

**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

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

⁴ITSAP-Institut de l'abeille, 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 x7.5 cm x11.5 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.

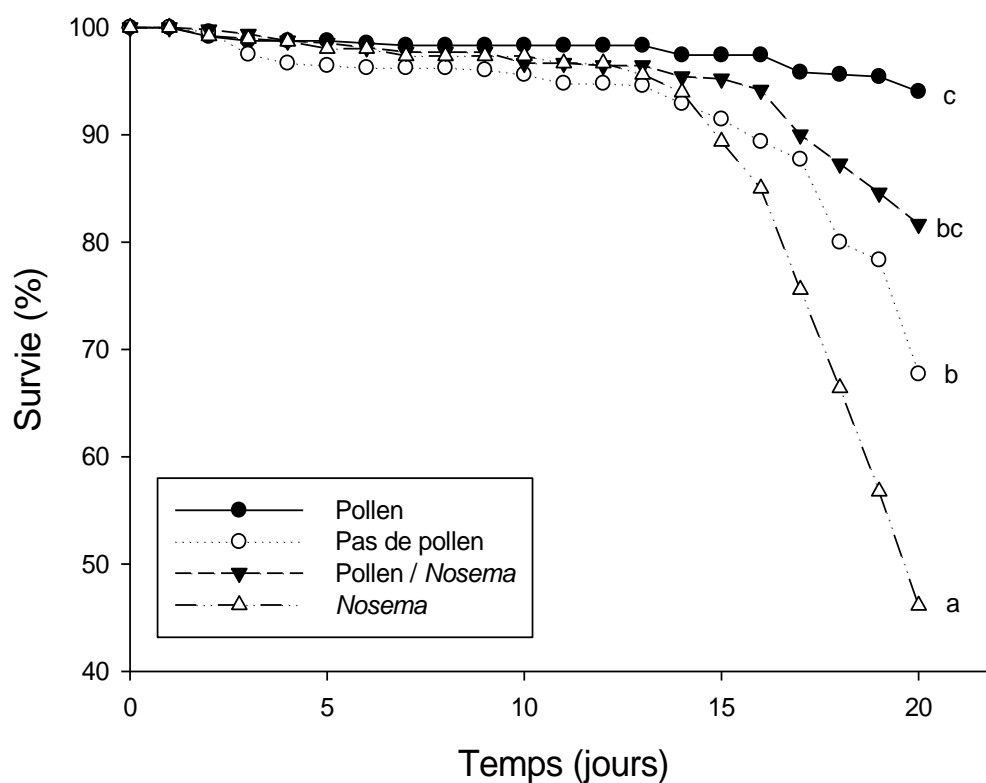


Figure 1: Effets du pollen et du parasite *Nosema ceranae* sur la survie des abeilles. Nombre de survivantes pendant les 60 jours de l'expérience (10 réplicats/modalité). Les lettres différentes montrent des différences significatives ($p < 0.01$, régression de Cox).

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 cagette 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.

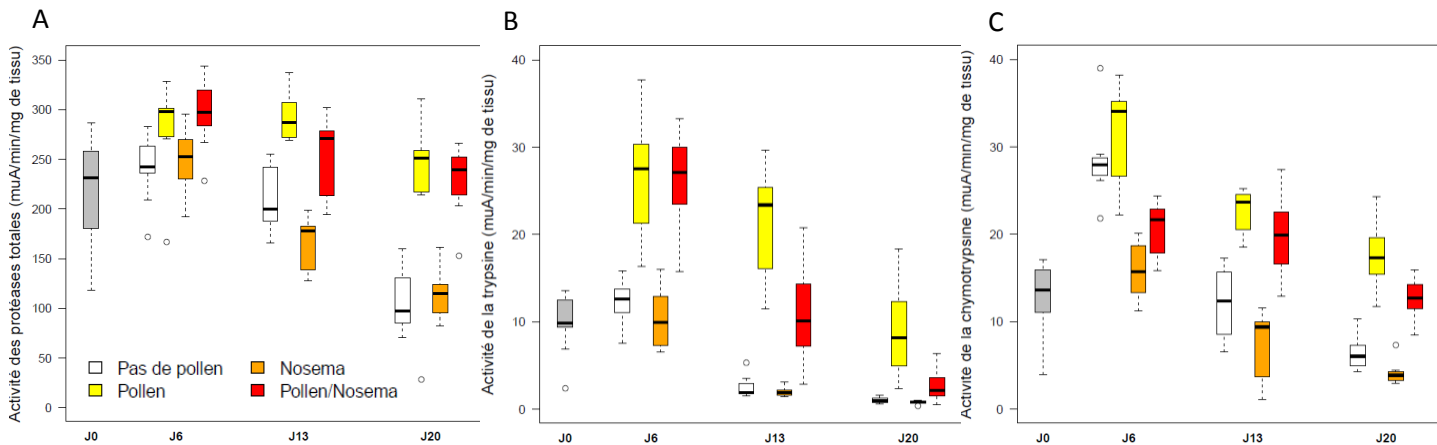


Figure 2: Effets du pollen et de *Nosema ceranae* sur (A) l'activité des protéases totales, (B) de la Trypsine (C) et de la Chymotrypsine dans les intestins d'abeilles domestiques. Les Box plots présentent les valeurs pour n= 10 mesures par modalité (3 abeilles par mesure). Les boites rangent les données 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.

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 trypsin, 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 trypsin 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 trypsin, 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 trypsin et de la chymotrypsine (Coéfficient de Spearman: 0.82, *p-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.

Annexes du chapitre 4

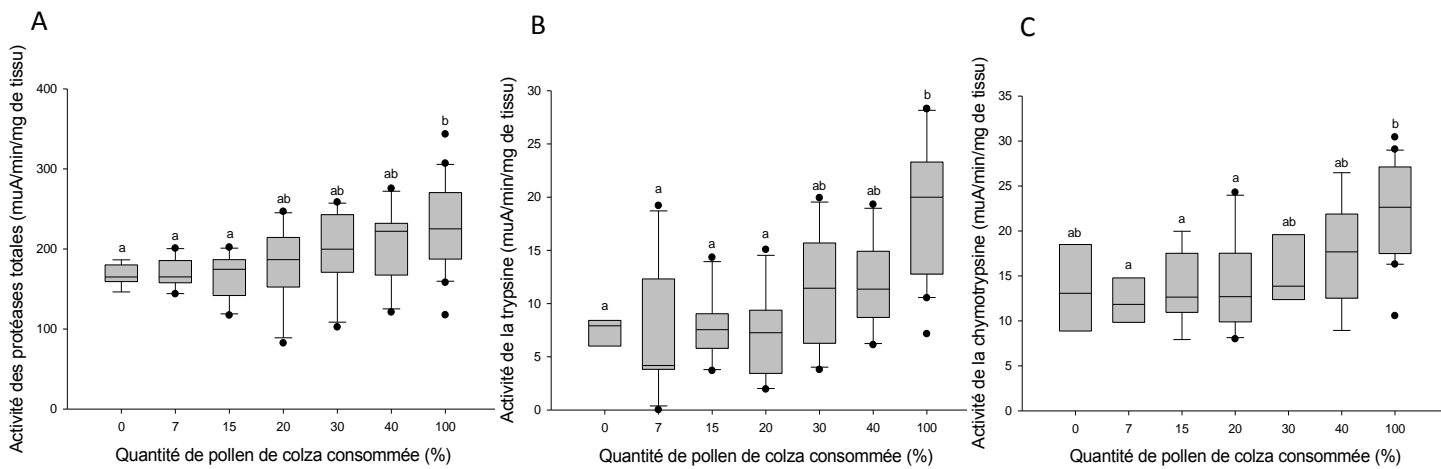


Figure 1: Effets de la quantité de pollen sur (A) l'activité des protéases totales, (B) de la Trypsine (C) et de la Chymotrypsine dans les intestins d'abeilles domestiques. Les Box plots présentent les valeurs pour $n = 10$ par modalité (3 abeilles par mesure). Les lettres différentes indiquent des différences 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 25^{ième} et le 75^{ième} 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