

Faculté des bioingénieurs

Etude des besoins nutritionnels en lysine pour l'espèce *Bombus terrestris*.

AUTEUR : CHARLOTTE WARD

PROMOTEURS : ANNE-LAURE JACQUEMART ET YVAN LARONDELLE

LECTEURS : CHARLOTTE DESCAMPS ET DENIS MICHEZ

ANNEE ACADEMIQUE 2021-2022

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
BIOINGENIEUR : SCIENCES AGRONOMIQUES**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Anne-Laure Jacquemart, ma promotrice de mémoire, pour son soutien, ses conseils et sa bonne humeur. Merci d'avoir été aussi présente et réactive tout au long de l'année. Merci pour vos nombreuses relectures.

Merci à Christel Buyens pour son aide précieuse durant les manipulations de laboratoires, ainsi que pour son enthousiasme et sa bienveillance.

Je remercie également mon co-promoteur, Yvan Larondelle, pour ses conseils aiguisés en termes de nutrition.

Merci à Charlotte Descamps et Denis Michez d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant que lecteurs.

Un tout grand merci à Léna Jeannerod d'avoir pris le temps de relire mes écrits et de m'avoir accompagné à Mons récupérer le matériel nécessaire pour mes expériences.

Un remerciement spécial va à Thomas Lemaire pour ses relectures et surtout son soutien moral inconditionnel.

Enfin, je tiens à remercier mes parents pour les encouragements et le soutien qu'ils m'ont apporté pendant la réalisation de ce travail, mais également tout au long de mon parcours universitaire. Merci.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	1
Liste des figures	1
Liste des tableaux	3
1 Introduction.....	5
1.1 Contexte de l'étude	5
1.2 Les insectes pollinisateurs	6
1.2.1 Service écosystémique	6
1.2.2 Pollinisateurs de type abeilles	6
1.2.2.1 Généralités	7
1.2.2.2 Espèce d'étude : <i>Bombus terrestris</i>	8
1.2.2.3 Socialité	11
1.2.2.4 Cycle de vie des abeilles sociales.....	12
1.2.2.5 Déclin.....	14
1.3 Alimentation des abeilles	16
1.3.1 Pollen	16
1.3.2 Système digestif.....	17
1.3.2.1 Structure	17
1.3.2.2 Digestion.....	19
1.3.2.3 Microbiote intestinal	19
1.3.3 Préférences florales des abeilles.....	20
1.3.4 Préférences florales de <i>Bombus terrestris</i>	21
1.3.5 Besoins nutritionnels	22
1.3.5.1 Abeilles en général	22
1.3.5.2 <i>Bombus terrestris</i>	25
1.4 Objectifs.....	26
2 Matériel et méthodes.....	27
2.1 Elevage de <i>Bombus terrestris</i>	27
2.1.1 Microcolonies	27
2.1.2 Conditions expérimentales	28
2.2 Régimes alimentaires	29
2.2.1 Série 1 : Mise au point du protocole.....	29
2.2.2 Série 2 : Besoins nutritionnels en lysine	30
2.2.3 Préparation et administration	33
2.3 Mesures et prélèvements.....	33

2.3.1	<i>Taux de survie des ouvrières</i>	33
2.3.2	<i>Prise alimentaire des pains de pollen</i>	34
2.3.3	<i>Nids</i>	34
2.3.4	<i>Couvains</i>	34
2.3.5	<i>Contenu en polypeptides</i>	35
2.3.5.1	<i>Méthode</i>	37
2.4	<i>Analyses statistiques</i>	38
3	<i>Résultats</i>	40
3.1	<i>Série 1 : Mise au point du protocole</i>	40
3.1.1	<i>Taux de survie des ouvrières</i>	40
3.1.2	<i>Prise alimentaire des pains de pollen</i>	41
3.1.3	<i>Nids et couvains</i>	41
3.2	<i>Série 2 : Besoins nutritionnels en lysine</i>	42
3.2.1	<i>Taux de survie des ouvrières</i>	42
3.2.2	<i>Prise alimentaire des pains de pollen</i>	43
3.2.3	<i>Nids et couvains</i>	45
3.2.3.1	<i>Initiation de la construction des nids</i>	45
3.2.3.2	<i>Masse finale des nids</i>	45
3.2.3.3	<i>Couvains</i>	46
3.2.4	<i>Contenu en polypeptides</i>	49
3.2.4.1	<i>Pains de pollen</i>	51
3.2.4.2	<i>Larves isolées</i>	51
3.2.4.3	<i>Ouvrières</i>	51
3.2.4.4	<i>Fèces</i>	52
4	<i>Discussion</i>	53
4.1	<i>Besoins nutritionnels en lysine de <i>Bombus terrestris</i></i>	53
4.2	<i>Besoins nutritionnels en autres acides aminés pour <i>Bombus terrestris</i></i>	55
4.3	<i>Comportement de <i>Bombus terrestris</i></i>	55
4.3.1	<i>En conditions expérimentales</i>	55
4.3.2	<i>Dans la nature</i>	57
4.4	<i>Perspectives</i>	58
4.4.1	<i>Pains de pollen</i>	58
4.4.2	<i>Besoins nutritionnels en autres acides aminés essentiels</i>	59
4.4.3	<i>Protocole expérimental</i>	59
5	<i>Conclusion</i>	61
6	<i>Bibliographie</i>	62

7	Annexe.....	68
7.1	<i>Annexe 1</i>	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Répartition géographique de l'espèce *Bombus terrestris* (Rasmont et al., 2008)

Figure 2 – Coloration schématique des reines des 9 sous espèces de *Bombus terrestris*, avec les numéros de tergites (T_x) : (A) ssp. africanus, (B) ssp. audax, (C) ssp. calabricus, (D) ssp. canariensis, (E) ssp. dalmatinus, (F) ssp. lusitanicus, (G) ssp. sassaricus, **(H) ssp. terrestris** et (I) ssp. Xanthopus (Rasmont et al. 2008)

Figure 3 – Le cycle de vie des abeilles sociales en colonie (Benton, 2006)

Figure 4 – Différents stades de développement du couvain jusqu'à la formation d'un nouvel individu

Figure 5 – Liste rouge européenne IUCN des espèces *Bombus spp.* CR (danger critique d'extinction), EN (danger d'extinction), VU (vulnérable), NT (non menacées), LC (préoccupation mineure) et DD (données manquantes) (Nieto et al., 2014)

Figure 6 – Liste rouge des abeilles de Belgique (SAPOLL, 2019)

Figure 7 – Schéma d'un grain de pollen (Roussel 2022)

Figure 8a – Subdivisions majeures du tube digestif généralisé d'un insecte (Engel et Moran, 2013)

Figure 8b – Système digestif de l'abeille mellifère (Engel et Moran, 2013)

Figure 9 – Teneur en azote des abeilles (âgées de 7 ou 14 jours) dans les régimes alimentaires déficients en un acide aminé (de Groot 1952)

Figure 10 – Représentation schématique d'une microcolonie

Figure 11a - Disposition des microcolonies dans une salle de vol (photo personnelle)

Figure 11b - Disposition des microcolonies dans une chambre climatique (photo personnelle)

Figure 12a – Nid avec construction d'un dôme (photo personnelle)

Figure 12b – Nid sans construction de dôme (photo personnelle)

Figure 13 - Individus du couvain ; les œufs (A), les larves non isolées (B), les larves isolées (C) et les pupes (D) (photo personnelle)

Figure 14 - Courbes de réponse chromatique typiques pour la BSA (albumine de sérum bovin) et la BGG (gammaglobuline bovine) en utilisant le protocole standard de tube à essai (37°C/30min d'incubation) (Guide d'utilisation Thermoscientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 2020)

Figure 15 – Taux de survie [%] des microcolonies pour les six régimes alimentaires T0, T0.5, Za, Za0.5, Z0 et C0 au cours des 32 jours d'expérience. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P < 0.05$, selon des tests post hocs Dunn.

Figure 16 – Taux de survie cumulé [%] des microcolonies pour les dix régimes alimentaires Z₀, Z_{1.3}, Z_{1.9}, Z_{2.9}, Z_{3.9}, C₀, C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5} au cours des 35 jours d'expériences. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P < 0.05$, selon des tests post hocs Dunn.

Figure 17 – Masse finale des nids [g] des microcolonies pour les dix régimes alimentaires Z₀, Z_{1.3}, Z_{1.9}, Z_{2.9}, Z_{3.9}, C₀, C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5} au 35^e jour d'expérience. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P < 0.05$, selon des tests Tukey après une ANOVA 1.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Classification des taxons communément appelés « abeilles » (Danforth et al. 2013)

Tableau 2 – Quantités minimales en acides aminés essentiels à respecter afin d'observer une prise de poids optimum par jeune *Apis mellifera* (de Groot 1953)

Tableau 3 – Concentrations [mg/g de poids sec] d'acides aminés, déjà considérés comme essentiels pour *Apis mellifera*, dans les charges polliniques des bourdons *Bombus terrestris* ayant prélevés sur sept espèces végétales (Riesell et al., 2016)

Tableau 4 – Composition des pains de pollen en gramme, des régimes alimentaires avec ou sans pollen de saule (T₀, T_{0.5}, Z_a, Z_{a0.5}, Z₀ et C₀) lors de la mise en place du protocole

Tableau 5 – Composition des pains de pollen en gramme, pour les 10 régimes alimentaires (Z₀, Z_{1.3}, Z_{1.9}, Z_{2.9}, Z_{3.9}, C₀, C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5}) lors de la détermination des besoins en lysine. Les pourcentages de lysine libre, protéique et total par unité de pain de pollen ont été déterminés en prenant en compte du taux d'évaporation.

Tableau 6 – Composition en acides aminés essentiels (en milligramme par gramme de protéine) de la caséine (FAO, 1991), de la zéine (YANG et al., 2020) et du pollen de *Salix* (Moerman et al, 2016b)

Tableau 7 - Effet des six régimes alimentaires (T₀, T_{0.5}, Z_a, Z_{a0.5}, Z₀ et C₀) sur le développement de microcolonies de *Bombus terrestris* élevées en laboratoire pendant 32 jours. Les valeurs moyennes sont fournies avec leur écart-type. Le test Kruskal-Wallis (H) permet de voir quelles moyennes sont significativement différentes entre elles (P < 0,05). Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à P<0.05, selon des tests post hocs Dunn.

Tableau 8 - Prise alimentaire de pains de pollen par ouvrière [g] à intervalle de 2-3 jours, prenant en compte l'évaporation de l'aliment, pour les dix régimes alimentaires (Z₀, Z_{1.3}, Z_{1.9}, Z_{2.9}, Z_{3.9}, C₀, C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5}). Aucune différence significative observées entre régimes alimentaire (H=23.78, P>0.05), et jours (H=75.65, P<0.01). Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à P<0.05, selon des tests post hocs Dunn, après un test de Kruskal-Wallis.

Tableau 9 – Nombre moyen d'alvéoles construites au 4^e et 6^e jours d'expérience pour les dix régimes alimentaires Z₀, Z_{1.3}, Z_{1.9}, Z_{2.9}, Z_{3.9}, C₀, C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5}

Tableau 10 - Effet de dix régimes alimentaires (Z₀, Z_{1.3}, Z_{1.9}, Z_{2.9}, Z_{3.9}, C₀, C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5}) sur le développement de microcolonies de *Bombus terrestris* élevées en laboratoire pendant 35 jours. Les valeurs moyennes sont fournies avec leur écart-type. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à P< 0,05, selon le test post hocs Dunn, après le test de Kruskal-Wallis.

Tableau 11 - Contenu en polypeptides des pains de pollen, des fèces des ouvrières, des ouvrières vivantes et mortes pour les 10 régimes alimentaires (Z_0 , $Z_{1.3}$, $Z_{1.9}$, $Z_{2.9}$, $Z_{3.9}$, C_0 , $C_{1.5}$, $C_{2.3}$, $C_{3.4}$ et $C_{4.5}$) exprimé en microgramme de polypeptides par milligramme d'échantillon lyophilisé [$\mu\text{g}/\text{mg}$]. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $\alpha=0.05$, selon le test post hocs après une ANOVA1 ou le test Kruskal Wallis.

1 INTRODUCTION

1.1 CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Un déclin général des espèces d'insectes pollinisateurs est constaté au niveau mondial. Les changements climatiques ainsi que les modèles agricoles modernes, limitant la quantité et la densité de ressources florales dans les paysages, sont entre autres les causes majeures de ce déclin. Les Apidés, la plus grande et la plus diversifiée des familles d'abeilles, se nourrissent principalement de nectar, source principale de glucides, et de pollen, source principale de lipides et protéines. Les protéines alimentaires, à travers leur composition en acides aminés essentiels, sont indispensables pour le bon développement des larves et des abeilles adultes. Cependant, leurs besoins nutritionnels sont peu connus et peu étudiés.

Dix acides aminés ont été considérés comme essentiels pour les abeilles mellifères *Apis mellifera* par de Groot en (1952). Depuis lors, aucune autre expérience n'a été menée pour savoir si ces mêmes acides aminés sont essentiels pour les autres espèces d'abeilles.

Ce mémoire s'insère dans les recherches menées au sein du laboratoire PEPA à l'UCLouvain, dans le cadre des projets portant sur l'influence de la quantité et de la qualité nutritionnelle des ressources florales pour les pollinisateurs en paysages agricoles.

Afin d'approfondir les connaissances des besoins nutritionnels des insectes pollinisateurs, ce mémoire a pour but de déterminer les besoins particuliers en un acide aminé, la lysine, de l'espèce *Bombus terrestris* tout en mettant au point un protocole expérimental qui permettront de réaliser d'autres études sur les besoins nutritionnels de cette espèce.

L'espèce de bourdons *Bombus terrestris* est un pollinisateur robuste et utilisé commercialement pour la pollinisation de certaines cultures, particulièrement sous serre et sous tunnel.

1.2 LES INSECTES POLLINISATEURS

1.2.1 Service écosystémique

Au sein de chaque écosystème, il existe des interactions constantes entre la communauté d'êtres vivants qu'il englobe et leur environnement. Un service écosystémique est un service rendu par un écosystème pour la communauté humaine. Les services sont classés en 4 groupes : les services culturels, de soutien, de régulation et d'approvisionnement (Reid et al. 2005).

Les pollinisateurs assurent un service de régulation à travers la pollinisation (Bartholomée et Lavorel 2019). La pollinisation est préalable à la reproduction sexuée chez les Angiospermes, avec le transfert de pollen des étamines vers le pistil (Michez et al. 2019). Les Angiospermes sont la lignée de plantes vasculaires la plus présente et diversifiée au monde, avec un total de 250 000 à 260 000 espèces estimées (Danforth et al. 2006). De cette manière, les pollinisateurs offrent des services de productions indirects et contribuent à la productivité agricole (Bartomeus et al. 2014), ainsi qu'à la prolifération d'espèces non cultivées.

La production végétale mondiale est dépendante des pollinisateurs : 87.5% de l'ensemble des espèces végétales non cultivées, ainsi que plus de 75% des principales cultures vivrières mondiales, sont entre autres dépendantes de la pollinisation animale (Meeus et al. 2021). En Europe, plus de 80 % des plantes cultivées dépendent des espèces pollinisatrices Hyménoptères, particulièrement des abeilles (Michez et al. 2019).

La pollinisation possède une valeur économique mondiale estimée à 153 milliards d'euros par an (Gallai et al. 2009).

1.2.2 Pollinisateurs de type abeilles

L'efficacité des espèces pollinisatrices dépend de leur population au sein d'une communauté, de leur capacité à transporter le pollen et d'atteindre les anthères et les stigmates, ainsi que de la distance parcourue entre fleurs (Ollerton 2017).

Parmi les 350 000 espèces animales pollinisatrices connues dans le monde, les insectes forment le groupe de pollinisateurs principal avec quatre ordres majoritaires :

les Lépidoptères, les Coléoptères, les Hyménoptères et les Diptères (Ollerton 2017). Les Hyménoptères représentent l'ordre le plus diversifié, avec plus de 150 000 espèces recensées, dont 15 % représentant seulement des espèces d'abeilles (Michez et al. 2019).

Approximativement 20 000 espèces d'abeilles sont recensées mondialement, dont 2 000 en Europe (Barraud et al., 2022), une forte concentration sachant que l'Europe représente seulement 7 % de tous les habitats terrestres mondiaux (Nieto et al. 2014). Les Apidés représentent la plus grande et la plus diversifiée des familles d'abeilles, avec 5 700 espèces décrites (Danforth et al. 2013). On y retrouve notamment l'abeille domestique *Apis mellifera* et les bourdons *Bombus spp.*

1.2.2.1 Généralités

Le terme « abeilles » désigne tous les insectes faisant partie de l'ordre des Hyménoptères, de la superfamille des *Apoidea* et appartenant au clade des *Anthophila* (Tableau 1). Les *Anthophila* se divisent en 7 familles ; *Andrenidae*, *Apidae*, *Colletidae*, *Halictidae*, *Megachilidae*, *Melittidae* et *Stenotritida*, les 6 premières étant présentes Europe (Danforth et al. 2013).

Rang	Désignation scientifique
Embranchement	Arthropoda
Sous-embranchement	Hexapoda
Classe	Insecta
Sous-classe	Pterygota
Super-ordre	Endoptérygota
Ordre	Hymenoptera
Sous-ordre	Apocrita
Infra-ordre	Aculeata
Super-famille	Apoidea
/	Anthophila

Tableau 1 – Classification des taxons communément appelés « abeilles »

Les abeilles sont communément classées en deux groupes : les abeilles à longue langue (>14 mm) (*Apidae* et *Megachilidae*) et celles à courte langue (*Andrenidae*, *Colletidae*, *Halictidae*, *Melittidae* et *Stenotritidae*) (Borrell 2005; Danforth et al. 2006).

Au sein de la famille Apidés, plusieurs modes de vie sont observés (parasite, solitaire, social) et leur spécialisation alimentaire varie entre spécialistes et généralistes (Michez et al. 2019). Parmi les spécialistes, se trouvent les abeilles monolectiques, fidèles à une espèce végétale, et les abeilles oligolectiques, fidèles un groupe de plante particulier. Les abeilles polylectiques sont généralistes, butinant une grande variété de plantes à fleurs.

Plusieurs espèces d'abeilles généralistes sont domestiquées et utilisées pour la pollinisation de cultures commerciales, comme *Apis mellifera* ou *Bombus terrestris*.

1.2.2.2 Espèce d'étude : *Bombus terrestris*

Aujourd'hui, 250 espèces de bourdons du genre *Bombus* sont recensées mondialement (Williams et al. 2008), dont 68 espèces présentes en Europe (Nieto et al. 2014).

Le genre *Bombus* est inclus dans l'ordre des Hyménoptères et dans la famille des Apidés. *Bombus* fait partie de la tribu des Bombini, qui, combinée avec les Apini (abeilles mellifères), les Meliponini (abeilles dépourvues de dard) et les Euglossini (abeilles orchidées) constitue les abeilles corbiculées, possédant des corbeilles à pollen sur leurs pattes arrière (Cameron, Hines, et Williams 2007).

Les bourdons sont des abeilles pollinisatrices efficaces et robustes, figurant parmi les principaux visiteurs des plantes à fleurs des régions tempérées, alpines et arctiques (Cameron, Hines, et Williams 2007; Imran et al. 2017). À travers leur technique de bourdonnement-butinage, les bourdons font vibrer leurs ailes et leur corps, provoquant une résonance à l'intérieur de l'anthère et l'éjection du pollen (King 1993). Économiquement et écologiquement, ils font partie des insectes pollinisateurs indispensables pour l'agriculture européenne (Goulson 2003; Nieto et al. 2014).

Depuis 1987, certains pays européens, comme la Belgique et les Pays-Bas, ont débuté des élevages de l'espèce *Bombus terrestris* à grande échelle dans le but de répondre aux besoins des producteurs sous serre (S. Ghosh, Meyer-Rochow, et Jung 2021; Imran et al. 2017 ; Rasmont et al. 2008). Cette domestication et commercialisation ont introduit l'espèce dans plusieurs continents (Moerman et al. 2016a). *Bombus terrestris* est l'une des espèces de bourdons la plus répandue dans la zone Paléarctique occidentale, car capable d'exploiter une diversité d'habitats (Rasmont et al. 2008) (Figure 1).

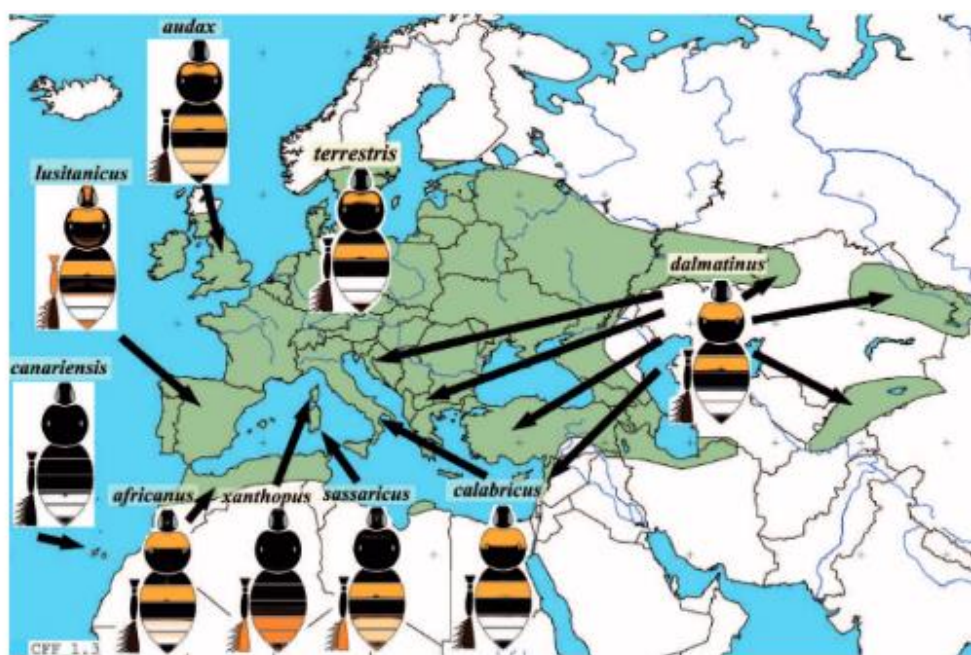


Figure 1 – Répartition géographique de l'espèce *Bombus terrestris*
(Rasmont et al., 2008)

Dotés d'un système de thermorégulation performant, les bourdons sont présents dans des environnements froids, contrairement à nombreuses autres espèces pollinisatrices (Heinrich 2004; Hines 2008). Les ouvrières butineuses sont capables de stocker plus de 90% de leur poids en nectar dans leur jabot, et jusqu'à 20 % de leur poids en pollen sur leurs corbeilles (Benton 2006).

Bombus terrestris est une espèce d'abeille eusociale vivant en colonie, composée d'une seule reine et de quelques centaines d'ouvrières (Benton 2006; Michez et al. 2019). La colonie comprend des mâles et deux castes de femelles, les reines

reproductrices et les ouvrières non reproductrices. Les tâches assignées aux individus sont spécifiques à la caste et au sexe, menant à des adaptations physiologiques, morphologiques et comportementales entre individus au sein d'une même colonie (Streinzer et Spaethe 2014). Il s'agit d'une espèce « complexe », la reine domine les autres individus de la colonie et choisi le moment de la création de la deuxième génération (mâles et futures reines). La reine *Bombus terrestris* donne naissance aux mâles et futures reines en parallèle à de nouvelles ouvrières, permettant d'assurer le bon développement de la colonie (Benton 2006).

Bombus terrestris est une espèce stockeuse de pollen et de nectar. Les bourdons stockent le pollen et le nectar dans des pots de cire construits dans le nid, afin de nourrir les individus de la colonie (Bortolotti, Pošćić, et Bogo 2020). Le pollen ramené au sein de la colonie est plus vite consommé que le nectar (Stabler et al. 2015). Le taux de butinage et la collecte de pollen des individus *Bombus terrestris* sont favorisés par une grande humidité environnementale (Peat et Goulson 2005).

Les espèces *Bombus* sont difficiles à identifier, à cause de leur monotonie morphologique (Michener 1990). Les sous-genres *Bombus* des espèces européennes (*B. terrestris*, *B. lucorum*, *B. cryptarum*, *B. magnus*, *B. maderensis* et *B. sporadicus*) se distinguent entre elles par de petites différences physiques, nécessitant de la pratique et l'aide de clés morphologiques pour les identifier correctement (Kozmus et al. 2011).

Les bourdons terrestres sont des abeilles à courte langue (nommée labium), entre 7.5-11.5mm de long (Benton 2006). Les reines *Bombus terrestris* sont de grande taille, entre 20 et 23 mm de long (Michez et al. 2019). Elles possèdent une robe courte et régulière, avec généralement le collare (bande colorée sur le pronotum) et la bande du deuxième tergite de couleur jaune œuf (Rasmont et Terzo 2010). La taille corporelle des ouvrières varie fortement entre individus, dépendant de son rôle dans la colonie (Streinzer et Spaethe 2014). Les mâles possèdent également un collare et le deuxième tergite de couleur jaune d'œuf. Le reste de leur robe est noir, à l'exception des tergites 4 et 5 (blancs). Ils possèdent souvent des soies rousses au niveau de leurs corbeilles. Très rarement, des mâles entièrement noirs sont observés (Benton 2006).

Parmi *Bombus terrestris*, 9 sous-espèces morphologiques sont reconnues (Rasmont et al. 2008) : ssp. *terrestris* (L. 1758), ssp. *africanus* (Krüger 1956), ssp. *audax* (Harris 1780), ssp. *calabricus* (Krüger 1958), ssp. *canariensis* (Pérez 1895), ssp. *dalmatinus* (Dalla Torre 1882), ssp. *lusitanicus* (Krüger 1956), ssp. *sassaricus* (Tournier 1890) et ssp. *xanthopus* (Kriechbaumer 1870). Ces sous-espèces se différencient entre elles grâce à leur panel de couleur nuancé (Figure 2).

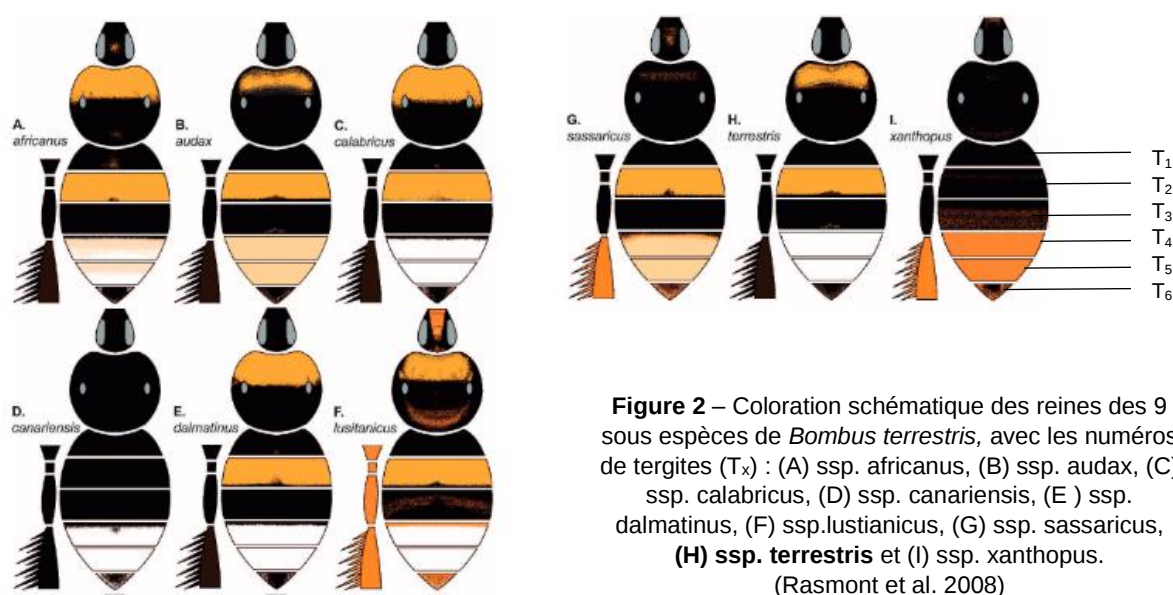


Figure 2 – Coloration schématique des reines des 9 sous espèces de *Bombus terrestris*, avec les numéros de tergites (T_x) : (A) ssp. *africanus*, (B) ssp. *audax*, (C) ssp. *calabricus*, (D) ssp. *canariensis*, (E) ssp. *dalmatinus*, (F) ssp. *lusitanicus*, (G) ssp. *sassaricus*, **(H) ssp. *terrestris*** et (I) ssp. *xanthopus*. (Rasmont et al. 2008)

La reine de *Bombus terrestris* ssp. *terrestris* (Figure 2 H), espèce étudiée dans ce travail, possède un col jaune étroit mélangé avec des poils noirs. La marge antérieure du deuxième tergite est jaune tandis que la marge postérieure du troisième tergite, les tergites 4 et 5 ainsi que le côté supérieur du sixième tergite sont blancs. Le reste du corps est noir. Les corbeilles, situées sur les pattes postérieures, sont bordées des poils noirs (Rasmont et al. 2008), servant de lieu de stockage de pollen lors du butinage.

1.2.2.3 Socialité

La catégorie de socialité est définie par le type de contacts que les individus, au sein d'une même espèce, ont entre eux, ainsi que par le lien de parenté qui les lie. Le degré de socialité varie entre les espèces eusociales et solitaires, avec des

intermédiaires comme les espèces grégaires, para-sociales ou encore sub-sociales (Michez et al. 2019).

Les abeilles eusociales représentent 6 % des espèces d'abeilles à l'échelle mondiale (Danforth, 2007). Les espèces eusociales vivent en colonie, de quelques dizaines (*Bombus terrestris*) jusqu'à plusieurs milliers d'individus (*Apis mellifera*). Au sein de la colonie, les individus présentent des différences morphologiques selon la tâche de travail leur étant assignée (Vereecken, 2017). Seuls certains individus se reproduisent, tandis que les ouvrières, stériles, s'occupent de la progéniture et du nid (Danforth et al. 2013). Les abeilles eusociales se catégorisent, soit en tant qu'espèce primitive, avec une phase solitaire incluse dans leur cycle de vie (*Bombus terrestris*), soit en tant qu'espèce évoluée, avec aucune phase solitaire (*Apis mellifera*) (Michez et al. 2019).

1.2.2.4 Cycle de vie des abeilles sociales

En Europe, le cycle de vie des abeilles sociales est annuel, à l'exception de certaines espèces, dont *Apis mellifera* (Michez et al. 2019). Au printemps, les reines sortent d'hibernation, cherchent un site de nidification, fondent leur propre colonie et meurent à l'arrivée de l'hiver. Deux générations se succèdent par an ; les ouvrières, suivies des mâles et des futures reines (Figure 3).

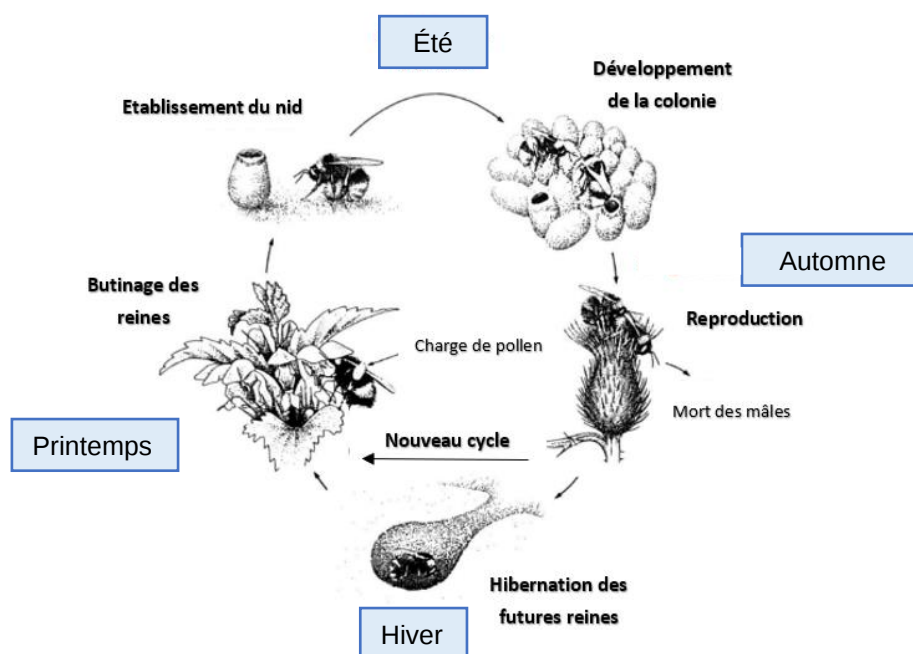


Figure 3 – Le cycle de vie des abeilles sociales en colonie (Benton, 2006)

Après l'accouplement, les reines conservent le sperme dans leur spermathèque, une poche annexe de la chambre vaginale, afin de pouvoir féconder les œufs (Vollet-Neto et al. 2018). En contrôlant la libération de spermatozoïdes, les reines peuvent choisir le genre auquel elles donnent naissance. Les femelles sont issues d'œufs diploïdes, fécondés par des spermatozoïdes, tandis que les œufs haploïdes, non fécondés, donnent naissance à des mâles.

Après la période d'hibernation, les jeunes reines restaurent leur stock de graisses avant d'établir leur nid (Benton 2006). La qualité et la quantité de pollen prélevé, ainsi que le moment d'approvisionnement en pollen des colonies peuvent impacter l'initiation et la progression de construction du nid (Klinger et al. 2019). Une fois le nid choisi, la reine confectionne un pot à miel avec de la cire, permettant de stocker le nectar au sein du nid.

Par la suite, la reine pond ses premiers œufs, souvent 6 à 8 œufs, dans une cavité cireuse. Les œufs sont couvés par la reine pendant 4 à 6 jours avant de donner naissance à des larves (Figure 4). Ces dernières sont nourries avec des pains de pollen, un mélange de pollen et de nectar confectionné par la reine. Les larves muent plusieurs fois au cours de leur développement et après 7 à 10 jours, elles s'isolent dans un cocon de soie pour se transformer en nymphe. Dix à douze jours plus tard, les premières ouvrières émergent et prennent le relais dans la quête de nectar et de pollen. Lors de la nymphose des futures ouvrières, la reine a déjà initié une nouvelle ponte (Habay et Renneson 2019).

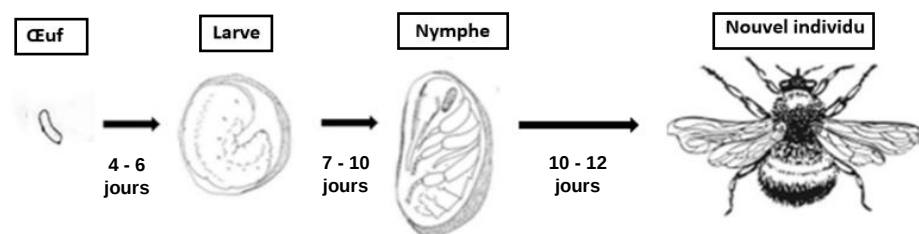


Figure 4 – Différents stades de développement du couvain jusqu'à la formation d'un nouvel individu

Des femelles stériles, appelées ouvrières, émergent des œufs fécondés. Leur stérilité est maintenue par le biais de phéromones sécrétées par la reine (Benton 2006; Michez et al. 2019). Ces ouvrières assurent le ravitaillement de la colonie et la maintenance du nid. Leur durée de vie est de 2 à 3 semaines (Michez et al. 2019). Plusieurs générations d'ouvrières sont formées jusqu'à ce que la reine meure, menant au déclin de la colonie. La dernière génération d'ouvrières s'occupe de nourrir les dernières larves qui donnent naissance à des femelles de plus grande taille corporelle, étant les potentielles futures reines. En parallèle, des œufs non fécondés pondus par la reine, mais également par quelques ouvrières, donnent naissance à des mâles.

Les futures reines et les mâles quittent le nid et s'accouplent. Les reines fécondées passent l'hiver dans un abri souterrain et n'en ressortiront que l'année prochaine pour établir leur propre colonie.

1.2.2.5 Déclin

Les causes du déclin des insectes pollinisateurs sont multiples et majoritairement d'origine anthropique (Gaspar et al. 2022; Millard et al. 2021). Les principales étant la perte et la fragmentation des habitats, les changements climatiques, les interactions négatives avec des espèces exotiques envahissantes ainsi que l'utilisation d'intrants chimiques et de pesticides (Michez et al. 2019). Ces facteurs engendrent une diminution de la disponibilité et diversité des ressources florales, ainsi que des sites de nidification (Gaspar et al. 2022; Ollerton et al. 2014).

Une évaluation de l'état des espèces d'abeilles, à l'échelle européenne a été réalisée par Nieto et al (2014), qui conclue que 7 espèces d'abeilles sont en danger critique d'extinction, 46 espèces sont en danger, 24 espèces sont vulnérables ainsi que 101 espèces sont proches d'être menacées sur un nombre total de 2 000 espèces. Au total, 9,2% des espèces d'abeilles européennes sont menacées d'extinction, mais pour 56,7% des espèces totales européennes, il n'a pas été possible d'évaluer leur risque d'extinction par manque de données.

Pour les bourdons, plus de 90% des espèces ont été évaluées, permettant d'avoir une vision plus précise de l'ampleur de leur déclin (Nieto et al. 2014). L'Europe compte 68 espèces de bourdons. Selon la liste rouge européenne des abeilles IUCN, 16 espèces

de *Bombus spp* sont menacées d'extinction et 3 sont proches de la menace d'extinction (Figure 5).

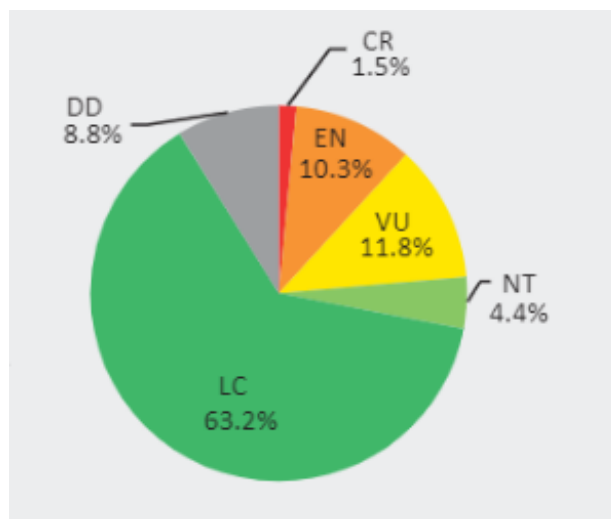


Figure 5 – Liste rouge européenne IUCN des espèces *Bombus spp*. CR (danger critique d'extinction), EN (danger d'extinction), VU (vulnérable), NT (non menacées), LC (préoccupation mineure) et DD (données manquantes).
(Nieto et al., 2014)

En Belgique, dans le cadre du projet BELBEES, une liste rouge des abeilles de Belgique a été déterminée (Figure 6) ¹. Sur les 381 espèces évaluées, 32.8% sont menacées d'extinction, 11.8% sont éteintes régionalement et 6.8% sont à la limite d'être menacées. Certaines espèces sont plus vulnérables, notamment les bourdons avec 80% de leurs espèces éteintes, menacées ou proches de la menace.

¹ SAPOLL. 2019. « Liste rouge des abeilles de Belgique - Un constat alarmant - ». Consulté le 24 mai 2022.
<http://sapoll.eu/liste-rouge-des-abeilles-de-belgique-un-constat-alarlant/>.

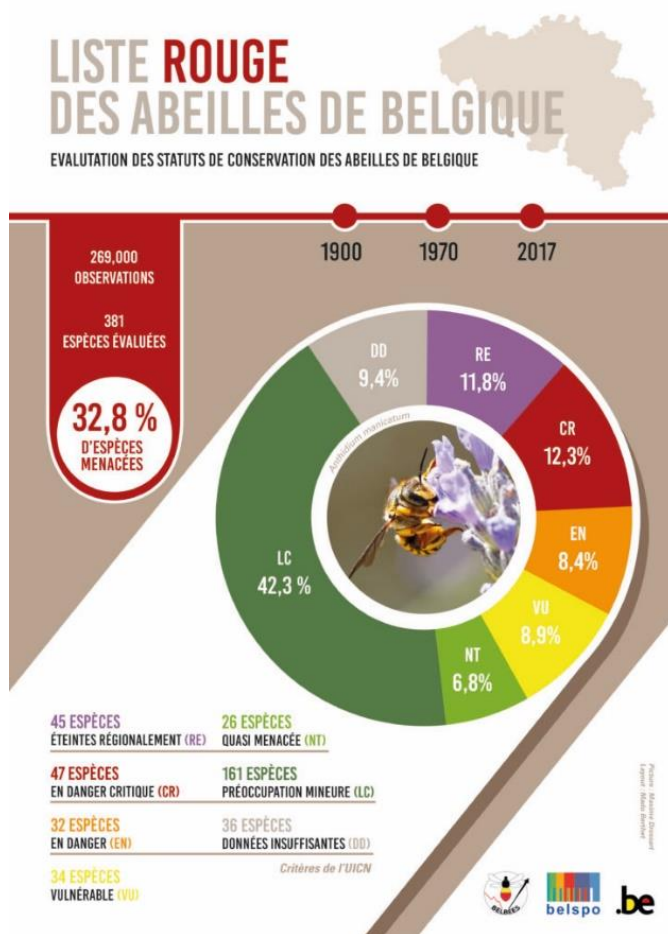


Figure 6 – Liste rouge des abeilles de Belgique.

Les espèces d'abeilles spécialistes ou oligolectiques sont plus souvent menacées d'extinction. Ces dernières disparaissent en même temps que leurs plantes hôtes, tandis que les abeilles généralistes sont capables de se nourrir de plantes alternatives et persister dans une zone aux ressources florales réduites (Biesmeijer et al. 2006 ; Roger et al. 2017).

1.3 ALIMENTATION DES ABEILLES

1.3.1 Pollen

Un grain de pollen est une cellule végétative contenant les gamètes mâles protégés par deux couches : l'exine, couche externe, et l'intine, couche interne principalement composée de cellulose et de pectine (Figure 7) (McKinstry et al. 2020). La partie

interne du grain de pollen contient le cytoplasme, le noyau de la cellule végétative ainsi que l'ensemble de la cellule générative.

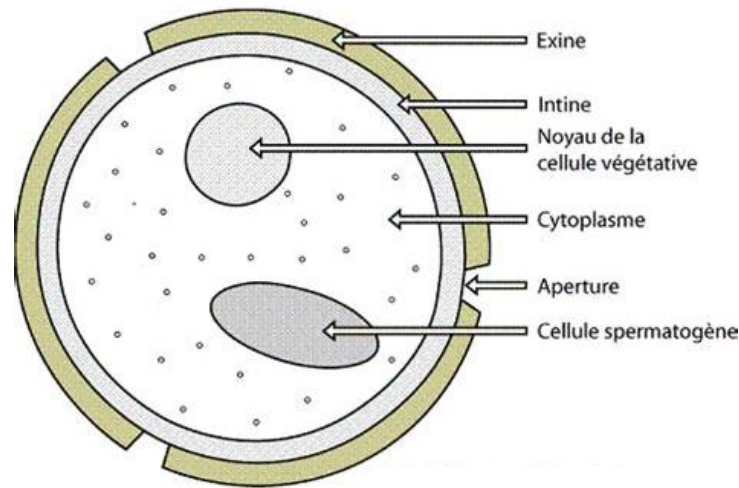


Figure 7 – Schéma d'un grain de pollen
(Roussel 2022)

Le pollen est un aliment essentiel pour les abeilles. La composition chimique du pollen diffère en fonction de l'espèce végétale, avec un contenu protéique et lipidique pouvant varier respectivement de 2–60 % et 1–20 % (Alexandre Barraud et al. 2022 ; Roulston et Cane 2002 ; Anthony D. Vaudo et al. 2020). Ces différences de composition impactent le développement des larves (Moerman, Vanderplanck, et al. 2016) et de la colonie (Tasei et Aupinel 2008). Le choix floral des ouvrières butineuses (spécialistes ou généralistes) affecte directement l'apport en nutriments pour toute la colonie.

1.3.2 Système digestif

1.3.2.1 Structure

La structure de base du tube digestif est similaire chez tous les insectes. L'intestin est divisé en 3 régions principales : l'intestin antérieur (stomodeum), moyen (mésentéron) et postérieur (proctodeum) (Figure 8a) (Chapman 2013; P. Engel et Moran 2013). Selon les espèces, des modifications sont apparues à la suite d'adaptation à différents régimes alimentaires (Figure 8b).

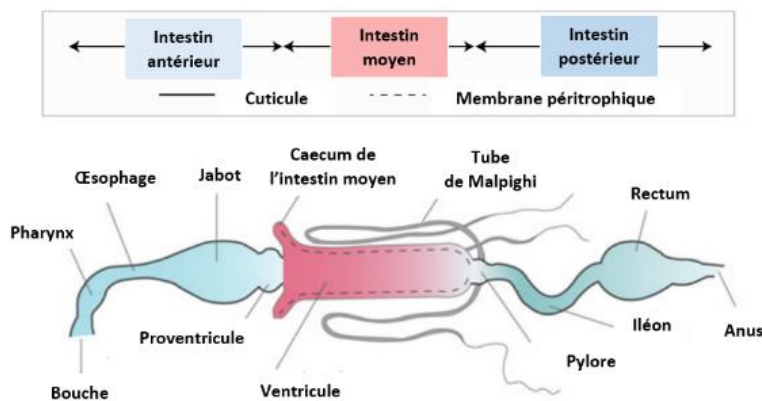


Figure 8a –Subdivisions majeures du tube digestif généralisé d'un insecte.
(Engel et Moran, 2013)

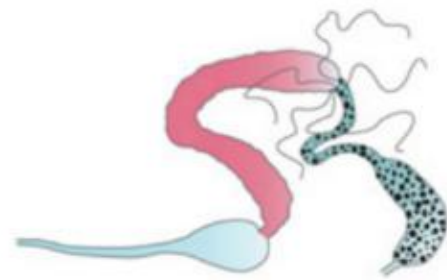


Figure 8b –Système digestif de l'abeille mellifère (Hyménoptère, *Apis mellifera*)
(Engel et Moran, 2013)

Les intestins antérieur et postérieur possèdent un exosquelette de glycoprotéines cuticulaires et de chitine. L'intestin antérieur permet de stocker de la nourriture temporairement, grâce au jabot, tandis que l'intestin postérieur permet, entre autres, la réabsorption d'eau et de nutriments (P. Engel et Moran 2013).

L'intestin moyen est le site principal de digestion et d'absorption de nutriments. Une matrice péritrophique protège les cellules épithéliales et permet la digestion (Sauvion et al. 2013). Cette dernière est constituée de réseau fibreux de chitine et de protéines, notamment l'amylase, la trypsine (endopeptidase principale), la maltase et l'aminopeptidase (Terra et Ferreira 2020). Sa structure poreuse laisse passer les enzymes et les produits de digestion, tout en empêchant la contamination des cellules épithéliales par des microorganismes véhiculés à travers les aliments (Barbehenn et Martin 1997; P. Engel et Moran 2013).

Les insectes ne possèdent pas d'orifice excréteur distinct, signifiant que tous les déchets du métabolisme sont mélangés aux déchets de la digestion. À la jonction de l'intestin moyen et postérieur, se trouvent les tubes de Malpighi, organes excréteurs filamenteux (Figure 8a) (Chapman 2013; Sauvion et al. 2013). Leur rôle est d'absorber les déchets de l'organisme (tel l'acide urique) et de les évacuer à l'intérieur du système digestif.

1.3.2.2 Digestion

Les abeilles ingèrent du nectar et du pollen. Le saccharose, provenant du nectar, est digéré en molécules de glucose au niveau du jabot, par une sucrase (Terra et Ferreira 2020). En revanche, le contenu des grains de pollen est digéré à partir de l'intestin moyen. La digestibilité du grain de pollen est variable, dépendante de sa structure (Sampat Ghosh et Jung 2020). Le processus de digestion du pollen par les abeilles n'est pas encore compris dans sa globalité (McKinstry et al. 2020). Roulston et Cane (2000) ont mentionné quatre mécanismes pouvant être impliqués dans la digestion du pollen par les abeilles : une pseudo germination, un choc osmotique, une rupture mécanique de l'exine et une dégradation enzymatique. Une fois le contenu du grain de pollen libéré dans le tube digestif, un ensemble d'enzymes poursuit la digestion des macromolécules (McKinstry et al. 2020).

Les protéines sont d'abord dégradées par des endopeptidases, notamment la trypsine, formant des oligopeptides. Ensuite, des aminopeptidases libèrent les acides aminés dans le lumen. L'absorption d'acides aminés nécessite des mécanismes de transport énergivores, travaillant contre les gradients de concentration, comme notamment des pompes sodium-potassium (Larondelle et Debier 2021). Avant d'atteindre leur cellule cible, les acides aminés doivent traverser les membranes apicales et basolatérale des cellules épithéliales ainsi que les membranes plasmiques des cellules somatiques (Boudko 2012). Les cellules ne sont pas capables de stocker les acides aminés libres, signifiant que le manque en un certain acide aminé essentiel limite la synthèse protéique.

1.3.2.3 Microbiote intestinal

Le microbiote intestinal des abeilles joue un rôle dans la digestion et la protection de l'hôte, mais le rôle fonctionnel de ces bactéries n'est pas encore complètement connu (Philipp Engel, Martinson, et Moran 2012; Sampat Ghosh et Jung 2020; Koch et Schmid-Hempel 2011b, 2011a).

L'intestin postérieur de l'abeille domestique *Apis mellifera* est dominé par 9 groupes d'espèces bactériennes, dont cinq majoritaires : *Snodgrassella alvi* (Gram-), *Gilliamella apicola* (Gram-), *Lactobacillus Firm-4* (Gram+), *Lactobacillus Firm-5* (Gram+) et *Bifidobacterium asteroides* (P. Engel et Moran 2013; Kwong et Moran

2016; Raymann et Moran 2018). Les quatre autres bactéries (*Bartonella apis*, *Apibacter adventoris*, *Frischella perrara*, et *Acetobacteraceae*) ne sont pas retrouvées systématiquement chez chaque individu.

L'intestin postérieur est divisé en deux parties : l'iléon, dominé par les espèces Gram (-), et le rectum, dominé par les bactéries fermentaires Gram (+) ainsi que *Bifidobacterium*. La transmission du microbiote intestinale se fait à travers la voie fécale et est accentuée par les interactions sociales entre individus de la colonie (Raymann et Moran 2018).

Koch et Schmid-Hempel (2011a) ont découvert que le microbiote des abeilles du genre *Bombus* possède les cinq espèces bactériennes majoritaires d'*Apis mellifera*. Ces dernières possèdent également les symbiotes intestinaux *Schmidhempelia bombi* (apparenté à *G. apicola*) et *Bombiscardovia coagulans* (Kwong et Moran 2016; Raymann et Moran 2018).

1.3.3 Préférences florales des abeilles

La grande majorité des abeilles sont phytophages et dépendent de plantes à fleurs pour se nourrir. Leur régime alimentaire est composé de deux aliments principaux ; le nectar, source principale d'hydrates de carbone, et le pollen, source principale de protéines et autres nutriments essentiels, tels que des lipides, des vitamines et des minéraux (Sampat Ghosh et Jung 2020; Grund-Mueller et al. 2020 ; Imdorf et al. 1998 ; Vanderplanck et al. 2014).

Les abeilles reconnaissent d'abord les ressources florales par l'odorat, principalement grâce à leurs antennes. La morphologie florale définit la facilité avec laquelle le pollinisateur accède au nectar. Les abeilles à langues longues visitent davantage des fleurs à corolle profonde, tandis que celles à courtes langues visitent des fleurs à corolle plus courte. Le comportement alimentaire, dont le choix floral, varie entre espèces, mais également entre individus de la colonie. En effet, les reines butinent plus prudemment que ses ouvrières, sa mort entraînant des répercussions plus lourdes pour la colonie (Evans et Raine 2014).

Les espèces d'abeilles généralistes perçoivent la composition chimique du pollen et sont capables de modifier leur comportement alimentaire en fonction des quantités de nutriments voulues (Alexandre Barraud et al. 2022; A.D. Vaudo et al. 2016). Les

bourdons (*Bombus spp*) et les abeilles mellifères (*Apis mellifera*) préfèrent les espèces végétales avec un pollen de teneur protéique élevée (Bortolotti, Pošćić, et Bogo 2020; Chapman 2013; Sampat Ghosh et Jung 2020; Somme et al. 2015; A.D. Vaudo et al. 2016; Anthony D. Vaudo et al. 2020). Les bourdons prélèvent du pollen de plusieurs espèces végétales lors d'une séquence de butinage (Roulston et Cane 2002). En revanche, les abeilles mellifères restent fidèles à une plante hôte par séquence de butinage (Sampat Ghosh et Jung 2020). La diversité florale ne reflète pas la qualité du régime pollinique. En effet, un régime polyfloral peut être de moins bonne qualité qu'un régime monofloral, si ce dernier est composé d'un pollen de qualité nutritionnelle supérieure (Alexandre Barraud et al. 2022).

Le choix pollinique des abeilles semble être influencé par son ratio Protéines:Lipides (P:L) (A.D. Vaudo et al. 2016; Anthony D. Vaudo et al. 2020; Wood et al. 2021). En effet, Vaudo et al (2020) ont mis en évidence que les espèces d'abeilles prélèvent du pollen avec un ratio pollinique P:L différent. *Bombus terrestris* et *Osmia cornifrons* préfèrent du pollen possédant un ratio P:L de 4:1 et 2:9 respectivement, alors qu'*Apis mellifera* préfère un ratio compris entre 1:1 et 2:1. Cependant, les effets de ce ratio sur le développement de la colonie nécessitent encore d'être étudiés.

1.3.4 Préférences florales de *Bombus terrestris*

L'espèce *Bombus terrestris* est polylectique et récolte sur des centaines d'espèces florales, 309 espèces de fleurs butinées étant répertoriées en France et en Belgique (Rasmont et al. 2008).

Plusieurs études ont démontré la préférence des bourdons pour des fleurs avec du nectar riche en hydrates de carbones (Somme et al. 2015), et du pollen de qualité lipidique et protéique élevée (Sampat Ghosh et Jung 2020; Konzmann et Lunau 2014; Somme et al. 2015; A.D. Vaudo et al. 2016). Les bourdons sont capables de détecter certains acides aminés (asparagine, cystéine, hydroxyproline, acide glutamique, lysine, phénylalanine et sérine) à travers leurs antennes, grâce à une simulation chimiotactile, avant même d'ingérer la nourriture (Ruedenauer, Spaethe, et Leonhardt 2015).

Les butineuses *Bombus terrestris* ont tendance à prélever des mélanges de pollen pouvant provenir de jusqu'à six espèces végétales différentes (Leonhardt et Blüthgen

2012), préférant des pollens avec un ratio P:L élevé, particulièrement celui des Fabacées (Wood et al. 2021), et ce avec ou sans la présence de couvain dans la colonie (A.D. Vaudo et al. 2016). Cette collecte pollinique polyflorale permet de diminuer le temps de déplacement entre sites de butinage et de composer un régime alimentaire proche de leur optimum nutritionnel (Riesell, Hilpert, et Leonhardt 2017).

1.3.5 Besoins nutritionnels

Pour chaque espèce animale, un optimum nutritionnel, comprenant des proportions spécifiques en différents nutriments, est défini en fonction de l'état physiologique, l'âge ainsi que la capacité de reproduction de l'individu (Simpson et al. 2012). Dans la nature, cet optimum est rarement atteignable, laissant le choix aux individus de consommer une quantité adéquate d'un nutriment, à défaut d'en surconsommer ou sous-consommer un autre (Chapman 2013; Grund-Mueller et al. 2020).

Les protéines sont des molécules composées de plusieurs acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. La valeur nutritionnelle d'une protéine dépend de sa digestibilité ainsi que de sa composition en acides aminés, principalement ceux considérés comme essentiels (Larondelle et Debier 2021). Elles sont utilisées par l'organisme à des fins structurelles, pour le transport et le stockage ainsi qu'en tant que récepteurs moléculaires (Chapman 2013). Les protéines alimentaires satisfont des besoins quantitatifs en azote pour l'animal et des besoins qualitatifs, en lui apportant des acides aminés essentiels que les individus sont incapables de synthétiser par eux-mêmes.

1.3.5.1 Abeilles en général

Les besoins nutritionnels des abeilles varient entre espèces, mais également entre individus de la colonie (Alexandre Barraud et al. 2022). Les abeilles adultes et les larves ont besoin du même spectre de macronutriments (lipides, protéines et glucides), mais en des proportions différentes (Grund-Mueller et al. 2020 ; A.D. Vaudo et al. 2016). Les ouvrières ont des besoins en glucides plus élevés, tandis que les reines et les larves nécessitent davantage de protéines et de lipides pour la ponte et le développement larvaire (Kraus et al. 2019). Les besoins nutritionnels de la colonie

évoluent avec le développement du couvain et l'augmentation du nombre d'individus (Evans et Raine 2014).

Les glucides sont une source d'énergie indispensable. Les ouvrières priorisent l'ingestion de glucides comparés aux acides aminés essentiels (Paoli et al. 2014 ; Stabler et al. 2015). Les abeilles adultes possèdent de faibles réserves de glycogène, contrairement aux larves (Sampat Ghosh et Jung 2020). Une quantité totale de 59,4 mg d'hydrates de carbone est nécessaire pour élever une ouvrière *Apis mellifera* (Hrassnigg et Crailsheim 2005).

Les lipides et les protéines sont essentiels pour maintenir les fonctions somatiques et de reproduction des adultes et pour le développement larvaire. Les lipides sont composés, entre autres, d'acides gras essentiels et de stérols, nécessaires pour synthétiser les hormones de mues (Sampat Ghosh et Jung 2020; Grund-Mueller et al. 2020 ; A.D. Vaudo et al. 2016). Les lipides servent également à la production d'hydrocarbures cuticulaires et de cire, à la maturation comportementale des adultes, à la diapause et au développement de glandes, utilisées pour produire la nourriture du couvain (A.D. Vaudo et al. 2016).

Les protéines sont primordiales pour une croissance et un développement larvaire optimum. La quantité de protéines ingérées par les larves est positivement corrélée à leur poids (Imran et al. 2017). Les protéines assurent également le développement des glandes et du système reproducteur des adultes (Alqarni 2006; Sampat Ghosh et Jung 2020; A.D. Vaudo et al. 2016). À noter qu'un excès protéique engendre un surplus de déchets azotés toxiques pour l'organisme et diminue le taux de survie des individus (Alqarni 2006; Grund-Mueller et al. 2020 ; Kraus et al. 2019). Les abeilles mellifères (*Apis mellifera*) ont besoin de 25 à 37,5 mg de protéines par individu pour atteindre l'âge adulte (Hrassnigg et Crailsheim 2005).

En plus de varier entre individus d'une même colonie, les besoins protéiques varient entre espèces d'abeille. En effet, un régime alimentaire composé à 40 % de protéines a des répercussions négatives sur le développement d'*Apis mellifera* contrairement aux espèces *Bombus terrestris*, *Osmia bicornis* et *Osmia cornuta* (Alexandre Barraud et al. 2022).

Selon de Groot (1952), dix acides aminés (arginine, tryptophane, lysine, isoleucine, leucine, phénylalanine, histidine, thréonine, valine et méthionine) sont essentiels pour l'abeille mellifère *Apis mellifera* (Figure 9).

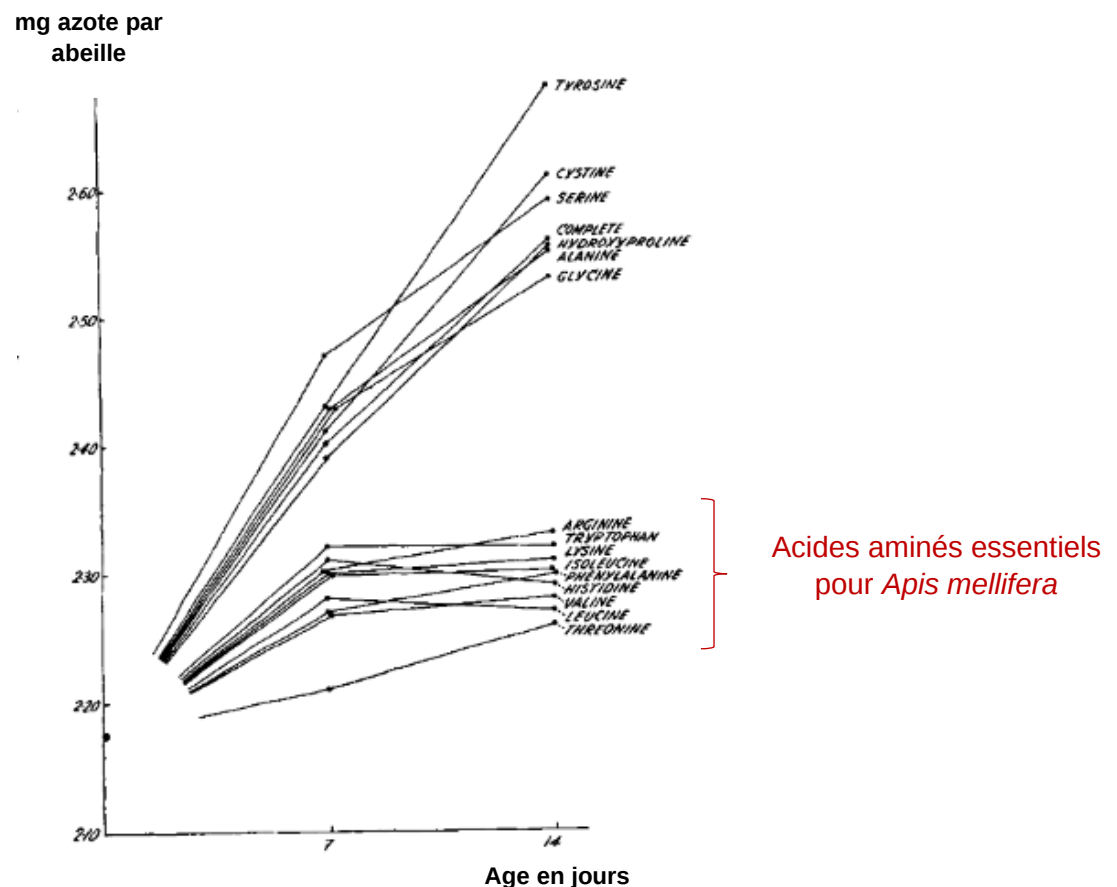


Figure 9 – Teneur en azote des abeilles (âgées de 7 ou 14 jours) dans les régimes alimentaires déficients en un acide aminé.

(de Groot 1952)

Les quantités minimales d'acides aminés essentiels requises pour les abeilles *Apis mellifera* ont également été déterminé par de Groot (1953) (Tableau 2).

Acides aminés	Niveau minimal requis <i>Apis mellifera</i> [g/100g protéines]
Arginine	3
Histidine	1.5
Lysine	3
Tryptophane	1
Phénylalanine	2.5
Méthionine	1.5
Thréonine	3
Leucine	4.5
Isoleucine	4
Valine	4

Tableau 2 – Quantités minimales en acides aminés essentiels à respecter afin d’observer une prise de poids optimum par jeune *Apis mellifera*
(de Groot 1953)

1.3.5.2 *Bombus terrestris*

Génissel et al (2002) ont mis en évidence qu’un pollen avec une teneur protéique supérieure à 20% améliore le développement larvaire de *Bombus terrestris*.

Les bourdons prélèvent du pollen de plusieurs espèces végétales, en partie pour composer un régime alimentaire proche de son optimum nutritionnel. La composition en acides aminés des charges de pollen de *Bombus terrestris* a été déterminée par Riesell et al (2016) (Tableau 3). Les proportions moyennes d’acides aminés prélevées par les bourdons ressemblent fortement aux besoins minimums d’acides aminés requis pour les abeilles mellifères, définis par de Groot (1953). Cependant, les bourdons prélèvent du pollen avec des teneurs différentes de lysine (8.49% pour *Bombus terrestris* contre 3% pour *Apis mellifera*), de thréonine (4.58 % contre 3%), de leucine (7.76% contre 4.5%) et d’isoleucine (2.37% contre 4%).

Acides aminés	Charges de pollen <i>Bombus terrestris</i>	
	[mg/g de poids sec]	
Histidine	2.16	± 0.68
Isoleucine	2.37	± 0.47
Leucine	7.76	±1.48
Lysine	8.49	±1.89
Méthionine	1.44	± 0.54
Phénylalanine	4.15	± 0.98
Thréonine	4.58	± 1.26
Valine	2.83	± 0.74

Tableau 3 – Concentrations [mg/g de poids sec] d'acides aminés, déjà considérés comme essentiels pour *Apis mellifera*, dans les charges polliniques des bourdons *Bombus terrestris* ayant prélevés sur sept espèces végétales (Riesell et al., 2016)

Si les quantités minimales d'acides aminés essentiels requises pour les abeilles mellifères sont connus, celles des bourdons doivent encore être déterminé par des tests de laboratoire. La lysine est considérée comme un acide aminé essentiel pour *Apis mellifera* (de Groot 1952) et probablement aussi pour les bourdons (Génissel et al. 2002).

1.4 OBJECTIFS

Ce mémoire a pour objectif de mettre au point un protocole afin de déterminer les conditions expérimentales pour l'élevage de l'espèce d'étude, *Bombus terrestris*, en laboratoire et connaître leur tolérance face à des régimes alimentaires sans ou partiellement composés de pollen. En tenant en compte des résultats de cette première expérience, nous avons tenté de déterminer si la lysine est un acide aminé essentiel pour *Bombus terrestris*. Pour ce faire, différentes concentrations en lysine libre ont été inclus dans des régimes alimentaires de pollen complétés en zéine, protéine déficiente en lysine, ou en caséine, protéine possédant un équilibre en acides aminés essentiels.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Deux expériences ont été réalisées dans le cadre de ce travail. Dans un premier temps, une mise au point du protocole a été effectuée. Cette première expérience a eu pour but de déterminer les conditions expérimentales pour l'élevage de l'espèce d'étude, *Bombus terrestris*, et de savoir s'ils tolèrent divers régimes alimentaires remplaçant partiellement ou totalement le pollen de saule par de la zéine, de la cellulose ou de la caséine. Par la suite, une étude plus approfondie sur les besoins nutritionnels du *Bombus terrestris* en lysine a été réalisée.

2.1 ELEVAGE DE *BOMBUS TERRESTRIS*

2.1.1 Microcolonies

Les bourdons ont été achetés chez Biobest NV (Westerlo, Belgique). Les effets de régimes alimentaires de différentes qualités nutritionnelles ont été évalués sur l'espèce *Bombus terrestris*, à l'échelle de microcolonies. Trois colonies de 100 ouvrières, sans reine, ont été utilisés pour composer un total de 48 microcolonies de cinq ouvrières. Dix-huit microcolonies ont été utilisées pour la mise en place du protocole, tandis que les 30 autres ont servi pour l'étude des besoins nutritionnels en lysine. Trois microcolonies ont été utilisées par traitement expérimental.

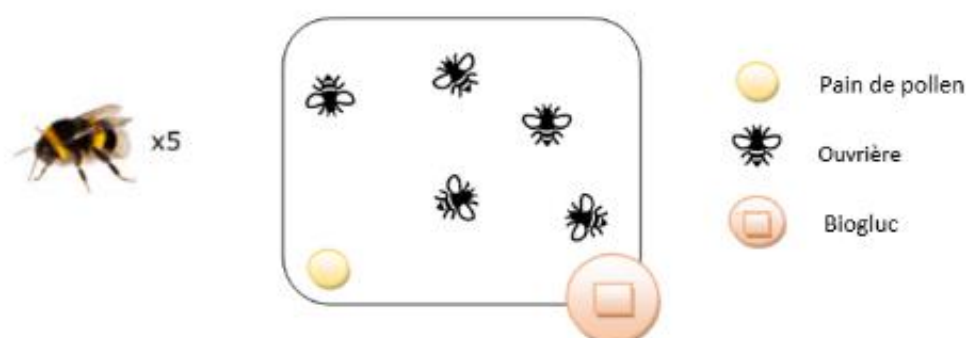


Figure 10 – Représentation schématique d'une microcolonie

Les ouvrières ont été placées dans des boîtes en plastique rectangulaires transparentes (8*16*16 cm) (Biobest NV, Westerlo, Belgique), avec un opercule en plastique amovible (Figure 10). Le transfert d'ouvrières des colonies commerciales de départ vers les boîtes de microcolonie s'est déroulé dans l'obscurité, à l'aide d'ampoules rouges (Voltis, Louvain-la-neuve, Belgique, E27) (Figure 10a).



Figure 11a - Disposition des microcolonies dans une salle de vol



Figure 11b - Disposition des microcolonies dans une chambre climatique

2.1.2 Conditions expérimentales

Chaque microcolonie a eu accès *ad libitum* au sirop commercial BIOGLUC®, grâce à un capillaire. Les pains de pollen ont tous été placés dans un coin de la boîte, afin de pouvoir le récupérer plus facilement, excepté le premier. Ce dernier a été placé au centre de la boîte pour que les ouvrières y construisent leur nid autour.

L'expérience de mise en place du protocole a duré 35 jours. Une température de 26°C et une humidité relative de 30-40% ont été maintenues dans la pièce contenant les microcolonies (Figure 11a). Lors de l'étude des besoins nutritionnels en lysine, les microcolonies ont été élevées dans deux chambres climatiques (Snijders Scientific,

Tilburg, Pays-Bas) pendant 32 jours (Figure 11b). La température de 26°C a été maintenue, mais l'humidité relative a été adaptée à 60-70%, suite aux résultats de la première expérience.

2.2 RÉGIMES ALIMENTAIRES

2.2.1 Série 1 : Mise au point du protocole

Afin de connaître plus précisément les conditions expérimentales pour élever *Bombus terrestris* en laboratoire et de savoir leur tolérance face à des régimes alimentaires avec ou sans pollen, 90 ouvrières (provenant d'une ruche Biobest NV) ont été réparties en 18 microcolonies.

Trois catégories de régimes alimentaires ont été testées (Tableau 4) ;

- Un régime avec du pollen de saule (T₀) (Ruchers de Lorraine, Nancy, France)
- Trois régimes composés partiellement de pollen de saule complétés en cellulose (T_{0.5}) (Sigma-Aldrich, ref : 435236), en caséine (C₀) (Sigma-Aldrich, ref : C3400) ou en zéine (Z₀) (Sigma-Aldrich, ref : Z3625)
- Deux régimes sans pollen de saule, à base de zéine avec (Z_{a0.5}) ou sans apport en cellulose (Z_a)

Catégories	Régimes alimentaires	Pollen de saule [g]	BIOGLUC® [g]	Eau déminéralisée [g]	Zéine [g]	Caséine [g]	Cellulose [g]	Total [g]
Témoin	T ₀	1	0.17	0	0	0	0	1.17
Pollen complété	T _{0.5}	0.5	0.17	0	0	0	0.5	
	C ₀	0.5	0.17	0.2	0	0.5	0	
	Z ₀	0.5	0.17	0.6	0.5	0	0	1.37
Sans pollen	Z _a	0	0.17	0.6	1	0	0	1.77
	Z _{a0.5}	0	0.17	0.6	0.5	0	0.5	

Tableau 4 – Composition des pains de pollen en gramme, des régimes alimentaires avec ou sans pollen de saule (T₀, T_{0.5}, Z_a, Z_{a0.5}, Z₀ et C₀) lors de la mise en place du protocole

Selon plusieurs études, le pollen de saule est considéré comme un pollen de bonne qualité nutritionnelle pour le développement de *Bombus terrestris* (Moerman et al., 2016 ; Barraud et al., 2020). Après analyse du pollen dans notre laboratoire, par Christel Buyens, sa composition a été déterminée à 77,3 % de *Salix*, 17,9 % d'*Anemone* et 1,7 % de *Buxus* et 3.1% non identifiées.

Le pollen a été complété (ratio pollen:composé 1:1) en caséine (C₀), zéine (Z₀) ou cellulose (T_{0.5}). La caséine est une protéine animale dite « complète », fournissant un équilibre complet en acides aminés essentiels (Auestad et Layman 2021). En revanche, la zéine est une protéine végétale déficiente en deux acides aminés essentiels, le tryptophane et la lysine, lui conférant une faible valeur nutritionnelle (Zhao, Wang, et Li 2021). La cellulose a été utilisée dans le but de diminuer la qualité nutritionnelle des pains de pollen, sans diminuer leur appétence (A. Barraud et al. 2020 ; Jack et al. 2016).

Du sirop commerciale, BIOGLUC® (Biobest NV, Westerlo, Belgique), a été inclus dans chaque régime alimentaire (0.17mL par gramme de composants solides). Il s'agit d'une solution sucrée contenant des antimicrobiens, agissant contre le développement de microorganismes dans les microcolonies. Cependant, sa formulation exacte n'est pas divulguée par le fournisseur Biobest. Différentes quantités d'eau ont été ajoutées aux pains de pollen afin d'obtenir la consistance d'aliment adéquate pour former des sphères.

2.2.2 Série 2 : Besoins nutritionnels en lysine

Lors de cette deuxième expérience, différentes quantités de L-lysine (Sigma-Aldrich, L-lysine, ref : L5501) ont été ajoutées aux régimes afin d'analyser les besoins nutritionnels en lysine des bourdons. La lysine possède deux énantiomères, L ou D, la L-lysine étant la forme stable et active de l'acide aminé (Malvy et Caesar 2022).

Un total de 150 ouvrières (provenant de deux ruches Biobest NV) a été réparti en 30 microcolonies.

Deux catégories de régimes alimentaires ont été testés (Tableau 5) ;

- Cinq régimes pollen de saule et zéine, avec ou sans apport de L-lysine libre
- Cinq régimes pollen de saule et caséine, avec ou sans apport de L-lysine libre

Catégories	Régimes alimentaires	Pollen de saule [g]	BIOGLUC® [g]	Eau déminéralisée [g]	Zéine [g]	Caséine [g]	L-lysine [g]	Total [g]	Lysine libre ajoutée [%]	Lysine protéique [%]	Lysine totale [%]
Zéine	Z ₀	0.5	0.17	0.6	0.5	0	0	1.77	0	0.1	0.1
	Z _{1.3}	0.5	0.17	0.6	0.48	0	0.02		1.3	0.1	1.4
	Z _{1.9}	0.5	0.17	0.6	0.47	0	0.03		1.9	0.1	2.0
	Z _{2.9}	0.5	0.17	0.6	0.455	0	0.045		2.9	0.1	3.0
	Z _{3.9}	0.5	0.17	0.6	0.44	0	0.06		3.9	0.1	4.0
	C ₀	0.5	0.17	0.2	0	0.5	0		0	0.4	0.4
Caséine	C _{1.5}	0.5	0.17	0.2	0	0.48	0.02	1.37	1.5	0.4	1.9
	C _{2.3}	0.5	0.17	0.2	0	0.47	0.03		2.3	0.4	2.7
	C _{3.4}	0.5	0.17	0.2	0	0.455	0.045		3.4	0.4	3.8
	C _{4.5}	0.5	0.17	0.2	0	0.44	0.06		4.5	0.4	4.9

Tableau 5 – Composition des pains de pollen en gramme, pour les 10 régimes alimentaires (Z₀, Z_{1.3}, Z_{1.9}, Z_{2.9}, Z_{3.9}, C₀, C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5}) lors de la détermination des besoins en lysine. Les pourcentages de lysine libre, protéique et total par unité de pain de pollen ont été déterminés en prenant en compte du taux d'évaporation.

Le mélange de pollen avec de la zéine (Z0) et le mélange de pollen avec de la caséine (C0) ont été considérés respectivement comme les témoins négatif et positif, selon la concentration en lysine incluse dans ces deux protéines. En effet, la zéine est concentrée à 0,02 % de lysine, tandis que la caséine l'est à 0,85% (Tableau 6).

Acides aminés essentiels	Caséine [mg/g]	Zéine [mg/g]	Pollen de <i>Salix</i> [mg/g]
Thréonine	4.2	2.3	8.03
Histidine	3.2	1.02	6.2
Isoleucine	5.4	4.8	7.7
Leucine	9.5	17.8	13.9
Valine	6.3	3.3	10.2
Lysine	8.5	0.2	14.6
Méthionine & cystéine	3.5	3.2	4.5
Phénylalanine & tyrosine	11.1	11.9	15.5
Arginine	3.7	2.6	12.4
Tryptophane	1.4	2.3	

Tableau 6 – Composition en acides aminés essentiels (en milligramme par gramme de protéine) de la caséine (FAO, 1991), de la zéine (YANG et al., 2020) et du pollen de *Salix* (Moerman et al, 2016b)

La zéine a été substituée par 0.02, 0.03, 0.045 et 0.06g de L-lysine, correspondant respectivement à 1.3%, 1.9%, 2.9% et 3.9% de lysine libre ajoutée par unité de pain de pollen (Z_{1.3}, Z_{1.9}, Z_{2.9} et Z_{3.9}) (Tableau 5). Ces pourcentages prennent en compte la proportion des différents constituants du pain de pollen, ainsi que son évaporation journalière (13%).

Les mêmes quantités de L-lysine ont remplacé la caséine. Cependant, elles correspondent respectivement à 1.5%, 2.3%, 3.4% et 4.5% de lysine libre ajoutée par unité de pain de pollen (C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5}) (Tableau 5). Ces différences sont dues à une quantité d'eau plus faible ajoutée dans les pains de pollen caséine et donc un taux d'évaporation journalier de seulement 3.7%.

La teneur totale en lysine par pain de pollen a été calculée pour chaque régime alimentaire, en tenant compte des proportions de chaque composants et d'un contenu protéique de 15,4 % pour le pollen de *Salix* (Tableau 5) (Tasei et Aupinel 2008).

2.2.3 Préparation et administration

Les régimes alimentaires ont été administrés aux microcolonies sous forme de pains de pollen. Avant le début des expériences, tous les pains de pollen ont été confectionnés au préalable en laboratoire et stockés au congélateur (-20°C), afin d'éviter des contaminations de microorganismes.

Dans un premier temps, tous les constituants solides du pain de pollen ont été pesés et broyés dans un mortier, pour obtenir un mélange homogène. Ensuite, les composants liquides (eau déminéralisée et BIOGLUC®) ont été ajoutés. Les pains de pollen ont été confectionnés manuellement, pesant entre 1,17- 1,77g.

Les pains de pollen ont été changés tous les 2-3 jours, pour fournir du pollen frais aux ouvrières régulièrement. Afin de quantifier la prise alimentaire de chaque microcolonie, les pains de pollen ont été pesés avant leur administration et lors de leur récupération.

2.3 MESURES ET PRÉLÈVEMENTS

Plusieurs paramètres ont été évalués afin d'analyser le développement des microcolonies :

- (i) le taux de survie des ouvrières
- (ii) la prise alimentaire de pains de pollen
- (iii) le nid
- (iv) le couvain (œufs, larves et pupes)
- (vi) le contenu en polypeptides des ouvrières (mortes et vivantes), des larves isolées, des fèces, des pains de pollen.

2.3.1 Taux de survie des ouvrières

Le taux de survie des ouvrières a été quantifié tout au long des expériences. Les ouvrières mortes ont été retirées des boîtes de microcolonies, mais pas remplacées.

2.3.2 Prise alimentaire des pains de pollen

Le taux d'évaporation des pains de pollen a été déterminé en plaçant, pendant 48h, un échantillon par régime alimentaire dans la salle d'élevage.

La prise alimentaire des pains de pollen a été calculée par ouvrière, tenant en compte de l'évaporation de l'aliment, ainsi que de l'évolution du taux de mortalité des microcolonies sur la durée totale des expériences.

2.3.3 Nids

L'évolution des constructions des nids a été observée durant l'expérience. Le nombre d'alvéoles visibles, la présence d'une structure « dôme » et le nombre de larves éjectées ont été quantifiés. Les nids ont tous été construits au centre de la boîte autour du premier pain de pollen (Figure 12). Au fil de l'expérience, un grand nombre de microcolonies ont construit un « dôme », laissant seulement apparaître certaines alvéoles ainsi qu'un accès à l'intérieur du nid (Figure 12a).

Les nids ont été pesés, sans les couvains, en fin d'expérience.



Figure 12a – Nid avec construction d'un dôme



Figure 12b – Nid sans construction de dôme

2.3.4 Couvains

Le couvain comprend les œufs, les larves et les pupes. L'évolution du couvain au cours des expériences n'a pas été observée. Seule la masse finale du couvain, et le nombre

d'individus de la nouvelle génération formé ont été analysés en fin d'expérience. Plusieurs stades de vie ont été définis : les œufs, les larves non isolées et isolées, les larves éjectées et les pupes (Figure 13).

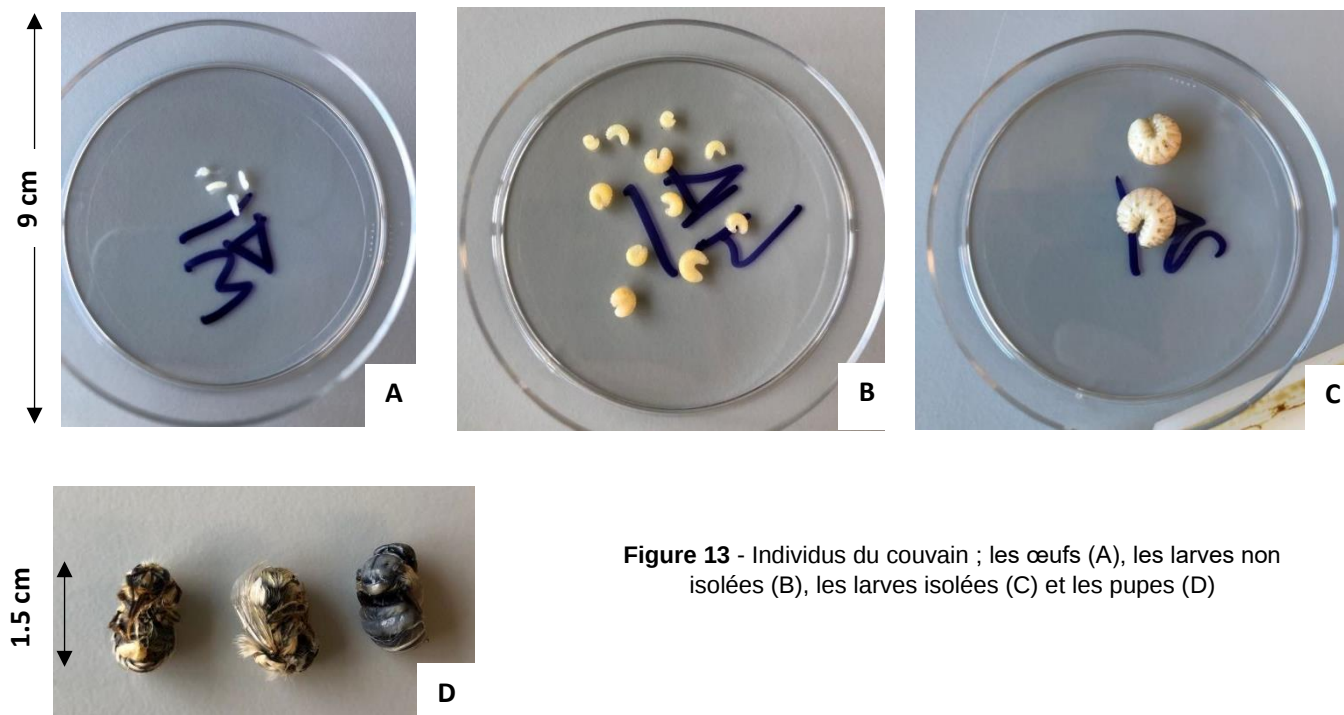


Figure 13 - Individus du couvain ; les œufs (A), les larves non isolées (B), les larves isolées (C) et les pupes (D)

2.3.5 Contenu en polypeptides

Le contenu en polypeptides a été évalué sur base de 5 mg d'échantillon lyophilisé (pains de pollen, fèces, ouvrières ou larves) suivant la méthode de Vanderplanck et al (2014).

La quantification des polypeptides a été réalisée grâce aux kits de dosages de protéines BCA (acide bicinchoninique) (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Cette méthode est basée sur la réaction de réduction de Cu^{2+} en Cu^{+} , réalisée par les protéines en milieu alcalin. La chélation de deux molécules de BCA avec Cu^{+} crée un produit violet, doté d'une grande absorbance à 562 nm, rendant la détection de l'ion cuivreux possible par un réactif contenant du BCA.

Les différentes concentrations de protéines sont déterminées à l'aide d'une courbe standard, d'une série de dilutions de concentration connue d'une protéine commune,

par exemple la BSA (albumine de sérum bovin) (Figure 14). L'utilisation d'un standard protéique de qualité similaire à la protéine inconnue est conseillée pour effectuer une quantification précise.

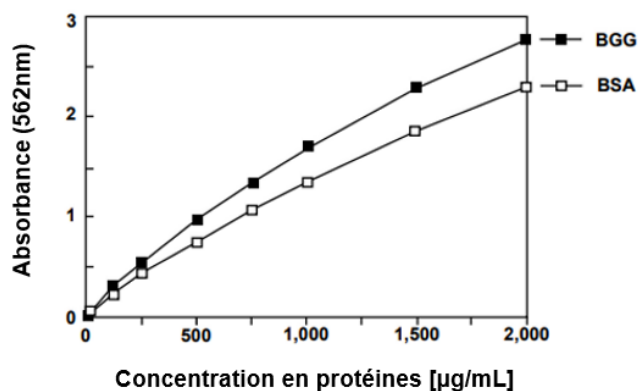


Figure 14 - Courbes de réponse chromatique typiques pour la BSA (albumine de sérum bovin) et la BGG (gammaglobuline bovine) en utilisant le protocole standard de tube à essai (37°C/30min d'incubation).

(Guide d'utilisation ThermoScientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 2020)

Cette méthode de quantification des protéines BCA est compatible avec plusieurs agents interférents, comme la guanidine/HCl, et ne varie pas beaucoup entre protéines, possédant 14,7 % de coefficient de variation (fourni avec le guide d'utilisation du kit de dosage des protéines BCA, Pierce, Thermo Scientific).

La concentration de protéines par échantillon [µg/mg] est calculée grâce à l'équation suivante :

$$P = C_s \cdot V_s \cdot \frac{1}{w_x}$$

Où C_s représente la concentration de la solution de base [µg/mL], V_s est le volume de la solution de base [mL] et w_x correspond au poids de l'échantillon de départ [mg].

2.3.5.1 Méthode

2.3.5.1.1 Broyage de pollen

Les échantillons (ouvrières, larves, pains de pollen et fèces) de 5mg ont été broyés manuellement dans un mortier avec de l'azote liquide, laissé en congélation toute une nuit à – 80 °C, avant d'être lyophilisé (CHRIST Gamma 1-16 LSC, Grosseron, Coueron, France) et placé dans des tubes Eppendorf 2 mL.

Pour les échantillons contenant du pollen, des billes de verre (425-600 µm, Sigma-Aldrich Life Science, Ref : G9268), en quantité équivalente de l'échantillon, ont été ajoutés dans le but de broyer le pollen et en extraire les polypeptides. Afin d'éviter au maximum la protéolyse, les échantillons ont été vortexé (TopMix, Fischer Scientific, Merelbeke, Belgique) à cinq reprises sous azote liquide. Quant aux échantillons dépourvus de pollen, l'étape avec les billes de verres a été évité.

2.3.5.1.2 Précipitation des protéines et élimination des contaminants

Tous les échantillons ont ensuite subi trois lavages successifs à 4 °C avec (i) 10 % de TCA (VWR, Ref :822342.0250) /acétone, (ii) 80 % de méthanol/acétate d'ammonium 0.1 M et (iii) 80 % d'acétone. Entre chaque étape de lavage, une sonication à 45 kHz (VWR international bvba, Leuven, Belgique, Ref : USC200T) a été effectué pour disperser l'échantillon et le surnageant a été éliminé, à l'aide d'une pipette pasteur, après une centrifugation (Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne, Ref : 5430r) à 16 000×g à 4°C pendant 3 minutes.

2.3.5.1.3 Elimination des résidus d'acétone et extraction des polypeptides avec des tampons SDS et phénol

Le culot final a été placé sur une plaque chauffante (VWR international bvba, Leuven, Belgique) à 50 °C durant 10 minutes, dans le but d'éliminer l'acétone résiduelle. Un volume de 500µL du tampon d'extraction SDS (0,1 M Tris-HCl, pH 8, 30 % (p/v) de saccharose, 5 % (v/ v) de 2-mercaptoéthanol et 2 % (p/v) de SDS (VWR, Ref :822050.0100)) a été ajouté au culot sec avant d'être vortexé, soniqué et incubé sous agitateur MixMate® (Eppendorf, France, Ref : 5353000510) en chambre froide à 4°C pendant 10 minutes. Ensuite, 500µL de phénol ont été ajoutés à l'échantillon suivi

d'une centrifugation à 16 000×g durant 10 min à 4 °C. L'échantillon se divise en deux phases bien distinctes. Un volume de 400 µL de la phase phénolique supérieure ont été récupérée dans un nouvel Eppendorf 2 mL, auquel 1,6 mL de solution glacée d'acétate d'ammonium/méthanol 0.1 M a été ajouté avant d'être incubé toute une nuit à - 20 °C, permettant la précipitation des polypeptides.

2.3.5.1.4 Précipitation des protéines, lavage et séchage à l'air

Après une centrifugation à 16 000×g et 4 °C pendant 10 minutes, les polypeptides ont été récupérés, ne gardant que le culot. Ce dernier a d'abord été lavé avec une solution glacée de méthanol et ensuite avec une solution glacée d'acétone. Entre chaque lavage, les échantillons ont été centrifugés à 16 000×g pendant 3 minutes à 4 °C et le surnageant a été retiré avec précaution. Le culot final lavé a été séché à l'air libre, sous hotte, avant d'être dissous dans 0.5 mL d'une solution tampon chlorhydrate de guanidine (pH 8.5).

2.3.5.1.5 Préparation et lecture de la microplaque

Les échantillons ont ensuite été insérés dans les puits d'une microplaque, parmi une série de dilutions de concentration connue de BSA. La microplaque a ensuite été incubée (Modèle FD 23 - 20 L, Binder, Bohemia, U.S.) pendant 30 minutes à 37 °C et puis insérée dans le photomètre (Multiskan™ FC, Thermo Fisher Scientific, Shangaï, Chine), avec trois lectures à 5 minutes d'intervalles. Le lecteur Multitaskan donne la concentration protéique de la solution comprise dans chaque puits.

2.4 ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été analysées au moyen de tests statistiques avec le logiciel Rstudio (version 4.0.3).

Pour les données normalisées (test Shapiro Wilk) et homogènes (test Batlett), des ANOVA 1 ont été réalisés afin de savoir si les moyennes étaient significativement différentes entre groupes en utilisant le test Fischer, un test d'hypothèse (H_0 = pas de différence entre groupes, H_1 = différence entre groupes) (Govaerts et Draye 2021). Tous les tests ont été réalisés avec un seuil de signification de $\alpha = 0.05$, un $P < 0.05$ signifiant que l'hypothèse nulle est rejetée et donc qu'une différence significative est

observée entre les différents groupes. Dans ce cas, des tests de Student ont été appliqués afin de comparer les moyennes des groupes deux à deux, permettant de savoir où se trouvait les différences. Seules les données de masses finales des nids et du contenu polypeptidique des ouvrières ont été traitées comme des données normales.

Le test non paramétrique Krukal Wallis a été appliqué pour les données non-normales, l'équivalent d'une ANOVA¹, suivi de tests post Hoc de Dunn. Le taux de survie, la prise alimentaire et le couvain ont été traités en tant que données non normales.

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type.

3 RÉSULTATS

3.1 SÉRIE 1 : MISE AU POINT DU PROTOCOLE

3.1.1 Taux de survie des ouvrières

Le taux de survie augmente avec la quantité de pollen incluse dans les régimes alimentaires.

En effet, les microcolonies nourries avec du pollen de saule (T_0) ont eu un taux de survie supérieur à celles des autres régimes, possédant partiellement ou pas de pollen (86.6% (T_0) contre 33.3% ($T_{0.5}$ et C_0) et 0% (Z_a , $Z_{a0.5}$ et Z_0) au 32^e jour d'expérience, test Dunn $P < 0.05$) (Figure 15).

Un taux de survie comparable a été observé chez les microcolonies nourries aux régimes partiellement composés de pollen, peu importe la nature des composants alimentaires ajoutés ; cellulose ($T_{0.5}$), caséine (C_0) ou zéine (Z_0) (test Dunn, $P < 0.01$).

En revanche, toutes les microcolonies nourries avec les régimes artificiels, sans pollen, (Z_a et $Z_{a0.5}$) ont eu le taux de survie le plus faible (test Dunn, $P < 0.01$). Ces microcolonies ont perdu la totalité de leurs ouvrières entre le 22^e et 24^e jours d'expérience.

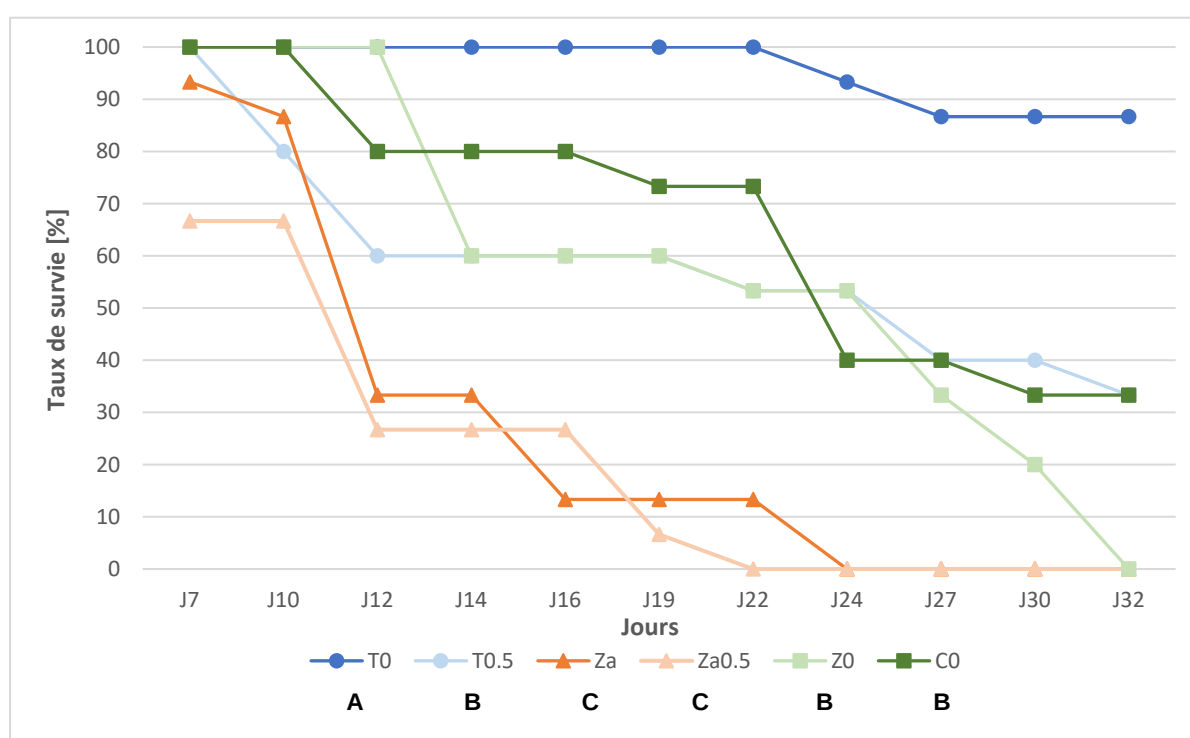


Figure 15 – Taux de survie [%] des microcolonies pour les six régimes alimentaires T_0 , $T_{0.5}$, Z_a , $Z_{a0.5}$, Z_0 et C_0 au cours des 32 jours d'expérience. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P < 0.05$, selon des tests post hocs Dunn.

3.1.2 Prise alimentaire des pains de pollen

Certains pains de pollen se sont désagrégés lors de leur récupération, ne permettant pas de récupérer l'entièreté des aliments. À cause de ces problèmes pratiques, les données de prises alimentaires pour cette expérience (Annexe 1) n'ont pas été considérées comme justes et exploitables dans ce travail.

3.1.3 Nids et couvains

Seuls les régimes alimentaires pollen (T_0) et pollen complété en caséine (C_0) ont permis la formation de nids et de couvains (Tableau 7). Leurs masses finales de nids et de couvains sont comparables (test Dunn, $P < 0.05$).

Le régime pollen T_0 a permis de former une masse finale de nid et de couvain supérieure aux régimes polliniques complétés en cellulose ($T_{0.5}$) ou en zéine (Z_0), ainsi que ceux dépourvus de pollen (Z_a et $Z_{a0.5}$). Le même résultat a été observé à propos du nombre d'individus composant le couvain (4,67 individus (T_0) contre 0 (Z_a , $Z_{a0.5}$, Z_0 et $T_{0.5}$) au 32^e jour, test Dunn $P_{unajust} = 0.01$).

	T_0	$T_{0.5}$	Z_a	$Z_{a0.5}$	Z_0	C_0	Statistiques
Nbre de μcolonies	3	3	3	3	3	3	
Nbre œuf(s)	4 ± 1 <i>a</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	3 ± 0.7 <i>ab</i>	H = 13.15 P < 0.05
Nbre pupe(s)	0.3	0	0	0	0	0	H = 5 P > 0.05
Poids moyen d'une pupe [g]	0.2 ± 0.6	0	0	0	0	0	H = 5 P > 0.05
Nbre nouveau individu émergé	0.3	0	0	0	0	0	H = 5 P > 0.05
Structure du nid [g]	0.5 ± 0.2 <i>a</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0.35 ± 0.31 <i>ab</i>	H = 13.4 P = 0.01
Masse finale du couvain [g]	0.08 ± 0.1 <i>a</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0.006 ± 0.004 <i>ab</i>	H = 13.1 P < 0.05
Nbre individu(s) total du couvain	4.7 ± 2 <i>a</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	0 <i>b</i>	3 ± 2.6 <i>ab</i>	H = 13.27 P < 0.05

Tableau 7 - Effet des six régimes alimentaires (T_0 , $T_{0.5}$, Z_a , $Z_{a0.5}$, Z_0 et C_0) sur le développement de microcolonies de *Bombus terrestris* élevées en laboratoire pendant 32 jours. Les valeurs moyennes sont fournies avec leur écart-type. Le test Kruskal-Wallis (H) permet de voir quelles moyennes sont significativement différentes entre elles ($P < 0,05$). Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont

3.2 SÉRIE 2 : BESOINS NUTRITIONNELS EN LYSINE

3.2.1 Taux de survie des ouvrières

Seules les microcolonies nourries avec les régimes caséine concentrés en lysine totale de 0,4 % (C₀) et 4,9 % (C_{4.5}) n'ont perdu aucune ouvrière (Figure 16).

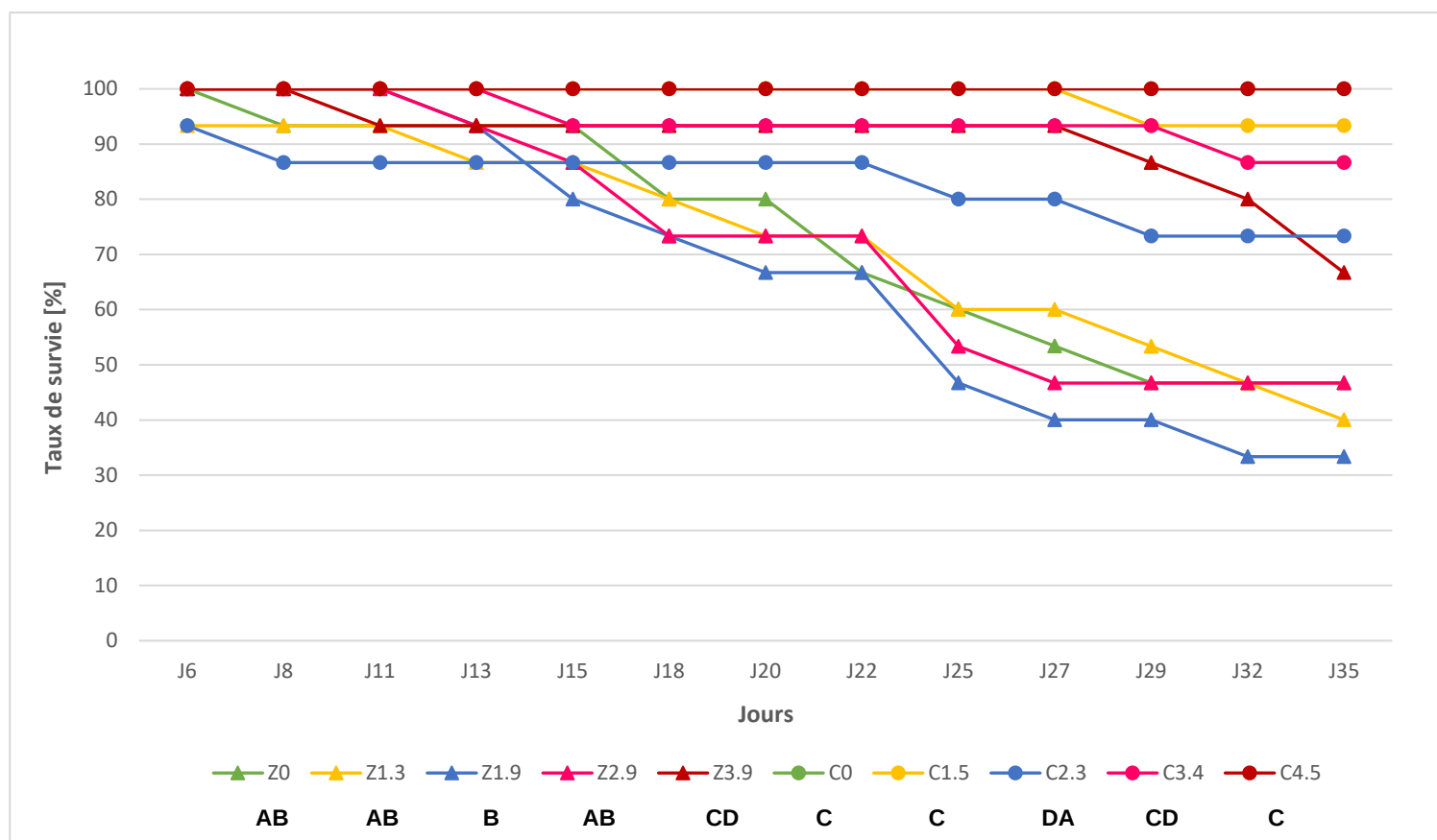


Figure 16 – Taux de survie cumulé [%] des microcolonies pour les dix régimes alimentaires Z₀, Z_{1.3}, Z_{1.9}, Z_{2.9}, Z_{3.9}, C₀, C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5} au cours des 35 jours d'expériences. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à P<0.05, selon des tests post hocs Dunn.

Durant les 35 jours d'expériences, la survie des microcolonies a suivi deux tendances selon les régimes alimentaires administrés. D'une part, les microcolonies nourries avec les régimes zéine concentrés de 0.1 à 3 % en lysine totale (Z₀, Z_{1.3}, Z_{1.9} et Z_{2.9}), ont présenté des taux de survie décroissants au cours du temps. D'autre part, les microcolonies nourries avec les régimes zéine concentrés à 4 % en lysine totale (Z_{3.9})

et les régimes caséine (C₀, C_{1.5}, C_{2.3}, C_{3.4} et C_{4.5}) ont eu un taux de survie constant supérieur à 85% pendant minimum 11 jours (test Dunn, P<0.01).

Cependant, le régime concentré à 2.7 % en lysine totale (C_{2.3}) a engendré une perte d'ouvrières plus élevée par rapport aux régimes concentrés à 0.4% 1.9 % et 4.9 % en lysine totale (C₀, C_{1.5}, C_{4.5}) (taux de survie de 73.3 % (C_{2.3}) contre 93.3 % (C_{1.5}) et 100% (C₀ et C_{4.5}) le 29^e jour d'expérience, test Dunn, P<0.05).

3.2.2 Prise alimentaire des pains de pollen

Les pains de pollen ont été manipulés avec plus de précautions par rapport à la mise au point du protocole (cfr 3.1.2.).

Les ouvrières ont toutes prélevé une quantité similaire de pains de pollen (Kruskal-Wallis, P>0.05), et ce peu importe leur concentration en lysine totale.

Les ouvrières ont prélevé de plus grandes quantités de pain de pollen le 25^e jour, comparé aux jours 6 à 22, excepté le 18^e jour (test Dunn, P<0.01) (Tableau 8).

Aucune corrélation n'a pu être établie entre « mortalité » et « prise alimentaire » (Pearson, r=0.19).

Régimes alimentaires	J ₆	J ₈	J ₁₁	J ₁₃	J ₁₅	J ₁₈	J ₂₀	J ₂₂	J ₂₅	J ₂₇	J ₂₉	J ₃₂	J ₃₅	
Zéine	Z ₀	0,084 ± 0,008	0,091 ± 0,015	0,09271 ± 0,0094	0,085 ± 0,0067	0,085 ± 0,007	0,098 ± 0,01	0,093 ± 0,033	0,11 ± 0,025	0,15 ± 0,063	0,13 ± 0,088	0,17 ± 0,12	0,15 ± 0,11	0,13 ± 0,061
	Z _{1,3}	0,102 ± 0,0103	0,095 ± 0,0052	0,097 ± 0,0075	0,097 ± 0,037	0,096 ± 0,037	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,042	0,103 ± 0,06	0,15 ± 0,13	0,12 ± 0,1	0,13 ± 0,11	0,18 ± 0,091	0,2 ± 0,0205
	Z _{1,9}	0,0702 ± 0,0071	0,07 ± 0,0073	0,085 ± 0,011	0,081 ± 0,019	0,1001 ± 0,0081	0,12 ± 0,0042	0,14 ± 0,033	0,13 ± 0,012	0,23 ± 0,031	0,206 ± 0,023	0,207 ± 0,04	0,26 ± 0,12	0,25 ± 0,07
	Z _{2,9}	0,13 ± 0,093	0,086 ± 0,017	0,101 ± 0,022	0,09 ± 0,026	0,1 ± 0,015	0,14 ± 0,047	0,12 ± 0,019	0,11 ± 0,032	0,2 ± 0,105	0,17 ± 0,108	0,26 ± 0,52	0,2 ± 0,103	0,17 ± 0,089
	Z _{3,9}	0,081 ± 0,015	0,091 ± 0,0075	0,13 ± 0,0102	0,14 ± 0,019	0,14 ± 0,021	0,12 ± 0,031	0,12 ± 0,014	0,12 ± 0,0086	0,16 ± 0,0089	0,12 ± 0,013	0,106 ± 0,014	0,12 ± 0,036	0,13 ± 0,052
Caséine	C ₀	0,12 ± 0,025	0,085 ± 0,0078	0,092 ± 0,016	0,106 ± 0,046	0,12 ± 0,056	0,15 ± 0,065	0,062 ± 0,051	0,13 ± 0,0706	0,14 ± 0,043	0,091 ± 0,036	0,093 ± 0,043	0,12 ± 0,058	0,077 ± 0,024
	C _{1,5}	0,11 ± 0,0203	0,103 ± 0,0087	0,094 ± 0,0037	0,092 ± 0,009	0,105 ± 0,017	0,16 ± 0,043	0,097 ± 0,026	0,11 ± 0,031	0,18 ± 0,069	0,11 ± 0,0087	0,12 ± 0,027	0,12 ± 0,033	0,093 ± 0,017
	C _{2,3}	0,108 ± 0,023	0,099 ± 0,0106	0,109 ± 0,0096	0,094 ± 0,0096	0,12 ± 0,025	0,17 ± 0,067	0,104 ± 0,03	0,089 ± 0,018	0,15 ± 0,022	0,079 ± 0,015	0,099 ± 0,025	0,092 ± 0,036	0,077 ± 0,031
	C _{3,4}	0,102 ± 0,02	0,089 ± 0,056	0,11 ± 0,076	0,11 ± 0,036	0,11 ± 0,035	0,15 ± 0,032	0,091 ± 0,026	0,095 ± 0,025	0,14 ± 0,054	0,073 ± 0,038	0,074 ± 0,034	0,094 ± 0,014	0,077 ± 0,018
	C _{4,5}	0,095 ± 0,016	0,096 ± 0,008	0,12 ± 0,011	0,109 ± 0,0025	0,109 ± 0,0064	0,14 ± 0,0034	0,094 ± 0,0064	0,106 ± 0,023	0,16 ± 0,036	0,099 ± 0,0076	0,107 ± 0,032	0,13 ± 0,028	0,077 ± 0,029

Tableau 8 - Prise alimentaire de pains de pollen par ouvrière [g] à intervalle de 2-3 jours, prenant en compte l'évaporation de l'aliment, pour les dix régimes alimentaires (Z₀, Z_{1,3}, Z_{1,9}, Z_{2,9}, C₀, C_{1,5}, C_{2,3}, C_{3,4} et C_{4,5}). Aucune différence significative observée entre régimes alimentaire (H=23.78, P>0.05), et jours (H=75.65, P<0.01). Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à P<0.05, selon des tests post hoc's Dunn , après un test de Kruskal-Wallis.

3.2.3 Nids et couvains

3.2.3.1 Initiation de la construction des nids

Toutes les microcolonies ont initié la construction de leur nid entre le 4^e et 6^e jours de l'expérience. Un nombre comparable d'alvéoles construites (entre 0.3 et 1 alvéole) a été observé entre régimes alimentaires (test Dunn, $P > 0.05$) (Tableau 9).

Régimes alimentaires		Nombre moyen d'alvéoles	
		J ₄	J ₆
Zéine	Z ₀	0.3 ± 0.6	0.7 ± 1.1
	Z _{1,3}	0.3 ± 0.6	1 ± 1
	Z _{1,9}	0	0.7 ± 0.6
	Z _{2,9}	0.3 ± 0.6	1.7 ± 1.1
	Z _{3,9}	0.3 ± 0.6	1.3 ± 0.6
Caséine	C ₀	0	1
	C _{1,5}	0.7 ± 0.6	1.7 ± 0.6
	C _{2,3}	0.7 ± 0.6	1.7 ± 0.6
	C _{3,4}	0.3 ± 0.6	1.3 ± 0.6
	C _{4,5}	1	2

Tableau 9 – Nombre moyen d'alvéoles construites au 4^e et 6^e jours d'expérience pour les dix régimes alimentaires Z₀, Z_{1,3}, Z_{1,9}, Z_{2,9}, Z_{3,9}, C₀, C_{1,5}, C_{2,3}, C_{3,4} et C_{4,5}

3.2.3.2 Masse finale des nids

Après 35 jours d'expérience, les masses finales des nids ont été déterminées (Figure 17).

Les microcolonies nourries avec les régimes alimentaires concentrés à 0.1%, 1.4% et 2% de lysine totale (Z₀, Z_{1,3} et Z_{1,9}) ont construit des nids de masse plus faible comparée au régime concentré à 0,4 % de lysine totale (C₀) (1.4g, 1.7g et 1.9g contre 6.3g respectivement, test Student, $P < 0.01$). C'est seule différence massique observée.

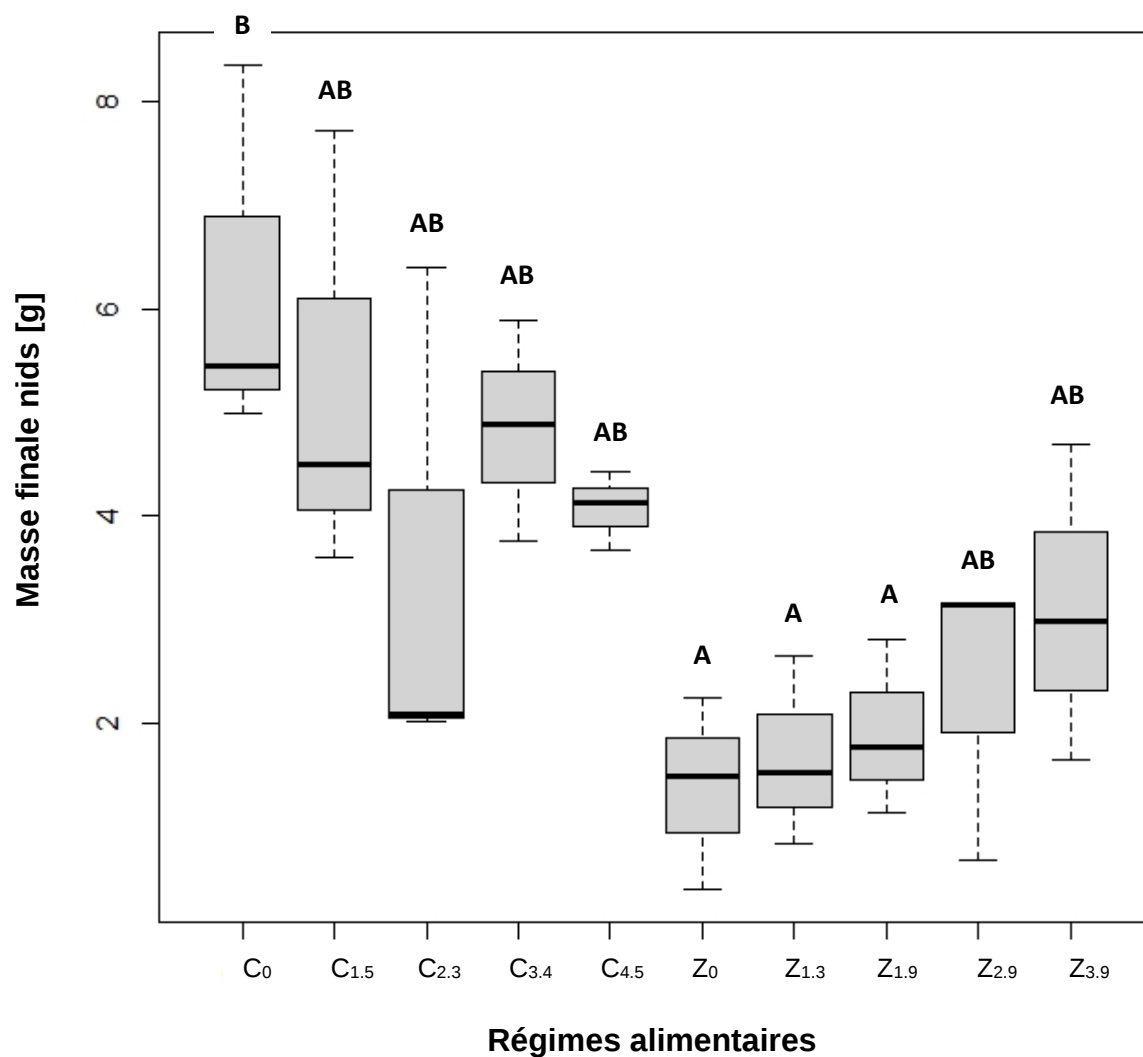


Figure 17 – Masse finale des nids [g] des microcolonies pour les dix régimes alimentaires Z0, Z1.3, Z1.9, Z2.9, Z3.9, C0, C1.5, C2.3, C3.4 et C4.5 au 35^e jour d'expérience. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P < 0.05$, selon des tests Tukey après une ANOVA 1.

3.2.3.3 Couvains

Les couvains ont été analysés en fin d'expérience (Tableau 9). Le couvain d'une microcolonie comprend les œufs, les larves et les pupes.

Régimes alimentaires	Z ₀	Z _{1,3}	Z _{1,9}	Z _{2,9}	Z _{3,9}	C ₀	C _{1,5}	C _{2,3}	C _{3,4}	C _{4,5}	Statistiques
Nbre de colonies	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Nbre œuf(s)	0	0	1.3 ± 2.3	3 ± 5.1	0	3.7 ± 3.2	2 ± 3.4	5 ± 8.6	13.7 ± 14.01	20 ± 4.3	H=15.2 P > 0.05
Nbre larve(s) non isolée(s)	1.7 ± 2.8	0	2.7 ± 3.7	3.7 ± 6.3	5.3 ± 2.08	7.3 ± 6.6	12.7 ± 2.5	16 ± 7	8 ± 11.3	5.3 ± 9.2	H=13.6 P > 0.05
Nbre larve(s) isolée(s)	0	0.7 ± 1.1	0.3 ± 0.5	0	0	0.3 ± 0.5	1.7 ± 2.08	0	0	2 ± 2	H=11.7 P > 0.05
Poids moyen larve isolée [g]	0	0.2	0.1	0	0	0.08	0.1 ± 0.02	0	0	0.05 ± 0.03	H=10.3 P > 0.05
Nbre pupe(s)	0	0	0	0	0	1.3 ± 2.3	1.7 ± 2.08	0.3 ± 0.5	0	0	H=12.2 P > 0.05
Poids moyen pupe [g]	0	0	0	0	0	0.3 ± 0.03	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.02	0	0	H=12.1 P > 0.05
Nbre larve(s) éjectée(s)	0	0	2 ± 2	3 ± 4.3	0.3 ± 0.5	10.3 ± 6.1	13.3 ± 7.2	8 ± 5.2	7.7 ± 6.3	15 ± 3.6	H=23.2 P < 0.01
Total individu(s) formé(s)	1.7 ± 2.9	0.67 ± 1.1	6.3 ± 4	9.7 ± 8.7	5.7 ± 2.5	23 ± 16.1	31.3 ± 6	29.3 ± 13.6	29.3 ± 14.9	42.3 ± 13.2	H=23.3 P < 0.01
	a	a	ab	abd	abd	acd	bcd	bcd	cd	c	

Tableau 9 - Effet de dix régimes alimentaires (Z₀, Z_{1,3}, Z_{1,9}, Z_{2,9}, Z_{3,9}, C₀, C_{1,5}, C_{2,3}, C_{3,4} et C_{4,5}) sur le développement de microcolonies de *Bombus terrestris* élevées en laboratoire pendant 35 jours . Les valeurs moyennes sont fournies avec leur écart-type. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à P< 0,05, selon le test post hoc Dunn, après le test de Kruskal-Wallis.

Aucun œuf n'a été observé chez les microcolonies nourries avec les régimes concentrés à 0,1 %, 1,4 % et 4 % de lysine (Z_0 , $Z_{1.3}$ et $Z_{3.9}$). Une moyenne de 20 œufs a été observée chez les microcolonies ayant reçues les pains de pollen concentrés à 4,9 % de lysine ($C_{4.5}$). Cependant, le nombre d'œufs n'a pas été considéré comme statistiquement différent entre régimes alimentaires (Kruskal-Wallis, $P>0.05$) (Tableau 9).

Des larves non isolées ont été retrouvées dans toutes les microcolonies, à l'exception de celles nourries avec le régime concentré à 1.4 % de lysine ($Z_{1.3}$). Quant aux larves isolées, elles ont seulement été observées chez les microcolonies ayant reçues les régimes contenant 0.4 % (C_0), 1.4 % ($Z_{1.3}$), 1.9 % ($C_{1.5}$), 2 % ($Z_{1.9}$), et 4.9 % ($C_{4.5}$) de lysine. Cependant, le nombre de larves, isolées ou non isolées, n'a pas été considéré comme statistiquement différent entre régimes alimentaires (Kruskal-Wallis, $P>0.05$).

Seules les microcolonies nourries avec les régimes caséine concentrés en lysine totale à 0.4%, 1.9% et 2.7 % (C_0 , $C_{1.5}$, $C_{2.3}$) ont formé des pupes. Cependant, le nombre de pupes, ainsi que leur poids moyen n'ont pas été considérés comme statistiquement différents entre régimes (Kruskal-Wallis, $P>0.05$).

Des larves éjectées ont été observées dans toutes les microcolonies, excepté celles nourries avec les régimes zéine concentrés en lysine totale à 0.1 % (Z_0) et 1.4 % ($Z_{1.3}$). Au sein d'un même groupe alimentaire, zéine ou caséine, les microcolonies ont éjecté une quantité comparable de larves, et ce peu importe le pourcentage de lysine ajoutée (test Dunn, $P>0.05$). Les microcolonies nourries avec les régimes caséine composés en lysine totale à 1.9 % et 4.9 % ($C_{1.5}$ et $C_{4.5}$) ont éjecté un plus grand nombre de larves par rapport aux régimes zéine (test Dunn, $P_{\text{unadj}}<0.01$).

Le nombre total d'individus formés comprend les individus du couvain (œufs, larves et pupes) ainsi que les larves éjectées. Le régime alimentaire à base de caséine concentré en lysine à 4.9 % ($C_{4.5}$) a permis un taux de reproduction plus élevé par rapport aux régimes zéine (test Dunn, $P_{\text{unadj}}<0.01$). Pour les régimes non complétés en lysine, celui composé avec 0.4% de lysine protéique (C_0) a formé plus d'individus qu'avec 0.1% de lysine protéique (Z_0). Cependant, les pains de pollen zéine concentrés à 3 et 4 % de lysine ($Z_{2.9}$ et $Z_{3.9}$) et les pains de pollen caséine concentrés entre 0.4 et 3.8 % de lysine (C_0 , $C_{1.5}$, $C_{2.3}$ et $C_{3.4}$) ont montré un taux de reproduction comparable de nouveaux individus (test Dunn, $P_{\text{unadj}}<0.01$).

3.2.4 Contenu en polypeptides

Pour les dix régimes alimentaires, le contenu polypeptidique des pains de pollen, des ouvrières vivantes, des ouvrières mortes ainsi que leurs fèces ont été déterminés. Le taux de polypeptides des larves isolées a également été analysé (Tableau 11).

	Z ₀	Z _{1,3}	Z _{1,9}	Z _{2,9}	Z _{3,9}	C ₀	C _{1,5}	C _{2,3}	C _{3,4}	C _{4,5}	Statistique
Pain de pollen	18.07 ± 9.38 <i>a</i>	10.73 ± 1.64 <i>a</i>	10.47 ± 1.2 <i>a</i>	15.96 ± 5.15 <i>a</i>	20.05 ± 3.31 <i>ab</i>	140.73 ± 17.81 <i>cb</i>	179.13 ± 18.54 <i>c</i>	134.12 ± 8.94 <i>cb</i>	94.83 ± 7.88 <i>abc</i>	98.21 ± 17.71 <i>abc</i>	H = 25.5 P < 0.01
Fèces	9.81 ± 5.96 <i>a</i>	7.58 ± 2.96 <i>a</i>	9.68 ± 3.89 <i>a</i>	8.03 ± 1.87 <i>a</i>	9.05 ± 2.37 <i>a</i>	16.37 ± 4.88 <i>ab</i>	24.12 ± 2.5 <i>ab</i>	24.37 ± 10.59 <i>ab</i>	30.97 ± 12.45 <i>b</i>	29.84 ± 2.15 <i>b</i>	H = 22.4 P < 0.01
Ouvrière survivante	84.17 ± 12.1 <i>ab</i>	106 ± 32.82 <i>ab</i>	86.33 ± 13.68 <i>ab</i>	105.8 ± 26.1 <i>ab</i>	102.3 ± 10.55 <i>ab</i>	119.01 ± 22.84 <i>b</i>	109.17 ± 15.33 <i>ab</i>	56.97 ± 7.19 <i>a</i>	66.66 ± 10.01 <i>ab</i>	118.29 ± 17.21 <i>b</i>	F = 3.9 P < 0.01
Ouvrière morte	59.67 ± 12.49 <i>a</i>	58.41 ± 12.07 <i>a</i>	54.91 ± 15.55 <i>a</i>	84.85 ± 19.95 <i>bc</i>	101.75 ± 6.38 <i>bc</i>		137.84 ± 31.1 <i>c</i>	150.25 ± 7.7 <i>d</i>	100.9 ± 8.88 <i>b</i>		F = 53.9 P < 0.01
Larve isolée		25.82 ± 3.1	179.98 ± 67.62			76.48 ± 15.09	57.36 ± 5.03		85.9 ± 21.07		H=9.03 P>0.05

Tableau 11 - Contenu en polypeptides des pains de pollen, des fèces des ouvrières, des ouvrières vivantes et mortes pour les 10 régimes alimentaires (Z₀, Z_{1,3}, Z_{1,9}, Z_{2,9}, Z_{3,9}, C₀, C_{1,5}, C_{2,3}, C_{3,4} et C_{4,5}) exprimé en microgramme de polypeptides par milligramme d'échantillon lyophilisé [µg/mg]. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à α=0.05, selon le test post hoc après une ANOVA1 ou le test Kruskal Wallis.

3.2.4.1 Pains de pollen

Une quantité polypeptidique plus élevée a été observée pour les pains de pollen caséine par rapport à ceux du groupe zéine (test Dunn, $P < 0.01$), peu importe la quantité de lysine ajoutée (Tableau 11).

Les pains de pollen caséine concentrés à 0.4 %, 1.9 % et 2.7 % de lysine totale (C_0 , $C_{1.5}$ et $C_{2.3}$) ont un contenu polypeptidique plus élevé par rapport aux pains de pollen zéine, excepté celui concentré à 4 % de lysine totale ($Z_{3.9}$) (test dunn, $P_{unadj} < 0.01$). Néanmoins, ce dernier possède une quantité polypeptidique inférieure au pain de pollen caséine concentré à 1.9 % de lysine totale ($C_{1.5}$).

3.2.4.2 Larves isolées

Des larves isolées ont été observées dans les microcolonies de cinq régimes alimentaires ($Z_{1.3}$, $Z_{1.9}$, C_0 , $C_{1.5}$ et $C_{3.4}$). Leur contenu polypeptidique n'a pas montré de différence statistique entre les différents régimes (Kruskal-Wallis, $P > 0.05$).

3.2.4.3 Ouvrières

Les ouvrières vivantes ont vécu les 35 jours d'expérience. Celles ayant été nourries avec les pains de pollen-caséine concentrés à 0.4 % et 4.9 % de lysine totale (C_0 et $C_{4.5}$) possèdent une quantité polypeptidique plus élevée par rapport au régime concentré à 2,7 % ($C_{2.3}$) (test Student, $P < 0.01$). En revanche, les quantités polypeptidiques contenues dans les ouvrières n'ont pas différé entre les autres régimes alimentaires.

Les ouvrières mortes ont été récupérées entre les jours 25 et 29 pour 8 des 10 régimes alimentaires. Les régimes caséine concentrés à 0,4 et 4.9% (C_0 et $C_{4.5}$) de lysine totale n'ont pas perdu d'ouvrières. Celles nourries avec les régimes les moins concentrés en lysine (0.1 %, 1.4 % et 2 % (Z_0 , $Z_{1.9}$, $Z_{1.3}$)) ont montré les quantités polypeptidiques les plus faibles (test Student, $P < 0.01$). La quantité polypeptidique la plus élevée a été observée chez les ouvrières nourries avec le régime caséine concentré à 2.7 % de lysine totale ($C_{2.3}$).

Les quantités polypeptidiques entre ouvrières mortes et vivantes n'ont pas montré de différence (test Student, $P > 0.05$).

3.2.4.4 Fèces

Une quantité polypeptidique plus élevée a été observée dans les fèces des microcolonies nourries avec les régimes caséine (test Dunn, $P < 0.01$), et ce peu importe la quantité de lysine ajoutée. Cependant, la teneur polypeptidique des fèces des ouvrières nourries avec les régimes concentrés en lysine à 3,8 % et 4,9 % (C_{3,4} et C_{4,5}) est plus élevée par rapport aux régimes zéine (test Student, $P < 0.01$).

4 DISCUSSION

Ce travail vise à approfondir les connaissances à propos des besoins nutritionnels de *Bombus terrestris*, particulièrement en lysine, un acide aminé considéré comme essentiels pour les abeilles *Apis mellifera* (de Groot 1952). En parallèle, un protocole expérimental a été mis au point pour réaliser des études sur les besoins nutritionnels en acides aminés de cette espèce.

Ce travail a consisté en des expériences de 32 à 35 jours, utilisant un total de 48 microcolonies de cinq ouvrières, sans reine. Deux séries d'expériences ont été réalisées : (i) une première afin de déterminer la tolérance des bourdons face à des régimes avec ou sans pollen, et (ii) une seconde pour déterminer leurs besoins nutritionnels en lysine.

Les points abordés dans la discussion de ce travail seront : (1) l'impact des différentes concentrations de lysine sur le taux de survie des ouvrières et le développement des couvains, (2) les autres besoins nutritionnels protéiques de *Bombus terrestris* et enfin (3) le comportement de *Bombus terrestris* en conditions expérimentales et dans le nature.

4.1 BESOINS NUTRITIONNELS EN LYSINE DE *BOMBUS TERRESTRIS*

Les ouvrières étudiées ont toutes prélevé une quantité similaire de pains de pollen. La quantité d'aliment prélevée par ouvrière *Bombus terrestris* en microcolonie est indépendante de sa composition chimique (Vanderplanck et al. 2014).

A partir de 0.4% de lysine protéique ou à partir de 0.1% de lysine protéique complétée à 3.9% de lysine libre, le taux de survie reste élevé. En effet, le taux de survie des ouvrières a été amélioré à partir de 4% de lysine totale inclus dans les régimes zéine (Z_{3.9}). Les régimes caséine montrent un taux de survie élevé à partir de 0.4% de lysine totale (C₀). McAulay et Forrest (2019) ont montré un taux de mortalité plus élevé pour les ouvrières *Bombus terrestris* nourries avec du pollen de *Helianthus* (Asteraceae), concentré à 0.0089% de lysine protéique (Nicolson et Human 2013), comparé à celles nourries avec du pollen de *Castanea* (Fagaceae), concentré à 1.16% de lysine

protéique (Pollenergie 2022). Ces résultats semblent définir qu'une concentration minimale de lysine protéique de 0.4% améliore le taux de survie des ouvrières.

Nos résultats montrent que la lysine à l'état libre n'a pas d'effet toxique direct sur les ouvrières à une concentration inférieure à 4.5%. Certains acides aminés libres ont des effets toxiques chez les insectes à travers leur mauvaise incorporation dans les protéines, des obstructions du métabolisme primaire de l'individu ou encore à cause d'une interférence avec leur processus neurologique (Kraus et al. 2019 ; Vanderplanck et al. 2014).

Toutes les microcolonies étudiées ont initié la construction de leur nid dans les mêmes délais, entre les jours 4 et 6. Ryder et al. (2021) ont montré que le taux de lysine du pollen n'impact pas l'initiation de la construction des nids.

A partir de 0.4% de lysine protéique ou à partir de 0.1% de lysine protéique complétée à 2.9% de lysine libre, le taux de reproduction a été amélioré. En effet, le taux de reproduction des microcolonies des régimes zéine a été amélioré à partir de 3% de lysine totale ($Z_{2.9}$). Tandis qu'un taux de reproduction élevé a déjà été observé pour les régimes caséine à partir de 0.4% de lysine totale (C_0). L'établissement de la microcolonie n'a pas été suivi au cours de cette étude. Un faible taux de reproduction peut signifier, soit une ponte plus lente, soit la présence d'oophagie au sein de la microcolonie. La consommation d'œufs est une pratique courante au sein de microcolonies. Ce phénomène peut être expliqué par une ponte d'œufs non viables, des ressources limitantes tant quantitativement que qualitativement, ou encore par la compétition entre ouvrières pour la reproduction (McAulay et Forrest 2019).

Le développement du couvain d'une microcolonie est affecté par des modifications nutritionnelles de leur régime alimentaire (Dance, Botías, et Goulson 2017; Laycock et al. 2012 ; Moerman, Vanderplanck, et al. 2016). En effet, la qualité protéique du régime peut améliorer la maturation des ovaires de l'ouvrière dominante et ainsi accélérer la formation de nouveaux individus (Imran et al. 2017 ; A.D. Vaudo et al. 2016).

Le taux de larves éjectées du nid est un paramètre à interpréter avec précaution, car la cause peut être soit comportementale, soit liée aux effets du régime alimentaire. Les bourdons éjectent naturellement un pourcentage de larves afin de nourrir adéquatement les individus restant dans le couvain (Tasei et Aupinel 2008). Généralement, au plus le taux de reproduction est élevé et au plus le taux d'éjection

est élevé (Gradish et al., 2013). Le stade larvaire précédant la nymphose est la période la plus sensible au stress nutritionnel quantitatif et qualitatif (Carnell et al. 2020). Cependant, dans cette étude, aucune différence de poids larvaire n'a été observée.

4.2 BESOINS NUTRITIONNELS EN AUTRES ACIDES AMINÉS POUR *BOMBUS TERRESTRIS*

Les acides aminés essentiels, une fois absorbés par les cellules épithéliales (Sauvion et al. 2013), sont utilisés par les bourdons adultes pour maintenir leurs fonctions somatiques et la reproduction, tandis que les juvéniles en ont besoin pour leur croissance (Paoli et al. 2014). Les ouvrières maintiennent leur contenu en protéines corporelles au-dessus de 40% (Tasei et Aupinel 2008). Les déchets azotés sont évacués de l'organisme sous forme d'acide urique, grâce aux tubes de Malpighi, et sont mélangés avec les déchets de la digestion (Chapman 2013).

Nos résultats à propos des quantités de polypeptides ingérées, excrétées et métabolisées par ouvrière ne renseignent pas sur les besoins nutritionnels en lysine, ou autres acides aminés potentiellement essentiels, des bourdons *Bombus terrestris*. Comme les ouvrières ont métabolisé des quantités comparables de polypeptides, cela ne permet pas d'affirmer que la lysine est un acide aminé limitant. En effet, lorsqu'un acide aminé essentiel est limitant, la synthèse protéique est tributaire de la présence de cet acide aminé (Larondelle et Debier 2021). Même si la lysine n'impacte pas la quantité polypeptidique métabolisée par les bourdons, elle influence le type de polypeptides formés. En effet, la composition en acides aminés du polypeptide détermine son rôle physiologique (Malvy et Caesar 2022).

4.3 COMPORTEMENT DE *BOMBUS TERRESTRIS*

4.3.1 En conditions expérimentales

Maintenir des conditions expérimentales, dont une température constante et d'au moins 25°C ainsi qu'une humidité relative de 65%, est nécessaire pour garantir un développement optimal des microcolonies de *Bombus terrestris* (Holland et Bourke 2015; Yoon, Kim, et Kim 2002).

La température de 26 °C a été maintenue tout au long de nos expériences. Cette condition correspond à celles utilisées lors d'autres études, qui étaient des 25°C

(Holland et Bourke 2015) ou 27-29 °C (Weidenmüller, Kleineidam, et Tautz 2002). Ces températures sont optimales pour maintenir le comportement thermorégulateur des individus et leur garantir une longévité ainsi qu'une productivité optimale (Guiraud et al. 2021). Les espèces de *Bombus* ont une température de nidification idéale, le moindre écart pouvant impacter le développement du couvain.

Le niveau d'humidité relative influence le prélèvement de nectar et de pollen. Une grande humidité augmente la prise alimentaire des abeilles (Peat et Goulson 2005). Les ouvrières priorisent l'ingestion d'hydrates de carbone face aux acides aminés essentiels et peuvent survivre quelques jours avec un régime alimentaire à base de sucres, sans protéines, mais pas le contraire (Stabler et al. 2015). Lors de la mise en place du protocole, l'humidité relative dans la pièce d'élevage était de 30-40 %, conduisant à un environnement sec et à l'évaporation rapide de l'eau contenu dans le sirop commercial BIOGLUC®. Lors du changement des capillaires et du réapprovisionnement en sirop, les ouvrières des microcolonies se regroupaient autour des capillaires pour s'alimenter. Ce comportement suppose que le sirop trop concentré empêche une bonne prise alimentaire de BIOGLUC® par capillarité. Les microcolonies élevées sous une humidité relative de 30-40% possèdent un taux de survie plus faible que celles élevées avec une humidité relative de 60-70%, alors qu'elles ont été nourries avec des pains de pollen de composition identique (Z_0 et C_0). Cette différence de résultat peut être expliquée par un accès limité au sirop BIOGLUC®, engendrant un stress nutritionnel supplémentaire aux ouvrières dû à l'apport limité en sucres et en eau.

Les microcolonies étudiées ont toutes été élevées dans des pièces plongées dans l'obscurité totale et manipulées sous lumière rouges, non détectées par les bourdons (Sadd 2011). La masse du couvain et des adultes nouvellement émergés diminue avec une exposition croissante à la lumière (Klinger et al. 2019).

Les microcolonies étudiées possédaient toutes initialement cinq ouvrières, parmi lesquelles une dominante s'est mise à pondre. Plusieurs études ont utilisé cinq ouvrières par microcolonie, ce nombre étant considéré comme fiable pour évaluer les impacts de différents régimes alimentaires (A. Barraud et al. 2020; Gradish et al. 2013; Klinger et al. 2019; Moerman, Vanderplanck, et al. 2016). Dans chaque microcolonie, une des ouvrières devient dominante sur les autres et initie la ponte, phénomène non

observé lorsque le nombre d'ouvrières par microcolonie est trop élevé (A. Barraud et al. 2020).

Le taux de survie et l'initiation du couvain ont été influencés par la quantité de pollen de saule inclus dans les régimes alimentaires. Le pollen de saule a été décrit, dans de précédentes études, comme un pollen qualitatif pour le développement de *Bombus terrestris*, avec une teneur totale d'acide aminé de 18.65% (A. Barraud et al. 2020 ; Moerman, Roger, et al. 2016). Les microcolonies nourries avec le pollen complété en cellulose (T_{0.5}) (ratio 1:1) ont perdu, au total, 53.3 % plus d'ouvrières que celles nourries avec du pollen (T₀). De plus la cellulose n'a pas favorisé le développement d'un couvain. L'inclusion de cellulose dans les aliments engendre des diminutions du taux de survie et de masse de couvain produit. Cette diminution de performance peut être due à la déficience nutritionnelle de l'aliment ou à l'effet de la cellulose sur le métabolisme des ouvrières ou des larves. L'impact de la cellulose sur la survie des ouvrières n'est pas encore bien connu (Jack et al. 2016). Selon (Willard et al. 2011), la cellulose cause un stress mécanique intestinal chez les abeilles contribuant à un taux de mortalité cellulaires élevé des cellules épithéliales.

Les microcolonies nourries avec les régimes alimentaires artificiels, sans pollen (Z_a et Z_{a0.5}), ont perdu toutes leurs ouvrières après 24 jours d'expérience. La survie des microcolonies des régimes zéine avec ou sans cellulose était comparable, signifiant que la zéine n'est pas adéquate aux besoins nutritionnels des bourdons. En incluant du pollen de saule à la zéine, cela a permis de rallonger la longévité des individus de 8 jours supplémentaires. Ces résultats montrent que l'inclusion de pollen de saule dans les régimes est bénéfique. En effet, le pollen contient d'autres nutriments essentiels, tels que des lipides, des vitamines et des minéraux (Sampat Ghosh et Jung 2020; Grund-Mueller et al. 2020 ; Imdorf et al. 1998 ; Vanderplanck et al. 2014).

4.3.2 Dans la nature

En présence de ressources florales, les bourdons *Bombus terrestris* sont capables de détecter certains acides aminés dans le pollen, dont la lysine (Ruedenauer, Spaethe, et Leonhardt 2015). Ils composent naturellement des charges polliniques polyflorales

contenant 8.49% de lysine protéique. Cette collecte pollinique polyflorale permet de former une charge de pollen de composition chimique la plus proche possible de leur optimum nutritionnel (Riesell, Hilpert, et Leonhardt 2017). En transformant le pourcentage de 0.4% de lysine totale du régime (Co) en pourcentage de lysine par protéines, 7.72% de lysine (g/100g de protéines) est obtenu. Ce pourcentage est proche de la composition en lysine des charges de pollen dans la nature (8.49%). Nos résultats sont en accord avec Riesell, Hilpert, et Leonhardt (2017), disant que les besoins proportionnels en lysine peuvent différer entre bourdons et abeilles *Apis mellifera*. Cette dernière a besoin d'un minimum de 3% en lysine pour atteindre une prise de poids optimal (de Groot 1953).

4.4 PERSPECTIVES

Au sein des laboratoires du département PEPA de l'UCLouvain, l'élevage de bourdons en microcolonie n'avait jamais été effectué. De plus, cette étude a été limitée dans le temps, expliquant que de nombreux paramètres n'ont pas pu être étudiés.

Cette partie a pour but d'apporter des nouveaux éléments de réflexions visant à améliorer les prochaines études sur le sujet.

4.4.1 Pains de pollen

Lors de la détermination des besoins nutritionnelles en lysine dans ce travail, une quantité similaire de pollen de saule a été inclus dans chaque régime. Le pollen de saule est composé de plusieurs molécules, principalement de lipides et de protéines (Sampat Ghosh et Jung 2020; Grund-Mueller et al. 2020; Imdorf et al. 1998; Vanderplanck et al. 2014). Il serait intéressant de définir la quantité minimum de pollen à inclure dans les régimes alimentaires, afin d'avoir un meilleur contrôle sur leur composition chimique exacte. Cela permettrait d'observer l'impact réel des concentrations d'acides aminés essentiels étudiés.

Stabler et al (2015) ont administré des régimes alimentaires sous forme liquide à des ouvrières, en incorporant à du saccharose et de l'eau, soit une protéine, soit un mélange d'acides aminés essentiels libres, sur une durée de 7 jours. Il serait intéressant de prolonger le délai de l'étude afin de voir si de tels régimes

conviendraient pour le développement de couvains. Si tel est le cas, cela pourrait être une alternative aux pains de pollen, friables.

Deux autres régimes alimentaires à base de caséine avaient été prévus dans cette étude, mais à cause de leur texture finale, leur administration sous forme de pains de pollen n'a pas été possible. Il serait intéressant de voir si les bourdons tolèrent des régimes artificiels à base de caséine, une protéine non déficiente en lysine cette fois.

4.4.2 Besoins nutritionnels en autres acides aminés essentiels

Avec 4% de lysine totale (dont 0.1% protéique et 3.9% libre) et à partir de 0.4% de lysine totale (seulement protéique) le taux de survie des ouvrières s'est amélioré. Il serait intéressant de réitérer l'expérience avec des concentrations plus précises, entre 2.9% (Z_{2.9}) et 3.9% (Z_{3.9}) de lysine libre ajoutée, afin de connaître plus précisément la concentration nécessaire en lysine libre pour améliorer les taux de survie des ouvrières.

Les acides aminés libres peuvent être toxiques à partir d'une certaine concentration (Klinger et al. 2019). Dans cette étude, la concentration maximum de lysine libre apportée dans les régimes alimentaires était de 4.5%, n'impliquant aucune toxicité chez les ouvrières. En étudiant des concentrations de lysine libre supérieures à 4.5%, il serait possible de confirmer si la lysine est un acide aminé libre toxique, lorsque sa forme libre est ingérée en trop grande quantité.

Après avoir déterminé avec plus de précision la quantité optimale de lysine nécessaire pour *Bombus terrestris*, il serait intéressant de réitérer l'expérience pour les neufs autres acides aminés considérés comme essentiels pour *Apis mellifera* (de Groot 1952). À noter, qu'il faudra identifier à chaque fois une protéine déficiente en l'acide aminé essentiel étudié, si le protocole expérimental de ce travail est appliqué.

4.4.3 Protocole expérimental

La quantité de sirop de sucre prélevée par les ouvrières devrait être un paramètre analysé lors des futures expériences. En effet, au fur et à mesure du développement du couvain, les ouvrières ont besoin de plus d'énergie pour s'en occuper, expliquant une quantité croissante de sirop consommé (Moerman, Vanderplanck, et al. 2016).

L'analyse de ce paramètre permettrait d'avoir une vision globale sur les quantités alimentaires ingérées par les bourdons en microcolonies.

Le nombre de répliques par régime alimentaire devrait être supérieur à 3, afin de confirmer les résultats et certaines tendances observées de cette étude.

Aucun nouvel individu émergé n'a été observé dans les microcolonies. Augmenter la durée de l'expérience permettrait d'obtenir la quantité d'individus réellement arrivés à maturité, ainsi que de les comparer entre régimes alimentaires. Un minimum de 21 jours est nécessaire pour que l'œuf se développe en une ouvrière (Habay et Renneson 2019).

Les pains de pollen sont des aliments friables. Il n'est pas possible de garantir que la différence de poids de l'aliment entre son administration et sa récupération correspond réellement à la quantité utilisée par les bourdons. Il serait intéressant, soit d'améliorer la conception des boîtes de microcolonies, soit de repenser la forme sous laquelle l'aliment est administré.

Dans ce travail, la quantité de polypeptides ingérée, excrétée et digérée a été quantifiée entre régimes alimentaires, mais leur composition en acides aminés n'a pas été analysée. Il serait donc intéressant de réaliser en complément une analyse d'acides aminés libres ou liés, permettant ainsi de savoir si la lysine a été incorporée dans les polypeptides.

5 CONCLUSION

Les conditions idéales pour l'élevage de l'espèce *Bombus terrestris*, à l'échelle de microcolonie de cinq ouvrières, sont ; l'obscurité, une humidité relative de minimum 60% ainsi qu'une température constante de 26°C. De plus, l'inclusion de pollen de saule dans les régimes expérimentaux améliore le taux de survie et de reproduction des bourdons.

Afin de ne pas seulement étudier les effets liés aux différentes concentrations d'acides aminés, il est primordial que les besoins nutritionnels en glucides des bourdons soient atteints.

La lysine à l'état libre n'a pas d'effet toxique direct sur les ouvrières à une concentration inférieure à 4.5%.

Nos résultats montrent que le taux minimum de lysine dans le régime alimentaire doit être de 0.4%, lorsqu'elle est sous forme protéique, ou de 3.9%, lorsqu'elle est sous forme libre, afin d'assurer un développement maximal des microcolonies de l'espèce *Bombus terrestris*.

Bombus terrestris compose naturellement des charges polliniques polyflorales concentrées à 8.59% de lysine, supérieure à la teneur minimale de 3% de lysine requise pour *Apis mellifera*.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Alqarni, A.S. 2006. « Influence of Some Protein Diets on the Longevity and Some Physiological Conditions of Honeybee *Apis Mellifera* L. Workers ». *Journal of Biological Sciences* 6(4): 734-37.
- Auestad, N., et D.K. Layman. 2021. « Dairy Bioactive Proteins and Peptides: A Narrative Review ». *Nutrition Reviews* 79: 36-47.
- Barbehenn, RAYMOND V, et MICHAEL M Martin. 1997. « Permeability of the Peritrophic Envelopes of Herbivorous Insects to Dextran Sulfate: A Test of the Polyanion Exclusion Hypothesis ». *Journal of Insect Physiology* 43(3): 243-49.
- Barraud, A., M. Vanderplanck, S. Nadarajah, et D. Michez. 2020. « The impact of pollen quality on the sensitivity of bumblebees to pesticides ». *Acta Oecologica* 105.
- Barraud, Alexandre et al. 2022. « Variations in Nutritional Requirements Across Bee Species ». *Frontiers in Sustainable Food Systems* 6.
- Bartholomée, Océane, et Sandra Lavorel. 2019. « Disentangling the Diversity of Definitions for the Pollination Ecosystem Service and Associated Estimation Methods ». *Ecological Indicators* 107: 105576.
- Bartomeus, I. et al. 2014. « Contribution of Insect Pollinators to Crop Yield and Quality Varies with Agricultural Intensification ». *PeerJ* 2014(1).
- Benton, Ted. 2006. *Bumblebees*. London: Collins.
- Biesmeijer, J. C. et al. 2006. « Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands ». *Science* 313(5785): 351-54.
- Borrell, Brendan J. 2005. « Long Tongues and Loose Niches: Evolution of Euglossine Bees and Their Nectar Flowers¹ ». *Biotropica* 37(4): 664-69.
- Bortolotti, L., F. Pošćić, et G. Bogo. 2020. « Comparison of different pollen substitutes for the feeding of laboratory reared bumble bee (*bombus terrestris*) colonies ». *Journal of Apicultural Science* 64(1): 91-104.
- Boudko, Dmitri Y. 2012. « Molecular Basis of Essential Amino Acid Transport from Studies of Insect Nutrient Amino Acid Transporters of the SLC6 Family (NAT-SLC6) ». *Journal of Insect Physiology* 58(4): 433-49.
- Cameron, SA, H. Hines, et Paul Williams. 2007. « A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*): BUMBLE BEE PHYLOGENY ». *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 161-88.
- Carnell, Joanne D., Sam Page, Dave Goulson, et William O. H. Hughes. 2020. « Trialling Techniques for Rearing Long-Tongued Bumblebees under Laboratory Conditions ». *Apidologie* 51(2): 254-66.
- Chapman, Reginald F. 2013. *The insects structure and function*. Fifth edition. New York: Cambridge university press.

- Dance, C., C. Botías, et D. Goulson. 2017. « The Combined Effects of a Monotonous Diet and Exposure to Thiamethoxam on the Performance of Bumblebee Micro-Colonies ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139: 194-201.
- Danforth, Bryan N. et al. 2013. « The Impact of Molecular Data on Our Understanding of Bee Phylogeny and Evolution ». *Annual Review of Entomology* 58(1): 57-78.
- Danforth, Bryan N., Sedonia Sipes, Jennifer Fang, et Seán G. Brady. 2006. « The history of early bee diversification based on five genes plus morphology ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(41): 15118-23.
- Engel, P., et N.A. Moran. 2013. « The Gut Microbiota of Insects - Diversity in Structure and Function ». *FEMS Microbiology Reviews* 37(5): 699-735.
- Engel, Philipp, Vincent G. Martinson, et Nancy A. Moran. 2012. « Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(27): 11002-7.
- Evans, Lisa J., et Nigel E. Raine. 2014. « Changes in Learning and Foraging Behaviour within Developing Bumble Bee (*Bombus Terrestris*) Colonies ». *PLoS ONE* 9(3): e90556.
- Gallai, Nicola, Jean-Michel Salles, Josef Settele, et Bernard E. Vaissière. 2009. « Economic Valuation of the Vulnerability of World Agriculture Confronted with Pollinator Decline ». *Ecological Economics* 68(3): 810-21.
- Gaspar, H. et al. 2022. « Impact of Local Practices and Landscape on the Diversity and Abundance of Pollinators in an Insect-Dependent Crop ». *Agriculture, Ecosystems and Environment* 326.
- Génissel, A. et al. 2002. « Influence of Pollen Origin on Performance of *Bombus Terrestris* Micro-Colonies ». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104(2-3): 329-36.
- Ghosh, S., V.B. Meyer-Rochow, et C. Jung. 2021. « Honey Bees and Their Brood: A Potentially Valuable Resource of Food, Worthy of Greater Appreciation and Scientific Attention ». *Journal of Ecology and Environment* 45(1).
- Ghosh, Sampat, et Chuleui Jung. 2020. « Changes in Nutritional Composition from Bee Pollen to Pollen Patty Used in Bumblebee Rearing ». *Journal of Asia-Pacific Entomology* 23(3): 701-8.
- Goulson, Dave. 2003. *Bumblebees: Their Behaviour and Ecology*. Oxford University Press.
- Govaerts, et X. Draye. 2021. « Biométrie : BIRC2101 ». Présenté à UCLouvain.
- Gradish, A. E., C. D. Scott-Dupree, A. D. Mcfarlane, et A. J. Frewin. 2013. « Too Much Work, Not Enough Tarsi: Group Size Influences *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) Worker Reproduction With Implications for Sublethal Pesticide Toxicity Assessments ». *Journal of Economic Entomology* 106(2): 552-57.
- de Groot, A. P. 1952. « Amino Acid Requirements for Growth of the Honeybee (*Apis Mellifica* L.) ». *Experientia* 8(5): 192-94.
- . 1953. « Protein and amino acid requirement of the honey bee ». *Oceol* 3(Fasc. 2 & 3,): 197-285.

- Grund-Mueller, N., F.A. Ruedenauer, J. Spaethe, et S.D. Leonhardt. 2020. « Adding amino acids to a sucrose diet is not sufficient to support longevity of adult bumble bees ». *Insects* 11(4).
- Guiraud, M. et al. 2021. « Higher Developmental Temperature Increases Queen Production and Decreases Worker Body Size in the Bumblebee *Bombus Terrestris* ». *Journal of Hymenoptera Research* 88: 39-49.
- Habay, Jean, et Jean-Luc Renneson. 2019. « Les bourdons et leur élevage ». 3(193).
http://insectes.xyz/pdf/i193-habay-renesson.pdf?fbclid=IwAR2O6YjHVq6BxuAHPp_oZ6WCV0cFuQdQeyyzC92cWtuwRXq7STbdjBcpNAI (7 juin 2022).
- Heinrich, Bernd. 2004. *Bumblebee Economics*. Harvard University Press.
- Hines, Heather M. 2008. « Historical Biogeography, Divergence Times, and Diversification Patterns of Bumble Bees (Hymenoptera: Apidae: Bombus) ». *Systematic Biology* 57(1): 58-75.
- Holland, Jacob G., et Andrew F. G. Bourke. 2015. « Colony and Individual Life-History Responses to Temperature in a Social Insect Pollinator ». *Functional Ecology* 29(9): 1209-17.
- Hrassnigg, Norbert, et Karl Crailsheim. 2005. « Differences in Drone and Worker Physiology in Honeybees (*Apis Mellifera*) ». *Apidologie* 36(2): 255-77.
- Imdorf, Anton et al. 1998. « Nitrogen and Mineral Constituents of Honey Bee Worker Brood during Pollen Shortage ». *Apidologie* 29(4): 315-25.
- Imran, Muhammad et al. 2017. « Are Colony Developmental Stages of Bumblebee *Bombus Terrestris* ». https://www.academia.edu/33682830/Are_colony_developmental_stages_of_bumblebee_Bombus_terrestris (6 août 2021).
- Jack, Cameron J., Sai Sree Uppala, Hannah M. Lucas, et Ramesh R. Sagili. 2016. « Effects of Pollen Dilution on Infection of *Nosema Ceranae* in Honey Bees ». *Journal of Insect Physiology* 87: 12-19.
- King, Marcus J. 1993. « Buzz foraging mechanism of bumble bees ». *Journal of Apicultural Research* 32(1): 41-49.
- Klinger, Ellen G et al. 2019. « *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) Microcolonies as a Tool for Biological Understanding and Pesticide Risk Assessment ». *Environmental Entomology* 48(6): 1249-59.
- Koch, Hauke, et Paul Schmid-Hempel. 2011a. « Bacterial Communities in Central European Bumblebees: Low Diversity and High Specificity ». *Microbial Ecology* 62(1): 121-33.
- . 2011b. « Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(48): 19288-92.
- Konzmann, Sabine, et Klaus Lunau. 2014. « Divergent Rules for Pollen and Nectar Foraging Bumblebees – A Laboratory Study with Artificial Flowers Offering Diluted Nectar Substitute and Pollen Surrogate ». *PLOS ONE* 9(3): e91900.
- Kozmus, P., M. Virant-Doberlet, V. Meglič, et P. Dovč. 2011. « Identification of *Bombus* Species Based on Wing Venation Structure ». *Apidologie* 42(4): 472-80.

- Kraus, S. et al. 2019. « Bumblebees adjust protein and lipid collection rules to the presence of brood ». *Current Zoology* 65(4): 437-46.
- Kwong, Waldan K., et Nancy A. Moran. 2016. « Gut Microbial Communities of Social Bees ». *Nature reviews. Microbiology* 14(6): 374-84.
- Larondelle, Yvan, et Cathy Debier. 2021. « Physiological and Nutritional Biochemistry : LBRAL 2102 ». Présenté à UCLouvain.
- Laycock, Ian, Kate M. Lenthall, Andrew T. Barratt, et James E. Cresswell. 2012. « Effects of Imidacloprid, a Neonicotinoid Pesticide, on Reproduction in Worker Bumble Bees (*Bombus Terrestris*) ». *Ecotoxicology* 21(7): 1937-45.
- Leonhardt, Sara Diana, et Nico Blüthgen. 2012. « The Same, but Different: Pollen Foraging in Honeybee and Bumblebee Colonies ». *Apidologie* 43(4): 449-64.
- Malvy, Claude, et Maram Caesar. 2022. « Structure et fonctions des protéines ». *eBiologie*. https://www.ebiologie.fr/cours/s/163/structure-et-fonction-des-proteines?fbclid=IwAR0dz8yVclq89On2nyPAvhk6jVsHriP06g_Mefw_O45BbtSX0ouljj-ukvE (7 juin 2022).
- McAulay, M. K., et J. R. K. Forrest. 2019. « How Do Sunflower Pollen Mixtures Affect Survival of Queenless Microcolonies of Bumblebees (*Bombus Impatiens*)? » *Arthropod-Plant Interactions* 13(3): 517-29.
- McKinstry, Mia, Sofia R. Prado-Irwin, Tara Reyes Adames, et Jonathan W. Snow. 2020. « Retained Metabolic Activity in Honey Bee Collected Pollen Has Implications for Pollen Digestion and Effects on Honey Bee Health ». *Apidologie* 51(2): 212-25.
- Meeus, I. et al. 2021. « Reduced Nest Development of Reared *Bombus Terrestris* within Apiary Dense Human-Modified Landscapes ». *Scientific Reports* 11(1).
- Michener, Charles D. 1990. « Classification of the Apidae (Hymenoptera) ». *The University of Kansas Science Bulletin*: 91.
- Michez, Denis, Pierre Rasmont, Michaël Terzo, et Nicolas Vereecken. 2019. 1 *Abeilles d'Europe*. N.A.P.
- Millard, J. et al. 2021. « Global Effects of Land-Use Intensity on Local Pollinator Biodiversity ». *Nature Communications* 12(1).
- Moerman, Romain, Maryse Vanderplanck, et al. 2016. « Growth Rate of Bumblebee Larvae is Related to Pollen Amino Acids ». *Journal of Economic Entomology* 109(1): 25-30.
- Moerman, Romain, Nathalie Roger, et al. 2016. « Interspecific Variation in Bumblebee Performance on Pollen Diet: New Insights for Mitigation Strategies ». *PLOS ONE* 11(12): e0168462.
- Nicolson, Susan Wendy, et Hannelie Human. 2013. « Chemical Composition of the 'Low Quality' Pollen of Sunflower (*Helianthus Annuus*, Asteraceae) ». *Apidologie* 44(2): 144-52.
- Nieto, Ana et al. 2014. *European Red List of Bees*. LU: Publications Office of the European Union. <https://data.europa.eu/doi/10.2779/77003> (29 avril 2022).

- Ollerton, Jeff. 2017. « Pollinator Diversity: Distribution, Ecological Function, and Conservation ». *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 48(1): 353-76.
- Ollerton, Jeff, Hilary Erenler, Mike Edwards, et Robin Crockett. 2014. « Extinctions of Aculeate Pollinators in Britain and the Role of Large-Scale Agricultural Changes ». *Science* 346(6215): 1360-62.
- Paoli, Pier P., Luisa A. Wakeling, Geraldine A. Wright, et Dianne Ford. 2014. « The Dietary Proportion of Essential Amino Acids and Sir2 Influence Lifespan in the Honeybee ». *AGE* 36(3): 9649.
- Peat, James, et Dave Goulson. 2005. « Effects of Experience and Weather on Foraging Rate and Pollen versus Nectar Collection in the Bumblebee, *Bombus Terrestris* ». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58(2): 152-56.
- Pollenergie. 2022. « Pollen Châtaigner ronce ». (1/2): 2.
- Rasmont, Pierre, Audrey Coppee, Denis Michez, et Thibaut De Meulemeester. 2008. « An Overview of the *Bombus Terrestris* (L. 1758) Subspecies (Hymenoptera: Apidae) ». *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)* 44(2): 243-50.
- Rasmont, Pierre, et Michaël Terzo. 2010. « Catalogue et clé des sous-genres et espèces du genre *Bombus* de Belgique et du nord de la France (Hymenoptera, Apoidea) ». 2e édition: 29.
- Raymann, Kasie, et Nancy A Moran. 2018. « The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers ». *Current opinion in insect science* 26: 97-104.
- Reid, Walter et al. 2005. « Ecosystem and Human Well-Being - Synthesis ». *UNEP - UN Environment Programme*. <http://www.unep.org/resources/report/ecosystem-and-human-well-being-synthesis> (29 avril 2022).
- Riesell, L., A. Hilpert, et S.D. Leonhardt. 2017. « Different but the Same: Bumblebee Species Collect Pollen of Different Plant Sources but Similar Amino Acid Profiles ». *Apidologie* 48(1): 102-16.
- Roger, N. et al. 2017. « Diet effects on bumblebee health ». *Journal of Insect Physiology* 96: 128-33.
- Roulston, T.H., et J.H. Cane. 2002. « The Effect of Pollen Protein Concentration on Body Size in the Sweat Bee *Lasioglossum Zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes) ». *Evolutionary Ecology* 16(1): 49-65.
- Ruedenauer, F.A., J. Spaethe, et S.D. Leonhardt. 2015. « How to Know Which Food Is Good for You: Bumblebees Use Taste to Discriminate between Different Concentrations of Food Differing in Nutrient Content ». *Journal of Experimental Biology* 218(14): 2233-40.
- Ryder, J.T., A. Cherrill, H.M. Thompson, et K.F.A. Walters. 2021. « Lower Pollen Nutritional Quality Delays Nest Building and Egg Laying in *Bombus Terrestris* Audax Micro-Colonies Leading to Reduced Biomass Gain ». *Apidologie* 52(6): 1033-47.
- Sadd, Ben M. 2011. « Food-Environment Mediates the Outcome of Specific Interactions Between a Bumblebee and Its Trypanosome Parasite ». *Evolution* 65(10): 2995-3001.
- Sauvion, Nicolas, Paul-André Calatayud, Denis Thiéry, et Frédéric Marion-Poll. 2013. *Interactions insectes-plantes*. Editions Quae.

- Simpson, Stephen J., David Raubenheimer, Stephen J. Simpson, et David Raubenheimer. 2012. « The Nature of Nutrition: A Unifying Framework ». *Australian Journal of Zoology* 59(6): 350-68.
- Somme, Laurent et al. 2015. « Pollen and Nectar Quality Drive the Major and Minor Floral Choices of Bumble Bees ». *Apidologie* 46(1): 92-106.
- Stabler, Daniel, Pier P. Paoli, Susan W. Nicolson, et Geraldine A. Wright. 2015. « Nutrient balancing of the adult worker bumblebee (*Bombus terrestris*) depends on the dietary source of essential amino acids ». *Journal of Experimental Biology* 218(5): 793-802.
- Streinzer, Martin, et Johannes Spaethe. 2014. « Functional Morphology of the Visual System and Mating Strategies in Bumblebees (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*): *Bombus* Compound Eye Morphology ». *Zoological Journal of the Linnean Society* 170(4): 735-47.
- Tasei, Jean-Noël, et Pierrick Aupinel. 2008. « Nutritive Value of 15 Single Pollens and Pollen Mixes Tested on Larvae Produced by Bumblebee Workers (*Bombus Terrestris*, Hymenoptera: Apidae) ». *Apidologie* 39(4): 397-409.
- Terra, Walter R., et Clelia Ferreira. 2020. « Evolutionary Trends of Digestion and Absorption in the Major Insect Orders ». *Arthropod Structure & Development* 56: 100931.
- Vanderplanck, Maryse et al. 2014. « How Does Pollen Chemistry Impact Development and Feeding Behaviour of Polylectic Bees? » *PLOS ONE* 9(1): e86209.
- Vaudo, A.D. et al. 2016. « Bumble bees regulate their intake of essential protein and lipid pollen macronutrients ». *Journal of Experimental Biology* 219(24): 3962-70.
- Vaudo, Anthony D. et al. 2020. « Pollen Protein: Lipid Macronutrient Ratios May Guide Broad Patterns of Bee Species Floral Preferences ». *Insects* 11(2): 132.
- Vollet-Neto, A. et al. 2018. « Recent Advances in Reproductive Biology of Stingless Bees ». *Insectes Sociaux* 65(2): 201-12.
- Weidenmüller, Anja, Christoph Kleineidam, et Jürgen Tautz. 2002. « Collective Control of Nest Climate Parameters in Bumblebee Colonies ». *Animal Behaviour* 63(6): 1065-71.
- Willard, Laura Evins, Ashley Maria Hayes, Megan Ann Wallrichs, et Olav Rueppell. 2011. « Food Manipulation in Honeybees Induces Physiological Responses at the Individual and Colony Level ». *Apidologie* 42(4): 508-18.
- Williams, Paul H. et al. 2008. « A Simplified Subgeneric Classification of the Bumblebees (Genus *Bombus*) ». *Apidologie* 39(1): 46-74.
- Wood, Thomas J. et al. 2021. « Global Patterns in Bumble Bee Pollen Collection Show Phylogenetic Conservation of Diet ». *Journal of Animal Ecology* 90(10): 2421-30.
- Yoon, Hyung Joo, Sam Eun Kim, et Young Soo Kim. 2002. « Temperature and humidity favorable for colony development of the indoor-reared bumblebee, *Bombus ignitus* ». *Applied Entomology and Zoology* 37(3): 419-23.
- Zhao, Jikai, Donghai Wang, et Yonghui Li. 2021. « Proteins in Dried Distillers' Grains with Solubles: A Review of Animal Feed Value and Potential Non-Food Uses ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 98(10): 957-68.

7 ANNEXE

7.1 ANNEXE 1

Prise alimentaire de pains de pollen par ouvrière [g] à intervalle de 2-3 jours [J], prenant en compte l'évaporation de l'aliment, pour les six régimes alimentaires (T_0 , $T_{0.5}$, Z_a , $Z_{a0.5}$, Z_0 et C_0).

	J2	J7	J10	J12	J14	J16	J19	J22	J24	J27	J30	J32
$T_{(0)}$	0.86 ± 0.016	0,036 ± 0.0092	0,029 ± 0.012	0,031 ± 0.005	0,033 ± 0.0026	0,032 ± 0.0078	0,033 ± 0.0087	0,0406 ± 0.012	0,054 ± 0.034	0,043 ± 0.012	0,043 ± 0.04	0,0502 ± 0.0098
$T_{(0.5)}$	0.76 ± 0.0203	0,071 ± 0.0048	0,091 ± 0.012	0,12 ± 0.019	0,11 ± 0.0096	0,107 ± 0.145	0,12 ± 0.0305	0,15 ± 0.043	0,13 ± 0.036	0,22 ± 0.13	0,21 ± 0.19	0,14 ± 0.017
$Z_{(a)}$	0.242 ± 0.053	0,064 ± 0.0064	0,062 ± 0.0041	0,21 ± 0.11	0,22 ± 0.12	0,19 ± 0.14	0,29 ± 0.0303	0.34	0	0	0	0
$Z_{(a0.5)}$	0.35 ± 0.004	0,069 ± 0.0005	0,067 ± 0.0098	0,072	0,076	0,086	0.35	0	0	0	0	0
$Z_{(0)}$	0.83 ± 0.082	0,096 ± 0.032	0,096 ± 0.032	0,077 ± 0.0088	0,14 ± 0.07	0,066 ± 0.035	0,14 ± 0.071	0.19 ± 0.053	0,19 ± 0.047	0,3 ± 0.102	0,47 ± 0.034	0
$C_{(0)}$	0.91 ± 0.096	0,061 ± 0.0033	0,088 ± 0.059	0,088 ± 0.042	0,087 ± 0.068	0,12 ± 0.11	0,11 ± 0.064	0,103 ± 0.059	0,075 ± 0.022	0,11 ± 0.066	0,12 ± 0.0054	0,1 ± 0.057

Etude des besoins nutritionnels en lysine pour l'espèce *Bombus terrestris*

Charlotte Ward

Résumé

Depuis plusieurs décennies, la communauté mondiale d'insectes pollinisateurs ne cesse de diminuer. Les fragmentations d'habitats ainsi que la diminution des ressources florales sont entre autres les causes principales. Les Apidés se nourrissent principalement de nectar, source de glucides, et de pollen, source de lipides et de protéines. Les protéines alimentaires sont essentielles pour le maintien des fonctions somatiques et de reproduction des abeilles adultes, ainsi que pour la croissance des larves. Cependant, leurs besoins nutritionnels sont encore peu connus.

Afin d'approfondir les connaissances des besoins nutritionnels en lysine de l'espèce *Bombus terrestris*, deux séries d'expériences ont été réalisées. Les essais en laboratoire ont été menés à 26°C sur des microcolonies composées de cinq ouvrières.

La première expérience pour développer un protocole expérimental en laboratoire, a montré que les régimes alimentaires artificiels, sans pollen, n'étaient pas supportés par les bourdons.

La deuxième expérience a pour but de quantifier les besoins nutritionnels du *Bombus terrestris* en lysine, en substituant le pollen de saule par deux protéines, la zéine et la caséine, auxquelles différentes teneurs en lysine ont été ajoutées. Ceci afin d'évaluer l'impact de cet acide aminé sur le développement des microcolonies *Bombus terrestris*.

Les résultats montrent que le taux minimum de lysine dans le régime alimentaire doit être de 0.4%, lorsqu'elle est sous forme protéique, ou de 3.9%, lorsqu'elle est sous forme libre, afin d'assurer un développement maximal des microcolonies de l'espèce *Bombus terrestris*.