

Evaluation de la qualité spermatique des mâles de bourdons sauvages en Belgique

Mémoire de fin d'études présenté par **Ambre Dormal**

En vue de l'obtention du diplôme de
Master en Biologie des Organismes et Écologie
à Finalité Spécialisée dans les métiers de l'éco-conseil

Directeur de mémoire

Prof. Denis Michez

Encadrante

Kimberly Przybyła

« Nous ne voyons jamais les choses telles qu'elles
sont, nous les voyons telles que nous sommes. »

Anaïs Nin

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Denis MICHEZ pour son accueil au sein du laboratoire de Zoologie et sa supervision durant ce mémoire. Merci d'avoir veillé à l'ambiance chaleureuse et accueillante du labo.

Un énorme merci à mon encadrante, Kimberly PRZYBYLA, sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour. Merci d'avoir accepté de travailler avec moi dans tes recherches, ce fut une expérience très enrichissante. Merci de m'avoir soutenue, dès le début, dans l'accomplissement de ce mémoire et d'avoir toujours veillé à ce que tout se déroule pour le mieux. Merci pour ton expertise, ta disponibilité, tes conseils et ton aide précieuse.

Également, merci à Baptiste MARTINET pour l'immense aide qu'il a fourni dans la collecte et l'acquisition des données. Merci pour tes conseils judicieux et le partage de ta connaissance sur les bourdons.

Un grand merci au laboratoire de Biologie Evolutive et Ecologie de l'ULB (EBE, Dr. Serge ARON) pour l'utilisation du cytomètre en flux ainsi qu'au laboratoire de Biologie marine de l'UMONS (Dr. Igor EECKHAUT) pour l'utilisation du microscope à épifluorescence.

Merci à mes parents de m'avoir transmis leur intérêt pour la Biologie et les petites bestioles et m'avoir ainsi permis d'en faire mon métier. Merci également à ma sœur et à mon frère d'avoir toujours été là pour moi.

Je ne peux terminer ces remerciements sans remercier mes amis les plus proches, Rémi et Lisa. Merci de m'avoir accompagné dans cette dernière année de master et dans ma quête aux bourdons à travers la Belgique. Votre aide a été précieuse, non seulement pour vos coups de filet mais aussi pour votre bonne humeur et votre soutien.

Merci Rémi d'avoir été le meilleur co-mémorant et ami possible. Je suis ravie d'avoir rencontré quelqu'un d'aussi passionné que moi par l'entomologie et la randonnée. Notre Erasmus en Italie restera mémorable ! Merci pour tous ces bons moments partagés depuis la master 1.

Finalement, merci Lisa d'avoir été à mes côtés tout au long de mes cinq années d'université. Merci pour tous ces apéros et sushis partagés, ainsi que tes fameux cocktails ! Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir, partager de bons moments, et me remonter le moral dans les moments plus difficiles, mes années universitaires auraient été bien différentes sans toi.

Résumé : Dans le contexte global du déclin de la biodiversité, les populations de bourdons ne sont pas épargnées. Ces pollinisateurs, indispensables dans nos régions tempérées pour la biodiversité végétale et la production agricole, se retrouvent menacés par la dégradation et la fragmentation de leurs habitats, l'agriculture intensive et le réchauffement climatique.

Alors que les recherches pour identifier et mieux comprendre les effets négatifs de ces menaces sur la santé des bourdons progressent, la plupart des études se concentrent uniquement sur les femelles. Les potentiels impacts sur les mâles sont, ainsi, rarement évalués. Ils sont pourtant davantage susceptibles d'être affectés par les stress environnementaux (*e.g.* vagues de chaleur, applications de pesticides, ...) que les femelles étant donné qu'ils vivent hors de la colonie une grande partie de leur vie, sans pouvoir bénéficier du refuge offert par cette dernière.

Lors de l'accouplement, la qualité spermatique du mâle est un facteur essentiel pour l'état de santé et la fitness des colonies résultantes, et donc, la santé des populations de bourdons. La grande majorité des reines sont monoandres et gardent un stock unique de spermatozoïdes jusqu'à la fin de leur vie. Dès lors, il est crucial que les mâles fournissent aux femelles, un stock spermatique de haute qualité pour mener au bon développement des colonies annuelles.

Jusqu'à présent, il a été démontré en laboratoire que des facteurs de stress agro-chimiques (*i.e.* pesticides) et thermiques (*i.e.* hautes températures) peuvent réduire la viabilité et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes stockés dans les vésicules séminales des mâles d'abeilles. Cependant, aucune étude n'a encore tenté d'évaluer la fertilité de bourdons mâles *in situ*. Il n'est ainsi pas encore clair si la qualité de l'habitat (*i.e.* occupation du sol, utilisation de pesticides, climat, ...) influence de manière locale et significative la fitness reproducteur des mâles.

En collectant des mâles de bourdons appartenant aux cinq espèces les plus abondantes en Belgique, sur plusieurs sites d'échantillonnage, nous avons évalué le taux de viabilité et de fragmentation de l'ADN spermatique de ces populations par cytométrie en flux comme proxy de la qualité spermatique. Nos résultats montrent une variabilité significative de la qualité spermatique entre les espèces mais également entre les stations.

Abstract: In the global context of biodiversity decline, bumblebee populations are not spared. These pollinators, essential in our temperate regions for plant biodiversity and agricultural production, are mainly threatened by degradation and fragmentation of their habitats, intensive farming, and climate change.

While research progresses to identify and better understand the negative effects of these threats on bumblebee health, most studies focus exclusively on females. Potential impacts on males are therefore rarely assessed. However, they are more likely to be affected by environmental stresses (*e.g.* heatwaves, pesticide exposure, ...) than females, as they spend a large part of their lives outside the colony, without having access to the refuge it provides.

During mating, male sperm quality is a crucial factor for the health and fitness of resulting colonies and thus, the fitness of bumblebee populations. The vast majority of queens are monoandrous and keep a unique stock of spermatozoa for the rest of their lives. Consequently, it is crucial for males to provide females with a high-quality sperm stock to ensure the successful development of annual colonies.

So far, it has been demonstrated under laboratory conditions that agrochemical (*i.e.* pesticides) and thermal (*i.e.* high temperatures) stress factors can reduce the viability and DNA integrity of spermatozoa stored in the seminal vesicles of male bees. However, no study has so far attempted to assess the fertility of male bumblebees *in situ*. It is therefore not clear whether habitat quality (*i.e.* land use, use of pesticides, climate, ...) has a local and significant influence on the male reproductive fitness.

By collecting males from the five most abundant bumblebee species in Belgium across several sampling sites, we assessed the viability and DNA fragmentation rate of their spermatozoa as a proxy for sperm quality, using flow cytometry. Our results reveal significant variability in sperm quality both among species and among stations.

Table des matières

I. Introduction	1
1. Diversité et importance des abeilles	1
2. Diversité et importance des bourdons	1
2.1. Écologie et services écosystémiques.....	1
2.2. Cycle de vie	2
2.3. Reproduction	4
3. Les bourdons en Belgique	5
4. Déclin des bourdons en Belgique	6
4.1. Tendances des populations.....	6
4.2. Facteurs de déclin.....	7
5. La fertilité des mâles comme indice de la santé des populations de bourdons	9
5.1 Spermatozoïdes.....	10
5.2. Facteurs de stress environnementaux	10
II. Objectifs	15
III. Matériels et méthodes	16
1. Projet initial du mémoire	16
2. Espèces cibles	17
2.1. <i>Bombus (Thoracobombus) pascuorum</i> (Scopoli, 1763).....	17
2.2. <i>Bombus (Bombus sensu stricto) terrestris</i> (Linnaeus, 1758)	17
2.3. <i>Bombus (Melanobombus) lapidarius</i> (Linnaeus, 1758).....	18
2.4. <i>Bombus (Pyrobombus) pratorum</i> (Linnaeus, 1761).....	19
2.5. <i>Bombus (Pyrobombus) hypnorum</i> (Linnaeus, 1758).....	19
3. Sites échantillonnés	20
4. Méthode de collecte	22
5. Extraction des spermatozoïdes	22
6. Évaluation de la qualité spermatique	23
6.1. Caractérisation des spermatozoïdes.....	24
6.2. Taux de viabilité des spermatozoïdes.....	24
6.3. Taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes	25
7. Analyses statistiques	26

IV. Résultats	27
1. Variabilité interspécifique de la longueur des spermatozoïdes	27
2. Taux de viabilité spermatique	29
2.1 Variabilité interspécifique	29
2.2. Variabilité interspécifique selon la station	30
2.3. Variabilité entre les stations	31
2.4. Effet de la station sur la variabilité interspécifique	32
3. Taux de fragmentation de l'ADN spermatique	33
3.1 Variabilité interspécifique	33
3.2. Variabilité interspécifique selon la station	34
3.3. Variabilité entre les stations	35
3.4. Effet de la station sur la variabilité interspécifique	36
V. Discussion.....	38
1. Variabilité interspécifique de la longueur des spermatozoïdes	38
2. Variabilité interspécifique de la qualité spermatique	39
3. Effet du site d'échantillonnage sur la variabilité intraspécifique de la qualité spermatique.....	40
4. Effet du site d'échantillonnage sur la qualité spermatique.....	45
4.1. Fragmentation de l'ADN spermatique.....	45
4.2. Viabilité spermatique	45
VI. Conclusion	49
VII. Perspectives	50
VIII. Bibliographie	
IX. Annexes	

I. Introduction

1. Diversité et importance des abeilles

Les abeilles (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila) représentent un groupe d'insectes très large et très diversifié. Plus de 20 000 espèces d'abeilles sont décrites dans le monde et 2 000 espèces sont présentes en Europe (Nieto *et al.*, 2014 ; Ascher & Pickering, 2020). La plupart des espèces d'abeilles sont solitaires mais une petite partie d'entre elles sont eusociales et vivent en colonie (< 10%) (Danforth, 2007).

Elles sont d'importants pollinisateurs et, de ce fait, indispensables pour nos cultures et la biodiversité végétale. Plus de 85 % des espèces de plantes à fleurs sauvages, et plus de 75% des principaux types de cultures vivrières dans le monde, dépendent, au moins partiellement, de la pollinisation biotique pour leur reproduction sexuée (Ollerton *et al.*, 2011 ; Potts *et al.*, 2016). Ainsi, le service de pollinisation fourni par les abeilles représente une valeur économique mondiale de 153 milliards d'euros par an (Gallai *et al.*, 2009). Parmi ces pollinisateurs, un groupe se démarque pour ses services de pollinisation particulièrement efficaces en Europe, les bourdons.

2. Diversité et importance des bourdons

Les bourdons sont des abeilles sociales appartenant au genre *Bombus* (Latreille, 1802). Environ 260 espèces de bourdons sont décrites dans le monde et 68 sont présentes en Europe (Nieto *et al.*, 2014 ; Cameron & Sadd, 2020). Parmi ces 68 espèces, 24 sont actuellement recensées en Belgique (Folschweiller *et al.*, 2020).

2.1. Écologie et services écosystémiques

Les bourdons sont des abeilles généralistes, c'est-à-dire qu'ils butinent sur un large éventail de plantes à fleurs, même si des préférences peuvent être observées (Rasmont *et al.*, 2015). Ce sont des pollinisateurs extrêmement efficaces, capables de butiner toute la journée à un rythme effréné, même par mauvaises conditions (*e.g.* fine pluie, vent, ...) ou basses températures (< 15°C) (Heinrich, 2004). Ces qualités font d'eux d'indispensables pollinisateurs dans les régions nordiques et tempérées pour la pollinisation d'une grande variété de plantes sauvages (Rasmont *et al.*, 2015).

Les bourdons sont l'un des rares genre d'abeilles à pouvoir polliniser certaines plantes par *buzz pollination* (De Luca & Vallejo-Marín, 2013). Beaucoup de plantes cultivées pour leurs fruits

et légumes exigent ce type de pollinisation, notamment celles de la famille des Solanaceae (*e.g.* tomates, aubergines, poivrons, ...). En Europe, une espèce en particulier se démarque pour sa facilité d'élevage et son caractère peu farouche, à savoir, *Bombus terrestris* (Figure 1). Elle est d'ailleurs domestiquée depuis plusieurs années maintenant (Velthuis, 2002). Les deux principales entreprises d'élevage de *B. terrestris* en Europe sont Biobest Group et Kopper France. Elles fournissent aux agriculteurs des colonies développées et prêtes à polliniser efficacement leurs cultures de fruits et légumes sous serre pour optimiser leurs rendements (*e.g.* tomates, fraises, ...) (Potts *et al.*, 2016). Les services rendus par les bourdons, sauvages ou domestiqués, sont donc essentiels pour la production de fruits et légumes mais aussi pour la biodiversité végétale globale (Rasmont *et al.*, 2015 ; Potts *et al.*, 2016).



Figure 1. Bombus terrestris. *B. terrestris* est l'une des espèces de bourdons les plus communes en Europe. A. Dormal.

2.2. Cycle de vie

Les bourdons sont des abeilles sociales qui vivent en colonies. Au sein d'une colonie cohabitent trois castes : la reine, les ouvrières et les mâles (Hutchinson, 1950). Chez les bourdons, seules les reines s'accouplent avec les mâles, les ouvrières n'assurent pas de reproduction sexuée mais peuvent pondre, à la fin du cycle de vie de la colonie, des œufs non fécondés, qui donneront alors uniquement des mâles (Bourke, 1988 ; Darrouzet & Corbara, 2016).

Chez la majorité des espèces de bourdons, les colonies ont un cycle annuel (Figure 2) (Michener, 2000). Au printemps, les reines fécondées de l'année précédente sortent d'hibernation et se mettent à la recherche d'un site de nidification (Alford, 1975 ; Goulson, 2003 ; Heinrich, 2004). Une fois le site choisi, la reine pond ses premiers œufs et occupe alors son temps entre couvrir le nid et butiner (Alford, 1975). Environ trois à cinq semaines après les premières pontes,

les premières ouvrières émergent (Alford, 1975 ; Heinrich, 2004). Celles-ci s'occupent du couvain et sortent collecter le nectar et le pollen nécessaires pour maintenir dans la colonie une quantité de réserves énergétiques suffisante (Goulson, 2003 ; Heinrich, 2004). La reine se consacre alors uniquement à la ponte et à la couvaison du nid (Alford, 1975 ; Goulson, 2003). Progressivement, de nouvelles ouvrières émergent, augmentant le nombre d'effectifs dans la colonie. Les individus sexués (nouvelles reines et mâles) émergent des derniers œufs que la reine pond. L'émergence de ces derniers signe la fin de la colonie (Alford, 1975 ; Heinrich, 2004). Les mâles et les nouvelles reines quittent le nid pour s'accoupler dès qu'ils sont aptes à voler (Heinrich, 2004). Contrairement aux nouvelles reines, les mâles ne retournent plus à la colonie une fois qu'ils la quittent, au risque d'être chassés par les ouvrières, agressives envers eux (Ratnieks & Reeve, 1992). En fin de cycle, il ne reste dans la colonie plus que la vieille reine et de vieilles ouvrières qui cessent de butiner et commencent à entrer en léthargie (Alford, 1975 ; Goulson, 2003). Avant l'hiver, seules les nouvelles reines fécondées survivent (Alford, 1975). Ces dernières cherchent alors un site d'hibernation, appelé *hibernaculum*, pour y passer l'hiver (Alford, 1975) et le cycle peut ensuite recommencer.

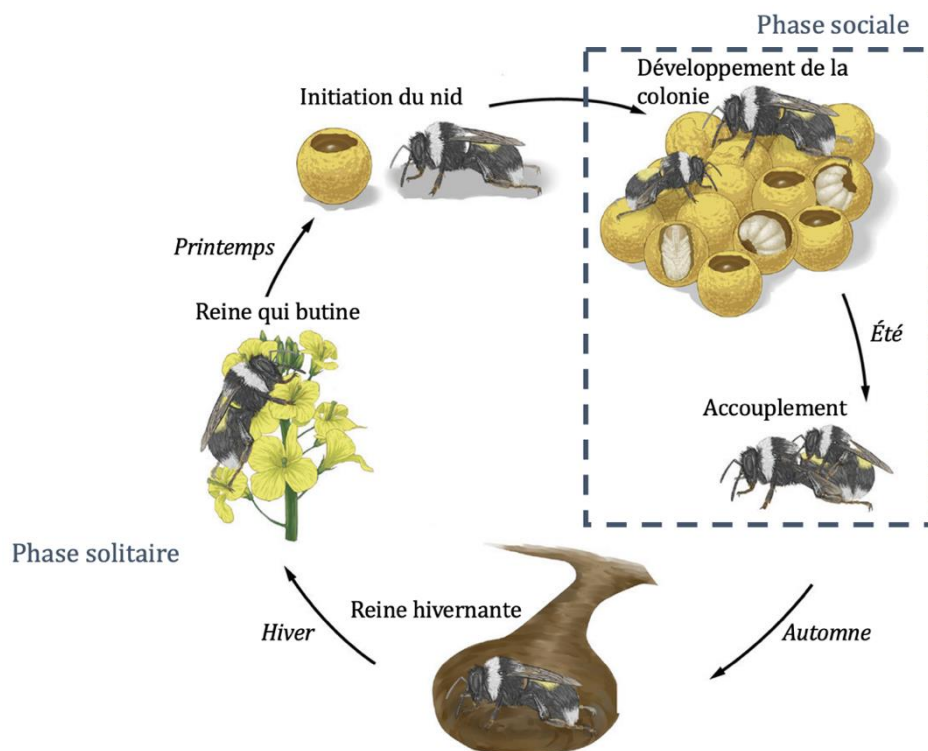


Figure 2. Cycle de vie d'une colonie de bourdons. La reine bourdon initie seule le nid en pondant ses premiers œufs. Les ouvrières qui en émergent s'occupent alors du couvain et collectent des ressources nutritives à l'extérieur. En fin de cycle, les sexués émergent et quittent la colonie pour s'accoupler. Seules les nouvelles reines fécondées survivent à la colonie et se mettent à l'abri pour y passer l'hiver. Adaptée de Wang et al. (2019).

2.3. Reproduction

2.3.1. Appareil reproducteur mâle

L'appareil reproducteur des mâles est composé de deux testicules, lieu de synthèse des spermatozoïdes, reliés chacun à un canal déférent (Figure 3) (Duvoisin *et al.*, 1999). Les deux canaux s'épaississent dans leur section médiane pour former les testicules accessoires, lieux de stockage des spermatozoïdes matures (Duvoisin *et al.*, 1999). Lors de l'accouplement, les spermatozoïdes sont recueillis par les canaux déférents qui aboutissent chacun à une glande accessoire qui libère une substance gélatineuse (*cf.* 2.3.3. Accouplement) (Duvoisin *et al.*, 1999). Les différentes sécrétions se rejoignent alors dans un canal éjaculatoire qui passe par l'endophallus, l'organe copulateur des mâles (Duvoisin *et al.*, 1999). L'appareil reproducteur mâle se termine par les parties externes sclérosées des genitalia, elles permettent au mâle de s'attacher fermement à la femelle lors de l'accouplement (Duvoisin *et al.*, 1999).

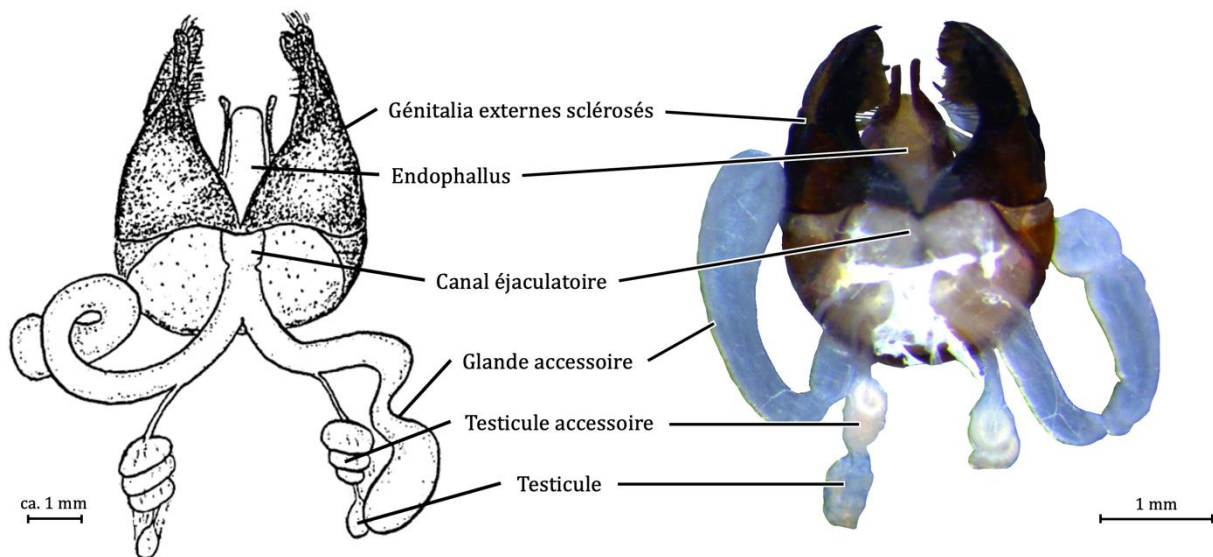


Figure 3. Appareil reproducteur mâle. À gauche, dessin de l'anatomie du système reproducteur du bourdon mâle. Adaptée d'Alford (1975). À droite, photo du système reproducteur d'un mâle de *B. pascuorum* mâle (K. Przybyla). Les spermatozoïdes sont produits dans les testicules puis stockés dans les testicules accessoires. Les glandes accessoires libèrent une substance gélatineuse qui forme un mating plug. L'endophallus est l'organe reproducteur des mâles. Les genitalia externes sclérosés permettent au mâle de s'accrocher à la femelle lors de l'accouplement.

2.3.2. Appareil reproducteur femelle

L'appareil reproducteur des femelles est composé de deux ovaires formés chacun de quatre ovarioles (Figure 4) (Duvoisin *et al.*, 1999). Chaque ovaire est relié à la bourse copulatrice par un oviducte (Duvoisin *et al.*, 1999). Au dos de cette bourse est située la spermathèque, lieu de stockage des spermatozoïdes mâles. Lors de l'accouplement, les spermatozoïdes y sont conduits en passant par un canal situé à l'avant de la bourse (Duvoisin *et al.*, 1999).

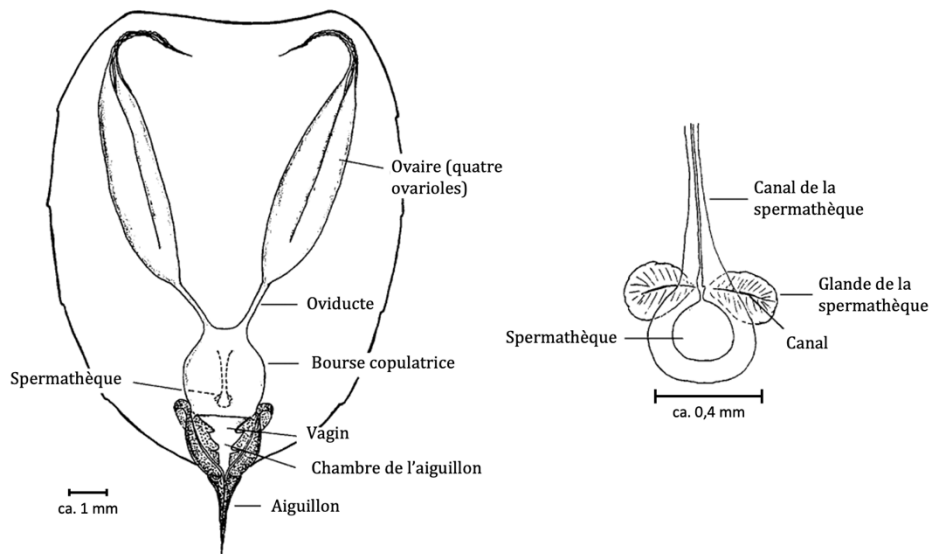


Figure 4. Appareil reproducteur femelle. Dessin de l'anatomie du système reproducteur du bourdon femelle. Adaptée d'Alford (1975).

2.3.3. Accouplement

Chez la majorité des espèces de bourdons, les reines sont monoandres c'est-à-dire qu'elles ne s'accouplent qu'une seule fois (Röseler, 1973 ; Alford, 1975). Au contraire, les mâles peuvent s'accoupler à plusieurs reprises, jusqu'à huit fois comme il a été observé chez *B. terrestris*, avec à chaque fois une partenaire différente (Röseler, 1973 ; Tasei *et al.*, 1998 ; Baer, 2003). Chez *B. terrestris*, l'accouplement dure en moyenne 36 minutes, cependant les deux premières minutes suffisent au mâle pour transférer la quantité de sperme nécessaire pour remplir la spermathèque de la femelle (Duvoisin *et al.*, 1999). Pour prévenir l'accouplement de la reine avec d'autres mâles, le mâle s'attache fermement à la femelle à l'aide de ses genitalia externes qui lui servent de forceps et sécrète abondamment, par ses glandes accessoires, une substance visqueuse qui remplit la bourse copulatrice de la femelle et forme un bouchon muqueux appelé *mating plug* (Williams, 1985 ; Duvoisin *et al.*, 1999). Ce *mating plug* empêche le passage des spermatozoïdes des éventuels futurs mâles qui voudraient se reproduire avec la même femelle (Duvoisin *et al.*, 1999).

3. Les bourdons en Belgique

Les bourdons sont distribués partout en Belgique car ce territoire présente des conditions favorables et des habitats propices à leur établissement (Folschweiller *et al.*, 2020). En effet, de par sa proximité avec la mer, la Belgique est caractérisée par un climat tempéré à forte tendance océanique (Climat.be, 2023). Les hivers et les étés sont relativement doux et présentent des températures clémentes tandis que les températures extrêmes restent occasionnelles.

La Belgique a pour avantage d'avoir des données sur sa faune de bourdons depuis plus d'un siècle, ces données historiques ont d'ailleurs permis de mettre en évidence les changements dans les populations de bourdons qui se sont produits suite, notamment, à la modification de l'occupation du sol (Ball, 1914, 1920 ; Vray, 2018 ; Vray *et al.*, 2019). Les populations de bourdons les plus diversifiées, en termes de nombre d'espèces, se trouvent dans l'Est de la Campine et dans le Sud de la Belgique (Figure 7) (Folschweiller *et al.*, 2020). Ces zones sont caractérisées par une grande densité de forêts et de prairies, de tels milieux sont extrêmement favorables aux bourdons (Le Féon *et al.*, 2010 ; Diaz-Forero *et al.*, 2013 ; Vray *et al.*, 2019). En effet, les prairies naturelles abritent une quantité importante et variée de sites de nidification et offrent des ressources florales abondantes et diversifiées tout au long de la saison (*e.g.* *Salix sp.* et *Helleborus sp.* au début du printemps, *Taraxacum sp.* et *Lamium sp.* au printemps, *Lavandula sp.* et *Centaurea sp.* en été et *Cirsium sp.* en fin d'été) (Carvell, 2002 ; Carvell *et al.*, 2004 ; Öckinger & Smith, 2007 ; Vereecken *et al.*, 2017). Les lisières de forêts quant à elles présentent également de bons sites de nidifications pour les espèces forestières comme *B. hypnorum* (Folschweiller *et al.*, 2020).

Au contraire, les milieux fortement anthropisés, c'est-à-dire qui présentent une haute densité de zones urbaines et agricoles, tendent à avoir une mauvaise influence sur les populations d'abeilles sauvages et présentent souvent uniquement les espèces de bourdons les plus communes (Vray, 2018 ; Vray *et al.*, 2019 ; Folschweiller *et al.*, 2020).

4. Déclin des bourdons en Belgique

4.1. Tendances des populations

Dans le contexte actuel de déclin généralisé, la Belgique, ainsi qu'une bonne partie du reste du monde, fait face à un appauvrissement de sa biodiversité (Cardinale *et al.*, 2012 ; Johnson *et al.*, 2017). Les bourdons ne font pas exception et sont également touchés par cette tendance (Drossart & Gérard, 2020).

Dans le but d'évaluer à l'échelle nationale et régionale le risque d'extinction des espèces végétales et animales, les listes rouges ont été mises au point et se sont révélées être un outil très efficace dans la lutte pour la conservation des espèces en danger d'extinction. Les listes rouges des abeilles d'Europe et de Belgique ont été publiées, respectivement, en 2014 et 2019 (Nieto *et al.*, 2014 ; Drossart *et al.*, 2019). En Europe, 28% des 68 espèces de bourdons évaluées sont menacées ou quasi menacées d'extinction alors que 8,8% des espèces sont classées dans la catégorie « données insuffisantes » (Figure 5) (Nieto *et al.*, 2014). Le pourcentage d'espèces menacées pourrait donc être en réalité plus élevé (jusqu'à 36,8%). En Belgique, la menace est assez prononcée, sur les 30 espèces de bourdons évaluées, 60% sont menacées ou quasi menacées

d'extinction tandis que 20% sont éteintes sur le territoire ou du moins n'y ont plus été observées depuis 1990 (Figure 5) (Drossart *et al.*, 2019).

Cette menace pesante sur la biodiversité des bourdons pèse également sur leurs précieux services de pollinisation, et ainsi, sur la biodiversité végétale et le rendement des cultures (Ollerton *et al.*, 2011 ; Potts *et al.*, 2016).

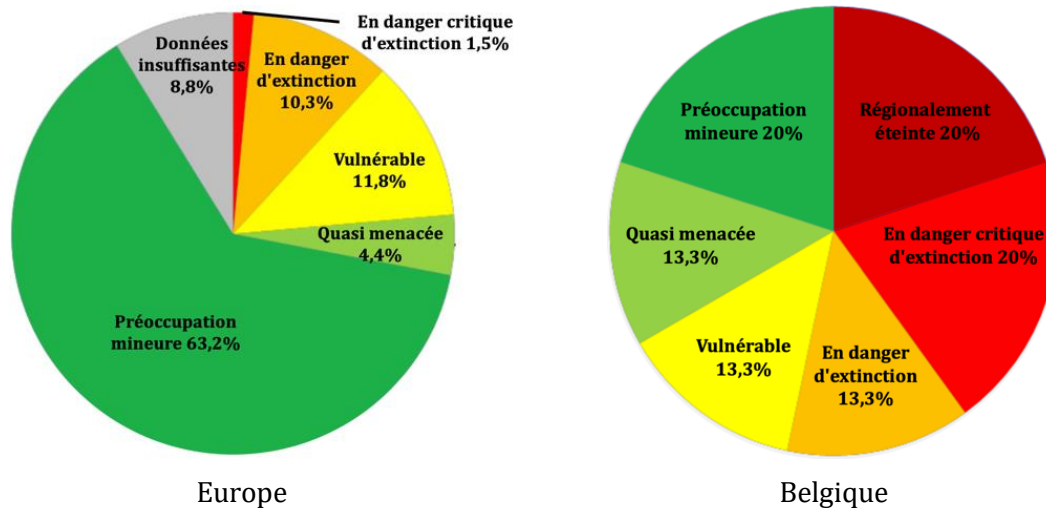


Figure 5. Statut des bourdons en Europe et en Belgique sur la liste rouge de l'IUCN. À gauche, statut de Bombus sp. en Europe. Adaptée de Nieto et al. (2014). À droite, statut de Bombus sp. en Belgique. Adaptée de Drossart et al. (2019). Un plus grand pourcentage d'espèces de bourdons se retrouve menacé en Belgique qu'en Europe.

4.2. Facteurs de déclin

Divers facteurs, dont plusieurs peuvent être imputés à l'Homme, ont été identifiés comme pouvant être à l'origine de ce déclin global. Parmi eux : (i) l'utilisation excessive des produits phytosanitaires dans l'agriculture (Goulson, 2003 ; Whitehorn *et al.*, 2012), (ii) la fragmentation d'habitats, causée principalement par l'accroissement de l'urbanisation et l'extension de l'agriculture (Goulson, 2003 ; Goulson *et al.*, 2008) et (iii) le changement climatique (Rasmont *et al.*, 2015 ; Soroye *et al.*, 2020).

Au cours du siècle dernier, l'occupation du sol belge s'est fortement remodelée suite à l'accroissement de l'urbanisation et l'intensification agricole (Figure 6) (Vray, 2018). Avec l'augmentation de la population humaine, le pourcentage du sol occupé par des zones urbanisées a considérablement augmenté (Rasmont *et al.*, 2019 ; Vray *et al.*, 2019). Pour répondre aux besoins de cette population croissante, les petites cultures à faible rendement se sont vues remplacées par de larges monocultures intensives (Rasmont *et al.*, 2019 ; Vray *et al.*, 2019). Les prairies, à l'époque de bonne qualité car riches en fleurs (non-graminées), ont vu leur superficie augmenter mais leur qualité diminuer à cause d'une densité de bétail plus élevée, d'une activité

de pâturage et de fauchage plus intensive ainsi que d'une utilisation d'engrais accrue pour augmenter les rendements (Rasmont *et al.*, 2019 ; Vray *et al.*, 2019). Actuellement, le centre de la Belgique est dominé par des zones agricoles et urbaines tandis que le Sud et le Nord-Est sont dominés par des zones de forêts et de prairies (Figure 6) (Fuchs *et al.*, 2015). La population belge se concentre principalement dans la région flamande, la région Bruxelles-Capitale et les régions urbaines de Charleroi-Liège-Namur (StatBel, 2023). Le Sud de la Belgique est lui faiblement peuplé et par conséquent, faiblement urbanisé (StatBel, 2023).

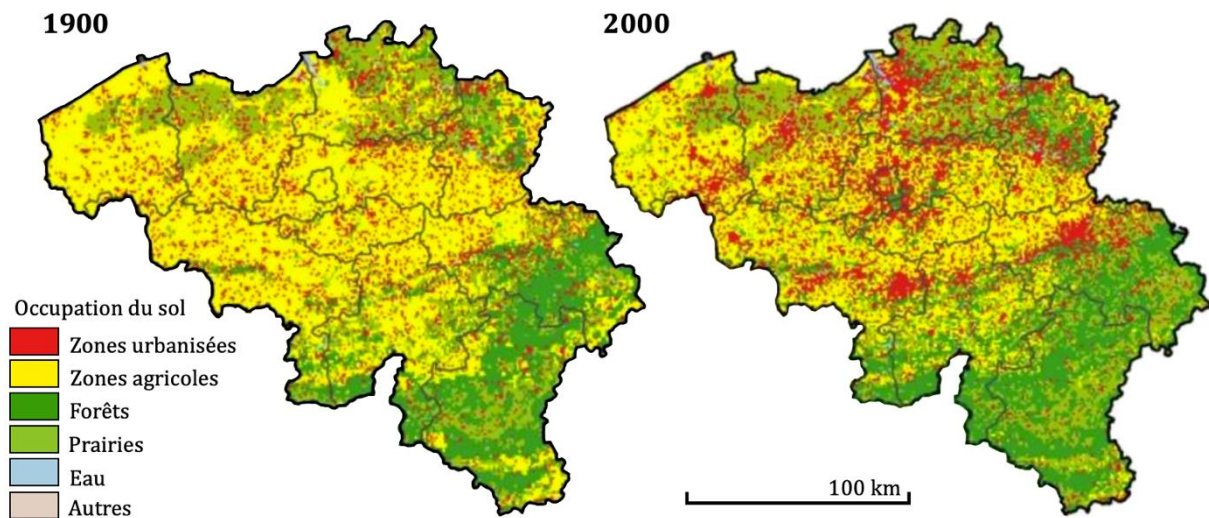


Figure 6. Occupation du sol belge en 1900 et 2000. En un siècle l'occupation du sol belge s'est remodelée, avec notamment un fort accroissement des zones urbanisées. Adaptée de Fuchs et al. (2015).

Ces zones anthropisées semblent coïncider avec les zones possédant une plus faible diversité d'espèces (Figure 7) (Vray, 2018). Les zones agricoles possèdent une diversité florale réduite de par le remplacement des petites cultures pérennes par de grandes monocultures intensives (Rasmont & Mersch, 1988). Ces dernières sont, pour la majorité, des cultures de céréales et de betteraves sucrières, et ne possèdent donc aucune valeur nutritive pour les bourdons (Vray *et al.*, 2019). De plus, les zones agricoles possèdent une surface de nidification disponible très limitée (Fussell & Corbet, 1992 ; Svensson *et al.*, 2000 ; Kells & Goulson, 2003). En effet, les fréquentes perturbations que subissent les sols agricoles, causées par les activités de labourage, de fauchage et d'ensilage, les rendent inhospitaliers pour les bourdons qui nichent majoritairement au niveau ou sous le sol (Kells & Goulson, 2003 ; Vray, 2018). De plus, ces zones agricoles peuvent provoquer chez les espèces sensibles, des effets néfastes supplémentaires liés à l'utilisation excessive de pesticides (*cf.* 5.2. Facteurs de stress environnementaux) (Blacquiere *et al.*, 2012 ; Lu *et al.*, 2020). Au niveau des zones urbaines, les surfaces imperméabilisées (*e.g.* bitume, goudron, ...) réduisent également la surface disponible pour nidifier ainsi que l'abondance et la diversité des ressources nutritives disponibles. Cependant, les jardins urbains pourraient faire office de « refuges » pour

les pollinisateurs puisqu'ils sont susceptibles d'offrir des sites de nidification divers (tas de pierres, touffes d'herbes, cabanes à oiseaux, ...) ainsi que des ressources fourragères (Osborne *et al.*, 2008 ; Ahrne *et al.*, 2009 ; Diaz-Forero *et al.*, 2013). Finalement, l'augmentation des surfaces agricoles, des routes et des bâtiments, qui découlent de l'urbanisation croissante, entraînent une fragmentation des habitats (Fischer & Lindenmayer, 2007). Ces patches d'habitats dispersés et isolés les uns des autres obligent les bourdons à parcourir de plus grandes distances pour satisfaire leurs besoins (ressources nutritives, matériaux pour la construction du nid, ...) (Fischer & Lindenmayer, 2007).

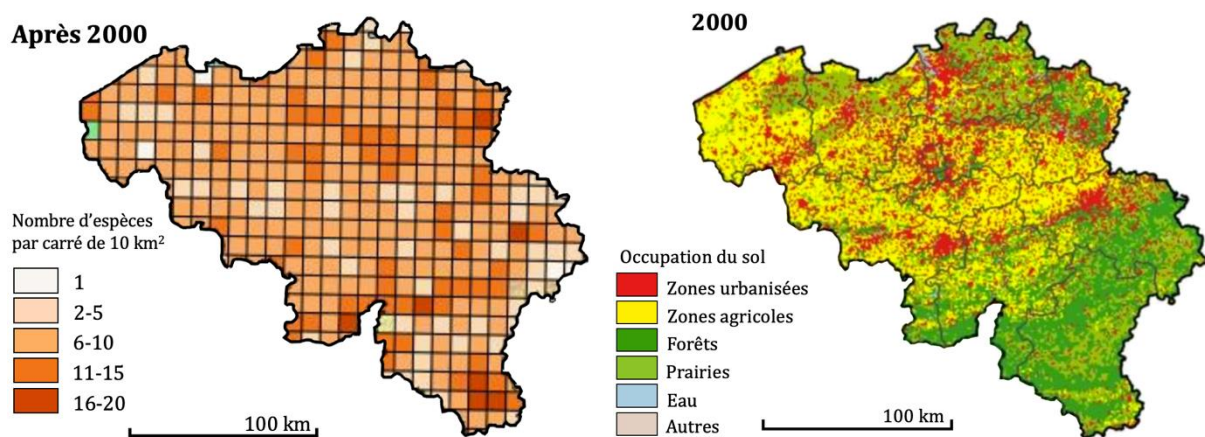


Figure 7. Comparaison de la diversité des bourdons de Belgique avec l'occupation de son sol. À gauche, carte de la Belgique représentant le nombre d'espèces de bourdons observées par carré UTM de 10km², après 2000. Adaptée de Folschweiller *et al.* (2020). À droite, occupation du sol de la Belgique en 2000. Adaptée de Fuchs *et al.* (2015). Les carrés de 10km² avec un nombre élevé d'espèces (16-20) correspondent à des zones avec une forte densité de forêts et/ou de prairies tandis que les régions occupées en majorité par des zones agricoles et urbanisées possèdent un nombre plus faible d'espèces (<16).

5. La fertilité des mâles comme indice de la santé des populations de bourdons

Bien souvent lorsqu'il est question d'étudier les effets négatifs que pourrait engendrer un stress sur la santé des populations de bourdons, les observations sont faites à l'échelle de la colonie (masse du couvain, production de reines, ...) (*e.g.* Whitehorn *et al.*, 2012 ; Scholer & Krischik, 2014 ; Vanderplanck *et al.*, 2014), et prennent donc en compte uniquement les ouvrières et les reines qui la composent. Les mâles, n'apparaissant qu'en fin de cycle et, quittant le nid dès qu'ils sont aptes à voler, participent peu à l'organisation de la colonie (Heinrich, 2004). Ils ont ainsi longtemps été considérés comme de « *simple and small mating machines* » (Tsuji, 1996) et moins pris en compte dans les études (Belsky *et al.*, 2020 ; Zhao *et al.*, 2021). En tant que géniteurs, ils jouent pourtant un rôle crucial dans le devenir de chaque colonie (Belsky *et al.*, 2020). Le mâle transmet à la femelle son matériel génétique, par l'intermédiaire d'un stock de spermatozoïdes, stock que la reine gardera tout au long de sa vie pour féconder ses œufs qui permettront de

construire une colonie (Alford, 1975). La qualité de ce stock spermatique est dès lors crucial pour la fitness des colonies résultantes. En effet, une colonie ne peut se développer correctement si la reine fondatrice reçoit du mâle un stock de spermatozoïdes altérés, comme suggéré par Pettis *et al.* (2016) chez *Apis mellifera*.

5.1 Spermatozoïdes

Les spermatozoïdes des bourdons sont caractérisés par un long flagelle filiforme et un noyau très allongé (Figure 8) (Baer *et al.*, 2003). Leur longueur est en moyenne de 170 μm chez *B. terrestris* mais peut varier entre frères, entre mâles de colonies différentes et entre espèces (Baer *et al.*, 2003, 2006). Lorsque les mâles émergent, leurs testicules sont actifs et développés comparé aux testicules accessoires (Duchateau & Marien, 1995). Ils dégénèrent au fur et à mesure que les spermatozoïdes produits migrent vers les testicules accessoires pour y être stockés (Duchateau & Marien, 1995). Lorsque les mâles atteignent la maturité sexuelle, les testicules régressent et cessent de produire des spermatozoïdes (Baer, 2003). Les mâles bourdons possèdent donc un stock fini de spermatozoïdes et ne peut être renouvelé en cas de stress subis (Baer, 2003).



Figure 8. Spermatozoïdes de *B. terrestris*. Photo sous microscope optique (grossissement 40x) de 3 spermatozoïdes de *B. terrestris* colorés au VitalScreen (FertiPro). Le noyau est coloré en rose tandis que le flagelle apparaît transparent. K. Przybyla.

5.2. Facteurs de stress environnementaux

Plusieurs facteurs de stress environnementaux sont connus pour impacter la qualité des spermatozoïdes des mâles, nous pouvons notamment citer : (i) les pesticides (Linguadoca *et al.*, 2021 ; Minnameyer *et al.*, 2021 ; Strobl *et al.*, 2021) et (ii) les stress hyperthermiques (Pettis *et al.*, 2016 ; Martinet *et al.*, 2021a ; Champion *et al.*, 2023).

5.2.1. Pesticides

Généralisée depuis la moitié du 20^e siècle, l'utilisation des pesticides est omniprésente dans l'agriculture (Goulson, 2003). Bien que des tests de toxicité strictement réglementés soient requis avant la mise en vente d'un produit chimique (protocoles OCDE), la plupart des pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché possèdent un manque crucial de données quant à leurs effets sublétaux sur les abeilles (Rasmont *et al.*, 2015). Ces lignes directrices proposées par l'OCDE pour évaluer la toxicité d'un produit chimique visent principalement à déterminer la LD₅₀ du produit, *i.e.* la dose à laquelle 50% des individus meurent, et considèrent donc uniquement les potentiels effets létaux. Pourtant, des études plus approfondies ont permis de mettre en évidence la présence d'effets sublétaux pouvant être tout aussi dramatiques pour la survie des individus et des colonies (Linguadoca *et al.*, 2021 ; Minnameyer *et al.*, 2021 ; Strobl *et al.*, 2021).

Durant la dernière décennie, plusieurs études ont néanmoins permis de mettre en évidence l'apparition d'effets sublétaux sur les ouvrières et les reines bourdons suite à une exposition temporaire ou prolongée aux pesticides (Gill *et al.*, 2012 ; Straw & Brown, 2021 ; Straw *et al.*, 2021). Ces études ont suggéré qu'une exposition chronique pouvait causer une diminution du développement de la colonie (Scholer & Krischik, 2014 ; Barraud *et al.*, 2020), une diminution de longévité chez les reines (Scholer & Krischik, 2014) et une réduction de la production de jeunes reines (Whitehorn *et al.*, 2012 ; Rundlöf *et al.*, 2015). Elle pourrait également engendrer des effets néfastes sur le comportement des ouvrières comme une baisse d'activité (Cresswell *et al.*, 2014 ; Scholer & Krischik, 2014) et une diminution de l'efficacité de recherche de nourriture (Gill *et al.*, 2012 ; Feltham *et al.*, 2014 ; Stanley *et al.*, 2016), possiblement due à une altération de l'apprentissage et de la mémoire (Stanley *et al.*, 2015 ; Phelps *et al.*, 2018). Outre ces dégâts évalués à l'échelle de la colonie, quelques études ont également mis en évidence les impacts négatifs que peuvent avoir les pesticides sur les mâles. Des mâles d'abeilles exposés de manière chronique à des doses de pesticides réalistes à celles enregistrées sur le terrain ont montré une réduction significative de leur viabilité spermatique, réduisant ainsi leur fertilité (Straub *et al.*, 2016 pour *A. mellifera* ; Minnameyer *et al.*, 2021 pour *B. terrestris* ; Strobl *et al.*, 2021 pour *Osmia cornuta*).

Les bourdons peuvent se retrouver exposés aux pesticides à différents stades de leur développement, et ce par deux voies d'exposition majeures (Gradish *et al.*, 2019). Premièrement, les bourdons qui quittent la colonie peuvent entrer directement en contact avec des pesticides lorsqu'ils butinent sur des cultures en fleurs pulvérisées à ce moment-là ou lorsqu'ils se heurtent aux nuages de poussières que génère la plantation de semences chimiquement traitées (Goulson, 2003 ; Krupke *et al.*, 2012 ; Tapparo *et al.*, 2012 ; Godfray *et al.*, 2014 ; Gradish *et al.*, 2019). Cela

concerne uniquement les ouvrières butineuses, les mâles et les reines qui cherchent de la nourriture en début et fin de cycle de la colonie. Le couvain n'est pas pour autant épargné puisqu'au sein même du nid, larves et adultes peuvent être exposés aux résidus de pesticides présents dans le sol (Krupke *et al.*, 2012 ; Goulson, 2013 ; Gradish *et al.*, 2019). Deuxièmement, les bourdons peuvent être exposés aux pesticides en consommant les récompenses florales de plantes contaminées (Goulson, 2003 ; Gradish *et al.*, 2019). En effet, de par leur nature systémique, les pesticides de la classe des néonicotinoïdes se retrouve dans le nectar et le pollen des plantes traitées mais aussi des mauvaises herbes aux alentours des cultures (Goulson, 2003, 2013 ; Krupke *et al.*, 2012 ; Whitehorn *et al.*, 2012 ; Gradish *et al.*, 2019). Cette nourriture contaminée est ensuite rapportée et stockée dans le nid, exposant ainsi larves et adultes (Krupke *et al.*, 2012 ; Gradish *et al.*, 2019).

5.2.2. Stress hyperthermique

Le changement climatique se traduit principalement par l'augmentation de la température moyenne de la surface de la Terre et l'augmentation de la fréquence des phénomènes extrêmes tels que les sécheresses, les fortes pluies et les vagues de chaleur (Karl, 2003 ; Dutta & Radner, 2009 ; Herring *et al.*, 2015). En Belgique, l'Institut Royal de Météorologie définit une vague de chaleur comme étant une période minimale de cinq jours successifs où les températures maximales sont supérieures à 25°C et dont au moins trois sont supérieures à 30°C (IRM, 2023). L'activité anthropique semble augmenter leurs chances d'occurrence (Stott *et al.*, 2004). Les vagues de chaleurs sont particulièrement néfastes pour les pollinisateurs (Folschweiller *et al.*, 2020) et ne sont donc pas à négliger lorsque l'on évalue la santé des bourdons. D'autant plus qu'elles seront, dans la seconde moitié du 21^{ème} siècle, de plus en plus fréquentes, longues et intenses en Europe (Meehl & Tebaldi, 2004). Cela est d'ailleurs déjà observable dans les données collectées en Belgique ces cent dernières années, qui témoignent d'une augmentation de la fréquence des épisodes de vagues de chaleur (Figure 9).

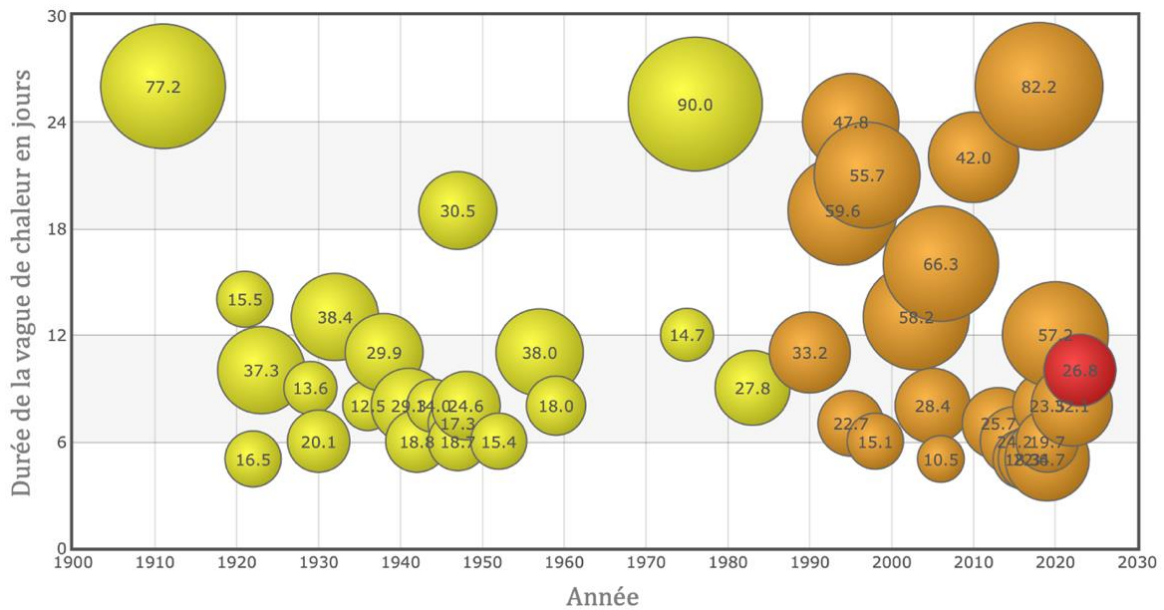


Figure 9. Vagues de chaleur enregistrées en Belgique à Uccle (station météorologique de référence) de 1900 à 2023. Une vague de chaleur est considérée comme étant une période minimale de cinq jours successifs durant lesquels les températures maximales sont supérieures à 25°C dont au moins trois sont supérieures à 30°C. La couleur des ronds correspond à la période avant et après 1988 (respectivement jaune et orange), date à partir de laquelle le réchauffement climatique a commencé à être plus perceptible en Europe. Le rond rouge correspond à 2023. La taille des ronds est proportionnelle au poids de la vague de chaleur. Considérant 20°C comme température moyenne de référence, une journée avec une température moyenne de 23,6°C aura un poids de 3,6. Le poids de la vague de chaleur correspond à la somme des poids de chaque journée qui la compose. Adaptée de Mievis (2023).

Les bourdons sont des insectes adaptés au froid, cela fait d'eux des espèces particulièrement sensibles à de fortes températures (Heinrich, 2004). De ce fait, les vagues de chaleur représentent pour eux un stress important. Un bourdon soumis à un stress hyperthermique persistant finit par entrer en état de stupeur thermique et peut potentiellement en mourir (Hance *et al.*, 2007 ; Martinet *et al.*, 2015a, 2021b ; Zambra *et al.*, 2020). De plus, des effets sublétaux sont observés chez les individus ayant survécus à la stupeur thermique (Martinet *et al.*, 2021a).

De nombreuses études ont déjà démontré qu'un stress hyperthermique pouvait entraîner une dégradation de la qualité du sperme chez les mâles au travers le règne animal : des mammifères aux insectes, en passant par les oiseaux et les poissons (*e.g.* Pérez-Crespo *et al.*, 2008 ; Breckels & Neff, 2013 ; Hurley *et al.*, 2018, Sales *et al.*, 2018). Cette baisse de qualité du sperme peut se traduire par des dommages à l'ADN et/ou une diminution de la viabilité des spermatozoïdes, de leur motilité et de leur concentration (Paynter *et al.*, 2014). Les bourdons ne font pas exception, il a récemment été démontré que les spermatozoïdes stockés dans leurs testicules sont sensibles lors d'une exposition à de hautes températures (Martinet *et al.*, 2021a ; Campion *et al.*, 2023). Alors qu'il ne semble ne pas y avoir d'effet sur *B. terrestris*, une espèce connue pour sa grande résistance, un stress thermique de 40/45°C réduit significativement la viabilité des

spermatozoïdes chez les mâles de *B. jonellus*, *B. magnus* et *B. impatiens* (Martinet *et al.*, 2021a ; Champion *et al.*, 2023).

Les bourdons étant des pollinisateurs cruciaux, il est essentiel d'évaluer l'état de santé générale de leurs populations pour mener, si besoin, à l'élaboration de mesures de conservation dans le but de protéger leur diversité mais aussi leurs précieux services de pollinisation. Le bon développement des colonies étant, en partie, assuré par la fertilité saine des mâles, l'évaluation de leur qualité spermatique peut être utilisée comme indice de la santé des populations.

II. Objectifs

Ce mémoire a pour but d'évaluer, en milieu naturel, la qualité spermatique (*i.e.* la viabilité et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes) des cinq plus abondantes espèces de bourdons en Belgique, dans différents sites présentant des contraintes éco-climatiques et agro-environnementales différentes.

Les réponses aux contraintes environnementales étant largement *species-specific* chez les bourdons, nous émettons l'hypothèse qu'une espèce ubiquiste et résistante comme *B. terrestris*, présente en moyenne une qualité spermatique supérieure comparé aux quatre autres espèces moins ubiquistes et avec une niche climatique plus étroite.

Par ailleurs, nous suggérons que la qualité spermatique des mâles provenant de zones densément urbanisées et à forte activité agricole devrait être plus faible que celles des mâles provenant de zones plus isolées de l'activité humaine et possédant une plus grande densité d'habitats naturels (hors zones agricoles).

Enfin, cette étude explore pour la première fois la pertinence de mettre en place une surveillance de l'état physiologique des populations d'abeilles sauvages par l'intermédiaire de la mesure simple et rapide de la qualité spermatique, représentant un proxy de l'état de santé général des populations sauvages.

III. Matériels et méthodes

1. Projet initial du mémoire

Le plan initial du mémoire était de capturer des reines bourdons de différentes espèces et de les placer individuellement en micro-colonie, sous des conditions contrôlées de laboratoire, afin que chacune initie une colonie, jusqu'à la production de mâles. L'objectif étant, pour chaque espèce, de récupérer ces mâles et les diviser en un groupe témoin, ayant grandi sous des conditions optimales, et un groupe test, auquel nous aurions fait subir un stress thermique de 40°C jusqu'à la stupeur thermique. Le but était ainsi de mesurer, pour chaque espèce, la qualité spermatique de référence (*i.e.* viabilité et fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes) et la qualité spermatique à la suite d'un stress thermique simulant les effets que pourrait avoir une vague de chaleur dans la nature.

Pour cela, des reines de bourdons sauvages fécondées (*i.e.* *B. hypnorum*, *B. lucorum*, *B. lapidarius*, *B. magnus*, *B. pascuorum* et *B. pratorum*) ont été collectées durant la fin de l'été et le début de l'automne 2022 dans les landes de bruyères à Kalmthout. Après avoir été mise en hibernation pendant deux mois (température : 5°C, humidité : 100%), chaque reine a été placée individuellement dans une boîte d'élevage en plastique transparent (8×16×16 cm), sensiblement sous les mêmes conditions d'élevage utilisées pour *B. terrestris* (température : 24°C, humidité : 50-55%). Malgré le succès de l'hibernation, aucune reine n'a initié de colonie viable ayant mené à la production de mâles. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer cela. Tout d'abord, contrairement à *B. terrestris*, les espèces de bourdons sauvages nécessitent des gammes de températures plus strictes car elles possèdent une tolérance à la température plus étroite. Deuxièmement, il semble que les reines n'étaient pas dans un environnement optimal (*e.g.* allées et venues dans la salle d'élevage, interférences sonores, éclairage, ...) et ont ainsi pu être stressées. Finalement, les espèces sauvages n'ont pas toutes les mêmes exigences en matière de nidification, certaines nichent dans le sol, d'autres à la surface, ou encore dans des troncs d'arbres et n'ont donc pas les mêmes exigences en termes de luminosité, d'humidité, ... Des protocoles d'élevage strictes à chaque espèce devraient être établis à l'avenir afin de permettre l'étude des espèces sauvages en laboratoire.

Le projet n'ayant donc pas pu être mené à terme, il a fallu mettre au point un nouveau projet (projet présenté dans ce travail) faisable en trois mois, temps entre le retour du stage effectué à l'étranger et la seconde session.

2. Espèces cibles

Le choix des espèces s'est porté sur les cinq espèces de bourdons les plus répandues et communes en Belgique, à savoir : *B. hypnorum*, *B. lapidarius*, *B. pascuorum*, *B. pratorum* et *B. terrestris* (Folschweiller *et al.*, 2020) Ces cinq espèces ont toutes été évaluées comme étant en préoccupation mineure dans la liste rouge des abeilles de Belgique et d'Europe (Nieto *et al.*, 2014 ; Drossart *et al.*, 2019).

2.1. *Bombus (Thoracobombus) pascuorum* (Scopoli, 1763)

Bombus pascuorum est l'espèce de bourdon la plus abondante en Belgique (Figure 10) (Rasmont & Pauly, 2010). L'espèce niche au niveau du sol ou au-dessus dans des touffes d'herbes ou des tapis de mousse (Fussel & Corbet, 1992). Elle se plaît dans tous les milieux, également les milieux urbains, bien qu'elle semble avoir une préférence pour les zones plus ou moins boisées (Folschweiller *et al.*, 2020). L'espèce est très opportuniste concernant les ressources florales (Folschweiller *et al.*, 2020). Les reines possèdent une stratégie de reproduction particulière en pondant des mâles par vagues successives pendant la plus grande durée du cycle, contrairement aux quatre autres espèces chez lesquelles les mâles émergent en fin de cycle (Folschweiller *et al.*, 2020).

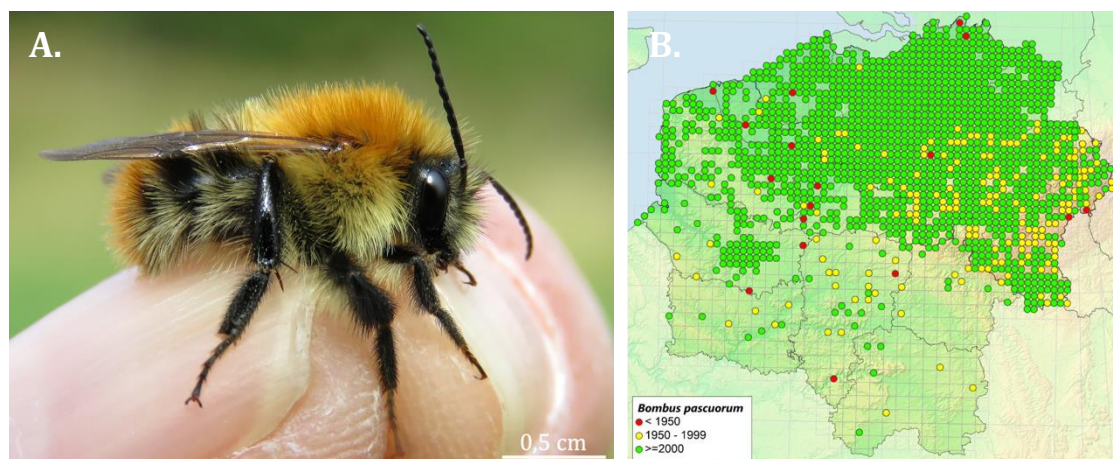


Figure 10. *Bombus (Thoracobombus) pascuorum*. A. Mâle de *B. pascuorum*. S. Falk. B. Carte des observations de *B. pascuorum* en Belgique et dans le Nord de la France (67 269 spécimens). La carte est divisée en grille UTM de 10 km². Les points rouges sont les individus recensés avant 1950, les points jaunes sont ceux recensés entre 1950 et 1999 et les points verts sont ceux recensés après 2000. Folschweiller *et al.* (2020).

2.2. *Bombus (Bombus sensu stricto) terrestris* (Linnaeus, 1758)

Bombus terrestris est la deuxième espèce la plus abondante en Belgique (Figure 11) (Rasmont & Pauly, 2010). Cette espèce est extrêmement ubiquiste et très opportuniste en ce qui concerne les ressources florales (Folschweiller *et al.*, 2020). Elle niche dans des cavités souterraines, par

exemple des nids de rongeurs abandonnés (Fussel & Corbet, 1992). Grâce à sa domestication qui a eu lieu durant le 20^{ème} siècle en Europe, elle est utilisée dans le secteur agricole pour ses services de pollinisation et dans la recherche scientifique comme organisme modèle des abeilles (Velthuis, 2002 ; Potts *et al.*, 2016). Cette espèce est connue pour sa grande résistance aux stress hyperthermiques (Zambra *et al.*, 2020 ; Martinet *et al.*, 2021b).

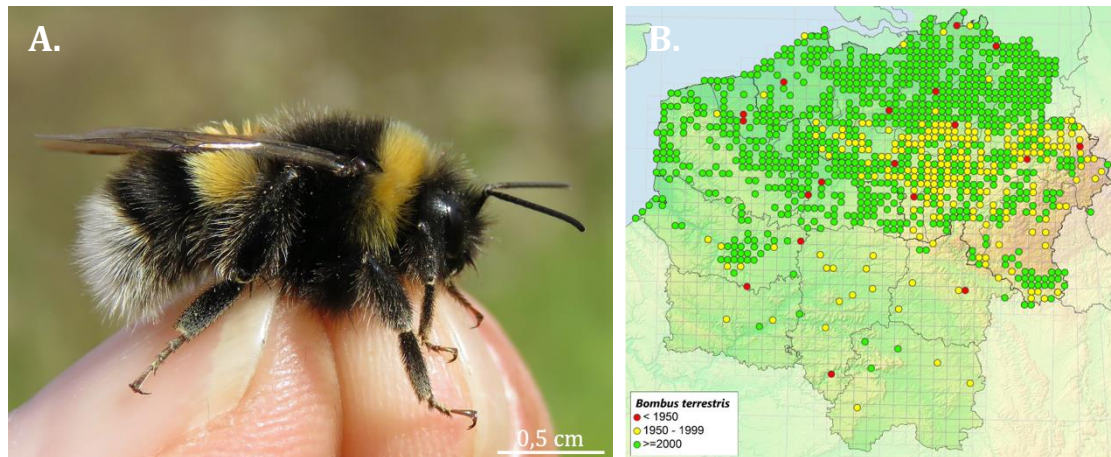


Figure 11. *Bombus (Bombus sensu stricto) terrestris*. A. Mâle de *B. terrestris*. S. Falk. B. Carte des observations de *B. terrestris* en Belgique et dans le Nord de la France (17 084 spécimens). Folschweiller *et al.* (2020).

2.3. *Bombus (Melanobombus) lapidarius* (Linnaeus, 1758)

Bombus lapidarius apprécie particulièrement les milieux ouverts (prairies, jardins, lisières de bois, ...) (Figure 12) (Svensson *et al.*, 2000). Elle niche souvent dans des endroits non ombragés comme un tas de pierre ou une brèche dans un mur (Kells & Goulson, 2003). Cette espèce est généraliste concernant les ressources florales (Folschweiller *et al.*, 2020). Les mâles émergent tardivement, en juillet (Bergman & Bergström, 1996).

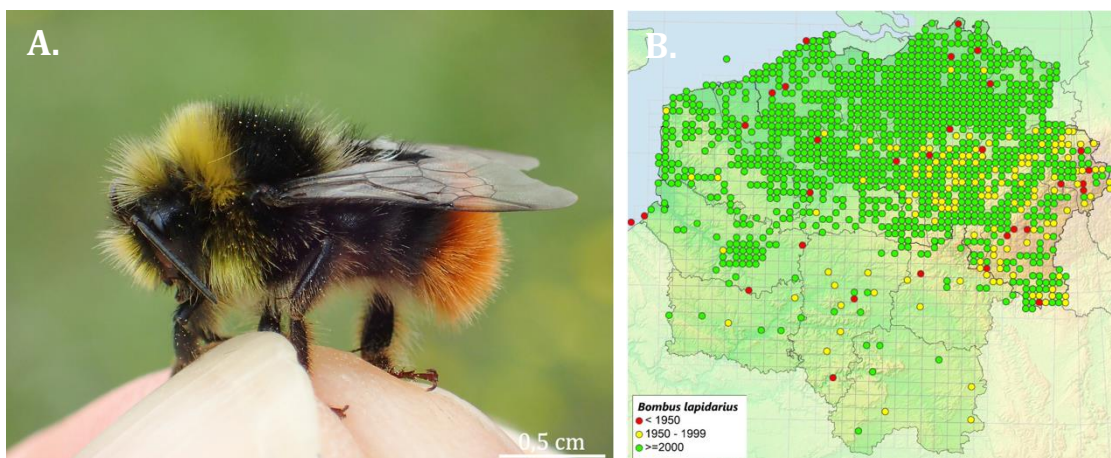


Figure 12. *Bombus (Melanobombus) lapidarius*. A. Mâle de *B. lapidarius*. S. Falk. B. Carte des observations de *B. lapidarius* en Belgique et dans le Nord de la France (38 092 spécimens). Folschweiller *et al.* (2020).

2.4. *Bombus (Pyrobombus) pratorum* (Linnaeus, 1761)

Bombus pratorum est rencontré dans tous les milieux, avec une préférence pour les milieux arborés, bien qu'il puisse être absent dans les milieux les plus urbanisés (Figure 13) (Folschweiller *et al.*, 2020). L'espèce est relativement opportuniste concernant les choix floraux et les sites de nidification (Kells & Goulson, 2003). Les mâles sont cependant souvent trouvés à butiner sur des ronces (*Rubus* spp.) (Folschweiller *et al.*, 2020). Les reines de cette espèce émergent tôt dans la saison et produisent des mâles dès le mois de mai (Folschweiller *et al.*, 2020). Le cycle de la colonie se termine tôt, avant juillet/août (Rasmont & Iserbyt, 2012).

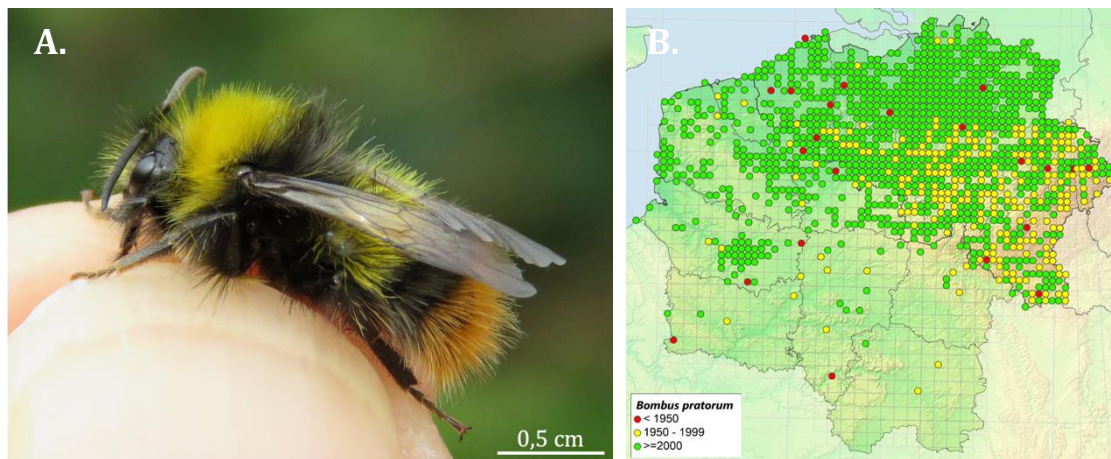


Figure 13. *Bombus (Pyrobombus) pratorum*. A. Mâle de *B. pratorum*. S. Falk. B. Carte des observations de *B. pratorum* en Belgique et dans le Nord de la France (19 591 spécimens). Folschweiller *et al.* (2020).

2.5. *Bombus (Pyrobombus) hypnorum* (Linnaeus, 1758)

Cette espèce niche dans les cavités des troncs d'arbres mais peut également nicher dans des cavités artificielles comme des nichoirs à oiseaux (Figure 14) (Folschweiller *et al.*, 2020). L'espèce est associée aux milieux boisés mais se plaît également dans les milieux suburbains (Folschweiller *et al.*, 2020). Les reines de *B. hypnorum* ont la particularité d'être polyandres (Baer *et al.*, 2003). Cette espèce est souvent observée à butiner sur des plants de ronces (*Rubus* spp.) (Folschweiller *et al.*, 2020). Les mâles émergent en juin et l'espèce peut terminer son cycle avant juillet/août (Rasmont & Iserbyt, 2012).

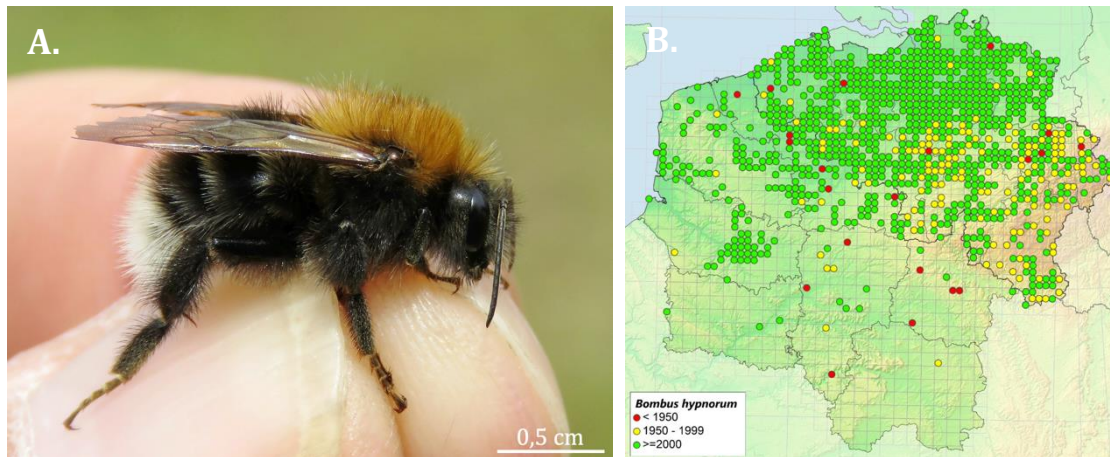


Figure 14. *Bombus (Pyrobombus) hypnorum*. A. Mâle de *B. hypnorum*. S. Falk. B. Carte des observations de *B. hypnorum* en Belgique et dans le Nord de la France (10 228 spécimens). Folschweiller et al. (2020).

3. Sites échantillonnés

Le choix des sites s'est porté sur ceux les plus échantillonnés en Belgique. Ball F.J est l'un des premiers à s'être intéressé aux populations de bourdons de Belgique et a entrepris, à partir de 1910, une immense collecte à travers le pays (Ball, 1914, 1920). Les sites les plus échantillonnés par Ball et ses collaborateurs, *i.e.* 29 anciennes communes, ont été repris dans le cadre du projet BELBEES (Rasmont *et al.*, 2019) et six d'entre-eux ont à nouveau été échantillonnés de 2013 à 2015 par S. Vray dans le cadre de ses travaux visant à étudier le déclin des bourdons en Belgique à la suite des changements de l'occupation du sol et de l'influence du climat (Vray, 2018 ; Vray *et al.*, 2019).

Les cinq sites sélectionnés pour ce mémoire (Dworp, Kalmthout, Ostende, Spa et Trivières) sont répartis à travers la Belgique, à différentes altitudes (Ostende : 4 m, Kalmthout : 18 m, Dworp : 45 m, Trivières : 57 m et Spa : 253 m), avec un gradient de continentalité allant de la zone atlantique du pays, à la zone continentale (Figure 15). Ils représentent différents types d'occupation du sol (Dworp : urbain ; Kalmthout : prairies ; Ostende et Trivières : agricole ; Spa : forêts), avec un gradient d'artificialisation allant de zones fortement anthropisées (*i.e.* Dworp, Ostende et Trivières) à des zones moins urbanisées (*i.e.* Kalmthout) et dominées par la forêt (*i.e.* Spa) (*cf.* IX. Annexes, Figure A1-A5)(Vray, 2018 ; Vray *et al.*, 2019).

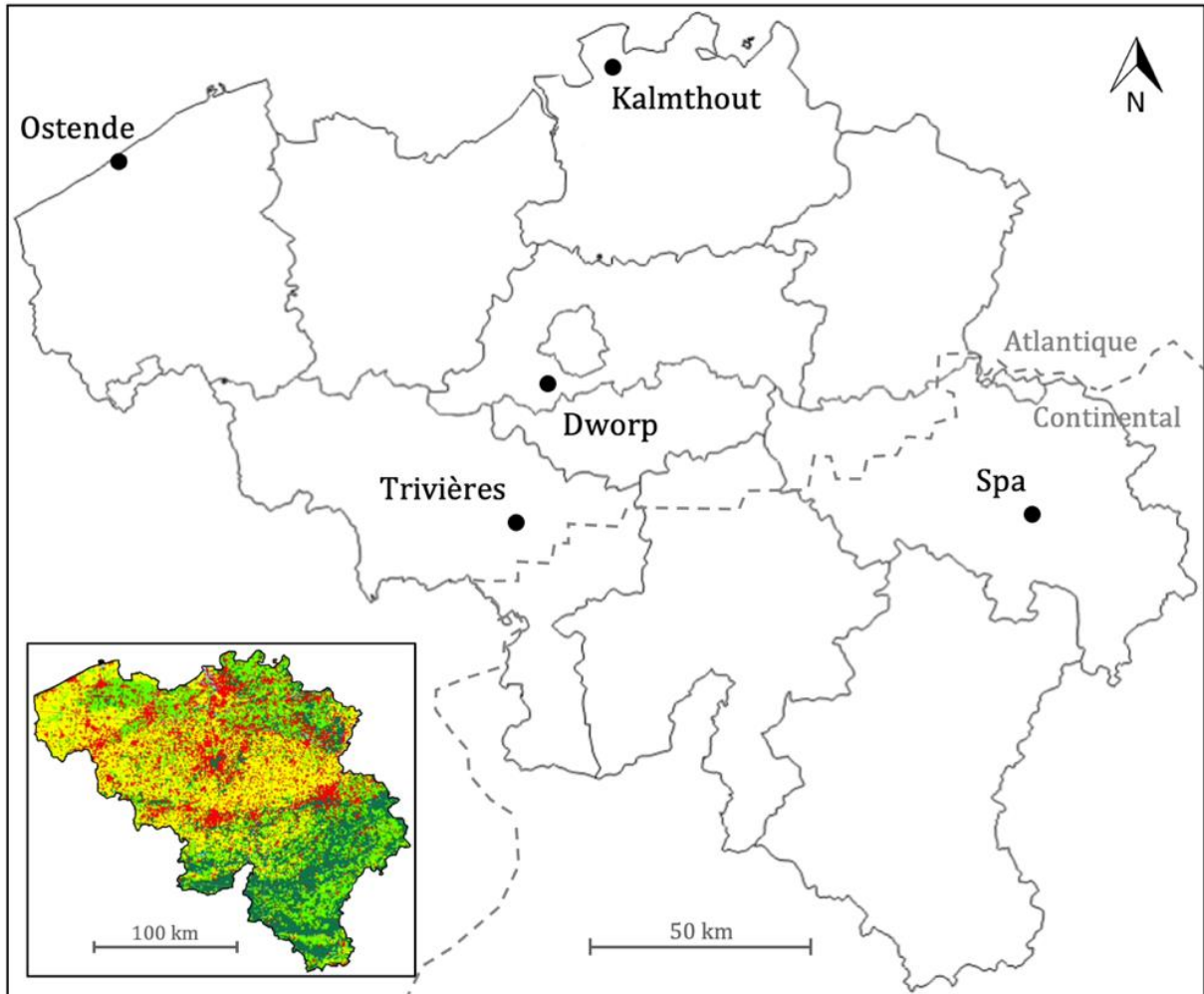


Figure 15. Position géographique des sites échantillonnés. Aperçu des cinq sites échantillonnés à travers la Belgique : Ostende (Altitude : 4 m), Kalmthout (Altitude : 18 m), Dworp (Altitude : 45 m), Trivières (Altitude : 57 m) et Spa (Altitude : 253 m). En pointillé, la séparation entre la zone continentale et la zone atlantique. En bas à gauche, l'occupation du sol en Belgique en 2000 (jaune : zones agricoles, rouge : zones urbanisées, vert clair : prairies, vert foncé : forêts). Adaptée de Fuchs et al. (2015).

4. Méthode de collecte

La collecte s'est déroulée au début de la période de vol des bourdons mâles soit du 08 juin au 25 juillet 2023, suivant la phénologie de chaque espèce. Les bourdons ont été capturés à l'aide d'un filet et placés individuellement dans un pot en plastique troué afin de permettre une aération. Les pots ont été gardés dans un sac en toile régulièrement humidifié et placé à l'ombre afin de limiter le stress durant le transport. Il était prévu de collecter vingt individus par espèce pour chaque site, soit 500 individus au total. Les collectes des espèces tardives, *i.e.* *B. pascuorum* et *B. lapidarius*, ont cependant été compromises par les mauvaises conditions météorologiques de la seconde moitié du mois de juillet. Chaque site a été échantillonné deux à quatre fois au cours de l'été, au début de la période d'émergence des mâles de chaque espèce, afin de s'assurer qu'ils soient dans leur pic de maturité. De plus, afin d'avoir des individus d'âge similaire, nous avons veillé à ce qu'un maximum d'individus soient prélevés le jour même ou, le cas échéant, la même semaine. Le jour même de la collecte, les bourdons mâles ont été regroupés par espèce et placés dans des boîtes d'élevage en plastique transparent (8×16×16 cm) pour y passer la nuit et être disséqués le lendemain. Ils ont été maintenus sous des conditions de laboratoire optimales, à une température de 24-25°C et une humidité relative de 50-55%, dans l'obscurité totale. Les bourdons ont été nourris *ad libitum* avec une solution sucrée (Biogluc, Biobest Group NV).

5. Extraction des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes des bourdons ont été extraits suivant le protocole de Martinet *et al.* (2021a) (Figure 16). Brièvement, le bourdon est maintenu entre le pouce et l'index et légèrement massé au niveau du thorax afin de le calmer. Avec le pouce, une légère pression est exercée le long de la face interne de l'abdomen jusqu'à l'extrémité de ce dernier afin de faire sortir les genitalia. Une fois les parties externes chitineuses des genitalia visibles, ces dernières sont délicatement tirées à l'aide d'une pince jusqu'à en sortir l'endophallus, les testicules et les glandes accessoires. Le tout est déposé dans une boîte de pétri, sur une goutte de 100 µl d'un tampon phosphate salin ou PBS (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 10 mM Na₂HPO₄ ; 1,76 mM KH₂PO₄ ; pH 7,4) préalablement déposée. Ensuite, à l'aide de la face plate d'un scalpel, les genitalia sont écrasées une vingtaine de fois dans la solution. Cette dernière est récupérée dans un micro-tube d'1,5 ml. Une deuxième goutte de 100 µl de PBS est ajoutée à l'endroit où les genitalia ont été écrasées, afin de récupérer les éventuels spermatozoïdes restés dans la boîte de pétri. Ainsi, pour chaque individu est récupéré un extrait spermatique de 200 µl. Une fois extraits, les échantillons dédiés à l'analyse de la viabilité ont tout de suite été préparés pour analyse tandis que ceux dédiés à la fragmentation ont été conservés à - 20°C pour analyse ultérieure.

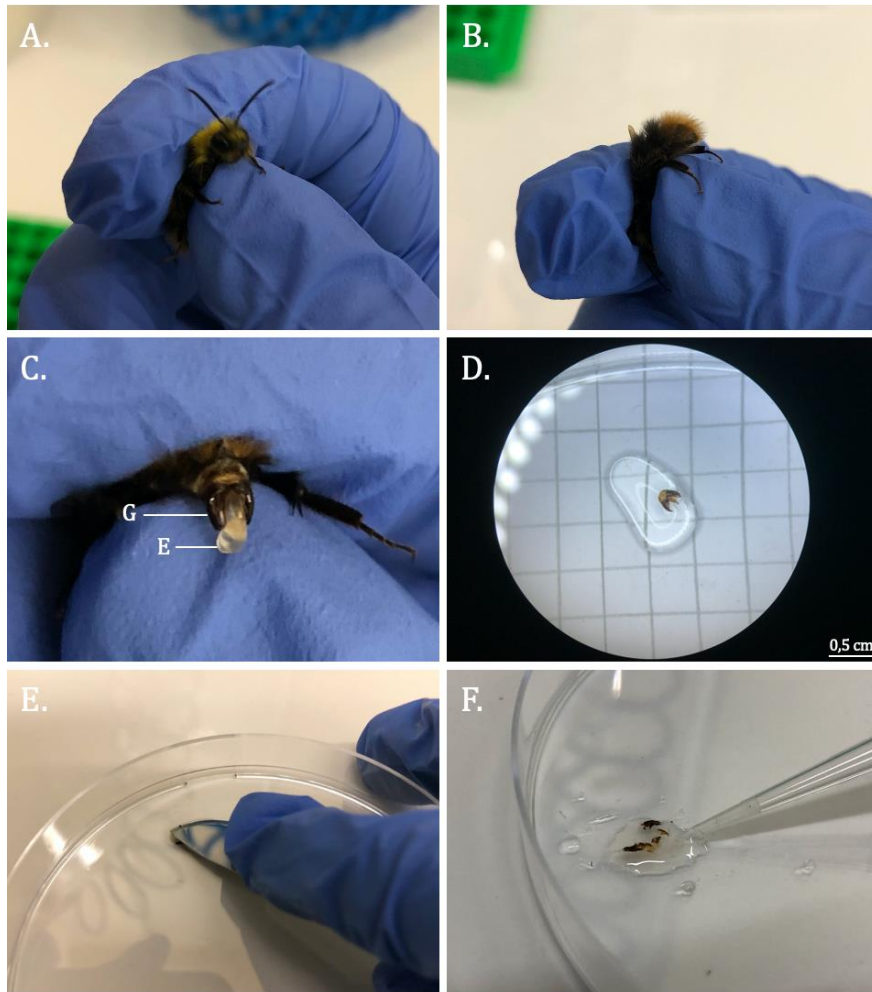


Figure 16. Méthode d'extraction des spermatozoïdes chez un mâle de *B. pratorum*. *A.* Le bourdon est maintenu entre le pouce et l'index au niveau du thorax. *B.* Une légère pression est exercée le long de la face interne de l'abdomen pour forcer l'éjaculation. *C.* Les parties externes chitineuses du genitalia (G) sont tirées à l'aide d'une pince pour en sortir l'endophallus (E), les testicules et les glandes accessoires. *D.* Le tout est déposé sur une goutte de PBS. *E.* Les genitalia sont écrasés une vingtaine de fois avec la face plate d'un scalpel pour libérer les spermatozoïdes dans la solution *F.* La solution est récupérée à l'aide d'un tips coupé en biais. *A.* Dormal.

6. Évaluation de la qualité spermatique

La qualité du sperme de chaque espèce a été évaluée en utilisant deux paramètres : (i) le taux de viabilité des spermatozoïdes et (ii) le taux de fragmentation de l'ADN spermatique (Evenson, 2013 ; Paynter *et al.*, 2014). Les mesures ont été réalisées par cytométrie en flux (CyFlow® Space Sysmex) à faible débit (0,5 µl/sec), en comptant un minimum de 1 000 000 événements. Toutes les données obtenues à partir du cytomètre ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo v10.9.0 (Treestar, Ashland, OR). Pour chacune des cinq espèces, tous les individus provenant du même site (± 20 réplicas) ont été divisés en deux groupes égaux de manière à obtenir (i) ± 10 réplicas pour mesurer le taux de viabilité des spermatozoïdes et (ii) ± 10 réplicas pour mesurer le taux de fragmentation de l'ADN spermatique. Les deux mesures ont donc été prises de manière indépendante, sur des individus différents.

6.1. Caractérisation des spermatozoïdes

Conjointement aux analyses par cytométrie en flux, des lames microscopiques de référence pour chaque espèce étudiée ont été préparées. Brièvement, pour chaque espèce, après extraction des spermatozoïdes d'un mâle, ceux-ci sont dilués dans 200 μ l de PBS. A l'échantillon sont ajoutés 5 μ l de SYBR-14 dilué 50x (*cf.* 6.2. Taux de viabilité des spermatozoïdes), la solution est ensuite laissée à incuber 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Sur deux lames microscopiques, 10 μ l sont déposés puis recouverts d'une lamelle. Les lames ont été observées à la fois par microscopie optique et à épifluorescence dans le but d'observer les noyaux et les corps des cellules. Finalement, la longueur de sept spermatozoïdes par individu a été mesurée (*i.e.* de l'apex de la tête à l'extrémité du flagelle) à l'aide du logiciel d'analyse d'images Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). Les mesures ont été comparées statistiquement afin de déterminer de potentielles différences interspécifiques.

6.2. Taux de viabilité des spermatozoïdes

Le taux de viabilité des spermatozoïdes, *i.e.* la proportion de spermatozoïdes morts et vivants dans le sperme, a été évalué à l'aide du *LIVE/DEAD Sperm Viability kit* (Molecular Probes, ThermoFisher). Le kit contient deux colorants d'acide nucléiques : (i) le SYBR-14, perméable à la membrane cellulaire, qui marque par fluorescence les spermatozoïdes vivants en vert et (ii) l'iodure de propidium (PI), imperméable à la membrane cellulaire, qui marque par fluorescence les spermatozoïdes morts en rouge. De par ses propriétés physico-chimiques, le SYBR-14 pénètre facilement les membranes cellulaires pour se lier à l'ADN spermatique. Le fluorochrome émet dans le vert lorsqu'il est excité à une longueur d'onde d'excitation de 400 à 537 nm. Le PI, de par sa taille et sa charge, est incapable de traverser les membranes cellulaires sauf si celles-ci ont perdu leur intégrité membranaire, comme c'est le cas chez les spermatozoïdes morts. Il se lie également à l'ADN spermatique, et inhibe la fluorescence du SYBR-14 (Paynter *et al.*, 2014). Ainsi, seuls les spermatozoïdes morts sont marqués par le PI et seuls les spermatozoïdes vivants sont marqués par le SYBR-14 (Garner & Johnson, 1995). Le PI émet dans le rouge lorsqu'il est excité à une longueur d'onde d'excitation au-dessus de 419 à 650 nm. Chaque extrait spermatique (\pm 200 μ l) a été porté à 1 ml avec du PBS et un volume de 5 μ l de SYBR-14 y a été ajouté. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante dans le noir, un volume de 5 μ l de PI a été ajouté et la solution a, à nouveau, été mise à incuber pendant 10 minutes. Finalement, chaque échantillon a directement été passé sous le cytomètre en flux. En excitant chaque cellule à l'aide d'un laser ($\lambda_{\text{excitation}} = 488$ nm pour SYBR-14 ; $\lambda_{\text{excitation}} = 365$ nm pour PI), le cytomètre détecte, pour chaque spermatozoïde de l'échantillon, le fluorochrome lié à l'ADN selon sa longueur d'onde d'émission ($\lambda_{\text{émission}} = 536$ nm pour SYBR-14 ; $\lambda_{\text{émission}} = 630$ nm pour PI). Pour chaque échantillon, les

spermatozoïdes sont distingués des autres cellules et résidus par des stratégies de gating en se basant sur leur taille et leur granulométrie.

La viabilité spermatique est estimée en calculant le ratio du nombre de spermatozoïdes qui ont gardé leur membrane intègre, c'est-à-dire les spermatozoïdes vivants, sur le nombre total de spermatozoïdes.

$$\text{Taux de viabilité (\%)} = \left(\frac{\text{Nb spermatozoïdes vivants}}{\text{Nb spermatozoïdes totaux}} \right) \times 100$$

6.3. Taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes

L'acridine orange (AO) a été utilisée comme fluorochrome suivant la méthode SCSA ou *Sperm Chromatin Structure Assay* (Evenson, 2013) pour évaluer le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. L'AO est un colorant d'acides nucléiques perméable à la membrane cellulaire. Lorsqu'il s'intercale aux molécules d'ADN double brin (ADNdb), il émet par fluorescence dans le vert tandis que lorsqu'il s'intercale à des molécules d'ADN simple brin (ADNsb), c'est-à-dire de l'ADN fragmenté, il émet dans le rouge. Les extraits spermatiques ($\pm 200 \mu\text{l}$) conservés à -20°C ont d'abord été décongelés. Pendant ce temps, cinq solutions ont été préparées pour la coloration :

- Une solution détergente acide (150 mM NaCl ; 0,08 N HCl ; 0,1% Triton X-100 ; pH 1,2)
- Un tampon de coloration (150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 100 mM acide citrique ; 200 mM Na₂PO₄ ; pH 6)
- Une solution stock d'AO (6 mg d'AO pour 6 ml d'eau distillée)
- Une solution de marquage d'AO (120 μl de solution stock pour 19,88 ml de tampon de coloration)
- Une solution d'équilibration de l'AO (375 μl de solution détergente acide pour 1,125 ml de solution de marquage d'AO)

La solution d'équilibration de l'AO est passée dans le cytomètre en flux pendant 15 minutes avant le début des mesures pour le calibrer. Un volume de 333 μl de solution détergente acide est ajouté à 166 μl d'extrait spermatique. Après 30 secondes, 1ml de la solution de marquage est ajouté. Après 3 minutes, l'échantillon est passé sous le cytomètre en flux. En excitant chaque cellule à l'aide d'un laser ($\lambda_{\text{excitation}} = 502 \text{ nm}$ pour ADNdb ; $\lambda_{\text{excitation}} = 460 \text{ nm}$ pour ADNsb), le cytomètre détecte, pour chaque spermatozoïde de l'échantillon la longueur d'onde d'émission du fluorochrome intercalé à l'ADN ($\lambda_{\text{émission}} = 525 \text{ nm}$ pour ADNdb ; $\lambda_{\text{émission}} = 650 \text{ nm}$ pour ADNsb). Le taux de fragmentation de l'ADN spermatique correspond au ratio de la fluorescence rouge, qui correspond à l'ADN endommagé, sur la fluorescence totale (verte + rouge) :

$$\text{Taux de fragmentation de l'ADN (\%)} = \left(\frac{\text{fluorescence rouge}}{\text{fluorescence totale}} \right) \times 100$$

7. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été exécutées à l'aide du logiciel Rstudio (R Development Core Team, 2019). Afin de visualiser et comparer graphiquement les résultats de viabilité et de fragmentation obtenus pour les différents groupes, des boîtes de dispersion ont été réalisées utilisant le *ggplot2 package* (Hadley Wickham, 2019). Des tests de significativité ont ensuite été effectués afin de déterminer les possibles différences significatives de qualité spermatique entre les espèces de bourdons et les stations. Pour cela, les conditions d'utilisation d'un test paramétrique ont d'abord été évaluées à l'aide d'un test Shapiro-Wilk pour vérifier la distribution des données et d'un test de Bartlett pour vérifier leur homoscedasticité. Une transformation logarithmique ($\log(x/1-x)$) a été appliquée sur les données brutes lorsque celles-ci ne suivaient pas une distribution normale. Un test paramétrique ANOVA a ensuite été employé sur les données transformées satisfaisant les conditions d'utilisation (distribution normale et homoscedasticité des données). Un test post-hoc paramétrique utilisant la méthode HSD de Tukey a été utilisé lorsque l'ANOVA montrait une différence significative, afin de discriminer quel(s) groupe(s) se différencient significativement. Pour déterminer si les conditions météorologiques de chaque sites ont pu avoir un effet significatif sur les pourcentages de viabilité et de fragmentation de l'ADN spermatique mesurés, des tests de corrélation de Spearman ont été effectués utilisant à chaque fois un facteur météorologique différent (*i.e.* moyennes mensuelles des températures maximales journalières, moyennes mensuelles des températures moyennes journalières et températures extrêmes mensuelles).

IV. Résultats

1. Variabilité interspécifique de la longueur des spermatozoïdes

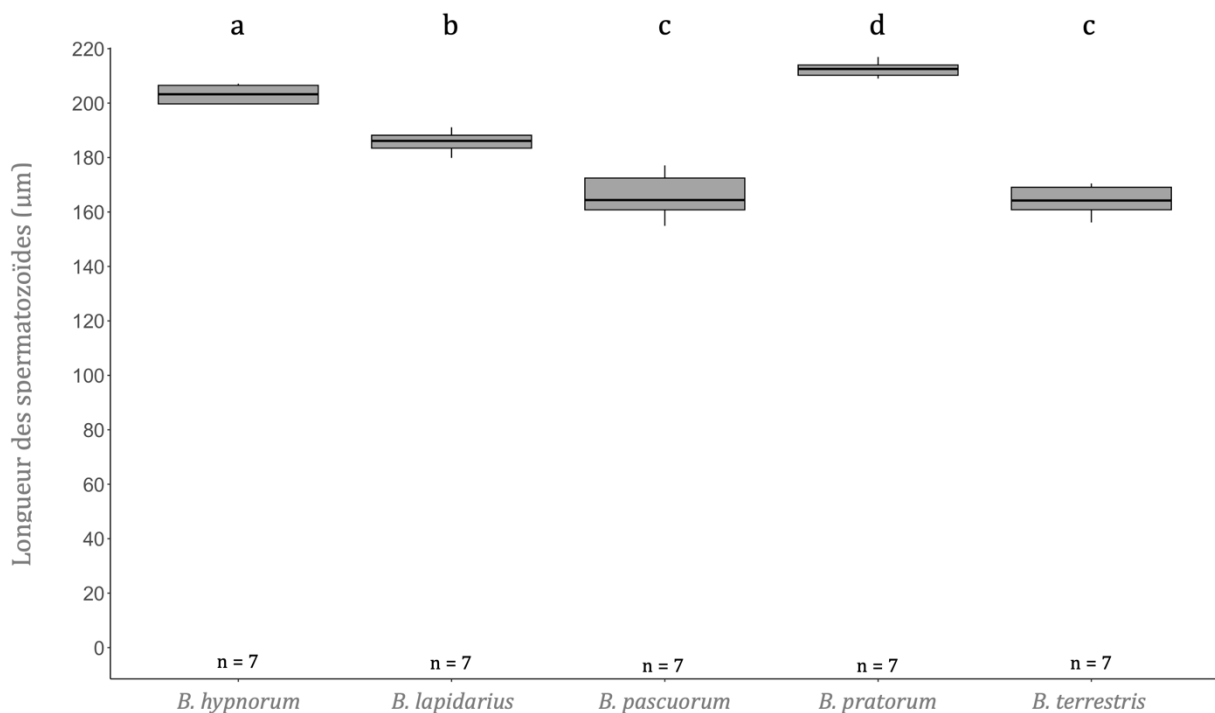


Figure 17. Variabilité interspécifique de la longueur des spermatozoïdes chez les cinq espèces de bourdons échantillonnées : *B. hypnorum* (médiane : 203,2 µm), *B. lapidarius* (médiane : 186,1 µm), *B. pascuorum* (médiane : 164,4 µm), *B. pratorum* (médiane : 212,5 µm), et *B. terrestris* (médiane : 164,2 µm). Les lettres au-dessus des boîtes de dispersion correspondent aux groupes soutenus par un test de comparaison multiple post-hoc. Pour chaque espèce, la longueur de sept spermatozoïdes a été mesurée provenant d'un seul individu.

Pour chaque espèce, la longueur de sept spermatozoïdes provenant tous d'un même individu a été mesurée (Figure 17). La longueur moyenne des spermatozoïdes est de $203,2 \pm 3,6$ µm pour *B. hypnorum*, $185,8 \pm 3,9$ µm pour *B. lapidarius*, $166,1 \pm 8,2$ µm pour *B. pascuorum*, $212,4 \pm 2,8$ µm pour *B. pratorum*, et $164,4 \pm 5,4$ µm pour *B. terrestris*. Les moyennes varient de manière significative entre les espèces (ANOVA, $F = 123,3$, $df = 4$, $p < 2e^{-16}$) excepté entre *B. pascuorum* et *B. terrestris* ($p = 0,967$).

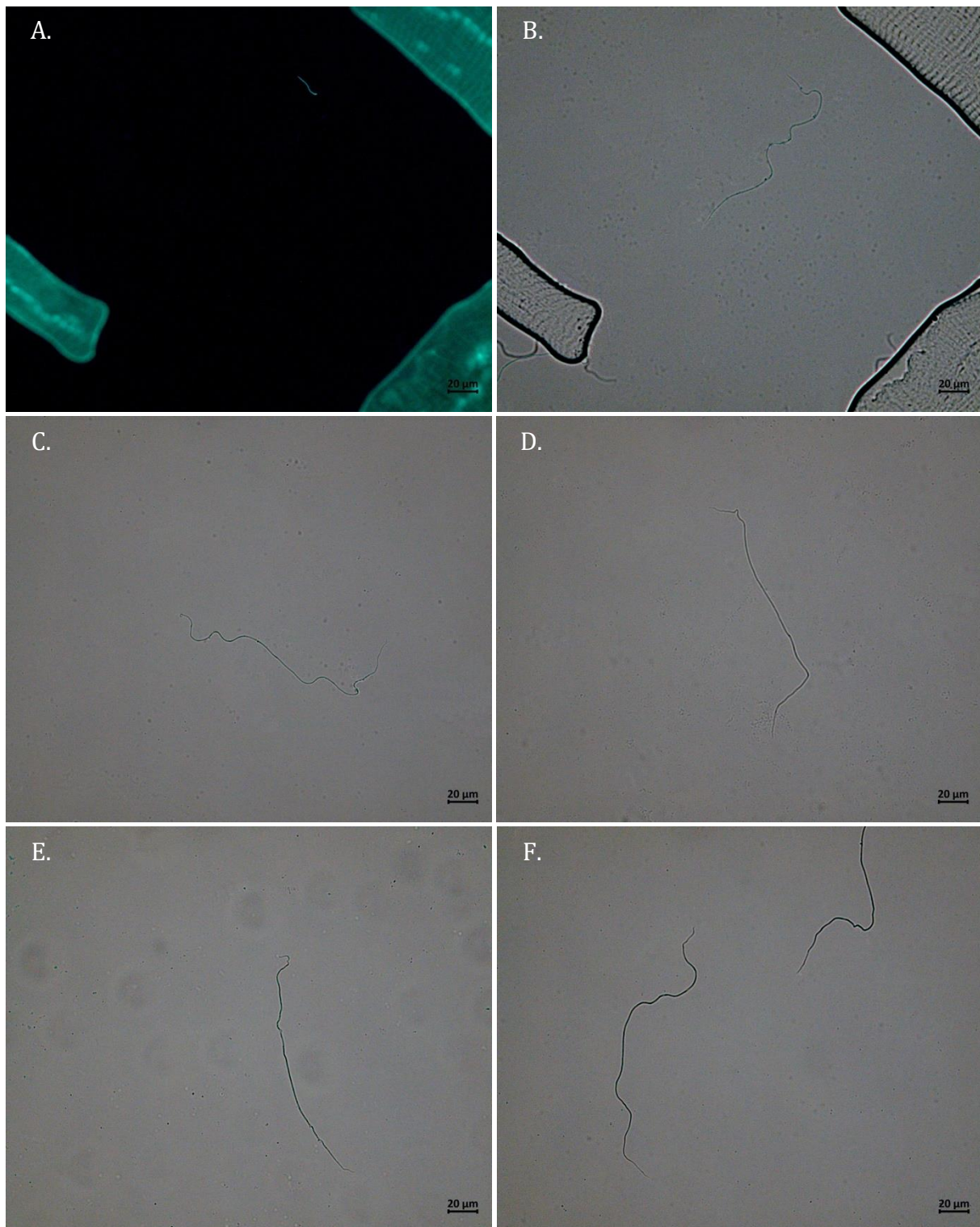


Figure 18. Spermatozoïdes de *Bombus* sp. Images obtenues au microscope optique et à épifluorescence au zoom 40x. **A.** Noyau d'un spermatozoïde de *B. terrestris* coloré au SYBR-14, et difficilement distinguable du flagelle sans coloration (17,8 µm). **B.** Spermatozoïde de *B. terrestris* (160,6 µm). **C.** Spermatozoïde de *B. hypnorum* (199,7 µm). **D.** Spermatozoïde de *B. lapidarius* (189,4 µm). **E.** Spermatozoïde de *B. pascuorum* (170,8 µm). **F.** Spermatozoïde de *B. pratorum* (214,1 µm). A. Dormal.

2. Taux de viabilité spermatique

2.1 Variabilité interspécifique

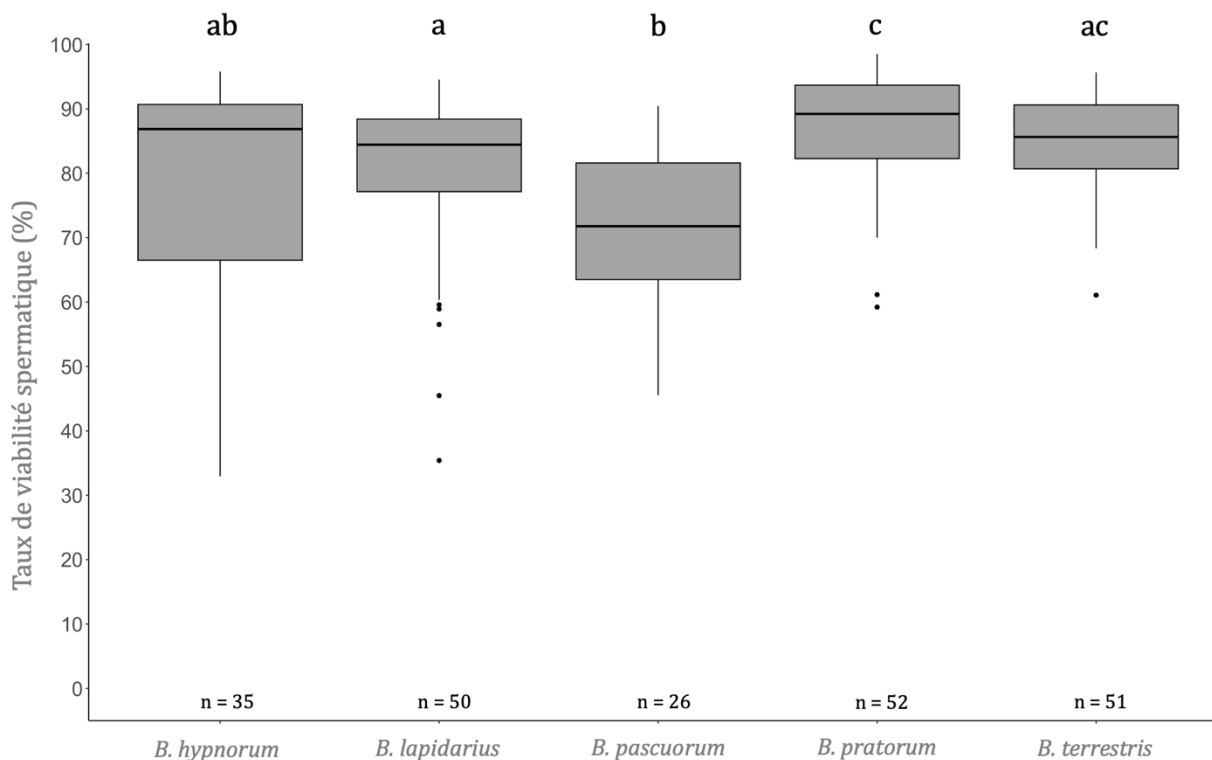


Figure 19. Variabilité interspécifique du taux de viabilité spermatique (%), toutes stations confondues, parmi les cinq espèces de bourdons échantillonnées : *B. hypnorum* (médiane : 86,86%), *B. lapidarius* (médiane : 84,43%), *B. pascuorum* (médiane : 71,77%), *B. pratorum* (médiane : 89,21%), et *B. terrestris* (médiane : 85,63%).

La viabilité des spermatozoïdes de 214 mâles (pour les cinq espèces), échantillonnés à travers la Belgique, a pu être évaluée. La moyenne du taux de viabilité spermatique, toutes stations et espèces confondues, est de $79,52 \pm 7,15\%$ (moyenne = $86,64 \pm 2,12\%$ pour *B. pratorum* ; moyenne = $84,82 \pm 1,87\%$ pour *B. terrestris* ; moyenne = $80,08 \pm 7,89\%$ pour *B. lapidarius* ; moyenne = $77,58 \pm 9,05\%$ pour *B. hypnorum* ; moyenne = $68,49 \pm 9,53\%$ pour *B. pascuorum*). Le taux de viabilité des spermatozoïdes varie significativement entre les cinq espèces (ANOVA, $F = 9,237$, $df = 4$, $p = 6,840e^{-7}$) (Figure 19). *Bombus pascuorum* possède un taux significativement plus faible que *B. lapidarius* ($p = 3,655e^{-2}$), *B. pratorum* ($p = 4,000e^{-7}$) et *B. terrestris* ($p = 2,033e^{-4}$) et, la différence est à la limite de la significativité avec *B. hypnorum* ($p = 6,607e^{-2}$). *Bombus pratorum* possède un taux significativement plus élevé que *B. lapidarius* ($p = 6,934e^{-3}$) et *B. hypnorum* ($p = 1,710e^{-2}$). *Bombus pratorum* possède la médiane la plus élevée (médiane = 89,21%) tandis que *B. pascuorum* possède la médiane la plus faible (médiane = 71,77%).

2.2. Variabilité interspécifique selon la station

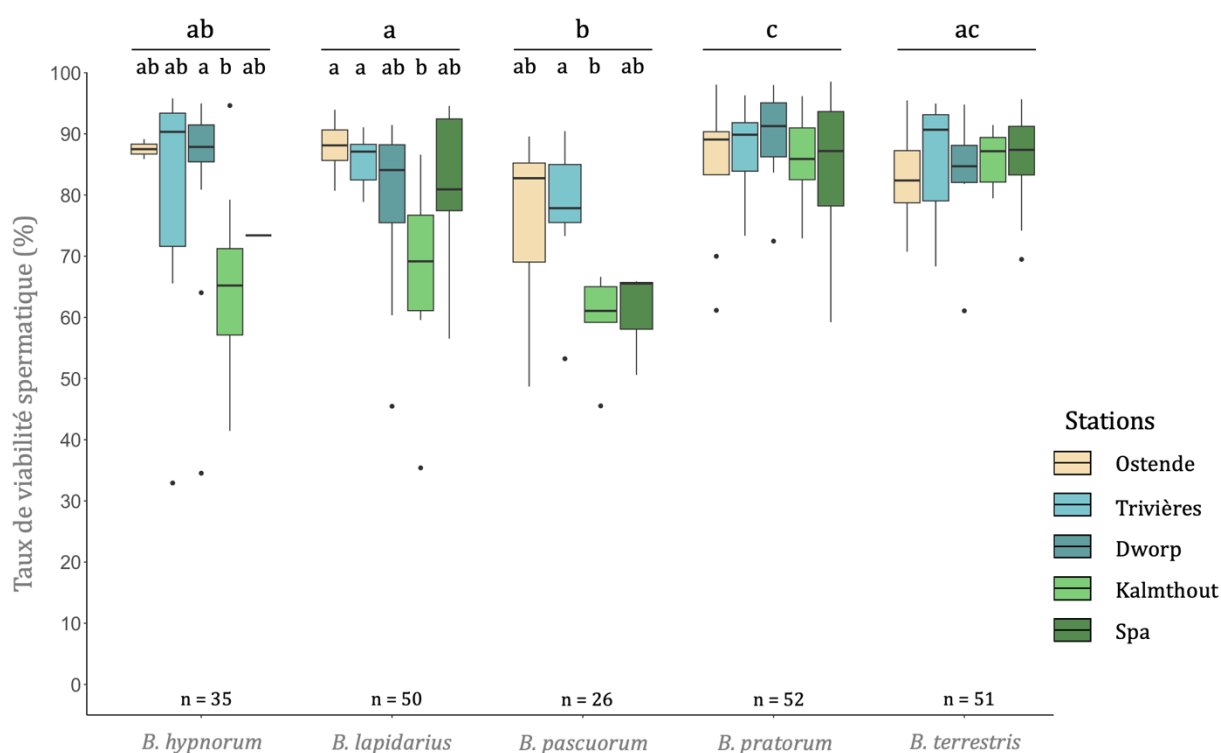


Figure 20. Variabilité interspécifique du taux de viabilité spermatique (%) parmi les cinq espèces de bourdons suivant la station échantillonnée.

***Bombus hypnorum*.** Il y a une différence significative de la viabilité spermatique parmi les cinq sites (ANOVA, $F = 3,034$, $df = 3$, $p = 4,440e^{-2}$). En retirant le site Spa des tests statistiques (car $n = 1$), *B. hypnorum* s'avère avoir un taux de viabilité significativement plus faible à Kalmthout qu'à Dworp ($p = 3,463e^{-2}$). Le taux ne diffère pas de manière significative entre les trois autres sites (Figure 20).

***Bombus lapidarius*.** Le pourcentage de viabilité diffère de manière significative suivant le site d'échantillonnage (ANOVA, $F = 4,406$, $df = 4$, $p = 4,320e^{-3}$). Il est significativement plus faible à Kalmthout qu'à Ostende ($p = 2,181e^{-3}$) et Trivières ($p = 3,842e^{-2}$), et est à la limite de la significativité avec Spa ($p = 5,214e^{-2}$) (Figure 20).

***Bombus pascuorum*.** Une différence de viabilité significative est présente parmi les sites (ANOVA, $F = 4,481$, $df = 3$, $p = 1,340e^{-2}$). Le taux de viabilité est significativement plus faible à Kalmthout qu'à Trivières ($p = 2,665e^{-2}$) et a tendance à être plus faible qu'à Ostende ($p = 7,298e^{-2}$). Il ne diffère pas de manière significative entre les autres sites (Figure 20).

***Bombus pratorum* et *Bombus terrestris*.** Le taux de viabilité spermatique n'est pas significativement différent entre les cinq stations pour ces deux espèces (ANOVA, $F = 0,541$, $df = 4$, $p = 7,060e^{-1}$ pour *B. pratorum* ; ANOVA, $F = 0,634$, $df = 4$, $p = 6,410e^{-1}$ pour *B. terrestris*) (Figure 20).

2.3. Variabilité entre les stations

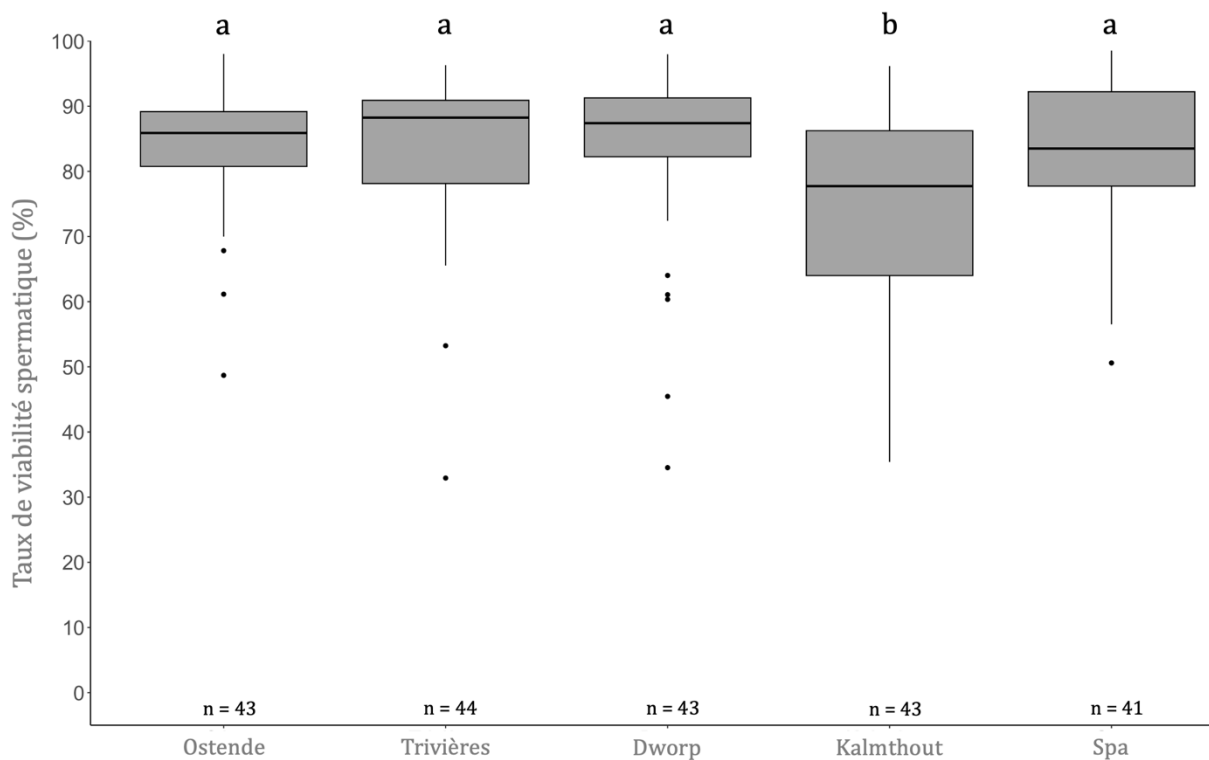


Figure 21. Variabilité du taux de viabilité spermatique (%), toutes espèces confondues, parmi les cinq stations échantillonnées : Ostende (médiane : 85,89%), Trivières (médiane : 88,25%), Dworp (médiane : 87,39%), Kalmthout (médiane : 77,73%), et Spa (médiane : 83,5%).

La moyenne du taux de viabilité spermatique, toutes espèces confondues, est de $83,82 \pm 4,55\%$ pour Dworp, $83,72 \pm 4,92\%$ pour Ostende, $83,21 \pm 4,85\%$ pour Trivières, $77,12 \pm 10,40\%$ pour Spa et de $72,81 \pm 12,38\%$ pour Kalmthout. Le taux ne varie pas significativement entre les cinq sites excepté pour Kalmthout qui présente un taux significativement plus faible (ANOVA, $F = 4,366$, $df = 4$, $p = 2,060e^{-3}$) (Ostende-Kalmthout, $p = 2,060e^{-2}$; Dworp-Kalmthout, $p = 2,668e^{-3}$; Trivières-Kalmthout, $p = 8,412e^{-3}$; Spa-Kalmthout, $p = 4,951e^{-2}$) (Figure 21). Trivières possède la médiane la plus élevée (médiane = 88,25%) tandis que Kalmthout possède la plus médiane la plus faible (médiane = 77,73%).

2.4. Effet de la station sur la variabilité interspécifique

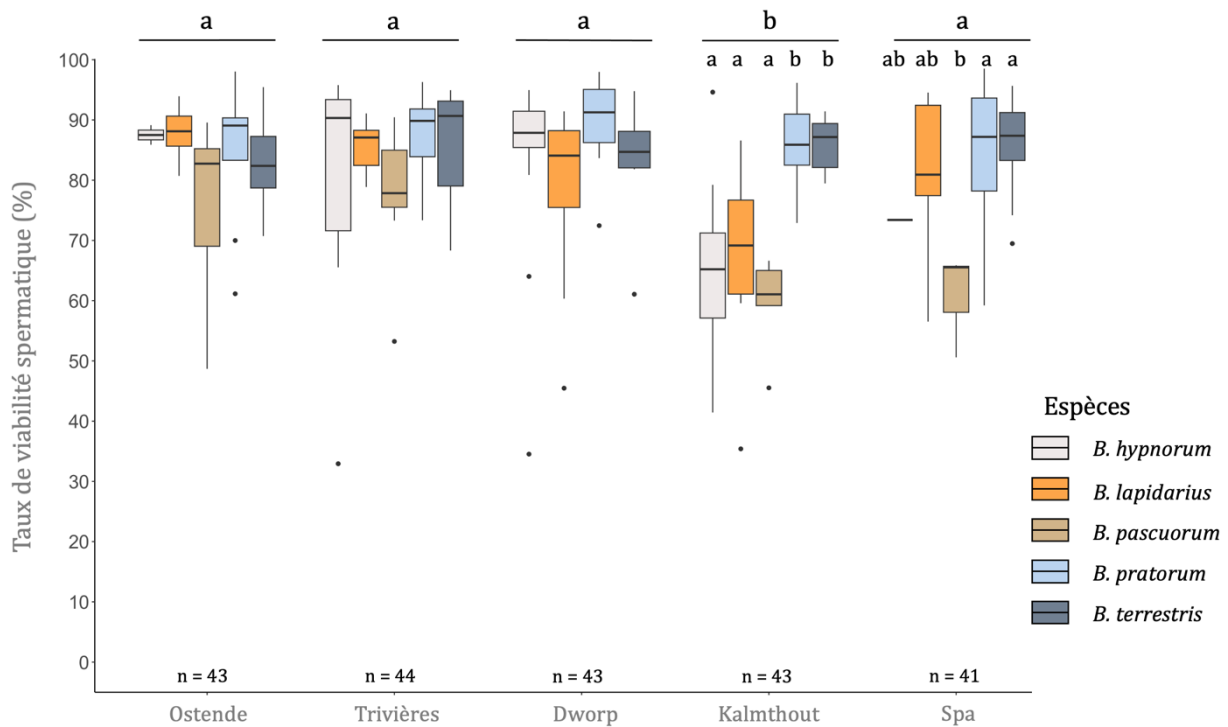


Figure 22. Variabilité du taux de viabilité spermatique (%) parmi les cinq stations échantillonnées suivant l'espèce ciblée.

Ostende, Trivières et Dworp. Le taux de viabilité spermatique n'est pas significativement différent entre les cinq espèces pour ces trois stations (ANOVA, $F = 1,735$, $df = 4$, $p = 1,620e^{-1}$ pour Ostende ; ANOVA, $F = 1,623$, $df = 4$, $p = 1,880e^{-1}$ pour Trivières ; ANOVA, $F = 2,375$, $df = 3$, $p = 8,480e^{-2}$ pour Dworp) (Figure 22).

Kalmthout. Nous observons pour cette station que le pourcentage de viabilité varie de manière significative suivant les espèces (ANOVA, $F = 9,389$, $df = 4$, $p = 2,230e^{-5}$). Il est significativement plus élevé chez *B. pratorum* que chez *B. hypnorum* ($p = 3,219e^{-3}$), *B. lapidarius* ($p = 5,428e^{-3}$) et *B. pascuorum* ($p = 6,971e^{-4}$). De la même manière, il est significativement plus élevé chez *B. terrestris* que chez *B. hypnorum* ($p = 6,728e^{-3}$), *B. lapidarius* ($p = 1,128e^{-2}$) et *B. pascuorum* ($p = 1,391e^{-3}$) (Figure 22).

Spa. Une différence significative de viabilité spermatique est présente entre les cinq espèces (ANOVA, $F = 3,064$, $df = 4$, $p = 2,850e^{-2}$). Elle est significativement plus faible chez *B. pascuorum* que chez *B. pratorum* ($p = 2,262e^{-2}$) et *B. terrestris* ($p = 2,478e^{-2}$) et à la marge d'être significativement plus faible que *B. lapidarius* ($p = 9,695e^{-2}$) (Figure 22).

Nous trouvons une corrélation négative entre les températures extrêmes mensuelles des différents sites et la viabilité spermatique ($\rho = -0,240$, $p = 3,850e^{-4}$) mais pas avec les autres facteurs (*i.e.* moyennes mensuelles des températures maximales et moyennes journalières).

3. Taux de fragmentation de l'ADN spermatique

3.1 Variabilité interspécifique

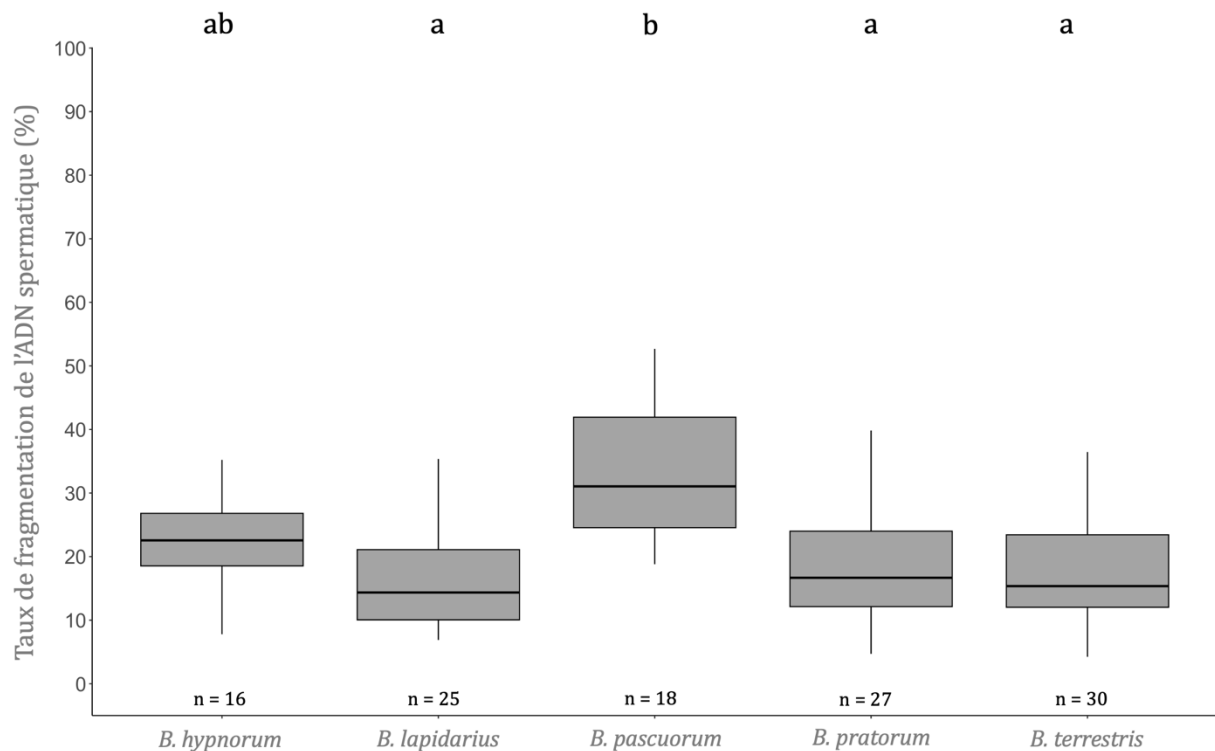


Figure 23. Variabilité interspécifique du taux de fragmentation de l'ADN spermatique (%), toutes stations confondues, parmi les cinq espèces de bourdons échantillonnées : *B. hypnorum* (médiane : 22,55%), *B. lapidarius* (médiane : 14,35%), *B. pascuorum* (médiane : 31,05%), *B. pratorum* (médiane : 16,67%), et *B. terrestris* (médiane : 15,35%).

La fragmentation de l'ADN spermatique de 116 mâles, échantillonnés à travers la Belgique, a pu être évaluée. La moyenne du taux de fragmentation de l'ADN, toutes stations et espèces confondues, est de $21,36 \pm 7,03\%$ (moyenne = $16,61 \pm 5,27\%$ pour *B. lapidarius* ; moyenne = $16,99 \pm 4,82\%$ pour *B. terrestris* ; moyenne = $18,29 \pm 5,27\%$ pour *B. pratorum* ; moyenne = $21,45 \pm 4,70\%$ pour *B. hypnorum* ; moyenne = $33,47 \pm 8,19\%$ pour *B. pascuorum*). Le taux de fragmentation varie significativement entre les cinq espèces (ANOVA, $F = 9,384$, $df = 4$, $p = 1,430e^{-6}$) (Figure 23). *Bombus pascuorum* possède un taux significativement plus élevé que *B. lapidarius* ($p = 8,700e^{-6}$), *B. pratorum* ($p = 1,073e^{-4}$) et *B. terrestris* ($p = 3,900e^{-6}$) et, la différence est à la limite de la significativité avec *B. hypnorum* ($p = 7,059e^{-2}$). *B. lapidarius* possède la médiane la plus faible (médiane = 14,35%) tandis que *B. pascuorum* possède la médiane la plus élevée (médiane = 31,05%).

3.2. Variabilité interspécifique selon la station

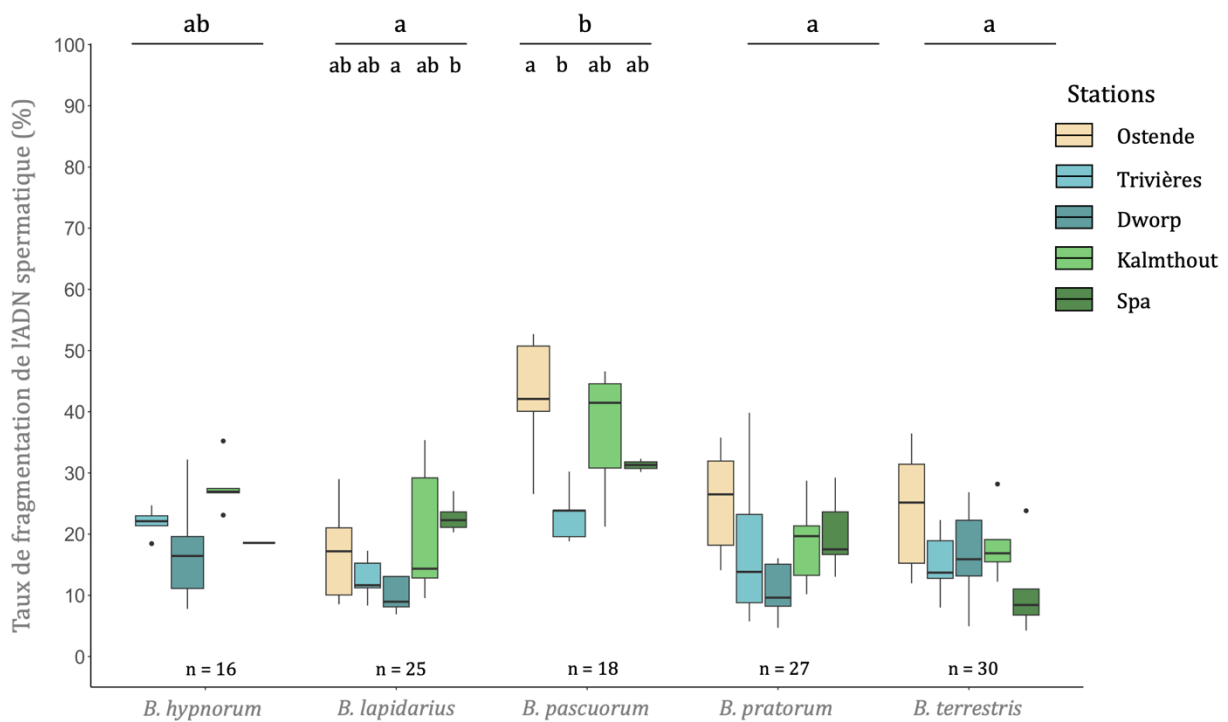


Figure 24. Variabilité interspécifique du taux de fragmentation de l'ADN spermatique (%) parmi les cinq espèces de bourdons suivant la station échantillonnée.

***Bombus lapidarius*.** Le pourcentage de fragmentation d'ADN spermatique ne diffère pas de manière significative entre les sites d'échantillonnage excepté entre Dworp et Spa (ANOVA, $F = 3,073$, $df = 4$, $p = 3,990e^{-2}$) où il est significativement plus faible à Dworp ($p = 4,714e^{-2}$) (Figure 24).

***Bombus pascuorum*.** Une différence significative du taux de fragmentation est présente parmi les sites (ANOVA, $F = 4,964$, $df = 3$, $p = 1,490e^{-2}$). Ce taux est significativement plus élevé à Ostende qu'à Trivières ($p = 1,106e^{-2}$) et a tendance à être plus élevé à Kalmthout qu'à Trivières ($p = 6,553e^{-2}$). Il ne diffère pas de manière significative entre les autres stations (Figure 24).

***Bombus hypnorum*, *Bombus pratorum* et *Bombus terrestris*.** Il n'y a pas de variabilité significative dans le taux de fragmentation de l'ADN spermatique parmi les cinq stations chez ces trois espèces (ANOVA, $F = 2,542$, $df = 3$, $p = 1,050e^{-1}$ pour *B. hypnorum* ; ANOVA, $F = 2,181$, $df = 4$, $p = 1,050e^{-1}$ pour *B. pratorum* ; ANOVA, $F = 2,126$, $df = 4$, $p = 1,070e^{-1}$ pour *B. terrestris*) (Figure 24).

3.3. Variabilité entre les stations

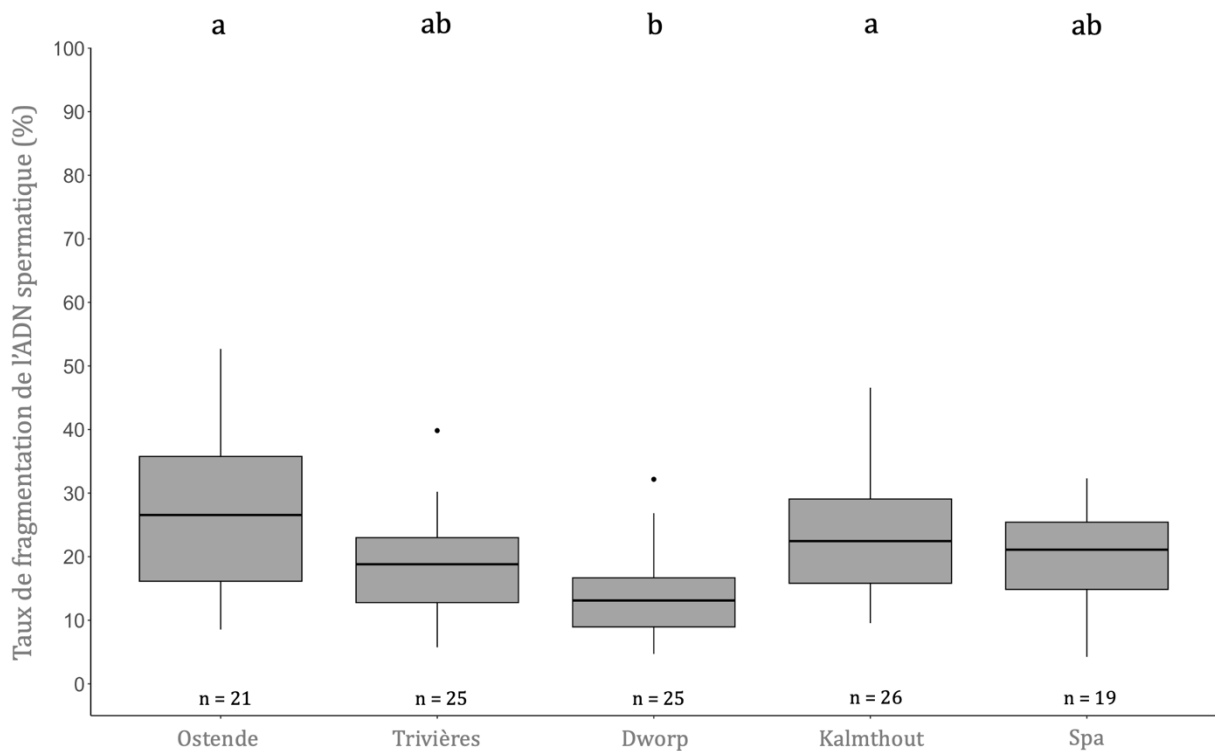


Figure 25. Variabilité du taux de fragmentation de l'ADN spermatique (%), toutes espèces confondues, parmi les cinq stations échantillonnées : Ostende (médiane : 26,55%), Trivières (médiane : 18,81%), Dworp (médiane : 13,11%), Kalmthout (médiane : 22,46%) et Spa (médiane : 21,10%).

La moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique, toutes espèces confondues, est de $13,68 \pm 3,84\%$ pour Dworp, $18,27 \pm 4,43\%$ pour Trivières, $20,71 \pm 7,38\%$ pour Spa, $24,11 \pm 8,30\%$ pour Kalmthout et $27,24 \pm 1,63\%$ pour Ostende. Le taux ne varie pas significativement entre les stations excepté pour Dworp qui présente un taux significativement plus faible qu'à Kalmthout ($p = 1,257e^{-3}$) et Ostende ($p = 2,653e^{-4}$) (ANOVA, $F = 6,141$, $df = 4$, $p = 1,680e^{-4}$) (Figure 25). La station de Dworp possède la médiane la plus faible (médiane = 13,11%) tandis que la station d'Ostende possède la plus médiane la plus élevée (médiane = 26,55%).

3.4. Effet de la station sur la variabilité interspécifique

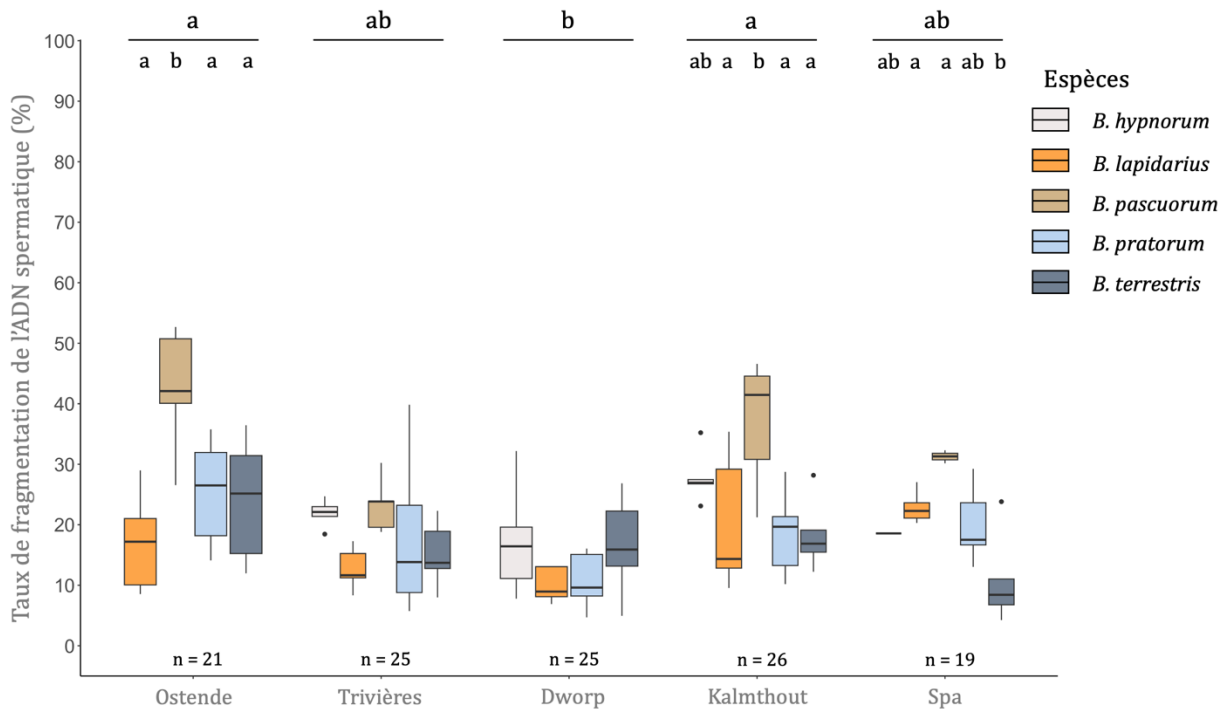


Figure 26. Variabilité du taux de fragmentation de l'ADN spermatique (%) parmi les cinq stations échantillonnées suivant l'espèce ciblée.

Ostende. Nous observons pour cette station que le pourcentage d'ADN fragmenté varie de manière significative suivant l'espèce considérée (ANOVA, $F = 6,398$, $df = 3$, $p = 4,240e^{-3}$) (Figure 26). Le pourcentage est significativement plus élevé chez *B. pascuorum* que chez les trois autres espèces (*B. pascuorum*-*B. lapidarius*, $p = 3,031e^{-3}$; *B. pascuorum*-*B. pratorum*, $p = 3,900e^{-2}$; *B. pascuorum*-*B. terrestris*, $p = 3,267e^{-2}$).

Kalmthout. Le taux de fragmentation d'ADN spermatique est significativement différent entre les espèces (ANOVA, $F = 4,828$, $df = 4$, $p = 6,410e^{-3}$). Il est significativement plus élevé chez *B. pascuorum* que chez *B. lapidarius* ($p = 3,196e^{-2}$), *B. pratorum* ($p = 1,102e^{-2}$) et *B. terrestris* ($p = 1,449e^{-2}$) (Figure 26).

Spa. Une différence significative de fragmentation est présente parmi les cinq espèces (ANOVA, $F = 6,864$, $df = 4$, $p = 2,820e^{-3}$). Elle est significativement plus faible chez *B. terrestris* que chez *B. lapidarius* ($p = 2,803e^{-2}$) et *B. pascuorum* ($p = 1,411e^{-3}$) (Figure 26).

Trivières et Dworp. Le taux de fragmentation n'est pas significativement différent parmi les espèces pour ces deux stations (ANOVA, $F = 1,902$, $df = 4$, $p = 1,490e^{-1}$ pour Trivières ; ANOVA, $F = 1,944$, $df = 3$, $p = 1,530e^{-1}$ pour Dworp) (Figure 26).

Nous trouvons une corrélation négative entre les moyennes mensuelles des températures maximales journalières et la viabilité spermatique ($\rho = -0.186$, $p = 4,530e^{-2}$) mais pas avec les autres facteurs.

V. Discussion

1. Variabilité interspécifique de la longueur des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes des cinq espèces de bourdons présentent une morphologie similaire, à savoir, un long flagelle filiforme ($186,4 \pm 20,1 \mu\text{m}$) et un noyau très allongé ($17,4 \mu\text{m} \pm 1,5 \mu\text{m}$), difficilement distinguable du reste du corps sans l'utilisation de colorants d'acides nucléiques (e.g. SYBR-14, DAPI, ...) (Figure 18). La longueur des spermatozoïdes varie significativement entre les espèces, excepté entre *B. pascuorum* et *B. terrestris* (Figure 17). Le spermatozoïde de *B. pratorum* sont les plus grands ($212,4 \pm 2,8 \mu\text{m}$), suivi de *B. hypnorum* ($203,2 \pm 3,6 \mu\text{m}$), de *B. lapidarius* ($185,8 \pm 3,9 \mu\text{m}$), et finalement de *B. pascuorum* et *B. terrestris* (respectivement, $166,1 \pm 8,2 \mu\text{m}$ et $164,4 \pm 5,4 \mu\text{m}$). Baer *et al.* (2003) avait déjà rapporté une variabilité interspécifique significative chez *B. hypnorum* (200-220 μm), *B. lucorum* (160-175 μm) et *B. terrestris* (165-175 μm). La longueur des spermatozoïdes mesurée chez *B. hypnorum* et *B. terrestris* corrobore les observations de Baer *et al.* (2003). Pour ce qui est des trois autres espèces, à notre connaissance aucune étude antérieure n'avait encore évalué la taille des spermatozoïdes de ces espèces. Parmi les cinq espèces étudiées, la longueur des spermatozoïdes varie de 155 à 220 μm (cf. IX. Annexes, Tableau A1). Cette taille est assez remarquable par rapport à la taille de l'individu, en comparaison, les spermatozoïdes mesurent 50 à 60 μm de long chez l'Homme et 125 μm chez la souris (*Mus musculus*) (Cummins & Woodall, 1985 ; Albrechtova *et al.*, 2014). Chez les autres hyménoptères sociaux, la longueur des spermatozoïdes est de 250-270 μm chez *A. mellifera* et peut varier de 70 à 230 μm au sein d'un même tribu chez les fourmis (Jamieson, 1987 ; Baer *et al.*, 2009). Il faut cependant souligner le fait qu'un seul individu par espèce a été utilisé pour nos mesures, étant donné la variabilité inter- et intra- individuelle (Baer *et al.*, 2003), un plus grand nombre de répliques permettrait de renforcer la validité de nos observations.

Baer *et al.* (2003) explique la longueur des spermatozoïdes chez *B. hypnorum* par la polyandrie facultative de cette espèce. Selon eux, cette observation soutiendrait l'hypothèse selon laquelle la compétition spermatique influencerait positivement la longueur des spermatozoïdes. Cependant, nos mesures sont en contradiction avec cette hypothèse. En effet, nous observons chez *B. pratorum* des spermatozoïdes plus longs que chez *B. hypnorum*, alors que les reines de *B. pratorum* sont monoandres (Estoup *et al.*, 1995). *Bombus hypnorum* et *B. pratorum* appartiennent tous les deux au sous-genre *Pyrobombus*. Le fait qu'ils présentent les spermatozoïdes les plus longs, nous laissent penser qu'il pourrait y avoir un signal phylogénétique pour expliquer ces différences de tailles. Il faudrait échantillonner un plus grand nombre d'espèces pour pouvoir confirmer ou non : (i) l'implication de la compétition spermatique ou, (ii) l'implication de la phylogénie, dans la longueur des spermatozoïdes au sein du genre *Bombus*.

2. Variabilité interspécifique de la qualité spermatique

Nous avons évalué la qualité spermatique de 330 bourdons mâles appartenant à cinq espèces différentes et échantillonnés sur cinq sites répartis en Belgique, en mesurant la viabilité et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes (cf. IX. Annexes, Tableau A2). Pour ces deux paramètres, nos résultats montrent des différences significatives entre espèces mais également entre les sites d'échantillonnage (Figure 19, 21, 23 & 25). Contrairement à notre hypothèse initiale, les mâles provenant des sites considérés comme fortement anthropisés (*i.e.* Dworp, Trivières et Ostende), ne présentent pas une qualité spermatique significativement plus faible (Figure 21 & 25). Comme prévu, les spermatozoïdes de *B. terrestris* ont une qualité spermatique élevée mais pas significativement différente de *B. hypnorum*, *B. lapidarius* et *B. pratorum* (Figure 19 & 23). *Bombus terrestris* présente un pourcentage de viabilité et de fragmentation de l'ADN de ses spermatozoïdes stable entre les cinq sites, et ne semble ainsi pas être impacté par les différentes conditions de ces derniers (Figure 20 & 24). Tandis que les autres espèces, quant à elles, présentent des variations dans la qualité de leurs spermatozoïdes en fonction des sites, exception faite de *B. pratorum* qui montre une qualité spermatique stable (Figure 20 & 24).

Nous avons obtenu une moyenne du taux de viabilité spermatique de 80-85 % pour *B. lapidarius*, *B. pratorum* et *B. terrestris*, et de 70-75 % pour *B. hypnorum* et *B. pascuorum*. Martinet *et al.* (2021b) ont obtenu des pourcentages plus faibles, avec, en moyenne, 70 % de spermatozoïdes vivants pour *B. terrestris* et 60 % pour *B. jonellus* et *B. magnus*, deux espèces de bourdons en déclin. Cependant, contrairement à notre étude, où toutes les analyses ont été effectuées au cytomètre en flux, les leurs ont été réalisées en utilisant le couple DAPI/PI pour la viabilité et le test SCD pour l'intégrité de l'ADN, au microscope à épifluorescence où seulement un maximum de 200 spermatozoïdes étaient comptés par lame microscopique. Au contraire, Greeff & Schmid-Hempel (2008) ont obtenu, en utilisant le couple SYBR-14/PI combiné à une analyse par microscopie à épifluorescence, des taux plus élevés pour la viabilité, avec une médiane de 97 % pour *B. terrestris*. Cependant le fait qu'ils aient uniquement prélevé les spermatozoïdes issus des testicules accessoires pourrait expliquer cette très haute viabilité ainsi que le fait qu'ils aient évalué cette dernière sur des mâles élevées en laboratoire sous des conditions optimales (*i.e.* 20–25°C, 60–70% d'humidité relative, lumière rouge et nourriture à volonté).

Concernant le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, nous avons obtenu une moyenne de ± 20 % excepté pour *B. pascuorum* présentant une moyenne de 33 %. Martinet *et al.* (2021b) ont obtenu un pourcentage de fragmentation de ± 15 % pour les trois espèces évaluées, ce qui est en concordance avec nos résultats.

Plus récemment, une étude chez *B. terrestris* utilisant la même méthodologie que la nôtre (*i.e.* cytométrie en flux, SYBR-14/PI pour la viabilité, AO pour la fragmentation de l'ADN), a obtenu une moyenne de 79 % pour la viabilité et une moyenne de 11 % pour la fragmentation de l'ADN (Martinet *et al.*, in prep). Les mesures ont été prises sur des mâles élevés sous des conditions optimales en laboratoire, et âgés d'une semaine. A notre connaissance, ces pourcentages sont probablement ceux qui se rapprochent le plus des taux standards de viabilité et de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez les mâles de *B. terrestris*.

Chez les autres hyménoptères sociaux, les spermatozoïdes des mâles de faux-bourçons (*A. mellifera*) présentent une viabilité moyenne de 80 % (Collins, 2004 ; Johnson *et al.*, 2013). Chez la fourmi d'Argentine (*Linepithema humile*), le pourcentage de viabilité des spermatozoïdes stockés dans les vésicules séminales varie entre 80 et 95% (Dávila & Aron, 2017).

3. Effet du site d'échantillonnage sur la variabilité intraspécifique de la qualité spermatique

Les sites d'échantillonnage ne semblent pas avoir d'influence sur la qualité spermatique de *B. pratorum* et *B. terrestris*, qui ont montré une qualité spermatique élevée et stable au travers des différents sites échantillonnés (Figure 20 & 24).

Bombus pratorum. L'espèce a montré un taux de viabilité spermatique moyen ($86,64 \pm 2,12$ %) supérieur aux autres espèces, mais pas significativement différent de *B. terrestris* (Figure 19). Il est possible que ce taux de viabilité élevé et constant à travers les différents sites provienne de la résistance de cette espèce à différents stress. Il est difficile de confirmer cette hypothèse car très peu de données ont été collectées concernant la réponse aux stress chez cette espèce. Nous savons cependant que *B. pratorum* est la deuxième espèce, parmi les cinq étudiées, à résister le plus longtemps à un stress thermique (médiane : 169 minutes), après *B. terrestris* (médiane : 395 minutes) et devant *B. hypnorum* (médiane : 81 minutes) (Figure 27) (Martinet *et al.*, 2021b). Or une espèce résistante à la chaleur comme *B. terrestris* a également montré une résistance à la chaleur dans sa qualité spermatique à 40°C (Martinet *et al.*, 2021a). Un examen de la qualité spermatique chez *B. pratorum* après un stress thermique (*i.e.* 40°C jusqu'à la stupeur thermique) serait nécessaire afin de confirmer ou non si les mâles de *B. pratorum* montre une résistance thermique au niveau de leurs spermatozoïdes.

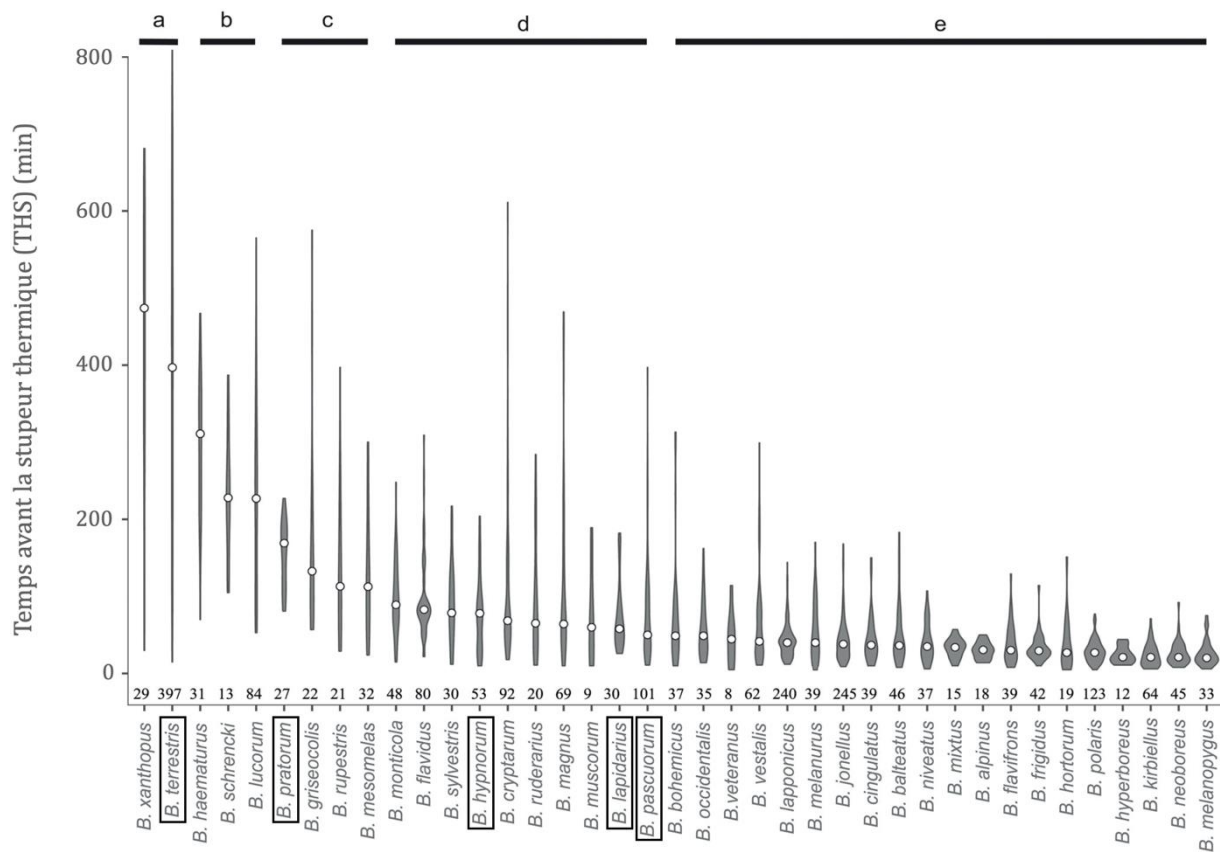


Figure 27. Variabilité interspécifique du temps avant la stupeur thermique (THS) chez les cinq espèces de bourdons étudiées (encadrées en noir). Les cercles blancs représentent la médiane et le nombre au-dessus de l'axe des x représente le nombre de spécimens par espèce. Adaptée de Martinet et al. (2021b).

La qualité spermatique relativement élevée de *B. pratorum* pourrait également s'expliquer par le fait que cette espèce soit printanière et donc moins susceptible à subir des stress thermiques. Selon les observations de Prys-Jones & Corbet (2015) et Folschweiller *et al.* (2020) faites, respectivement, au Royaume-Uni et en Belgique, les reines sortent d'hibernation dès le début du mois de mars et les premières ouvrières peuvent être observées en avril contrairement aux premières ouvrières des deux espèces dites tardives, *B. lapidarius* et *B. pascuorum*, qui n'apparaissent qu'en mai (Prys-Jones & Corbet, 2015). Les premiers sexués de *B. pratorum* sont produits en mai (dans notre cas les mauvaises conditions climatiques du mois de mai ont repoussé leur émergence à juin) (Folschweiller *et al.*, 2020), mois durant lequel les températures sont plus clémentes comparé au mois de juin et juillet (*cf.* IX. Annexes, Figure A1). Étant donné que l'espèce possède un cycle de vie court, les colonies se terminent avant juillet-août, c'est-à-dire avant la période de l'année où les vagues de chaleur sont les plus fréquentes en Belgique (Folschweiller *et al.*, 2020 ; Mievis, 2023). Ainsi, de par son cycle de colonie court et précoce, *B. pratorum* serait moins enclin à subir dans la nature de fortes températures que les autres espèces à la phénologie plus tardive. Sans potentiel stress thermique, la qualité spermatique observée chez cette espèce resterait intacte.

Bombus terrestris. Les mâles de cette espèce ont présenté parmi les meilleurs taux de viabilité et de fragmentation de l'ADN spermatique (Figure 19, 20, 23 & 24). *Bombus terrestris* est connu pour sa résistance thermique supérieure aux autres espèces de bourdons (Zambra *et al.*, 2020 ; Martinet *et al.*, 2021b). En effet, les mâles de *B. terrestris* peuvent tenir plus de cinq heures sous 40°C avant de présenter les premiers symptômes de stupeur thermique (Figure 27) (Zambra *et al.*, 2020 ; Martinet *et al.*, 2021b). En plus de ce temps de résistance notable, cette exposition à 40°C n'affecte pas significativement les spermatozoïdes stockés dans leurs testicules (Martinet *et al.*, 2021a). De récentes études montrent que la résistance *species-specific* à la chaleur serait liée, de manière constitutive mais aussi de manière induite suite à une réponse à un stress thermique, à une surexpression de protéines impliquées dans la *Heat shock response* (e.g. protéines chaperonnes) (Martinet *et al.*, *in prep*). Cette différence interspécifique dans le bagage protéomique se reflète aussi dans le liquide séminale et participerait donc à une meilleure conservation du sperme chez les espèces présentant une haute résistance thermique comme *B. terrestris* (Martinet *et al.*, *under review*). L'espèce s'avère cependant sensible aux pesticides, tant au niveau individuel qu'à l'échelle de la colonie (Mommaerts & Smagghe, 2011). Récemment, des études ont montré que le thiaméthoxame, un insecticide de la classe des néonicotinoïdes, pouvait avoir des effets délétères sur la viabilité des spermatozoïdes de l'espèce (Minnameyer *et al.*, 2021 ; Straub *et al.*, 2022). Des impacts de pesticides sur la fertilité des mâles ont également été observés chez les mâles d'*A. mellifera* (Straub *et al.*, 2016 ; Ciereszko *et al.*, 2017 ; Fisher & Rangel, 2018).

La qualité élevée et stable observée chez les spermatozoïdes de *B. terrestris* au travers des sites d'échantillonnage renforce son caractère résistant, qui lui vaut, entre-autre, son succès de dispersion en Europe mais également hors de sa zone native, où l'espèce entre en compétition avec les espèces locales (Dafni *et al.*, 2010 ; Martinet *et al.*, 2015b ; Rasmont *et al.*, 2015).

Les mâles de *B. hypnorum*, *B. lapidarius* et *B. pascuorum* ont présenté des différences significatives dans la viabilité et l'intégrité de l'ADN de leurs spermatozoïdes entre les différents sites (Figure 20 & 24). Cela suggère que leur qualité spermatique peut être sensible à un ou plusieurs facteurs de stress présents dans certains sites (*cf.* 4. Effet du site d'échantillonnage sur la qualité spermatique).

Bombus hypnorum. Pour les deux paramètres évalués, la qualité des spermatozoïdes des mâles de *B. hypnorum* n'est globalement pas significativement différente des autres espèces (Figure 19 & 23). Cependant, la variabilité intraspécifique varie significativement suivant le site d'échantillonnage (Figure 20). En effet, les individus échantillonnés à Kalmthout ont une viabilité fortement réduite (64,2 %), tirant la viabilité globale vers le bas (de 80,9 % à 77,6 %) (Figure 19).

Bombus lapidarius. Comme pour *B. hypnorum*, la viabilité des spermatozoïdes et l'intégrité de leur ADN ne sont globalement pas significativement différentes des autres espèces (Figure 19 & 23). L'hypothèse de la sensibilité du sperme à la chaleur peut être envisagée pour expliquer la réduction de la qualité spermatique dans certaines stations car il a été montré que l'espèce, malgré son abondance, est sensible à la chaleur (médiane : 58 minutes) (Figure 27) (Zambra *et al.*, 2020 ; Martinet *et al.*, 2021b). De plus, les mâles de cette espèce ont une émergence tardive, les sexués n'apparaissent pas avant juillet-août, mois où les températures sont les plus chaudes et les vagues de chaleur les plus fréquentes (Goodwin, 1995 ; Mievis, 2023).

Bombus pascuorum. De manière générale, les spermatozoïdes de *B. pascuorum* montrent les plus faibles pourcentages de viabilité ($68,49 \pm 9,53$ %) et les plus hauts pourcentages d'ADN fragmenté ($33,47 \pm 8,19$ %) (Figure 19 & 23). Ces résultats sont surprenants car cette espèce est l'espèce de bourdon la plus abondante en Belgique et fortement répandue en Europe (Rasmont & Pauly, 2010 ; Rasmont *et al.*, 2015). On s'attendrait donc à ce qu'une espèce en expansion comme celle-ci dispose d'une haute qualité spermatique.

Une des raisons qui pourrait expliquer ces observations est que les mâles de *B. pascuorum* émergent tardivement, seulement à partir du mois de juillet (Folschweiller *et al.*, 2020). A titre de comparaison, les mâles des espèces précoces (*e.g.* *B. pratorum*, *B. hypnorum*, ...) émergent dès mai/début juin (Folschweiller *et al.*, 2020). La période d'émergence des mâles de *B. pascuorum* coïncide ainsi avec la période de l'été où les jours sont les plus chauds en Belgique (*cf.* IX. Annexes, Tableau A3) (IRM, 2023). Les mâles de *B. pascuorum* présentent la moins grande résistance à la chaleur parmi les cinq espèces évaluées (médiane : 48 minutes) (Figure 27) (Zambra *et al.*, 2020 ; Martinet *et al.*, 2021b). Or, une baisse de fertilité, à la suite d'un stress thermique, a déjà pu être observée chez deux espèces peu résistantes à la chaleur (*B. magnus* et *B. jonellus*) (Martinet *et al.*, 2021a). En supposant donc que les spermatozoïdes de *B. pascuorum* puissent être négativement affectée par la chaleur, les fortes températures enregistrées en Belgique au mois de juillet (> 25°C et jusqu'à 36°C à Kalmthout) (*cf.* IX. Annexes, Figure A6) pourraient expliquer la faible qualité spermatique chez les mâles de *B. pascuorum*. Cependant, contrairement à *B. pascuorum* qui est une espèce en expansion, les deux espèces testées par Martinet *et al.* (2021b) étaient des espèces en déclin, distribuées en région boréale et sub-boréale. De plus, dans cette même étude, *B. terrestris*, une espèce très répandue et possédant une haute résistance thermique, n'a présenté aucun impact significatif sur la viabilité et l'intégrité de l'ADN de ses spermatozoïdes (Martinet *et al.*, 2021a).

La plus faible qualité spermatique de *B. pascuorum* n'explique pas pourquoi l'espèce est, malgré tout, aussi répandue. L'une des explications possibles pour expliquer sa large et abondante distribution malgré la sensibilité de ses spermatozoïdes observée lors de notre étude, pourrait résider dans la stratégie du cycle de développement de la colonie. Les reines de *B. pascuorum* ont la particularité de pondre des sexués en plusieurs vagues successives, contrairement aux reines des autres espèces où tous les sexués émergent en même temps, en fin de cycle (Folschweiller *et al.*, 2020). Le système de ponte des reines de *B. pascuorum* peut rappeler la stratégie « r » du modèle évolutif r/K proposé par Robert MacArthur R. et Wilson E. O (1967). Dans ce modèle s'opposent deux stratégies de reproduction :

- (i) La stratégie « r », où les espèces misent sur la quantité plutôt que la qualité. Ces espèces produisent un grand nombre de jeunes, au dépit de la qualité de sa descendance, qui possède un faible taux de survie (*e.g.* les amphibiens).
- (ii) La stratégie « K », où les espèces investissent dans la qualité plutôt que dans la quantité. Ces espèces produisent moins de jeunes mais ces derniers ont de meilleures chances de survie (*e.g.* l'Homme).

Ainsi, les reines de *B. pascuorum* fourniraient plus d'énergie dans la production répétée de lot de mâles, au dépend de l'apport nutritif fourni à ces derniers. Ce manque d'investissement dans la descendance entraînerait des spermatozoïdes de moins bonne qualité et donc plus sensibles aux conditions environnementales. Très peu d'études ont investigué les impacts d'une restriction protéique au cours du développement larvaire sur la qualité spermatique des mâles chez les hyménoptères sociaux (Pech-May *et al.*, 2012 ; Stürup *et al.*, 2013 ; Czekonska *et al.*, 2014 ; Dávila & Aron, 2017). Il a été montré chez *A. mellifera*, qu'une restriction protéique au cours du développement larvaire des faux-bourçons n'entraîne pas une baisse de la production et de la viabilité des spermatozoïdes chez les mâles (Stürup *et al.*, 2013 ; Czekonska *et al.*, 2014). Une étude similaire menée sur la fourmi d'Argentine *Linepithema humile* a cependant montré qu'une restriction protéique entraîne une baisse de la production des spermatozoïdes mais pas de leur viabilité (Dávila & Aron, 2017). De même résultats ont été obtenus chez l'abeille sans dard *Melipona beecheii* (Pech-May *et al.*, 2012). D'autres études devront être menées, notamment chez les bourçons, pour mieux comprendre les effets que peut avoir un plus faible apport en protéine pendant le développement larvaire des mâles sur leur qualité spermatique.

Nos observations, combinées au comportement de ponte particulier des reines de *B. pascuorum*, nous laissent supposer que lorsqu'un évènement stressant survient dans le paysage (*e.g.* vague de chaleur, application de pesticides, ...), ce dernier entraîne une dégradation de la

qualité spermatique chez les mâles de *B. pascuorum* présents à ce moment-là. Cette génération de mâles stressés pourrait être remplacée par des mâles non-stressés provenant d'un nouveau batch d'individus nouvellement produits. Il serait alors intéressant de voir si les reines de *B. pascuorum* seraient ensuite capables de différencier les mâles stressés des mâles sains, comme cela a pu être fait chez *B. terrestris* (Przybyla *et al.*, 2021).

4. Effet du site d'échantillonnage sur la qualité spermatique

4.1. Fragmentation de l'ADN spermatique

La mesure du taux de fragmentation de l'ADN spermatique nous a permis d'estimer sa moyenne globale (chez les cinq espèces) à savoir $21,4 \pm 7,0$ %. Cela nous permet de voir que, bien que le taux de fragmentation de l'ADN et le taux de viabilité spermatique ont été mesurés sur des individus différents, les résultats obtenus pour la fragmentation sont cohérents avec ceux obtenus pour la viabilité (moyenne = $79,5 \pm 7,1$ %). Nous trouvons d'ailleurs une corrélation négative entre ces deux variables (Test de Spearman, $\rho = -0,200$, $p = 0,045$), cependant nous ne pouvons pas réellement prouver que les 20% d'ADN fragmenté soient équivalent aux 20% de spermatozoïdes morts par le fait que les échantillons pour chaque analyse venaient d'individus différents. Cette mesure nous a également permis de voir que *B. pascuorum* possède le taux de fragmentation le plus élevé parmi les cinq espèces, ce qui tend à appuyer notre hypothèse émise précédemment (Figure 23).

Des analyses plus approfondies ne sont cependant pas possibles compte tenu du trop faible échantillon pour chaque espèce et chaque site ($n \leq 5$). Nous n'obtenons pas des résultats cohérents et en accord avec ceux obtenus pour la viabilité concernant les effets des sites sur cette mesure, aucune tendance ne peut être observée (figure 20 & 24). De plus, cette mesure semble varier pour *B. hypnorum*, *B. terrestris* et *B. pratorum* suivant le site d'échantillonnage mais ces différences ne sont pas supportées par nos tests statistiques, possiblement dû au faible échantillonnage (Figure 24). Un plus grand échantillon est indispensable pour pouvoir tirer des résultats et des conclusions robustes de ces observations.

4.2. Viabilité spermatique

Le pourcentage de viabilité des mâles varie significativement au sein de Kalmthout et de Spa contrairement aux autres stations (Figure 22). Parmi les mâles collectés à Kalmthout, deux groupes se démarquent significativement : (i) *B. pratorum* et *B. terrestris* et (ii) *B. hypnorum*, *B. lapidarius* et *B. pascuorum* (Figure 22). Ces deux groupes correspondent à ceux discutés dans la section précédente (*i.e.* qualité spermatique stable vs variable). Les mâles de *B. hypnorum*, *B. lapidarius* et *B. pascuorum* ont une viabilité spermatique plus faible à Kalmthout que celle de leurs

congénères dans les autres stations, ce qui nous laisse penser qu'un ou plusieurs facteurs de stress sont présents au niveau de ce site, et absents chez les quatre autres.

L'anthropisation comme facteur de stress ne semble pas être l'explication la plus probable étant donné que le taux de viabilité des spermatozoïdes reste stable pour les cinq espèces à Dworp, Ostende et Trivières, qui présentent pourtant un degré d'anthropisation important (cf. IX. Annexes, Figure A1-A5). Cette variabilité intraspécifique, selon le site, de la qualité spermatique ne peut pas non plus s'expliquer par des différences génétiques entre les populations conspécifiques. En effet, Maebe *et al.* (2019) ont récemment étudié, au sein de la Belgique, la variation de la diversité génétique entre les populations conspécifiques chez sept espèces de bourdons (dont *B. hypnorum*, *B. pascuorum* et *B. lapidarius*). Ils ont découvert que, pour chaque espèce, il n'y a pas ou peu de différences génétiques entre leurs populations. Cela signifie que pour chacune de ces espèces, les différentes populations retrouvées sur le territoire belge ne seraient en fait qu'une seule méta population.

Le facteur exerçant une influence sur la qualité spermatique semble plutôt être d'origine météorologique. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les trois espèces qui montrent une qualité spermatique variable, font parties des espèces, recensées en Belgique, les moins résistantes au stress thermique (Zambra *et al.*, 2020). En comparant les moyennes mensuelles des températures maximales journalières et des températures moyennes journalières, pendant la période de 1991 à 2020, des cinq sites, nous observons que les moyennes mensuelles à Kalmthout ne se sont pas différentes de celles enregistrées à Trivières et à Dworp (cf. IX. Annexes, Tableau A3) (IRM, 2023). Les températures à Ostende et à Spa, de par la proximité avec la mer de l'un, et la haute altitude de l'autre, sont, en moyenne, plus faibles (IRM, 2023). Cependant, étudier les températures moyennes ne permet pas de représenter les phénomènes de températures extrêmes qui sont ponctuels et les plus susceptibles d'être un facteur de stress (Rasmont & Iserbyt, 2012 ; Rasmont *et al.*, 2015). En comparant les températures extrêmes enregistrées sur chaque station, Kalmthout se révèle être la station qui présente les plus grands maxima (33°C en juin et 36°C en juillet). Pour appuyer cette observation, nous avons effectués des analyses statistiques qui ont montré une corrélation négative entre les températures extrêmes mensuelles recensées sur chaque site et les pourcentages de viabilité spermatique.

Les études disponibles chez les bourdons concernant l'effet d'un stress hyperthermique sur la fertilité des mâles ont montré une diminution de la viabilité des spermatozoïdes à la suite d'une exposition de 40/45°C, même si celle-ci était de courte durée (~1h) (Martinet *et al.*, 2021a ; Champion *et al.*, 2023). Un cas notable est la surprenante résistance de *B. terrestris* pouvant supporter une température de 40°C pendant plus de 5h sans que la viabilité spermatique des

mâles ne soit réduite (Martinet *et al.*, 2021a). Cela est probablement dû à son bagage protéique précédemment expliqué (Martinet *et al.*, *in prep* ; Martinet *et al.*, *under review*). Car chez d'autres hyménoptères sociaux, notamment *A. mellifera*, nous observons une diminution de la viabilité après une exposition de 4h à 39°C (Stürup *et al.*, 2013). À notre connaissance, aucune étude n'a évalué l'impact d'un stress thermique sur la fertilité des mâles chez les fourmis. Dans le cas d'autres insectes comme le ténébrion *Tribolium castaneum*, une élévation de 5°C par rapport à la température optimale a entraîné une diminution de la viabilité spermatique des mâles (Sales *et al.*, 2018).

Ainsi, ce qui semble être à l'origine des variations de la qualité spermatique entre les stations, sont les températures extrêmes respectives de ces dernières. Nous observons : (i) des espèces résistantes comme *B. terrestris*, qui présentent une qualité spermatique stable et élevée au sein des différents sites, (ii) d'autres espèces, comme *B. pratorum*, qui évitent ces températures extrêmes en émergeant et en bouclant leur cycle de vie précocement, et (iii) des espèces estivales, comme *B. pascuorum*, chez lesquelles les mâles émergent au moment où les épisodes de vagues de chaleur sont les plus fréquents en Belgique et qui se retrouvent soumis et impactés par ces fortes températures. Il est essentiel de pouvoir identifier les espèces sensibles, comme cela a déjà pu être fait sur une partie des espèces belges par Zambra *et al.* (2020) afin d'élaborer des plans de conservation spécifiques pour ces espèces. En Belgique, plus de la moitié des 24 espèces de bourdons sont menacées ou quasi menacées d'extinction (Drossart *et al.*, 2019). Ce constat alarmant nous incite à agir pour protéger leur diversité et préserver leurs services écosystémiques, intimement liés à cette dernière (Figure 28) (Folschweiller *et al.*, 2019).

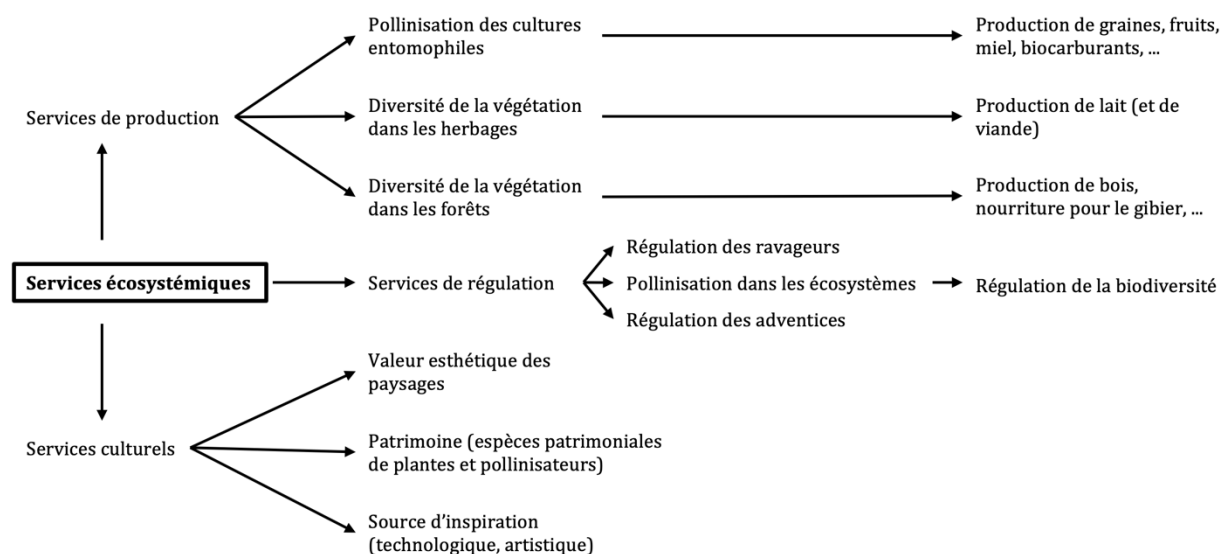


Figure 28. Services écosystémiques de production, de régulation et culturels fournis par les abeilles. Les abeilles fournissent de nombreux services à l'Homme, mais également aux écosystèmes en général. Adaptée de Folschweiller *et al.* (2019).

Nous pouvons agir face à ce déclin en mettant en œuvre des mesures de gestion du paysage (Folschweiller *et al.*, 2019). Beaucoup de recherches menées sur la perte de diversité des bourdons, et des abeilles en général, en sont arrivées à la même conclusion : pour ralentir la tendance et protéger les espèces vulnérables, il faut préserver ou aménager des zones à haute diversité végétale dans les paysages (Ockinger & Smith, 2007 ; Ahrne *et al.*, 2009 ; Nicholls & Altieri, 2013). Dans les zones à risque pour les bourdons (dans notre cas la commune de Kalmthout sujette à des températures extrêmes plus sévères), l'installation de patchs riches en fleurs à haute qualité nutritive (*e.g.* trèfles, saules, châtaigniers, ...) (Roncoroni *et al.*, 2020) le long des routes ou en bord de champs pourrait atténuer les impacts des stress liés à la zone en apportant aux pollinisateurs une ressource nutritive riche et de qualité (*i.e.* concentrations en acides aminés, rapport protéines/lipides et composition en stéroïdes), comme le suggère l'étude de Schmehl *et al.* (2014), de Vanderplanck *et al.* (2019) et de McNeil *et al.* (2020).

VI. Conclusion

Les populations de bourdons font face à un déclin mondial de leur biodiversité, qui menace leurs services écosystémiques. Les principales menaces à l'origine de leur déclin sont : (i) le changement climatique, (ii) l'utilisation excessive des produits phytosanitaires dans l'agriculture, et (iii) la fragmentation de leurs habitats, causée par l'accroissement de l'urbanisation et l'extension de l'agriculture. Compte tenu de leurs rôles de géniteurs, la qualité du stock de spermatozoïdes des mâles est cruciale dans la fitness des colonies résultantes, d'autant plus que ce stock est fini et non-renouvelable. La fertilité des mâles peut ainsi être utilisée comme indication de l'état de santé général des populations de bourdons.

La qualité spermatique de 330 mâles, appartenant aux cinq espèces de bourdons les plus abondantes en Belgique et échantillonnés le long de différents gradients environnementaux, a pu être évaluée en mesurant, par cytométrie en flux, le taux de viabilité et de fragmentation de l'ADN spermatique.

Nos résultats montrent une variabilité significative de la qualité spermatique entre les espèces mais également entre les stations. *Bombus pratorum* et *B. terrestris* présentent une qualité spermatique élevée et stable au travers des différents sites échantillonnés. Contrairement à notre hypothèse initiale, les sites considérés comme fortement anthropisés ne présentent pas une qualité spermatique significativement plus faible. Il semblerait que le facteur qui explique ces différences entre stations soit climatique et, plus spécifiquement, lié aux températures extrêmes. Nous observons que l'endroit où la mesure de la qualité spermatique est la plus faible correspond à l'endroit où les canicules sont les plus extrêmes.

Cette étude a permis d'explorer pour la première fois la qualité spermatique des mâles de bourdons sauvages à travers la Belgique. Ce travail montre la pertinence de mettre en place une surveillance de l'état physiologique des populations par l'intermédiaire d'une mesure simple et rapide telle que la qualité spermatique. En utilisant ce paramètre comme proxy de l'état de santé général des populations de bourdons, nous pouvons déterminer les endroits les plus à risque pour ces populations. Ce type d'étude pourrait aider, en ciblant ces zones à risque, à mettre en place des plans d'actions locaux afin de contribuer de manière optimale à la conservation des espèces.

VII. Perspectives

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons été limités dans le nombre de spécimens collectés et de sites échantillonnés. Dans le futur, il serait nécessaire de collecter plus de mâles par site afin d'obtenir des données statistiques plus robustes, et renforcer la validité de nos observations. De plus, un plus grand nombre de sites investigués permettrait de mieux couvrir les différents degrés de continentalité (*i.e.* températures) et d'anthropisation (*i.e.* occupation du sol) présents en Belgique. Il serait également approprié de caractériser plus profondément chaque site en identifiant et quantifiant les potentiels résidus de pesticides présents dans le sol et les plantes, et en calculant la proportion occupée par chaque type de sol (*i.e.* champs, maisons, prairies, ...).

Étant donné le caractère particulier de *B. pascuorum*, davantage de recherches devront être menées pour mieux comprendre la stratégie du cycle de développement de la colonie de cette espèce. Notamment, tenter d'identifier plus précisément les facteurs qui lui permettent de bénéficier d'une large distribution en Europe, malgré sa qualité spermatique plus sensible que les quatre autres espèces. Il faudrait commencer par estimer la qualité spermatique chez des mâles produits par des colonies développées sous des conditions optimales de laboratoire, afin d'obtenir le taux de viabilité et de fragmentation de l'ADN spermatique standard, pour comparer ensuite avec ceux de différents groupes de mâles qui auraient subi différents types de stress (*i.e.* nutritionnel, thermique, chimique, ...). Il serait également pertinent de réaliser une démarche similaire pour les deux autres espèces de cette étude (*i.e.* *B. hypnorum* et *B. lapidarius*) ayant présenté une qualité spermatique différente au travers des différents sites, pour mieux caractériser et quantifier cette sensibilité.

Finalement, nos résultats ont montré que des mâles conspécifiques pouvaient présenter une qualité spermatique variable suivant les caractéristiques du site dans lequel ils avaient été échantillonnés. Pour approfondir davantage ces observations et évaluer les dégâts qu'une diminution de fertilité pourrait engendrer sur la colonie, nous pourrions imaginer retourner en fin de saison sur les différents sites, et collecter de jeunes reines fécondées afin de voir si le taux de viabilité et de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes stockés dans leur spermathèque sont similaires à ceux que nous avons mesurés chez les mâles. S'ils s'avèrent supérieurs chez les femelles, cela ouvrirait la voie à l'idée que les femelles disposent d'un mécanisme de sélection visant à conserver uniquement les spermatozoïdes intègres et viables, ou un comportement d'évitement d'accouplement avec des mâles stressés. Au contraire, s'ils s'avèrent similaires, il faudrait voir s'il y a une corrélation positive entre la qualité spermatique des mâles et le bon développement des colonies en prenant, par exemple, comme paramètres la masse du couvain et le nombre de sexués produits.

VIII. Bibliographie

Ahrne, K., Bengtsson, J., & Elmqvist, T. (2009). Bumble bees (*Bombus* spp) along a gradient of increasing urbanization. *PLoS one*, 4(5), e5574.

Albrechtová, J., Albrecht, T., Ďureje, L., Pallazola, V. A., & Piálek, J. (2014). Sperm morphology in two house mouse subspecies: do wild-derived strains and wild mice tell the same story?. *PLoS One*, 9(12), e115669.

Alford, D. V. (1975). *Bumblebees*. Davis-Poynter.

Ascher, J. S. and J. Pickering. (2020). *Discover Life bee species guide and world checklist* (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila).

Baer, B. (2003). Bumblebees as model organisms to study male sexual selection in social insects. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54(6), 521-533.

Baer, B., Schmid-Hempel, P., Høeg, J. T., & Boomsma, J. J. (2003). Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. *Insectes Sociaux*, 50(2), 101-108.

Baer, B., De Jong, G., Schmid-Hempel, R., Schmid-Hempel, P., Høeg, J. T., & Boomsma, J. J. (2006). Heritability of sperm length in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Genetica*, 127(1), 11-23.

Baer, B., Dijkstra, M. B., Mueller, U. G., Nash, D. R., & Boomsma, J. J. (2009). Sperm length evolution in the fungus-growing ants. *Behavioral Ecology*, 20(1), 38-45.

Ball, F. J. (1914). Les bourdons de la Belgique. *Annales de la Societe Entomologique de Belgique*, 58, 77.

Ball, F. J. (1920). Notes supplémentaires sur les bourdons de la Belgique. *Annales de la Societe Entomologique de Belgique*, 60, 31.

Barraud, A., Vanderplanck, M., Nadarajah, S., & Michez, D. (2020). The impact of pollen quality on the sensitivity of bumblebees to pesticides. *Acta oecológica*, 105, 103552.

Belsky, J. E., Camp, A. A., & Lehmann, D. M. (2020). The importance of males to bumble bee (*Bombus* species) nest development and colony viability. *Insects*, 11(8), 506.

Bergman, P., & Bergström, G. (1997). Scent marking, scent origin, and species specificity in male pre-mating behavior of two Scandinavian bumblebees. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1235-1251.

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

Bourke, A. F. (1988). Worker reproduction in the higher eusocial Hymenoptera. *The quarterly review of biology*, 63(3), 291-311.

Breckels, R. D., & Neff, B. D. (2013). The effects of elevated temperature on the sexual traits, immunology and survivorship of a tropical ectotherm. *Journal of Experimental Biology*, 216(14), 2658-2664.

- Cameron, S. A., & Sadd, B. M. (2020). Global trends in bumble bee health. *Annual review of entomology*, 65, 209-232.
- Campion, C., Rajamohan, A., & Dillon, M. E. (2023). Sperm can't take the heat: Short-term temperature exposures compromise fertility of male bumble bees (*Bombus impatiens*). *Journal of Insect Physiology*, 146, 104491.
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., ... & Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401), 59-67.
- Carvell, C. (2002). Habitat use and conservation of bumblebees (*Bombus* spp.) under different grassland management regimes. *Biological conservation*, 103(1), 33-49.
- Carvell, C., Meek, W. R., Pywell, R. F., & Nowakowski, M. (2004). The response of foraging bumblebees to successional change in newly created arable field margins. *Biological Conservation*, 118(3), 327-339.
- Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G. J., Siuda, M., Bąk, B., Judycka, S., & Karol, H. (2017). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 48, 211-222.
- Climat.be. (2023). Climat.be. <https://climat.be> consulté le 18 juin 2023.
- Collins, A. M. (2004). Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination. *Invertebrate reproduction & development*, 45(3), 231-237.
- Cooley, H., & Vallejo-Marín, M. (2021). Buzz-pollinated crops: a global review and meta-analysis of the effects of supplemental bee pollination in tomato. *Journal of Economic Entomology*, 114(2), 505-519.
- Cowles, R. B., & Bogert, C. M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of the AMNH*; v. 83, article 5.
- Cresswell, J. E., Robert, F. X. L., Florance, H., & Smirnoff, N. (2014). Clearance of ingested neonicotinoid pesticide (imidacloprid) in honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest management science*, 70(2), 332-337.
- Cummins, J. M., & Woodall, P. F. (1985). On mammalian sperm dimensions. *Reproduction*, 75(1), 153-175.
- Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., & Samborski, J. (2015). Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie*, 46, 1-9.
- Dafni, A., Kevan, P., Gross, C. L., & Goka, K. (2010). *Bombus terrestris*, pollinator, invasive and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes. *Applied Entomology and Zoology*, 45(1), 101-113.
- Danforth, B. (2007). Bees. *Current biology*, 17(5), R156-R161.
- Darrouzet, E., & Corbara, B. (2016). *Les insectes sociaux*. éditions Quæ.
- Darwin, C. (1865). On the flight paths of male humble bees (translated from German by R.B. Freeman). *The Works of Charles Darwin: An Annotated Bibliographical Handlist*. Appendix. Dawson's of Pall Mall, London.

- Dávila, F., & Aron, S. (2017). Protein restriction affects sperm number but not sperm viability in male ants. *Journal of insect physiology*, 100, 71-76.
- De Luca, P. A., & Vallejo-Marín, M. (2013). What's the 'buzz' about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Current opinion in plant biology*, 16(4), 429-435.
- Diaz-Forero, I., Kuusemets, V., Mänd, M., Liivamägi, A., Kaart, T., & Luig, J. (2013). Influence of local and landscape factors on bumblebees in semi-natural meadows: a multiple-scale study in a forested landscape. *Journal of insect conservation*, 17, 113-125.
- Drossart, M., Rasmont, P., Vanormelingen, P., Dufrêne, M., Folschweiller, M., Pauly, A., ... & Michez, D. (2019). Belgian red list of bees.
- Drossart, M., & Gérard, M. (2020). Beyond the decline of wild bees: Optimizing conservation measures and bringing together the actors. *Insects*, 11(9), 649.
- Duchateau, M. J., & Marien, J. (1995). Sexual biology of haploid and diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Insectes Sociaux*, 42, 255-266.
- Dutta, P. K., & Radner, R. (2009). A strategic analysis of global warming: Theory and some numbers. *Journal of Economic Behavior & Organization*, 71(2), 187-209.
- Duvoisin, N., Baer, B., & Schmid-Hempel, P. (1999). Sperm transfer and male competition in a bumblebee. *Animal Behaviour*, 58(4), 743-749.
- Estoup, A., Scholl, A., Pouvreau, A., & Solignac, M. (1995). Monoandry and polyandry in bumble bees (Hymenoptera; Bombinae) as evidenced by highly variable microsatellites. *Molecular Ecology*, 4(1), 89-94.
- Evenson, D. P. (2013). Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Spermatogenesis: methods and protocols*, 147-164.
- Feltham, H., Park, K., & Goulson, D. (2014). Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology*, 23(3), 317-323.
- Fischer, J., & Lindenmayer, D. B. (2007). Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global ecology and biogeography*, 16(3), 265-280.
- Fisher, A., & Rangel, J. (2018). Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. *PLoS One*, 13(12), e0208630.
- Folschweiller, M., Drossart, M., D'Haeseleer, J., Marescaux, Q., Rey, G., Rousseau-Piot, J. S., ... & Rasmont, P. (2019). Plan d'action transfrontalier en faveur des pollinisateurs sauvages.
- Folschweiller, M., Hubert, B., Rey, G., Barbier, Y., D'Haeseleer, J., Drossart, M., & Vray, S. (2020). Atlas des bourdons de Belgique et du nord de la France. 154.
- Fuchs, R., Herold, M., Verburg, P. H., Clevers, J. G., & Eberle, J. (2015). Gross changes in reconstructions of historic land cover/use for Europe between 1900 and 2010. *Global change biology*, 21(1), 299-313.
- Fussell, M., & Corbet, S. A. (1992). The nesting places of some British bumble bees. *Journal of Apicultural Research*, 31(1), 32-41.

- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological economics*, 68(3), 810-821.
- Garner, D. L., & Johnson, L. A. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of reproduction*, 53(2), 276-284.
- Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), 105-108.
- Godfray, H. C. J., Blacquiere, T., Field, L. M., Hails, R. S., Petrokofsky, G., Potts, S. G., ... & McLean, A. R. (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1786), 20140558.
- Goodwin, S. G. (1995). Seasonal phenology and abundance of early-, mid-and long-season bumble bees in southern England, 1985–1989. *Journal of Apicultural Research*, 34(2), 79-87.
- Goulson, D. (2003). *Bumblebees: their behaviour and ecology*. Oxford University Press, USA, pg. 4-10.
- Goulson, D., Lye, G., & Darvill, B. (2008). The decline and conservation of bumblebees. *Annual review of entomology*, 53, 191-208.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.
- Gradish, A. E., Van Der Steen, J., Scott-Dupree, C. D., Cabrera, A. R., Cutler, G. C., Goulson, D., ... & Thompson, H. (2019). Comparison of pesticide exposure in honey bees (Hymenoptera: Apidae) and bumble bees (Hymenoptera: Apidae): implications for risk assessments. *Environmental Entomology*, 48(1), 12-21.
- Greeff, M., & Schmid-Hempel, P. (2008). Sperm viability in the male accessory testes and female spermathecae of the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *European Journal of Entomology*, 105(5).
- Hance, T., van Baaren, J., Vernon, P., & Boivin, G. (2007). Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 107-126.
- Heinrich, B. (2004). *Bumblebee economics*. Harvard University Press, p.11,21.
- Herring, S. C., Hoerling, M. P., Kossin, J. P., Peterson, T. C., & Stott, P. A. (2015). Explaining extreme events of 2014 from a climate perspective. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 96(12), S1-S172.
- Hurley, L. L., McDiarmid, C. S., Friesen, C. R., Griffith, S. C., & Rowe, M. (2018). Experimental heatwaves negatively impact sperm quality in the zebra finch. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1871), 20172547.
- Hutchinson, G. E. (1950). Marginalia. *American Scientist*, 38(4), 612-619.
- IRM (2023). Dico Météo : Vague de chaleur sur www.meteo.be.
- Jamieson, B. G. (1987). *The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa*. CUP Archive.

- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D., & Ellis, M. D. (2013). Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 88-95.
- Johnson, C. N., Balmford, A., Brook, B. W., Buettel, J. C., Galetti, M., Guangchun, L., & Wilmshurst, J. M. (2017). Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene. *Science*, 356(6335), 270-275.
- Karl, T. R., & Trenberth, K. E. (2003). Modern global climate change. *science*, 302(5651), 1719-1723.
- Kells, A. R., & Goulson, D. (2003). Preferred nesting sites of bumblebee queens (Hymenoptera: Apidae) in agroecosystems in the UK. *Biological conservation*, 109(2), 165-174.
- Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G., & Given, K. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS one*, 7(1), e29268.
- Le Féon, V., Schermann-Legionnet, A., Delettre, Y., Aviron, S., Billeter, R., Bugter, R., ... & Burel, F. (2010). Intensification of agriculture, landscape composition and wild bee communities: a large scale study in four European countries. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 137(1-2), 143-150.
- Linguadoca, A., Rizzi, C., Villa, S., & Brown, M. J. (2021). Sulfoxaflor and nutritional deficiency synergistically reduce survival and fecundity in bumblebees. *Science of the Total Environment*, 795, 148680.
- Lu, C., Hung, Y. T., & Cheng, Q. (2020). A review of sub-lethal neonicotinoid insecticides exposure and effects on pollinators. *Current pollution reports*, 6, 137-151.
- MacArthur, R. H., & Wilson, E. O. (1967). *The theory of island biogeography* (2001 reprint ed.). Princeton university press.
- Maebe, K., Karise, R., Meeus, I., Mänd, M., & Smaghe, G. (2019). Pattern of population structuring between Belgian and Estonian bumblebees. *Scientific reports*, 9(1), 9651.
- Martinet, B., Lecocq, T., Smet, J., & Rasmont, P. (2015a). A protocol to assess insect resistance to heat waves, applied to bumblebees (*Bombus Latreille*, 1802). *PloS one*, 10(3), e0118591.
- Martinet, B., Rasmont, P., Cederberg, B., Evrard, D., Ødegaard, F., Paukkunen, J., & Lecocq, T. (2015b). Forward to the north: two Euro-Mediterranean bumblebee species now cross the Arctic Circle. In *Annales de la Société entomologique de France (NS)* (Vol. 51, No. 4, pp. 303-309). Taylor & Francis.
- Martinet, B., Zambra, E., Przybyla, K., Lecocq, T., Anselmo, A., Nonclercq, D., ... & Hennebert, E. (2021a). Mating under climate change: Impact of simulated heatwaves on the reproduction of model pollinators. *Functional Ecology*, 35(3), 739-752.
- Martinet, B., Dellicour, S., Ghisbain, G., Przybyla, K., Zambra, E., Lecocq, T., ... & Rasmont, P. (2021b). Global effects of extreme temperatures on wild bumblebees. *Conservation Biology*, 35(5), 1507-1518.
- Martinet, B., Renard T., Wattiez R., Libbrecht R., Boseret M., Colgan J. & Aron, S. Climate-associated advanced paternal age affects sperm quality and colony fitness in key pollinators. Under review.

Martinet, B., Przybyla, K., Decroo, C., Wattiez, R. & Aron, S. Keeping sperm alive under heat stress: a proteomics response in social insects. *Proceedings B*.

Martinet, B., Przybyla, K., Aron, S., Michez, D., Bulet, P. & Dalel, A. Differential hemolymph protein expression in wild bumblebees provides insights into heat stress management. In prep.

McNeil, D. J., McCormick, E., Heimann, A. C., Kammerer, M., Douglas, M. R., Goslee, S. C., ... & Hines, H. M. (2020). Bumble bees in landscapes with abundant floral resources have lower pathogen loads. *Scientific Reports*, 10(1), 22306.

Meehl, G. A., & Tebaldi, C. (2004). More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. *Science*, 305(5686), 994-997.

Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). JHU press, p.60.

Mievis, P. (2023). Les vagues de chaleur en Belgique depuis 1901. *MeteoBelgique.be*. <https://www.meteobelgique.be/article/articles-et-dossier/le-climat/2084-les-vagues-de-chaleurenbelgiquedepuis1901#:~:text=Encore%20un%20été%20remarquable%20%3A%20on%2C10%20août%20au%2028%20août> consulté le 23 juillet 2023.

Minnameyer, A., Strobl, V., Bruckner, S., Camenzind, D. W., Van Oystaeyen, A., Wäckers, F., ... & Straub, L. (2021). Eusocial insect declines: insecticide impairs sperm and feeding glands in bumblebees. *Science of the total environment*, 785, 146955.

Mommaerts, V., & Smaghe, G. (2011). Side-effects of pesticides on the pollinator *Bombus*: an overview (pp. 507-552). In-Tech.

Nicholls, C. I., & Altieri, M. A. (2013). Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable development*, 33, 257-274.

Nieto, A., Roberts, S.P.M., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., García Criado, M., Biesmeijer, J.C., Bogusch, P., Dathe, H.H., De la Rúa, P., De Meulemeester, T., Dehon, M., Dewulf, A., Ortiz-Sánchez, F.J., Lhomme, P., Pauly, A., Potts, S.G., Praz, C., Quaranta, M., Radchenko, V.G., Scheuchl, E., Smit, J., Straka, J., Terzo, M., Tomozii, B., Window, J. and Michez, D. (2014). *European Red List of bees*. Luxembourg: Publication Office of the European Union.

Öckinger, E., & Smith, H. G. (2007). Semi-natural grasslands as population sources for pollinating insects in agricultural landscapes. *Journal of applied ecology*, 44(1), 50-59.

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

Osborne, J. L., Martin, A. P., Shortall, C. R., Todd, A. D., Goulson, D., Knight, M. E., ... & Sanderson, R. A. (2008). Quantifying and comparing bumblebee nest densities in gardens and countryside habitats. *Journal of Applied Ecology*, 45(3), 784-792.

Paynter, E., Baer-Imhoof, B., Linden, M., Lee-Pullen, T., Heel, K., Rigby, P., & Baer, B. (2014). Flow cytometry as a rapid and reliable method to quantify sperm viability in the honeybee *Apis mellifera*. *Cytometry Part A*, 85(5), 463-472.

Pech-May, F. G., Medina-Medina, L., de J. May-Itzá, W., Paxton, R. J., & Quezada-Euán, J. J. G. (2012). Colony pollen reserves affect body size, sperm production and sexual development in males of the stingless bee *Melipona beecheii*. *Insectes sociaux*, 59, 417-424.

- Pérez-Crespo, M., Pintado, B., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(1), 40-47.
- Pettis, J. S., Rice, N., Joselow, K., vanEngelsdorp, D., & Chaimanee, V. (2016). Colony failure linked to low sperm viability in honey bee (*Apis mellifera*) queens and an exploration of potential causative factors. *PloS one*, 11(2), e0147220.
- Phelps, J. D., Strang, C. G., Gbylik-Sikorska, M., Sniegocki, T., Posyniak, A., & Sherry, D. F. (2018). Imidacloprid slows the development of preference for rewarding food sources in bumblebees (*Bombus impatiens*). *Ecotoxicology*, 27(2), 175-187.
- Potts, S. G., Ngo, H. T., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., ... & Vanbergen, A. (2016). The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production.
- Prys-Jones, O. E., & Corbet, S. A. (2015). *Bumblebees* (Vol. 6). Pelagic Publishing Ltd.
- Przybyla, K. (2019). Impact du stress hyperthermique sur la fertilité et le profil protéique des mâles de bourdons (Hymenoptera : Apidae). Mémoire de fin d'études. Université de Mons, Mons.
- Przybyla, K., Michez, D., Zambra, E., Anselmo, A., Hennebert, E., Rasmont, P., & Martinet, B. (2021). Effects of Heat Stress on Mating Behavior and Colony Development in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9.
- Rasmont, P., & Mersch, P. (1988). First estimation of faunistic drift by bumblebees of Belgium (Hymenoptera: Apidae). *Annalen van de Koninklijke Belgische Vereniging voor Dierkunde*.
- Rasmont P. & Pauly A. (2010). Les bourdons de la Belgique. Atlas Hymenoptera, Mons, Gembloux. <http://www.zoologie.umh.ac.be//hymenoptera/page.aspx?ID=160>
- Rasmont, P., & Iserbyt, S. (2012, January). The Bumblebees Scarcity Syndrome: Are heat waves leading to local extinctions of bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*)?. In *Annales de la Société entomologique de France* (Vol. 48, No. 3-4, pp. 275-280). Taylor & Francis Group.
- Rasmont, P., Franzen, M., Lecocq, T., Harpke, A., Roberts, S. P., Biesmeijer, J. C., ... & Schweiger, O. (2015). Climatic risk and distribution atlas of European bumblebees (Vol. 10, pp. 1-236). Pensoft Publishers.
- Rasmont, P., Boevé, J. L., de Graaf, D. C., Dendoncker, N., Dufrêne, M., Smagghe, G., ... & Zambra, E. (2019). Multidisciplinary assessment of BELgian wild BEE decline to adapt mitigation management policy (BELBEES).
- Ratnieks, F. L., & Reeve, H. K. (1992). Conflict in single-queen hymenopteran societies: the structure of conflict and processes that reduce conflict in advanced eusocial species. *Journal of Theoretical Biology*, 158(1), 33-65.
- Roncoroni, F., Kast C., & Kilchenmann V. (2020). Sources de pollen et de nectar pour les abeilles mellifères. Ed. Agroscope, Zentrum für Bienenforschung, Bern., 45 pp.
- Röseler, P. F. (1973). Die anzahl der spermien im receptaculum seminis von hummelköniginnen (Hym., Apoidea, Bombinae). *Apidologie*, 4(3), 267-274.

- Rundlöf, M., Andersson, G. K., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., ... & Smith, H. G. (2015). Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, 521(7550), 77-80.
- Sales, K., Vasudeva, R., Dickinson, M. E., Godwin, J. L., Lumley, A. J., Michalczyk, Ł., ... & Gage, M. J. (2018). Experimental heatwaves compromise sperm function and cause transgenerational damage in a model insect. *Nature Communications*, 9(1), 1-11.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.
- Schmehl, D. R., Teal, P. E., Frazier, J. L., & Grozinger, C. M. (2014). Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of insect physiology*, 71, 177-190.
- Scholer, J., & Krischik, V. (2014). Chronic exposure of imidacloprid and clothianidin reduce queen survival, foraging, and nectar storing in colonies of *Bombus impatiens*. *PLoS One*, 9(3), e91573.
- Soroye, P., Newbold, T., & Kerr, J. (2020). Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents. *Science*, 367(6478), 685-688.
- Stanley, D. A., Smith, K. E., & Raine, N. E. (2015). Bumblebee learning and memory is impaired by chronic exposure to a neonicotinoid pesticide. *Scientific reports*, 5(1), 1-10.
- Stanley, D. A., Russell, A. L., Morrison, S. J., Rogers, C., & Raine, N. E. (2016). Investigating the impacts of field-realistic exposure to a neonicotinoid pesticide on bumblebee foraging, homing ability and colony growth. *Journal of Applied Ecology*, 53(5), 1440-1449.
- StatBel. (2023). Structure de la population. <https://statbel.fgov.be/fr> consulté le 21 juillet 2023.
- Stott, P. A., Stone, D. A., & Allen, M. R. (2004). Human contribution to the European heatwave of 2003. *Nature*, 432(7017), 610-614.
- Straub, L., Villamar-Bouza, L., Bruckner, S., Chantawannakul, P., Gauthier, L., Khongphinitbunjong, K., ... & Williams, G. R. (2016). Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1835), 20160506.
- Straub, L., Minnameyer, A., Camenzind, D., Kalbermatten, I., Tosi, S., Van Oystaeyen, A., ... & Strobl, V. (2022). Thiamethoxam as an inadvertent anti-aphrodisiac in male bees. *Toxicology reports*, 9, 36-45.
- Straw, E. A., Carpentier, E. N., & Brown, M. J. (2021). Roundup causes high levels of mortality following contact exposure in bumble bees. *Journal of Applied Ecology*, 58(6), 1167-1176.
- Straw, E. A., & Brown, M. J. (2021). Co-formulant in a commercial fungicide product causes lethal and sub-lethal effects in bumble bees. *Scientific reports*, 11(1), 1-10.
- Strobl, V., Albrecht, M., Villamar-Bouza, L., Tosi, S., Neumann, P., & Straub, L. (2021). The neonicotinoid thiamethoxam impairs male fertility in solitary bees, *Osmia cornuta*. *Environmental pollution*, 284, 117106.

- Stürup, M., Baer-Imhoof, B., Nash, D. R., Boomsma, J. J., & Baer, B. (2013). When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology*, 24(5), 1192-1198.
- Svensson, B., Lagerlöf, J., & Svensson, B. G. (2000). Habitat preferences of nest-seeking bumble bees (Hymenoptera: Apidae) in an agricultural landscape. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 77(3), 247-255.
- Tapparo, A., Marton, D., Giorio, C., Zanella, A., Soldà, L., Marzaro, M., ... & Girolami, V. (2012). Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. *Environmental science & technology*, 46(5), 2592-2599.
- Tasei, J., Moinard, C., Moreau, L., Himpens, B., & Guyonnaud, S. (1998). Relationship between aging, mating and sperm production in captive *Bombus terrestris*. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 107-113.
- Tsuji, K. (1996). Queen-male conflict over sperm use in social insects. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(12), 490-491.
- Vanderplanck, M., Moerman, R., Rasmont, P., Lognay, G., Wathelet, B., Wattiez, R., & Michez, D. (2014). How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees?. *PloS one*, 9(1), e86209.
- Vanderplanck, M., Martinet, B., Carvalheiro, L. G., Rasmont, P., Barraud, A., Renaudeau, C., & Michez, D. (2019). Ensuring access to high-quality resources reduces the impacts of heat stress on bees. *Scientific reports*, 9(1), 12596.
- Velthuis, H. H. (2002). The historical background of the domestication of the bumble-bee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture. *Pollinating Bees-The conservation link between agriculture and nature*. Ministry of Environment, Sao Paulo, Brasil, 177, 184.
- Vereecken, N. J., Appeldoorn, M., & Colomb, P. (2017). Vers un fleurissement favorable aux pollinisateurs. *Collection Espaces Verts*, n°2.
- Vray, S. (2018). Cent ans de déclin des bourdons en Belgique: influence du climat et de l'occupation du sol (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat. Université de Mons & Université de Namur, Mons & Namur, 490pp).
- Vray, S., Rollin, O., Rasmont, P., Dufrêne, M., Michez, D., & Dendoncker, N. (2019). A century of local changes in bumblebee communities and landscape composition in Belgium. *Journal of Insect Conservation*, 23, 489-501.
- Wang, L., Wu, J., Li, K., Sadd, B. M., Guo, Y., Zhuang, D., ... & Li, J. (2019). Dynamic changes of gut microbial communities of bumble bee queens through important life stages. *Msystems*, 4(6), e00631-19.
- Whitehorn, P. R., O'connor, S., Wackers, F. L., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351-352.
- Williams, P. H. (1985). A preliminary cladistic investigation of relationships among the bumble bees (Hymenoptera, Apidae). *Systematic Entomology*, 10(2), 239-255.

Zambra, E., Martinet, B., Brasero, N., Michez, D., & Rasmont, P. (2020). Hyperthermic stress resistance of bumblebee males: test case of Belgian species. *Apidologie*, 51, 911-920.

Zhao, H., Mashilingi, S. K., Liu, Y., & An, J. (2021). Factors influencing the reproductive ability of male bees: current knowledge and further directions. *Insects*, 12(6), 529.

IX. Annexes

Tableau A1. Résumé de la longueur des spermatozoïdes pour chaque espèce. Pour chaque espèce, la longueur des spermatozoïdes provenant du même individu (n=7) a été mesurée.

	Longueur des spermatozoïdes				
	<i>B. hypnorum</i>	<i>B. lapidarius</i>	<i>B. pascuorum</i>	<i>B. pratorum</i>	<i>B. terrestris</i>
1	206,011 µm	182,17 µm	164,386 µm	210,849 µm	156,167 µm
2	207,03 µm	184,712 µm	174,083 µm	216,95 µm	169,08 µm
3	199,666 µm	186,933 µm	162,721 µm	212,544 µm	170,464 µm
4	199,539 µm	186,121 µm	177,121 µm	209,586 µm	164,226 µm
5	199,745 µm	189,418 µm	154,904 µm	213,818 µm	160,633 µm
6	207,144 µm	179,861 µm	170,847 µm	209 µm	169,08 µm
7	203,241 µm	191,098 µm	158,852 µm	214,149 µm	161,014 µm
Moyenne	203,197 ± 3,558 µm	185,759 ± 3,919 µm	166,131 ± 8,164 µm	212,414 ± 2,819 µm	164,381 ± 5,386 µm

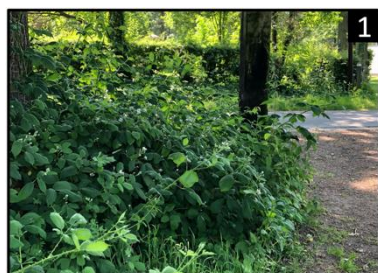
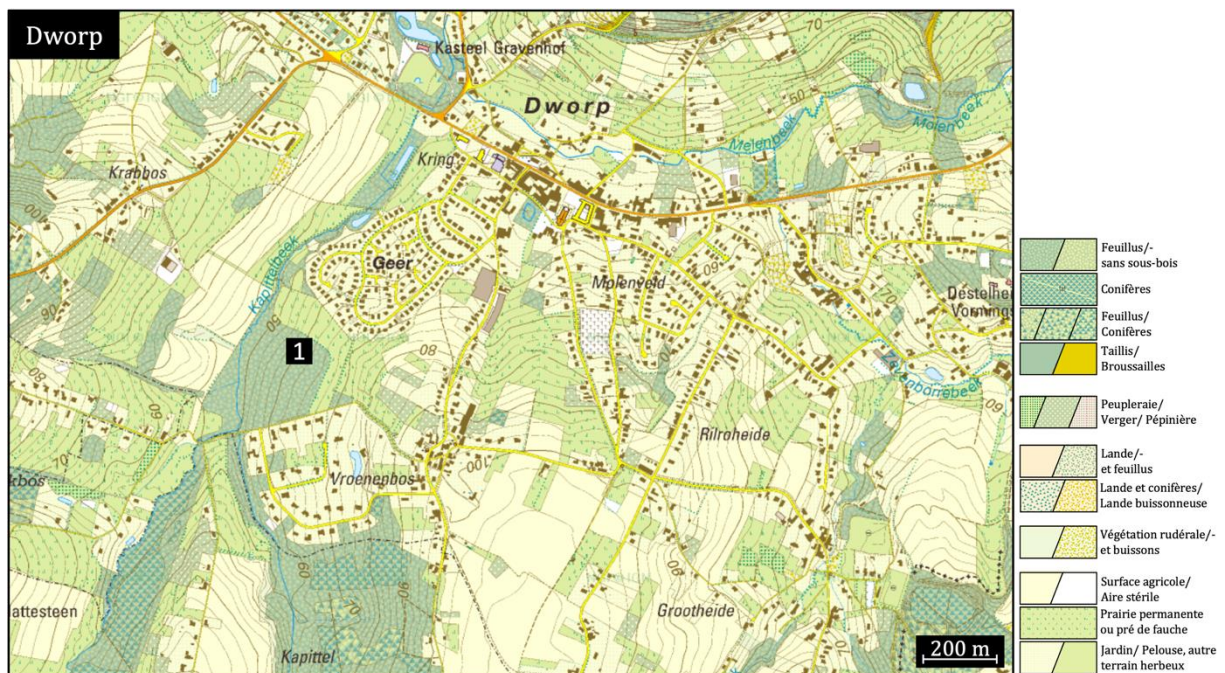


Figure A1. Position géographique des stations échantillonnées à Dworp et détails de l'occupation du sol. Carte de l'Institut Géographique National (IGN) belge.

Tableau A2. Résumé des moyennes obtenues pour la qualité spermatique chez les mâles de *B. hypnorum*, *B. lapidarius*, *B. pascuorum*, *B. pratorum*, *B. terrestris* et *B. terrestris*, suivant la station échantillonnée.

	<i>B. hypnorum</i>	<i>B. lapidarius</i>	<i>B. pascuorum</i>	<i>B. pratorum</i>	<i>B. terrestris</i>
Dworp					
Taux de viabilité	84,17 ± 15,20% (n = 16)	78,75 ± 14,27% (n = 11)	(n = 0)	89,72 ± 7,87% (n = 10)	82,62 ± 11,53% (n = 6)
Taux de fragmentation	17,42 ± 9,44% (n = 5)	10,03 ± 2,89% (n = 5)	(n = 0)	10,74 ± 4,78% (n = 5)	16,54 ± 6,93% (n = 10)
Kalmthout					
Taux de viabilité	64,63 ± 16,33% (n = 9)	67,48 ± 15,01% (n = 9)	59,87 ± 7,69% (n = 6)	86,08 ± 7,52% (n = 9)	86,00 ± 4,45% (n = 10)
Taux de fragmentation	27,90 ± 4,44% (n = 5)	20,26 ± 11,32% (n = 5)	36,93 ± 10,68% (n = 5)	17,08 ± 5,02% (n = 6)	18,37 ± 6,03% (n = 5)
Ostende					
Taux de viabilité	87,51 ± 1,62% (n = 3)	87,72 ± 4,41% (n = 11)	75,66 ± 14,40% (n = 7)	84,71 ± 12,48% (n = 8)	83,02 ± 6,83% (n = 14)
Taux de fragmentation	(n = 0)	17,16 ± 8,36% (n = 5)	42,43 ± 10,39% (n = 5)	25,34 ± 7,09% (n = 6)	24,05 ± 10,40% (n = 5)
Spa					
Taux de viabilité	73,40% (n = 1)	80,94 ± 12,79% (n = 12)	60,68 ± 8,73% (n = 3)	84,89 ± 10,50% (n = 13)	85,70 ± 7,66% (n = 12)
Taux de fragmentation	18,57% (n = 1)	22,87 ± 2,65% (n = 5)	31,26 ± 1,08% (n = 3)	20,02 ± 6,41% (n = 5)	10,86 ± 7,65% (n = 5)
Trivières					
Taux de viabilité	78,19 ± 24,78% (n = 6)	85,51 ± 4,73% (n = 7)	77,75 ± 10,52% (n = 10)	87,81 ± 6,88% (n = 12)	86,77 ± 9,53% (n = 9)
Taux de fragmentation	21,93 ± 2,31% (n = 5)	12,75 ± 3,53% (n = 5)	23,27 ± 4,54% (n = 5)	18,28 ± 13,75% (n = 5)	15,14 ± 5,57% (n = 5)



Figure A2. Position géographique des stations échantillonnées à Kalmthout et détails de l'occupation du sol. Carte de l'Institut Géographique National (IGN) belge.



Figure A3. Position géographique des stations échantillonnées à Ostende et détails de l'occupation du sol. Carte de l'Institut Géographique National (IGN) belge.



Figure A4. Position géographique des stations échantillonnées à Spa et détails de l'occupation du sol. Carte de l'Institut Géographique National (IGN) belge.

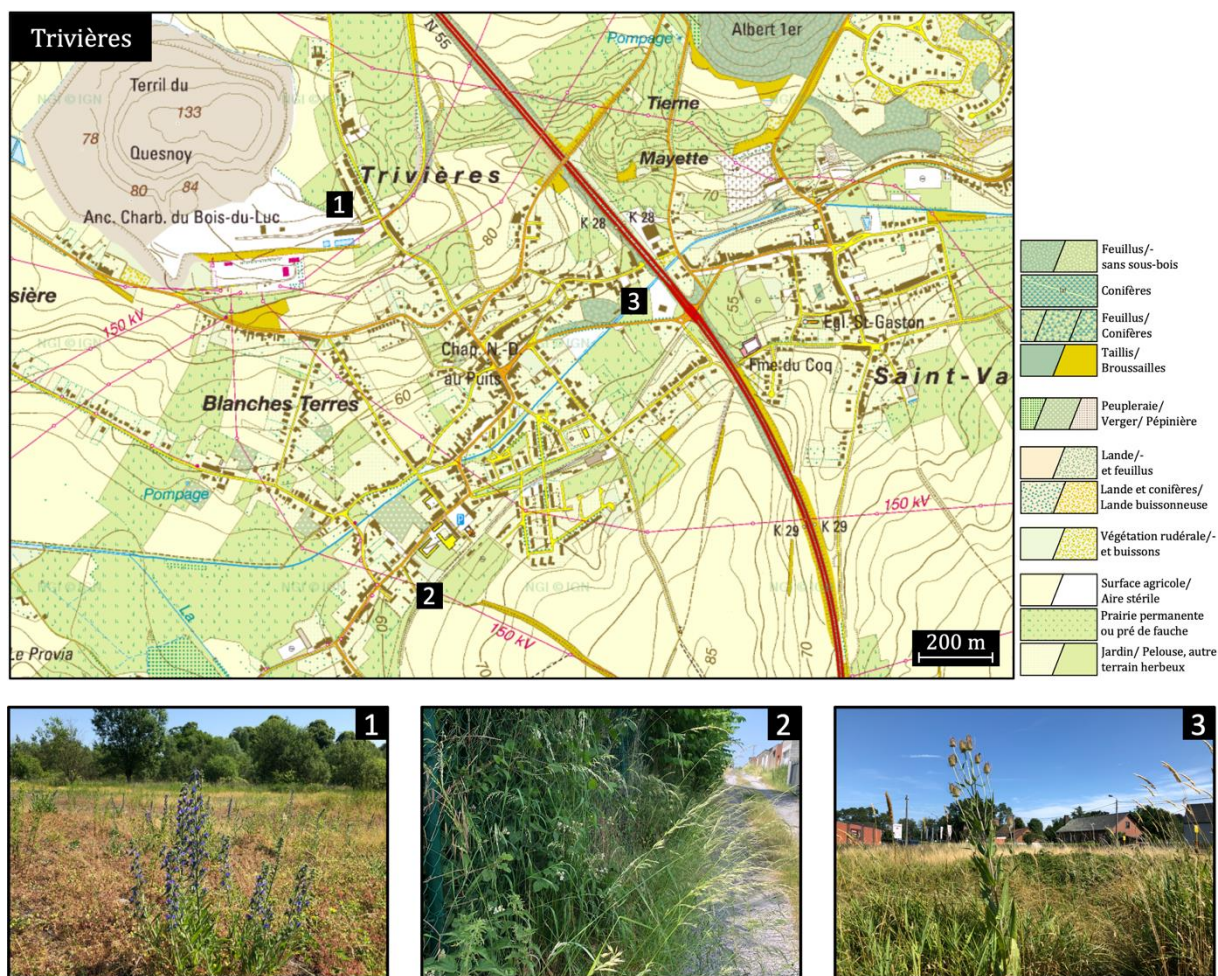


Figure A5. Position géographique des stations échantillonnées à Trivières et détails de l'occupation du sol. Carte de l'Institut Géographique National (IGN) belge.

Tableau A3. Moyennes mensuelles des températures maximales journalières pour le mois de juin et juillet sur la période de 1991-2020. IRM (2023).

	1991-2020	T° max moyenne (°C)			T° moyenne (°C)		
		Mai	Juin	Juillet	Mai	Juin	Juillet
Ostende	16,6	19,3	21,5	12,6	15,4	17,4	
Spa	16,6	19,5	21,5	12,0	15,0	17,1	
Dworp	18,9	21,7	23,8	13,7	16,6	18,7	
Kalmthout	18,9	21,5	23,4	13,8	16,6	18,6	
Trivières	18,5	21,4	23,6	13,3	16,3	18,3	

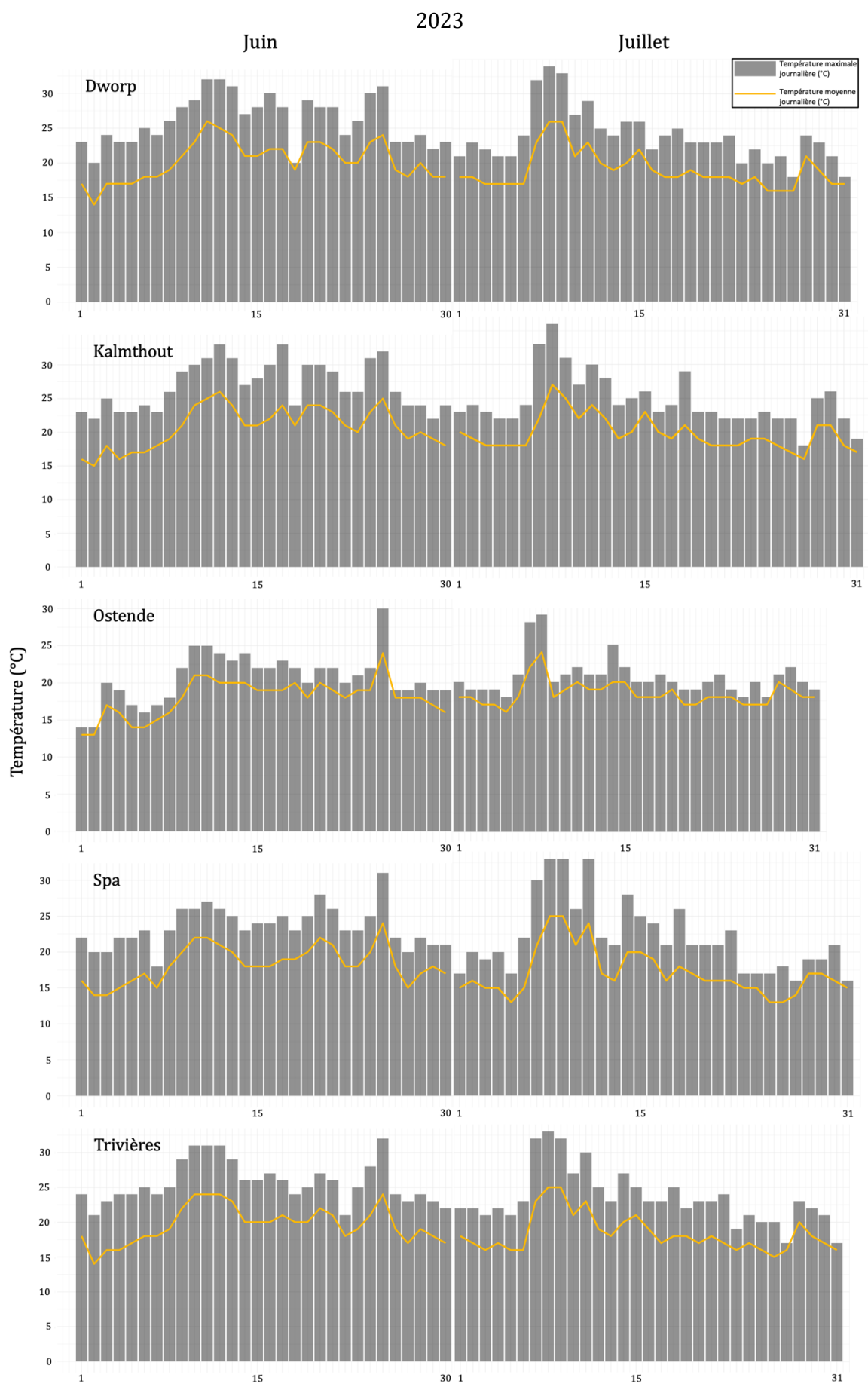


Figure A6. Moyennes mensuelles des températures maximales journalières pour le mois de juin et juillet 2023. IRM (2023).