



Influence de l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L.

Garance Di Pasquale

► To cite this version:

Garance Di Pasquale. Influence de l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L.. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2014. Français. <NNT : 2014AVIG0664>. <tel-01162055>

HAL Id: tel-01162055

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01162055>

Submitted on 9 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

Ecole Doctorale 536 « Agro-sciences et Sciences »

Présentée et soutenue publiquement par :
Garance Di Pasquale
Le 1 décembre 2014 à Avignon

**INFLUENCE DE L'ALIMENTATION POLLINIQUE SUR LA
SANTÉ DE L'ABEILLE DOMESTIQUE,
*APIS MELLIFERA L.***

Directeurs de thèse :
Yves Le Conte et Luc Belzunces

Co-encadrants :
Axel Decourtye et Cédric Alaux

Membres du jury

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directeur
Co-directeur

Mr. Mike BROWN
Pr. Frédéric DELBAC
Pr. Mohamed EL MAATAOUI
Mr. Jean-Daniel CHARRIERE
Dr. Yves LE CONTE
Dr. Luc BELZUNCES

APHA, Angleterre
Université Blaise Pascal, France
Université d'Avignon, France
Agroscope, Suisse
INRA d'Avignon, France
INRA d'Avignon, France



Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont permis de finaliser cette thèse.

L'avantage, et l'inconvénient, de travailler sur une étude transversale au sein d'une UMT, est d'avoir quatre chefs spécialisés dans des domaines différents. Cela m'a permis d'apprendre un petit peu de vous tous, de m'enrichir et de me former, pour pouvoir faire face à tous les cas de figure auxquels un jeune chercheur peut être confronté. Je remercie mes directeurs de thèse **Yves Le Conte** et **Luc Belzunces** pour leurs conseils et leur aide durant ces années. Merci à mes deux encadrants **Axel Decourtye** et **Cédric Alaux** qui ont su donner de leur personne pour m'aider dans cette lourde tâche qu'est la thèse, et dont les remarques et conseils ont toujours été très avisés et très bénéfiques. Je remercie tout particulièrement Cédric sans qui je pense, j'aurais eu beaucoup de mal à finir ces trois années debout, et qui a dû supporter mes moments de doute, de crainte et de larmes. Tu es pour moi plus qu'un « chef », je t'adore, et je te suis très reconnaissante pour tous nos moments, professionnels et personnels.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé à faire les expérimentations, les analyses de données et la rédaction des publications, notamment **Séverine Suchail, André Kretzschmar, et Maryline Pioz**, et les petites mains **Martin Le Conte, Claire Le Conte, et Claire Belzunces**.

Merci à **Jean-François Odoux** d'avoir participé à mon comité de thèse, aux remarques très intéressantes et appliquées que tu m'as donné, et à l'opportunité d'avoir pu contribuer au grand protocole expérimental mené au Magneraud avec l'apport de vos pollens dans mon étude.

Je remercie les membres du jury, **Mike Brown, Frédéric Delbac** (mes deux rapporteurs qui n'ont pas été ménagé au niveau des délais de relecture et de soutenance orale), **Jean-Daniel Charrière** et **Mohamed El Maataoui** pour l'attention porté à mon travail.

Cette étude a été financée par un programme Européen de soutien à l'apiculture et une bourse CIFRE (ANRT) avec l'ACTA. Je remercie les financeurs, ainsi que les membres de l'ACTA, notamment

Philippe Vissac, Sandrine Huet, Marianne Sellam, Violaine Lejeune, Marie-Florence Arzeux et

surtout **Claudine Martin** pour leur aide face à mon désarroi administratif.

Merci aux professeurs de l'Université d'Avignon qui m'ont permis d'obtenir des heures de TP-TD en Ecologie et Accompagnement au projet de formation et professionnel, et notamment **Christophe Mazzia** et **Caroline Martin**.

Merci à toutes les personnes du laboratoire **Abeilles et Environnement** pour leur accueil durant ces années pleines de moments forts. Les occasions de manger des gâteaux, pique-nique, ou repas tous ensembles n'ont pas manqués, et ça restera de très bons souvenirs, avec photos à l'appui. Je n'oublierai pas l'équipe Toxicologie avec la maman, **Sylvie Tchamitchian**, qui fait le meilleur café et qui est une source intarissable d'histoires en tout genre ; et l'oncle blagueur, **Jean-Luc Brunet**, le roi des chemises colorées, qui m'aura donné tous les surnoms possibles et inimaginables, dont mes préférés resteront « Samantha ous », et « la boulette ». Je suis désolée Jean-Luc, mais tu vas devoir tirer un trait sur ton foret... ☺. Merci à **l'équipe pollinisation** pour les goûters et les nombreuses conversations, je me suis toujours sentie la bienvenue dans votre bâtiment qui représente une jolie petite famille. Merci au papa de cette famille, **Bernard Vaissière** qui représente exactement ce que j'imagine et aime chez un chercheur (même s'il en arrive à me réveiller à 6h du matin en pensant appeler l'astreinte de nuit... Mais c'est vrai qu'avec tout ce temps passé au labo, je pense connaître tous les recoins mieux que personne). Enfin, il y a l'aile du labo plus appliquée, l'UMT, ceux qu'on ne voit pas trop en été car ils mouillent la chemise sur les ruchers, **Alban, Julien, Maxime, Cyril**, merci pour ces bons moments, le plus souvent autour d'un café ou d'un verre.

Passer trois ans avec les mêmes personnes permet aussi de créer des liens, et certaines personnes sont devenues plus que des collègues. A vous, je vous dis particulièrement merci d'avoir été là, et d'avoir fait que ce lieu de travail où j'ai passé la plus grande partie de mon temps, devienne une maison dans laquelle je me sens bien et qui me manquera.

Merci aux tricoteuses, régulières **Marianne, Corinne, Brigitte**, ou temporaires, avec qui on a échangé des moments bien féminins : laine, bouffes et potins. Je vous adore...même si je ne peux plus voir les écharpes et les chaussons en peinture ☺.

Guy Rodet, tu fais aussi partie de cette catégorie, car tu as été mon « soleil » tout au long de ces trois années. Tu as toujours été à l'écoute, tu m'as réconfortée, changé les idées, et même aidée à disséquer en période de grosse pression. Pour tout ça, je te remercie, tu es vraiment une belle personne. Merci aux thésards, **Fanny, Térésa**, mais surtout **Yannick** et **Guillaume** avec qui nous avons partagé des supers soirées et pauses-café, souvent accompagnées de repas très diététiques, plus rapides à consommer en période de manips. Merci à tous les gens de passage dans le labo, **Anne-laure, Marie, Marc**, avec qui j'ai pu parler d'autre chose que du boulot, ce qui représente vraiment une bouffée d'air frais au cours de la thèse. Vous me manquerez beaucoup !!!

Le plus grand des mercis revient à **Laura Fortel** et **Orianne Rollin**, mes deux sœurs de thèse, avec qui nous avons tout traversé, et qui ont été un réel soutien durant les meilleurs comme les pires moments, et surtout sur la fin. Tellement de choses et d'anecdotes me viennent à l'esprit quand je pense à vous deux. Je suis heureuse de pouvoir dire qu'on partagera aussi l'après-thèse, chômage, atelier bricolo-bricolette, et tisanes... ☺.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités ici mais qui ont eu leur rôle dans cette aventure.

Merci à mes amis de longue date qui connaissent la difficulté de la thèse, **Emilie, PAF**, ou non, **Lili, Sandra, Andréa, Rebecca, Audrey F et Audrey P, Hassiba, Morgane, Mandy, Rog, Romain**, mais qui ont toujours été là pour me soutenir et me changer les idées malgré mes sautes d'humeur et périodes de stress, ou juste pour faire la fête.

Pour finir, je remercie ma famille, ma plus grande force, qui a toujours cru en moi, plus que moi-même, et qui m'a toujours soutenue quoi qu'il arrive. Mes deux sœurs, **Oriane** et **Ambre**, vous m'avez prouvé que nous sommes des battantes et vos deux exemples me le prouvent tous les jours. Ambre, tu es celle qui me connaît le mieux, on a toujours tout partagé, tu es même devenue ma collègue de boulot... Je te remercie d'être là, et de m'avoir offert le plus beau des cadeaux... **Bianca**. Merci à mes **cousins-cousines** et **oncles** et **tantes** qui croient en moi et m'ont reboosté par leur amour sur la dernière ligne droite (spéciale dédicace à mon « **pigeon** » préféré qui me soutient tous les jours par ses messages ou sa présence ☺). Enfin, mes **parents**, et notamment mon **père** qui a souvent été là au téléphone, pour me remonter le moral, car il savait mieux que moi-même que j'étais capable d'aller jusqu'au bout. Je vous aime et vous remercie tout simplement d'être là.

A mon **grand-père**...

Sommaire

Présentation générale

11

Chapitre 1 : Introduction générale	15
I- La nutrition	17
II- L'abeille domestique comme modèle d'étude	18
III- L'alimentation de l'abeille domestique	20
A- <u>Le nectar / le miel, une source d'énergie</u>	20
B- <u>Le pollen, élément indispensable au développement de l'abeille</u>	21
<i>La composition du pollen</i>	21
<i>Les besoins en pollen de l'abeille domestique</i>	22
<i>Deux types de ressources florales disponibles pour l'abeille</i>	23
<i>Les effets du manque de pollen sur l'abeille domestique</i>	24
<i>Les pollens ont des valeurs nutritionnelles différentes de par leur composition</i>	25
<i>Les abeilles consomment préférentiellement des mélanges de pollen</i>	26
<i>Les besoins de l'abeille en eau</i>	27
<i>Le devenir des aliments</i>	28
IV- Dans l'environnement, l'abeille est soumise à des stress	30
<i>Modification des paysages par l'agriculture intensive</i>	30
<i>Présence de stressseurs biotiques dans les colonies</i>	30
<i>Intoxications par les pesticides</i>	31
<i>Autres facteurs possibles</i>	32
<i>Des causes multifactorielles</i>	32
Objectif et problématiques	35
 Chapitre 2 : Pollen dearth and poor-quality pollen affect longevity and nursing ability of honeybees in intensive agricultural landscapes	 39
Avant-propos du chapitre 2	41
Abstract	42
1- Introduction	43
2- Materials and methods	45
Bee rearing	45
<i>Influence of pollen shortage on nurse worker physiology and survival</i>	45
<i>Influence of "seasonal" diversity and quality of pollen mixes on nurse worker physiology and survival</i>	46
Physiological analysis	47
Statistical analysis	48
 3- Results	 48
<i>Influence of pollen shortage on nurse worker physiology and survival</i>	48

<i>Influence of “seasonal” diversity and quality of pollen mixes on nurse worker physiology and survival</i>	50
4- Discussion	54
<i>Influence of pollen dearth on nurse worker physiology and survival</i>	54
<i>Influence of “seasonal” diversity and quality of pollen mixes on nurse worker physiology and survival</i>	55
Annexes du chapitre 2	57
Chapitre 3: Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter?	61
Avant-propos du chapitre 3	63
Abstract	65
1- Introduction	66
2- Materials and methods	68
Pollen diet composition and nutritional factors	68
Bee rearing and feeding	69
<i>Influence of pollen quality and diversity on bee nurse physiology</i>	70
Development of hypopharyngeal glands	70
Abdomen gene expression	70
<i>Influence of pollen quality and diversity on bee tolerance to Nosema ceranae</i>	71
Bee infection with Nosema ceranae	71
Enzyme analysis	72
Statistical analysis	72
3- Results	73
Pollen diet nutritional factors	73
<i>Influence of pollen quality and diversity on nurse bee physiology</i>	74
<i>Influence of pollen quality and diversity on bee tolerance to Nosema ceranae</i>	75
4- Discussion	80
Annexes du chapitre 3	85
Chapitre 4 : Les effets de Nosema ceranae et du pollen sur les capacités digestives de l’abeille domestique	89
Avant-propos du chapitre 4	91

Résumé	92
1- Introduction	93
2- Matériels et méthodes	94
Elevage des abeilles	94
<i>Influence de Nosema ceranae sur les capacités digestives de l'abeille</i>	95
Analyses enzymatiques	96
<i>Extraction</i>	96
<i>Dosages des activités protéolytiques</i>	96
Analyses statistiques	97
3- Résultats	97
4- Discussion	100
Annexes du chapitre 4	105
Chapitre 5 : Discussion-perspectives	108
I- Les effets de l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille	108
1.1- <u>Importance des paramètres caractérisant les apports en pollen et hypothèses sur les mécanismes sous-jacents</u>	
108	
1.2- <u>Extrapolation à l'échelle coloniale</u>	109
1.2.1- <i>Les pollens de cultures à floraisons massives</i>	
109	
1.2.2- <i>Les pollens de fleurs sauvages</i>	111
1.2.3- <i>La résistance au parasite Nosema</i>	
113	
II- Solutions pour améliorer l'alimentation de l'abeille mellifère	114
2.1- <u>Mesures agro-écologiques</u>	114
2.1.1- <i>Une diversité d'habitats semi naturels</i>	
114	
2.1.2- <i>L'utilisation d'espèces végétales abondantes et de qualité</i>	
117	
2.2- <u>Alimentations d'appoint</u>	119
2.2.1- <i>Les suppléments protéiques, une solution efficace ?</i>	
119	
2.2.2- <i>Pollen frais versus pain d'abeille</i>	

Références bibliographiques	125
Annexes	147

Présentation générale

La société d'abeilles domestiques, *Apis mellifera* L., possède une structure sociale au sein de laquelle interagissent des dizaines de milliers d'individus. Il est évident que le comportement, la santé, et la survie de chaque individu ont un impact sur le développement et l'espérance de vie de la colonie toute entière. L'alimentation (nectar, pollen) fournit à l'individu les nutriments essentiels à son développement, ses défenses immunitaires, et sa survie. L'alimentation pollinique représente une ressource essentielle pour la santé de l'abeille en apportant notamment les protéines, les lipides et les vitamines. La collecte de pollens par les butineuses et son stockage dans la ruche dépendent de la disponibilité des ressources florales dans l'aire de butinage des colonies. Les deux grands types de ressources florales dont dispose l'abeille sont les fleurs de plantes sauvages (herbacées et ligneuses) et cultivées. En fonction du climat, du paysage, et de la phénologie des plantes, les ressources florales conditionnant l'alimentation de l'abeille varient dans le temps et dans l'espace. L'intensification des

pratiques agricoles (simplification des successions végétales, raréfaction des éléments fixes paysagers) tend à uniformiser et réduire la flore disponible.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'abondance, de la qualité, et de la diversité des ressources polliniques sur la santé de l'abeille. L'irrégularité et l'abondance en pollens récoltés par les colonies observées en zones de grandes cultures ont été reproduites dans des conditions de laboratoire en analysant des fonctions biologiques d'ouvrières soumises à un gradient de quantité de pollen monofloral consommée. La qualité des pollens a été révélée par leur composition en nutriments (lipides, protéines, acides aminés, etc...). La question de l'intérêt d'un régime pollinique polyfloral versus monofloral a également été posée. Puis, nous avons testé les effets de la quantité, de la qualité et de la diversité du pollen sur la physiologie et la survie d'abeilles nourrices soumises à un stresser biotique, *Nosema ceranae*. Enfin, nous avons essayé de déterminer l'impact de ce parasite sur les capacités digestives de l'abeille, et sur sa consommation en pollen.

La première partie de ce manuscrit, l'introduction, réalise une synthèse du contexte et de la problématique de cette thèse. Elle se conclut par un rappel de l'objectif de cette étude.

La seconde partie comprend un article scientifique sur les effets de la quantité, de la qualité, et de la diversité pollinique sur la physiologie d'abeilles nourrices (taille des glandes hypopharyngiennes, expression du gène de la *vitellogénine*) et sur leur survie. Elle fait une analyse des effets des pollens disponibles pour l'abeille en milieu agricole céréalier en tenant compte de la variabilité des pollens de grandes cultures et de fleurs sauvages, récoltés en conditions naturelles.

La troisième partie est composée d'un article publié dans Plos One, sur les effets de la qualité et de la diversité pollinique de fleurs sauvages sur la santé de l'abeille (taille des glandes hypopharyngiennes ; taux d'expression des gènes de la *vitellogénine* et de la transferrine ; activités d'enzymes impliquées dans l'immunité ou la détoxification ; et survie), et particulièrement sur sa tolérance face à un stresser biotique, le parasite *N. ceranae*.

La quatrième partie évalue les fonctions digestives de l'abeille soumise à la pression de *N. ceranae*. Pour cela, nous avons analysé l'effet du pollen sur les activités de trois enzymes digestives identifiées chez l'ouvrière, en présence du parasite *Nosema*.

Pour finir, la discussion générale donne une vision intégrative et synthétique de l'ensemble des résultats et leur contribution à répondre à notre hypothèse de recherche, qui est de déterminer les effets de l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille domestique. Suite à

nos travaux, des recherches complémentaires ont été menées sur les effets de suppléments protéiques sur la santé de l'abeille, ainsi que l'évaluation de la valeur nutritionnelle du pain d'abeille par rapport aux pelotes. Ces dernières sont développées comme perspectives dans le dernier chapitre.

Chapitre 1

Introduction générale

I- La nutrition

La disponibilité des nutriments dans l'environnement est un facteur clé de la croissance et de la survie des organismes. En effet, pour faire face aux dépenses engendrées par son métabolisme de base et sa thermorégulation, pour pouvoir se développer, et permettre les interactions entre tous les systèmes qui le constituent, tout organisme supérieur (métazoaires) a besoin d'énergie qu'il va puiser dans les nutriments. Ces derniers sont généralement classés en deux catégories, les macronutriments (glucides, protides, lipides) et les micronutriments (vitamines et minéraux). Leur digestion permet de transformer les macromolécules telles que

les sucres complexes, les protéines, et les graisses en molécules plus simples, que sont les sucres simples, les acides aminés et les acides gras, respectivement.

Chaque nutriment assure une fonction spécifique qui le rend indispensable notamment à l'équilibre énergétique de l'individu, les besoins de ce dernier variant avec l'âge, son stade de développement, ou bien son statut reproductif.

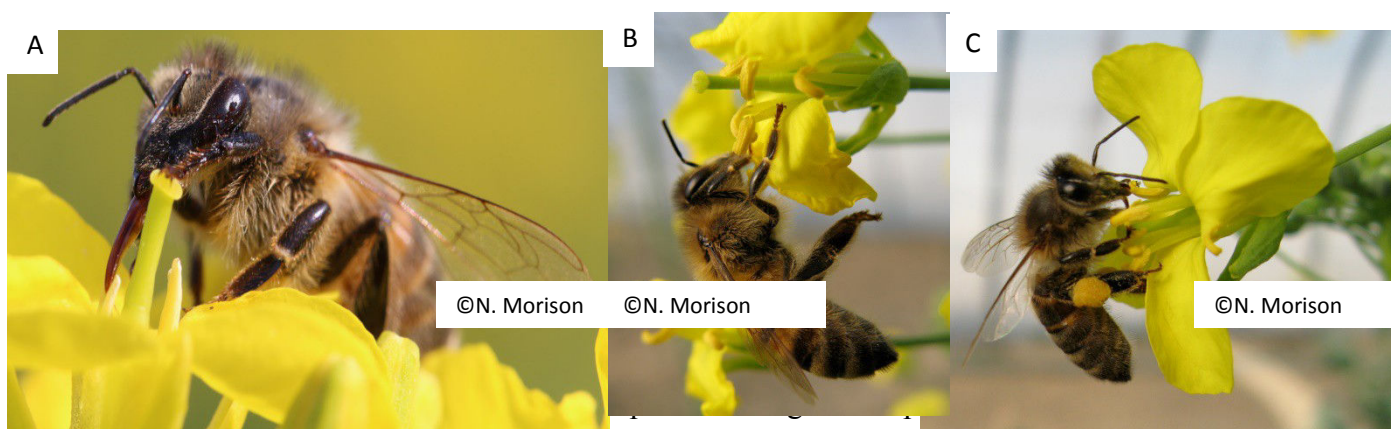
Les sucres représentent la principale source énergétique des animaux supérieurs. Ils permettent d'alimenter tous les organes responsables des fonctions vitales (cerveau, muscles, etc...). Seule source d'azote, les protéines sont indispensables à la vie. Elles contiennent principalement du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote. Elles sont constituées par des combinaisons ou des duplications d'acides aminés dont la place respective de chacun détermine la forme et la fonction particulière de chaque protéine. Parmi ces acides aminés, il existe ceux que l'organisme n'est pas capable de synthétiser, appelés « acides aminés essentiels », et qui doivent nécessairement être apportés par l'alimentation. Les nutriments et notamment les protéines servent à construire et à renouveler les structures cellulaires de l'individu. Elles contrôlent notamment l'expression des gènes, et la synthèse d'enzymes et d'hormones qui participent à différentes voies métaboliques. C'est aussi grâce à elles que l'individu peut se défendre contre les divers agents infectieux. Les acides gras sont des composants nécessaires des phospholipides dont dépendent l'intégrité de la structure et la fonction de presque toutes les membranes cellulaires internes et externes. Ils servent également à la synthèse des cires cuticulaires, de nombreuses phéromones et de composés de défense (Howard et Blomquist, 2005).

A l'inverse des macronutriments, les micronutriments représentent les nutriments nécessaires en petites quantités, voir traces, pour l'organisme. On recense notamment les vitamines, les sels minéraux, les oligoéléments et les stérols. Leurs rôles sont très variés (constitution des tissus, transferts de molécules, synthèse d'enzymes ou d'hormones, etc...) mais leurs présences sont indispensables à la bonne assimilation, transformation et utilisation des macronutriments.

Enfin, l'eau n'est pas considérée comme un nutriment mais doit être bien évidemment soulignée comme étant essentielle. En effet, elle participe à la thermorégulation, au système de transport et d'excrétion, aux réactions chimiques (glycolyse nécessaire à la production d'ATP (adénosine triphosphate), énergie servant notamment à la contraction musculaire), à la composition de tous les tissus, à la lubrification des articulations et des organes du système digestif.

II- L'abeille domestique comme modèle d'étude

L'abeille domestique, *Apis mellifera* L., est, de par de nombreux aspects, un modèle très intéressant pour étudier l'influence de la nutrition sur la santé et la survie des individus. Cette espèce appartient à la catégorie des insectes dits « sociaux ». Une société est un ensemble d'individus de la même espèce, vivant dans un même lieu, organisés en coopérant pour la division du travail, dans le but de survivre (Wilson, 1971). *A. mellifera* L. fait partie des insectes qui présentent les plus hauts degrés de socialité, les insectes « eusociaux ». Les individus de la même colonie coopèrent dans l'élevage des jeunes mais ne prennent pas tous part aux tâches reproductrices, des individus stériles (les ouvrières) travaillant au bénéfice d'un individu reproducteur (la reine) ; en outre deux générations d'individus peuvent se chevaucher et sont capables de contribuer ensemble au travail de la colonie (Michener, 1969). La récolte des réserves alimentaires a lieu non seulement pour les propres besoins de l'individu, mais aussi pour l'ensemble de la colonie, créant ainsi une forte dépendance de la santé et de la survie de la colonie aux ressources alimentaires. Or, l'abeille se nourrit presque exclusivement de nectar et de pollen qu'elle peut trouver dans les fleurs de plantes mellifères (plantes qui représentent un intérêt pour l'abeille). L'abeille est spécialisée à la récolte de ce type de ressources par ses caractéristiques morphologiques : un proboscis (langue) (Figure 1A) dont la pilosité et l'extrémité en forme de cuillère permettent de recueillir du nectar présent dans les nectaires des fleurs ; un jabot, petite poche formée par un renflement de l'œsophage, servant de réservoir pour le nectar, et laissant à l'abeille la possibilité de régurgiter afin de composer les réserves de la colonie ; et des pattes (Figure 1B et C) permettant la récupération des grains de pollen et le stockage sous forme de pelotes dans des corbeilles à pollen.



assimiler les nutriments de manière optimale (Schmidt et Buchman, 1985).

Toutefois, l'accès aux ressources trophiques est variable dans le temps et dans l'espace et l'abeille domestique peut butiner à de grandes distances de la ruche. De plus, les plantes

mellifères dont l'abeille dispose varient en fonction de la localisation du rucher et de la saison. Beekman et Ratnieks (2000) ont déterminé grâce à l'étude de la danse des butineuses qui retournaient à la ruche que certaines butineuses parcouraient 6 km, voire plus de 9 km pour récolter du pollen. Cependant, dans la majorité des situations, les butineuses restent à une distance de 5 km autour de la ruche (Beekman et Ratnieks, 2000 ; Steffan-Dewenter et Kuhn, 2003 ; Odoux *et al.*, 2009). La structure du paysage a une incidence sur l'abondance, la taille, la qualité et la diversité des ressources florales disponibles pour une colonie d'abeilles. Un paysage complexe avec une grande diversité d'habitats, dont des éléments fixes (tels que les arbres) semi-naturels en forte proportion, doit assurer un approvisionnement plus continu en nectar et pollen que les paysages structurellement simples, moins riches en éléments fixes (Beekman et Ratnieks, 2000; Steffan-Dewenter *et al.*, 2002).

Alors que l'abeille est inféodée aux ressources florales, de grandes variations dans la disponibilité, en termes de quantité, qualité ou diversité des ressources peuvent avoir de fortes conséquences sur l'organisation, le développement et la survie des abeilles. Or les colonies d'abeilles domestiques connaissent aujourd'hui une surmortalité et de fréquents affaiblissements. En France, ce syndrome se caractérise par des mortalités hivernales qui dépassent largement les 10 % de mortalités considérés comme acceptables (Holzmann *et al.*, 2011). Il y a aussi des problèmes concernant les reines, qui survivraient deux fois moins longtemps qu'auparavant d'après les apiculteurs. Des pertes chez les colonies d'abeilles domestiques sont aussi observées aux Etats-Unis, sous le nom de « Colony Collapse Disorder ». Ce syndrome est caractérisé par une dépopulation de la ruche, avec la présence d'une reine, de couvain (oeufs, laves, nymphes) et de réserves alimentaires, mais absence de la population d'ouvrières correspondant à une telle colonie. L'hypothèse d'un facteur unique responsable de ces syndromes n'a pas pu être démontrée par la communauté scientifique. Les hypothèses actuelles reposent sur l'effet conjugué de stress biotiques et abiotiques, qui interagiraient ensemble (Van Engelsdorp *et al.*, 2009). L'hypothèse d'une nutrition de mauvaise qualité affectant la résistance des abeilles aux différents stress est également mise en avant (Van Engelsdorp *et al.*, 2008 ; Naug, 2009). En effet, la diminution de la biodiversité, liée notamment à la monoculture, a pour conséquence une réduction du nombre d'espèces de plantes disponibles et une irrégularité dans le temps des ressources présentes dans le milieu. Un déficit en terme d'abondance, de diversité et / ou de qualité des apports polliniques, peuvent affecter l'intégrité des fonctions vitales des colonies d'abeilles, se répercutant en cascade sur le fonctionnement des colonies.

III- L'alimentation de l'abeille domestique

A- Le nectar / le miel, une source d'énergie

L'abeille adulte se nourrit de miel. Les besoins pour une colonie sont estimés à 80 kg par an (in Winston, 1987). Une abeille adulte a besoin au minimum de 4 mg de sucres par jour pour survivre (Barker et Lehner, 1974), mais l'optimum pour fournir tout l'ATP nécessaire aux tâches journalières est de 11 mg de matière sèche de sucre par jour (Huang *et al.*, 1998). C'est par l'apport de miel que l'abeille comble ses besoins en carbohydrates pour le vol ou toute autre tâche nécessaire à la vie de la colonie (Figure 3). De même, Mao *et al.* (2013) ont déterminé que le miel pouvait contenir certaines substances telles que l'acide p-coumarique qui augmente l'expression de gènes de l'immunité et de détoxification. L'ouvrière butineuse récolte le nectar en fonction de sa richesse en sucres, son abondance, sa facilité d'accès, et la distance à parcourir pour le prélever. En laboratoire, les abeilles préfèrent les nectars contenant du saccharose, et dont les concentrations en sucres se situent entre 15 et 50 % (Waller, 1972), mais elles évitent ceux trop visqueux, difficiles à collecter. Le nectar des fleurs contient de 5 à 80 % de sucres, principalement du saccharose, glucose, et fructose (in Winston, 1987). L' α -méthyl glucoside, le maltose, le tréhalose, et le mélézitose ont aussi une valeur nutritionnelle pour l'abeille, tandis que les autres sucres n'apportent rien ou peu. Certains sucres comme le mannose, le galactose, ou le rhamnose sont connus pour être toxiques pour l'abeille (Von Friesch, 1934). Cela est une conséquence d'apports excédents la dégradation des sucres par l'organisme, qui va provoquer une sorte « d'overdose » de sucres ou de ses métabolites qui s'accumulent dans certains organes (Barker, 1977). Le nectar peut être consommé directement mais il est plus souvent concentré sous forme de miel (Maurizio, 1975). On distingue le nectar, produit par la plante, et le miel, élaboré par les abeilles à partir de celui-ci. Pour transformer le nectar en miel, les abeilles le placent dans des cellules et font évaporer l'eau qu'il contient par absorption-régurgitation puis ventilation, jusqu'à atteindre des quantités de moins de 18 % d'eau, afin d'éviter le développement de levures. Mais cette transformation est aussi due à l'action des enzymes (invertases, diastases, glucose oxydases) ajoutées au nectar par l'ouvrière lorsqu'elle l'ingurgite pour le transporter (Simpson, 1960). Les sucres complexes des nectars sont ainsi clivés en sucres simples, pour une meilleure assimilation et conservation. Les substances azotées formées par les acides aminés libres et les protéines sont très peu représentées dans le miel (0,26 %), tout comme la

proportion de lipides, de matières minérales (environ 0,1 %) ou de vitamines, qui proviennent le plus souvent de grains de pollens contenus dans le miel et non du nectar lui-même.

B- Le pollen, élément indispensable au développement de l'abeille

La composition du pollen

Le pollen a une composition variable, selon la plante dont il provient. Il contient généralement entre 6 et 28 % de protéines (inWinston, 1987) (ce chiffre pouvant aller de 2,5 à 61 % d'après Roulston *et al.* (2000)). Il contient entre 1 et 20 % de lipides selon qu'il provient de plantes anémophiles (dont le pollen est transporté par le vent), qui sont pauvres en lipides, ou de plantes entomophiles (dont le pollen est transporté par les insectes pollinisateurs), qui sont quant à elles plus riches, bien que leur composition en lipides ne dépasse que rarement les 5 % de la masse totale. Le pollen présente aussi des glucides, formés essentiellement de sucres (glucose, fructose, en quantité de l'ordre de 15 %) mais provenant en réalité du nectar utilisé par l'abeille pour façonner les pelotes de pollen. La plupart des grains de pollens contiennent moins de 0,5 % de stérols, les plus importants pour l'abeille semblant être le cholestérol et le 24-méthylène cholestérol (Svoboda *et al.*, 1980). Puis on retrouve des vitamines, notamment des vitamines des groupes B (indispensables pour la majorité des insectes d'après Dadd (1973)) et C, et des minéraux. De Groot (1953) a répertorié l'arginine, l'histidine, la lysine, le tryptophane, la phénylalanine, la méthionine, la thréonine, la leucine, l'isoleucine, et la valine comme les acides aminés essentiels pour le développement et la croissance de l'abeille. Ils sont présents dans la majorité des pollens en quantité variable.

Quand le pollen est ramené à la ruche sous forme de pelotes (Figure 2A), les abeilles y ajoutent grâce à leur « salive », des micro-organismes, des genres *Pseudomonas*, *Lactobacillus* et *Saccharomyces*, pour éviter sa germination tout en prévenant des attaques bactériennes (Pain et Maugenet, 1966). Lorsque le pollen est complètement fermenté, il est appelé « pain d'abeille » (Figure 2B). Il peut ainsi être digéré plus facilement par l'abeille, ou être stocké pendant des mois.

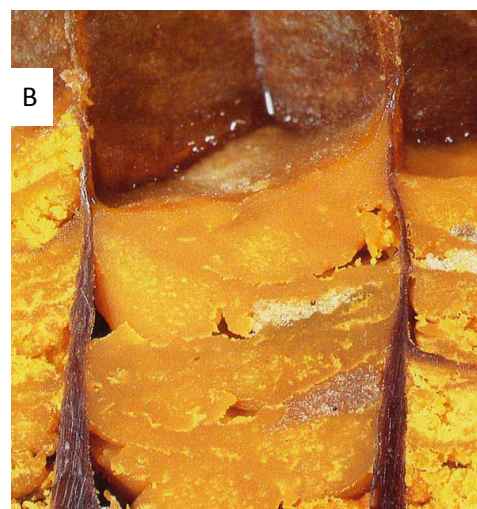


Figure 2: Pollen sous forme de pelotes en A, ou de pain d'abeille © Paul Starosta

Les besoins en pollen de l'abeille domestique

Le pollen, principale source de protéines, est indispensable à l'abeille adulte (Figure 3). Les besoins d'une colonie sont estimés entre 20 et 40 kg de pollen par an, tandis que la consommation individuelle est estimée à 3,4 - 4,3 mg de pollen par jour (Louveaux, 1954 ; Crailsheim *et al.*, 1992). Cependant, la consommation de pollen varie selon les colonies considérées en fonction de leur génotype (Free, 1980 ; Kulincevic et Rothenbuhler, 1989). Ce sont les abeilles dites « nourrices » qui consomment le plus de pollen (Pain et Maugenet, 1966 ; Crailsheim *et al.*, 1992). En effet, le rôle de nourrices incombe aux plus jeunes ouvrières présentes dans la ruche. Or, ce sont les jeunes abeilles qui consomment du pollen, et ce pendant une dizaine de jours après leur naissance (Hagedorn et Moeller, 1967). Cette consommation plus importante chez les jeunes abeilles se justifie de plusieurs façons : le pollen permet à l'abeille d'achever son développement, d'assurer la croissance des glandes hypopharyngiennes et la constitution de réserves lipidiques, augmentant les taux de *vitellogénine*, hormone produite dans les corps gras des abeilles.

Les nourrices sont chargées de nourrir et élever le couvain. Cependant, moins de 5 % des protéines apportées à ce dernier proviennent du pollen (Barbendreier *et al.*, 2004). Les 95 % restants, ainsi que la partie lipidique et les vitamines de la nourriture donnée aux larves, proviennent de sécrétions des glandes hypopharyngiennes des nourrices, appelées « gelée royale » (Patel *et al.*, 1960). Les larves reçoivent ainsi une alimentation mixte, composée de pollen, de miel et de gelée royale. La composition est différente en fonction de la caste d'appartenance de la larve. Pour élever une larve qui deviendra une ouvrière, la nourrice fournira de la gelée royale en quantité plus faible et pendant une durée plus limitée que pour une larve qui deviendra une reine. De même, l'alimentation de la reine se compose d'un mélange de miel et de gelée royale tout au long de sa vie. Cette nourriture lui est fournie par les abeilles dites « courtisanes », qui constituent un petit regroupement d'abeilles qui satisfont ses besoins. Ce partage de nourriture est appelé « trophallaxie ».

Deux types de ressources florales disponibles pour l'abeille

Le pollen provient de deux types de ressources florales, les fleurs de plantes sauvages et les fleurs de plantes cultivées. Odoux *et al.*, (2012) ont recensé les espèces de pollens récoltés par les colonies localisées sur une exploitation agricole dans l'ouest de la France. La contribution des différents habitats pour les pollens récoltés était de 62 % pour les grandes cultures, 32 % pour les zones boisées, 4 % provenant des prairies, et 1 % des jardins. Les abeilles de ce rucher ont donc prélevé du pollen de fleurs sauvages malgré la prédominance des pollens de cultures. De même, Requier (2013) a remarqué que les abeilles récoltaient des pollens d'espèces variées, et ce même durant les périodes de floraison des cultures massives. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Rollin *et al.* (2013) qui affirme que les abeilles domestiques, si elles sont le plus souvent observées sur des fleurs de cultures, sont tout de même présentes sur les fleurs sauvages qui poussent aux alentours.

Toutefois, la disponibilité et la valeur nutritionnelle de ces deux types de ressources varient dans le temps et dans l'espace, notamment avec l'intensification des paysages agricoles. En effet, l'agriculture intensive et la simplification des paysages qui l'accompagne réduisent la qualité de l'habitat à une échelle locale, tant d'un point de vue de la diversité que de la disponibilité des différentes ressources (Tschamtker *et al.*, 2005) (Figure 4). Cela a des conséquences néfastes sur la survie des abeilles (Biesmeijer *et al.*, 2006 ; Potts *et al.*, 2010 ; Garibaldi *et al.*, 2011).

Les effets du manque de pollen sur l'abeille domestique

D'après Mattila et Otis (2006), un déficit en pollen durant le stade larvaire peut influencer le comportement des abeilles nourrices qui en découleront. Mais ces analyses en plein champ ne permettent pas de transformer ces résultats en une généralité tant l'on observe de fluctuations d'une année à l'autre, particulièrement en raison de la variabilité environnementale. A l'inverse, les effets d'un manque de pollen sur les adultes ont fait l'objet d'un plus grand nombre d'études. Maurizio (1950) a démontré que l'apport de pollen influence la taille des glandes hypopharyngiennes, la quantité de corps gras, et la survie. De même, Haydack *et al.* (1970) observent une augmentation de la mortalité chez les abeilles qui ne reçoivent pas de pollen. De nombreuses études ont montré qu'en absence totale de pollen les abeilles sont plus sensibles aux pesticides (Wahl et Ulm, 1983), mais également à divers parasites et pathogènes, tels que les microsporidies (Rinderer et Elliott, 1977), les bactéries (Rinderer *et al.*, 1974), les virus (Degrandi-Hoffman *et al.*, 2010), ou encore l'acarien *Varroa destructor* (Janmaat et Winston, 2000).

En outre d'après Alaux *et al.* (2011), la présence de pollen permet d'augmenter l'expression des gènes de l'immunité. Il cite entre autres le gène codant pour la *vitellogénine*, très important et polyvalent chez l'abeille, impliqué aussi bien dans les fonctions immunitaires de cette dernière (Amdam *et al.*, 2004a et 2005, Seehuus *et al.*, 2006), que dans l'accumulation des réserves lipidiques et la survie des individus, mais également dans l'organisation sociale de la colonie, (Amdam *et al.*, 2002 et 2004b ; Corona *et al.*, 2007 ; Nelson *et al.*, 2007). Les résultats de Wang *et al.* (2014) vont dans le même sens puisque l'étude de différents gènes, dont celui codant pour la *vitellogénine* démontre un plus fort niveau d'expression pour ce gène et une meilleure survie des abeilles lorsque ces dernières consomment du pollen. Pour finir, Corby-Harris *et al.* (2014) ont observé une influence du pollen sur l'expression de certains gènes impliqués dans la physiologie et le développement des nourrices.

Ces modifications observées au niveau individuel peuvent avoir des conséquences au niveau de toute la colonie. Des études sur les effets du manque de pollen sur l'organisation, le développement, et la survie des colonies ont été menées. Il a été démontré qu'un manque de pollen peut influencer l'organisation de la colonie car les abeilles nourrices deviennent alors butineuses plus rapidement (Schulz *et al.*, 1998) et le couvain sera élevé moins longtemps (Mattila et Otis, 2007). Un défaut d'apport en pollen peut entraîner un développement moindre du couvain : on observe d'abord des larves sous-alimentées et mal operculées, puis si la carence se poursuit, les nourrices vont d'abord privilégier l'élevage des larves les plus âgées qui demandent moins d'apport protéique et de soins, jusqu'à enfin arrêter totalement l'élevage. Un phénomène de cannibalisme peut être observé sur les œufs et les larves les plus jeunes dans des cas extrêmes de manque de protéines (Newton et Michl, 1974 ; Blaschon *et al.*, 1999 ; Schmickl et Crailsheim, 2001 et 2002). Ainsi, Eischen et Graham (2008) mettent en évidence qu'une colonie qui reçoit des apports en pollen sera plus populeuse qu'une colonie carencée.

Les pollens ont des valeurs nutritionnelles différentes de par leur composition

Cependant en conditions naturelles, les abeilles se retrouvent rarement en carence totale de pollen. Elles sont le plus souvent confrontées à de fortes variations spatiales et temporelles dans la quantité, la qualité et la diversité des ressources polliniques disponibles (Decourtye *et al.*, 2010). Une abeille butineuse récolte le pollen en fonction de sa distance par rapport à la ruche, de son abondance, de sa facilité de récolte et de son goût, ou teneur en phagostimulants (éléments naturel qui induit une envie de s'alimenter), de son odeur, de sa couleur, mais de

manière intéressante, pas de sa valeur nutritionnelle (Levin et Bohart, 1955 ; Stanley et Linskens, 1974 ; Schmidt, 1982; Jay, 1986 ; Dobson et Bergstrom, 2000 ; Pernal et Currie, 2002; Diaz *et al.*, 2013). Schmidt *et al.* (1987 et 1995) et Knox *et al.* (1971) observent des différences sur la longévité des abeilles en fonction du type de pollen consommé. Il y a donc différentes valeurs nutritionnelles en fonction du pollen consommé, cela ayant une répercussion sur la santé de l'abeille. Cette valeur est conférée par la composition chimique du pollen (taux de protéines, lipides, acides aminés, vitamines, etc...). Toutefois, la plupart des études qui testent les effets de la qualité du pollen sur l'abeille utilisent le taux de protéines comme variable indicative. D'après Schmidt *et al.* (1987), les deux critères les plus importants pour augmenter la longévité des abeilles sont la quantité de pollen et le taux de protéines qu'il contient. Pour Roulston et Cane (2000), la qualité d'un pollen est déterminée par son taux de protéines. Kleinschmidt et Kondos (1976) concluent qu'un pollen avec moins de 20 % de protéines ne peut pas satisfaire les besoins d'une colonie pour lui permettre un élevage du couvain optimal, comparé à un pollen comportant plus de 25 % de protéines. Somerville et Nicol (2006) vont plus loin en définissant trois catégories de pollen en fonction de leur qualité : ceux de faible qualité comportant moins de 20 % de protéines, les pollens de bonne qualité comportant entre 20 et 25 % de protéines, et les excellents composés de plus de 25 % de protéines. Haydack (1970) et Roulston et Cane (2002) jugent que la quantité de protéines d'un pollen est le facteur le plus important permettant d'augmenter la survie des larves et des adultes. Pernal et Currie (2000) et Degrandi-Hoffman *et al.* (2010) observent des glandes hypopharyngiennes plus développées pour de plus fort taux de protéines ou avec des apports de suppléments protéiques. Une déficience en certains nutriments tels que les protéines peut provoquer une diminution de la réponse immunitaire chez les insectes, ainsi qu'une augmentation de leur sensibilité aux maladies (Field *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2007). L'apport de nutriments va donc agir sur les systèmes immunitaires et de détoxication. Cela paraît logique si on considère les besoins importants de ces systèmes en énergie et en acides aminés, qui vont notamment permettre la division des cellules et la synthèse de protéines. Outre les protéines, un autre composant du pollen est parfois utilisé comme facteur de qualité, la composition en acides aminés. Pour McCaughey *et al.* (1980), Loper et Cohen (1987), et Cook *et al.* (2003), la valeur nutritionnelle d'un pollen dépend de sa composition en acides aminés essentiels, répertoriés par De Groot (1953). Au niveau de la colonie, les effets de la qualité du pollen sont beaucoup moins étudiés car les expérimentations sont beaucoup plus difficiles à mener, du fait de l'action des facteurs extérieurs. Cependant, Campana et Moeller (1977) ont observé que le type de pollen

consommé influence le comportement d'élevage du couvain par les nourrices (taux de couvain operculé).

Les abeilles consomment préférentiellement des mélanges de pollen

Schmidt (1984) a observé que les abeilles préféraient consommer un pollen polyfloral que monofloral, cela étant renforcé par leur comportement polylectique. En effet, les abeilles collectent et consomment une grande variété de pollens (Louveaux, 1959 ; Dimou et Thrasyvoulou, 2009). Somerville et Nicol (2006) ont analysé le taux de protéines et la composition en acides aminés pour 62 types de pollens différents, et ils observent que si les pollens sont consommés seuls, la plupart d'entre eux ne permettent pas de satisfaire les besoins des abeilles. La diversité dans la consommation des pollens apparaît comme un facteur important. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Girard *et al.* (2012) qui observent que certaines cultures de mauvaise qualité, ou des cultures ayant à proximité une faible qualité et/ou diversité de ressources polliniques ne permettent pas aux abeilles d'élever le couvain de manière optimale en plein champs. En laboratoire, Tasei et Aupinel (2008) notent des différences sur le développement des larves de *Bombus terrestris*, en fonction de la qualité du pollen consommé (taux de protéines) et de sa diversité. Les larves nourries avec du pollen contenant de plus forts taux de protéines, ou avec le mélange sont celles qui sont les plus grosses (poids). Par ailleurs, Alaux *et al.* (2010a) ont trouvé une augmentation de « l'immunité sociale » (représentée ici par l'activité de l'enzyme glucose oxydase) lorsque l'abeille était nourrie avec un mélange de pollens plutôt qu'avec un pollen monofloral. De même Foley *et al.* (2012) observent que des larves nourries avec du pollen de pissenlit ou avec un mélange de pollens ont une meilleure résistance au champignon parasite *Aspergillus*. Il faut toutefois nuancer l'importance de la diversité des pollens consommés, la qualité demeurant un paramètre à considérer. En effet, en se basant sur le développement des larves, Singh et Singh (1996) suggèrent qu'il est plus intéressant pour l'abeille de consommer un pollen de bonne qualité (taux de lipides et composition en acides aminés) tel que la moutarde, plutôt qu'un mélange de pollens, mais de qualité inférieur.

Cependant et pour finir, peu d'expérimentations ont finalement été réalisées sur les effets de la quantité, la diversité, ou la qualité en tenant compte de la valeur nutritionnelle totale, sur la santé de l'abeille au niveau physiologique et biomoléculaire, et sur la résistance au stresser *N. ceranae*.

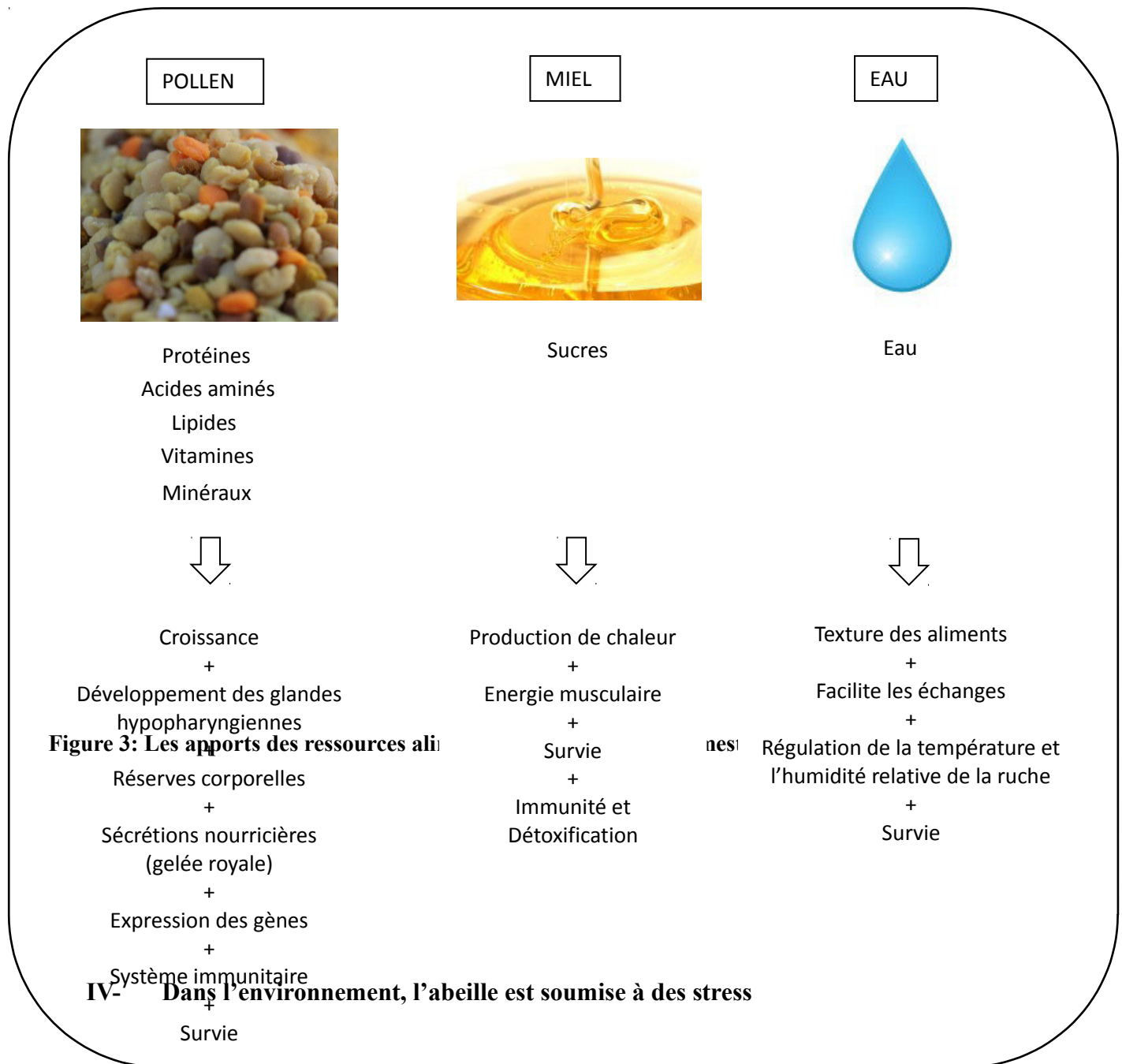
Les besoins de l'abeille en eau

L'abeille est composée d'environ 70% en poids d'eau, elle ne peut donc pas survivre plus de quelques jours sans en consommer (Herbert, 1992) (Figure 3). De plus, elle l'utilise pour gérer les textures des miels, de la gelée royale et des aliments qu'elle consomme, et pour faciliter les échanges. La gelée royale servant à nourrir les larves peut contenir jusqu'à 66% d'eau (Herbert, 1992). L'eau est également utilisée pour la thermorégulation dans la ruche. Les abeilles déposent de l'eau sur les cadres afin de modifier la température et l'humidité relative de la ruche. L'abeille ne boit presque pas en dessous de 20°C, peu de 25 à 30°C (0,4 mm³), et beaucoup au-dessus de 30°C (9,6 mm³ à 35°C, et 19,7 mm³ à 40°C) (in Chauvin, 1968). De même, plus la taille de la colonie est importante, moins les abeilles consomment d'eau, puisque les échanges trophalactiques sont plus fréquents, et donc les besoins individuels sont moindres (Free et Spencer Booth, 1958). Les abeilles préfèrent récolter de l'eau salée à 0,5 % (NaCl), ce qui augmente leur longévité et leur production de cire (Horr, 1998). Le sel peut notamment permettre à l'abeille de réguler son osmorégulation (Nicolson, 1990).

Le devenir des aliments

Après consommation, les aliments humectés de salive progressent jusqu'au jabot, dans lequel ils sont stockés. Une première digestion peut y avoir lieu grâce aux enzymes salivaires produites par les glandes salivaires (ou labiales). Puis les éléments solides sont déversés dans l'intestin moyen, où la digestion principale a lieu (Bailey, 1952 ; Dietz, 1969). Les éléments directement assimilables tels que l'eau, les sels minéraux, les acides aminés, les sucres simples, les acides gras, et les vitamines, sont absorbés par la membrane de l'intestin. Ils pourront être stockés dans les tissus adipeux, ou bien circuler dans l'hémolymphe (dont le rôle chez les insectes est analogue à notre sang) d'où ils seront transportés vers les différents organes qui vont pouvoir les utiliser. Pour le stockage de réserves alimentaires, les abeilles possèdent des cellules sur les parties dorsales et ventrales de l'abdomen appelées corps gras ; ces derniers concentrent et stockent les protéines sous forme d'albumen, ainsi que le glycogène, ce dernier pouvant être rapidement converti en glucose. Le tissu adipeux est particulièrement développé chez les abeilles d'hiver qui doivent survivre durant toute la saison froide dans la ruche. Les éléments non directement assimilables tels que les protéines, les sucres complexes et l'amidon ou les graisses, subissent d'abord l'action des enzymes digestives (les protéases pour la partie protéique (Terra et Ferreira, 1994) et les sucrases pour les sucres (Huber et Mathison, 1976)) avant de pouvoir être utilisés. Les éléments non assimilables (une partie de l'amidon et des sucres complexes, la cellulose, la sporopollenine,

etc...) sont excrétés. Les divers déchets peuvent être rejetés par les tubes de Malpighi, par l'ampoule rectale, ou par les voies respiratoires.



Modification des paysages par l'agriculture intensive

L'agriculture intensive a abouti à une modification profonde du paysage. En effet, les agriculteurs ont augmenté leurs surfaces cultivées, au détriment des surfaces naturelles et semi-naturelles (prairies permanentes, friches, jardins, haies, bordures de champs et de cours d'eau) (Hines et Hendrix, 2005 ; Goulson *et al.*, 2008). La dégradation et la fragmentation de l'habitat contribuent au déclin des colonies d'abeilles dans le monde (Richards, 2001 ;

Kremen *et al*, 2002 ; Larsen *et al*, 2005) (Figure 4). En effet, l'intensification des paysages agricoles provoque une diminution de la quantité, de la qualité, voire de la diversité des ressources en pollen pour l'abeille (Mattila et Ottis, 2006 ; Decourtye *et al*, 2010). Les ouvrières nourrices doivent produire la nourriture qu'elles distribuent aux larves à partir de leurs glandes nourricières, glandes dont le développement dépend de l'apport protéique contenu dans le pollen. Si les abeilles n'ont pas ou peu de pollen, ou si elles ont du pollen de mauvaise qualité à leur disposition, les nourrices ne peuvent plus réaliser leurs tâches mettant toute la colonie en péril. La disponibilité des ressources florales est ainsi un point important à prendre en compte dans la santé et la survie des abeilles. Les apiculteurs rajoutent notamment du sirop ou des suppléments protéiques, mais ils ne fournissent pas une valeur nutritionnelle aussi intéressante que le nectar et le pollen récoltés par les abeilles (Pederson et Omholt, 1993).

Présence de stressseurs biotiques dans les colonies

D'autres facteurs pourraient expliquer le déclin des abeilles. La présence de parasites/pathogènes ou de pesticides a fait l'objet de nombreuses études visant à prouver qu'il s'agissait de la principale cause de ce déclin (Figure 4). Les principaux parasites et agents infectieux qui affectent les abeilles domestiques et provoquent d'importantes disparitions de colonies sont l'acararien *Varroa destructor* (Dainat *et al*, 2012), les champignons du genre *Nosema* (Higes *et al.*, 2008a), les bactéries de type loque (Forsgren 2009), ainsi que de nombreux virus (Gregory *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2005 et 2007 ; Cox-Foster *et al.*, 2007 ; Highfield *et al.* 2009 ; Berthoud *et al.*, 2010). Notre étude se concentre sur *Nosema ceranae*. Il s'agit d'un parasite eucaryote, intracellulaire, obligatoire, d'abord détecté chez *Apis cerana*, puis chez *Apis mellifera* L. (Higes *et al.*, 2006). *N. ceranae* a remplacé *Nosema apis* dans les ruchers depuis quelques années, et est beaucoup plus virulent que ce dernier puisqu'il provoque une plus forte mortalité (Paxton *et al*, 2007 ; Fries, 2010). Il se développe rapidement dans l'intestin de son hôte après inoculation (Forsgren et Fries, 2010), et manipule ses fonctions clés pour son propre intérêt (Vidau *et al.*, 2014). Ainsi, *Nosema* cause un stress énergétique, et une diminution des capacités immunitaires et de la longévité des abeilles infectées (Martin-Hernandez, 2011; Antunez *et al.*, 2009 ; Higes *et al.*, 2007). En Espagne, la présence de ce champignon dans les ruchers provoque une dépopulation des ruches, une augmentation des mortalités hivernales, et une diminution des productions de miel (Higes *et al*, 2008a). Il a d'ailleurs été cité comme étant une cause potentielle du syndrome d'effondrement des colonies (Higes *et al.*, 2008a et b, et 2010 ; Paxton, 2010). La

contamination par les spores de *Nosema* peut avoir lieu par les matières fécales présentes dans la ruche, les échanges entre abeilles (contact, trophallaxie), ou par ingestion de pollen contaminé lors de la confection du pain d'abeille par des individus infectés (Higes *et al.*, 2008b et 2010 ; Smith, 2012).

Intoxications par les pesticides

En ce qui concerne les pesticides, les principales substances incriminées dans le déclin des abeilles sont les herbicides et les insecticides, et depuis quelques années les néonicotinoïdes (Cressey, 2013), insecticides systémiques qui persistent dans toutes les parties de la plante (Trapp et Pussemier, 1991). Des effets létaux et sub-létaux sont observés sur les abeilles (Figure 4). En effet, les pesticides peuvent agir au niveau physiologique, immunitaire, de l'apprentissage, du comportement, et/ou de la communication (Decourtye *et al.*, 2003 et 2005 ; Desneux *et al.* 2007 ; Henry *et al.* 2012). L'exposition peut se faire par contact direct avec ces produits lors de leur application, par contact avec des substances contaminées, ou bien par ingestion de pollen ou nectar contaminé (Goulson, 2010; Krupke *et al.*, 2012). Aux Etats-Unis, Frazier *et al.* (2008) ont détecté un grand nombre de pesticides différents dans les cires et les pollens. En France, une étude des pelotes de pollen récoltées par les abeilles sur des fleurs environnantes aux ruchers, a montré la présence de nombreux pesticides utilisés en agriculture, quelquefois à des concentrations inquiétantes (Chauzat *et al.*, 2006). De plus, certaines semences enrobées sont toujours utilisées pour les cultures de colza ou maïs, et les teneurs en pesticides des pollens et nectars que ces plantes mellifères produisent ne sont pas encore bien évaluées, mais peuvent être fortement toxiques (Van Engelsdorp and Meixner, 2010). Les molécules utilisées pour lutter contre les pathogènes des abeilles, tel que le fluvalinate et le coumaphos, acaricides utilisés pour lutter contre le *Varroa*, sont aussi à prendre en compte dans les divers modes de contamination des abeilles par les pesticides. Frazier *et al.* (2008) et Martel *et al.* (2007) ont trouvé des traces de ces deux produits dans 100 % des échantillons de cires testés aux États-Unis et en France.

Autres facteurs possibles

Enfin, il existe d'autres facteurs pouvant affaiblir les colonies d'abeilles, mais qui ne semblent pas être à eux seuls responsables du déclin des abeilles. Parmi ces causes, les pratiques apicoles peuvent être incriminées, la sélection génétique induisant une diminution de la variabilité génétique chez les abeilles, et aboutissant à une baisse de l'efficacité des abeilles à lutter contre les maladies (Tarpy, 2003 ; Van Engelsdorp et Meixner, 2010 ; Büchler *et al.*,

2014) ou simplement les techniques apicoles utilisées (transhumance, localisation des ruchers, gestion des ressources naturelles ou artificielles). Les changements climatiques auraient aussi leur part de responsabilité (Figure 4), du fait de l'influence du climat sur le développement des fleurs et la production de nectar dont dépendent l'activité de butinage et le développement des colonies. De plus, certaines conditions climatiques sont particulièrement favorables à l'apparition de certains pathogènes et notamment les fortes températures ou les périodes d'humidité (Le Conte *et al.*, 2008 ; Van Engelsdorp et Meixner, 2010). Blaschon *et al.* (1999) ont montré que le climat pouvait avoir des conséquences directes sur les réserves de la colonie. Au cours de leur expérience, il a été démontré que le maintien de conditions pluvieuses durant plusieurs jours provoquait une perte presque totale des réserves polliniques, contrairement aux réserves en miel qui n'étaient que très faiblement affectées. Enfin, Szabo *et al.* (1980) ont observé une corrélation entre les conditions climatiques, l'activité de vol des abeilles, et le gain de poids des colonies.

Des causes multifactorielles

Les différentes études ne permettant pas de mettre en évidence une cause unique responsable de ce déclin, les recherches se sont tournées vers des causes multifactorielles (Van Engelsdorp, 2009), les interactions entre facteurs ayant aussi fait l'objet d'études plus récentes. Colin et Belzunces (1992) ont étudié en laboratoire l'action conjuguée de deux pesticides, un insecticide pyréthrinoloïde (la deltaméthrine) et un fongicide (le prochloraz) sur la santé d'*Apis mellifera* L.. Exposées indépendamment à l'un ou l'autre de ces produits, les abeilles ne présentaient pas des taux de mortalité supérieurs à ceux des abeilles témoins. Cependant, une action combinée des deux pesticides entraînait une augmentation du taux de mortalité de l'ordre de 70 % comparativement au lot témoin.

Une sensibilité accrue face au champignon pathogène *N. ceranae* a également été observé par Wu *et al.* (2012), puis Pettis *et al.* (2013) en cas d'exposition à de hauts niveaux de résidus de pesticides, de même ordre de grandeur que les taux rencontrés dans le miel, la cire, ou le pollen.

La co-exposition à *Nosema* et aux insecticides a fait l'objet de diverses études, aboutissant à

chaque fois à la mise en évidence d'une mortalité accrue des ouvrières exposées aux deux stressés par rapport à celle des abeilles exposées à un seul stress (Alaux *et al.*, 2010b ; Vidau *et al.*, 2011). Yoder *et al.* (2013) ont observé que la présence de fongicides dans le pain

d'abeille de colonies vivant sur des vergers entraînait une diminution logique de la flore fongique naturelle du pain d'abeille, ce qui avait pour conséquence une plus grande sensibilité des colonies à la maladie dite du « couvain plâtré » provoquée par le champignon *Ascosphaera apis*. L'apparition de maladies est souvent associée à un manque de nourriture comme c'est le cas pour la loque américaine par exemple (Forsgren, 2009). Le rôle des protéines dans l'activation des défenses immunitaires basées sur des réactions enzymatiques (par exemple l'encapsulation) est reconnu (DeGrandi-Hoffman *et al*, 2010). Une carence en pollen peut ainsi affecter les défenses immunitaires de l'abeille et la rendre plus sensible aux pesticides et parasites. Le manque de nourriture augmentant la fréquence des trophallaxies (Feigenbaum et Naug, 2010), une colonie affamée sera davantage sujette aux transmissions virales.

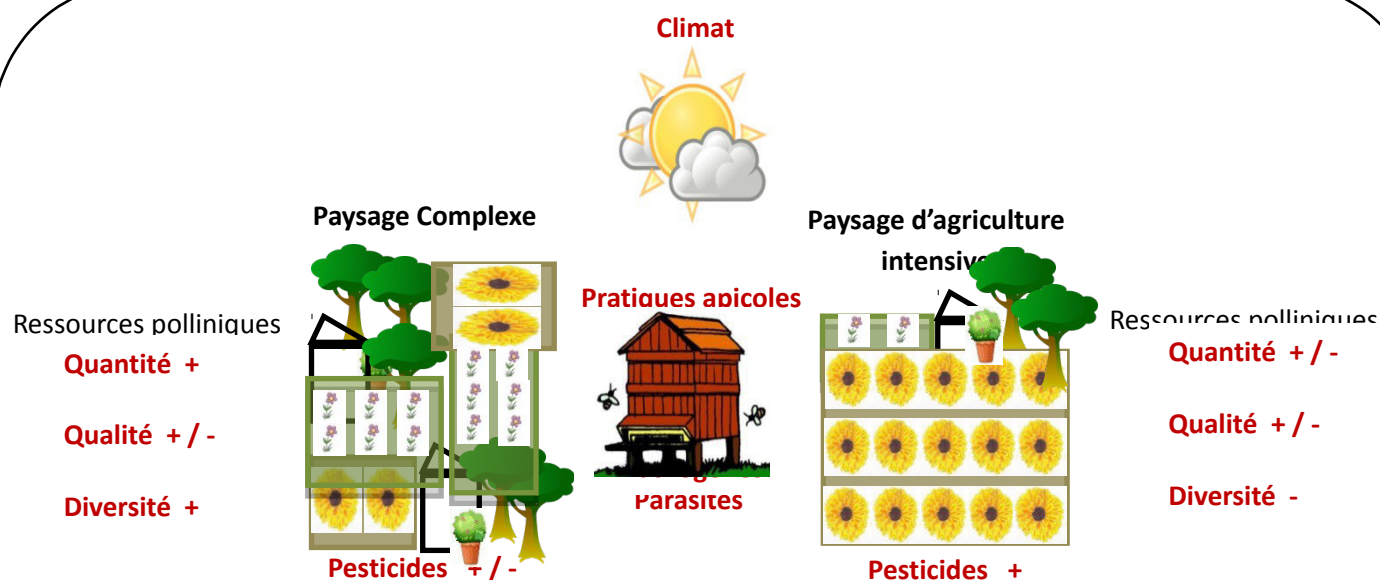


Figure 4 : Variabilité des ressources polliniques dans un environnement complexe ou en paysage d'agriculture intensive. Le signe « + » signifie que le paramètre est fortement représenté et de manière régulière, à l'inverse le signe « - » signifie que le paramètre est faiblement représenté, de manière régulière. Enfin le signe « +/- » définit des ressources plus ou moins représentées, et de manière irrégulière.

Objectif et problématiques

L'objectif général de cette étude est de tester les effets de l'alimentation pollinique sur la santé et la survie des abeilles. Notre hypothèse est la suivante : la variabilité de la quantité, la qualité, et la diversité des ressources polliniques influence la santé des abeilles, ainsi que leur résistance aux différents stress présents dans l'environnement.

Les abeilles se nourrissent de pollen durant les premiers jours après leur émergence. Les jeunes abeilles jouent le rôle de nourrice et sont indispensables à l'élevage du couvain, aux soins prodigués à la reine, et à l'alimentation de tous les individus de la colonie. Les deux principaux paramètres physiologiques qui définissent une nourrice sont le développement de ses glandes hypopharyngiennes, ainsi que la présence de nombreux corps gras, et donc de fort taux de *vitéllogénine*. Ces deux paramètres nous serviront de témoins pour tester la santé de l'abeille au cours de notre étude, et couplé à la survie des individus, nous aurons une idée des impacts observables en conditions réelles sur l'organisation dans la ruche, et sur la survie de la colonie entière.

L'agriculture s'intensifie et les paysages agricoles représentent l'environnement typique dont disposent les abeilles, avec deux grands types de ressources florales : les fleurs de plantes

sauvages, présentes dans les milieux interstitiels, les haies, les prairies, les jachères, et les cultures à floraison massives tels que le colza, le tournesol, la luzerne, le maïs. Ces deux types de pollens seront donc étudiés sur la santé de l'abeille au cours de notre étude.

Jusqu'à présent, l'importance de l'abondance pollinique a été testée en présence et absence de pollen. Mais les apports en pollen variant dans l'environnement, avec des périodes de pénuries, nous avons voulu déterminer le réel impact de la quantité de pollen sur la santé de l'abeille. La qualité du pollen est caractérisée comme un paramètre important de la nutrition des abeilles, mais les études ne concernent principalement que les taux de protéines et/ou la composition en acides aminés. Il paraît donc intéressant de confirmer qu'il s'agit bien des deux seuls composants à prendre en compte dans l'étude de la qualité du pollen. Enfin, il apparaît que les abeilles préfèrent consommer des mélanges de pollens plutôt que des pollens monofloraux, et que cela pourrait être bénéfique sur l'immunité de la colonie, mais dans quelles mesures cette diversité apporte-t-elle des bénéfices à l'abeille, et quel niveau de diversité lui est-il nécessaire ? Dans un premier temps, nous nous sommes donc questionnés sur les effets des variations observées en conditions réelles sur les ressources en pollen de fleurs sauvages et de culture, en termes de quantité, de qualité, et de diversité, sur la physiologie d'abeilles nourrices et sur leur survie.

La santé de l'abeille ne se définit pas seulement par l'absence de maladie mais aussi par la présence de nombreux individus, bien nourris, capables d'élever du couvain et résistant aux différents stress (Brodschneider *et al*, 2010). Or, de nombreuses études statuent des effets néfastes d'une multitude de stress sur la santé des abeilles et le devenir des colonies. La disponibilité des ressources polliniques apparaît comme un paramètre permettant de pallier à ces pertes. Nous nous sommes donc demandé dans un second temps quels sont les effets de la qualité et la diversité du pollen sur la résistance des abeilles au parasite *Nosema ceranae* ?

Les capacités digestives de l'abeille étant primordiales dans l'assimilation des nutriments que peuvent apporter les pollens, elles ont un impact direct sur les effets que peuvent avoir les pollens sur la résistance au parasite intestinal *Nosema*. Nous avons finalement étudié les activités de trois enzymes digestives identifiées chez l'abeille domestique, en présence du parasite.

Chapitre 2:

**Pollen dearth and poor-quality pollen
affect longevity and nursing ability of honeybees
in intensive agricultural landscapes**

Avant-propos du chapitre 2

La nutrition caractérise une fonction clé pour tous les organismes. Pour l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., le pollen représente l'élément limitant pour son développement, sa santé, et sa survie. En effet, de nombreuses études ont démontré l'importance de l'apport en pollen pour l'abeille (Haydack, 1970; Rinderer and Elliott, 1977 ; Wahl and Ulm, 1983 ; Brodschneider et Crailsheim, 2010 ; Alaux *et al.*, 2010a; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2014). Les colonies sont de plus en plus fréquemment placées à proximité de grandes cultures de manière à ce qu'elles soient approvisionnées par de grandes quantités de pollens. Mais ce type de ressources varie en abondance et qualité dans le temps et l'espace (Decourtye *et al.*, 2010). En effet, des périodes de pénuries en pollens suivent la floraison des grandes cultures (Maurizio, 1950; Louveaux, 1959; Odoux *et al.*, 2012; Requier, 2013). L'effet de ces périodes de pénuries, fournissant à l'abeille du pollen en plus faible quantité, n'a été que très peu étudié. Dans un premier temps nous avons donc testé l'hypothèse selon

laquelle ces périodes de déplétion pollinique pouvaient apporter un stress à l'abeille. Pour cela, nous avons nourri des abeilles en laboratoire avec du pollen de culture récolté par des ruches sous serre et nous avons identifié les effets des diverses carences sur la physiologie d'abeilles nourrices (glandes hypopharyngiennes et taux de *vitellogénine*), et sur leur survie. Durant ces périodes de pénuries, la disponibilité des ressources florales de plantes sauvages prend toute son importance. Or, ces ressources varient en qualité et diversité en fonction du lieu et de la période de butinage. De nombreuses études ont démontré que malgré l'importance de l'apport protéique pour l'abeille, ces dernières ne sélectionnent pas des pollens contenant de plus fort taux de protéines (Levin et Bohart, 1955 ; Pernal et Currie, 2002). En revanche, d'après Schmidt (1984), elles consomment préférentiellement des mélanges plutôt que du pollen monofloral. Les pollens utilisés dans la seconde partie de notre étude sont de vrais échantillons de pollens récoltés par des colonies situées dans un paysage agricole à l'ouest de la France. Ces mélanges recueillis supportent le postulat de Schmidt *et al.* (1984) et plus récemment Odoux *et al.*, (2012) et Requier (2013), que les abeilles sélectionnent des mélanges quand elles en ont le choix, même en présence d'une culture à floraison massive à proximité. Nous avons donc testé dans la seconde partie de cette étude les effets des différentes variétés de pollens (qualité et diversité) récoltées par des abeilles dans un environnement d'agriculture intensive, au cours d'une saison de butinage (de Mai à Septembre) sur la santé des abeilles.

Pollen dearth and poor-quality pollen affect longevity and nursing ability of honeybees in intensive agricultural landscapes

To submit to Plos One

Garance Di Pasquale^{1,2}, Cédric Alaux^{1,3}, Yves Le Conte^{1,3}, Jean-François Odoux⁴, Maryline Pioz^{1,3}, Bernard E. Vaissière^{1,3}, Luc P. Belzunces^{1,3}, Axel Decourtye^{1,2,5}

¹UMT PrADE, CS 40509, 84914 Avignon, France

²ACTA, Avignon, France

³INRA, UR 406 Abeilles et Environnement, CS 40509, 84914 Avignon, France

⁴INRA, Unité expérimentale d'entomologie Le Magneraud, 17700 Surgères, France

⁵ITSAP-Institut de l'abeille, Avignon, France

Abstract

Intensive agricultural systems often expose honey bees (*Apis mellifera* L.) to large temporal variations in the availability, diversity and quality of nutritional resources, with long periods of dearth following the flowering of a main resource-rich mass-flowering crop. Such nutritional irregularity is expected to affect worker health. The positive effects of pollen consumption on workers have largely been documented, but the extent to which the nutritional quality of the pollen mix available in agrosystems can modify honey bee physiology is not clear. We tested the effect of natural pollen shortage and different seasonal pollen mixes on honey bee survival and nursing capacities (hypopharyngeal gland development and *vitellogenin* expression) by feeding them with field harvested pollen diets in different amounts. A drop in pure oilseed rape (*Brassica napus* L.) pollen availability (60 % and more) resulted in a drastic reduction of survival and performance of nursing in a quantitative-dependent manner. Despite some variation in taxonomic diversity and nutritional quality, the pollen mixes harvested over the season had a similar positive influence on bee health, except for the one collected in the late July which induced poor survival and nursing capacities. This period coincided with the mass-flowering of maize (*Zea mays* L.), which produces poor-quality pollen. In intensively farmed agricultural landscapes, periods between the blooming of mass-flowering crops can be stressful for honey bees due not only to resources depletion but also to poor pollen quality as the pollen available *ad libitum* during the mass flowering of some crops can fail to provide workers with an adequate diet for their development.

1- Introduction

Bee species can be classified into two broad categories regarding their pollen diet: specialists, who feed on a few or even a single plant species, and generalists, who forage on a large array of phylogenetically unrelated plant species (Cane and Sipes 2006). Compared to specialists, generalists usually have a better resilience to environmental changes (Biesmeijer *et al.* 2006). Honey bees (*Apis mellifera* L.), which are extreme generalist, are thus expected to adapt to the human impact on landscape, notably in intensive agricultural landscapes. However, beekeepers have frequently cited starvation and poor foraging conditions as a significant driver of colony losses (Otis, 2007; Van Engelsdorp *et al.*, 2007). In addition, Naug (2009) suggested that nutritional stress due to habitat loss plays an important role in honeybee colony losses. The intensification of agriculture often causes a decrease in the diversity of floral

resources due to the destruction of natural habitats and the use of monocultures over large areas, but it also affects the quantity of resources available since the flowering period of crops is usually short (Decourtye *et al.*, 2010). Such changes in the landscape and thus in spatial and temporal availability of foraging resources can impact colonies as it has long been recognized that a lack of food, in particular pollen dearth, contributes to weaken colonies (Mattila and Otis, 2006; Maurizio, 1950). Indeed, pollen nutrients (proteins, lipids, vitamins and minerals) are essential to colony development and survival (Brodschneider and Crailsheim, 2010). Several studies have shown in details how the lack of pollen can decrease the longevity (Haydack, 1970; Rinderer and Elliott, 1977, Smeets and Duchateau, 2003; Wang *et al.*, 2014), metabolism (Toth, 2005; Fischer and Grozinger, 2008; Willard *et al.*, 2011; Alaux *et al.*, 2011), immunocompetence (Alaux *et al.*, 2010a; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010), and the tolerance threshold of individual honey bee workers to pathogens and pesticides (Rinderer *et al.*, 1974; Rinderer and Elliott, 1977; Wahl and Ulm, 1983; Bowen-Walker and Gunn, 2001; Mayack and Naug, 2009; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010). Pollen shortage also hinders the development of hypopharyngeal glands required for the production of brood food (Maurizio, 1950; Loper and Berdel, 1980a, b; Pernal and Currie, 2000; Degrandi-Hoffman *et al.*, 2010). A reduction of brood rearing combined with a shorter lifespan of adults can directly impact the colony population (Blaschon *et al.*, 1999; Schmickl *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2005; Mattila and Otis, 2006, 2007; Girard *et al.*, 2012). Pollen resources in an agricultural farmland are continuously available, but with considerable variation over time during a season (Maurizio, 1950; Louveaux, 1959; Odoux *et al.*, 2012; Requier, 2013). For example, amounts of pollen collected by colonies in an agrosystem in western France follow a very irregular pattern, with clear shortage periods (Steffan-Dewenter and Kuhn, 2003; Decourtye *et al.*, 2010; Odoux *et al.*, 2012; Requier, 2013). These temporal variations in the harvest of pollen also depend a lot on the apiary location (Louveaux, 1959; Duelli and Obrist, 2003). Furthermore, pollen quality and diversity can also affect the size of hypopharyngeal glands and worker longevity (Schmidt *et al.*, 1984, 1987; Tasei and Aupinel, 2008; Di Pasquale *et al.*, 2013). And, the diversity of pollen species harvested by honey bee colonies shows also considerable temporal variation (Dimou and Thrasyvoulou, 2007; Decourtye *et al.*, 2010; Wratten *et al.*, 2012).

In order to better understand how the availability of pollen resources (quantity, quality and diversity) in an agricultural landscape can influence honey bee health, we fed workers with environmentally-relevant diet. We first tested the effect of pollen shortage by providing bees with controlled amount of pollen encountered in the environment during a period of low food

supply. Whether a threshold amount of pollen is required for developing nurse physiology or the response is gradual could also be determined. Then, by feeding workers with representative pollen mixes harvested in an intensive agricultural area across different seasons, we assessed the influence of diet diversity and quality over time and determined whether some time frame are critical for honey bees or, conversely, if there is no stress period. The impact of the different diet on the survival and nurse physiology (Toth and Robinson, 2005; Toth *et al.*, 2005) was determined. For that purpose, we measured the development of hypopharyngeal glands and the level of vitellogenin. Nurses secrete 60 to 80 % of the brood diet from their hypopharyngeal glands, providing a secretion rich in protein for larvae (in Winston, 1987). Vitellogenin is the main storage protein in the haemolymph and precursor for many other proteins in the honey bee (Amdam *et al.*, 2003). This lipoprotein synthesized by the fat body was found to act as an antioxidant to promote longevity in both queen and worker bees (Seehuus *et al.*, 2006; Corona *et al.*, 2007). In addition, *vitellogenin* is used by nurses for the production of brood food (Amdam *et al.*, 2003, Seehuus *et al.*, 2007).

2- Materials and methods

Bee rearing

The experiment was performed on 1-day-old workers. They were obtained from three colonies by placing brood combs with late-stage pupae into an incubator at 34°C and 50 – 70 % of humidity. Bees that emerged within 10 hours were collected and mixed before placing them in cages (10.5 cm x 7.5 cm x 11.5 cm) at 34°C and 50 – 70 % of humidity in an incubator. They were provided *ad libitum* with candy (Apifonda® + powdered sugar) and water throughout the experiment. Fresh pollen diets were prepared according to environmentally-relevant diet and were supplied to the bees from day 1 for 9. Each day, pollen diets were weighed to determine the amount of pollen consumed per bee, per day and per modality. If a bee died during the pollen feeding period, it was removed and the amount of pollen was adjusted daily to the number of surviving bees.

Influence of pollen shortage on nurse worker physiology and survival

To assess the influence of pollen shortage experienced by colonies in agrosystems, we fed bees with controlled amount of pollens. Pollen quantities were estimated from a recent study, which analyzed pollen collection in an agricultural landscape of western France (Requier, 2013). From April to October, the weight of pollen collected by colonies followed a bimodal

seasonal trend, marked by a low food supply period between two oilseed mass-flowering crops (May for oilseed rape and July for sunflower). This dearth period was characterized by a median value of pollen weight loss of 66 %. On average, the pollen supply of colonies was then reduced of 40 % compared to the peak during the oilseed rape blooming period. Considering this variability of pollen availability under field conditions, we determined bee nursing capacities and survival along a decreasing gradient of consumed pollen quantities: 100 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 7 % and 0 %. The pollen quantity consumed under the *ad libitum* feeding condition was recorded as the “100 %” modality (average of 3.6 mg / bee / day). Groups of 44 one-day old bees were reared in cages and fed with the pollen diet. The trial with each diet modality was replicated ten times. The pollen of oilseed rape (*Brassica napus*, commercial F₁ hybrid ‘NK Fair’®, Syngenta, Basel, Switzerland) was chosen because of its high occurrence in the cereal farmland systems (Odoux *et al.*, 2012). The pollen was collected on plants grown under two 24 m long x 8 m wide plastic tunnels with the openings covered with insectproof screening to prevent any contamination by pesticides or other pollutants on two hives introduced in the tunnel at the onset of flowering and continuously fitted with bottom pollen traps that were emptied daily. The pollen pellets obtained were stored at - 20°C until use.

Influence of “seasonal” diversity and quality of pollen mixes on nurse worker physiology and survival

In this experiment, we tested the effect on worker health of pollen mixes collected by colonies in an agricultural landscape of western France. The different pollen mixes found across different seasons were obtained from experiments conducted in 2006 (Odoux *et al.*, 2012). Workers were fed with 6 pollen mixes collected by colonies from early May to late September in an apiary located at 46 ° 09' 13" N; 0 ° 41' 20" O. The pollen composition of each mix is presented in Figure 1. Each pollen mix was provided *ad libitum* to the bees (10 cages of 47 bees per diet). The protein and lipid levels of the different mixtures were determined after the pollen was dried for 24 h at 75°C (Louveaux, 1959) and the protein and lipid contents were expressed as percent of dry matter (Figure 1). The protein content was determined by Kjeldahl analysis (N x 6.25) using a Vapodest 45 (Gerhardt) and according to the procedure ISO 5983-2 norm (ISO 5983, 1997). After treating pollen with with hydrochloric acid (HCl 6N), total lipids were extracted with a chloroform / methanol mixture (2:1, v / v) (Folch *et al.*, 1957). The presence of pesticide residues in the different pollen diets was determined by Phytocontrol laboratory (Nimes, France) with gas and liquid chromatography (limit of

quantification of 0.01 mg / kg and limit of detection of 0.005 mg / k (AFNOR15662, 2009 ; Table 1). The samples were analyzed for 348 pesticides (Table S1).

Pollen sample	Class		Quantity
	Pesticides		(mg/kg)
Early May	Aclonifen	herbicide	0.032
	Cyprodinil	fungicide	0.012
	Flusilazole	fungicide	0.013
	Metolachlor	herbicide	0.014
Late May	Flusilazole	fungicide	0.015
Early June	Flusilazole	fungicide	< 0.01
	Pyrimethani	fungicide	
	1		< 0.01
	/	/	/
Late July			
Late August	Trifluraline	herbicide	0.06
Late September	Trifluraline	herbicide	< 0.01

Table 1: Pesticide residues in the pollen samples used for diets.

The presence of pesticide residues in the different pollen diets was assessed with a limit of quantification of 0.01 mg / kg and a limit of detection of 0.005 mg / kg.

Finally, to estimate the diversity gradient of pollen mixes, we calculated the Shannon Weaver index for each mix, as $H' = -\sum p_i \cdot \log_2 p_i$, where p_i was the amount of each pollen species represented in the mixture (Shannon and Weaver, 1949).

Physiological analysis

For both experiments, 3 bees per cage were flash frozen in liquid nitrogen at day 10, and the heads and abdomens were stored at -80°C . The right and left hypopharyngeal glands were dissected on ice in 100 μl of physiological serum (0.9 % NaCl w / w) and analyzed with an optical microscope coupled to a camera (CF 11 DSP, Kappa). The maximum diameter of 15 randomly chosen acini per gland was used to determine the development of hypopharyngeal glands ($n = 30$ acini per bees). This was performed with the Saisam 5.0.1 software (Microvision®). The 3 abdomens from each cage were pooled. RNA was extracted and the expression level of *vitellogenin* was determined by quantitative PCR using a StepOne-Plus

Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®) and the SYBR green detection method as in Di Pasquale *et al.* (2013). The influence of pollen shortage and seasonal mixes on bee survival was studied on remaining bees (41 and 44, respectively). Dead bees were counted daily and removed from the cages until the last worker died (60 or 90 days, respectively).

Statistical analysis

Since the data on hypopharyngeal gland size were not normally distributed, the effects of pollen shortage and seasonal mixes on these parameters were determined using a Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon tests with Bonferroni correction. *Vitellogenin* expression followed a normal distribution, we therefore used a one-factor ANOVA followed by Tukey post-hoc tests. For analysing the influence of feeding modalities on bee survival, the number of dead bees per day and cage throughout the experiments (70 or 90 days) were transformed in a survival table. A cox proportional hazards regression model was then used to compare the different modalities, with R functions (coxph) and the package [survival] (Cox, 1972). Finally, differences in the consumption of seasonal mixes were assayed using a Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon tests with Bonferroni correction. All analyses were performed on the statistical software R (2013).

3- Results

Influence of pollen shortage on nurse worker physiology and survival

Worker survival was highly dependent on the amount of pollen consumed. The more pollen bees received, the longer they lived with all quantitative modalities being different from each

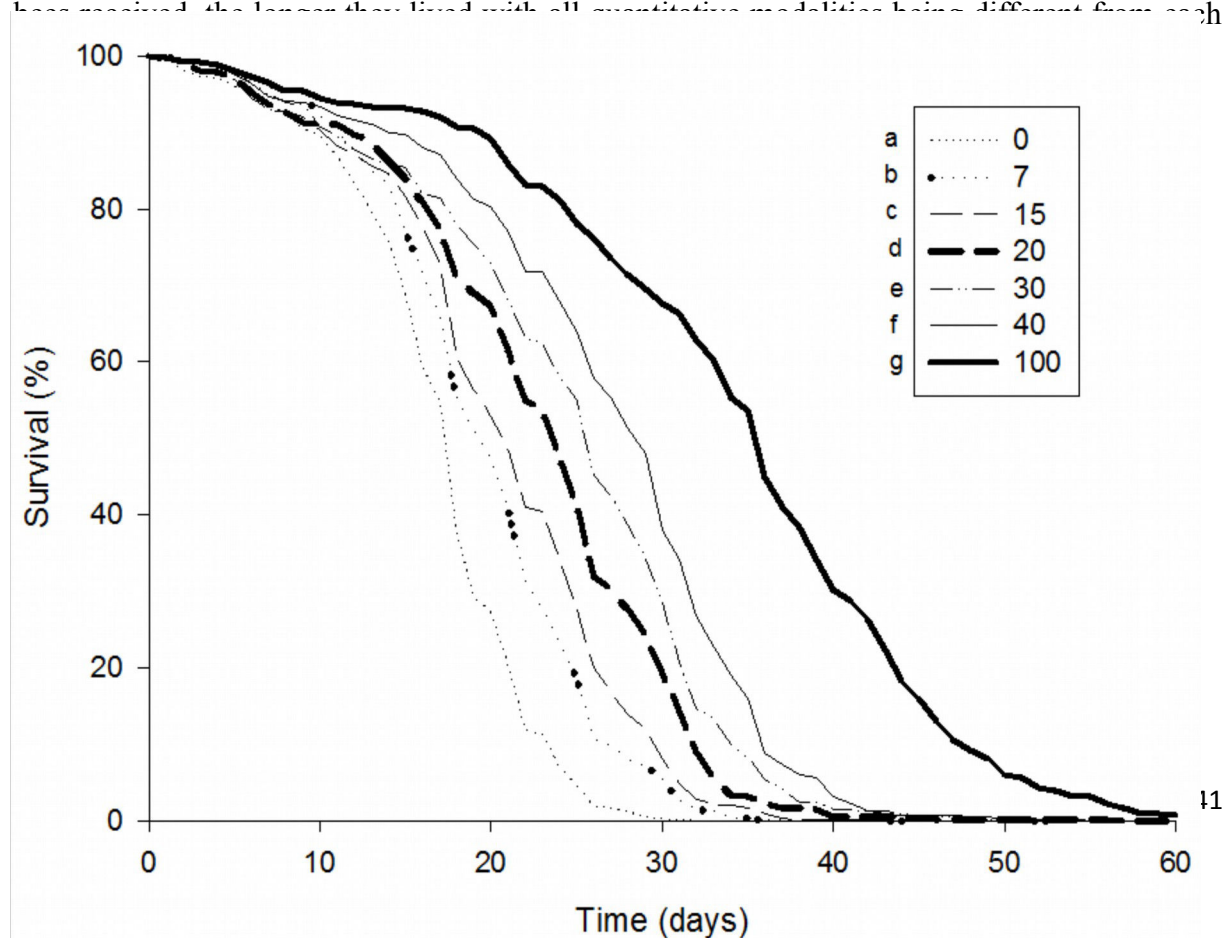
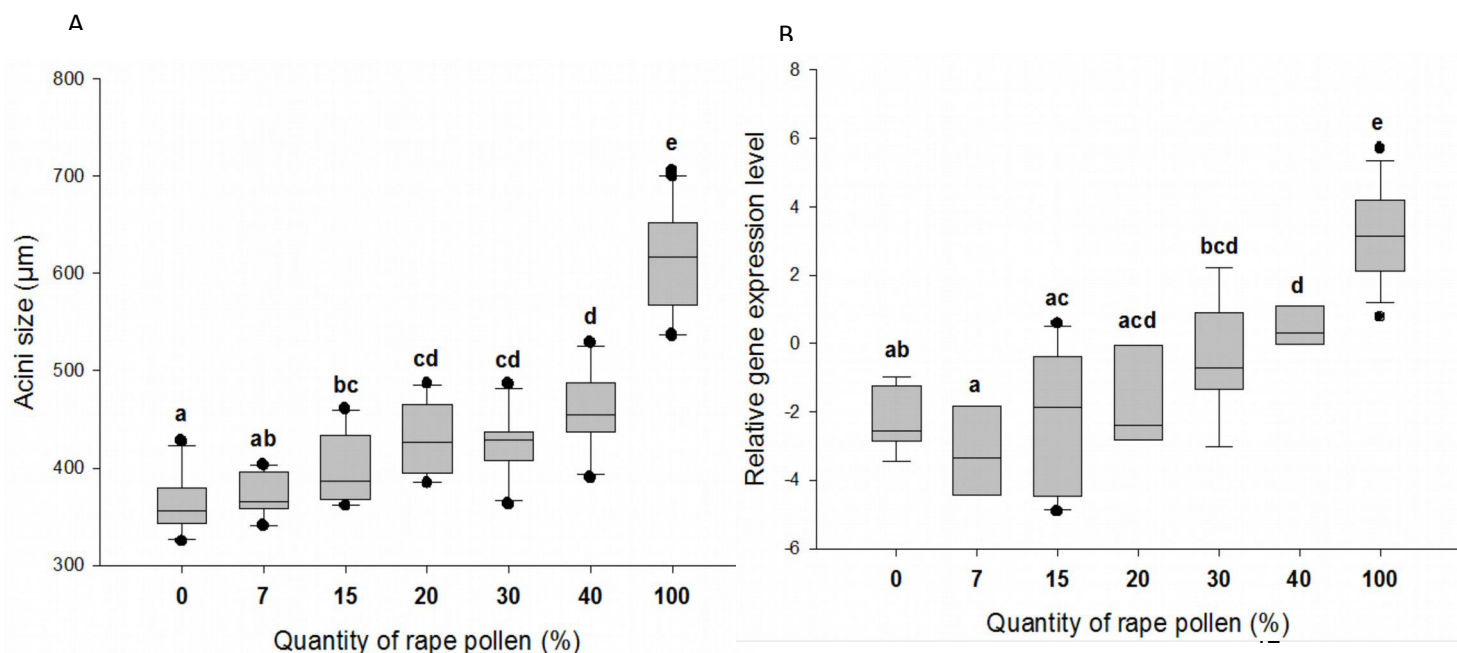


Figure 2: Effect of pollen shortage on worker survival. Data show the percentage of surviving workers over 60 days ($n = 10$ per modality) in function of quantities of pollen consumed (in %). Different letters denote significant differences ($p < 0.001$, Cox proportional hazards regression model).

The size of the hypopharyngeal glands and the expression level of *vitellogenin* were significantly affected by the quantity of pollen provided (hypopharyngeal glands: Kruskal-Wallis test, $H = 160.70$, $p < 0.001$, Figure 3A; *vitellogenin*: ANOVA test, $F = 24.51$, $df = 60$, $p < 0.001$, Figure 3B). The acini size and the level of *vitellogenin* also increased gradually with the amount of available pollen. However, bees who received the lowest amount of pollen (7 %) had glands that did not differ in size from bees that had a pollen-free diet. Similarly, low quantity of pollens (7 to 30 %) did not induce significant changes in *vitellogenin* levels as compared to bees that received no pollen at all.



3 bees (*vitellogenin*) for each diet modality. Different letters indicate significant differences between pollen quantities ($p < 0.001$, Wilcoxon tests with Bonferroni correction for hypopharyngeal glands and Tukey post-hoc tests for *vitellogenin* expression levels, respectively). Boxes show 25th and 75th percentiles range with line denoting median. Whiskers encompass 90% of the individuals, beyond which outliers are represented by dots.

Influence of “seasonal” diversity and quality of pollen mixes on nurse worker physiology and survival

The levels of proteins and lipids in the different pollen mixes ranged from 17 to 29 % and from 7 to 14 %, respectively, with the mix of “late July” having the lowest pollen quality (Figure 1). Pollen mixes from “late July” were essentially composed of crop pollens as compared to others periods, where pollen from mainly wild flower were found. The diversity of pollen mixes (Shannon index) varied among period, but there was no clear decrease in any of them. Finally, we found some pesticide residues above the detection limit in the pollen mix from the different seasonal periods. However, no residue was found in the “late July” mix.

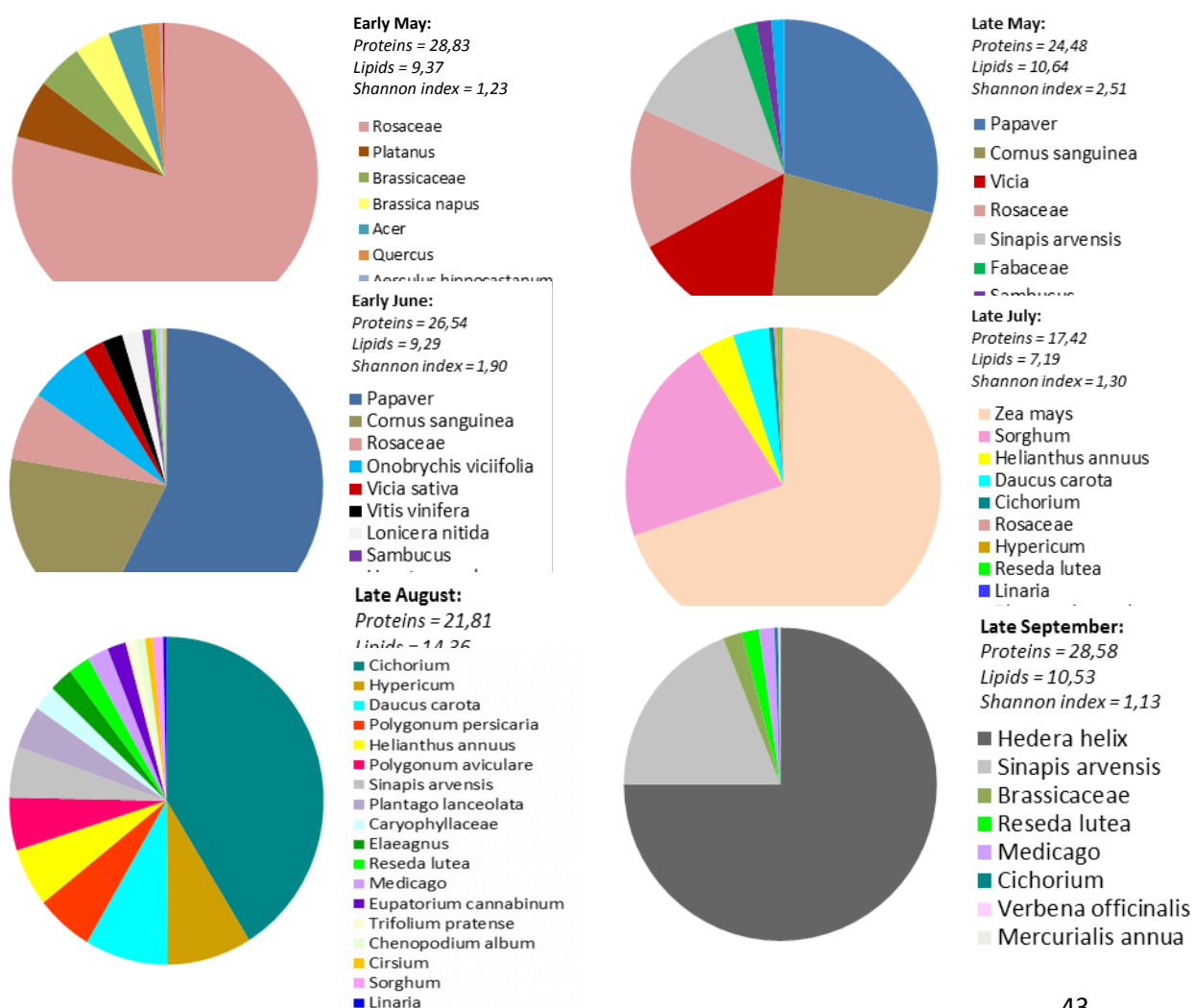
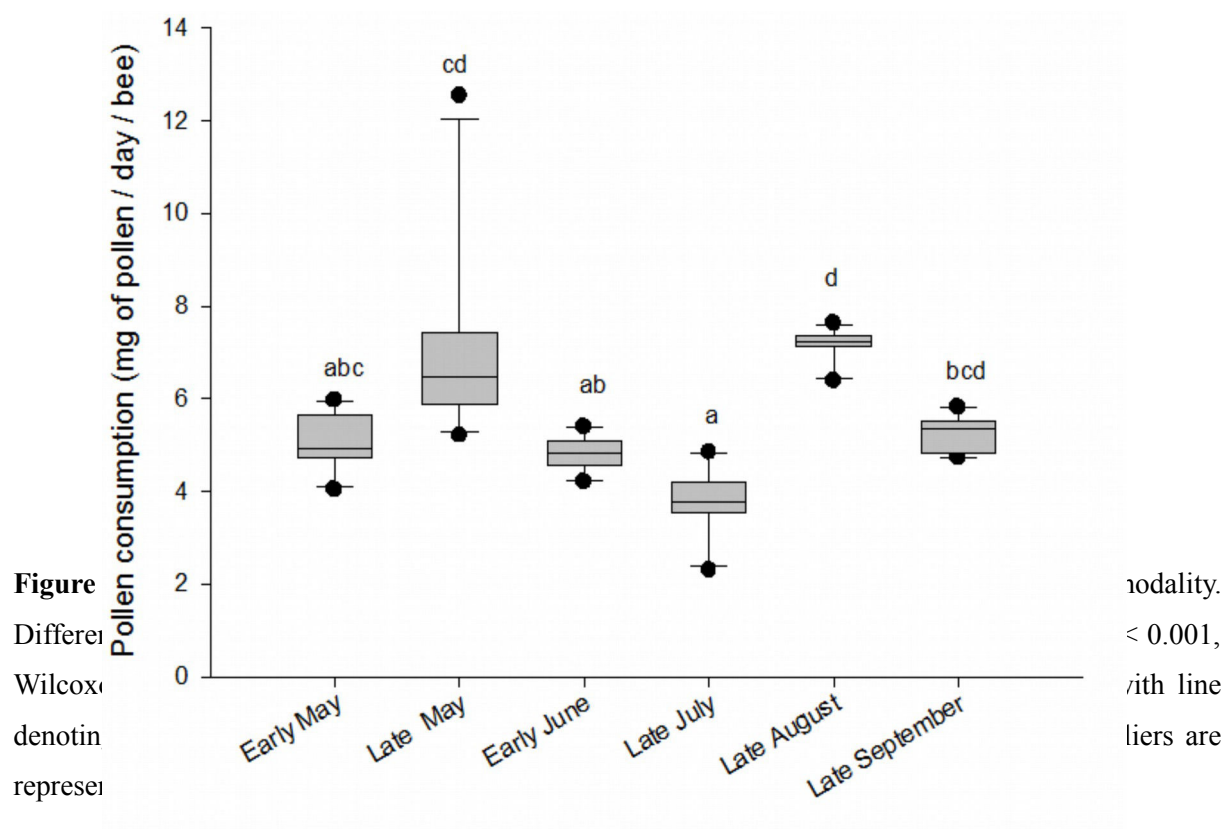


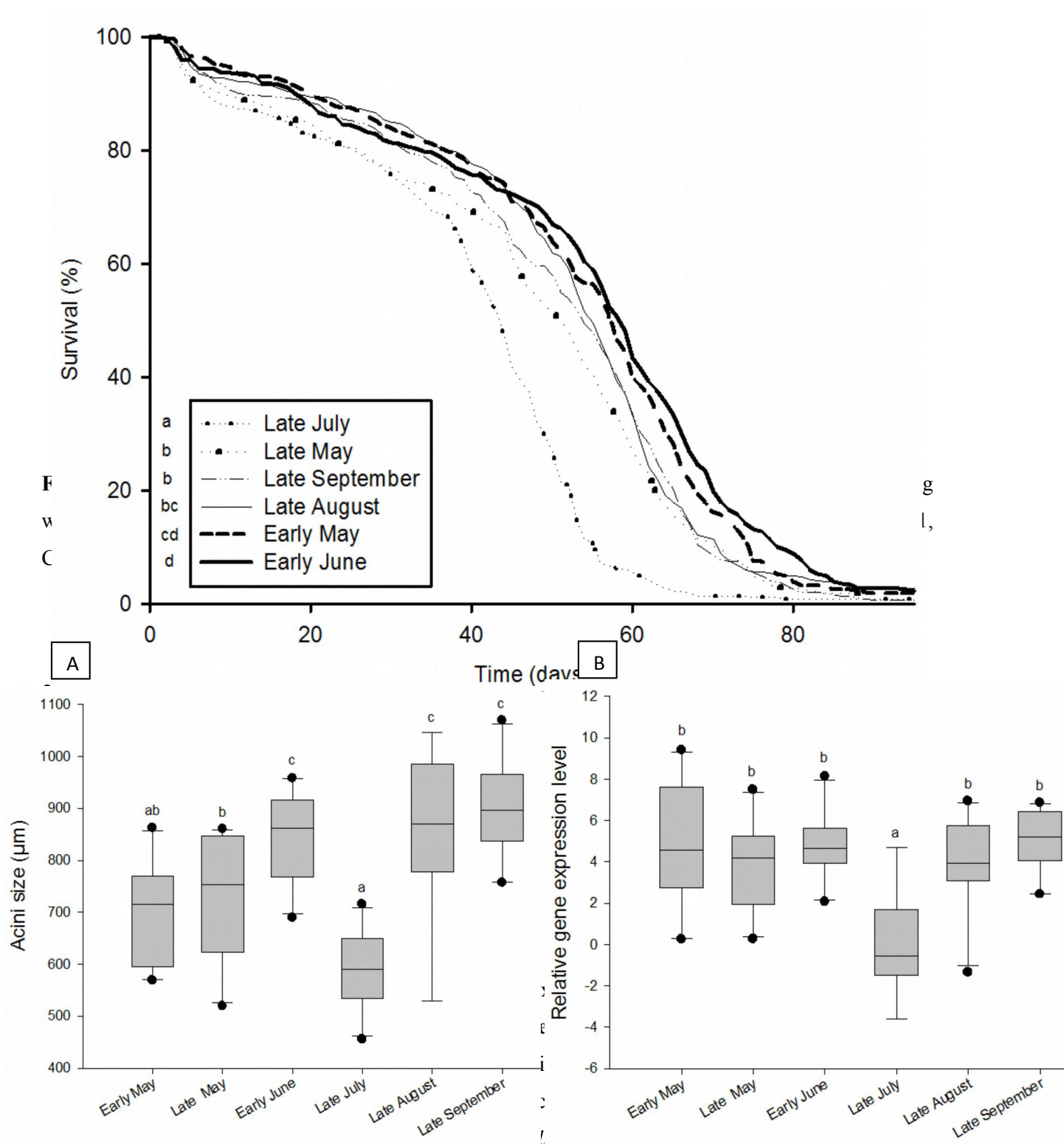
Figure 1: Composition and quality value parameters of pollen seasonal mixes harvested in an agricultural landscape of western France (46 ° 09' 13" N; 0° 41' 20" O). Pollen proteins and lipids are expressed as percentage of pollen dry matter. Shannon Weaver index were calculated for each mix, as $H' = -\sum p_i \log_2 p_i$, where p_i was the amount of each pollen species represented in the mixture

Pollen mixes were provided *ad libitum*, but they were not consumed equally by workers (Kruskal-Wallis test, $H = 46.64$, $p < 0.001$, Figure 4). Notably, the mix from “late July” was poorly consumed (less than 4 mg/bee/day), but its average consumption was not different from the mix of “early May” and “early June”.



Most pollen mixes induced slight changes in worker survival (Figure 5). However, workers provided with the “late July” mix exhibited a dramatic reduction of longevity as compared to all others mixes. Similarly, the hypopharyngeal glands development and *vitellogenin* expression were the lowest in the workers fed with the “late July” mix (Kruskal-Wallis test, $H = 31.35$, $p < 0.001$, Figure 6A and ANOVA test, $F = 5.01$, 62 DF, $p < 0.001$, Figure 6B, respectively. Early June, late August and September mixes gave the largest acini, but there was no difference in *vitellogenin* expression between the different mixes besides “late July”. Finally, we found a strong correlation between the level of *vitellogenin* and the survival

recorded as the day at which 50 % of the workers died in each cage) (Spearman coefficient = 0.554, $p < 0.001$).



and 75th percentiles range with line denoting median. Whiskers encompass 90% of the individuals, beyond which each outlier are represented by dots.

4- Discussion

Despite the extreme flexibility of their pollen foraging behavior and the considerable breadth of their pollen diet, it is often believed that the development of intensive agriculture can have negative impacts on honey bee colonies. However, the extent to which the modifications of the floral landscape affect workers is not easy to analyze. Indeed, there are many other sources of variability, beyond resource availability, that can affect bees in the field, such as climate, pests and diseases, genetic, and pesticides (Van Engelsdorp *et al.*, 2009; Van Engelsdorp and Meixner, 2010). Here, by feeding bees in controlled conditions with environmentally relevant diets in standard conditions, we were able to assess the effects of some components of the nutritional stress linked to agrosystems on honey bee health, all other things being equal.

Influence of pollen dearth on nurse worker physiology and survival

Periods of resource shortages are commonly observed in intensive agricultural landscapes between the blooming periods of major mass-flowering crops such as oilseed rape and sunflower (Steffan-Dewenter and Kuhn, 2003; Requier, 2013). It is well-established that the availability of pollen is important for worker survival (Haydack, 1970; Di Pasquale *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014), but we found here that natural shortages of up to 60 % and more can quickly reduce worker survival. As an example, a loss of 10 % of pollen caused an average decrease of 2 - 3 days in bee longevity, indicating that longevity is highly dependent on nutrients quantity and not governed by a threshold model (Figure 2).

Nursing capacities were also affected by pollen shortage. Our results indicate that those capacities are not regulated through quantitative thresholds of pollen availability. This was observed with the development of hypopharyngeal glands (Figure 3A). There was no minimal amount under which, gland did not develop at all and above which glands almost fully developed. Although 7 % of the *ad libitum* consumption did not succeed in initiating the development of glands compared to the controls. The development of hypopharyngeal glands is highly dependent on protein intake (Maurizio, 1950; Pernal and Currie, 2000) so it might not be surprising to find that the more workers consumed pollen, the more proteins were directed to the acini. Fernandes-da-silva and Zucoloto (1993) also tested the effect of pollen on the development of hypopharyngeal glands in the stingless bee *Scaptotrigona depilis* Moure (Hymenoptera, Apidae). By testing three amounts of pollens (0.25 g, 0.50 g and 0.75 g for 8 days), they found that the two lowest amounts were not sufficient for a good development of glands. Based on these results, they calculated that at least 0.80 mg pollen /

day / bee would be necessary to provide sufficient gland development, and this figure was equivalent to the 20 % modality in our tests. Yet in honey bees, access to only 20 % of the full pollen intake resulted in a poor development of hypopharyngeal glands. Similarly, the *vitellogenin* expression tended to increase gradually with the amount of pollen available. Bitondi and Simoes (1996) tested the effects of 0 %, 15 % and 50 % of pollen diet on *vitellogenin* expression level in Africanized honey bees. They found that workers that received 50 % of pollen had more *vitellogenin* than those that received only no or only 15 %, of pollen. This is consistent with our results since the workers that received 15 % and 40 % of pollen expressed significant differences in vitellogenin expression. However, contrary to hypopharyngeal glands, 40 % of pollen was the minimum required for obtaining an expression significantly higher than a pollen-free diet. This indicates that some tissues, like *fat bodies*, the main site of *vitellogenin* synthesis (Amdam *et al.*, 2005) are quantitatively more demanding in nutrients than others (such as hypopharyngeal glands) for initiating a nursing physiology.

Influence of “seasonal” diversity and quality of pollen mixes on nurse worker physiology and survival

Despite major changes in pollen composition and quality of the mixes among the seasons, survival and nursing capacities were weakly affected by the different diets, provided they were found *ad libitum*. However, the “late July” mix consistently caused a significant reduction of longevity and nursing capacities. Those negative effects could be attributed neither to the presence of pesticide residues since this pollen mixture was the only one that was not contaminated by any of the ones assayed (at a detection limit of 0.005 mg / kg), nor to its diversity index, which was above two others diets. It turned out that this mix had the lowest percentage of lipids and proteins, both of which are essential for worker health (Haydock, 1950; Pernal and Currie, 2000; Manning, 2001), and this mix was also the least consumed. The “late July” period corresponded to the flowering of maize (*Zea mays*) in north western of France, as confirmed by the presence of 69.8 % of maize pollen in the mix. Maize produces pollen of poor nutritional quality that is deficient in histidine, although the amount of other essential amino acids can be high (Pernal and Currie, 2000; Höcherl *et al.*, 2012). Its high prevalence in the Late July mix likely accounts for the low quality of this diet. Jacobs (2004) showed that consumption of corn pollen had a negative impact on the longevity of *Apis mellifera L.* bees reared in experimentation cages. Similarly, Höcherl *et al.* (2012) observed that bees fed with maize pollen show a reduction in brood rearing ability and

shortened lifespan. However, they did not find an effect on bee immunocompetence. The availability of different floral resources is expected to compensate for the low quality of specific pollens (Di Pasquale *et al.* 2013). However, the predominance of maize pollen did not allow such phenomenon. Either the flowering landscape did not provide enough qualitative resources (forcing bees to forage mostly on maize), or this pollen, despite its low nutritional quality, is too attractive for colonies during this period of late July.

The variability of nutritional landscape in agrosystems can expose bees to dearth periods and / or deficiency in diet quality. As a consequence, such nutritional stress can directly impact bee longevity and nursing capacities. In field conditions, it could lead to a higher turn-over between cohorts of bees and a suboptimal brood rearing by malnourished nurses (Loper and Berdel, 1980b). The colony productivity can then be affected. Providing bees with a great diversity of floral resources, such as grass strips, fallow land, or a semi-natural environment, represents one way to overcome any nutritional stress across the seasons (Decourtye *et al.*, 2010).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Community program for the French beekeeping (Feaga) who has founded the study.

Annexes du chapitre 2

1-naphtyl	Desmedipham	Fuberidazole	Picoxystrobine
2-Phenylphenol	Desmetryn	Furalaxyl	Pinoxadene
Acephate	Diafenthion	Furathiocarb	Piperonyl
Acetamipride	Dialifos	Halosulfuron-methyl	Pirimicarb
Aclonifen	Diallate	HCB	Pirimiphos-ethyl
Acrinathrine	Diazinon	HCH	Pirimiphos-methyl
Alachlore	Dichlobenil	HCH	Prochloraz
Aldicarb	Dichlofenthion	Heptachlore	Procymidone
Ametryn	Dichlofluanide	Heptenophos	Profenophos
Amitraze	Dichlorvos	Hexaconazole	Prometryn
Anthraquinone	Diclobutrazol	Hexazinone	Propachlor
Atrazine	Diclofop-methyl	Hexythiazox	Propamocarb
Azaconazole	Dicofol	Hydramethylnon	Propanil
Azimsulfuron	Dieldrin	Imazalil	Propaquizafop
Azinphos-ethyl	Diethofencarb	Imazaquin	Propargite
Azinphos-methyl	Difenacoum	Imidachlopride	Propazine
Azoxystrobine	Difenoconazole	Indoxacarb	Propetamphos
Benalaxyl	Di flufenican	Iodofenphos	Propham
Benfluraline	Dimetachlor	Iprodione	Propiconazole
Benfuracarb	Dimethenamid-P	Iprovalicarb	Propoxur
Benoxacor	Dimethoate	Isofenphos-ethyl	Propyzamide
Bensulfuron-methyl	Dimethomorphe	Isofenphos-methyl	Prosulfocarb
Benthiavalicarb-isopropyl	Diniconazole	Isopropaline	Prosulfuron
Bifenazate	Diphenylamine	Isoprothiolane	Prothioconazole
Bifenox	Disulfoton-sulfone	Isoproturon	Prothiophos
Bifenthrine	Diuron	Isoxaflutole	Prothoate
Biphenyl	DMST	Isoxathion	Pyraclostrobine
Bispyribac-Sodium	Dodine	Kresoxim-methyl	Pyraflufen-ethyl
Bitertanol	Edifenphos	Lenacil	Pyrazophos
Boscalide	Emamectin	Linuron	Pyridaben
Bromacil	Endosulfan	Lufenuron	Pyridaphenthion
Bromophos-ethyl	Endrin	Malathion	Pyridate
Bromophos-methyl	Epoxyconazole	Mandipropamide	Pyrimethanil
Bromopropylate	EPTC	Mecarbam	Pyriproxyfen
Bromuconazole	Ethidimuron	Mepanipyrim	Quinalphos
Bupirimate	Ethion	Mesosulfuron	Quinomethionate
Buprofezin	Ethoprophos	Metalaxyl	Quinoxifen
Butafenacil	Ethoxyquin	Metamitron	Quintozene
Butoxycarboxim	Etoxazole	Metazachlor	Quizalofop-ethyl
Butralin	Etrimphos	Metconazole	Rotenone
Buturon	Famoxadone	Methabenzthiazuron	Sebuthylazine
Cadusaphos	Famphur	Methamidophos	Simazine
Captafol	Fempropathrine	Methidathion	Spinosad
Captan	Fenamidone	Methiocarb-sulfoxide	Spirodiclofen
Carbaryl	Fenamiphos	Methomyl	Spiromesifen
Carbendazim	Fenamiphos-sulfone(+sulfoxide)	Methoxychlor	Spiroxamine
Carbetamide	Fenarimol	Methoxyfenozide	Sulfosulfuron
Carbofenothon	Fenazaquin	Metobromuron	Sulfotep
Carbofuran	Fenbuconazole	Metolachlor	TCMTB
Carbosulfan	Fenchlorphos	Metoxuron	Tebufenozide
Carboxin	Fenitrothion	Metrafenone	Tebufenpyrad

Table S1. List of pesticides analyzed in the pollen diets.

Chapitre 3:

**Influence of pollen nutrition on honey bee
health: Do pollen quality and diversity matter?**

Avant-propos du chapitre 3

Les résultats obtenus dans le chapitre précédent mettent en évidence l'importance de la quantité du pollen sur le développement et la survie des abeilles. De plus, ils permettent de confirmer les suppositions faites sur un potentiel stress impliqué par les périodes de pénuries observées en paysage d'agriculture intensive. Les conséquences directes de ce stress étant une perturbation de la physiologie des abeilles nourrices, et une diminution de leur survie. Indirectement, cela peut impliquer des perturbations sur l'organisation de la colonie, et un déclin de la survie de la colonie. De même, contrairement à Höckerl *et al.* (2012), nous démontrons clairement qu'un mélange de pollen récolté en période de floraison de maïs est de valeur nutritionnelle trop faible pour permettre à l'abeille un développement optimum. La qualité du pollen est donc un facteur important à prendre en compte dans l'étude de l'alimentation pollinique et des effets qu'elle peut avoir sur la santé de l'abeille. Dans cette partie, la diversité ne semble pas apporter de plus-value à l'abeille.

Cette étude nous a permis d'en savoir un peu plus sur l'importance de la quantité, de la qualité, et de la diversité pollinique sur le développement et la survie des abeilles domestique en conditions réelles. Dans le prochain chapitre, nous sommes allés un peu plus loin dans la détermination de l'influence de la qualité et de la diversité pollinique sur la santé de l'abeille. Pour cela, nous avons analysé la taille des glandes, et les taux de deux gènes (*vitellogénine* et *transferrine*) en fonction de la valeur nutritionnelle de pollens monofloraux, ou d'un mélange. Mais nous ne tenons compte ici que du stress qu'impliquent des variations dans la disponibilité du pollen. Or, de nombreux stress sont présents dans l'environnement, et ont de fortes incidences sur la santé de l'abeille et sa survie (Van Engelsdorp *et al.* 2009). Parmi eux, le parasite *Nosema ceranae*. Ce parasite très présent dans les ruchers apicoles français (Chauzat *et al.*, 2007) se développe dans l'intestin des abeilles, provoquant des conséquences multiples et variées. Après la germination de la spore et l'introduction de son sporoplasme dans le cytoplasme de la cellule hôte, une série d'altérations morphologiques et physiologiques sont visibles dans les cellules de l'épithélium de l'intestin (García-Palencia *et al.*, 2010 ; Dussaubat *et al.*, 2012). De plus, la microsporidie cause des stress énergétiques chez son hôte en capturant l'ATP de son environnement cellulaire. La microsporidie ne possédant pas de mitochondrie mais un organe réduit dénommé « mitosome » qui au cours de l'évolution a perdu la fonction de respiration cellulaire (Williams, 2009), elle doit s'entourer des mitochondries de son hôte pour pouvoir se développer et se multiplier (Higes *et al.*, 2007). En ce qui concerne les effets sur la survie des abeilles, les scientifiques n'ont pu trancher sur le degré de virulence de ce parasite (Higes *et al.*, 2007 ; Higes *et al.*, 2008a ; Martín-Hernández *et al.*, 2009; Van Engelsdorp *et al.*, 2009; Alaux *et al.*, 2010b; Forsgren et Fries, 2010; Chauzat *et al.*, 2010 ; Vidau *et al.*, 2011). Les mécanismes de défense des abeilles aux pathogènes comprennent deux stratégies principales : la résistance et la tolérance. La résistance s'exprime par la construction de barrières qui empêchent l'infection ou par l'activation de réponses de défense lorsque l'infection a eu lieu, alors que la tolérance vise à compenser le coût énergétique ou le dommage tissulaire provoqué par le pathogène ou par l'activation de la réponse immune de l'hôte (Evans et Spivak, 2010). Chez les insectes, les barrières sont la cuticule et les membranes épithéliales qui dans de nombreux cas évitent l'adhérence et l'entrée des microbes dans le corps. Ce type de défense a déjà fait l'objet d'études (Dussaubat *et al.*, 2012). C'est pourquoi dans un second temps, nous avons déterminé dans quelles mesures l'alimentation pollinique peut renforcer la résistance ou la tolérance de *A. mellifera* L. en présence du stresser, sur l'activité d'enzymes impliquées dans l'immunité ou la détoxification de l'abeille, ainsi que sur sa survie.

Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter?

Published in Plos one, 2013, 8(8): e72016

Garance Di Pasquale^{1, 2}, Marion Salignon³, Yves Le Conte^{1, 3}, Luc P. Belzunces^{1, 3}, Axel Decourtye^{1, 2}, André Kretzschmar^{1, 4}, Séverine Suchail⁵, Jean-Luc Brunet^{1, 3}, Cédric Alaux^{1, 3}

¹UMT, Protection des Abeilles dans l'Environnement, CS 40509, 84914 Avignon, France

²ACTA, Site Agroparc, 84914 Avignon, France

³INRA, UR 406 Abeilles et Environnement, CS 40509, 84914 Avignon, France

⁴INRA, UR 546 Biostatistique et Processus Spatiaux, CS 40509, 84914 Avignon, France

⁵ Université d'Avignon et des pays du Vaucluse, UMR 7263 Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, Pôle Agrosiences, 84914 Avignon, France

Abstract

Honey bee colonies are highly dependent upon the availability of floral resources from which they get the nutrients (notably pollen) necessary to their development and survival. However, foraging areas are currently affected by the intensification of agriculture and landscape alteration. Bees are therefore confronted to disparities in time and space of floral resource abundance, type and diversity, which might provide inadequate nutrition and endanger colonies. The beneficial influence of pollen availability on bee health is well-established but whether quality and diversity of pollen diets can modify bee health remains largely unknown.

We therefore tested the influence of pollen diet quality (different monofloral pollens) and diversity (polyfloral pollen diet) on the physiology of young nurse bees, which have a distinct nutritional physiology (e.g. hypopharyngeal gland development and *vitellogenin* level), and on the tolerance to the microsporidian parasite *Nosema ceranae* by measuring bee survival and the activity of different enzymes potentially involved in bee health and defense response (glutathione-S-transferase (detoxification), phenoloxidase (immunity) and alkaline phosphatase (metabolism)). We found that both nurse bee physiology and the tolerance to the parasite were affected by pollen quality. Pollen diet diversity had no effect on the nurse bee physiology and the survival of healthy bees. However, when parasitized, bees fed with the polyfloral blend lived longer than bees fed with monofloral pollens, excepted for the protein-richest monofloral pollen. Furthermore, the survival was positively correlated to alkaline phosphatase activity in healthy bees and to phenoloxydase activities in infected bees. Our results support the idea that both the quality and diversity (in a specific context) of pollen can shape bee physiology and might help to better understand the influence of agriculture and land-use intensification on bee nutrition and health.

1- Introduction

By ensuring reproduction of many plants, pollinators, like honey bees, are essential to the functioning of natural and agricultural ecosystems (Klein *et al.*, 2007; Gallai *et al.*, 2009; Morse, 1911). In turn, pollinators benefit from this pollination service by harvesting the nutrients (nectar and pollen) required for their growth and health. For example, in honey bees, floral nectar, containing carbohydrates and stored as honey, is the energetic fuel of individuals, and pollen provides most of the nutrients required for their physiological development (Brodschneider and Crailsheim, 2010). The development and the survival of honey bee colonies are therefore intimately associated with the availability of those environmental nutrients (Brodschneider and Crailsheim, 2010; Keller *et al.*, 2005; Haydack, 1970), which suggests that the alteration of bee foraging areas due to the current intensification of agriculture and landscape changes might provide a deficient nutrition and therefore affect honey bee populations (Decourtye *et al.*, 2010; Naug, 2009). This is further supported by beekeepers, who are ranking poor nutrition and starvation as two of the main reasons for colony losses (Van Engelsdorp *et al.*, 2008). Therefore, studying the link between nutrient availability and bee health might help to better understand the current bee losses

observed throughout the world (Neumann and Carrek, 2010). Among those flower nutrients, pollen, which is virtually the main source of proteins, amino acids, lipids, starch, sterols, vitamins and minerals (Roulston and Buchmann, 2000; Stanley and Linskens, 1974), is a major factor influencing the longevity of individuals (Haydack, 1970). Pollen is also important at the colony level, since it enables the production of jelly by young workers that is used to feed larvae, the queen, drones and older workers (Crailsheim *et al.*, 1992; Crailsheim, 1992). Therefore, a direct consequence of nutritional deficiency (pollen shortage) is a decrease in the colony population (Keller *et al.*, 2005) and likely a deficient health of individuals, which could also affect the resistance threshold of bees to other stress (pathogens or pesticides) (Van Engelsdorp *et al.*, 2008; Le conte *et al.*, 2011). Indeed, pollen intake is known for influencing the physiological metabolism (Alaux *et al.*, 2011; Ament *et al.*, 2011), immunity (Alaux *et al.*, 2010a), the tolerance to pathogens like bacteria (Rinderer *et al.*, 1974), virus (Degrandi-Hoffman *et al.*, 2010) and microsporidia (Rinderer *et al.*, 1977) and reducing the sensitivity to pesticides (Wahl and Ulm, 1983). However, honey bees rarely face a total lack of pollen in their environment but are rather confronted with variability in time and space of pollen resource abundance, type and diversity. In addition, pollens can differ between floral species regarding their nutritional contents (Roulston and Cane, 2000; Herbert and Shimanuki, 1978; Odoux *et al.*, 2012) suggesting that some are of better quality for bees than others. Therefore, studying the influence of pollen intake on bee health requires also taking into account the quality and diversity of pollen diets. Despite some studies showed that pollen quality can affect the longevity of bees (Schmidt *et al.*, 1987, 1995; Standifer, 1967; Maurizio, 1950) and the hypopharyngeal gland development (Standifer, 1967; Pernal and Currie, 2000) and, more recently, that pollen diversity might improve some immune functions (Alaux *et al.*, 2010a), our knowledge of the influence of quality and diversity of pollen diets on bee health is rather limited.

To improve our knowledge on this topic, the influence of pollen diet quality and diversity was tested on nurse physiology and the tolerance to a parasite. Since pollen is essentially consumed by young nurse bees, they have a very specific nutritional physiology with large lipid and protein stores (see Amdam and Page, 2010; Ament *et al.*, 2010 for reviews). Notably, pollen intake enables the development of their hypopharyngeal glands, where digested pollen nutrients are used to produce jelly, a proteinaceous glandular secretion shared with nestmates (Crailsheim *et al.*, 1992; Crailsheim, 1992). Nurse bee physiology was thus assessed by determining the development of the hypopharyngeal glands but also the gene expression level of *vitellogenin*, which is highly expressed in nurses as compared to foragers

(Amdam *et al.*, 2004b), and encodes a major protein produced in the fat body and used for jelly production (Amdam *et al.*, 2003). This gene, that can be nutritionally regulated (Alaux *et al.*, 2011; Ament *et al.*, 2011), also slows down aging (Seehus *et al.*, 2006) and is involved in the regulation of cellular immune functions (Amdam *et al.*, 2004a). We included the analysis of the gene *transferrin*, an iron transport protein also produced in the fat body, and involved in ovary development (Koywiwattrakul *et al.*, 2005 et 2009; Nino *et al.*, 2013) and immune response (Kucharski and Maleszka, 2003), like *vitellogenin*. However, it is not known whether it is nutritionally regulated, which will be tested through this study. Finally, the tolerance to parasitism was tested using the highly prevalent microsporidia *Nosema ceranae*, a gut parasite that might play a role in colony losses or honey bee weakening (Fries, 2010; Paxton, 2010; Higes *et al.*, 2010, 2013). For that purpose, we assessed the effects of pollen diet and parasite on bee survival and on physiology by measuring the activity of glutathione-S-transferase (GST), phenoloxidase (PO) and alkaline phosphatase (ALP). GSTs are important in the detoxification of endogenous and exogenous compounds (Sies, 1997) and can be induced in insect gut after bacterial infection, suggesting a protective role against pathogens (Buchon *et al.*, 2009). In addition, previous studies showed a higher GST activity after *Nosema* infection in bees (Vidau *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2012). PO plays an important role in insect immunity by encapsulating pathogens (e.g. bacteria and fungi) and repairing tissues via melanogenesis (Gonzales-Santoyo and Cordoba-Aguilar, 2012), and ALP, involved in many metabolic processes, is highly expressed in insect gut and plays a pivotal role in intestine health in mammals (Lallès, 2010).

2- Materials and methods

Pollen diet composition and nutritional factors

The effects of pollen quality and diversity were tested by feeding bees with monofloral diets that differed regarding their nutritional properties or a polyfloral diet composed of the different monofloral pollens. Four blends of wild flower pollens with a respective predominance of *Cistus*, *Erica*, *Castanea* and *Rubus* pollens were purchased fresh from Pollenergie® (France) and stored at - 20°C. Pollen pellets were collected from pollen traps at the hive entrance. Monofloral pollen diets of *Cistus*, *Erica*, *Castanea* and *Rubus* were obtained by sorting by color the pellets of the predominant pollen from each blend. Palynological tests were then performed to validate the genus of each sorted pollen. The

polyfloral pollen diet was composed of a mixture of the four monofloral pollens (25 % of each according to their weight).

To assess the nutritional quality of each pollen diet, we analyzed their protein, amino acid, lipid and sugar contents, as well as their antioxidant capacities. The protein content was determined by microkjeldahl analysis ($N \times 6.25$) using a Vapodest 45 (Gerhardt) and according to the procedure ISO 5983-2 (1997). Total lipids were analyzed after the disruption of pollen wall using an acid hydrolysis with hydrochloric acid (HCl 6N). Then lipids were extracted with a chloroform/methanol mixture (2:1, v / v) following the method of Folch et al. (1957). The protein and lipid contents were expressed as percent of dry matter, which was determined after drying the pollen for 24 h at 75°C (Louveaux, 1959). The nature and the concentrations of amino acids were determined in 20 mg of pollen with the ion-exchange chromatography technique using an automated amino acid analyzer according to the procedure EC 152/2009 (2009). The Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method with AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride) as a free-radical generator was used, as described by Ou *et al.* (2001), to measure the antioxidant capacity in 1 g of each pollen. The antioxidant trolox was used as a standard and thus the data expressed as trolox equivalent. To qualitatively measure sugar contents the pollens were dehydrated for 48 h at 35°C. Thirty mg of pollen were weighed and 1000 µl of Ultrahigh-quality water (18.2mΩ) were added. The content was passed with a Hamilton syringe through a 0.2 µm filter (Millex LG CI, 0.2 microns; Millipore) and injected into HPAEC Dionex ICS- 3000 equipment. Separation of carbohydrates was carried out on a CarboPac PA-1 guard column (4 x 50 mm) and a CarboPac PA-1 anion-exchange column (4 x 250 mm) after two-fold dilution. The quantitative determination of carbohydrates was carried out by pulsed amperometric detection (Baude et al., 2011). The presence of pesticide residues in the different pollen diets was assessed via gas and liquid chromatography with a limit of quantification of 0.01 mg / kg and a limit of detection of 0,005 mg / kg following the AFNOR 15662 procedure (2009) (List of analyzed pesticides in Table S1).

Bee rearing and feeding

To control the pollen intake, the experiments were performed on 1-day-old bees (*A. mellifera* L.) reared in cages (10.5 cm x7.5 cm x11.5 cm). Age-matched bees were obtained by placing honeycombs containing late-stage pupae into an incubator at 34°C and 50 – 70 % of humidity, and collecting bees that emerged within 10 hours. They originated from three colonies and were mixed before placing them in cages. The caged bees, kept in an incubator (34°C and 50

– 70 % of humidity), were provided *ad libitum* with candy (Apifond® + powdered sugar) and water. Groups of bees were fed with one of the following monofloral pollen diets: *Erica*, *Cistus*, *Rubus* or *Castanea*, a mixture of the four pollens (polyfloral diet) or did not receive any pollen. Pollen diets were prepared by mixing pollen with water at the mass ratio of 10 / 1 (pollen / water) and were freshly prepared and replaced every day for 7 days. To prevent a potential nutritive compensation of bees fed with one of the pollen diet, they were not provided with *ad libitum* pollen but with determined quantity of pollen each day: 4 mg / bee the first two days, 5 mg / bee the next two days, 3 mg / bee the fifth day, and 2 mg/bee the last two days. Those quantities were determined through preliminary experiments and represent the minimal consumption of all pollens on each day; and as previously found pollen consumption varies with age of the bees (increased the first days and then decreased) (Brodschneider and Crailsheim, 2010 ; Pernal and Currie, 2000). Using this method, bees were provided with the same quantity of each pollen diet and consumed all of it on each day. Since some bees died during the pollen feeding period (7 days), the pollen quantities were adjusted each day to the number of surviving bees.

Influence of pollen quality and diversity on bee nurse physiology

Groups of 35 one-day old bees were placed in cages and reared for 7 days with one of the pollen diet. On day 8, they were flash frozen in liquid nitrogen and stored at – 80°C for subsequent physiological analyses. The experiment was repeated 14 times per pollen diet.

Development of hypopharyngeal glands

The right and left glands from five bees per cage were dissected on ice in 100 µl of physiological serum (0.9 % NaCl). Both glands were slide-mounted and analyzed under an optical microscope coupled to a CF 11 DSP camera (Kappa). The gland development was assessed by measuring the maximum diameter of 15 randomly chosen acini per gland (n = 30 acini per bees) (Crailsheim and Stolberg, 1989) with the Saisam 5.0.1 software (Microvision®).

Abdomen gene expression

The abdomens of 10 bees per cage were homogenized in 1 ml of Trizol reagent (Invitrogen®) with a TissueLyser (Qiagen®) (4x30 s at 30 Hz). The mixture was incubated for 5 min at room temperature and after centrifugation (12,000 g for 30 s at 4°C) 500 µl of the supernatant was used for RNA extraction. One hundred µl of Chloroform (Sigma®) were added and the solution was incubated for 3 min and centrifuged (12,000 g for 15 min at 4°C). The aqueous phase was mixed with an equal volume of 70% ethanol (Sigma®) and transferred into a

Qiagen RNeasy column. RNA extraction was carried out as indicated in the Qiagen RNeasy kit for total RNA with on-column DNase I treatment (Qiagen®). For cDNA synthesis, 1,000 ng of RNA per sample were reverse-transcribed using the High capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems). cDNA samples were diluted ten-fold in molecular grade water. The expression level of *vitellogenin* and *transferrin* was determined by quantitative PCR using a StepOne-Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®) and the SYBR green detection method including the ROX passive reference dye. Three µl cDNA were mixed to 5 µl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 1 µl of forward primer (10 µmol) and 1 µl of reverse primer (10 µmol) of candidate genes. Cycle threshold (Ct) values of selected genes were normalized to the housekeeping gene *Actin* using the comparative quantification method (delta Ct method). Primer sequences (5'–3') were: *vitellogenin* forward: TTGACCAAGACAAGCGGAAGT, reverse: AAGGTTCGAATTAACGATGAA (Fischer and Grozinger, 2008) ; *transferrin* gene: forward: AGCGGCATACTCCAGGGAC, reverse: CGTTGAGCCTGATCCATACGA (Thompson et al., 2007); *Actin* forward: TGCCAACACTGTCCTTTCTG, reverse: AGAATTGACCCACCAATCCA.

Influence of pollen quality and diversity on bee tolerance to Nosema ceranae

For the experiment on bee tolerance to *Nosema ceranae*, groups of 70 one-day old bees were placed in cages and reared for 7 days with one of the pollen diet. For each pollen diet, one group was infected with *Nosema* and one group was *Nosema*-free, giving 12 treatment groups. On day 10, 28 bees per cage were flash frozen in liquid nitrogen and stored at - 20°C until analysis of glutathione-S-transferase, alkaline phosphatase and phenoloxidase. The other 42 bees were used to determine the influence of pollen diet and *Nosema ceranae* on bee survival. Dead bees were counted daily and removed from the cages until half of the bees had died. The experiment was repeated 9 times per treatment group (pollen diet, *Nosema* infection).

Bee infection with *Nosema ceranae*

Nosema spores were isolated from infected colonies. Ten abdomens of forager bees were crushed in 2 µl of distilled water using an electric grinder (Ultra Turrax ® T18 basic, IKA®). Homogenates were then filtered with paper Whatman No. 4, and the filtrate was supplemented with 10 ml of distilled water. Solutions were centrifuged three times at 800 g for 6 minutes and each time the spore pellet was resuspended in 10 ml of distilled water. Species identification was performed as in Alaux et al. (Alaux et al., 2010b) and the spore concentration was determined using a haemocytometer. To equally infect bees with a *Nosema ceranae* inoculum, bees were fed individually with 2 µl of freshly prepared 50 % sucrose

solution containing 100,000 spores, which is known to cause an infection in worker bees (Malone and Gatehouse, 1998, Higes *et al.*, 2007; Forsgren and Fries, 2010). Control bees were fed with a sucrose solution. At the end of the experiment, the guts of the bees were analyzed: no spores were found in the control bees but the infected bees were heavily parasitized (data not shown).

Enzyme analysis

Enzyme activities were assayed in different bee tissues: GST in the gut and head, ALP in the gut and PO in the abdomen devoid of gut. All analyses were performed on 3 pools of 3 bees per cage and in triplicate. Samples were homogenized at 4°C with TissueLyser (Qiagen®) (5x10 s at 30 Hz) in the extraction buffer (10 mM NaCl, 1 % (w/v) Triton X-100, 40 mM sodium phosphate pH 7.4, containing a mixture of 2 mg / ml of antipain, leupeptin and pepstatin A, 25 units / ml of aprotinin and 0.1 mg/ml of trypsin inhibitor) based on the weight of each pool (10 % w/v extract). The homogenate was then centrifuged at 4°C for 20 min at 15,000 g. The enzymatic activities in supernatant were assayed in microplates with a BioTek Synergy HT100 spectrophotometer (BioTek Instruments®). GST was assayed in a reaction medium (200 µL final volume) containing 10 µl of tissue extract and 1 mM EDTA, 2.5 mM reduced glutathione, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 100 mM Na / K-phosphate pH 7.4. GST activity was followed spectrophotometrically at 340 nm by measuring the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with reduced glutathione for 5 min at 25°C. ALP was assayed in a reaction medium (200 µL final volume) containing 10 µl of tissue extract and 20 mM of MgCl₂, 2 mM of *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate and 100 mM Tris-HCl pH 8.5 (Bounias *et al.*, 1996). ALP activity was followed by measuring *p*-nitrophenyl phosphate hydrolysis at 410 nm for 5 min at 25°C. PO was assayed in a reaction medium (200 µL final volume) containing 50 µl of tissue extract and 200 mM NaCl, 0,4 mg / mL L-Dopa (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine), 100 mM sodium phosphate pH 7.2). PO activity was followed at 490 nm by measuring the conversion of L-Dopa to melanin for 10 min (Alaux *et al.*, 2010b).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the statistical software R (2013). Since the data were not normally distributed, the influence of pollen quality and diversity on hypopharyngeal gland development, *vitellogenin* and *transferrin* expressions, and enzymatic activities was analysed using Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison tests. To analyze survival data obtained during the 50 days of experiment, we transformed the data in survival table and the remaining bees were considered alive at the day 50. Consequently, we used a Cox

proportional hazards regression model, with R functions (coxph) and the package [survival] (Cox, 1972) to analyze the effect of *Nosema*, pollen and *Nosema* x pollen interaction on bee survival. Then, the effects of *Nosema* for each pollen diet and the effect of each pollen in non- and *Nosema*-parasitized bees on bee survival were tested. For *Nosema*-parasitized and non-parasitized bees, the influence of pollen diets on enzyme activities was determined using Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison tests. For each pollen diet, the effect of *Nosema* parasitism on enzymes activities was analyzed using Mann-Whitney U tests. Finally, in order to better understand the underlying mechanisms of bee longevity, we assessed the link between LT50 (day on which 50 % of the bees had died in each cage based on the raw data) and enzyme activities (average value of the 3 analyzed pools per cage) using Spearman correlation for healthy and parasitized bees.

3- Results

Pollen diet nutritional factors

The nutritional value of each pollen was characterized before testing their effects on bees (Table 1). We did not detect the presence of pesticides in the four pollens that composed the different diets (Table S1). Contrary to lipids and sugars, the levels of proteins, amino acids and antioxidant capacity varied greatly between pollens. Therefore, pollen diets could be ranked according to their protein content as follows (from the poorest to the richest): *Cistus*, *Erica*, Mix (25% of each pollen), *Castanea* and *Rubus*. Exactly the same trend was found when looking at amino acids and antioxidants levels. The difference between *Cistus* and *Rubus* was especially striking with the latter having about twice as many proteins and amino acids, and almost five times greater antioxidant capacity. However, the lipid and sugar contents, which did not vary as much, followed different patterns. For example, *Erica* pollen was the richest in lipids but the poorest in sugars, and the other way round for *Rubus* pollen. All pollen diets contained the same amino acids including the 10 essential amino acids required for the bee adult development (de Groot, 1953): arginine, histidine, lysine, tryptophan, phenylalanine, methionine, threonine, leucine, isoleucine, and valine (Table S2). As for protein contents, most amino acids were in lower amounts in the *Cistus* pollen (notably the 10 essential amino acids) and in higher amounts in the *Rubus* pollen, whereas *Erica* and *Castanea* pollens had intermediary levels. Only proline was at the highest amount in *Cistus* pollen.

Regarding individual sugars, only glucose and fructose were found in all pollens (Table S3). Trehalose, a major hemolymph sugar of bees, was present in *Cistus* and *Castanea* pollens. Finally, erlose was only found in *Castanea* pollen, which contained all analyzed sugars.

Pollen diets	Proteins (%)	Lipids (%)	Sugars (%)	Amino acids (g)	Antioxidants (μmol)
<i>Cistus</i>	12	6.9	5.2	11.9	103
<i>Erica</i>	14.8	7.4	4.8	16.27	196
<i>Castanea</i>	21.6	6.6	5.0	18.68	399
<i>Rubus</i>	22	6.4	6.7	19.98	475
<i>Mix</i>	17.6	6.8	5.4	16.71	293

Table 1: Nutritional factor contents in the different pollen diets. *Mix* indicates the pollen diet composed of 25% of each monofloral pollen. Pollen proteins, lipids and sugars are expressed as percent of pollen dry matter. The antioxydant power is expressed in μmol of Trolox equivalent/g of pollen. The amino acids are expressed in g / 100g of pollen.

Influence of pollen quality and diversity on nurse bee physiology

Pollen feeding modified the hypopharyngeal glands development (Kruskal-Wallis test, $H = 143.84$, $p < 0.001$; Figure 1A), which was reduced in bees reared without pollen but varied depending on pollen quality, since acini were more developed in bees fed with *Rubus* pollen compared to bees fed with *Cistus* and *Erica* pollen (Figure 1A). The gland development of bees fed with the polyfloral blend was not different from bees provided with the monofloral diets (139.5 ± 2.3 μm) but was almost equal to the average gland development induced by the four diets (137.5 ± 4.1 μm).

The expression level of *vitellogenin* and *transferrin* was significantly affected by the different pollen diets (*vitellogenin*: Kruskal-Wallis test, $H = 43.13$, $p < 0.001$, Figure 1B; *transferrin*: Kruskal-Wallis test, $H = 42.31$, $p < 0.001$, Figure 1C), with a higher expression in bees fed with pollen than in bees that did not receive pollen (Figure 1C). Interestingly, the quality of pollen diet also shaped the expression of both genes since *Erica* and *Rubus* pollen triggered

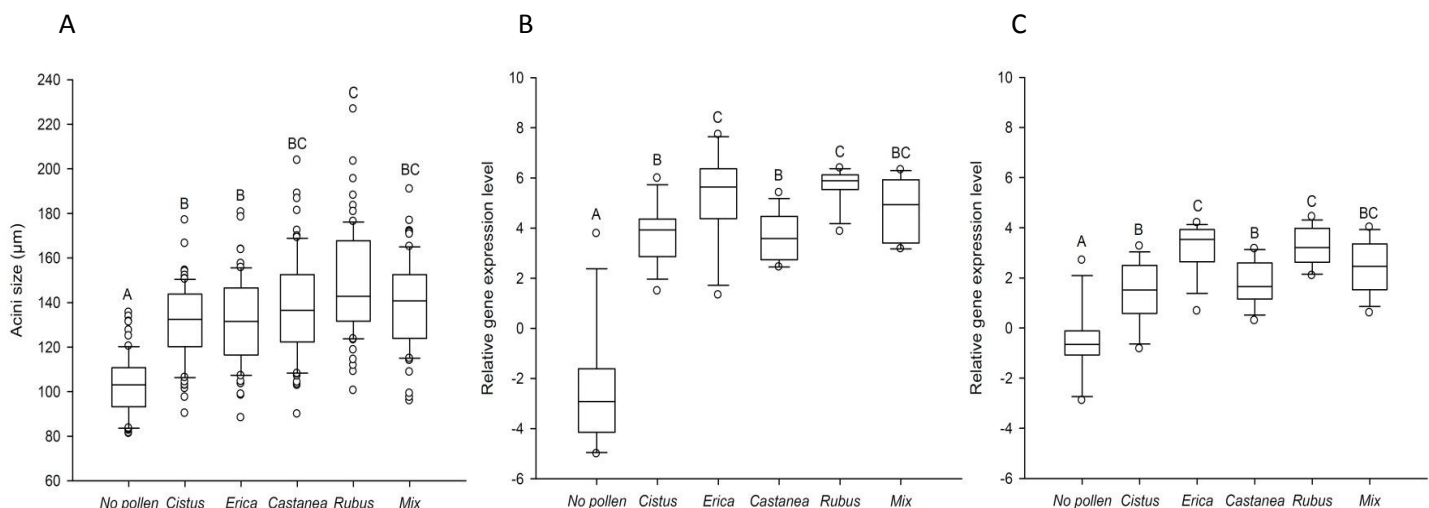
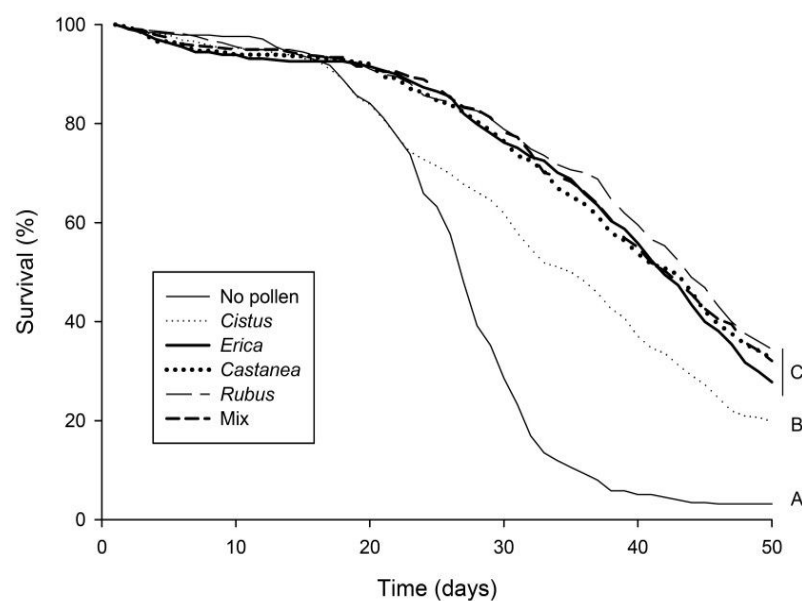


Figure 1: Effects of pollen quality and diversity on nurse physiology. (A) Size of hypopharyngeal gland acini, (B) *vitellogenin* and (C) *tansferrin* expression levels. Box plots are shown for 5 and 10 bees/replicate for the glands and each gene, respectively (n=14 replicates giving 70 and 140 bees/pollen diet for the glands and each gene, respectively). Different letters indicate significant differences between pollen diets ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison tests). Boxes show 25th and 75th percentiles range with line denoting median. Whiskers encompass 90 % of the individuals, beyond which each outliers are represented by circles.

Influence of pollen quality and diversity on bee tolerance to Nosema ceranae

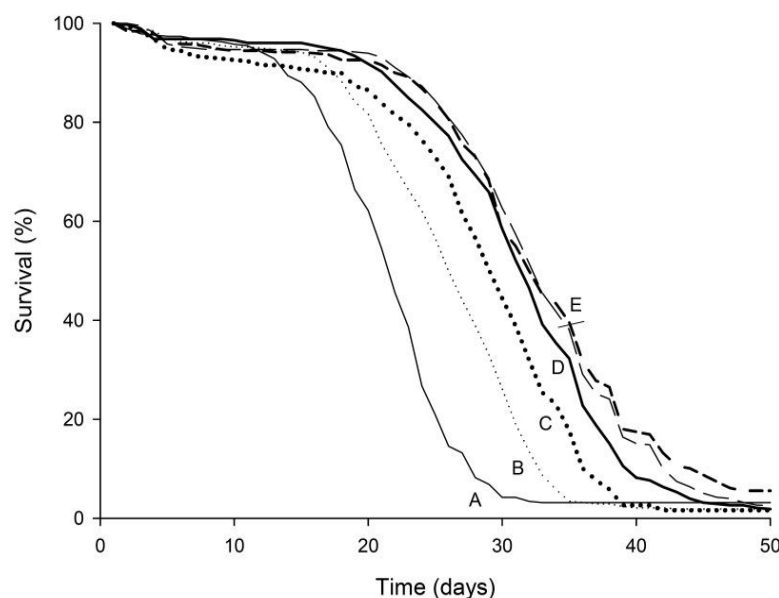
Nosema par

(Cox model, the type of p survival of b a significant the *Cistus* p healthy bees observed a parasitized b *Castanea* < significantly no significar



respectively egardless of modified the ar, we found . Except for survival of . Indeed, we survival of en: *Cistus* < blend lived ut there was e 2).

A



B

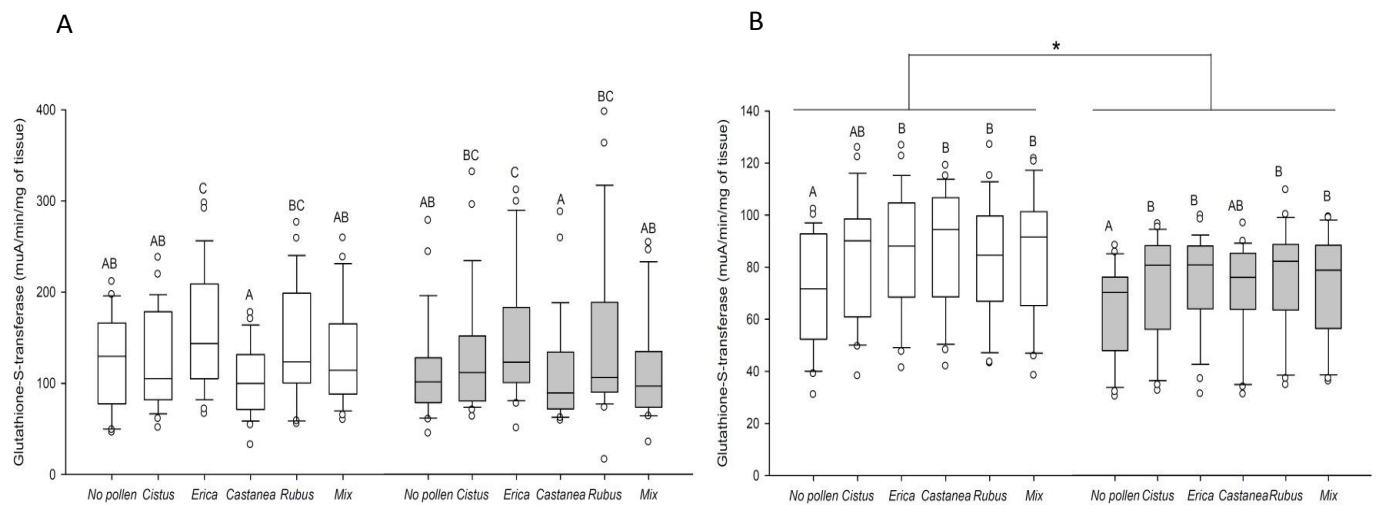
Figure 2: Effects of pollen diet and *Nosema ceranae* infection on bee survival. Data show the percentage of survival over 50 days for (A) non-parasitized and (B) *Nosema*-parasitized bees (9 replicates / pollen diet). Different letters denote significant differences between pollen diets in non-parasitized or *Nosema*-parasitized bees ($p < 0.05$, Cox proportional hazards regression model).

	<i>Cistus</i>	<i>Erica</i>	<i>Castanea</i>	<i>Rubus</i>	Mix
A					
No pollen	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<i>Cistus</i>		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<i>Erica</i>			0.47	0.1	0.35
<i>Castanea</i>				0.36	0.84
<i>Rubus</i>					0.47
B					
No pollen	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<i>Cistus</i>		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<i>Erica</i>			<0.0001	0.047	0.007
<i>Castanea</i>				<0.0001	<0.0001
<i>Rubus</i>					0.42

Table 2: Comparative effects of pollen diets on the survival of (A) non- and (B) *Nosema*-parasitized bees. P-values from the Cox proportional hazards regression model are reported.

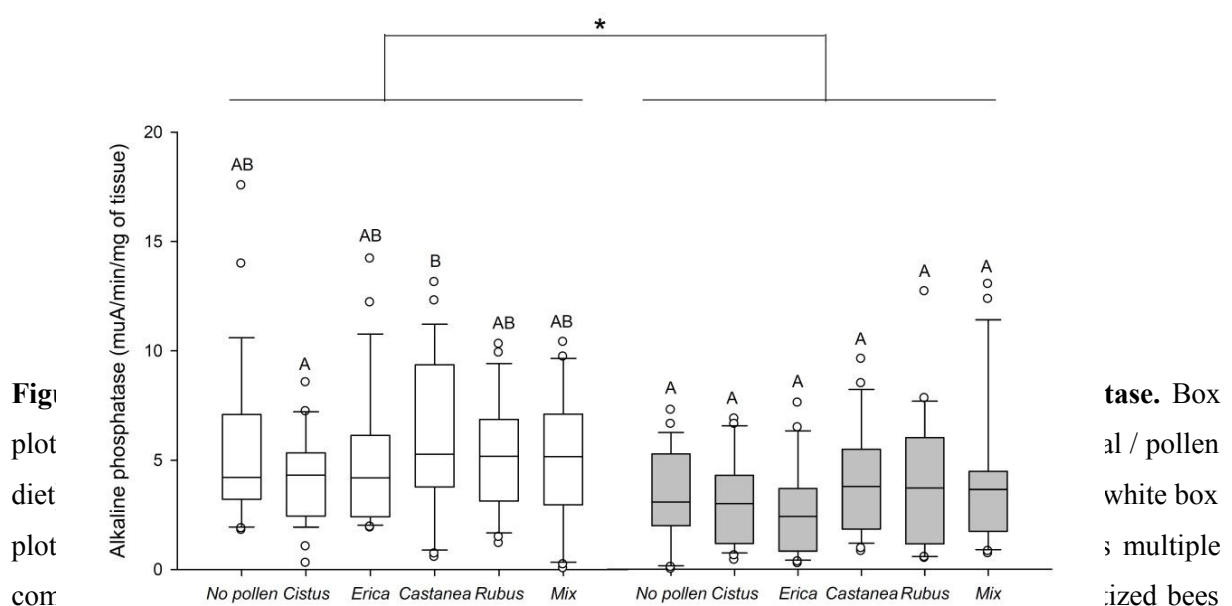
When looking at the bee physiology, *Nosema* did not affect gut GST activity (Figure 3A). However, pollen diets did modify GST level in both healthy and parasitized bees (Kruskal-Wallis test, $H=35.73$, $p<0.001$ and Kruskal-Wallis test, $H=32.73$, $p<0.001$, respectively, Figure 3A) and the highest activity was observed with *Erica* pollen diet (Figure 3A). In the head, GST activity was significantly lower in bees infected with *Nosema* (Fig. 3B) but was higher in bees fed with pollen regardless of exposure to *Nosema* (Kruskal-Wallis test, $H=22.06$, $p<0.001$ and Kruskal-Wallis test, $H=27.28$, $p<0.001$, respectively, Figure 3B).

Contrary to what was observed in the gut, the type of pollen diet did not affect head GST level.



(Mann-Whitney U tests). Boxes show 25th and 75th percentiles range with line denoting median. Whiskers encompass 90% of the individuals, beyond which each outliers are represented by circles.

Nosema ceranae caused a decrease in ALP activity whatever the pollen diet (Figure 4). However, besides a higher activity induced by *Castanea* pollen compared to *Cistus* pollen in healthy bees, the quality and the diversity of pollen supply did not affect the ALP activity in the bee gut (healthy bees: Kruskal-Wallis test, $H = 14.29$, $p = 0.013$ and parasitized bees: Kruskal-Wallis test, $H = 12.54$, $p = 0.028$, Figure 4).

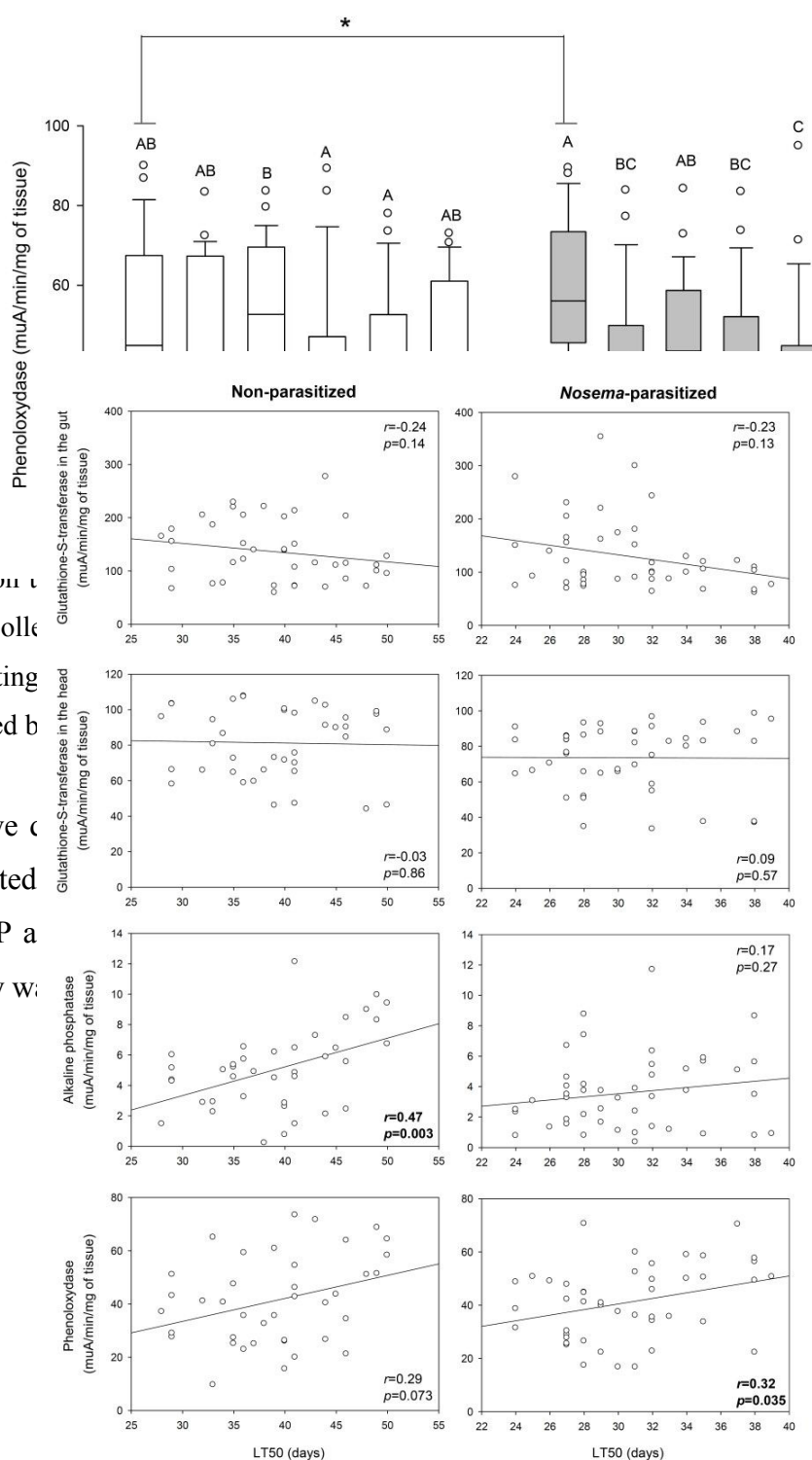


for each pollen diet ($p < 0.05$, Mann-Whitney U tests). Boxes show 25th and 75th percentiles range with line

denoting median. Whiskers encompass 90% of the individuals, beyond which each outliers are represented by circles.

Nosema ceranae induced a significant increase of PO activity in bees deprived of pollen (Fig. 5). In infected bees the immune enzyme activity was lower in the presence of pollen, except for *Erica* (Kruskal-Wallis test, $H = 49.64$, $p < 0.001$, Figure 5). In healthy bees, pollen intake had limited effect on PO activity (Kruskal-Wallis test, $H = 19.24$, $p < 0.001$, Figure 5). Only *Erica* pollen elicited a significant higher activity when compared to *Castanea* and *Rubus* pollen.

Figure 5
shown 1
Differer
plots) o
comparison
for each polle
line denoting
represented b
Lastly, we c
investigated
(i.e., ALP a
longevity w



plots are
en diet).
white box
multiple
non-parasitized bees
centiles range with
each outliers are
y of the different
with ALP activity
Nosema-infected,

Figure 6: Correlations between LT50 and enzyme activities in non- and *Nosema*-parasitized bees. *r* and *p*-values are shown. LT50: day on which 50 % of the bees had died in each cage.

4- Discussion

The results of this study support the idea that the nutritional quality and diversity of pollen nutrition can shape bee health. Indeed, we found that both bee physiology and tolerance to a parasite varied depending on the type of pollen diet, suggesting that not only does the availability but also the quality of environmental resources matter.

The type of pollen provided to the bees had significant effects on the nurse bee physiology. Bees fed with the protein-richest pollen (*Rubus*) presented the most developed acini and the highest expression level of *vitellogenin* and *transferrin*. This tends to confirm previous studies that showed that the hypopharyngeal gland development is linked to the level of proteins in the diet (Standifer, 1967; Pernal and Currie, 2000). However, the other pollen diets did not significantly induce different gland developments, which could be explained by a too small range of protein and/or other nutritional factors contents. Pollen feeding also increased the expressions of *vitellogenin* and *transferrin*. Since both genes are expressed in the fat bodies, the main site of nutrient storage, and pollen promotes the development of fat bodies (Alaux et al., 2010a), it is reasonable to expect an increase in both gene expression levels, as previously found for *vitellogenin* after consumption of proteins (Bitondi and Simoes, 1996). However, the expressions of *vitellogenin* and *transferrin* in bees fed with *Erica* pollen were not different from bees fed with *Rubus* pollen, although *Erica* had a lower amount of proteins. This suggests that their expression is not only sensitive to the protein level but also to other nutritional factors. When looking at the nutritional factors, we found that *Erica* pollen had the highest content in lipids, which might have promoted the increase of fat bodies and therefore

the expression of both genes, since fat body tissues are also the primary site of lipid metabolism (e.g. fatty acid synthesis and triacylglyceride production) (Hahn and Denlinger, 2011). This potential role of lipids in *vitellogenin* synthesis would further confirm that they are essential to the nurse physiology (Toth *et al.*, 2005) and the production of brood (Herbert *et al.*, 1980). In addition, it is interesting to note that *vitellogenin* and *transferrin* had similar expression patterns according to the different pollen diets. This covariation in gene expression was also found in previous works studying the potential role of those genes in ovary development (Koywiwattrakul *et al.*, 2005, 2009).

The quality of pollen also influenced the tolerance of bees to a parasite (*Nosema ceranae*). As expected, infection by *Nosema* decreased the survival of bees (Dussaubat *et al.*, 2012; Higes *et al.*, 2007) and pollen nutrition increased the survival of both healthy and parasitized bees. Except for bees fed with the protein-poorest pollen (*Cistus*), we did not observe a difference in survival between the different pollen diets when bees were non-parasitized. However, pollen quality had a strong influence when bees were parasitized by the microsporidia; the survival of bees was significantly different between the four different monofloral diets (from the least to the most beneficial pollen: *Cistus* < *Castanea* < *Erica* < *Rubus*). This suggests that the quality of pollen nutrients might have no or limited consequences on the physiology of bees when they are healthy, but it might affect their capacity to tolerate an external stress like parasites. The positive influence of *Rubus* pollen as compared to *Cistus* pollen has also been proved when looking at the effect of diet quality on larvae weight in bumble bees (Tasei and Aupinel, 2008). The extremely high protein and antioxidant levels of *Rubus* pollen, as compared to *Cistus* pollen, could explain the greater survival of infected bees fed with the former pollen. Notably proteins are known to improve bee survival (see Brodschneider and Crailsheim, 2010, for a review). High levels of amino acids could play an important role too, since ten of them are essential to the bees in specific concentrations (de Groot, 1953). However, the hierarchical influence of monofloral diet was not linked to the protein, amino acid or antioxidant levels, e.g. bees fed with *Erica* pollen (14.8% of protein) lived longer than bees fed with *Castanea* (21.6% of protein). *Erica* pollen had actually the highest lipid content and promoted a higher production of *vitellogenin* than *Castanea* pollen (Figure 1B). The positive influence of *vitellogenin* on bee lifespan (Seehuus *et al.*, 2006) might then contribute to the increased survival of bees supplied with *Erica* pollen. This suggests that the quality of pollen should not be estimated based on a single or few nutritional factors, but by taking all the nutritional factors as a whole.

Regarding the defense mechanism, the general activity of GST (detoxification), ALP and PO (immunity) changed too according to the pollen diets, but we did not observe a pattern similar to the bee survival. Therefore it was not possible to link the influence of diet quality on bee survival to the activity level of those enzymes. Moreover, the patterns of enzymes activity were not modified by *Nosema* infection, but the general level of head GST and ALP was reduced, confirming a previous study (Dussaubat *et al.*, 2012). However, an increase of GST activity in the gut of *Nosema*-parasitized bees has been previously reported (Vidau *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2012), likely to protect the host from the oxidative stress induced by the parasite (Buchon *et al.*, 2009). The lack of GST response in our study could be due to the diet, since we did not use a commercial mixture of proteins, amino acids and vitamins as in both previous studies, which could have promoted a GST response. Interestingly, the activity profile of GST in the gut was very similar to the expression profile of *vitellogenin* and *transferrin* according to the different diets, with *Erica* and *Rubus* pollen giving the highest activity. However, nothing is known about the relationship between GST and those two genes. Regarding PO activity, it is well-known in other insects that PO level can be influenced by the diet quality (Lee *et al.*, 2006, 2008; Klemola *et al.*, 2007). Indeed, melanogenesis, regulated by PO through the synthesis of melanin (a nitrogen-rich quinone polymer), might be costly in nitrogen (Campana and Moeller, 1977) and thus sensitive to variations in nitrogen resources. However, it did not vary between pollen diets in a previous study (Alaux *et al.*, 2010a) and, in our study, it was only higher with *Erica* pollen. Therefore, further investigations are needed to better understand the relationship between pollen diet and PO activity in bees.

Pollen dietary diversity was not associated with an improvement of nurse physiology, as reflected by the measured physiological parameters. The influence of the polyfloral diet actually came down to the average of each monofloral pollen influence. This suggests that a high-quality monofloral pollen may be better than a mixture of lower nutritional quality as found for brood rearing (Campana and Moeller, 1977; Singh and Singh, 1996). However, it is likely that different physiological factors in bees are not affected equally by the pollen diet. This has been observed in a recent study showing a higher activity of glucose oxidase in bees fed with a polyfloral pollen blend as compared to monofloral pollen, but PO activity and hemocyte count were not affected by the polyfloral diet (Alaux *et al.*, 2010a). This is further confirmed by our study, since the polyfloral blend had a positive influence on the survival of parasitized bees. It did not correspond to the average of each pollen effect, but was higher than *Cistus*, *Castanea* and *Erica* pollens and to the same level than *Rubus* pollen. This trend

was not observed in healthy bees suggesting again that nutritional quality can significantly affect the susceptibility of individuals to parasites. It is not known whether the increase in the survival of bees fed with the polyfloral blend was due to the combination of the four pollens or the simple presence of *Rubus* pollen, although it contained a quarter of this pollen. Similar results were found by Foley *et al.* (2012), who observed a decreased susceptibility to the fungal parasite *Aspergillus* of bee larvae fed with a specific pollen or with a mixture.

Finally, in order to decipher some of the underlying physiological mechanisms involved in bee health, we determined whether the activity of GST, PO and ALP were associated to an increase of survival in healthy or parasitized bees. Survival was positively associated to ALP and PO activity in healthy and *Nosema*-infected bees, respectively. In mammals, ALP is involved in the regulation of nutrient absorption (notably lipids), detoxification of bacterial lipopolysaccharide, intestinal tolerance to commensal bacteria, prevents bacterial invasion and reduces intestinal inflammation, playing thus a pivotal role in intestine health (see Lallès, 2010, for a review). It is not known whether ALP has similar roles in insects but there are structural and functional homologies between insect and mammal ALPs (Eguchi, 1995). In addition, the correlation between ALP activity and bee survival suggests that this enzyme might be important in insect health. When its activity was decreased by *Nosema* infection, it was no longer linked to bee survival. In that case, the survival rate was associated to PO activity. However, except in the absence of pollen, parasitized bees did not mount a PO immune response, which supports the idea that the bee survival was simply linked to a higher basal activity of PO.

In conclusion, pollens are not equal regarding their effects on bee health and a polyfloral blend is not necessarily better than a monofloral pollen of good nutritional values (e.g. *Rubus* pollen). However, when bees are infected with *Nosema c.*, the availability of different floral resources can cover the limited influence of some pollens and improve the tolerance to the infection to the level of a rich pollen. Pollinating areas of bees are currently changing due to intensification of agriculture and landscape alteration, and bees are often confronted with decreasing availability and diversity of resources in time and space. Global climate change is also expected to modify the environmental resources of bees due to changes in plant phenology and distribution (Le Conte and Navajas, 2008). Therefore, maintaining and/or developing floral resources within agro-ecosystems is needed to prevent the negative impact of human activity and sustain the bee population (Decourtye *et al.*, 2010).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank M. Cousin and G. Rodet for their help in the dissection of bees and M. Charbonnier for help with the English editing.

Annexes du chapitre 3

1-naphtyl	Desmedipham	Fuberidazole	Picoxystrobine
2-Phenylphenol	Desmetryn	Furalaxyl	Pinoxadene
Acephate	Diafenthiuron	Furathiocarb	Piperonyl
Acetamipride	Dialifos	Halosulfuron-methyl	Pirimicarb
Aclonifen	Diallate	HCB	Pirimiphos-ethyl
Acrinathrine	Diazinon	HCH	Pirimiphos-methyl
Alachlore	Dichlobenil	HCH	Prochloraz
Aldicarb	Dichlofenthion	Heptachlore	Procymidone
Ametryn	Dichlofluanide	Heptenophos	Profenophos
Amitraze	Dichlorvos	Hexaconazole	Prometryn
Anthraquinone	Diclobutrazol	Hexazinone	Propachlor
Atrazine	Diclofop-methyl	Hexythiazox	Propamocarb
Azaconazole	Dicofol	Hydramethylnon	Propanil
Azimsulfuron	Dieldrin	Imazalil	Propaquizafop
Azinphos-ethyl	Diethofencarb	Imazaquin	Propargite
Azinphos-methyl	Difenacoum	Imidachlopride	Propazine
Azoxystrobine	Difenoconazole	Indoxacarb	Propetamphos
Benalaxyl	Di flufenican	Iodofenphos	Propham
Benfluraline	Dimetachlor	Iprodione	Propiconazole
Benfuracarb	Dimethenamid-P	Iprovalicarb	Propoxur
Benoxacor	Dimethoate	Isofenphos-ethyl	Propyzamide
Bensulfuron-methyl	Dimethomorphe	Isofenphos-methyl	Prosulfocarb
Benthiavalicarb-isopropyl	Diniconazole	Isopropaline	Prosulfuron
Bifenazate	Diphenylamine	Isoprothiolane	Prothioconazole
Bifenox	Disulfoton-sulfone	Isoproturon	Prothiophos
Bifenthrine	Diuron	Isoxaflutole	Prothoate
Biphenyl	DMST	Isoxathion	Pyraclostrobine
Bispyribac-Sodium	Dodine	Kresoxim-methyl	Pyraflufen-ethyl
Bitertanol	Edifenphos	Lenacil	Pyrazophos
Boscalide	Emamectin	Linuron	Pyridaben
Bromacil	Endosulfan	Lufenuron	Pyridaphenthion
Bromophos-ethyl	Endrin	Malathion	Pyridate
Bromophos-methyl	Epoxyconazole	Mandipropamide	Pyrimethanil
Bromopropylate	EPTC	Mecarbam	Pyriproxyfen
Bromuconazole	Ethidimuron	Mepanipyrim	Quinalphos
Bupirimate	Ethion	Mesosulfuron	Quinomethionate
Buprofezin	Ethoprophos	Metalaxyl	Quinoxifen
Butafenacil	Ethoxyquin	Metamitron	Quintozene
Butoxycarboxim	Etoxazole	Metazachlor	Quizalofop-ethyl
Butralin	Etrimphos	Metconazole	Rotenone
Buturon	Famoxadone	Methabenzthiazuron	Sebuthylazine
Cadusaphos	Famphur	Methamidophos	Simazine
Captafol	Fempropathrine	Methidathion	Spinosad
Captan	Fenamidone	Methiocarb-sulfoxide	Spirodiclofen
Carbaryl	Fenamiphos	Methomyl	Spiromesifen
Carbendazim	Fenamiphos-sulfone(+sulfoxide)	Methoxychlor	Spiroxamine
Carbetamide	Fenarimol	Methoxyfenozide	Sulfosulfuron
Carbofenothon	Fenazaquin	Metobromuron	Sulfotep
Carbofuran	Fenbuconazole	Metolachlor	TCMTB
Carbosulfan	Fenchlorphos	Metoxuron	Tebufenozide
Carboxin	Fenitrothion	Metrafenone	Tebufenpyrad

Table S1: List of pesticides analyzed in the pollen diets.

Amino-acids	<i>Cistus</i>	<i>Erica</i>	<i>Castanea</i>	<i>Rubus</i>
Aspartic acid	1.65	1.16	1.85	2.76
Threonine	0.47	0.82	0.87	0.94
Serine	0.56	0.9	1	1.1
Glutamic acid	1.1	2.09	2.29	2.35
Proline	2.25	1.29	2	1.58
Glycine	0.45	0.8	0.82	0.85
Alanine	0.6	0.98	1.07	1.17
Valine	0.54	1.01	1.05	1.14
Cysteine	0.16	0.23	0.36	0.31
Methionine	0.32	0.44	0.51	0.54
Isoleucine	0.45	0.8	0.84	0.91
Leucine	0.81	1.34	1.36	1.48
Tyrosine	0.3	0.57	0.58	0.59
Phenylalanine	0.48	0.9	0.89	0.99
Lysine	0.77	1.23	1.43	1.5
Histidine	0.37	0.44	0.47	0.46
Arginine	0.49	1.1	1.07	1.03
Tryptophan	0.14	0.21	0.23	0.27

Table S2: Amino acids present in the different pollens. Their concentration is expressed in g / 100 g of pollen.

Sugars	<i>Cistus</i>	<i>Erica</i>	<i>Castanea</i>	<i>Rubus</i>
Trehalose	0.48	<i>nd</i>	3.57	<i>nd</i>
Glucose	8.8	5.2	9.5	6.6
Fructose	6×10^{-4}	3.7×10^{-4}	7×10^{-4}	8.5×10^{-4}
Saccharose	<i>nq</i>	2.09	6.2	3.9
Maltose	1.3×10^{-5}	<i>nd</i>	2.8×10^{-5}	6.2×10^{-6}
Erlöse	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.47	<i>nd</i>

Table S3: Sugars present in the different pollens. Their quantity is expressed in mg per g of pollen.
nd: not detected and *nq*: present but not quantifiable.

Chapitre 4

Les effets de *Nosema ceranae* et du pollen sur les capacités digestives de l'abeille domestique

Avant-propos du chapitre 4

Les résultats obtenus dans le chapitre 3 mettent en évidence la forte importance de la qualité d'un pollen pour la santé de l'abeille. En effet, le pollen de *Rubus* permet aux abeilles d'avoir de plus grandes glandes hypopharyngiennes et plus de *vitellogénine* et de *transferrine*. La diversité en revanche ne paraît pas apporter de plus-value dans ces conditions pour des abeilles saines. Mais lorsqu'un stress est ajouté, la qualité et surtout la diversité prennent toute leur importance. En effet, diversifier les espèces florales dans le régime alimentaire permet

aux abeilles de pallier aux faibles effets des pollens de mauvaise valeur nutritionnelle. Mais la consommation d'un pollen monofloral de bonne qualité paraît suffisante puisqu'elle induit des survies semblables à celles apportées par la consommation du mélange. De même, la comparaison des pollens de *Castanea* et *Erica* met en évidence que la qualité d'un pollen ne se détermine pas uniquement avec les taux de protéines et d'acides aminés essentiels, mais qu'il faut tenir compte de tous les composants chimiques du pollen.

Outre les constituants du pollen, sa valeur nutritionnelle est aussi déterminée par l'efficacité avec laquelle l'organisme le digère. La digestion permet à l'organisme de récupérer les nutriments des aliments grâce aux enzymes digestives (des protéases à sérine). Or, *N. ceranae* est un parasite de l'intestin, et sa présence altère les cellules épithéliales de l'intestin. Cela pourrait avoir comme conséquence une perturbation de la digestion des protéines apportées par le pollen, et affecter le développement, la résistance, et la survie de l'hôte. Il a déjà été observé une surconsommation de sirop de sucre (Mayack et Naug, 2009 ; Alaux *et al.*, 2010b ; Vidau *et al.*, 2011) chez les abeilles infestées par *N. ceranae*, dû au stress énergétique provoqué par ce dernier. Mais qu'en est-il pour la consommation du pollen, et surtout l'activité de l'équipement digestif des abeilles ? Afin de tester cela, nous avons dosé les activités des protéases totales, et de deux enzymes digestives identifiées chez l'abeille domestique *A. mellifera* L., et nous avons déterminé l'influence que pouvait avoir le parasite sur ces dernières.

Les effets de *Nosema ceranae* et du pollen sur les capacités digestives de l'abeille domestique.

En préparation

Garance Di Pasquale^{1,2}, Yves Le Conte^{1,3}, Cédric Alaux^{1,3}, Axel Decourtye^{1,2,4}, Luc P. Belzunces^{1,3}

¹UMT PrADE, CS 40509, 84914 Avignon, France

²ACTA, Avignon, France

Résumé

Nosema ceranae, un parasite invasif de l'abeille domestique *Apis mellifera* L., est suspecté d'être impliqué dans le déclin mondial des colonies d'abeilles. Ce parasite se développe dans les intestins de son hôte, les détériore, et détourne les fonctions clés (production d'énergie, immunité innée, régulation des protéines) pour accomplir son cycle de vie. L'intestin de l'abeille est le lieu qui comporte la meilleure disponibilité en nutriments permettant au parasite de se développer et de proliférer de manière optimale. Le pollen est l'aliment qui fournit à l'abeille les principaux nutriments, en particulier les protéines, essentielles au métabolisme de l'abeille. Pour déterminer l'influence du parasite *N. ceranae* sur les capacités digestives de l'abeille, nous avons mesuré les activités de trois enzymes protéolytiques (protéases totales, trypsine et chymotrypsine), chez des abeilles adultes de différents âges, nourries ou pas avec du pollen. Les résultats montrent que dans nos conditions d'expérimentation, l'apport de pollen permet de rétablir des activités enzymatiques et une survie à des niveaux peu ou pas différents de ceux observés chez des abeilles qui ont reçu du pollen mais qui ne sont pas infestées par *Nosema*. Deux hypothèses peuvent être mises en avant : l'apport de pollen permet, par les nutriments qu'il apporte et notamment les protéines, de renforcer les défenses de l'abeille ; ou bien le parasite essaye de préserver l'intégrité du métabolisme de digestion des protéines par l'abeille, dans une stratégie de prolifération.

1- Introduction

Nosema ceranae est une microsporidie pathogène découverte initialement chez l'abeille domestique asiatique, *Apis cerana*, (Huang *et al.*, 2005), et identifiée plus récemment chez l'abeille domestique européenne, *Apis mellifera* L..

Avant la première détection de *N. ceranae* chez *A. mellifera* en 2006 (Higes *et al.*, 2006), cet hôte était déjà infesté par la microsporidie *Nosema apis*. Du fait de sa plus forte virulence (Paxton *et al.*, 2007), *N. ceranae* a été rapidement suspecté comme pouvant être une cause majeure dans le déclin des colonies d'abeilles observé dans le monde (Higes *et al.*, 2008a; Paxton, 2010). Chez l'abeille domestique, *N. ceranae* induit la destruction de l'épithélium de l'intestin, des effets sur le comportement, et de multiples perturbations physiologiques tels que des désordres phéromonaux (Dussaubat *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2013), des stress énergétiques (Mayack and Naug, 2009; Martin-Hernandez, 2011), des dépressions immunitaires (Antunez *et al.*, 2009, Alaux *et al.*, 2010a; Di Pasquale *et al.*, 2013) et une diminution de la longévité des abeilles adultes (Higes *et al.*, 2008a; Alaux *et al.*, 2010a; Di

Pasquale *et al.*, 2013). Au niveau colonial, l'infestation par *Nosema* cause une réduction de la taille de la colonie, de l'élevage du couvain et de la production de miel (Botias *et al.*, 2013). Un aspect important de la pathogénèse des parasites intracellulaires comme les *Nosema* est leur capacité à manipuler l'activité des cellules de leur hôte pour leur propre bénéfice. L'intestin, premier site de prolifération de *N. ceranae*, joue un rôle important dans l'immunité, la digestion, et la détoxification des insectes. L'infestation par *N. ceranae* diminue la réponse immunitaire des abeilles en réduisant la quantité de peptides antimicrobiens (Antunez *et al.*, 2009), et en augmentant la sensibilité des abeilles aux produits chimiques (Alaux *et al.*, 2010b; Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012). Une récente étude de Vidau *et al.* (2014) a montré que *N. ceranae* causait une modulation des protéines impliquées dans trois fonctions clés chez l'abeille hôte, qui sont la production d'énergie, l'immunité innée, et la régulation des protéines.

Ces résultats suggèrent que *Nosema* crée une zone de « modification de l'habitat métabolique » dans l'intestin pour favoriser son développement en augmentant la disponibilité des nutriments et réduisant les défenses de l'abeille hôte. En d'autres termes, *Nosema* pourrait influencer le statut nutritionnel et les capacités digestives de l'abeille. Peu d'études ont été faites sur les relations entre les ressources nutritionnelles, les capacités de digestion des abeilles, et le développement du parasite. Les abeilles se nourrissent de deux types de ressources, le nectar qui fournit principalement des sucres et donc de l'énergie, et le pollen qui apporte les nutriments à l'abeille tels que les protéines, les acides aminés essentiels, les lipides, et les vitamines. Ces nutriments et particulièrement les protéines sont nécessaires pour le développement, la croissance, et la survie des abeilles, mais aussi pour le parasite. Après l'émergence, les abeilles consomment du pollen durant les premiers jours de leur vie. D'après Schmidt et Buchman (1985), *A. mellifera* digère le pollen et absorbe efficacement les nutriments qu'il contient. La transformation des protéines du pollen en acides aminés est effectuée par les protéases présentes dans l'épithélium intestinal, et spécialement chez les nourrices qui manifestent de fortes activités protéolytiques (Moritz et Crailsheim, 1987 ; Crailsheim et Stolberg, 1989). Parmi ces protéases, la trypsine et la chymotrypsine sont les enzymes les mieux étudiées et identifiées chez l'abeille domestique (Grogan et Hunt, 1989; Moritz et Crailsheim, 1987). La trypsine paraît être la plus abondamment représentée lorsqu'on considère les protéases totales (Giebel *et al.*, 1971; Dahlmann *et al.*, 1978, Grogan and Hunt, 1979). En effet, Belzunces *et al.* (1994) ont observé une diminution de 80 % de l'activité protéolytique totale en ajoutant un inhibiteur de trypsine. La trypsine pourrait donc représenter jusqu'au moins 80% de l'activité totale des protéases. *N. ceranae* peut

compromettre le comportement de consommation des abeilles puisque Mayack et Naug (2009) et Naug et Gibbs (2009) ont observé une surconsommation de sirop de sucre chez des abeilles infectées par *Nosema* et une diminution des échanges trophalactiques entre les abeilles. Dans cette étude, nous avons essayé de déterminer les effets de *N. ceranae* sur l'équipement métabolique de l'abeille impliqué dans la digestion des protéines, et sur le rôle du pollen face à un tel stress.

2- Matériels et méthodes

Elevage des abeilles

Les expérimentations ont été effectuées sur des abeilles provenant de trois colonies d'*A. mellifera* L.. Des cadres de couvain operculé ont été placés dans un incubateur à 34°C et 50-70 % d'humidité relative durant une nuit. Les abeilles qui en émergeaient le lendemain étaient collectées et mélangées afin de leur assurer un bagage génétique identique, avant d'être placées dans des cagettes (10.5 cm x 7.5 cm x 11.5 cm) (Pain, 1966). Les cagettes étaient conservées dans une étuve à 34°C et 50-70 % d'humidité tout au long de l'expérimentation. Les abeilles étaient approvisionnées avec du « candy » (Apifonda® + sucre en poudre) et de l'eau de manière *ad libitum*. Le pollen de colza utilisé a été récolté dans les trappes à pollen de trois colonies différentes placées sur une culture de colza sous serre, pour éviter les contaminations par les pesticides. Les pelotes de pollen récoltées ont été conservées à - 20°C jusqu'à utilisation. Afin de déterminer la quantité de pollen optimale à donner aux abeilles durant l'expérience, nous avons fait une expérimentation préliminaire. Des groupes de 50 abeilles confinées en laboratoire ont été approvisionnées, du jour 0 au jour 8, avec des quantités de pollen différentes (la quantité étant ajustée tous les jours en fonction du nombre de survivantes). Selon Crailsheim *et al.* (1992), une abeille a besoin d'environ 3.6 mg de pollen / jour. Ainsi, nous avons considéré que cette quantité représentait 100 % du régime alimentaire pollinique journalier de l'abeille. Des abeilles groupées dans 10 cagettes de 50 individus par modalité, recevaient 0, 7, 15, 20, 30, 40 ou 100 % du régime pollinique journalier déterminé. Au dixième jour, 3 abeilles par cagette ont été tuées à l'azote liquide et conservées à - 80°C jusqu'aux analyses. Les activités des trois enzymes digestives étudiées ont été déterminées, et il apparaît que l'activité enzymatique dépend de la quantité de pollen consommée (Annexes, Figure 1). La quantité de 100 % (3,6 mg de pollen / abeille / jour) a été conservée pour la suite de l'expérimentation.

Influence de Nosema ceranae sur les capacités digestives de l'abeille

Pour déterminer l'influence de *N. ceranae* sur les capacités digestives de l'abeille, nous avons mesuré les activités des trois enzymes protéolytiques sélectionnées, en présence/absence de *Nosema* et/ou de pollen. Six cent soixante abeilles ont été infectées individuellement à l'aide d'une pipette contenant 2 µl d'une solution fraîchement préparée contenant un *inoculum* de *N. ceranae* (solution de sirop de sucre à 50 % contenant 10,000 spores par abeille), et ont été réparties dans 20 cagettes par groupes de 33 individus. De même, 20 cagettes de 33 abeilles ont été préparées avec des abeilles non infectées. Les spores de *Nosema* provenant de colonies infectées ont été isolées selon la méthode utilisée dans Di Pasquale *et al.* (2013). Dix abdomens d'abeilles butineuses ont été mélangés avec 2 µl d'eau distillée à l'aide d'un broyeur électrique (Ultra Turrax® T18 basic, IKA®). Les homogénats ont ensuite été filtrés dans du papier Whatman No. 4, et le filtrat a été supplémenté avec 10 ml d'eau distillée. Les solutions ont été centrifugées trois fois à 800 g pendant 6 minutes et à chaque fois, les spores contenues dans le culot étaient resuspendues dans 10 ml d'eau distillée. L'identification des spores a été effectuée par PCR, comme dans Alaux *et al.* (2010a) et la concentration en spores a été déterminée avec un haemocytomètre. La moitié des abeilles infectées et non infectées a été nourrie avec du pollen de colza à 100 % (3,6 mg de pollen/abeille/jour) et de l'eau et du « candy » *ad libitum*, tandis que l'autre moitié ne recevait que du « candy » et de l'eau. Après 6, 13 et 20 jours, trois abeilles par cagette ont été tuées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'aux analyses. De même, afin de définir le niveau initial d'enzymes digestives à J0, nous avons échantillonné dix fois trois abeilles naissantes (30). Les longévités des abeilles de chaque modalité : Pas de pollen, Pollen, *Nosema*, et Pollen-*Nosema*, ont été suivies sur les 20 jours de l'expérimentation. Les abeilles mortes étaient comptées et retirées tous les jours.

Analyses enzymatiques

Extraction

Les activités enzymatiques ont été dosées sur des échantillons composés de 3 intestins d'abeilles par tube. Les échantillons ont été homogénéisés à 4°C avec le Tissue Lyser (Qiagen®) (5 x10 s à 30 Hz) dans un tampon d'extraction (150 mM NaCl, 6 mM CaCl₂, 10 mM saccharose, 1 % (p/v) Lubrol PX, 10 mM Tris-HCl pH 7,3) pour obtenir un extrait de tissu à 20 % (p/v). Puis l'homogénat a été centrifugé à 4°C pendant 20 min à 15,000 g. Le surnageant a ensuite été traité différemment en fonction de l'enzyme à doser. Les activités enzymatiques ont été mesurées avec un spectrophotomètre BioTek Synergy HT100 (BioTek Instruments®).

Dosages des activités protéolytiques

Pour mesurer l'activité protéolytique totale, les extraits de tissu (4 % p/v d'extrait) ont été mélangés à un tampon contenant 10 mM CaCl₂, 10 mM NaCl, 1mg / ml azoalbumine et 100 mM Tris-HCl pH 7,5 et ont été incubés à 37°C pendant 1 h. Puis, de l'acide trichloracétique (10 % p/v en concentration finale) a été ajouté pour faire précipiter les protéines, et le mélange a été laissé 1 h à 4°C. Après une centrifugation de 5 min à 10,000 g, le surnageant a été mélangé avec du NaOH (10 N) et l'absorbance des triplicats a été lue à 450 nm. Pour les dosages de la trypsine et de la chymotrypsine, l'extrait (5 % p/v) a été mélangé à un tampon contenant 10 mM CaCl₂, 10 mM NaCl, 0.3 mM de substrat (le BAPNA (*N*- α -benzoyl-(D)L-arginine-*p*-nitroanilide) pour la trypsine, et le GPNA (*N*-glutaryl-L-phenylalanine-*p*-nitroanilide) pour la chymotrypsine), et 80 mM Tris-HCl pH 8,0. Les dosages enzymatiques ont été effectués en triplicat et l'absorbance a été suivie pendant 10 min à 410 nm.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R[®] (2013). Pour analyser les effets du pollen, de *Nosema*, et de l'interaction pollen x *Nosema* sur la longévité, le nombre d'abeilles mortes a été transformé dans une table de survie. Puis une régression de Cox a été utilisée pour comparer les survies des différentes modalités, avec l'aide de la fonction `coxph` du package [survival] sous R (Cox, 1972).

Etant donné que nous avons déterminé des activités enzymatiques des abeilles en fonction de la cagette dans laquelle elles se trouvaient, et ce à plusieurs intervalles de temps, nous avons choisi d'utiliser un modèle linéaire généralisé à effets mixtes pour cette étude statistique. Le critère d'information Akaike (AIC) (Akaike, 1973) a été utilisé pour la sélection de modèle a priori. Pour les trois activités enzymatiques (protéases totales, trypsine et chymotrypsine), l'activité mesurée représente la variable dépendante. La cagette est incluse comme variable aléatoire dans le modèle. Nous avons considéré le jour de prélèvement (variable discrète), *Nosema* (présence/absence) et le pollen (présence/absence) comme variable explicative fixe. Enfin, nous avons étudié l'effet de l'interaction Pollen x *Nosema*.

3- Résultats

N. ceranae cause une réduction rapide de la survie des abeilles durant les vingt premiers jours (Régression de Cox, $p < 0.023$) (Figure 1). Au contraire, l'apport de pollen permet d'augmenter la survie des abeilles. Chez les abeilles de la modalité « Pollen-*Nosema* », la

survie n'est significativement pas différente des survies observées chez les abeilles des modalités « Pas de pollen » et « Pollen ». L'apport de pollen permet de rétablir un niveau de survie équivalent à celui d'abeilles en bonne santé, même en présence du parasite.

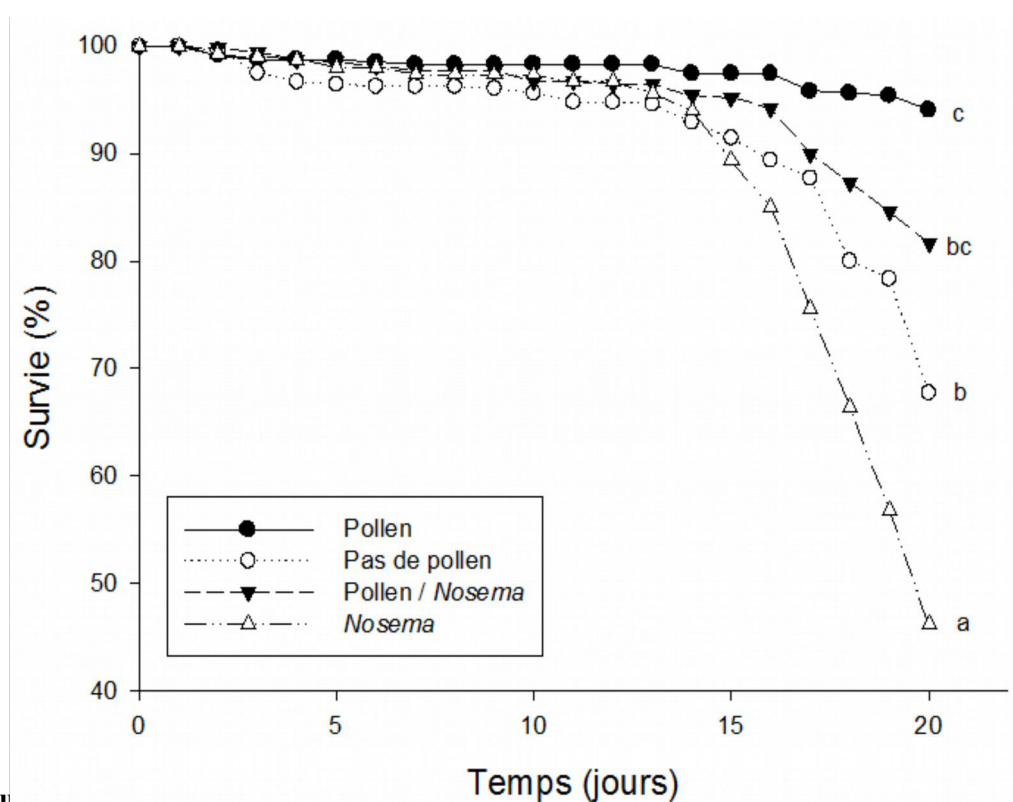
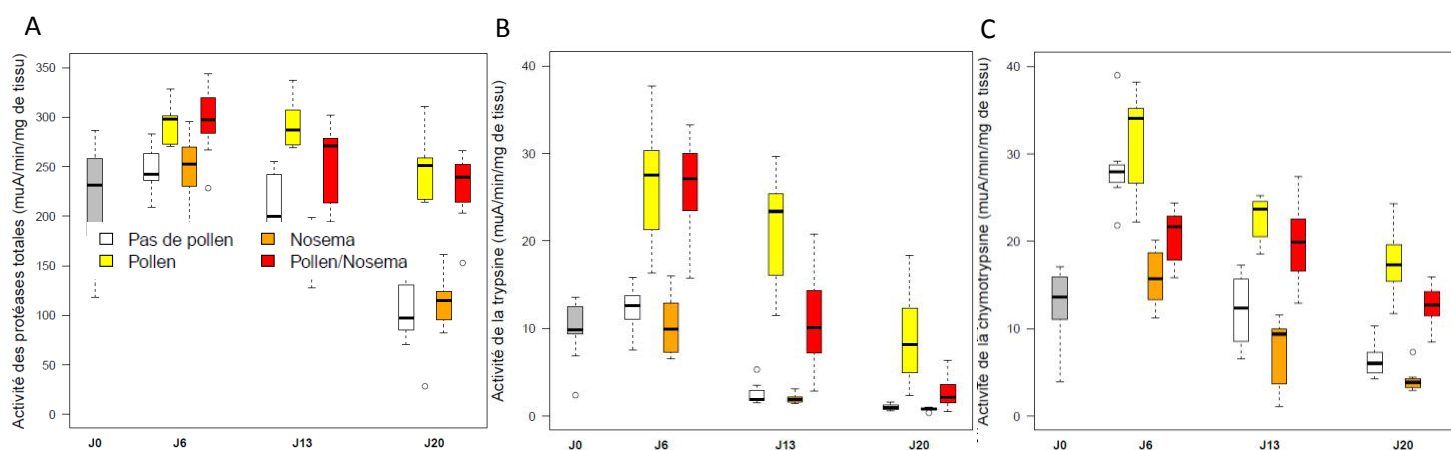


Figure Nombre de survivantes pendant les 60 jours de l'expérience (10 réplicats/modalité). Les lettres différentes montrent des différences significatives ($p < 0.01$, régression de Cox).

En ce qui concerne les effets de *Nosema* et du pollen sur les activités enzymatiques, le meilleur modèle en fonction de l'indice AIC (mesure de la qualité d'un modèle statistique qui permet de pénaliser les modèles en fonction du nombre de paramètres afin de satisfaire le critère de parcimonie. On choisit alors le modèle avec le critère d'information d'Akaike le plus faible) est le même pour les activités de la trypsine et des protéases totales. Il s'agit du modèle avec le jour et l'interaction pollen x *Nosema* en effet fixe, et la cage en effet aléatoire. Pour

la chymotrypsine, le meilleur modèle est celui avec le jour, *Nosema* et le pollen en effet fixe, et la cagette en effet aléatoire. L'activité de la chymotrypsine ne comporte pas d'interaction pollen x *Nosema* significative. Les coefficients et les erreurs standards avec les p-value des effets fixes associés pour les meilleurs modèles sont représentés pour chaque activité enzymatique dans le tableau 2 (Annexes). Les effets de l'infection par *Nosema* et de la consommation de pollen sur les activités enzymatiques aux jours 0, 6, 13, 20 sont présentés dans la Figure 2.



données entre le 25ième et le 75ième pourcent et la ligne représente la médiane. Les moustaches englobent 90% des individus, au-delà de laquelle les valeurs extrêmes sont représentées par des cercles.

Les activités enzymatiques évoluent au cours du temps de manière significative, puisqu'elles augmentent du jour 0 à 6, et diminuent par la suite et ce jusqu'à la fin. L'activité des protéases totales diminue légèrement chez les abeilles de la modalité « *Nosema* » par rapport aux abeilles de la modalité « Pas de pollen », alors que l'apport de pollen cause une forte augmentation de cette activité (« Pollen » versus « Pas de pollen ») (Figure 2A). Chez les abeilles infestées par *Nosema*, l'apport de pollen permet de rétablir des niveaux d'activités semblables à ceux observés chez la modalité « Pollen ». Pour l'activité de la trypsine, les activités recensées chez les « Pas de pollen » étant déjà très faibles, l'infection par *Nosema* n'a que très peu d'effet, tandis que l'apport de pollen provoque une forte augmentation. En revanche, l'activité de la trypsine chez les abeilles infectées qui reçoivent du pollen (« Pollen-*Nosema* ») est diminuée par rapport à la modalité « Pollen », mais reste nettement supérieure par rapport aux modalités « Pas de pollen » et « *Nosema* ».

Enfin, l'activité de la chymotrypsine est fortement diminuée en présence de *Nosema*, et augmente avec l'apport de pollen. De même que pour l'activité de la trypsine, chez les abeilles infectées qui reçoivent du pollen (« Pollen-*Nosema*») l'activité de la chymotrypsine est diminuée par rapport à la modalité « Pollen », mais reste supérieure par rapport aux modalités « Pas de pollen » et « *Nosema* ».

Nous avons observé une corrélation positive entre les activités de la trypsine et de la chymotrypsine (Coefficient de Spearman: 0.82, $p\text{-value} < 0.001$).

4- Discussion

Les profils des activités enzymatiques dans le temps correspondent à ceux observés par de nombreux auteurs (Grogan et Hunt, 1980; Crailsheim et Stolberg, 1989; Malone et Gatehouse, 1998) ; ils sont représentés par une augmentation à l'émergence de l'abeille adulte, du jour 0 à 6, puis une diminution jusqu'à de très faibles niveaux au jour 20. En effet, Moritz et Crailsheim (1987) observent qu'au sein de la colonie, les nourrices qui consomment plus de pollen ont aussi plus de protéases pour les digérer.

L'apport de pollen provoque une augmentation des activités des enzymes digestives testées, et ce d'autant plus que la quantité de pollen consommée est importante (Annexes, Figure 1). Ceci paraît normal étant donné que les enzymes sont libérées pour digérer les aliments, afin d'en extraire les nutriments, et que d'après Schmidt et Buchman (1985), les abeilles digèrent le pollen efficacement. L'apport de ces nutriments par le pollen, absorbés efficacement par l'abeille, provoquent une augmentation de la survie chez les abeilles de la modalité « Pollen » par rapport aux abeilles de la modalité « Pas de pollen ». Au contraire, une infestation par le parasite *N. ceranae* provoque une diminution de la survie, et des activités des enzymes digestives testées, par rapport aux abeilles qui n'ont pas reçu de pollen. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Malone and Gatehouse (1998) qui notent une diminution de la trypsine et de la chymotrypsine chez des abeilles infectées par la microsporidie *N. apis*.

Lorsqu'on apporte du pollen aux abeilles ayant été infectées par *N. ceranae*, les activités enzymatiques pour la trypsine et la chymotrypsine sont inférieures de celles des abeilles de la modalité « Pollen », excepté à J6 pour la trypsine, et J13 pour la chymotrypsine où « Pollen » et « Pollen-*Nosema* » ne sont significativement pas différentes. *Nosema* a donc tout de même une influence négative sur l'équipement digestif de l'abeille, mais les niveaux d'activité qu'il induit avec des abeilles nourries de pollen de colza restent nettement supérieurs aux activités obtenues chez des abeilles du groupe « *Nosema* » ou même du groupe « Pas de pollen » qui

n'en reçoivent pas. Cela signifie que quelque chose agit de manière bénéfique sur les enzymes digestives de l'abeille. Cet effet est encore plus marqué sur la survie. En effet, les abeilles du groupe « Pollen-*Nosema* » ont une survie qui n'est pas différente des abeilles nourries avec du pollen, non infectées (« Pollen »). Nous avons retenu deux hypothèses pour expliquer cela. La première explique le rétablissement de la modalité « Pollen-*Nosema* » par les nutriments apportés par le pollen, et notamment les protéines, qui permettent à l'abeille de renforcer ses défenses immunitaires. Les résultats de Di Pasquale *et al.* (2013) qui observent une forte influence de la qualité du pollen sur la résistance face au stresser *N. ceranae* vont dans ce sens. En effet, les abeilles ayant consommé du pollen de *Rubus* avaient une meilleure résistance au niveau enzymatique (phénoloxydase, phosphatase alcaline, glutathion-s-transférase), au niveau de l'expression des gènes (*vitellogénine*), ou même directement sur la longévité, que des abeilles nourries avec du pollen de faible qualité tel que le *Cistus*. De même, ils ont mis en évidence une plus forte résistance à *Nosema* lorsque les abeilles consommaient des mélanges de pollens par rapport à des pollens monofloraux. Ces résultats sont en accord avec ceux de Alaux *et al.* (2010a) qui déterminent une plus forte activité de l'immunité sociale (glucose oxydase) chez des abeilles ayant consommé des mélanges de pollens que du pollen monofloral. Enfin, Sedivy *et al.* (2011) qui ont étudié les performances de larves chez deux abeilles solitaires, suggèrent que le pollen de certaines espèces de fleurs peut chimiquement protéger les larves grâce à certains éléments bénéfiques qui le composent. La seconde hypothèse est que *Nosema* maintient l'intégrité de l'équipement digestif de l'abeille dans le but d'obtenir le plus de nutriments disponibles possibles, et donc de proliférer d'autant plus et plus rapidement. Cette stratégie est comparable à celle observée par Higes *et al.* (2013) qui suggèrent que *N. ceranae* empêche les cellules épithéliales des ventricules des abeilles infectées de subir l'apoptose pour favoriser leur propre développement et maturation. Basualdo (2014) et Porrini (2011) observent une plus forte prolifération de *N. ceranae* chez des abeilles ayant consommé du pollen. Nous avons donc déterminé les quantités de spores présentes dans les intestins des abeilles survivantes au jour 20 afin de vérifier s'il y a eu une prolifération du parasite. D'après les résultats obtenus dans le tableau 1 (Annexes), le nombre de spores retrouvées dans les intestins des abeilles du groupe « *Nosema* » et « Pollen-*Nosema* » à J20 est bien supérieur à celui qu'on leur a apporté à J0. On peut en effet conclure que le parasite a bien proliféré dans son hôte. De même, aucune spore n'a été retrouvée dans les intestins des abeilles des modalités « Pas de pollen » et « Pollen ». Et pour vérifier si *Nosema* a créé un stress énergétique comme Mayack et Naug (2009) et Naug et Gibbs (2009), l'ont observé, nous avons étudié les consommations en sucres de toutes les modalités, et

aucune différence n'a pu être mise en évidence (Wilcoxon test: $U = 62$, $p < 0.58$). Nous n'avons pas non plus observé de différence de consommation de pollen entre les modalités « Pollen » et « Pollen-*Nosema* » (T test: $F = 0.54$, $p < 0.36$). Ces résultats vont dans le même sens que ceux observés par Basualdo et al. (2014) qui n'observent pas de compensation par surconsommation de protéines chez les abeilles infectées par *N. ceranae*.

Pour conclure, nous n'avons pas pu mettre en évidence de manipulation des capacités digestives ou de la consommation de pollen ou de sucres, de l'abeille domestique par le parasite *N. ceranae*, contrairement aux résultats obtenus par Vidau et al. (2014). Mais nous pouvons souligner que des abeilles infectées par *Nosema ceranae* qui reçoivent du pollen possèdent des équipements digestifs, et une survie très semblables à ce qui peut être observé chez des abeilles ayant consommé du pollen, ou du moins, à des niveaux supérieurs que ceux observés chez des abeilles n'ayant pas consommé de pollen, qu'elles soient infectées ou non. Deux hypothèses restent à vérifier, les bénéfices des nutriments présents dans le pollen permettent à l'abeille de renforcer ses défenses contre le parasite ; ou bien le parasite conserve l'intégrité des capacités digestives de l'abeille dans une stratégie de prolifération. Afin de vérifier ces hypothèses, d'autres expérimentations peuvent être envisagées. L'influence du type de pollen et donc des éléments qu'ils peuvent apporter à l'abeille pour se défendre, peut être apportée en dosant les activités des enzymes digestives en fonction de différents types de pollens consommés, monofloraux ou polyfloraux. Dans le but de vérifier la seconde hypothèse, il peut être intéressant de déterminer l'efficacité de digestion chez les abeilles des modalités « Pollen » et « Pollen-*Nosema* » afin de mettre en évidence une potentielle perturbation par l'infestation de *Nosema*. De même, nos résultats ne traitent que de trois activités d'enzymes protéolytiques, il pourrait ainsi être intéressant d'étudier ce qu'il se passe chez les autres protéases ou chez les sucrases qui servent à digérer les sucres, importante source d'énergie et donc d'ATP pour l'hôte, et bien sûr pour le parasite.

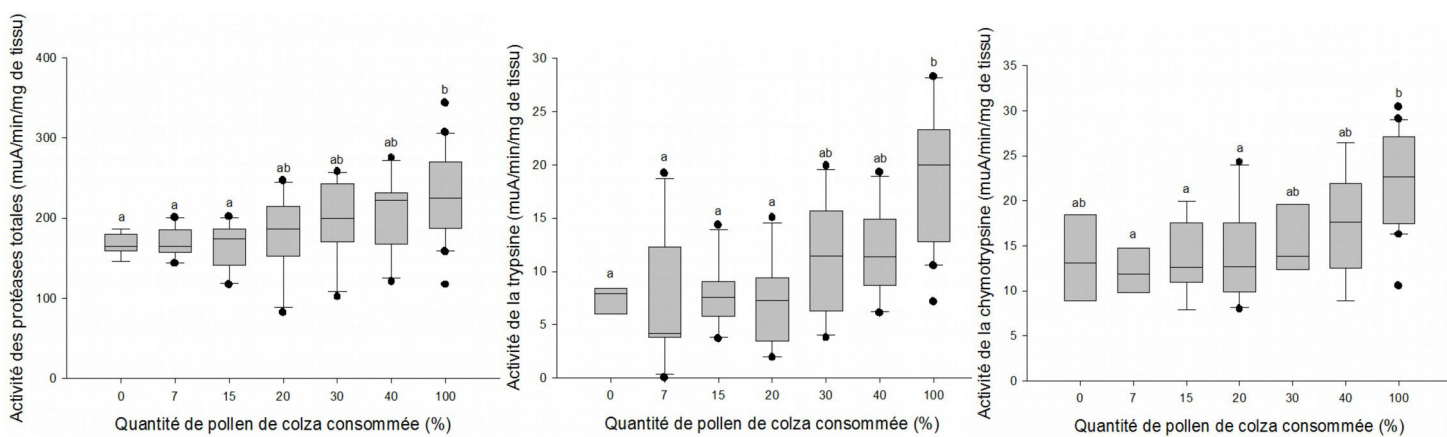


Figure 1: Effets de la quantité de pollen sur (A) l'activité des protéases totales, (B) de la Trypsine (C) et de la Chymotrypsine dans les intestins d'abeilles domestiques. Les Box plots présentent les valeurs pour $n = 10$ par modalité (3 abeilles par mesure). Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les quantités de pollen consommées ($p < 0.01$, Anova ; $p < 1.23 \times 10^{-5}$, test de Wilcoxon ; $p < 5.96 \times 10^{-4}$, test de Wilcoxon ; pour les activités de protéases totales, de la trypsine et de la chymotrypsine, respectivement). Les boîtes rangent les données entre le 25ième et le 75ième pourcent et la ligne représente la médiane. Les moustaches englobent 90% des individus, au-delà de laquelle les valeurs extrêmes sont représentées par des cercles.

	Consommation en pollen		Nombres de spores	
	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Pas de pollen	0	0	0	0
Pollen	34,21	3,48	0	0
<i>Nosema</i>	0	0	61 100 000	103 457 358
Pollen/ <i>Nosema</i>	38,73	4,76	86 880 000	60 497 083

Tableau 1: Détermination de la moyenne de pollen de colza consommée (et erreur standard) pour chaque modalité ($n = 10$ cagettes de 33 abeilles par modalité); et moyenne (et erreur standard) du nombre de spores de *Nosema ceranae* présent dans l'intestin des abeilles survivantes au jour 20 ($n = 50$ abeilles par modalité).

Variables dépendantes	covariables	classes	coefficients	erreurs standards	p-values
Activité des protéases totales	intercept		221.4	13.75	<0.001
	day	6	10.3	16.90	0.54
		13	-26.8	16.91	0.11
		21	-88.5	16.91	<0.001
	Nosema	présence	-11.6	11.65	0.33

	pollen		présence	79.4	11.43	<0.001
	Nosema	x				
	pollen		présence	6.8	16.47	0.68
Activité de la Trypsine						
	intercept			9.7	1.59	<0.001
	day		6	4.2	2.07	0.05
			13	-5.2	2.07	0.01
			21	-11.8	2.05	<0.001
	Nosema		présence	-1.2	1.66	0.48
	pollen		présence	13.7	1.44	<0.001
	Nosema	x				
	pollen		présence	-4.7	2.15	0.03
Activité de la Chymotrypsine						
	intercept			12.7	1.45	<0.001
	day		6	10.6	1.76	<0.001
			13	2.6	1.85	0.16
			21	-3.2	1.77	0.08
	Nosema		présence	-6.6	0.90	<0.001
	pollen		présence	8.1	0.92	<0.001

Tableau 2: Coefficients, erreurs standards et p-values associées aux variables fixes des modèles sélectionnés pour les activités des protéases totales, de la trypsine et de la chymotrypsine. L'intercept représente l'activité enzymatique des abeilles de la modalité contrôle sans *Nosema*, et sans apport de pollen au jour 0.

Chapitre 5

Discussion-perspectives

La nutrition représente une fonction biologique clé pour les organismes, c'est pourquoi nous avons voulu caractériser l'influence de l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille, et sa résistance au stresser *N. ceranae*. Nous nous sommes concentrés sur des fonctions biologiques stratégiques pour l'intégrité des populations d'abeilles, que sont la physiologie et le développement d'abeilles nourrices, l'immunité, et la survie des individus, testés en présence ou non du parasite.

L'alimentation pollinique est caractérisée par son abondance, sa qualité et sa diversité. Notre hypothèse générale est que des variations observées sur ces trois paramètres peuvent provoquer des perturbations au niveau individuel et modifier ainsi l'organisation sociale de la colonie, sa résistance aux stressers environnementaux, et aboutir à l'affaiblissement des colonies.

Afin de tester cette hypothèse nous avons établi trois objectifs (i) déterminer l'influence de la quantité, la qualité et la diversité du pollen sur la physiologie d'abeilles nourrices et sur leur survie, (ii) analyser l'importance de ces paramètres sur la santé de l'abeille lorsqu'elle est soumise au parasite intestinale *N. ceranae*, et (iii) vérifier si ce dernier perturbe les capacités de l'abeille à digérer les protéines du pollen, essentielles pour l'assimilation des nutriments.

A partir de nos recherches, nous avons pu déterminer un classement des paramètres représentant l'alimentation pollinique, par ordre d'importance des effets qu'ils induisent, en présence du stresser ou non. Cela nous a permis de nous questionner sur les mécanismes sous-jacents qui relient les différentes caractéristiques du pollen aux fonctions biologiques des individus, et sur les conséquences que peut avoir une mauvaise alimentation sur la colonie entière (Figure 5). Enfin, dans le but d'apporter des solutions aux problèmes de disponibilité des ressources polliniques en conditions réelles, nous avons réfléchi aux mesures agro-écologiques et aux alimentations d'appoints qui peuvent être utilisées.

I- Les effets de l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille

1.1- Importance des paramètres caractérisant les apports en pollen et hypothèses sur les mécanismes sous-jacents

D'après nos résultats, la quantité, la qualité et la diversité des pollens influencent les traits de vie des individus et leur capacité à amortir l'impact d'autres facteurs que sont les bioagresseurs, ici *N. ceranae*. Lorsqu'on regarde plus précisément les effets de chacun de ces paramètres sur la santé de l'abeille, et notamment sur sa survie, un classement déterminant leur nécessité peut être fait. Une variation de 10 % dans la quantité de pollen consommée peut causer une perte de 2-3 jours sur la longévité des ouvrières en conditions de laboratoire. Or, en conditions réelles, des diminutions de 60 % des ressources polliniques peuvent être observées dans un paysage d'agriculture intensive (Requier, 2013). La longévité des ouvrières peut donc être fortement diminuée durant ces périodes. En comparant les pollens monofloraux, on s'aperçoit qu'il n'y a que très peu de différences chez les abeilles non infestées, excepté quand elles consomment un pollen de très mauvaise qualité tel que le pollen de Ciste. Mais dans la réalité, elles ne consomment jamais un seul type de pollen (Odoux *et al.*, 2012 ; Requier, 2013). En ce qui concerne l'influence de la consommation de mélanges, les différences sur la survie sont encore plus faibles, excepté pour le mélange à dominance maïs-sorgho récolté en juillet. Il apparaît que la quantité de pollen disponible est le facteur qui cause les plus grandes variations sur la survie, d'autant plus qu'il s'agit d'un scénario réaliste et observé (Requier, 2013). L'abondance des ressources polliniques représente donc un paramètre très influant sur la santé des abeilles et peut représenter une des causes de l'affaiblissement des colonies (Figure 4). Pour remédier aux périodes de pénurie en paysage agricole, une solution est de fournir à l'abeille un paysage composé d'une grande diversité d'espèces florales. Les espèces ne fleurissent pas toutes à la même période et sur une même durée, et l'apport d'une telle diversité dans l'environnement permet aux abeilles d'avoir des ressources florales tout au long de leur saison de butinage. De même, les résultats obtenus dans le chapitre 3 mettent en évidence l'apport d'une plus-value de la diversité pour la résistance au parasite *Nosema*. Ces résultats mettent en relation la diversité des ressources et les fonctions de l'individu lui permettant de résister aux stress environnementaux. La forme de la relation entre la fonction de résistance, qui est la variable dépendante, et la diversité pollinique, qui est la variable explicative, peut être linéaire si chaque espèce de pollen contribue à la fonction étudiée. Mais cette relation peut avoir des formes différentes si les espèces sont fonctionnellement redondantes, ou au contraire si certaines espèces sont fonctionnellement uniques (Loreau *et al.*, 2002). Dans le cas où la biodiversité aurait un effet

redondant, les espèces de pollens seraient interchangeables. C'est-à-dire que l'apport ou le manque d'un type de pollen ne modifierait pas la fonction, puisqu'ils se valent tous et donc se compenseraient les uns les autres.

Si la biodiversité avait un caractère unique, on retrouverait des espèces de pollens essentielles, dont l'apport serait irremplaçable pour engager la fonction de résistance, et le manque ne permettrait pas à la fonction d'être effective. Certaines espèces de pollens seraient donc des espèces clés pour la santé de l'individu. Dans notre cas, la diversité a plutôt une relation de complémentarité pour les fonctions de résistance. En effet, le manque occasionné par l'apport de pollen de mauvaise ou faible qualité peut être compensé par les apports de pollens de bonne qualité. Mais, sans ces espèces de pollen à forte valeur nutritionnelle, la fonction de résistance a tout de même lieu, malgré une plus faible expression. De même, un pollen monofloral de bonne qualité peut suffire par rapport à un mélange ne comportant pas de pollen de bonne qualité. Le meilleur compromis pour éviter des carences dues aux périodes de déplétion pollinique est donc un environnement comportant une diversité d'essences florales, contenant une grande majorité d'espèces à forte valeur nutritionnelle pour l'abeille.

1.2- Extrapolation à l'échelle coloniale

1.2.1- *Les pollens de cultures à floraisons massives*

Les cultures massives sont gages d'abondance en ressources polliniques pour les abeilles domestiques. Mais cette disponibilité varie dans le temps et l'espace puisqu'elle dépend de l'occupation des sols aux alentours des ruchers et de la phénologie des plantes (Decourtye *et al.*, 2010). Dans cette thèse, le parti pris a été d'étudier les pollens issus de deux cultures à floraison massive et largement retrouvées dans les paysages agricoles européens : le colza fleurissant en avril-mai, et le maïs fleurissant en juillet-août. Comme l'ont souligné Steffan-Dewenter *et al.* (2005), Odoux *et al.* (2012), et plus récemment Requier (2013), des périodes de déplétion alimentaire, traduites par une diminution temporaire de la biomasse en ressources rapportée à la ruche, sont observées entre les périodes de floraison des cultures oléagineuses en zones céréalières. D'après des études démontrant le rôle crucial du pollen pour le développement, la résistance aux dangers, et la survie des abeilles (e.g ; Maurizio, 1950 ; Haydack, 1970 ; Rinderer et Elliott, 1977 ; Alaux *et al.*, 2010a), les auteurs suggèrent que la déplétion pollinique affecterait la santé des abeilles. Or, beaucoup de travaux étudiant l'influence de l'alimentation pollinique ont comparé une présence de pollen *versus* une

absence. Nos résultats, présentés dans le second chapitre, apportent des connaissances supplémentaires sur l'effet de la quantité de pollen, en reproduisant la déplétion en conditions contrôlées. En effet, nous montrons que l'apport en pollen de colza influence le développement de la jeune ouvrière (dévouée au soin des larves dans la colonie) de manière graduelle ; plus l'abeille consomme du pollen, plus le développement de ses glandes hypopharyngiennes et l'expression de la *vitellogénine* sont élevés, et plus elles survivent longtemps. Les périodes de déplétion observées entre la floraison du colza et celle du tournesol (Requier, 2013) pourraient causer une diminution de la longévité des ouvrières, forçant un renouvellement plus régulier de la population. Si l'activité de ponte de la reine n'est pas assez élevée, la colonie peut se retrouver dans une situation de déficit démographique, ce qui a tendance à l'affaiblir, et peut se traduire à l'échelle de la colonie par une baisse de la production en miel sur la miellée suivante qui est le tournesol (Figure 5). Les conséquences ont donc des répercussions sur la santé des colonies, mais aussi au niveau économique, puisque les ventes de miel représentent, d'après l'audit économique de la filière apicole française, environ 115 M€ en France pour l'année 2012.

Pour une même quantité de pollen consommée, certains pollens affectent nettement la santé et la longévité des ouvrières, c'est le cas du mélange dominé par des pollens de maïs (69.80 %) et de sorgho (21.25 %). Ce mélange de pollens récolté fin Juillet en zones de grandes cultures ne permet pas à l'abeille d'atteindre des tailles de glandes hypopharyngiennes et des taux de *vitellogénine* optimaux, et cause une diminution significative de sa survie. Dans ces conditions, même la diversité des pollens récoltés durant cette période de floraison du maïs et sorgho ne permet pas de compenser les effets d'un pollen de mauvaise qualité (17,42 % de protéines). Dimou et Thrasyvoulou (2007) ont recueilli les pollens récoltés par quatre ruches sur une saison de butinage en Grèce, et ils recensent notamment du pollen de maïs (12,6 % du poids total) entre Juin et Août. Parmi les autres espèces présentes dans les récoltes durant cette période, on identifie également du pollen de *Rubus* (7,2 % du poids total). Dans ce cas concret, nos résultats permettent de faire des hypothèses sur l'influence que peut avoir les apports en pollen pour la colonie. En effet, l'apport de maïs dans ce milieu peut carencer les abeilles et diminuer leur développement et leur survie. Mais l'apport de *Rubus* peut permettre de par sa qualité nutritionnelle (chapitre 3) de pallier à la mauvaise qualité du pollen de maïs, et ainsi donner une possibilité de résilience à la colonie. Malgré la variabilité des indices de diversité (indice de Shannon) des mélanges testés sur la santé des abeilles dans la seconde partie de notre étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences sur les variables

testées entre les modalités (excepté pour le mélange de fin Juillet). Dans le chapitre 2, le degré de diversité du pollen consommé n'est pas apparu comme un facteur apportant une plus-value pour la santé de l'abeille. Toutefois, nous n'avons testé que 6 mélanges dont la diversité est comprise entre 1,13 et 2,51, et des tests sur un plus grand nombre de mélanges différents, comportant une gamme d'indices plus étendus, mériteraient d'être menés.

1.2.2- Les pollens de fleurs sauvages

Qu'il s'agisse de couverts végétaux ligneux ou de ceux herbacés, cette flore naturelle produit des ressources trophiques stratégiques pour l'abeille mellifère à la sortie de l'hiver ou à sa préparation, ainsi qu'entre la floraison du colza et du tournesol en zones de grandes cultures (Requier, 2013). Dans le troisième chapitre de ce manuscrit, nous avons testé les effets de la qualité et de la diversité sur la physiologie des abeilles, et sur leur résistance au parasite *Nosema*. Nos résultats mettent en évidence que la qualité du pollen influence le développement des ouvrières nourrices. En effet, la taille des acini des glandes hypopharyngiennes et le taux d'expression du gène de la *vitellogénine* augmentent chez les abeilles nourries avec du pollen riche en nutriments, tel que le pollen de *Rubus* (protéines : 22 %, lipides : 6.4 %, sucres : 6.7 %, acides aminés 19.98 g, pouvoir antioxydant : 475 µmol), par rapport à un pollen pauvre en nutriments comme le *Cistus* (protéines : 12 %, lipides : 6.9 %, sucres : 5.2 %, acides aminés 11.9 g, pouvoir antioxydant : 103 µmol).

Les performances des nourrices pour les soins prodigués aux larves sont corrélées à la taille des glandes hypopharyngiennes (Huang *et al.*, 1989 ; Knecht et Kaatz, 1990 ; Hrassnigg et Crailsheim, 1998 ; Blaschon *et al.*, 1999). La *vitellogénine*, synthétisée et exprimée dans les corps gras, représente un bon marqueur quantitatif des réserves lipidiques des individus (Amdam *et al.*, 2005). De même, elle permet la production de la gelée protéinée que produisent les nourrices (Amdam *et al.*, 2003). Ainsi, nous supposons que des abeilles nourrices comportant de petites glandes et peu de *vitellogénine* connaissent des modifications comportementales dans l'élevage du couvain ou les soins apportés à la reine et à l'ensemble de la colonie (Figure 5). La qualité du pollen a une plus forte influence sur les abeilles soumises à un parasite, comme ça a été le cas en conditions réelles dans des colonies infectées par le champignon *N. ceranae*. Dans notre étude, les activités d'enzymes impliquées dans la défense immunitaire (phosphatase alcaline et phénoloxydase) ou de détoxification (glutathion-S-transférase) étaient altérées chez les abeilles infestées par *N. ceranae*. Cette modification des réactions métaboliques des individus peut impliquer une diminution des défenses au niveau individuel et colonial. Nos résultats laissent penser qu'au niveau d'une colonie, des

abeilles alimentées avec du pollen de faible qualité seraient moins à même de lutter contre des dangers biotiques, tel que *Nosema* sp., ou abiotiques, tels que les pesticides. Les résultats présentés sur la survie des abeilles en cagette permettent d'ailleurs de confirmer cela ; les abeilles infestées par *N. ceranae* qui ont consommé du pollen de *Cistus* survivent beaucoup moins longtemps que les abeilles nourries avec du pollen de *Rubus*. Ces effets sur la survie peuvent être dramatiques. 50 % des abeilles nourries avec du pollen de *Cistus* meurent avant le 21^{ème} jour, période à laquelle elles deviennent butineuses (Lindauer, 1953). De nombreuses études suggèrent des perturbations de la dynamique de la colonie dans le partage des tâches abeilles nourrices/butineuses dues à des pertes observées chez les butineuses, notamment à cause des intoxications de pesticides (Watanabe, 2008 ; Henry *et al.*, 2012). Khoury *et al.* (2011) observent un seuil critique du nombre de butineuses en dessous duquel un recrutement précoce des abeilles d'intérieur peut avoir lieu. Mais si comme le suggèrent nos résultats les abeilles meurent à 21 jours, la force de travail des nourrices peut diminuer, ainsi que le nombre d'aspirantes au renouvellement des butineuses. Ces colonies composées d'un petit nombre de nourrices et de butineuses, et donc de peu de réserves alimentaires, n'auraient que très peu de chances de survivre à l'hiver, ou en tout cas, en seraient très affaiblies (Schulz *et al.*, 1998) (Figure 5).

De manière générale, les études scientifiques des effets de la qualité du pollen sur l'abeille utilisent les taux de protéines ou la composition en acides aminés essentiels (Haydack, 1970 ; McCaughey *et al.*, 1980 ; Roulton et Cane, 2002 ; Cook *et al.*, 2003). Nos analyses ont mis en évidence que la composition en éléments nutritifs du pollen est à considérer dans sa totalité afin de déterminer la valeur nutritionnelle d'un pollen. Par exemple, le pollen d'*Erica* comporte 14,8 % de protéines mais induit une meilleure survie chez les abeilles infestées par le parasite *N. ceranae* que le pollen de *Castanea* qui est composé de 21,6 % de protéines. Ainsi, les taux et compositions des lipides, des sucres, des acides aminés, des vitamines, minéraux, etc... sont aussi à prendre en compte dans la valeur nutritive d'un pollen.

Contrairement aux résultats obtenus dans le chapitre 2, nous avons mis en évidence dans le chapitre 3 un intérêt à la diversité pollinique du régime alimentaire pour l'abeille. En effet, nos résultats mettent en évidence que l'apport de diverses essences polliniques apporte une plus-value aux abeilles lorsqu'elles sont soumises à un stress. Cependant, ils révèlent que la consommation d'un pollen monofloral de bonne qualité est aussi bénéfique qu'un polyfloral pour la physiologie et la survie des abeilles. La plus-value du mélange n'est en fait due qu'à la complémentarité qu'il apporte par l'apport de bons pollens versus mauvais pollens. La

diversité de la flore prend donc toute son importance pour maintenir l'abeille en bonne santé, notamment dans un paysage d'agriculture intensive qui comporte des espèces polliniques de faible valeur nutritionnelle, comme le maïs et le tournesol (Charrière *et al.*, 2006 ; Höcherl *et al.*, 2012).

1.2.3- La résistance au parasite *Nosema*

Comme on a pu le voir dans les chapitres 3 et 4 de notre étude, un stress peut avoir des conséquences au niveau individuel et colonial. En effet, des modifications de la physiologie des nourrices, une altération des enzymes immunitaires, de détoxification, ou digestives, et une diminution de la survie des abeilles ont pu être observées en condition de laboratoire sur les individus infectés par *Nosema*. Ces résultats laissent suggérer des perturbations sur l'organisation de la colonie, sa résistance, et sa capacité à survivre au cours d'une saison. Les effets de ce stress sont d'autant plus néfastes en absence de pollen ou lorsque les abeilles n'ont à disposition que des pollens de faible qualité nutritionnelle. Il paraît donc évident qu'en présence de multiples stress dans l'environnement, les conséquences d'une mauvaise alimentation pollinique soient encore plus prononcées et préjudiciables. Nos résultats mettent en évidence que la préservation de l'habitat des pollinisateurs tels que les sites d'alimentation est une priorité dans la préservation des abeilles domestiques. Les parties 2 et 3 de notre étude apportent des précisions sur les paramètres à prendre en compte dans la disponibilité des ressources polliniques pour optimiser notamment la résistance des abeilles face à des stress tels que *N. ceranae*.

La quantité reste le facteur le plus important pour la santé des abeilles, puisque les périodes de pénuries sont capables d'affaiblir les colonies et les rendre plus sensibles aux stress présents dans l'environnement. La consommation d'un mélange n'est pas forcément meilleure que la consommation d'un pollen de bonne qualité fournie dans les mêmes quantités, mais la diversité permet d'apporter une plus-value en complétant les carences que créent les pollens de faible qualité avec la présence de pollens à plus forte valeur nutritionnelle, notamment pour les abeilles infestées par *Nosema*. Un grand nombre de pollens ne permet pas de satisfaire les besoins de l'abeille lorsqu'ils sont consommés seuls, ou peuvent être toxiques, et une consommation plus diverse permet d'apporter les nutriments manquants, ou de diluer ces effets néfastes (Somerville et Nicol, 2006 ; Eckhardt *et al.*, 2013). L'apport de diversité, et la présence d'espèces florales de qualité dans un environnement donné permet de pallier aux carences que peuvent provoquer les périodes de déplétion en ressources polliniques.

II- Solutions pour améliorer l'alimentation de l'abeille mellifère

Au vu de l'influence que peut avoir l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille domestique, il semble que la disponibilité de ces ressources soit un facteur important dans l'affaiblissement des colonies. Mattila et Otis (2006 et 2007) concluent d'ailleurs que les variations des réserves polliniques influencent l'organisation de la colonie, et notamment la préparation à l'hivernage. La gestion des ressources florales dans l'environnement paraît être un bon moyen de prévention du déclin des colonies. Ainsi, il serait intéressant de faire un état des lieux des plantes disponibles dans chaque région, afin de fournir un outil aux agriculteurs pour favoriser leurs rendements par l'action de pollinisation des abeilles domestiques ; mais aussi pour les apiculteurs qui pourraient déterminer dans quelles zones placer leurs ruches, et à quel moment les transhumances seraient les plus favorables en fonction de la végétation environnante. Pour connaître la situation initiale des ressources disponibles il existe plusieurs méthodes, l'une basée sur la géomatique et la botanique (analyse géographique de l'organisation spatiale de la flore), l'autre plus à la portée des acteurs du développement apicole, qui consiste à caractériser les apports polliniques des ruches au cours de la saison en abondance et diversité (Piroux *et al.*, 2014). Les résultats présentés ici peuvent orienter ou appuyer des recommandations de gestion des aménagements floristiques sur le territoire.

2.1- Mesures agro-écologiques

2.1.1- Une diversité d'habitats semi-naturels

L'habitat naturel ou semi-naturel est un ensemble d'éléments du paysage, formé par des conditions stationnelles (climat, sol, relief,..) qui offrent les ressources suffisantes pour permettre à une population d'une espèce de se nourrir, de vivre et de se reproduire normalement sur ce territoire. La création ou protection de ces habitats semi-naturels permet ainsi de fournir à l'abeille mellifère des ressources supplémentaires (Lagerhöf *et al.*, 1992 ; Tschardt *et al* 2002), et permet de pallier aux variations de biodiversité observées dans le temps dans les paysages agricoles (Fussell et Corbet, 1991; Dover *et al.*, 2000 ; Holland et Farhig 2000 ; Ricketts *et al.*, 2008).

La conservation considère le nombre et la taille de ces milieux qui doivent être connectés par la présence de corridors tels que les haies, les bordures de champs et de route (Kremen *et al.*,

2004 ; in Hanski et Pöyry, 2006). Les ressources fournies par les habitats semi-naturels et naturels proviennent des plantes natives, et des plantes implantées artificiellement. Elles peuvent être divisées en deux groupes : les ressources des habitats ligneux (arbres, haies, arbustes, ronciers), et celles des habitats herbacés (prairies, jachères, bordures, fossés, adventices de cultures).

D'après Rollin *et al.* (2013), les habitats semi-naturels ligneux ont une forte attractivité pour les abeilles domestiques. Leur étude a mis en évidence que durant la floraison du colza, les abeilles domestiques étaient plus abondantes dans ces habitats que dans les autres compartiments fleuris, à savoir les habitats semi-naturels herbacés et les parcelles de colza.

Parmi ces ressources ligneuses, les arbres (forêts, lisières forestières et haies) peuvent représenter une ressource pollinifère majeure en raison de leur taille et de la quantité de fleurs produites, notamment en début de saison, au printemps et au début de l'été, pendant le démarrage des colonies (Odoux *et al.*, 2012 ; Requier, 2013). La production séquentielle des fleurs présentes dans les haies fournit une source de pollen constante (Fussell et Corbet, 1991 ; MacLeod, 1999). On retrouve par exemple des fleurs de *Prunus spinosa* en Mars, de *Rosa canina* et *Rubus fruticosus* en Juin, et du *Hedera helix* plus tard à l'automne (Pollard *et al.*, 1974). D'après Maudsley (2000) la taille des haies a un impact négatif sur l'abondance des abeilles. Malheureusement, de nombreux arbres matures sont souvent abattus pour favoriser le remembrement de parcelles (Robinson and Sutherland, 2002) ou pour des raisons de "santé et sécurité", et sont remplacés par des espèces plus petites et inadaptées, qui offrent peu de nourriture pour les abeilles (Kirk and Howes, 2012). Dans notre étude (chapitre 3), nous avons montré que le pollen de certaines essences présentes dans ces couverts ligneux et arbustifs, tels que les ronces, améliore la santé de l'abeille domestique et sa tolérance au parasite *N. ceranae*. En effet, les ouvrières nourries avec du pollen de *Rubus*, riche en protéines, en sucres et en antioxydants, ont des tailles de glandes

hypopharyngiennes supérieures, des taux de *vitellogénine* plus élevés, et résistent aussi bien au parasite que celles nourries avec un mélange de pollens. En ce qui concerne les ressources herbacées, l'introduction de jachères dans les assolements ou la gestion des bandes enherbées peuvent permettre de réintroduire la diversité floristique bénéfique aux populations d'abeilles domestiques (Murray *et al.*, 2009 ; Decourtye *et al.*, 2007, 2010 ; Wratten *et al.*, 2012). La Suisse a d'ailleurs répondu aux problèmes causés par les pratiques agricoles nécessaires au maintien de prairies et de champs de foin (fauches et espèces végétales utilisées) en recommandant une fauche tardive et en subventionnant les terres en jachère florale (Holzgang *et al.*, 2002, 2005 ; Albrecht *et al.*, 2007 ; Aschwanden *et al.*, 2007). Buri *et al.* (2014) confirment de même l'effet bénéfique de ces fauches tardives sur les populations d'abeilles domestiques. Mais les ressources issues de la flore dite « adventice » pour l'agriculture sont aussi à prendre en compte. En effet, elles sont capitales pour les abeilles domestiques (Requier, 2013 ; Rollin *et al.*, 2013). Durant la floraison du colza et du tournesol, 33,3 % et 21,3 % du pollen ramené aux ruches proviennent d'adventices, alors que ces proportions atteignent 43,2 % à 48,5 % de la récolte en période de déplétion d'approvisionnement alimentaire (Juin) (Requier, 2013). La conservation des adventices peu préjudiciables pour les cultures serait possible par une réduction de l'intensité de certaines pratiques agricoles, y compris l'utilisation d'herbicides (Barzman et Dachbrodt-Saaydeh, 2011). De même, les pesticides pulvérisés dans les champs en période de floraison, peuvent contaminer les abeilles par contact direct, ou indirectement lorsqu'elles consomment les produits de la fleur contaminée. Des phénomènes de « dérive » qui touchent particulièrement les bandes marginales des zones cultivées peuvent être observés, et ainsi contaminer les ressources florales sauvages (Richards, 2001). De nombreux effets létaux et sub-létaux sont observés chez les abeilles intoxiquées (Decourtye *et al.*, 2003 et 2005 ; Desneux *et al.* 2007, Henry *et al.*, 2012). Il est donc essentiel de respecter et/ou mettre en place des mesures qui visent à éviter la contamination de ces ressources alimentaires proposées par les aménagements floristiques.

Les agrosystèmes qui contiennent une mosaïque d'habitats semi-naturels dans le paysage peuvent maintenir un plus fort niveau d'abondance en abeilles (Tscharntke *et al.*, 2005 ; Winfree *et al.*, 2007), même à des niveaux régionaux (Tylianakis *et al.*, 2005). La restauration et la conservation des éléments semi-naturels permettraient d'apporter une diversité en ressources trophiques (Duelli et Obrist, 2003) dont les colonies d'abeilles (et les abeilles sauvages) sont dépendantes pour maintenir l'intégrité de leurs défenses naturelles. Afin de pallier aux conséquences négatives de l'agriculture intensive, le Département d'Agriculture

des Etats-Unis (USDA) et l'Union Européenne mettent en place des initiatives de régulation agro-environnementale et ont établi différentes directives ou orientations (Whittingham, 2011) dans le but de créer des habitats riches en fleurs sous la forme de haies, de plantations en bordure de champs, de couverts de cultures fleuries temporaires, et des zones tampons riches en fleurs. Mais le succès de ces actions varie en fonction du lieu, selon leur acceptation et leur popularité auprès des agriculteurs et du public (Kleijn et Sutherland, 2003 ; Kleijn *et al.*, 2006 ; Haaland *et al.*, 2011). Nos résultats (chapitre 2 et 3) objectivant l'influence de l'alimentation pollinique sur la santé des abeilles appuient l'intérêt d'une préservation des essences florales sauvages afin de fournir à l'abeille des pollens de bonne qualité, garants de sa santé et sa longévité.

2.1.2- L'utilisation d'espèces végétales abondantes et de qualité

Des couverts végétaux à cycle court peuvent être insérés en rotation avec la culture principale en début et fin de saison afin de fournir du pollen aux abeilles en période de déplétion pollinique. Parmi les plantes susceptibles de convenir à cette fin sont la phacélie (*Phacelia tanacetifolia*), les trèfles annuels (*Trifolium spp.*), et les *Brassicacées* comme les radis (*Raphanus spp.*) et les moutardes (*Brassica spp.*). Dans d'autres systèmes, des couverts végétaux de plus longue durée ou même vivaces sont préférés. Par exemple, un couvert végétal utilisé en rotation avec deux cultures de graminées tel que l'orge et le maïs peut durer neuf mois (Le Roux *et al.*, 2008). Des couverts composés de plantes sauvages et pérennes induisent une abondance et une diversité en pollinisateurs accrus par rapport à des mélanges de graminées, de cultures conventionnelles, ou de couverts spontanés (Meek *et al.*, 2002 ; Carvell *et al.*, 2004 ; Pywell *et al.*, 2005). Szalai (2001) a constaté que les mélanges d'espèces annuelles à base de moutarde et de sarrasin, et ceux d'espèces bisannuelles et pérennes à base de sainfoin de mélilot et de coronille, assurent un bon recouvrement du sol et une longue période de floraison. Le choix d'une gamme de plantes annuelles et pérennes variées paraît être le meilleur compromis pour fournir aux abeilles du pollen accessible tout au long de leur période d'activité. Nos résultats viennent confirmer d'un point de vue sanitaire l'intérêt de combler les périodes de déplétion pollinique par des couverts végétaux, puisque nous avons mis en évidence l'importance de la quantité de pollen sur le développement d'abeilles nourrices, et sur leur survie, ainsi que les préjudices que peuvent causer les périodes de pénurie de pollen. La ressource pollinique se doit d'être disponible tout au long de la période d'activité des abeilles, et l'utilisation de fleurs dont la période de floraison est étendue, et variant dans le temps permet de remédier à cela.

D'anciens travaux ont étudié la préférence des abeilles pour certaines plantes en situation de choix (Schmidt *et al.*, 1982, 1984, 1995). Les pollens provenant des fleurs de trèfles (*Trifolium spp*), lupin (*Lupinus angustifolius*), mélilot (*Melilotus officinalis*), phacélie (*Phacelia spp*), moutarde (*Brassica campestris*), ronce (*Rubus spp*), peuplier (*Populus fremontii*), thé mormon (*Ephedra trifurca*), acacia mexicain, poirier (*Pyrus communis*), amande (*Prunus dulcis*), platane (*Platanus spp*), chêne (*Quercus spp*) sont connus comme représentant des pollens de bonne qualité nutritionnelle pour les abeilles (Schmidt *et al.*, 1987 ; Singh et Singh, 1996 ; Pernal et Currie, 2000 et 2001 ; Roulston et Cane, 2002 ; Somerville et Nicol, 2006). En revanche, les pollens de myrtille (*Vaccinium spp*), de massette (*Typha spp*), ambroisie (*Ambrosia spp*), *Xanthium strumarium*, ciste (*Cistus spp*) sont plutôt des pollens de faible qualité nutritionnelle (Schmidt *et al.*, 1987, Pernal et Currie, 2001 ; Tasei et Aupinel, 2008). Les pollens de cultures de tournesol (*Helianthus annuus*), maïs (*Zea mays*), sesame (*Seamum indicum*) et de bleuet (*Centaurea cyanus*) ne permettent pas aux abeilles d'obtenir tous les éléments nécessaires à un développement optimal. L'apport d'autres espèces polliniques est alors nécessaire, contrairement à la culture de colza (*Brassica napus*) dont la qualité est suffisante (Schmidt *et al.*, 1995, Odoux *et al.*, 2004 ; Charrière *et al.*, 2006 ; Höcherl *et al.*, 2012 ; Girard *et al.*, 2012). En dépit de leur attractivité par les abeilles, les pollens d'*Asteraceae* tel que *Haplopappus spp*, ou le pissenlit (*Taraxacum spp*) ne sont pas des pollens de bonne valeur nutritionnelle. En effet, le pollen de pissenlit peut être considéré comme un pollen de mauvaise qualité car sa digestion par l'abeille est incomplète (Crailsheim et Stolberg, 1989) et il possède un faible taux d'acides aminés et concentration en protéines (Schmidt *et al.*, 1987). Decourtye *et al.* (2010) ont recensé des espèces de plantes bénéfiques pour les abeilles, à inclure dans les zones fleuries en Europe et aux Etats-Unis. Mais les plantes recommandées sont choisies pour leur durée ou période de floraison, pour leur attractivité pour les abeilles, ou encore pour leur taux de protéines ou d'acides aminés, mais pas pour leur valeur nutritionnelle complète ou leurs effets sur la santé de l'abeille. Bien que l'ensemble de ces recommandations ne reposent pas sur des données nutritionnelles approfondies, leur stratégie semble bonne au regard de nos résultats. Notre travail montre qu'hormis des plantes anémophiles (maïs, sorgho), connues pour avoir un pollen peu nutritif pour l'abeille, certaines entomophiles comme le ciste peuvent également produire un pollen de faible valeur nutritive. Donc on ne peut pas uniquement se baser sur le type de reproduction des plantes pour révéler la qualité nutritive de leur pollen. Mais puisqu'il est inenvisageable de connaître l'influence du pollen sur la santé de l'abeille de toutes les espèces

pollinifères présentes dans le commerce d'une part, et que d'autre part, nous montrons que la diversité alimentaire apporte une meilleure défense contre un bioagresseur, la stratégie de promouvoir des mélanges de plantes produisant du pollen est un bon compromis. De plus, il faut tenir compte du fait que l'importance des plantes dépend de la région, de l'histoire du paysage, et autres facteurs environnementaux (Tuell *et al.*, 2008 ; Connop *et al.*, 2010 ; Menz *et al.*, 2011).

2.2- Alimentations d'appoint

2.2.1- Les suppléments protéiques, une solution efficace ?

En période de pénurie ou lorsque la colonie se trouve dans un environnement composé de ressources polliniques à faible diversité et/ou valeur nutritionnelle, l'apiculteur peut améliorer l'alimentation de l'abeille domestique en fournissant aux colonies des suppléments protéiques commerciaux. Les travaux de recherche sur les substituts de pollen ont débuté il y a plus de 50 ans. Schmidt *et al.* (1995) suggèrent qu'un bon substitut doit être stimulant pour être consommé, digeste, et comporter assez de protéines et d'acides aminés pour le développement de l'abeille. Les premiers chercheurs utilisaient de la farine de blé dans leur préparation, puis du lait malté. De nombreux produits se sont ensuite enchainés, tels que la farine de soja, du lait écrémé en poudre, la farine de coton, du tourteau de soja. L'utilisation de farine de soja (*Glycine max* Merrill, *Fabaceae*) et de lupin (*Lupinus*, *Fabaceae*) causait une diminution de la longévité des abeilles (Manning et Rutkay, 2007). Cela peut être dû au fait que ces farines comportent du stachyose, sucre toxique pour les abeilles. Dans les années 50, des levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis*) ont été ajoutées aux substituts. A la fin des années 60, la majorité des suppléments alimentaires pour les abeilles étaient constitués de farine de soja, de levure de bière desséchée (*S. cerevisiae*), de lait écrémé en poudre. De temps en temps de la poudre de jaune d'œuf et de la caséine pouvaient être ajoutées pour augmenter la valeur nutritive du produit (Haydack, 1970). L'ajout de pollen naturel à ces substituts permet d'en augmenter l'appétence et on parlera alors de suppléments de pollen (Stanger et Laidlaw, 1974 ; Herbert, 1992). De même, la préparation des substituts en elle-même est importante ; la farine de soja doit par exemple être chauffée pour neutraliser les inhibiteurs de trypsine, qui empêche la digestion de l'abeille (Erickson et Herbert, 1980). Par la suite de nombreux autres substituts ont été essayés mais aucun n'a égalé les effets de la consommation de pollen frais. Les produits disponibles de nos jours sur le marché sont : Global Patties (Airdrie, Alberta, Canada) composé de sucre, de soja, de levure de bière, et de pollen naturel ; Brood Builder® (Dadant and Sons Inc, Hamilton, Illinois, Etats-Unis) et BeePol®

(International Ingredient Corporation, St-Louis, Missouri, Etats-Unis) composé de sucre, de soja, et de levure de bière ; Beltsville Bee Diet[®] (Bio-Serv, Frenchtown, New Jersey, Etats-Unis) composé de saccharose, de levure de torula et de lactalbumine ; et enfin Feed-Bee[®] (Bee Processing Entreprises Ltd, Scarborough, Ontario, Canada), Bee-Pro[®] (Mann Lake Ltd, Hackensack, Minnesota, Etats-Unis), et MegaBee[®] (Castle Dome Solutions, Yuma, Arizona, Etats-Unis) dont les compositions sont indéterminées. Les trois derniers ont fait l'objet d'études qui concluraient que MegaBee est le plus apte à permettre aux abeilles de produire plus de couvain et d'adultes (Gregory, 2006 ; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2008 ; De Jong *et al.*, 2009).

Afin de vérifier l'intérêt de ces suppléments protéiques sur la santé de l'abeille, nous avons procédé à quelques expérimentations. Ainsi, nous avons analysé le développement des glandes hypopharyngiennes, le taux de *vitellogénine*, et la survie d'abeilles ayant ou non reçu un supplément protéique. Les abeilles étaient nourries avec du pollen de colza *ad libitum* pendant les 10 premiers jours de leur vie, et la moitié seulement a reçu des protéines (Beevital, 1 % p/v) dans leur eau, du 10^{ième} jour de l'expérimentation jusqu'à la fin. Les prélèvements des échantillons à analyser ont été faits à 10 et 20 jours. D'après nos résultats (Annexes, Figure 1), l'apport de protéines après le dixième jour ne permet pas d'empêcher la réduction des glandes hypopharyngiennes. En effet, malgré le fait que la taille des glandes dépende des apports en protéines, leur développement dépend aussi de l'âge de l'abeille (Maurizio, 1950 ; Free, 1961 ; Knecht et Kaatz, 1990). En revanche, les taux d'expression du gène de la *vitellogénine* des abeilles ne recevant pas de protéines en supplément diminuent entre les jours 10 et 20, tandis que l'apport de protéines permet aux abeilles de conserver un taux constant jusqu'au 20^{ième} jour.

Nous savons que les abeilles consomment du pollen durant les dix premiers jours de leur vie (Haydack, 1970), et Huang *et al.* (2014) observent une diminution des taux de *vitellogénine* autour du 15^{ième} jour à cause de cet arrêt de la consommation en pollen. L'apport de protéines est donc un facteur primordial dans la synthèse de la *vitellogénine*. Cette dernière, synthétisée dans les corps gras, est un bon indicateur de santé et de longévité (Amdam *et al.*, 2005 ; Simone *et al.*, 2009). Huang *et al.* (2014) suggèrent que l'apport de suppléments protéiques peut permettre aux abeilles d'augmenter leurs réserves lipidiques et leur survie. Cependant, les conclusions de notre étude préliminaire ne vont pas forcément dans ce sens. En effet, les résultats obtenus sur la survie (Annexes, Figure 2) mettent en évidence une diminution significative de cette dernière lorsque des suppléments protéiques sont apportés. Herbert *et al.* (1977) considèrent qu'un supplément en protéines de 23 à 30 % est bénéfique pour la

production de couvain, tandis que des quantités de 5 à 10 % ne permettent pas l'élevage de couvain, et l'apport de 50 % cause trop de mortalité pour avoir des effets bénéfiques. Maurizio (1950) attribue ces effets néfastes à l'accumulation de matières indigestes dans l'intestin. Nos résultats préliminaires confirment que l'apport de protéines a des effets négatifs sur la survie d'abeilles adultes, malgré l'intérêt qu'il peut avoir sur le taux de *vitellogénine*, qui est pourtant un indicateur de longévité (Amdam et Omholt, 2002 ; Amdam *et al.*, 2004a, 2005). Mais cette diminution que cause l'apport de suppléments protéiques sur la survie n'est de l'ordre que d'un jour ou deux. Il serait donc intéressant de faire des analyses supplémentaires pour éclaircir l'avantage qu'apportent ces suppléments protéiques sur les taux de *vitellogénine*, l'immunité et la résistance aux différents stress notamment. En attendant, les apiculteurs ne devraient l'utiliser qu'en cas de pénurie extrême et favoriser plutôt les ressources disponibles dans l'environnement naturel.

2.2.2- Pollen frais versus pain d'abeille

De manière générale, les abeilles préfèrent les pollens frais provenant des fleurs aux substituts car ils comportent des substances les rendant plus attractifs (Huang *et al.*, 2012). Schmidt et Hanna (2006) ont démontré que certaines substances rendaient le substitut de pollen plus consommable mais aucun d'entre eux n'est aussi bénéfique que le pollen frais sur la survie des abeilles. Or, dans la réalité, les abeilles consomment autant de pollen frais en pelotes que de pollen sous forme de pain d'abeille (Ellis et Hayes, 2009). Dans toutes nos expérimentations, nous avons utilisé du pollen sous forme de pelotes. Nous avons voulu déterminer si nos conclusions étaient réalistes en comparant les effets que peut avoir le pollen frais versus ceux que cause la consommation du pollen sous forme de pain d'abeille, sur la santé des abeilles (le développement des glandes hypopharyngiennes, le taux de *vitellogénine*, les activités d'enzymes digestives, et la survie). La différence entre les deux types de pollens vient du fait que les abeilles mélangent le pollen avec du nectar, du miel régurgité, ou des sécrétions glandulaires comportant des microorganismes (*Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces sp*) et des enzymes (invertase) (Foote, 1957 ; Haydack 1958 ; Pain et Maugeunet, 1966). Ces derniers permettent de modifier le pollen en pain d'abeille suite à une fermentation, par diminution du pH. D'après Pain et Maugeunet (1966), la valeur biologique du pollen ensilé (pain d'abeille) est supérieure à celle du pollen frais. Cremonez et al (1998) observent d'ailleurs un maximum de *vitellogénine* et de protéines dans l'hémolymphe d'abeilles nourries avec du pain d'abeille par rapport aux abeilles nourries avec du pollen en pelotes. Pour notre expérience, nous avons prélevé du pollen récolté grâce à des trappes à

pollen sur cinq ruches d'un même rucher, et nous avons recueilli le pain d'abeille que ces mêmes ruches comportaient, sur la même période (les cadres étaient vides avant le début de l'expérimentation, et celle-ci a duré un mois). Des abeilles ont été nourries en laboratoire avec ces deux types de pollens durant neuf jours, et les prélèvements ont été réalisés au dixième jour. Finalement, les abeilles nourries avec du pain d'abeille comportaient des glandes hyopharyngiennes moins développées (Annexes, Figure 4A) et un taux de *vitellogénine* plus faible (Annexes, Figure 4B). Malgré une plus forte consommation de pollen pour les abeilles nourries avec du pain d'abeille (Annexes, Figure 3), nous n'avons pas observé de différences pour les activités des protéases totales et pour la trypsine entre les deux modalités testées (Annexes, Figure 5A et B), mais l'activité de la chymotrypsine est plus exprimée pour celles qui ont consommé le pain d'abeille (Annexes, Figure 5C). En revanche, la survie n'a pas été affectée par le type d'alimentation sur les 21 jours d'expérience (Annexes, Figure 6). D'après nos résultats, il apparaît que la consommation de pelotes est plus bénéfique à la physiologie de l'abeille que le pain. Mais nos résultats ne peuvent être considérés que comme une expérience préliminaire, puisque notre protocole n'a pas permis d'obtenir exactement les mêmes espèces palynologiques dans les échantillons en pelotes et en pain (Annexes, Tableau 1). Ainsi, nos résultats pourraient venir simplement de l'effet de la qualité d'un des pollens présents dans le mélange de pelotes et absent dans le pollen en pain. D'ailleurs le pollen sous forme de pelotes contenait un taux de protéine de 22,9 % tandis que le pain n'avait que 17,7 %. Malgré le fait qu'Herbert et Shimanuki (1978) et Human et Nicolson (2006) observent aussi une diminution des taux de protéines et de lipides dans le pain par rapport à celui contenu dans les pelotes, nous ne pouvons pas conclure sur une réelle perte de valeur nutritionnelle du pain d'abeille par rapport aux pelotes. Pour Vasquez et Olofsson (2009) la présence des bactéries lactiques dans le pain permet aux abeilles de lutter contre les maladies. De même, d'après Dustmann et Gunst (1981), le pain d'abeille comporte plus de glucose oxydase que le pollen en pelotes. Or il existe une corrélation positive entre la teneur en glucose oxydase et l'action antibactérienne, puisqu'il s'agit d'une enzyme impliquée dans l'immunité sociale de la ruche. Le pain d'abeille a donc plus de propriétés antibactérienne et devrait permettre à l'abeille de mieux se défendre face aux parasites et pathogènes. Il serait intéressant de reproduire cette expérimentation avec des échantillons ayant les mêmes espèces palynologiques sous forme de pelotes et de pain, et de les tester sur la résistance de l'abeille face à un stress parasitaire tel que l'infestation par *N. ceranae*.

Ces résultats sur les alimentations d'appoint ne sont que des expérimentations préliminaires et mériteraient d'être approfondies, pour apporter des solutions concrètes aux apiculteurs quant

aux suppléments alimentaires qu'ils devraient prodiguer pour renforcer leurs colonies. De plus, nos analyses ont toutes été réalisées en laboratoire, en conditions contrôlées, et les résultats obtenus sur les effets du pollen ou des suppléments sur le développement, les défenses immunitaires, et la survie des individus devraient être confirmés en condition de plein champ. Cela permettrait par la même occasion de vérifier nos hypothèses faites sur les conséquences que peuvent avoir les paramètres « quantité », « qualité » et « diversité » du pollen sur l'organisation, la démographie et la résistance de la colonie.

**Ressources polliniques
abondantes et / ou diversifiées**

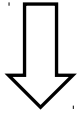
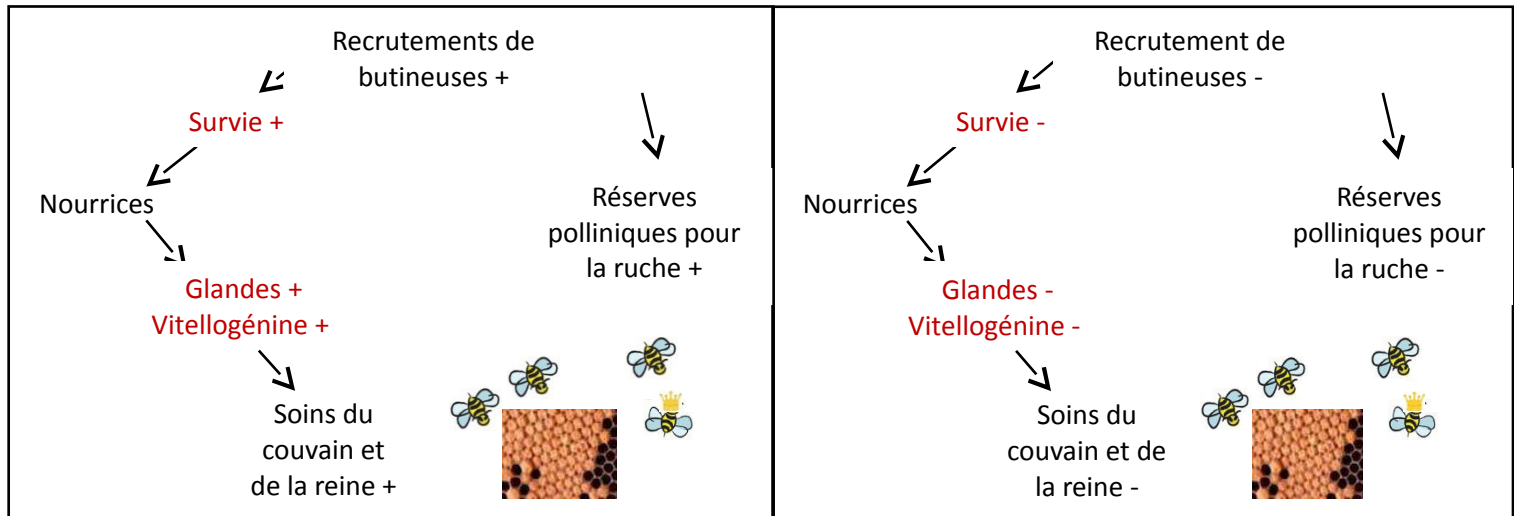


Butineuses +

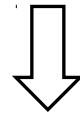
**Déplétion des
ressources polliniques**



Butineuses -



Colonie favorisée pour faire
face aux stress environnementaux
+
Colonie productive
(démographie et produits de la ruche)



Colonie affaiblit, plus sensible
aux stress environnementaux
+
Colonie peu productive
(démographie et produits de la ruche)

Figure 5 : Les effets des variations des ressources polliniques dans l'environnement sur le devenir des colonies.

Références bibliographiques

- AFNOR15662 (2009). Foods of plant origin - Method versatile determination of pesticide residues by GC-MS and SL / SM / MS extraction / partition with acetonitrile and cleaned by SPE dispersed.
- Akaike H. (1973). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle, pp.267-281. 2nd International Symposium on Information Theory, Budapest.
- Alaux C., Ducloz F., Crauser D., Le Conte Y. (2010a). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* 6: 562-565.
- Alaux C., Brunet J. L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L. P. and Le Conte Y. (2010b). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12(3): 774-782.
- Alaux C., Dantec C., Parrinello H., Le Conte Y. (2011). Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics* 12: 496.
- Albrecht M., Duelli P., Müller C., Kleijn D., Schmid B. (2007). The Swiss agri-environment scheme enhances pollinator diversity and plant reproductive success in nearby intensively managed farmland. *J. Appl. Ecol.* 44: 813-822.

- Amdam G.V. and Omholt S.W. (2002). The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *J. theor. Biol.* 216: 209-228.
- Amdam G.V., Norberg K., Hagen A., Omholt S.W. (2003). Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1799-1802.
- Amdam G.V., Simões Z.L.P., Hagen A., Norberg K., Schröder K., Mikkelsen O., Kirkwood T.B.L., Omholt S.W. (2004a). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.* 39: 767-773.
- Amdam G.V., Norberg K., Fondrk M.K., Page R.E. (2004b). Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11350-11355.
- Amdam G.V., Aase A.L.T.O., Seehuus S.C., Fondrk M.K., Norberg K., Hartfelder K. (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.* 40: 939-947.
- Amdam G.V., Page R.E. (2010). The developmental genetics and physiology of honeybee societies. *Anim. Behav.* 79: 973-980.
- Ament S.A., Wang Y., Robinson G.E. (2010). Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2: 566-576.
- Ament S.A., Chan Q.W., Wheeler M.M., Nixon S.E., Johnson S.P., Rodriguez-Zas S.L., Foster L.J. and Robinson G.E. (2011). Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *J. Exp. Biol.* 214: 3808-3821.
- Antunez K., Martin-Hernandez R., Prieto L., Meana A., Zunino P. and Higes M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Env. Microbiol.* 11(9): 2284-2290.
- Aschwanden J., Holzgang O., Jenni L. (2007). Importance of ecological compensation areas for small mammals in intensively farmed areas. *Wildl. Biol.* 13: 150-158.
- Audit économique de la filière apicole française (2012).
- Aufauvre J., Biron D.G., Vidau C., Fontbonne R., Roudel M., Diogon M., Vignes B., Belzunces L. P., Delbac F. and Blot N. (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific Reports* 2.
- Bailey L. 1952. The action of the proventriculus of the worker honeybee, *Apis mellifera* L. *J. Exp. Biol.*, 29 (2) : 310-327.
- Barbendreier D., Kalberer N., Romeis J., Fluri P., Bilger F. (2004). Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plant. *Apidologie* 35:293-300.
- Barker R.J. and Lehner Y. (1974). Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Exp. Zool.* 187(2): 277-285.
- Barker R.J. (1977). Some carbohydrates found in the pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. *J. nutr.* 107 (10).

- Barzman M. and Dachbrodt-Saaydeh S. (2011). Comparative analysis of pesticide action plans in five European countries. *Pest. Manag. Sci* 67: 1481-1485
- Basualdo M., Barragán S. and Antúnez K. (2014). Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Env. Microbiol.*
- Baude M., Leloup J., Suchail S., Allard B., Benest D., Mériguet J., Nunan N., Dajoz I. and Raynaud X. (2011). Litter inputs and plant interactions affect nectar sugar content. *J. Ecol.* 99: 828-837.
- Beekman M. and Ratnieks F.L.W. (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Funct. Ecol.* 14(4): 490-496.
- Belzunces L.P., Lenfant C., Di Pasquale S. and Colin M.E. (1994). In vivo and in vitro effects of wheat germ agglutinin and Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor, two potential transgene products, on midgut esterase and protease activities from *Apis mellifera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B (1): 63-69.
- Berthoud H., Imdorf A., Haueter M., Radloff S. and Neumann P. (2010). Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *J. Apicult Res.* 49(1): 60-65.
- Biesmeijer J.C., Roberts S.P.M., Reemer M., Ohlemuller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A. P., Potts S. G., Kleukers R., Thomas C. D., Settele J., Kunin W. E. (2006). Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313:351-354.
- Bitondi M.M.G., Simões Z.L.P. (1996). The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. *J. Apicult. Res.* 35: 27-36.
- Blaschon B., Guttenger H., Hrassnigg N. and Crailsheim K. (1999). Impact of bad weather on the development of the broodnest and pollen stores in a honeybee colony (Hymenoptera : Apidae). *Entomol. Gen.* 24(1): 49-60.
- Botías C., Martín-Hernández R., Barrios L., Meana A. and Higes M. (2013). *Nosema spp.* infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Vet. Res.* 44:25.
- Bounias M., Kruk I., Nectoux M., Popeskovic D. (1996). Toxicology of cupric salts on honeybees. V. Gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatases. *Ecotox. Environ. Safe.* 35: 67-76.
- Bowen-Walker P.L. and Gunn A. (2001). The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomol. Exp. Appl.* 101: 207-217.
- Brakefield P.M. (1987). Industrial melanism: Do we have the answers? *Trends Ecol. Evol.* 2: 117-122.
- Brodschneider R., Crailsheim K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278-294.

- Büchler R., Costa C., Hatjina F., Andonov S., Meixner M.D., Le Conte Y., Uzunov A., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Drazic M., Dyrba W., Kryger P., Panasiuk B., Pechhacker H., Petrov P., Kezić N., Korpela S. and Wilde J. (2014). The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. *J. Apicult. Res.* 53(2): 205-214.
- Buchon N., Broderick N.A., Poidevin M., Pradervand S., Lemaitre B. (2009). *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe* 5: 200-211.
- Buri P., Humbert J.Y., Arlettaz R. (2014). Promoting Pollinating Insects in Intensive Agricultural Matrices: Field-Scale Experimental Manipulation of Hay-Meadow Mowing Regimes and Its Effects on Bees. *Plos one* 9 (1): e85635.
- Campana B.J., Moeller F.E. (1977). Honey bees: preference for and nutritive value of pollen from 5 plant sources. *J. Econ. Entomol.* 70: 39-41.
- Cane J., Sipes S. (2006). Characterizing floral specialization among bees: analytical methods and a revised lexicon for oligolecty. in Waser N.M., Ollerton J. (eds.) *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. University of Chicago Press. 99-122.
- Carvell C., Meek W.R., Pywell R.F., Nowakowski M. (2004). The response of bumblebees to successional change in newly created arable field margins. *Biol. Conserv.* 118: 327-339.
- Charrière J.D., Imdorf A., Koenig C., Gallmann S. et Kuhn R. (2006). Cultures de tournesol et développement des colonies d'abeilles mellifères. *Revue suisse Agric.* 38 (5): 269-274.
- Chauzat, M.P., Faucon J.P., Martel A.C., Lachaize J., Cougoule N. and Aubert M. (2006). A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.* 99(2): 253-262.
- Chauzat M-P, Higes M, Martin-Hernandez R, Meana A, Cougoule N, Faucon J-P (2007). Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. vol. 46, no2, pp. 127-128.
- Chauzat M.P., Carpentier P., Madec F., Bougeard S., Cougoule N., Drajnudel P., Clément M.C., Aubert M., and Faucon J.P. (2010). The role of infectious agents and parasites in the health of honey bee colonies in France. *J. Apicult. Res.* 49(1): 31-39.
- Chauvin R. (1968). *Le traité de biologie de l'abeille*. Masson et compagnie éditions.
- Commission régulation (EC) N° 152/2009 (2009). Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union* 54: 23-37.
- Cook S.M., Awmack C.S., Murray D.A. and Williams I.H. (2003). Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecol. Entomol.* 28(5): 622-627.
- Corby-Harris V., Jones B.M., Walton A., Schwan M.R. and Anderson K.E. (2014). Transcriptional markers of sub-optimal nutrition in developing *Apis mellifera* nurse workers. *Bmc Genomics* 15.
- Corona M., Velarde R.A., Remolina S., Moran-Lauter A., Wang Y., Hughes K.A. and Robinson G.E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *P. Natl. Acad. Sci. Biol.* 104(17): 7128-7133.

- Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., VanEngelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J.H., Cui L.W., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Crailsheim K., Stolberg E. (1989). Influence of Diet, Age and Colony Condition Upon Intestinal Proteolytic Activity and Size of the Hypopharyngeal Glands in the Honeybee (*Apis-Mellifera* L). J. Insect. Physiol. 35: 595-602.
- Crailsheim K., Schneider L.H.W., Hrassnigg N., Bühlmann G., Brosch U., (1992a) Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. J. Insect. Physiol. 38: 409-419.
- Crailsheim K. (1992b). The Flow of Jelly within a Honeybee Colony. J. Comp. Physiol. B 162(8): 681-689.
- Cremonese T.M., De Jong D., and Bitondi M.M.G. (1988). Quantification of Hemolymph Proteins as a Fast Method for Testing Protein Diets for Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 91(6): 1284 -1289.
- Cressey D. (2013). Europe debates risk to bees. Nature 496(7446): 408-408.
- Connop S., Hill T., Steer J., Shaw P. (2010). The role of dietary breadth in national bumblebee (*Bombus*) declines: Simple correlation? Biol. Conserv. 143: 2739-2746.
- Colin M.E. and Belzunces L.P. (1992). Evidence Of Synergy Between Prochloraz And Deltamethrin In *Apis-Mellifera* L - A Convenient Biological Approach. Pestic. Sci. 36(2): 115-119.
- Cox D.R. (1972). Regression models and life tables. Biometrics 38: 67-77.
- de Groot, A.P. (1953). Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifica* L.). Physiol.Comp. Oecol. 3: 197-285.
- Dadd R.H. (1973). Insect Nutrition: Current Developments And Metabolic Implications. Annu. Rev. Entomol.18:381-420.
- Dahlmann B., Jany K.D., And Pfelelderer G. (1978). The Midgut Endopeptidases Of The Honey Bee (*Apis Mellifica*): Comparison Of The Enzymes In Different Ontogenetic Stages. Insect Biochem. 8: 203-211.
- Dainat B., Evans J.D., Chen Y.P., Gauthier L., Neumann P. (2012). Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. Plos one 7(2): e32151.
- Decourtye A., Lacassie E. and Pham-Delegue M.H. (2003). Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. Pest. Manag. Sci. 59(3): 269-278.
- Decourtye A., Devillers J., Genecque E., Le Menach K., Budzinski H., Cluzeau S. and Pham-Delegue M.H. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. Env. Cont. and Tox. 48(2): 242-250.
- Khoury D.S., Myerscough M.R., Barron A.B. (2011). A Quantitative Model of Honey Bee Colony Population Dynamics. Plos One 6(4): e18491.

- Decourtye A., Mader E. and Desneux N. (2010). Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems. *Apidologie* 41(3): 264-277.
- DeGrandi-Hoffman G., Wardell G., Ahumada-Secura F., Rinderer T.E., Danka R., Pettis J., (2008). Comparisons of pollen substitute diets for honeybees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *J. Apicult. Res.* 47: 265–270.
- Degrandi-Hoffman G., Chen Y., Huang E. and Huang M.H. (2010). The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect. Physiol.* 56: 1184-1191.
- De Jong D., Junqueira da Silva E., Kevan G.P., and Atkinson L.J. (2009). Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen. *J. Apicult. Res.* 48: 34-37.
- Desneux N., Decourtye A. and Delpuech J.M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 81-106.
- Diaz P.C., Arenas A., Fernandez V.M., Martin C.S., Basilio A.M. and Farina W.M. (2013). Honeybee cognitive ecology in a fluctuating agricultural setting of apple and pear trees. *Behav. Ecol.* 24(5): 1058-1067.
- Dietz A. (1969). Initiation of pollen consumption and pollen movement through the alimentary canal of newly emerged honey bees. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 62 (1): 43-46.
- Dimou M. And Thrasyvoulou A. (2007). Seasonal variation in vegetation and pollen collected by honeybees in Thessaloniki, Greece. *Grana*, 46: 292–29.
- Dimou M. and Thrasyvoulou A. (2009). Pollen analysis of honeybee rectum as a method to record the bee pollen flora of an area. *Apidologie* 40(2): 124-133.
- Duelli P., Obrist M.K. (2003). Regional biodiversity in an agricultural landscape: the contribution of seminatural habitat islands. *Basic Appl. Ecol.* 4: 129-138.
- Di Pasquale G., Salignon M., Le Conte Y., Belzunces L.P., Decourtye A., Kretzschmar A., Suchail S., Brunet J.L., Alaux C.. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *Plos one* 8 (8): e72016.
- Dobson H.E.M. and Bergstrom G. (2000). The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Syst Evol* 222(1-4): 63-87.
- Dover J., Sparks T., Clarke S., Gobbett K., Glossop S.(2000) Linear features and butterflies: the importance of green lanes. *Agric. Ecosyst. Environ.* 80: 227-242.
- Dussaubat C., Maisonnasse A., Alaux C., Tchamitchan S., Brunet J.L., Plettner E., Belzunces L.P., Le Conte Y. (2010). *Nosema* spp. Infection Alters Pheromone Production in Honey Bees (*Apis mellifera*). *J. Chem. Ecol.* 36:522-525.
- Dussaubat C., Brunet J.L., Higes M., Colbourne J.K., Lopez J., Choi J.H., Martin-Hernandez R., Botias C., Cousin M., McDonnell C., Bonnet M., Belzunces L.P., Moritz R.A., Le Conte Y., Alaux C. (2012). Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *Plos One* 7: e37017.

- Dustmann J., Gunst E. (1981). Inhibin And Bacteriostatic Effect Of Beebread. *Apidologie* 12 (1): 78-79.
- Eckhardt M., Haider M., Dorn S. and Müller A. (2013). Pollen mixing in pollen generalist solitary bees: a possible strategy to complement or mitigate unfavourable pollen properties? *J. Anim. Ecol.* 83(3): 588-597.
- Eguchi M. (1995). Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 111(2): 151-162.
- Eischen F.A., Graham R.H. (2008) Feeding overwintering honey bee colonies infected with *Nosema ceranae*. In P. Am. Bee. Res. Conf., Am. Bee J. 148: 555.
- Ellis A.M., Hayes G.W. An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apicult. Res.* 48 (3) : 215-216.
- Evans J.D, Spivak M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103: 62-72.
- Erickson E.H., Herbert E.W. (1980). Soybean products replace expeller-processed soyflour for pollen supplements and substitutes. *Am. Bee J.* 120 (2): 122-126.
- Feigenbaum C., Naug D. (2010). The influence of social hunger on food distribution and its implications for disease transmission in a honeybee colony. *Insect. Soc.* 57:217-222.
- Fernandes-da-Silva P.G., Muccillo G., Zucoloto F.S. (1993). Determination of minimum quantity of pollen and nutritive value of different carbohydrates for *Scaptotrigona depilis* Moure (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 24:73-79.
- Field C.J., Johnson I.R, and Schley P.D. (2002). Nutrients and their role in host resistance to infection. *J. Leukocyte Biol.* 71:16-32.
- Fischer P. and Grozinger C.M. (2008). Pheromonal regulation of starvation resistance in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 95(8): 723-729.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- Foley K., Fazio G., Jensen A.B. and Hughes W.O.H. (2012). Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 111(1): 68-73.
- Foote H.L. (1957). Possible use of microorganisms in synthetic bee bread production. *Amer.Bee J.* 97: 476-478.
- Forsgren E., de Miranda J.R., Isaksson M., Wei S. and Fries I. (2009). Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Exp Appl Acarol* 47(2): 87-97.
- Forsgren E., Fries I. (2010) Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.* 170: 212-217.
- Frazier M., Mullin C., Frazier J., Ashcraft S., (2008). What have pesticides got to do with it? *Am. Bee J.* 148: 521-523.

- Free J.B. And Spencer-Booth Y. (1958). Observations on the Temperature Regulation and Food Consumption of Honeybees (*Apis Mellifera*). Exp. Biol. 35:930-937.
- Free J.B. (1961). Hypopharyngeal glands development and division of labor honeybee (*Apis Mellifera* L.) colonies. P. Roy. Entomol. Soc. London 36(1-3): 5-8.
- Free J. (1980). Differences in food consumption of caged honeybees from different colonies. J. Apicult Res. 19(2): 112-114.
- Fries I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). J. Invertebr. Pathol. 103: 73-79.
- Fussell M., Corbet S.A. (1991). Forage for bumble bees and honey bees in farmland: a case study. J. Apicult. Res. 30: 87-97.
- Gallai N., Salles J.M., Settele J. and Vaissiere B.E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecol. Econ. 68(3): 810-821.
- García-Palencia P., Martín-Hernández R., González-Porto A.V., Marín P., Meana A., and Higes M. (2010). Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-workers honey bees (*Apis mellifera*). J. Apicult. Res. 49:278-283.
- Garibaldi L.A., Steffan-Dewenter I., Kremen C., Morales J.M., Bommarco R., Cunningham S.A., Carvalheiro L.G., Chacoff N.P., Dudenhoffer J.H., Greenleaf S.S., Giebel A., Zwilling R. And Pfleiderer G. (1971). The Evolution Of Endopeptidases-Xii. The Proteolytic Enzymes Of The Honeybee (*Apis Mellifica* L.). Comp. Biochem. Physiol. 38B: 197-210.
- Girard M., Chagnon M. and Fournier V. (2012). Pollen diversity collected by honey bees in the vicinity of *Vaccinium* spp. crops and its importance for colony development. Botany-Botanique 90(7): 545-555.
- González-Santoyo I., Córdoba-Aguilar A. (2012) Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. Entomol. Exp. Appl. 142: 1-16.
- Goulson D., Lye G.C. and Darvill B. (2008). Decline and conservation of bumble bees. Annu. Rev. Entomol. Palo Alto, Annual Reviews 53: 191-208.
- Goulson D., Lepais O., O'Connor S., Osborne J.L., Sanderson R.A., Cussans J., Goffe L. and Darvill B. (2010). Effects of land use at a landscape scale on bumblebee nest density and survival. J. App. Ecol. 47(6): 1207-1215.
- Gregory P.G., Evans J.D., Rinderer T. and de Guzman L. (2005). Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by Varroa mites. J. Insect Sci. 5.
- Gregory P.G. (2006). Protein diets and their effects on worker weight, longevity, consumption and haemolymph protein levels of *Apis mellifera* . Am. Bee J. 146: 447.
- Grogan D.E. and Hunt J.H. (1984). Cymotrypsine-like activity in the honeybee midgut: patterns in a three-year study. J. Apicult. Res. 23(2): 62-63.

- Haaland C., Naisbit R.E. And Bersier L.F. (2011). Sown wildflower strips for insect conservation: a review. *Insect Cons. and Div.* 4: 60-80.
- Hagedorn H.H. et Moeller F.E. (1967). The rate of pollen consumption by newly emerged honeybees. *J. Apicult. Res.* 6(3): 159-162.
- Hahn D.A. and Denlinger D.L. (2011). Energetics of insect diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 56: 103-121.
- Hanski I. and Poyry J. (2007). Insect populations in fragmented habitats. In: *Insect Conservation Biology* (eds Stewart, A.J.A., New, T.R. & Lewis, O.T.). CABI, Wallingford: 175-202.
- Haydak M.H. (1958). Pollen - pollen substitutes bee bread. *Amer. Bee J.* 98 :145-146.
- Haydak M.H. (1970). Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* 15: 143-156.
- Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S. and Decourtye A. (2012). A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* 336(6079): 348-350.
- Herbert E.W., Shimanuki H., Caron D. (1977). Optimum Protein Levels Required By Honey Bees (Hymenoptera, Apidae) To Initiate And Maintain Brood Rearing. *Apidologie* 8 (2)141-146.
- Herbert E.W. and Shimanuki H. (1978). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie* 9(1): 33-40.
- Herbert E.W., Shimanuki H. and Shasha B.S. (1980). Brood Rearing and Food-Consumption by Honeybee Colonies Fed Pollen Substitutes Supplemented with Starch-Encapsulated Pollen Extracts. *J. Apicult. Res.* 19(2): 115-118.
- Herbert E.W.J. (1992) Honey bee nutrition. In J.M. Graham (ed.) *The Hive and the Honey Bee*. Dadant and Sons, Hamilton, IL, 197-233.
- Higes M., Martin R. and Meana A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92(2): 93-95.
- Higes M., Garcia-Palencia P., Martin-Hernandez R. and Meana A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94(3): 211-217.
- Higes M., Martin-Hernandez R., Botias C., Bailon E.G., Gonzalez-Porto A.V., Barrios L., del Nozal M.J., Bernal J.L., Jimenez J.J., Palencia P.G. and Meana A. (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Env. Microbiol.* 10(10): 2659-2669.
- Higes M., Martin-Hernandez R., Garrido-Bailon E., Garcia-Palencia P. and Meana A. (2008b). Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* 97(1): 76-78.
- Higes M., Martin-Hernandez R. and Meana A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41(3): 375-392.

- Higes M., Meana A., Bartolomé C., Botías C. and Martín-Hernández R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Env. Microbiol. Rep.* 5(1): 17-29.
- Higes M., Juarranz A., Dias-Almeida J., Lucena S., Botías C., Meana A., García-Palencia P. and Martín-Hernández R. (2013). Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Env. Microbiol. Rep.* 5(4):530-536.
- Highfield A.C., El Nagar A., Mackinder L.C.M., Noel L., Hall M.J., Martin S.J. and Schroeder D.C. (2009). Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses. *Appl. and Env. Microbiol.* 75(22): 7212-7220.
- Hines H.M. and Hendrix S.D. (2005). Bumble bee (Hymenoptera : Apidae) diversity and abundance in tallgrass prairie patches: Effects of local and landscape floral resources. *Env. Entomol.* 34(6): 1477-1484.
- Höcherl N., Siede R., Illies I., Gätschenberger H., Tautz J. (2012). Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees. *J. Insect Physiol.* 58: 278-285.
- Holland J., Fahrig L. (2000) Effect of woody borders on insect density and diversity in crop fields: a landscape-scale analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.* 78: 115-122.
- Holt H.L., Aronstein K.A. and Grozinger C.M. (2013). Chronic parasitization by *Nosema microsporidia* causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 14:799.
- Holzgang O., Pfister H.P., Heynen D., Blant M., Righetti A., Berthoud G., Marchesi P.I., Maddalena T., Muri H., Wendelspiess M., Dändliker G., Mollet P., Bornhauser-Sieber U. (2002). Les corridors faunistiques en Suisse, Cahier de l'environnement No. 326, Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage (OFEFP), Société suisse de Biologie de la Faune (SSBF), Station ornithologique suisse de Sempach, Berne, 120 pp.
- Holzgang O., Righetti A., Pfister H.P. (2005). Swiss wildlife corridors on paper, imagined and in the countryside, *GAIA-Ecol. Perspect. Sci. Soc.* 14 :148–151.
- Holzmann C., Britten V., Allier F., Vallon J., Jourdan P. (2011). Enquête pertes hivernales de colonies : quantification des pertes pour les campagnes 2007/2008 à 2010/2011. Rapport ITSAP-Institut de l'abeille. 2 pp.
- Holtschuh R., Isaacs K., Krewenka Y., Mandelik M.M., Mayfield L.A., Morandin S.G., Potts T.H., Ricketts H., Szentgyorgyi B.F., Viana C., Westphal R., Winfree and Klein A.M. (2011). Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits. *Ecol. Lett.* 14(10): 1062-1072.
- Horr B.Z. (1998). Salt - An important dietary supplement in honey bee nutrition? *Am. Bee J.* 138(9): 662-662.
- Howard R.W., Blomquist G.J. (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 50:371-93.
- Grassnig N., Crailsheim K. (1998). Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Insect Physiol.* 44 : 929-939.

- Huang Z.Y., Otis G.W, Teal P.E.A (1989). Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera). *Apidologie* 20 : 455-464
- Huang Z.Y., Plettner E., Robinson G.E. (1998). Effects of social environment and worker mandibular glands on endocrine-mediated behavioral development in honey bees. *J. Comp. Physiol. A* 183: 143-152.
- Huang W.F., Jiang J.H., Chen Y.W., Wang C.H. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38: 30-37.
- Huang S.K., Csaki T., Doublet V., Dussaubat C. (2012). Evaluation of Cage Designs and Feeding Regimes for Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Laboratory Experiments. *J. Econ. Entomol.* 107(1): 54-62.
- Huber R.E. And Mathison R.D. (1976). Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrose of honey bees (*Apis mellifera*). *Can. J. Biochem.* 54: 153-164.
- Human H., Nicolson S.W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 67: 1486-149.
- ISO 5983 (1997) Animal feeding stuffs. Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content Kjeldahl method. Switzerland, Geneva: International Organization for Standardization.
- Jacobs F. (2004). Impact de l'alimentation en pollens sur la longévité de l'abeille. Compte-rendu du 1^{er} Colloque technique apicole, 12 octobre 2004, Roissy. BASF Agro (ed.), Ecully, France, 57-67.
- Janmaat A.F. and Winston M.L. (2000). The influence of pollen storage area and *Varroa jacobsoni* Oudemans parasitism on temporal caste structure in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insect. soc.* 47: 177-182.
- Jay S.C. (1986). Spatial Management Of Honey-Bees On Crops. *Annu. Rev. Entomol.* 31: 49-65.
- Keller I., Fluri P., Imdorf A. (2005) Pollen nutrition and colony development in honey bees, Part II. *Bee World* 86: 27-34.
- Kirk W.D.J., Howes, F.N. (2012). Plants for Bees: A Guide to the Plants That Benefit the Bees of the British Isles. *Int. Bee Res. Assoc.*
- Kleijn D. et Sutherland W.J. (2003). How effective are European agri-environment schemes in conserving and promoting biodiversity? *J. Appl. Ecol.* 40: 947-969.
- Kleijn D., Baquero R.A., Clough Y., Diaz M., De Esteban J., Fernandez F. (2006). Mixed biodiversity benefits of agri-environment schemes in five European countries. *Ecol. Lett.* 9: 243-254.
- Klein A.M., Vaissiere B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C. and Tscharntke T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *P. Roy. Soc. B* 274(1608): 303-313.

- Kleinschmidt G.J., Kondos A.C. (1976). Influence of crude protein levels on colony production in relation to the pollen nutrition of *Apis mellifera*. Australasian beekeeper.
- Klemola N., Klemola T., Rantala M.J., Ruuhola T. (2007). Natural host-plant quality affects immune defence of an insect herbivore. Entomol. Exp. Appl. 123: 167-176.
- Knecht D., Kaatz H.H. (1990). Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. Apidologie 21: 457-468.
- Knox D., Shimanuki H., And. Herbert E.W (1971). Diet and the Longevity of Adult Honey Bees. J. Econ. Entomol. 64 (6): 1415-1416.
- Koywiwattrakul P., Thompson G.J., Sitthipraneed S., Oldroyd B.P., Maleszka R. (2005). Effects of carbon dioxide narcosis on ovary activation and gene expression in worker honey bees, *Apis mellifera*. J. Insect. Sci. 5: 36.
- Koywiwattrakul P., Sittipraneed S. (2009). Expression of vitellogenin and transferrin in activated ovaries of worker honey bees, *Apis mellifera*. Biochem. Genet. 47: 19-26.
- Kremen C., Williams N.M. and Thorp R.W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. P. Natl. Acad. Sci. USA 99(26): 16812-16816.
- Kremen C., Williams N.M., Bugg R.L., Fay J.P. and Thorp R.W. (2004). The area requirements of an ecosystem service: crop pollination by native bee communities in California. Ecol. Lett. 7: 1109-1119.
- Krupke C.H., Hunt G.J., Eitzer B.D., Andino G. and Given K. (2012). Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. Plos One 7(1).
- Kucharski R., Maleszka R. (2003). Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. J. Insect. Sci. 3: 27.
- Kulincevic J.M. et Rothenbuhler W.C. (1989). Variation in food consumed by caged worker bees from different colonies. J. Apicult. Res. 28(1): 26-29.
- Lallès J.P. (2010). Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. Nutr. Rev. 68: 323-332.
- Le Conte Y. and Navajas M. (2008). Climate change: impact on bee populations and their illnesses. Rev. Sci. Tech. Oie. 27(2): 485-497.
- Lagerh f J., Stark J., Svensson B. (1992). Margins of agricultural field as habitats for pollinating insects. Agric. Ecosyst. Environ. 40, 117–124.
- Larsen T.H., Williams N.M. and Kremen C. (2005). Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. Ecol. Lett. 8: 538-547.
- Le Conte Y., Brunet J.L., McDonnell C., Dussaubat C., Alaux C. (2011). Interactions between risk factors in honey bees. In: Sammataro D., Yoder J., editors. Recent Investigations into the Problems with our Honey Bee Pollinators: Taylor and Francis Inc. 215-222.
- Lee K.P., Cory J.S., Wilson K., Raubenheimer D., Simpson S.J. (2006). Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar. Proc. Biol. Sci. 273: 823-829.

- Lee K.P., Simpson S.J., Wilson K. (2008). Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Funct. Ecol.* 22: 1052-1061.
- Le Roux X., Barbault R., Baudry J., Burel F., Doussan I., Garnier E., Herzog F., Lavorel S., Lifran R., Roger-Estrade J., Sarthou J.P., Trommetter M. (2008). Agriculture et biodiversité - Valoriser les synergies - Synthèse du rapport d'expertise - 2ème partie, Expertise scientifique collective INRA.
- Levin M.D., Bohart G.E. (1955). Selection of Pollens by Honey Bees. *Amer. Bee J.* 95(10): 392-393.
- Li P., Yin Y.L., Li D., Kim S.W. and Wu G. (2007). Amino acids and immune function. *Brit. J. Nutr.* 98: 237-252.
- Lindauer M. 1953. Division of labour in the honeybee colony. *Bee World* 34:63-73, 85-90.
- Loper G.M., Berdel R.L. (1980a). The Effects Of Nine Pollen Diets On Broodrearing Of Honeybees. *Apidologie*, 11(4): 351-359.
- Loper G.M., Berdel R.L. (1980b). A Nutritional Bioassay Of Honeybee Brood-Rearing Potential. *Apidologie* 11(2): 181-189.
- Loper G.M. And Cohen A.C. (1987). Amino-Acid Content Of Dandelion Pollen, A Honey-Bee (Hymenoptera, Apidae) Nutritional-Evaluation. *J. Econ. Entomol.* 80(1): 14-17.
- Loreau M., Naeem S., Inchausti P. (2002). Biodiversity and Ecosystem Functioning. Oxford University press.
- Louveaux J. (1954). Etudes sur la récolte du pollen par les abeilles. *Apiculteur* 98: 43-50.
- Louveaux J. (1959). Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (*Apis mellifera* L.). *Annales de l'abeille* 2: 99.
- MacLeod A. (1999). Attraction and retention of *Episyrphus balteatus* DeGeer (Diptera: Syrphidae) at an arable field margin with rich and poor floral resources. *Agr. Ecosyst. Environ.* 73: 237-244.
- Malone L.A., Gatehouse H.S. (1998). Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*Apis mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity. *J. Invertebr. Pathol.* 71: 169-174.
- Manning R. (2001). Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World* 82(2): 60-75.
- Manning R., Rutkay A., Eaton L. and Dell B. (2007). Lipid-enhanced pollen and lipid-reduced flour diets and their effect on the longevity of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Aust. J. Entomol.* 46: 251-257.
- Mao W., Schuler M.A. and Berenbaum M.R. (2013). Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 110(22): 8842-8846.
- Martel A.C., Zeggane S., Aurieres C., Drajnudel P., Faucon J.P. and Aubert M. (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar (R) or Asuntol (R) 50. *Apidologie* 38(6): 534-544.

- Martín-Hernández R., Botías C., Barrios L., Martínez-Salvador A., Meana A., Mayack C. and Higes M. (2009). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*).
- Martin-Hernandez R., Botias C., Barrios L., Martinez-Salvador A., Meana A., Mayack C. and Higes M. (2011). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). Parasitol. Res. 109(3): 605-612.
- Mattila H.R., Otis G.W. (2006). The effects of pollen availability during larval development on the behaviour and physiology of spring-reared honey bee workers. Apidologie 37 : 533-546.
- Maudsley M.J. (2000). A review of the ecology and conservation of hedgerow invertebrates in Britain. J. Env. Manag. 60: 65-76.
- Maurizio A. (1950). The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honey bee. Bee World 31: 9-12.
- Maurizio A., Duisberg H., Evenius J., Focke E. and Vorwohl G. (1975). Honey: the origin, harvesting, properties and investigation of honey. Der Honig: Herkunft, Gewinnung, Eigenschaften und Untersuchung des Honigs. Stuttgart, German Federal Republic, Verlag Eugen Ulmer.
- Mayack C., Naug D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. J. Invertebr. Pathol. 100: 185-188.
- McCaughey W.F., Gilliam M. and Standifer L.N. (1980). Amino-Acids And Protein Adequacy For Honey Bees Of Pollens From Desert Plants And Other Floral Sources. Apidologie 11(1): 75-86.
- Meek B., Loxton D., Sparks T., Pywell R., Pickett H., Nowakowski M. (2002) The effect of arable field margin composition on invertebrate biodiversity. Biol. Conserv. 106: 259-271.
- Menz M.H.M., Phillips R.D., Winfree R., Kremen C., M.A. Aizen, S.D. Johnson and K.W. Dixon (2011). Reconnecting plants and pollinators: challenges in the restoration of pollination mutualisms. Trends Plant. Sci. 16 (1).
- Michener C.D. (1969). Comparative Social Behavior of Bees. Annu. Rev. Entomol. 14: 299-342.
- Moritz B. and Crailsheim K. (1987). Physiology Of Protein Digestion In The Midgut Of The Honeybee (*Apis Mellifera* L.). J. Insect Physiol. 33(12): 923-931.
- Morse R.A. (1991). Honeybees forever. Trends Ecol. Evol. 6(10): 337-338.
- Murray T.E., Kuhlmann M., Potts S.G. (2009). Conservation ecology of bees: populations, species and communities. Apidologie, 40: 211-236.
- Naug D. (2009). Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. Biol. Conserv. 142: 2369-2372.

- Naug D., Gibbs A. (2009). Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* 40 (6): 595-599.
- Nelson C.M., Ihle K.E., Fondrk M.K., Page R.E. and Amdam G.V. (2007). The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *Plos Biol.* 5(3): 673-677.
- Neumann P., Carreck N.L. (2010). Honey bee colony losses. *J. Apicult. Res.* 49: 1-6.
- Newton D.C. and Michl D.J. (1974). Cannibalism as an indication of pollen insufficiency in honeybees: ingestion or recapping of manually exposed pupae. *J. Apicult. Res.* 13(4): 235-241.
- Nicolson S.W. (1990). Osmoregulation in a nectar-feeding insect, the carpenter bee *Xylocopa capitata*: water excess and ion conservation. *Physiol. Entomol.* 15:433-440.
- Nino E.L., Tarpy D.R., Grozinger C.M. (2013). Differential effects of insemination volume and substance on reproductive changes in honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Insect Mol. Biol.* 22(3):233-244.
- Odoux J.F., Caro G., Touillet C., Peyra E., Derelle D., Aupinel P. and Bretagnolle V. (2009) Which landscape features influence population ecology of bee colonies in farmland intensive cereals systems? 41e Congress of Apimondia, Montpellier.
- Odoux J.F., Feuillet D., Aupinel P., Loublier Y., Tasei J.N. (2012). Territorial biodiversity and consequences on physico-chemical characteristics of pollen collected by honey bee colonies. *Apidologie* 43: 561-575.
- Otis G.W. (2007). Comments about colony collapse disorder. *Am. Bee J.* 147: 1033-1035.
- Ou B., Hampsch-Woodill M. and Prior R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49(10): 4619-4626.
- Pain J., Maugenet J. (1966). Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles. *Ann. Abeille* 9 :209-236.
- Patel N.G., Haydack M.H., Gochnauer T.A. (1960). Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. *Nature* 186(4725): 633-634.
- Paxton R.J., Klee J., Korpela S. and Fries I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38(6): 558-565.
- Paxton R. J. (2010). Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)? *J. Apicult. Res.* 49(1): 80-84.
- Pedersen K., Omholt S.W. (1993). A comparison of diets for honeybee, Norwegian. *J. Agric. Sci.* 7:213-219.
- Pernal S.F. and Currie R.W. (2000). Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 31: 387-409.
- Pernal S.F. and Currie R.W. (2002). Discrimination and preferences for pollen-based cues by foraging honeybees, *Apis mellifera* L. *Anim. Behav.* 63: 369-390.

- Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., VanEngelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S., Lipkin W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318(5848): 283-287.
- Pettis J.S., Lichtenberg E.M., Andree M., Stitzinger J., Rose R., VanEngelsdorp D. (2013). Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *Plos one* 8 (7): e70182.
- Piroux M., Lambert O., Puyo S., Farrera I., Thorin C., L'hostis M., Vigues B., Bastian S. (2014). Correlating The Pollens Gathered By *Apis Mellifera* With The Landscape Features In Western France. *Appl. Ecol. Env. Res.* 12(2): 423-439.
- Pollard E., Hooper M.D., Moore N.W. (1974) *Hedges*. London: Collins 256pp.
- Porrini M.P., Sarlo E.G., Medici S.K., Garrido P.M., Porrini D.P., Damiani N. and Eguara M.J. (2011). *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *J. Apicult. Res.* 50(1): 35-41.
- Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O. and Kunin W.E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25(6): 345-353.
- Potts S.G., Roberts S.P.M., Dean R., Marris G., Brown M.A., Jones R., Neumann P. and Settele J. (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apicult. Res.* 49(1): 15-22.
- Pywell R.F., Warman E.A., Carvell C., Sparks T.H., Dicks L.V., Bennett D., Wright A., Critchley C.N.R., Sherwood A. (2005) Providing foraging resources for bumblebees in intensively farmed landscapes. *Biol. Conserv.* 121: 479-494.
- Requier F. (2013) Dynamique spatio-temporelle des ressources florales et écologie de l'abeille domestique en paysage agricole intensif. Thèse.
- Richards A.J. (2001). Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield? *Ann. Botany* 88(2): 165-172.
- Ricketts T.H., Regetz J., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Bogdanski A., Gemmill-Herren B., Greenleaf S.S., Klein A.M., Mayfield M.M., Morandin L.A., Ochieng A., Viana B.F. (2008). Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecol. Lett.* 11: 499-515.
- Rinderer T.E., Rothenbuhler W.C., Gochnauer T.A. (1974). The influence of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 23: 347-350.
- Rinderer T.E., Elliott K.D. (1977). Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*. *J. Econ. Entomol.* 70: 431-433.
- Robinson R.A. and Sutherland W.J. (2002). Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *J. Appl Ecol.* 39: 157-176.

- Rollin O., Bretagnolle V., Decourtye A., Aptel J., Michel N., Vaissiere B.E. and Henry M. (2013). Differences of floral resource use between honey bees and wild bees in an intensive farming system. *Agricult. Ecosyst. Env.* 179: 78-86.
- Roulston T.H., Buchmann S.L. (2000). A phylogenetic reconsideration of the pollen starch-pollination correlation. *Evol. Ecol. Res.* 2: 627-643.
- Roulston T.H., Cane J.H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Syst. Evol.* 222: 187-209.
- Roulston T.H., Cane J.H. (2002). The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes). *Evol. Ecol.* 16: 49-65.
- Schmickl T. and Crailsheim K. (2001). Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *J. Comp. Physiol. A* 187(7): 541-547.
- Schmickl T. and Crailsheim K. (2002). How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behaviour in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51(5): 415-425.
- Schmickl T., Blaschon B., Gurmman B. and Crailsheim K. (2003). Collective and individual nursing investment in the queen and in young and old honeybee larvae during foraging and non-foraging periods. *Insect. Soc.* 50: 174-184.
- Schmidt J.O. (1982). Pollen Foraging Preferences of Honey Bees (Hymenoptera, Apidae). *Southwest Entomol* 7(4): 255-259.
- Schmidt J.O. (1984). Feeding Preferences of *Apis-Mellifera* L (Hymenoptera, Apidae) - Individual Versus Mixed Pollen Species. *J. Kansas Entomol. Soc.* 57(2): 323-327.
- Schmidt J.O., Buchmann S.L. (1985). Pollen digestion and nitrogen utilization by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Camp. Biochem. Physiol.* 82A(3): 499-503.
- Schmidt J.O., Thoenes S.C., Levin M.D. (1987). Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *J. Econ. Entomol.* 80: 176-183.
- Schmidt L.S., Schmidt J.O., Rao H., Wang W., Xu L. (1995). Feeding preference and survival of young worker honey bees (Hymenoptera:Apidae) fed rape, sesame, and sunflower pollen. *J. Econ. Entomol.* 88: 1591-1595.
- Schmidt J.O. and Hanna A. (2006). Chemical Nature of Phagostimulants in Pollen Attractive to Honeybees. *J. Insect Behav.* 19(4):521-532.
- Schulz D.J., Huang Z.Y. and Robinson G.E. (1998). Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42(5): 295-303.
- Sedivy C., Muller A. and Dorn S. (2011). Closely related pollen generalist bees differ in their ability to develop on the same pollen diet: evidence for physiological adaptations to digest pollen. *Funct. Ecol.* 25: 718-725.
- Seehuus S.C., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G.V. (2006). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 962-967.

- Seehuus S.C., Norberg K., Krekling T., Fondrk K. and Amdam G.V. (2007). Immunogold localization of vitellogenin in the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honeybee workers, *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* 7(52).
- Shannon C.E. and Weaver W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*, University of Illinois Press, Urbana.
- Sies H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82: 291-295.
- Simone M., Evans J.D., and Spivak M. (2009). Resin Collection And Social Immunity In Honeybees. *Evolution* 63-11: 3016-302.
- Simpson J. (1960). The Functions Of The Salivary Glands Of *Apis Mellifera*. *J. Ins. thyriol.* 4:107-121.
- Singh R.P., Singh P.N. (1996). Amino acid and lipid spectra of larvae of honey bee (*Apis cerana Fabr*) feeding on mustard pollen. *Apidologie* 27: 21-28.
- Smeets P., Duchateau M.J. (2003). Longevity of *Bombus terrestris* workers (Hymenoptera: Apidae) in relation to pollen availability, in the absence of foraging. *Apidologie* 34: 333-337.
- Smith M.L. (2012). The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? *Plos One* 7(8).
- Somerville D.C. and Nicol H.I. (2006). Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Aust. J. Exp. Agr.* 46(1): 141-149.
- Standifer L.N. (1967). A comparison of the protein quality of pollens for growth stimulation of the hypopharyngeal glands and longevity of honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Insect Soc.* 14 :415-426.
- Stanger W., Laidlaw H.H. (1974). Supplemental Feeding Of Honeybees (*Apis Mellifera* Linnaeus). *Apiacta* 2.
- Stanley R.G. and Linskens H.F. (1974). *Pollen: Biology, biochemistry, management*. Heidelberg, Germany, Springer.
- Steffan-Dewenter I. (2002). Landscape context affects trap-nesting bees, wasps, and their natural enemies. *Ecol. Entomol.* 27(5): 631-637.
- Steffan-Dewenter I. and Kuhn A. (2003). Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* 270(1515): 569-575.
- Svoboda J.A., Thompson M.J., Herbert E.W. Shimanuki H. (1980). Sterol utilization in honey bees fed a synthetic diet: Analysis of prepupal sterols. *J. Insect Physiol.* 26 (5): 291-294.
- Szabo T.I. (1980). Effect of Weather Factors on Honey-Bee Flight Activity and Colony Weight-Gain. *J. Apicult. Res.* 19(3): 164-171.
- Szalai Z. (2001). Development of melliferous plant mixtures with long lasting flowering period. In: VIII International Symposium on Pollination – Pollination: Integrator of Crops

- and Native Plant Systems. *Acta Horticulturae*, 561. Leuven : International Society for Horticultural Science.
- Tarpy D.R. (2003). Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* 270(1510): 99-103.
- Tasei J.N. and Aupinel P. (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 W.R. and Ferreira C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B(1): 1-62.
- The comprehensive R archive Network website. Available; <http://www.R-project.org/>. Accessed 2013 May 28.
- Thompson G.J., Yockey H., Lim J., Oldroyd B.P. (2007). Experimental manipulation of ovary activation and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers: Testing hypotheses of reproductive regulation. *J. Exp. Zool.* 307A: 600-610.
- Toth A.L., Kantarovich S., Meisel A.F., Robinson G.E. (2005). Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *J. Exp. Biol.* 208: 4641-4649.
- Toth A.L. and Robinson G.E (2005). Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Anim. Behav.* 69:427-435.
- Trapp S. and Pussemier L. (1991). Model Calculations And Measurements Of Uptake And Translocation Of Carbamates By Bean Plants. *Chemosphere* 22(3-4): 327-339.
- Tscharntke T., Steffan-Dewenter I., Kruess A., And Thies C. (2002). Contribution Of Small Habitat Fragments To Conservation Of Insect Communities Of Grassland–Cropland Landscapes. *Ecol. Appl.* 12(2): 354-363.
- Tscharntke T., Klein A.M., Kruess A., Steffan-Dewenter I. and Thies C. (2005). Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity - ecosystem service management. *Ecol. Lett.* 8: 857-874.
- Tuell J.K., Fiedler A.K., Landis D., and Isaacs R. (2008). Visitation by Wild and Managed Bees (Hymenoptera: Apoidea) to Eastern U.S. Native Plants for Use in Conservation Programs. *Env. Entomol.* 37(3):707-718.
- Tylianakis J.M., Klein A.M., And Tscharntke T. (2005). Spatiotemporal Variation In The Diversity Of Hymenoptera Across A Tropical Habitat Gradient. *Ecology* 86(12): 3296-3302.
- Van Engelsdorp D., Underwood R., Caron D., Hayes J. (2007). An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *Am. Bee J.* 147: 599-603.
- Van Engelsdorp, D., J. Hayes, Jr., R. M. Underwood and J. Pettis (2008). A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 3(12): e4071.

- Van Engelsdorp, D., J. D. Evans, C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B. K. Nguyen, M. Frazier, J. Frazier, D. Cox-Foster, Y. P. Chen, R. Underwood, D. R. Tarpay and J. S. Pettis (2009). "Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. Plos One 4(8).
- Van Engelsdorp D., Meixner M.D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. J. Invertebr. Pathol. 103: 80-95.
- Vasquez A., Olofsson T.C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. J. Apicult. Res. and Bee world 48(3): 189-195.
- Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Viguès B. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. Plos One 6: e21550.
- Vidau C., Panek J., Texier C., Biron D.G., Belzunces L.P., Le Gall M., Broussard C., Delbac F. and El Alaoui H. (2014). Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. J. Invertebr. Pathol. 121: 89-96.
- Von Frisch K. (1934) Über den Geschmackssinn der Biene. Ein Beitrag zur vergleichenden Physiologie des Geschmacks. 2. vergl. Physiol. 21: 1-156.
- Wang H., Zhang S.W., Zeng Z.J., Yan W.Y. (2014). Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. Apidologie 45(5): 618-625.
- Wahl O., Ulm K. (1983) Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. Oecologia 59: 106-128.
- Waller G.D. (1972). Evaluating Responses of Honey Bees to Sugar Solutions Using an Artificial-Flower Feeder. Ann. Entomol. Soc. Am. 65(4): 857-862(6).
- Watanabe M.E. (2008). Colony Collapse Disorder: Many Suspects, No Smoking Gun. BioScience 58(5):384-388.
- Whittingham M.J. (2011). The future of agri-environment schemes: biodiversity gains and ecosystem service delivery? J. Appl. Ecol. 48: 509-513.
- Willard L.E., Hayes A.M., Wallrichs M.A., Rueppell O. (2011). Food manipulation in honeybees induces physiological responses at the individual and colony level. Apidologie 42:508-518.
- Williams B.A.P. (2009). Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. Cell. Microbiol. 11(11): 1551-1560.
- Wilson E.O. (1971). The Insect Societies Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Winfrey R., Williams N.M., Dushoff J. and Kremen C. (2007). Native bees provide insurance against ongoing honey bee losses. Ecol. Lett. 10: 1105-1113.
- Winston M.L. (1987). The Biology of the Honey Bee. University Press, Cambridge.
- Wratten S.D., Gillespie M., Decourtye A., Mader E., Desneux N. (2012). Pollinator habitat enhancement: Benefits to other ecosystem services. Agr. Ecosyst. Environ 159: 112-122.

- Wu J.Y., Smart M.D., Anelli C.M. and Sheppard W.S. (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. J. Invertebr. Pathol. 109(3): 326-329.
- Yang X.L. and Cox-Foster D.L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. P. Natl. Acad. Sci. USA 102(21): 7470-7475.
- Yang X. and Cox-Foster D.L. (2007). Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. Parasitology 134: 405-412.
- Yoder J.A., Jajack A.J., Rosselot A.E., Smith T.J., Yerke M.C. and Sammataro D. (2013). Fungicide Contamination Reduces Beneficial Fungi in Bee Bread Based on an Area-Wide Field Study in Honey Bee, *Apis mellifera*, Colonies. J. Toxicol. Env. Heal. A 76(10): 587-600.

Annexes

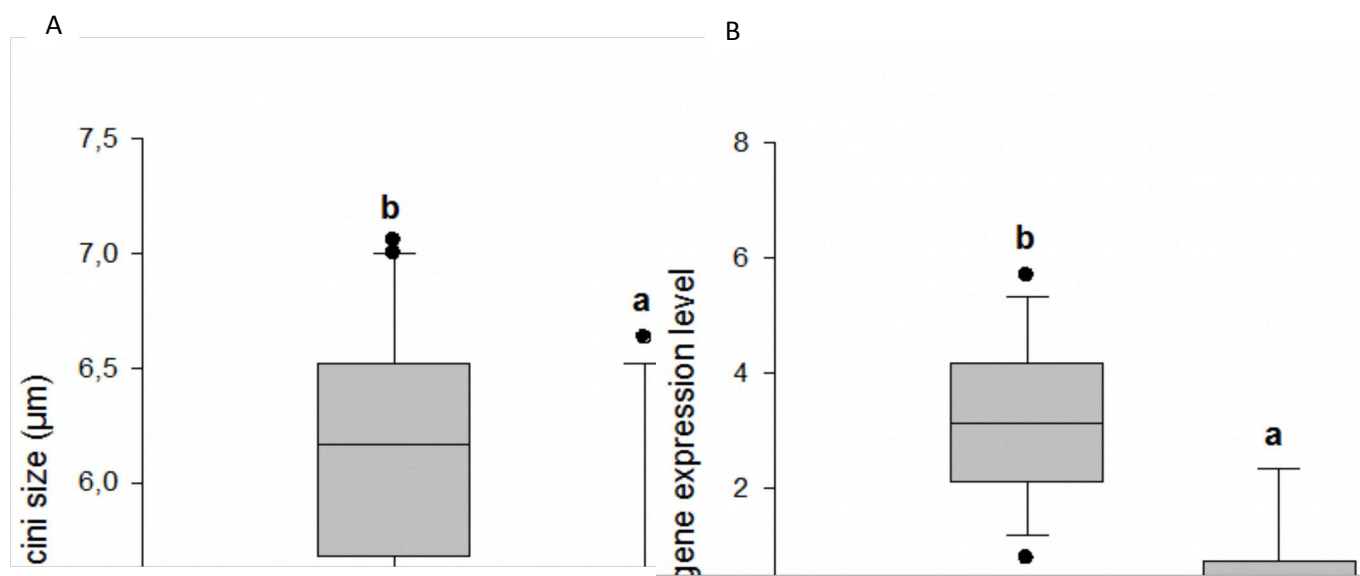


Figure 1: Effets d'un supplément protéique sur (A) la taille des acini des glandes hypopharyngiennes, (B) le taux d'expression de la *vitellogenine*, entre le jour 10 et 20. Les Box plots présentent pour 10 données/modalité (n = 60 glandes/modalité and 10 taux d'expression du gène/modalité). Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités (p < 0.05, Test de Wilcoxon et la correction de Bonferroni). Les boîtes rangent les données entre le 25ième et le 75ième pourcent et la ligne représente la médiane. Les moustaches englobent 90% des individus, au-delà de laquelle les valeurs extrêmes sont représentées par des cercles.

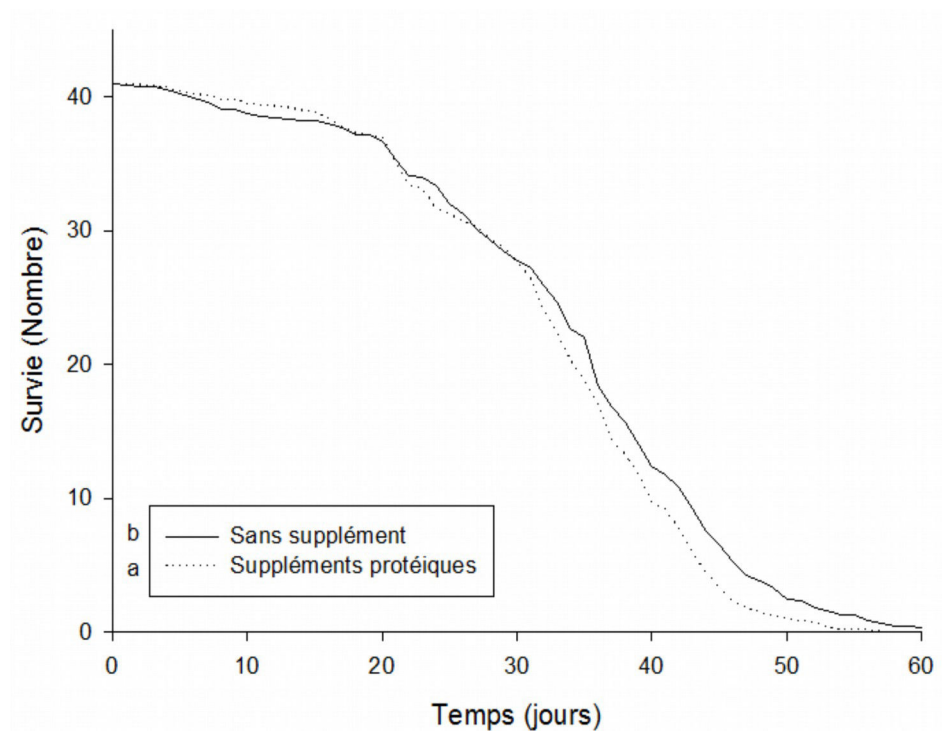


Figure 2: Effets du supplément protéique sur la survie des abeilles. Les données montrent le nombre de survivantes au cours du temps. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités (p < 0.05, Test de Wilcoxon et la correction de Bonferroni).

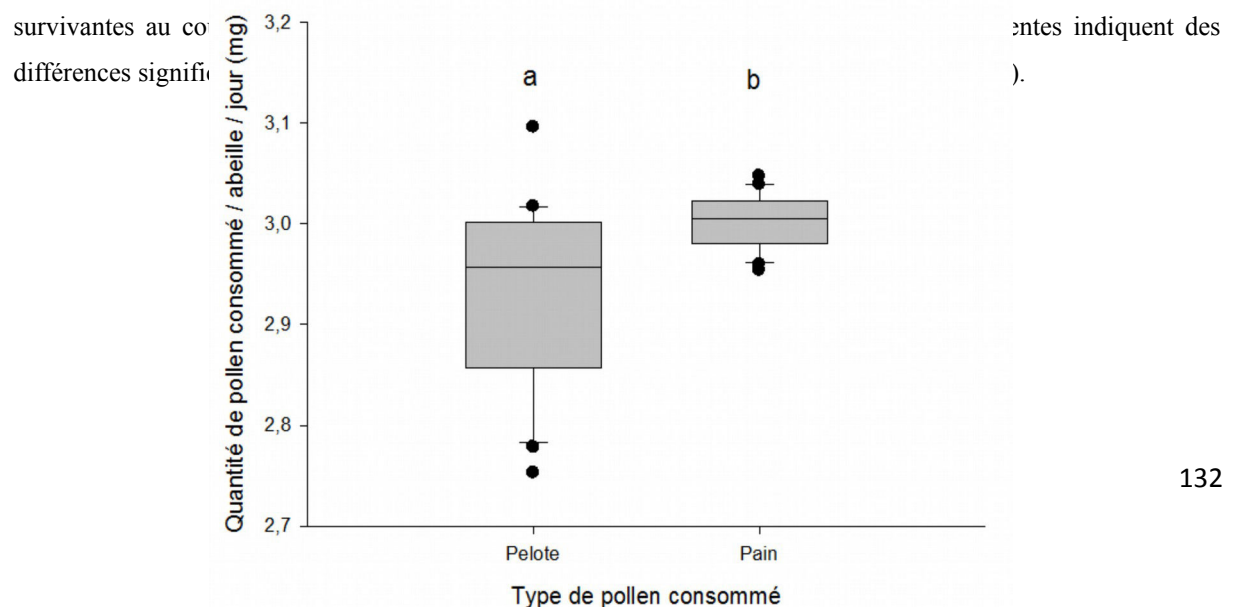
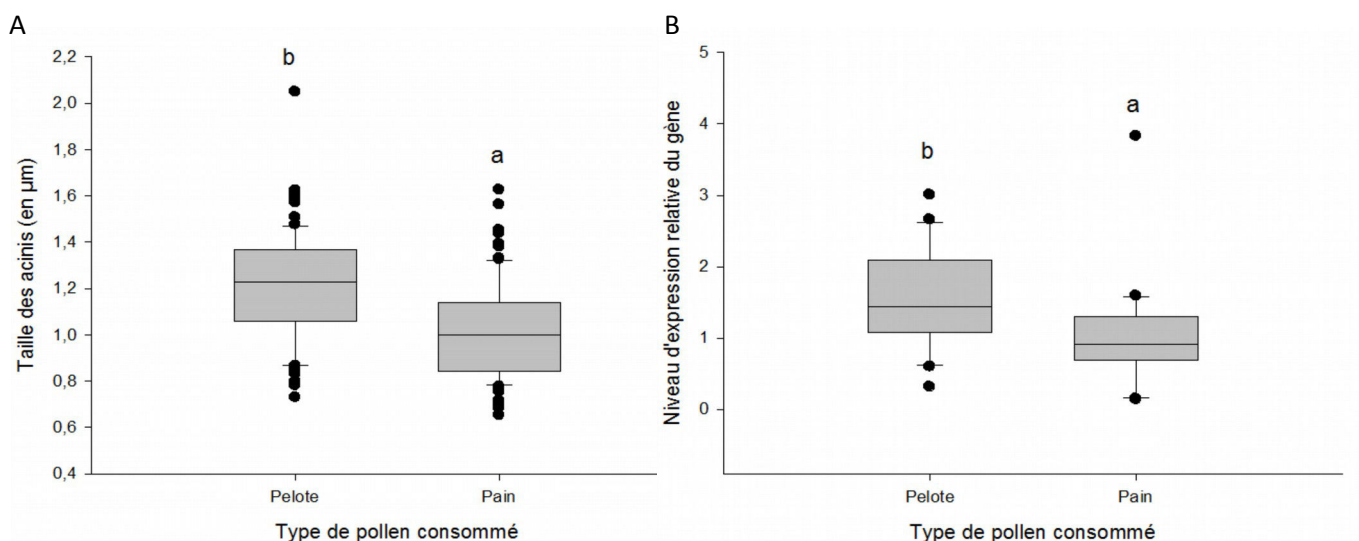


Figure 3: Comparaison de la quantité de pollen consommé en fonction du type d'alimentation.

Les Box plots présentent pour 10 données/modalité. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités ($p < 0.01$, Test de Wilcoxon et la correction de Bonferroni). Les boîtes rangent les données entre le 25ième et le 75ième pourcent et la ligne représente la médiane. Les moustaches englobent 90% des individus, au-delà de laquelle les valeurs extrêmes sont représentées par des cercles.



hypopharyngiennes, (B) le taux d'expression de la *vitellogenin*, au dixième jour. Les Box plots présentent pour 10 données/modalité ($n = 60$ glandes/modalité and 10 taux d'expression du gène/modalité). Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités ($p < 0.01$, Test de Wilcoxon et la correction de Bonferroni). Les boîtes rangent les données entre le 25ième et le 75ième pourcent et la ligne représente la médiane. Les moustaches englobent 90% des individus, au-delà de laquelle les valeurs extrêmes sont représentées par des cercles.

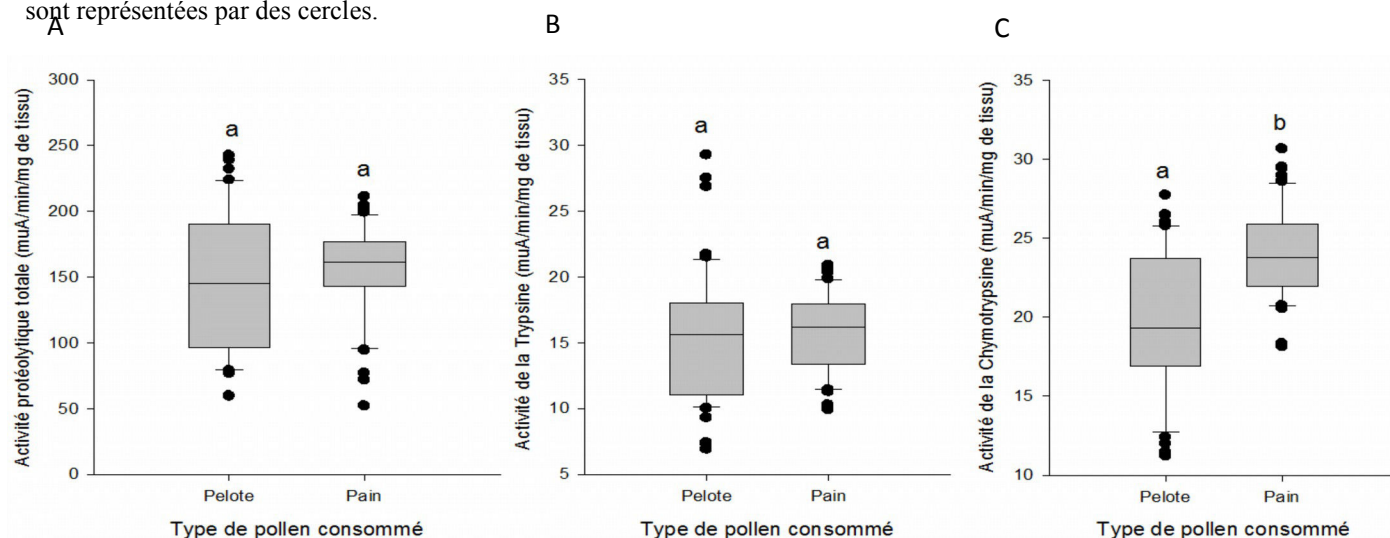


Figure 5: Effets du type d'alimentation pollinique sur les activités (A) Protéolytiques totales, (B) de la Trypsine (C) et de la Chymotrypsine. Les Box plots présentent pour 10 données/modalité (3 abeilles par mesure). Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les modalités (Test de Wilcoxon, $p > 0.05$; $p > 0.05$; $p < 0.01$; pour les activités protéolytiques totales, de la trypsine et de la chymotrypsine respectivement). Les boîtes rangent les données entre le 25ième et le 75ième pourcent et la ligne représente la médiane. Les moustaches englobent 90% des individus, au-delà de laquelle les valeurs extrêmes sont représentées par des cercles.

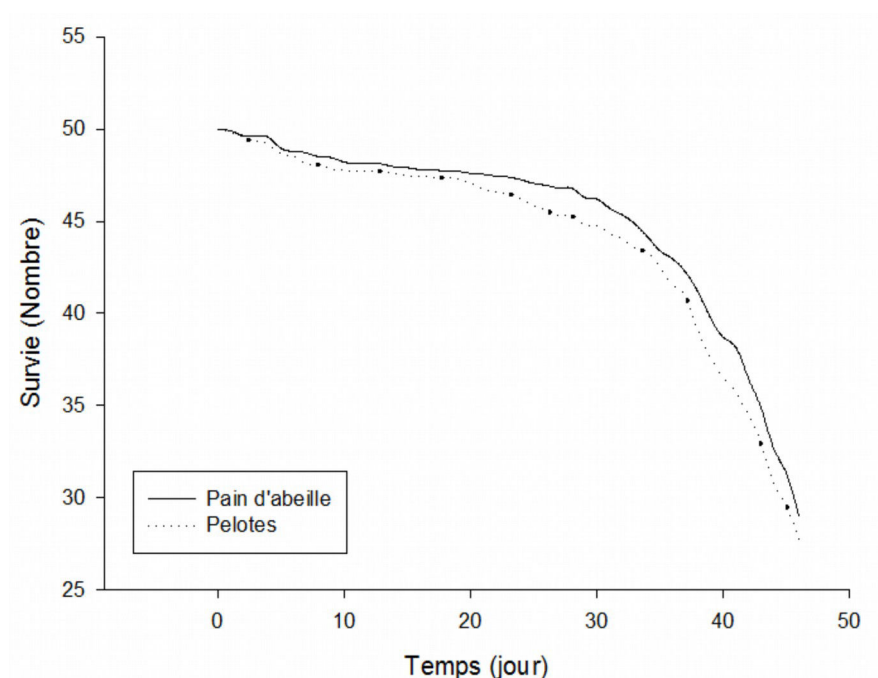


Figure 6: Effets du type d'alimentation pollinique sur la survie des abeilles. Les données montrent le nombre de survivantes au cours des 45 jours d'expérience (10 réplicats / modalité). Les courbes ne sont pas différentes en fonction du type d'alimentation ($p > 0.05$, Modèle à risque proportionnel de Cox).

Espèces palynologiques	Pelotes (en %)	Pain (en %)
<i>Brassica napus</i>	53	27
<i>Trifolium pratense</i>	35	0
<i>Trifolium repens</i>	0	4
<i>Cornus sanguinea</i>	9	32
<i>Stachys type</i>	7	7
<i>Taraxacum sp</i>	1	2
<i>Prunus/pyrus</i>	0	23
<i>Lamiaceae</i>	0	6
<i>Castanea sativa</i>	0	2

<i>Salix sp</i>	0	1
<i>Potentilla sp</i>	0	1

Tableau 1 : Composition palynologique des échantillons de pollen de type pelotes ou pain d'abeille, représentées en pourcentage de masse.

Résumé : L'influence de l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille domestique *Apis mellifera* L.

La nutrition est l'ensemble des processus par lesquels un être vivant transforme des aliments pour assurer son fonctionnement. Etudier la nutrition d'un organisme permet de comprendre les rapports entre la nourriture consommée et la santé de l'individu. L'ensemble des organes assurant l'extraction d'énergie est le système digestif, qui transforme les sucres en glucose, les corps gras en acides gras, et les protéines en acides aminés.

L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence que peut avoir la nutrition pollinique sur la santé de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L.. Pour assurer cette nutrition, l'abeille est inféodée aux ressources florales. Du pollen récolté sur les plantes à fleurs, l'organisme puise les corps gras (ou lipides), les vitamines et les protéines. Or l'accès à ces ressources est variable en qualité, en quantité, et en diversité selon le temps et le milieu. Des problèmes de mortalités et affaiblissements des colonies sont observés depuis une vingtaine d'années, et l'une des causes suspectées est le manque de disponibilité et la faible valeur nutritionnelle des ressources polliniques en zones agricoles céréalières. Nous avons donc testé en conditions contrôlées les effets de la quantité, la qualité et la diversité pollinique sur la physiologie d'abeilles nourrices, sur leur immunité, ainsi que sur leur survie. La nutrition jouant un rôle essentiel dans la prévention de nombreuses maladies, les effets de

l'alimentation pollinique ont été déterminés en présence ou non d'un stresser biotique, *Nosema ceranae*, dont la prévalence dans les colonies est très élevée. Il s'agit d'une microsporidie invasive qui se développe dans l'intestin de son hôte, provoquant divers effets sublétaux et létaux. Etant donné que la valeur nutritionnelle d'un aliment dépend de sa composition mais aussi de sa digestibilité, une troisième partie porte sur l'influence que peut avoir le stresser sur les capacités de digestion des protéines contenues dans le pollen par l'abeille.

Nos résultats apportent des connaissances sur l'impact d'une déplétion en pollen que peuvent subir les colonies dans un paysage d'agriculture intensive. En effet, des abeilles carencées à plus ou moins 60 %, comme cela peut être observé entre deux cultures à floraison massives, subissent des perturbations au niveau individuel (perturbations du développement physiologique des abeilles nourrices, diminution de leur survie), ce qui peut les rendre moins performantes et plus sensibles aux stress présents dans l'environnement. De plus, nous avons pu démontrer que la valeur nutritionnelle des pollens, influence la tolérance des abeilles à *Nosema ceranae*. La qualité d'un pollen se définit par sa composition chimique totale (protéines, acides aminés, lipides, vitamines, sucres, etc...), et non pas uniquement par sa teneur en protéines ou acides aminés essentiels. Notre étude met d'ailleurs en évidence l'effet négatif d'une alimentation à base de pollen de maïs sur le développement des glandes hypopharyngiennes, l'expression du gène de la *vitellogénine*, et la survie des abeilles. Au regard de la présence élevée de cette culture dans les zones d'agriculture intensive et sa haute exploitation par les butineuses, nos résultats sont discutés en fonction des répercussions envisagées sur les colonies. Dans ces milieux, la diversité des ressources polliniques, par l'apport de pollens de qualité, compense la pauvreté nutritionnelle d'autres pollens. Dans nos conditions, nous pouvons observer la plus-value d'une alimentation pollinique polyflorale chez des abeilles infestées par *Nosema*. Les mesures agro-écologiques œuvrant pour régulariser dans le temps les apports polliniques aux colonies, et pour leur offrir une diversité alimentaire participent donc à renforcer leur capacité à lutter contre les stress présents dans l'environnement.

Mots clés : *Apis mellifera L.*, *Nosema ceranae*, paysages agricoles, alimentation, pollen, protéines, qualité, quantité, diversité, digestion, glandes hypopharyngiennes, *vitellogénine*, enzymes, immunité, survie, nourrices.

Abstract: Influence of pollen diet on the honeybee health, in *Apis mellifera L.*

Nutrition is the set of processes by which a living organism transforms food for its functions. Studying nutrition allows to understanding the relationship between food intake and health of the individual. All organs for extracting energy are the digestive system, which converts sugars into glucose, fats into fatty acids, and proteins into amino acids.

The objective of this study is to determine the possible influence of pollen nutrition on the honeybee health, *Apis mellifera L.* To ensure that nutrition, the bee is subservient to floral resources. Of pollen collected from the flowering plants, the body draws fats (or lipids), vitamins and proteins. Access to

these resources is variable in quality, quantity, and diversity depending on the time and the environment. Problems of mortality and weakening of colonies are observed for some twenty years, and one of the suspected causes is the lack of availability and low nutritional value of pollen resources in agricultural areas. We therefore tested under controlled conditions the effects of quantity, quality and diversity of pollen on nurse worker physiology and on their immunity, as well as their survival. Nutrition plays a vital role in the prevention of many diseases, the effects of pollen diet were determined in the presence or absence of a biotic stressor, *Nosema ceranae*, whose prevalence in the colonies is very high. It is an invasive microsporidia that develops in the intestine of its host, causing various sublethal and lethal effects. Since the nutritional value of a food depends on its composition but also its digestibility, a third part focuses on the possible influence of the stressor on bee ability digestion of the proteins provided by the pollen.

Our results provide knowledge on the impact of pollen depletion that may undergo the colonies in an intensive agricultural landscape. Indeed, bees starved to roughly 60%, as can be observed between two cultures massive flowering undergo disturbances at individual level (disturbances of nurse worker physiological development, reduced survival), which may make them less efficient and more susceptible to stress from the environment. In addition, we demonstrated that the nutritional value of pollen influences the *Nosema ceranae*'s bee tolerance. The pollen quality is determined by the total chemical composition (proteins, amino acids, lipids, vitamins, sugars, etc ...), not only by its content of essential amino acids or proteins. Our study also demonstrated the negative effect of a diet based on maize pollen on hypopharyngeal glands development, the *vitellogenin* gene expression, and the bee survival. In view of the high presence of this culture in intensive agriculture areas and high exploitation by foragers, our results are discussed in terms of their impact on the proposed settlements. In these environments, the diversity of pollen resources by providing pollen of quality compensates nutritional poverty of other pollens. In our conditions, we can observe the gain of power of a polyfloral pollen in *Nosema* infested bees. Agro-ecological measures working to regularize, in time, the pollen contributions to the colonies, and to provide them with food diversity thus participate in building their capacity to fight against stress in the environment.

Keywords: *Apis mellifera* L., *Nosema ceranae*, agricultural landscapes, food, pollen, protein, quality, quantity, diversity, digestion, hypopharyngeal glands, *vitellogenin*, enzymes, immunity, survival, nurses.

Résumé : L'influence de l'alimentation pollinique sur la santé de l'abeille domestique *Apis mellifera* L.

La nutrition est l'ensemble des processus par lesquels un être vivant transforme des aliments pour assurer son fonctionnement. Etudier la nutrition d'un organisme permet de comprendre les rapports entre la nourriture consommée et la santé de l'individu. L'ensemble des organes assurant l'extraction d'énergie est le système digestif, qui transforme les sucres en glucose, les corps gras en acides gras, et les protéines en acides aminés.

L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence que peut avoir la nutrition pollinique sur la santé de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L.. Pour assurer cette nutrition, l'abeille est inféodée aux ressources florales. Du pollen récolté sur les plantes à fleurs, l'organisme puise les corps gras (ou lipides), les vitamines et les protéines. Or l'accès à ces ressources est variable en qualité, en quantité, et en diversité selon le temps et le milieu. Des problèmes de mortalités et affaiblissements des colonies sont observés depuis une vingtaine d'années, et l'une des causes suspectées est le manque de disponibilité et la faible valeur nutritionnelle des ressources polliniques en zones agricoles céréalières. Nous avons donc testé en conditions contrôlées les effets de la quantité, la qualité et la diversité pollinique sur la physiologie d'abeilles nourrices, sur leur immunité, ainsi que sur leur survie. La nutrition jouant un rôle essentiel dans la prévention de nombreuses maladies, les effets de l'alimentation pollinique ont été déterminés en présence ou non d'un stresser biotique, *Nosema ceranae*, dont la prévalence dans les colonies est très élevée. Il s'agit d'une microsporidie invasive qui se développe dans l'intestin de son hôte, provoquant divers effets sublétaux et létaux. Etant donné que la valeur nutritionnelle d'un aliment dépend de sa composition mais aussi de sa digestibilité, une troisième partie porte sur l'influence que peut avoir le stresser sur les capacités de digestion des protéines contenues dans le pollen par l'abeille. Nos résultats apportent des connaissances sur l'impact d'une déplétion en pollen que peuvent subir les colonies dans un paysage d'agriculture intensive. En effet, des abeilles carencées à plus ou moins 60 %, comme cela peut être observé entre deux cultures à floraison massives, subissent des perturbations au niveau individuel (perturbations du développement physiologique des abeilles nourrices, diminution de leur survie), ce qui peut les rendre moins performantes et plus sensibles aux stress présents dans l'environnement. De plus, nous avons pu démontrer que la valeur nutritionnelle des pollens, influence la tolérance des abeilles à *Nosema ceranae*. La qualité d'un pollen se définit par sa composition chimique totale (protéines, acides aminés, lipides, vitamines, sucres, etc...), et non pas uniquement par sa teneur en protéines ou acides aminés essentiels. Notre étude met d'ailleurs en évidence l'effet négatif d'une alimentation à base de pollen de maïs sur le développement des glandes hypopharyngiennes, l'expression du gène de la *vitellogénine*, et la survie des abeilles. Au regard de la présence élevée de cette culture dans les zones d'agriculture intensive et sa haute exploitation par les butineuses, nos résultats sont discutés en fonction des répercussions envisagées sur les colonies. Dans ces milieux, la diversité des ressources polliniques, par l'apport de pollens de qualité, compense la pauvreté nutritionnelle d'autres pollens. Dans nos conditions, nous pouvons observer la plus-value d'une alimentation pollinique polyflorale chez des abeilles infestées par *Nosema*. Les mesures agro-écologiques œuvrant pour régulariser dans le temps les apports polliniques aux colonies, et pour leur offrir une diversité alimentaire participent donc à renforcer leur capacité à lutter contre les stress présents dans l'environnement.

Mots clés : *Apis mellifera* L., *Nosema ceranae*, paysages agricoles, alimentation, pollen, protéines, qualité, quantité, diversité, digestion, glandes hypopharyngiennes, *vitellogénine*, enzymes, immunité, survie, nourrices.