



HAL
open science

Caractérisation biochimique de la collecte du pollen par les abeilles domestiques

Philippe Royer

► **To cite this version:**

Philippe Royer. Caractérisation biochimique de la collecte du pollen par les abeilles domestiques. [Stage] Université Paris Sud - Paris 11 (UP11), Orsay, FRA. 2011, 12 p. hal-02810913

HAL Id: hal-02810913

<https://hal.inrae.fr/hal-02810913>

Submitted on 6 Jun 2020

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.

Caractérisation biochimique de la collecte du pollen par les abeilles domestiques



Abeille domestique sur *Helianthus annuus* (© P. ROYER)

Philippe ROYER

Maître de stage : B. VAISSIERE (bernard.vaissiere@avignon.inra.fr)

Tuteur : S. SUCHAIL (severine.suchail@univ-avignon.fr)

SOMMAIRE

<u>REMERCIEMENTS</u>	3
<u>RÉSUMÉ</u>	4
I- <u>INTRODUCTION</u>	4
II- <u>MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	6
a) <u>Matériel végétal</u>	6
b) <u>Matériel animal</u>	8
c) <u>Analyse par HPIC</u>	8
III- <u>RÉSULTATS</u>	9
IV- <u>DISCUSSION</u>	10
V- <u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	12

REMERCIEMENTS

Je remercie Yves Le Conte, directeur de l'UMR Abeilles et Environnement de l'INRA d'Avignon pour m'avoir accueilli dans son unité. Je remercie aussi toutes les personnes travaillant dans cette unité et plus particulièrement celles de l'équipe Pollinisation et Ecologie des Abeilles.

Merci à Bernard Vaissière pour m'avoir proposé ce sujet si intéressant et m'avoir fait participer activement aux autres projets de l'équipe.

Un grand merci à Séverine Suchail qui s'est occupée de tout l'aspect biochimique et terrain de mon stage et sans qui je n'aurais pas pu avancer, merci pour son aide, ses conseils, son encadrement. Merci aussi à Nicolas Morison et Laurent Guilbaud pour toutes leurs connaissances qu'ils m'ont apporté sur le monde des abeilles et de la photographie.

Je remercie aussi tout particulièrement le reste de l'équipe pour leur accueil et tous les bons moments passés avec eux : Jean Aptel, Benjamin Barbier, Marie-Josée Buffière, Jean-Marie Cécilio, Corinne Chêne, Sophie Derveau, Marie HARRUIS, Mickael Henry, Laurent Neu, Céline Pleindoux, Guy Rodet, et Jean-Paul Vermandère.

Merci également à Dominique Garcin, agriculteur, qui m'a permis d'effectuer certaines parties de mon stage sur son exploitation et à Marine Pouvreau.

Merci à tous !

RÉSUMÉ

Pour se nourrir, l'abeille domestique butine du nectar et récolte du pollen de fleurs. Le pollen prélevé est ensuite aggloméré sous forme de pelotes qu'elle transporte jusqu'au nid. Ce comportement est mal connu et aucune recherche n'a encore caractérisé les substances intervenant dans cette compaction. Dans ce contexte, une étude a été menée sur 4 espèces végétales : la picride, le troène, le coquelicot et le tournesol afin de comparer le profil glucidique du pollen pur et du pollen aggloméré. Des analyses par chromatographie ionique haute performance ont permis de mettre en évidence que les abeilles domestiques ajoutent 3 sucres au pollen pur pour former leurs pelotes sur picride, un sucre sur troène et de 1 à 4 sucres différents pour les butineuses de coquelicot et de tournesol. La nature des sucres ajoutés ainsi que leur quantité varie avec l'espèce végétale. De plus, il a été montré que le pollen de tournesol est celui qui en contient le plus alors que celui du troène est le plus pauvre en glucide. Ainsi, ces études ont permis de mettre en évidence que, pour agglomérer le pollen, les abeilles domestiques utilisent des composés d'origine glucidique provenant du nectar.

I- INTRODUCTION

Dans le monde, on compte actuellement 20 000 espèces d'abeilles (http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species), dont 1000 en France qui incluent l'abeille domestique, *Apis mellifera*, qui produit le miel. Ces hyménoptères jouent un rôle capital dans la pollinisation, c'est-à-dire le transport du pollen des anthères vers le stigmate d'une même plante ou d'une plante différente. On distingue la pollinisation anémophile (transport du pollen par le vent) et entomophile (transport du pollen par les insectes). La morphologie des abeilles (présence de poils branchus qui recouvrent tout ou une partie de leur corps), leur régime alimentaire constitué exclusivement de nectar et de pollen, et leur comportement de butinage en font des vecteurs de pollen particulièrement efficaces et précis. Grâce à ce service de pollinisation, les abeilles contribuent à la survie et à l'évolution de plus de 80% des espèces végétales (Allen-Wardel et al. 1998). En agriculture, les abeilles sont utilisées pour faciliter la reproduction sexuée des plantes dans le but de produire des fruits et des graines commercialisables. L'intervention des insectes pollinisateurs, au premier rang desquels les abeilles, a été estimée à plus de 153 millions d'euros en 1995 pour les cultures qui nourrissent directement l'humanité (Gallai et al. 2009).

On distingue les abeilles domestiques, *Apis mellifera*, des abeilles sauvages. Les premières sont sociales et constituent des colonies composées de trois castes d'individus : (i) les ouvrières, où l'on retrouve les butineuses de nectar et de pollen, les nourricières et les nettoyeuses, (ii) la reine, et (iii) les mâles appelés aussi faux-bourçons. Le fait de vivre en communauté va entraîner toute une série de comportements, comme la récolte du pollen et du nectar qui sera stocké sous forme de miel puis redistribué au reste de la colonie. Au contraire, la majorité des espèces sauvages sont solitaires.

Le nectar constitue la ressource principale butinée par les abeilles domestiques et les glucides y sont les constituants principaux avec trois sucres majoritaires, le glucose, le fructose et le saccharose. Le nectar est également constitué de sucres minoritaires en quantité beaucoup plus faible, mais souvent caractéristiques de l'espèce végétale (Cotte et al. 2003).

Les études palynologiques ont permis d'avoir une bonne connaissance sur l'étendue du régime alimentaire pollinique et sur l'importance des différentes sources de pollen pour l'abeille. Le pollen a pour rôle de finaliser le développement des structures internes de l'abeille comme l'appareil digestif et circulatoire. Par sa constitution, le pollen représente l'apport protéique et lipidique des abeilles. Il contient également des acides aminés, des vitamines, des caroténoïdes et flavonoïdes, et des sucres qui peuvent constituer 35 à 61% du poids frais du pollen d'abeilles (Human et Nicholson, 2006). Le pollen mature possède une quantité de saccharose inversement proportionnelle à celle de l'amidon (Speranza et al. 1996). Ce dernier est l'élément clé de la survie du pollen (A. Speranza et al 1996, Castro et Clément 2007, Hoekstra & van Roekel 1988, Hoekstra et al 1989, 1991). Le grain de pollen transporté par l'abeille est une structure cellulaire contenant des gamétophytes mâles. Il est formé d'une enveloppe constituée de plusieurs couches dont une couche externe, très résistante, l'exine. Selon leurs modes de dissémination, les grains de pollen présentent une morphologie différente. Leur diamètre peut varier de 3 μm (*Myosotis*) à 200 μm (*Cucurbita pepo*). Les butineuses de pollen agglomèrent le pollen en pelote au niveau de leurs corbicules pour le transporter jusqu'à la ruche tandis que les abeilles sauvages vont le stocker au niveau de leur face ventrale ou de leur *scopae*. C'est la forme ornementée du pollen entomophile qui lui permet de rester accroché aux poils branchus de l'abeille ou de faciliter son agrégation en pelote (Vaissière & Vinson 1994). Les pelotes sont constituées de pollen de fleur (pollen pur) mélangé avec du nectar ou des sécrétions d'abeilles (Silva et al 2006). Par ailleurs, R.W Thorp a montré en 1979 que certaines espèces d'abeilles sauvages (*Panurginae* et *Mellitidae*) rajoutaient des substances pour stocker le pollen sur leur corps. Néanmoins, les mécanismes d'agrégation restent mal connus. Par exemple les facteurs de variation de la quantité de liants ajoutés au pollen n'ont jamais été étudiés. De plus, il se pourrait que la pression osmotique ou l'action de certains composés spécifiques des substances ajoutées lors de l'agglomération du pollen, diminuent la viabilité du pollen (Vaissière et al. 1996).

Ainsi, l'objectif de ce stage est de mieux comprendre les interactions pollen-abeilles. Dans un premier temps, un travail méthodologique sera réalisé pour analyser quantitativement la composition glucidique du pollen pur en comparaison avec du pollen de la même espèce mis en pelotes sur quelques espèces végétales (coquelicot, picride, troène, tournesol). La détermination quantitative et qualitative des sucres sera effectuée par chromatographie ionique haute performance (HPIC). Cette analyse permettra d'évaluer la nature et les quantités de sucres ajoutés par les abeilles mellifères lors de leur récolte du pollen.

II- MATERIELS ET METHODES

a) Matériel végétal

- Pollen pur

⇒ La récolte des boutons floraux de coquelicots (*Papaver roheas*) commence à 6H30 avant le butinage des abeilles pour éviter toute contamination de pollen et augmenter les chances de son prélèvement. Les étamines sont extraites des boutons floraux après avoir séparé les fleurs de leur tige avec une lame de rasoir. On attend ensuite la déhiscence des anthères (photos 1 et 2).

Tous les grains de pollen seront récoltés après avoir placé les étamines sur du papier d'aluminium à cause de sa neutralité en terme chimique et de son rôle anti-électrostatique.



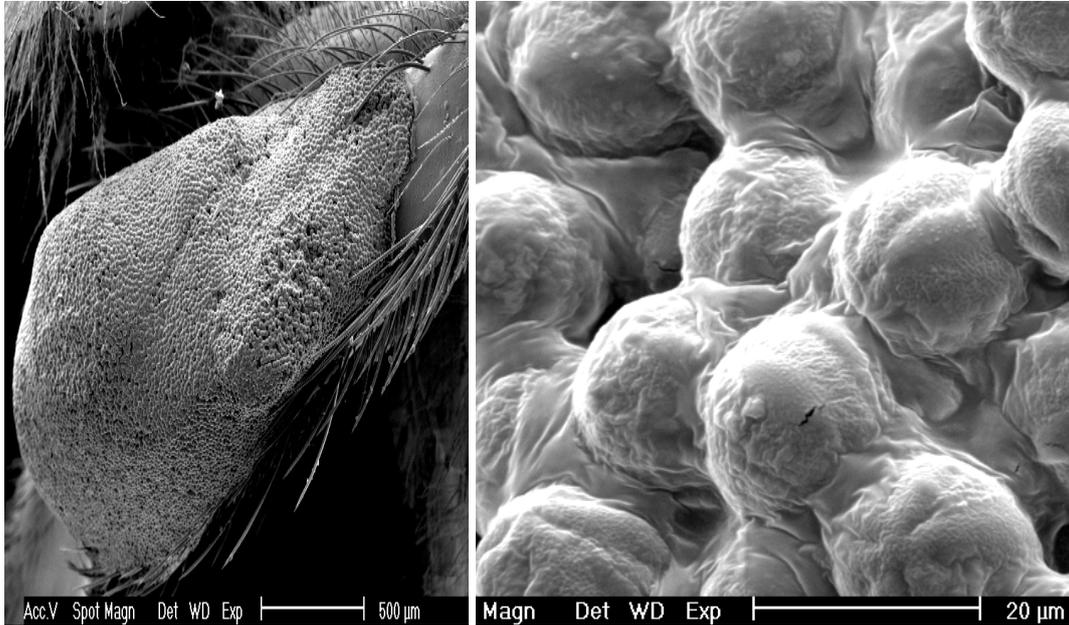
Photos1 et 2 : Champs et anthères déhiscentes de *Papaver roheas* (©P.ROYER)

Une fois la déhiscence terminée, les étamines placées dans une boule à thé sont vibrées afin de libérer les grains de pollen qui sont ensuite stockés à -20°C. Chaque tube contient un poids frais supérieur ou égal à 10 mg de pollen pur (PP), quantité minimale pour l'analyse en HPIC.

⇒ Pour le pollen de picride fausse vipérine (*Picris echioides*), du troène commun (*Ligustrum vulgaris*) et du tournesol (*Heliantus annuus*), la récolte du pollen se fait en début d'après-midi. Des rameaux qui n'ont pas encore fleuris sont coupés afin d'éviter toute contamination. L'extraction du pollen et sa récolte sont réalisées de la même façon que sur coquelicot.

- Les pelotes des abeilles domestiques

Les pelotes des abeilles domestiques (photos 3 et 4) sont prélevées avec une pince fine n°5 sous la loupe binoculaire. Elles sont de couleurs différentes selon l'espèce végétale. Elles sont de couleur noire pour le coquelicot, jaune pour la picride et le troène et orange pour le tournesol. Les pelotes de tournesol sont plus légères que les autres à cause de la paroi hérissée du grain de pollen qui l'empêche de s'agréger correctement avec d'autres grains. La pelote est dite creuse (photo 5).



Photos 3 et 4: Pelote et grains de pollen agglomérés par MEB (©Chifflet – Bornard – INRA 2008)

Chaque pelote est pesée avec une balance de précision. Si son poids est inférieur à 10 mg, les deux pelotes seront analysées en même temps, dans le cas contraire, une répétition supplémentaire sera réalisée. 700 µL d'H₂O ultrapure sont ajoutés aux pollen pur, pelotes ou pollen non aggloméré et déposés dans des tubes eppendorf puis placés dans le bac à ultrason et soniqués pendant 1 minute. Les solutions sont homogénéisées à l'aide d'un vortex puis filtrées avec des filtres IC Millex –LG (Ø 13 mm, 0,2 µm).

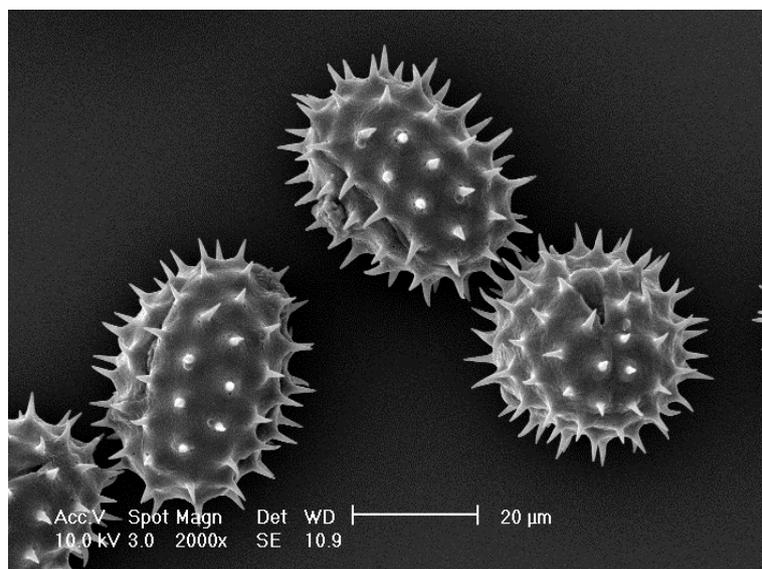


Photo 5 : grains de pollen de tournesol par MEB (©Chifflet – Bornard – INRA 2008)

b) Matériel animal

Les abeilles domestiques (photo 6) sont capturées avec un filet. Une glacière permet de conserver les pelotes et les spécimens. Les abeilles sont déposées dans des tubes en verre puis stockées à -20°C .



Photo 6: *Apis mellifera* sur *Helianthus annuus* (© P.ROYER)

c) Analyse par HPIC

L'HPIC est une technique permettant une détection très sensible des sucres (photo 7). Cette technique utilise une phase stationnaire sur laquelle se trouvent des groupements ionisés : échangeur d'anions (un soluté ionisé de charge opposée se trouvera d'autant plus retenu que sa charge sera plus forte). Cette phase stationnaire est généralement poreuse et renferme dans ses pores une phase liquide qui peut jouer un rôle très important dans les séparations. Une colonne carbo Pac A1 est utilisée car elle est spécifique pour la séparation des sucres.

La solution éluante (250 mM NaOH ; 4mM Acétate de Na) est préparée avec 10,4 mL de NaOH à 46% et 0,262 g d'Acétate de sodium. La durée de l'élution est de 40 min par échantillon. A la fin, les différents profils glucidiques de chaque espèce végétale sont étudiés. Avant d'analyser les échantillons, il est nécessaire de procéder à une calibration. Pour cela, un mélange de 12 sucres (sorbitol, maltose, tréhalose, stachyose, rhamnose, glucose, fructose, mélibiose, saccharose, mélézitose, raffinose et erlose) est réalisé à une concentration de 2 mM. Différents volumes de cette concentration sont injectés de façon à obtenir 15 ; 12,5 ; 10 ; 7,5 ; 5 et 2,5 nmoles de chacun des sucres. La calibration permet de transmettre à la machine les informations sur le temps de rétention et la relation aire-quantité des sucres dans le but de déterminer d'un point de vue qualitatif et quantitatif les différents sucres contenus dans le pollen. Pour chaque échantillon, deux répétitions sont réalisées.

III- RESULTATS

Le poids moyen des pelotes est résumé dans le tableau 1 ci-dessous. Sur troène, la moyenne donnée correspond à la somme des pelotes portées par l'abeille, à cause d'une erreur de manipulation.

Nom de l'espèce végétale	<i>Picride</i>	<i>Troène</i>	<i>Coquelicot</i>	<i>Tournesol</i>
Poids des pelotes (moyenne en mg ± écart-type)	14,00 ± 1,41	9,33 ± 2,52	10,83 ± 1,60	6,35 ± 0,47

Tableau I : Nombre d'abeilles domestiques et poids moyen des pelotes prélevées sur différentes espèces végétales.

Les résultats mettent en évidence que le poids moyen des pelotes varie avec l'espèce végétale. En effet, les pelotes de picride sont les plus lourdes avec 14,00 mg alors que celles du troène semblent être les plus légères avec 8,67 mg pour deux pelotes.

L'analyse par HPIC a permis de mettre en évidence la présence de différents sucres dans le pollen pur ainsi que dans le pollen aggloméré. Les résultats sont montrés dans la figure 1 ci-dessous.

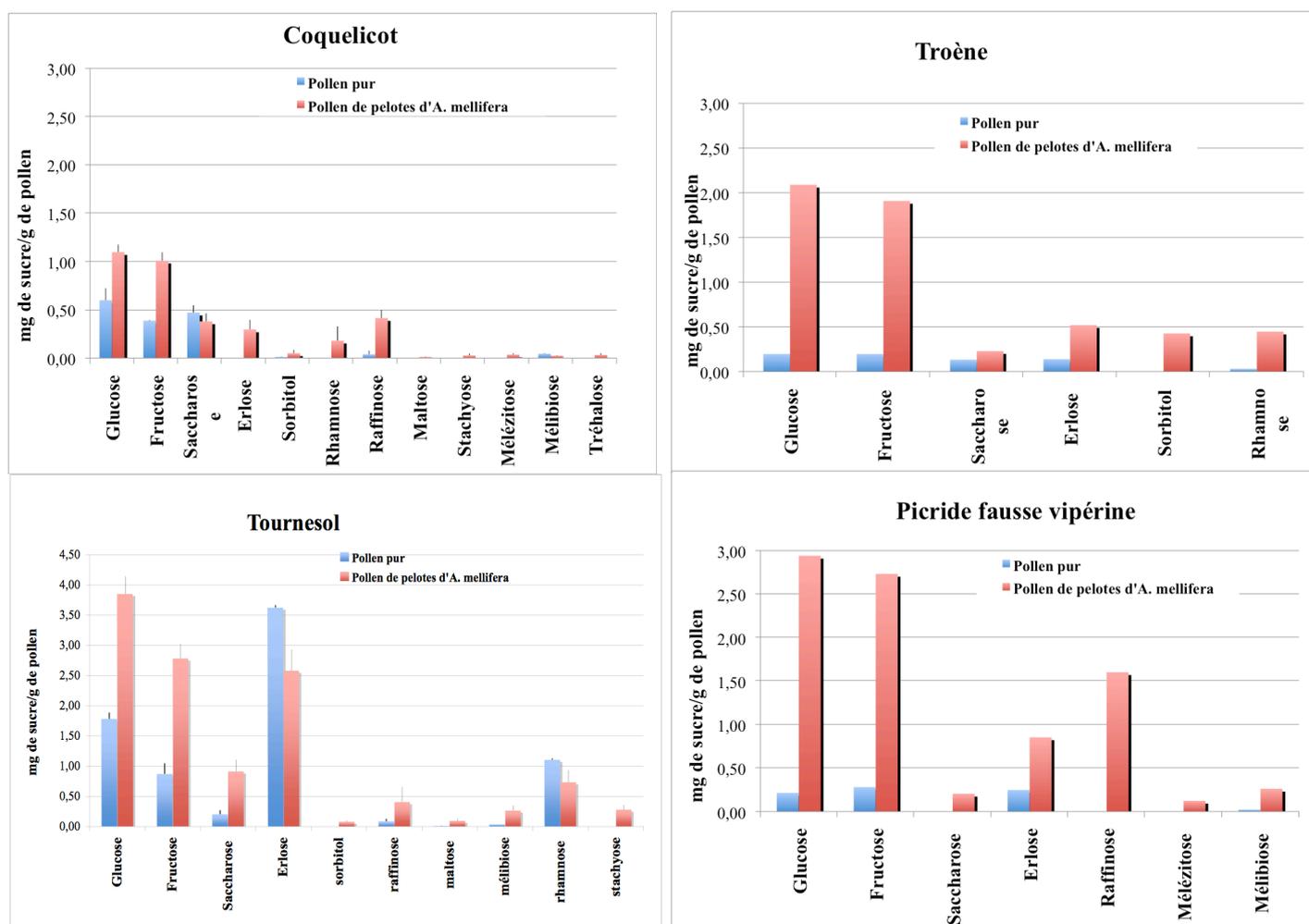


Figure 1 : Quantification en milligrammes de sucre par grammes de pollen de 4 espèces végétales (moyenne ± SE)

Le pollen pur de picride contient 4 sucres, le glucose, le fructose, l'erlose, et le mélibiose. Le glucose et le fructose sont majoritaires. En raison d'une trop faible quantité de pollen récolté, l'analyse n'a pu être répétée.

Pour le troène, 5 sucres ont été mis en évidence dans le pollen pur. Les sucres sont le glucose, le fructose, le saccharose, l'erlose et le mélibiose. Le glucose et le fructose restent les glucides majoritaires. Un seul échantillon a pu être aussi analysé en raison de la trop faible quantité de pollen pur récolté.

Le pollen pur de coquelicot contient 6 sucres : le glucose, le fructose et le saccharose qui sont majoritaires du point de vue quantitatif avec une forte dominance pour le glucose et le fructose. Le raffinose, le sorbitol et le mélibiose ont été mis en évidence en très faible quantité. Enfin, 4 autres sucres ont été détectés mais ils ne sont ni identifiables et ni quantifiables. Trois répétitions ont pu être effectuées. Enfin, l'analyse des pelotes fait apparaître de nouveaux sucres comme le rhamnose, le maltose, le stachyose, le tréhalose et d'autres sucres non identifiés.

Le pollen pur de tournesol est composé de 8 sucres : le glucose, le fructose, le saccharose, l'erlose, le raffinose, le maltose, le mélibiose et le rhamnose. Le glucose, le fructose, l'erlose et le rhamnose sont les sucres majoritaires. En revanche, le maltose, le mélibiose et le raffinose sont présents en très faible quantité.

IV- DISCUSSION

Les analyses réalisées sur pollen pur nous ont permis de mettre en évidence que, quelque soit l'espèce végétale, le glucose et le fructose sont les sucres majoritaires. De plus, le nombre de sucres ajoutés et la quantité des sucres totaux varient selon le type pollinique. En effet, parmi les 4 espèces végétales étudiées, le pollen pur de tournesol est celui qui possède non seulement le plus de sucres d'un point de vue quantitatif mais aussi d'un point de vue qualitatif. Par opposition, le pollen pur de troène est celui qui est le plus pauvre en substance glucidique.

Le poids moyen des pelotes varie de 4,67 mg (troène) à 14 mg (picride). Ces résultats sont en accord avec ceux de Maurizio (1953) et Warakomska (1962). De plus, l'étude a montré que le rapport de la quantité de sucres dans le pollen aggloméré par rapport celle du pollen pur de picride fausse vipérine et de tournesol est bien supérieur à celui du troène et du coquelicot. Cet ajout plus important est dû à la morphologie pollinique. En effet, le pollen de picride fausse vipérine et de tournesol est un pollen échiné appartenant à la famille des Asteraceae et demande donc plus de substance ajoutée pour la compaction des grains de pollen en pelote. En revanche, le pollen de troène et de coquelicot qui ont plutôt un type de morphologie réticulée demandent moins de composés pour agglomérer le pollen.

Ces travaux confirment l'étude menée par Thorp en 1979 qui met en évidence que les abeilles domestiques rajoutent des substances glucidiques afin d'agglomérer les grains de pollen ornementés en pelotes. De plus, Vaissière et Vinson ont montré en 1994 que la tension de surface des solutions sucrées étant relativement constante, le profil des sucres ajoutés aux pelotes peut donc varier dans de larges proportions entre les individus en fonction de l'origine du nectar ou du miel ajoutés au pollen. Par ailleurs, cette compaction permet aussi à l'abeille d'optimiser sa capacité à ramener du pollen de différentes espèces végétales et de le conserver afin de nourrir la colonie. Ces sucres ajoutés proviennent du nectar que les abeilles prélèvent lors du butinage.

En perspective, dans un premier temps, il serait intéressant d'augmenter le nombre de sucres étudiés pour obtenir le profil glucidique total du pollen pur et du pollen aggloméré car la calibration contenant les 12 oses n'a pas permis de caractériser tous les sucres. Dans un second temps, l'étude pourrait être étendue aux abeilles sauvages. Effet, ces dernières stockant le pollen au niveau de leur face ventrale ou de leur *scopae* pourraient elles aussi ajouter des substances glucidiques pour optimiser le transport des grains de pollen vers leur nid.

V- RÉFÉRENCES BLIOGRAPHIQUES

- Castro A, Clément C. 2007. *Sucrose and starch catabolism in the anther of Lilium during its development: a comparative study among the anther wall, locular fluid and microspore/pollen fractions*. *Planta* 225, 1573–1582.
- Cotte J.F, Casabianca H, Chardon S, Lhéritier J, grenier-Loustalot MF. 2003. *Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity*. *J. Chromato . A1021* :145-155.
- Gallai N., Salles J.M., Vaissière B E. 2009. *Evaluation de la contribution économique du service de pollinisation à l'agriculture européenne*. *Bull. Tech. Apic.* 36 (3). 110-116.
- Gordon Allen-Wardell, Peter Bernhardt, Ron Bitner, Alberto Burquez, Stephen Buchmann, James Cane, Paul Allen Cox, Virginia Dalton, Peter Feinsinger, Mrill Ingram, David Inouye, C. Eugene Jones, Kathryn Kennedy, Peter Kevan, Harold Koopowitz, Rodrigo Medellin, Sergio Medellin-Morales, Gary Paul Nabhan, Bruce Pavlik, Vincent Tepedino, Phillip Torchio and Steve Walker, 1998. *The Potential Consequences of Pollinator Declines on the Conservation of Biodiversity and Stability of Food Crop Yields*. *Conservation Biology* 12, 8-17.
- Hoekstra FA. 1992. *Stress effects on the male gametophyte..* Cresti M, Tiezzi A (eds) *Sexual plant reproduction*, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 193–201.
- Hoekstra FA, Roekel T van. 1988. *Desiccation tolerance of Papaver dubium L. pollen during its development in the anther*. *Plant Physiol* 88:626–632.
- Hoekstra FA, Crowe LM, Crowe JH. 1989. *Differential desiccation sensitivity of corn and Pennisetum pollen linked to their sucrose content*. *Plant Cell Environ* 12:83–91.
- Hoekstra FA, Crowe JH, Crowe LM. 1991. *Effect of sucrose on phase behavior of membranes in intact pollen of Typha latifoliaL., as measured with Fourier transform infrared spectroscopy*. *Plant Physiol* 97:1073–1079.
- Human H, Nicholson S.W. 2006. *Nutritional content of fresh, bee- collected and stored pollen of Aloe greatheadii var. davyana (Asphodelaceae)*. *Phytochemistry* 67, 1486–1492.
- Maurizio A. (1953). *Weitere Untersuchungen an Pollenhöshen*. *Beith. Schweiz. Bienen Ztg.* II 20 : 486-556.
- Silva, T.M.S., Camara, C.A., Da Silva Lins, A.C., Barbosa-Filho, J.M., Saramento da Silva, E.M., Freitas, B.M., Ribeiro dos Santos, F.A. 2006. *Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee Melipona subnitida Ducke*. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 507–511.
- Speranza A., Calzoni G.L., Pacini E. 1997. *Occurrence of mono- or disaccharides and polysaccharide reserves in mature pollen grains*. *Sex Plant Reprod.* 10 : 110-115.
- Thorp R.W. 1979b. *Structural, behavioral, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 66: 788-812.
- Vaissière B.E., Malaboef F, Rodet G. 1996. *Viability of Cantaloupe Pollen Carried by Honeybees Apis mellifera varies with Foraging Behavior*. *Naturwissenschaften* 83 84-86.
- Vaissière B.E., Vinson S. B. 1994 *Pollen morphology and its effect on pollen collection by honey bees, Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae), with special reference to upland cotton, Gossypium hirsutum L. (Malvaceae)*. *Grana* 33: 128-138.
- Warakomska Z. 1962. *An investigation into pollen collections by Apis mellifica L. from two different parts of Poland*. *Ann. Univ. Mariae Curie- Sklodowska (Lublin, Poland). Sect. E.* 17(5) : 67-106.