

**COMPOSES DE L'ABEILLE POUVANT AVOIR UN EFFET SUR LA  
QUALITE REPRODUCTRICE DU POLLEN**

## I. Introduction

Comme cela a été présenté précédemment, la qualité reproductrice du pollen est affectée par l'abeille. Il a été montré que la qualité du pollen était plus ou moins altérée en fonction de la partie du corps de l'abeille avec laquelle il était en contact ou du comportement de butinage. Ainsi, Mesquida et Renard (1989) ont montré que le pollen de colza présentait une aptitude à germer plus faible lorsqu'il était mis en pelote que lorsqu'il était porté sur le corps. Ils ont également montré que le pollen porté sur la tête perdait plus rapidement son aptitude à germer que celui porté sur le thorax. L'hypothèse avancée par ces auteurs est que la perte de l'aptitude à germer *in vitro* du pollen de colza récolté par l'abeille pourrait être causée par un contact avec des fluides oraux de l'abeille. Ces fluides sont constitués de nectar et de sécrétions glandulaires que l'abeille régurgite afin de les ajouter au pollen pour le compacter en pelotes. Il a été montré chez d'autres insectes comme la noctuelle de la tomate (*Helicoverpa armigera*) que les fluides oraux diminuent la qualité du pollen (Richards *et al.*, 2005). Vaissière *et al.* (1996) ont montré que la viabilité du pollen porté par des butineuses mixtes était plus faible que celui porté par des butineuses strictes de nectar. Ces dernières, qui se nettoient du pollen, utiliseraient moins de fluide oraux ou de composition différente que les butineuses qui compactent le pollen dans leurs corbicules (Vaissière *et al.*, 1996).

Des recherches ont mis en évidence que des composés de l'abeille inhibaient la germination *in vitro* du pollen. Maurizio (1958) a montré que les sécrétions des glandes hypopharyngiennes dont la gelée royale inhibaient fortement la germination du pollen. Il a été montré par la suite que de nombreux acides gras avaient une action inhibitrice (Keularts and Linskens, 1968). L'acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA), en particulier, empêche la germination du pollen de pétunia (Lukoschus and Keularts, 1968). Produit par les glandes mandibulaires, il est présent sur la tête, mais pratiquement absent sur le reste du corps où il y parviendrait lors du processus de façonnage des pelotes de pollen (Lukoschus and Keularts, 1968 ; Verhoef and Hoekstra, 1986). Des substances autres que les acides gras ont une action inhibitrice. C'est le cas du miel et des solutions sucrées dont la concentration en sucres est supérieure à 40% et de la propolis (Maurizio, 1958).

Néanmoins, dans le dispositif expérimental que nous avons utilisé précédemment, les abeilles n'avaient pas la possibilité de se brosser et de manipuler le pollen. Il semblerait plus probable que des substances présentes sur la cuticule induiraient cette diminution de qualité. Koidsumi

(1957) a montré que les extraits à l'éther de cuticules de certains insectes étaient fongicides. Or les grains de pollen réagissent comme certains microorganismes lorsqu'ils sont traités avec des antibiotiques (Beattie *et al.*, 1985). Le pollen exposé au tégument de fourmi présente une qualité réduite (Beattie *et al.*, 1984). Un antibiotique puissant, produit par la glande métapleurale (Beattie *et al.*, 1986) et se retrouvant sur le tégument lorsque la fourmi se nettoie ou par passage à travers la cuticule, a pour effet secondaire de tuer le pollen (Beattie *et al.*, 1985). Cet effet du tégument des fourmis sur la qualité du pollen explique qu'elles soient rarement des pollinisateurs. En revanche, Harriss et Beattie (1991) ont montré que le contact du tégument d'une abeille sans dard (*Trigona carbonaria* Smith) induisait également une diminution de la viabilité du pollen, alors qu'elle n'était pas significativement diminuée au contact du tégument d'*Apis mellifera*.

Aucune étude ne fait, à notre connaissance, référence à des composés de l'abeille qui pourraient protéger le pollen.

Les hydrocarbures et les esters sont les composés majoritaires des cires cuticulaires de l'abeille (Francis *et al.*, 1989 ; Schmitt *et al.*, 2007). Nous avons donc choisi de rechercher parmi ces composés des substances candidates qui pourraient être responsables des deux effets que nous avons mis en évidence. Pour cela, les substances présentes à la surface des abeilles qui diminuaient ou qui augmentaient la qualité du pollen ont été extraites et fractionnées. Les différentes fractions obtenues ont été mises en contact avec le pollen afin d'évaluer leur effet sur sa qualité. Les profils chimiques de ces différentes fractions ont été également comparés en fonction de l'effet des abeilles sur la qualité du pollen, pour rechercher des composés pouvant induire ces modifications. Un intérêt particulier a été porté sur l'oléate d'éthyle, substance produite en majorité par les butineuses, son effet sur la qualité du pollen a donc été testé seul.

## **II. Matériels et méthodes**

### ***1. Matériel animal***

Cette étude a été menée sur des abeilles domestiques dont l'effet sur la qualité reproductrice du pollen était déjà déterminé. Pour cela, des abeilles ayant servi à l'étude précédente et stockées à -20°C ont été utilisées. Elles ont été triées en fonction de leur effet sur le pollen. En 2008, deux catégories d'abeilles ont été déterminées, la première regroupant les abeilles induisant une viabilité du pollen au moins inférieure à 50% de celle des témoins, et la deuxième constituée des abeilles induisant une viabilité du pollen supérieure ou égale à 50% de la viabilité des témoins. En revanche, en 2009, un intervalle de confiance à 95% (IC95) a été déterminé autour de la viabilité moyenne du pollen témoin. Les abeilles ont été triées en trois catégories, (i) celles qui induisaient une viabilité du pollen comprise dans l'IC95, (ii) celles induisant une viabilité supérieure à l'IC95 et (iii) celles induisant une viabilité inférieure à l'IC95.

Pour 2008, le choix de garder les abeilles durant l'expérimentation ayant été fait tardivement, toutes les abeilles stockées ont été analysées. En revanche, en 2009, seules les abeilles ayant un effet très marqué sur la qualité reproductrice du pollen ont été sélectionnées, c'est-à-dire les abeilles induisant une augmentation d'au moins 20% de l'aptitude à germer et d'au moins 30% de la viabilité pour la catégorie >IC95 et les abeilles induisant une diminution d'au moins 25% de l'aptitude à germer et d'au moins 16% de la viabilité pour la catégorie <IC95.

## ***2.Extraction et fractionnement des composés de l'abeille***

Deux types d'extractions de molécules ont été réalisées à partir des abeilles, (i) par trempage pour extraire les composés présents à la surface du corps de l'abeille et (ii) par broyage pour extraire l'ensemble des substances présentes chez l'abeille. Pour cela, des lots de cinq abeilles classées en fonction de leur effet sur la viabilité du pollen ont été placés dans des tubes de 4 ml contenant 1900  $\mu\text{l}$  d'iso-hexane et 100  $\mu\text{l}$  de solution de standards à 10  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Cette solution est composée de deux esters, l'heptadécanoate de méthyle (C17:0) et l'arachidate de méthyle (C20:0), et d'un hydrocarbure, l'eicosane. Ces esters ont été choisis pour leur temps de rétention proche des esters recherchés et pour leur absence chez l'abeille car ils sont insaturés alors que l'ensemble des esters présents chez l'abeille sont saturés. L'extraction par trempage a été réalisée en immergeant les abeilles 1 minute dans le solvant. Le surnageant a ensuite été récupéré. Pour l'extraction par broyage, les abeilles ont été broyées dans le solvant à l'aide d'un pilon en verre pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant a ensuite été récupéré après centrifugation des broyats à 4000  $\text{tours}\cdot\text{min}^{-1}$ , à une température de 4°C et pendant 20 min.

Ces différents extraits ont ensuite été fractionnés afin de séparer les familles de molécules selon leur polarité. Cette étape permet de séparer les hydrocarbures présents en grandes quantités des esters minoritaires qu'ils pourraient masquer lors de l'analyse en chromatographie gazeuse. Pour cela, chaque extrait a été déposé sur une colonne de silice (silica gel 60, taille des particules 40-63  $\mu\text{m}$ , mesh de 230-400). Dans un premier temps, l'extrait a été élué avec de l'éther à 1,5% dans de l'iso-hexane (v/v), afin de récupérer la première fraction (F1 ; 3 ml) contenant les hydrocarbures. Dans un second temps, l'élué a été fait avec de l'éther à 6% dans de l'iso-hexane (v/v) afin de récupérer la deuxième fraction (F2 ; 3 ml) contenant les esters.

## ***3.Analyse des composés par chromatographie en phase gazeuse***

Un ml de chaque fraction a été concentré à 10  $\mu\text{l}$  par évaporation sous flux d'azote. Pour chaque analyse, 1  $\mu\text{l}$  de l'aliquot de 10 $\mu\text{L}$  a été injecté dans un chromatographe (fast chromatography GC 2014, Shimadzu, Japon) équipé d'un injecteur split/splitless et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les échantillons ont été injectés en mode split. L'hydrogène a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 0,52  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Deux colonnes différentes ont

été utilisées en fonction de la fraction analysée. L'analyse de la fraction 1 contenant des hydrocarbures a été faite sur une colonne capillaire equity-5 (15 m x 0,10 mm, 0,10 µm d'épaisseur de film) avec la méthode A (Tableau 6) alors qu'une colonne capillaire Omegawax 100 (10 m x 0,10 mm, 0,10 µm d'épaisseur de film) a été utilisée pour l'analyse de la fraction 2 contenant des esters avec la méthode B (Tableau 6). Les composés détectés dans la fraction 1 ont été notés Hn alors que ceux de la fraction 2 ont été notés En.

Méthode	Durée	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5
A	30,79 min	70°C, 0,5 min	70 à 150°C, 40°C.min <sup>-1</sup>	150 à 320°C, 7°C.min <sup>-1</sup>	320°C, 4 min	
B	13,85 min	90°C, 1 min	90 à 195°C, 40°C.min <sup>-1</sup>	195 à 201°C, 1°C.min <sup>-1</sup>	201 à 270°C, 40°C.min <sup>-1</sup>	270°C, 3min

**Tableau 6 : Les différents méthodes de chromatographie en phase gazeuse utilisées.**

La quantification des molécules d'intérêt a été calculée selon la méthode des standards internes, c'est-à-dire par calcul de l'aire du pic de chaque molécule rapportée à l'aire des standards dont la quantité est connue. Les quantités des molécules d'intérêt ont été comparées en utilisant le test de Mann –Withney réalisé avec le logiciel Statview 5.0 (SAS Institut, Cary, NC).

#### **4.Effet des composés sur la viabilité du pollen**

Les fleurs de *C. melo* utilisées pour cette étude provenaient de la culture dite « 2009 » et ont été récoltées avant chaque expérimentation. Pour chaque test, les anthères de chaque fleur ont été placées dans un tube auquel ont été rajoutés 75 µl de la solution à tester (solvants, oléate d'éthyle, extraits d'abeilles). Après évaporation complète de la solution, 1ml de solution de saccharose à 15% (p/v) et d'acide borique à 5 mg.ml<sup>-1</sup> ainsi que 2,5 µl de diacétate de fluorescéine à 2 mg.ml<sup>-1</sup> d'acétone ont été rajoutés. Après 15 minutes de réaction, 20 µl de solution contenant du pollen ont été prélevés et déposés entre lame et lamelle. Pour chaque lame, 100 grains de pollen ont été analysés sous microscope à épifluorescence. Lors de chaque test, un témoin constitué uniquement de solvant a été réalisé et dans certains cas, un témoin fleur, c'est-à-dire sans mise en contact avec du solvant a également été réalisé. L'effet des différentes solutions sur la viabilité du pollen a été déterminé en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi du test post hoc de Wilcoxon pour réaliser une comparaison deux à deux lorsque c'était nécessaire.

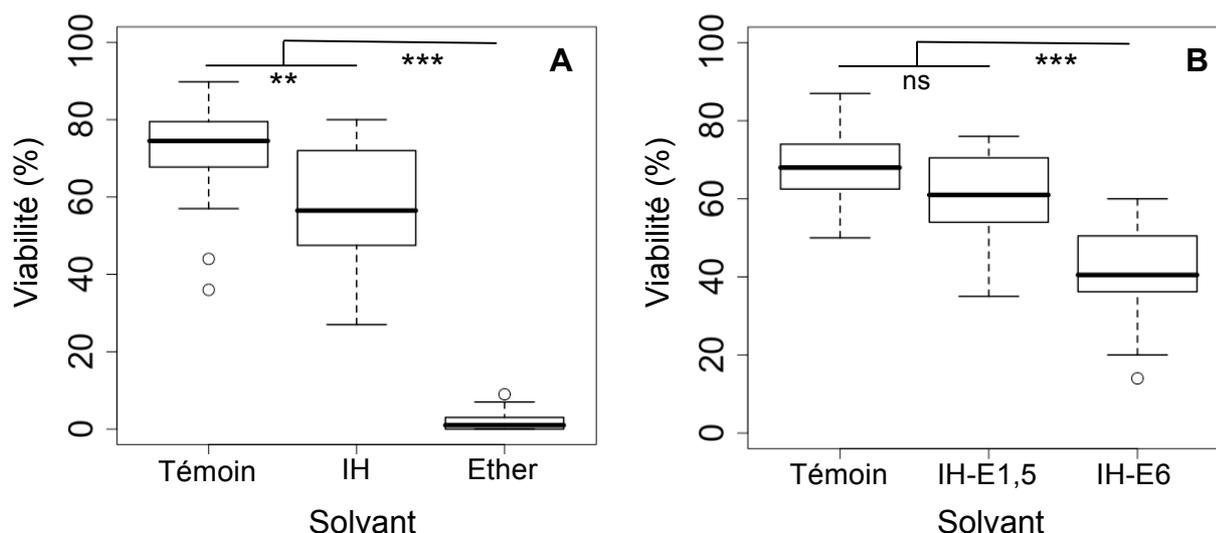
### III. Résultats

#### 1. Effet des différents solvants sur la viabilité du pollen

Nous avons estimé l'effet de différents solvants sur la viabilité du pollen afin de choisir ceux qui n'interféraient pas avec la méthode d'estimation de la viabilité et qui permettaient d'obtenir des valeurs de viabilité suffisamment élevées pour mesurer par la suite les effets des substances rajoutées dans ces solvants.

Dans un premier temps, l'effet de différents solvants d'extraction purs a été testé (Figure 51A). Nos résultats ont montré que l'iso-hexane (IH) diminuait la viabilité du pollen de près de 20% (test post-hoc,  $p=0,0043$ ), avec cependant, des valeurs moyennes suffisamment élevées pour en permettre l'utilisation. En revanche, l'éther réduisait très significativement l'estimation de la viabilité du pollen ( $p=1,8.10^{-7}$ ).

Le fractionnement se faisant avec ces deux solvants en mélange, nous avons testé l'effet de l'éther à 1,5% puis à 6% dans de l'iso-hexane pur (respectivement IH-E1,5 et IH-E6) sur la viabilité du pollen (Figure 51B). Nous avons montré que l'éther à 1,5% dans de l'iso-hexane ne modifiait pas la viabilité du pollen ( $p=0,076$ ) et pouvait donc être utilisé pour le fractionnement sans perturber les tests de viabilité. En revanche, l'éther à 6% dans de l'iso-hexane diminuait de près de 30% la viabilité du pollen ( $p=1,3.10^{-6}$ ). Cependant, malgré cet effet, la viabilité estimée était suffisamment élevée pour utiliser ce solvant.



**Figure 51 : Effet des solvants sur la viabilité du pollen de *C. melo*.** A Iso-hexane (IH) et éther purs. B Mélanges de solvants : éther à 1,5% dans de l'iso-hexane (IH-E1,5) et éther à 6% dans de l'iso-hexane (IH-E6). Trait = médiane, boîte = 25%-75%, moustaches = 1<sup>er</sup>-9<sup>e</sup> déciles, cercles = valeurs extrêmes, n=20, ns = différence non significative, \*\* = différence significative à  $p<0,01$ , \*\*\* = différence significative à  $p<0,001$ .

## 2.Effet de l'oléate d'éthyle sur la viabilité du pollen

Différentes quantités d'oléate d'éthyle ont été mises en contact avec du pollen. L'effet du contact de ce composé sur la viabilité du pollen a ensuite été testé (Figure 52). Nos résultats ont montré que quel que soit la quantité mise en contact, l'oléate d'éthyle n'avait pas d'effet significatif sur la viabilité du pollen (KW,  $H=1,961$ ,  $df=7$ ,  $p=0,96$ ).

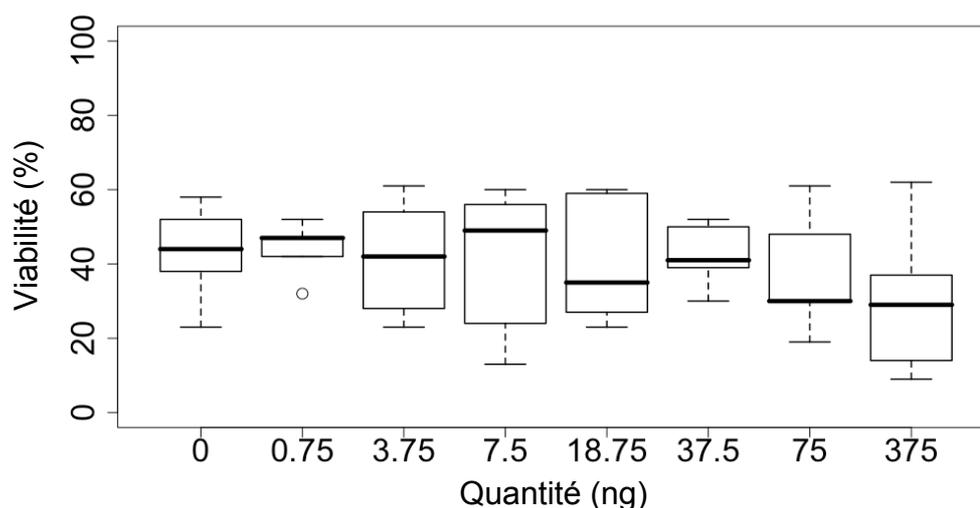


Figure 52 : Effet de l'oléate d'éthyle sur la viabilité du pollen de *C. melo*. Trait = médiane, boîte = 25%-75%, moustaches = 1<sup>er</sup>-9<sup>e</sup> déciles, cercles = valeurs extrêmes,  $n=5$ .

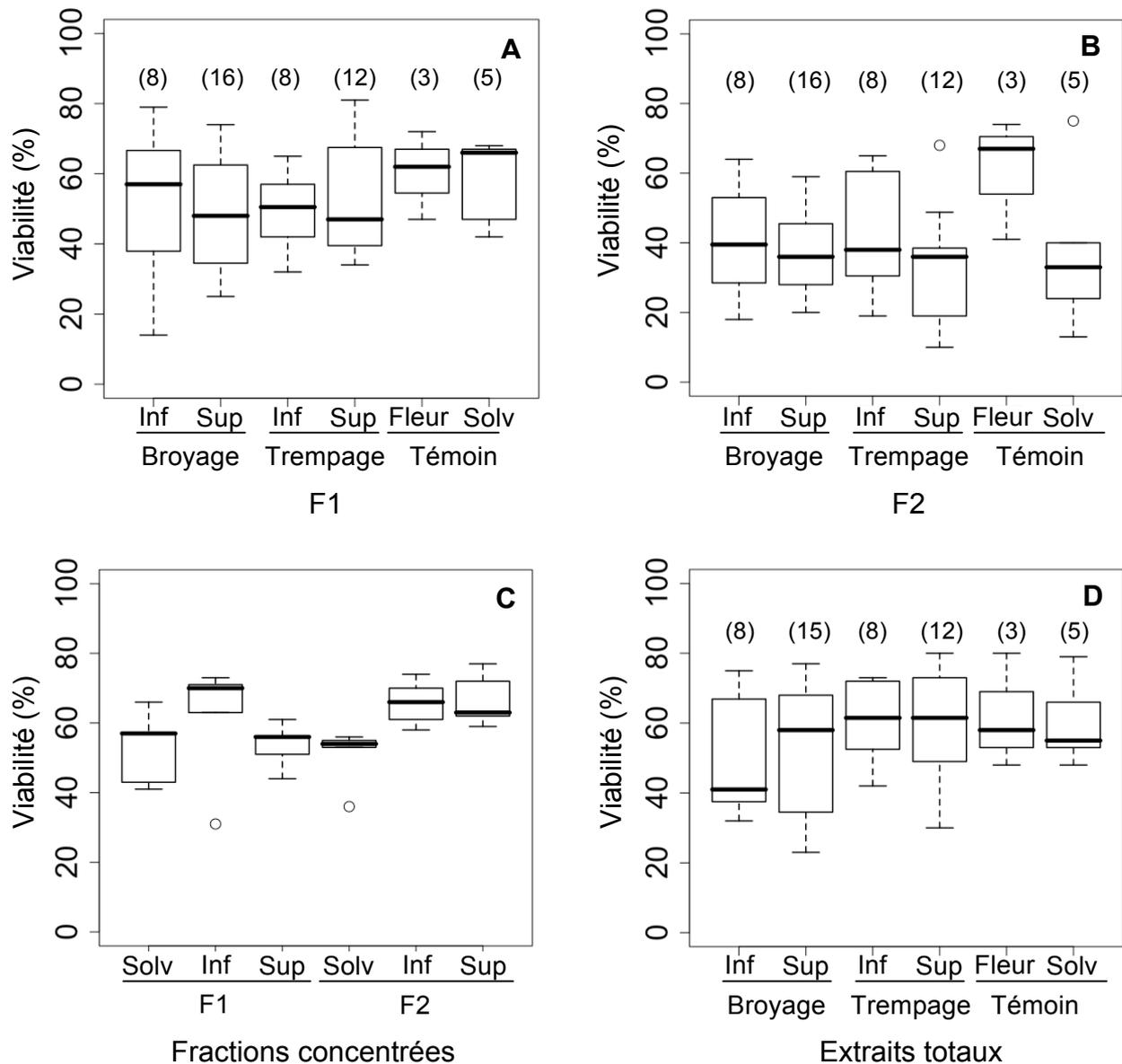
## 3.Effet des extraits d'abeilles sur la viabilité du pollen

Dans un premier temps, l'effet des différentes fractions d'hydrocarbures a été testé sur la viabilité du pollen (Figure 53A). L'absence de différence entre le témoin fleur et le témoin solvant a confirmé que la solution exempte de composés provenant de l'abeille était sans effet sur la viabilité du pollen. Aucune des fractions d'hydrocarbures testées n'a eu d'effet sur la viabilité du pollen, que ce soit les hydrocarbures totaux ou seulement les hydrocarbures cuticulaires ou qu'ils proviennent d'abeilles diminuant la viabilité du pollen ou ne l'altérant pas (KW,  $H=2,529$ ,  $df=5$ ,  $p=0,77$ ).

Le contact entre les différentes fractions d'esters et le pollen (Figure 53B) a également été sans effet sur la viabilité ( $H=5,744$ ,  $df=5$ ,  $p=0,33$ ).

Faisant l'hypothèse que ces différentes fractions ont été sans effet car les composés extraits étaient en trop faible quantité, nous avons choisi de rassembler, pour chaque type de fraction et d'effet produit par les abeilles, les extraits provenant du broyage et du trempage d'abeilles, et de les concentrer sous flux d'azote. L'effet de ces nouveaux extraits a été testé sur la

viabilité du pollen (Figure 53C). Les deux fractions d'hydrocarbures testées, provenant d'abeilles qui diminuaient la viabilité du pollen ou qui ne l'altéraient pas, n'ont pas induit de changement de la viabilité du pollen ( $H=2,970$ ,  $df=2$ ,  $p=0,23$ ). En revanche, les deux fractions d'esters testées ont entraîné une augmentation de la viabilité d'environ 10% ( $H=9,42$ ,  $df=2$ ,  $p=0,009$ ). Cependant, aucune différence significative n'a été enregistrée entre ces deux fractions, en fonction de l'effet qu'induisaient les abeilles dont elles proviennent (test post hoc,  $p=0,84$ ).



**Figure 53 : Effet des différents extraits d'abeilles sur la viabilité du pollen de *C. melo*.** Extraits obtenus par broyage ou trempage à partir d'abeilles induisant une diminution (Inf) ou une augmentation (Sup) de la viabilité du pollen comparés à des témoins sans contact avec des solutions (Fleur) et des témoins en contact avec le solvant uniquement (Solv). **A** Effet de différentes F1 (hydrocarbures). **B** Effet de différentes F2 (esters). **C** Effet des F1 et F2 poolées par effet et concentrées. **D** Effet des extraits totaux. Trait = médiane, boîte = 25%-75%, moustaches = 1<sup>er</sup>-9<sup>e</sup> déciles, cercles = valeurs extrêmes, **A**, **B** et **D** nombre d'échantillons entre parenthèse, **C** n=5.

Les fractions concentrées n'ayant pas eu d'effet sur la viabilité, nous avons testé l'effet des extraits totaux (Figure 53D), en faisant l'hypothèse qu'il existait une synergie entre des composés présents dans les différentes fractions. Cependant, aucun des extraits totaux testés n'a eu d'effet sur la viabilité du pollen (KW, H=3,299, df=5, p= 0,65).

#### **4. Recherche de composés candidats**

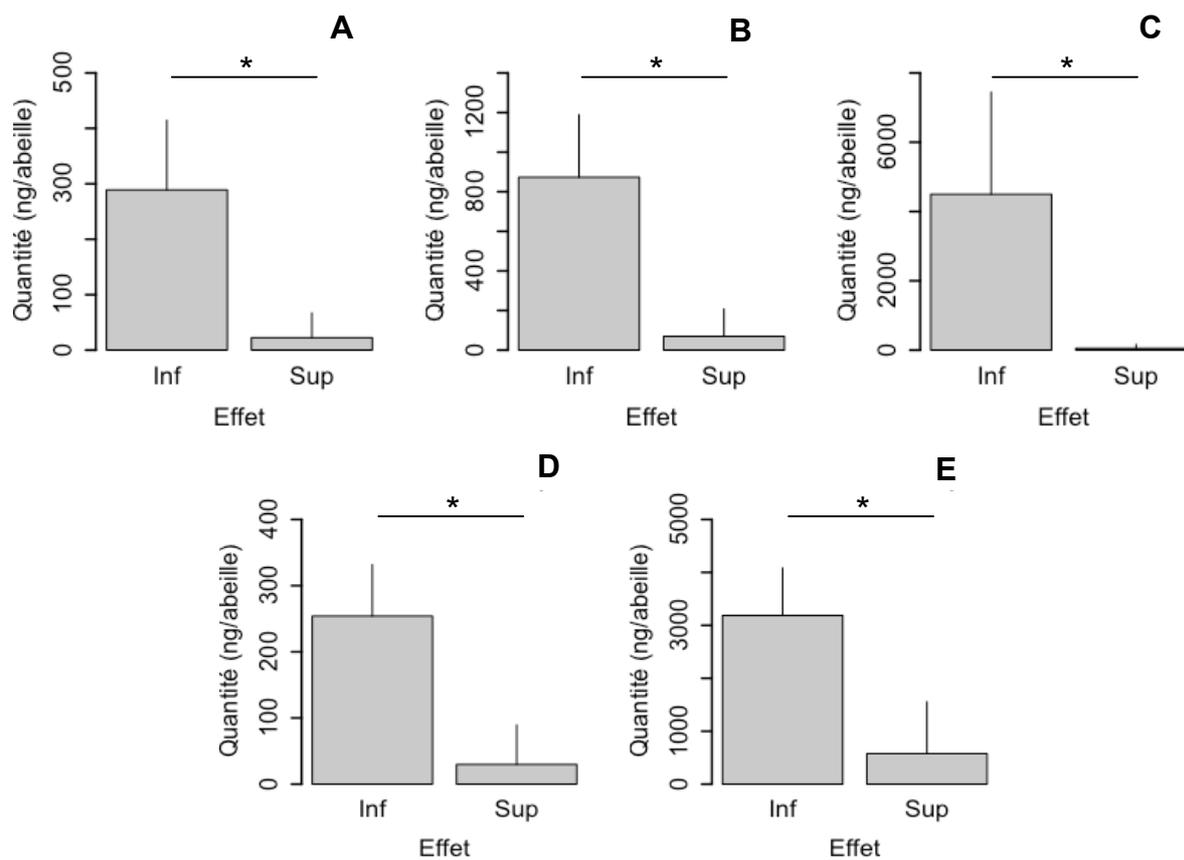
Les abeilles de 2008 présentaient des profils identiques, quel que soit l'effet qu'elles induisaient sur la viabilité du pollen. Aucune différence n'a été notée au niveau de leurs profils des fractions 1 et 2 (résultats non présentés).

Bien que les résultats de 2008 n'ont montré aucune différence en fonction de l'effet des abeilles sur le pollen, nous avons mener la même expérimentation en 2009 car les abeilles ont montré trois effets différents sur le pollen et pour tester également les abeilles utilisées pour l'évaluation de l'aptitude à germer.

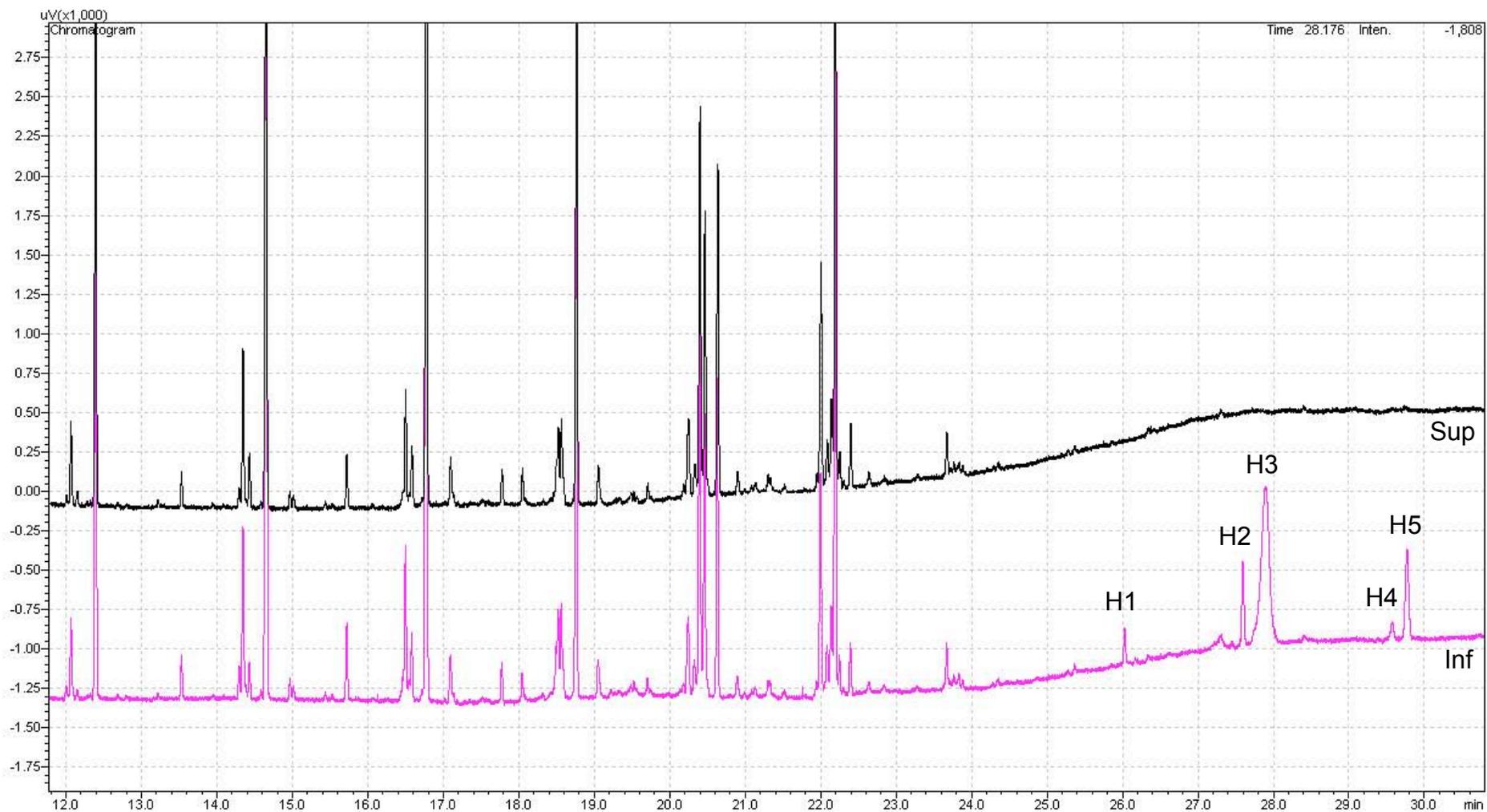
La comparaison des profils des abeilles de 2009 a montré des différences en termes de présence ou de quantité en fonction de l'effet qu'elles induisaient sur la qualité du pollen. Ces différences n'ont été observées qu'à partir d'abeilles ayant servies à l'évaluation de l'aptitude à germer.

Cinq composés candidats (fraction 1) ont été détectés chez les abeilles qui induisaient une diminution de la qualité du pollen (Figure 55). Ils ont été mis en évidence uniquement dans la fraction d'hydrocarbures totaux. Ils possèdent des temps de rétention longs, ce qui indique un nombre important de carbones (H1 : 26,047 min ; H2 : 27,581 min ; H3 : 27,875 min ; H4 : 29,564 min ; H5 : 29,776 min).

Ces composés étaient présents en quantités très différentes (254 ng par abeille en moyenne pour H4 contre près de 4500 ng par abeille en moyenne pour H3 ; Figure 54) chez les abeilles diminuant la qualité du pollen, mais toujours nettement supérieures aux quantités enregistrées chez les abeilles augmentant la qualité du pollen (Z=-2,366, p=0,018 pour H1, H2, H3 et H4 ; Z=-2,033, p=0,042 pour H5).



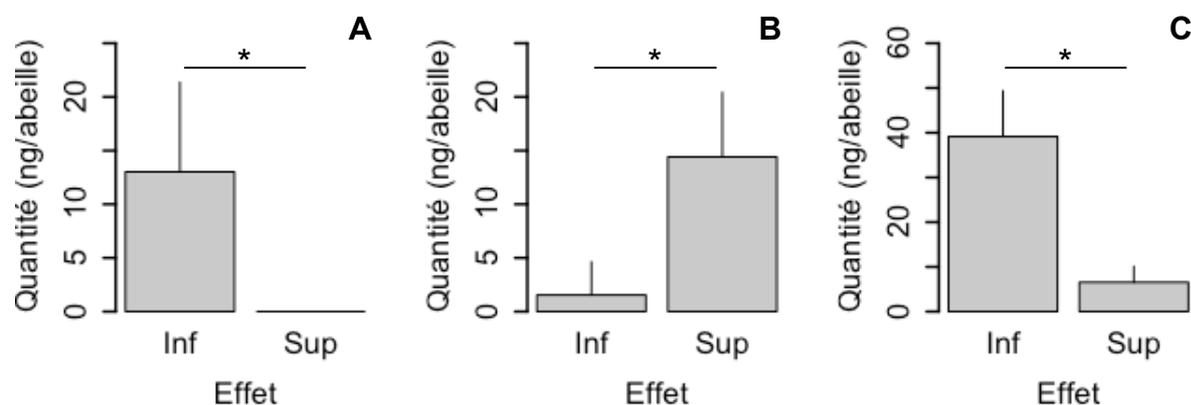
**Figure 54 : Quantité par abeille des différents composés de la fraction 1 détectés sur les abeilles diminuant ou augmentant la qualité reproductrice du pollen. A H1 détecté à 26,047 min. B H2 détecté à 27,581 min. C H3 détecté à 27,875 min. D H4 détecté à 29,564 min. E H5 détecté à 29,776 min. Les résultats montrent la quantité moyenne ainsi que l'écart-type des composés présents chez les abeilles augmentant (Sup) ou diminuant (Inf) la qualité du pollen, n=4, \* = différence significative à p<0,05.**



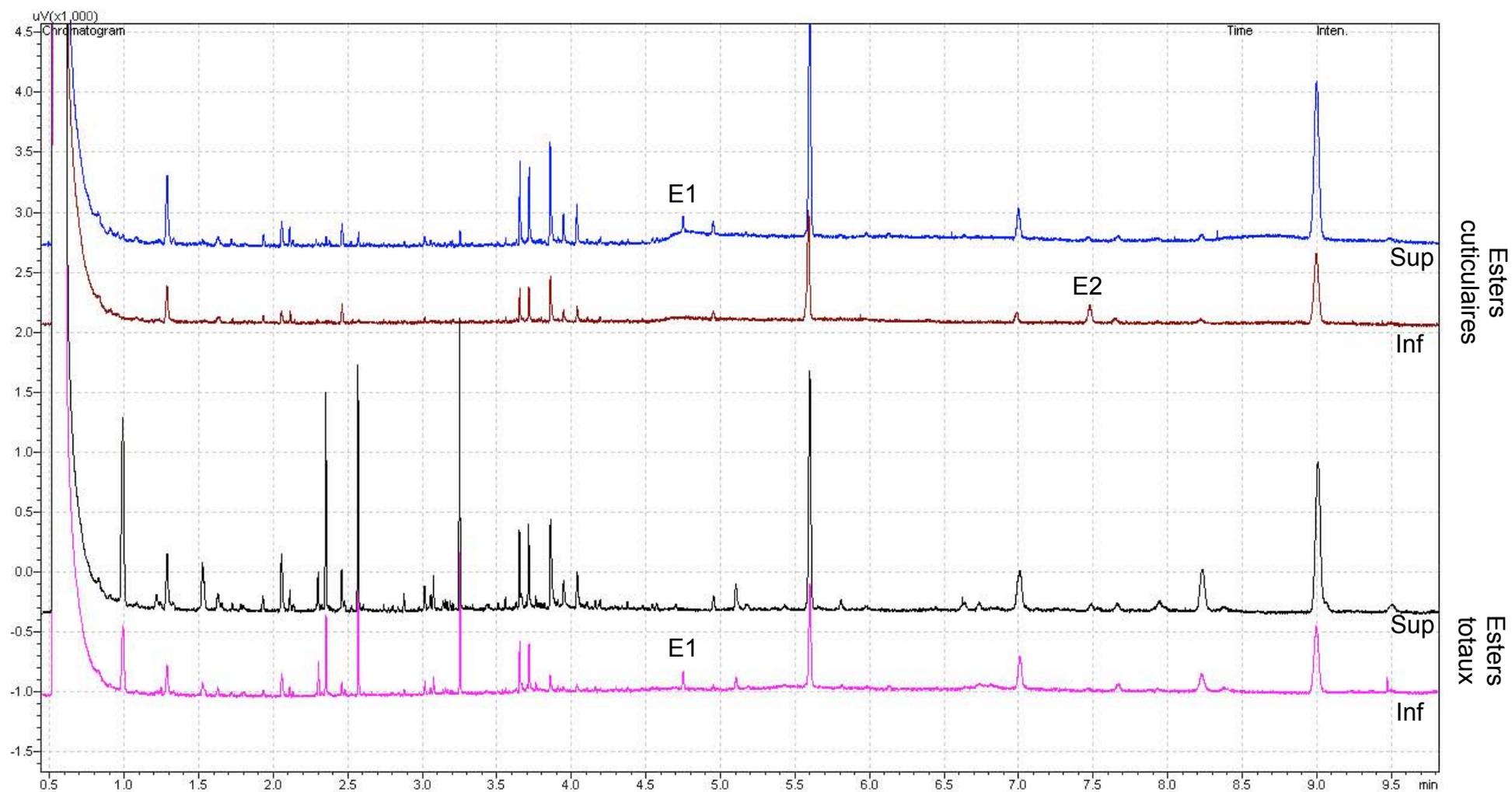
**Figure 55 : Profils de la fraction 1 obtenues par broyage des abeilles diminuant (Inf) ou augmentant (Sup) la qualité du pollen. Cinq composés ont été détectés uniquement chez les abeilles diminuant la qualité du pollen (H1 : 26,047 min ; H2 : 27,581 min ; H3 : 27,875 min ; H4 : 29,564 min ; H5 : 29,776 min).**

Nos analyses ont montré que deux composés de la fraction 2 étaient présents en quantités différentes en fonction de l'effet des abeilles sur la viabilité (Figure 57). Il s'agissait du composé détecté à 4,757 min (E1) et de celui détecté à 7,500 min (E2).

Dans la fraction 2 des composés totaux (obtenue par broyage), E1 était présent uniquement chez les abeilles diminuant la qualité (13 ng par abeille ;  $Z=-2,460$ ,  $p=0,014$  ; Figure 56A). En revanche, dans la fraction 2 des composés cuticulaires, il était présent chez les deux types d'abeilles, mais en plus grande quantité chez les abeilles augmentant la viabilité (14,4 ng par abeille contre 1,5 ng par abeille ;  $Z=-2,366$ ,  $p=0,018$  ; Figure 56B). E2 était présent uniquement dans la fraction 2 des composés cuticulaires et en plus grande quantité chez les abeilles diminuant la viabilité (39,2 ng par abeille contre 6,5 ng par abeille ;  $Z=-2,039$ ,  $p=0,021$  ; Figure 56C).



**Figure 56 : Quantité par abeille des différents composés de la fraction 2 détectés sur les abeilles diminuant ou augmentant la viabilité du pollen. A** E1 détecté à 4,757 min dans la fraction d'esters totaux. **B** E1 dans la fraction d'esters cuticulaires. **C** E2 détecté à 7,5 min dans la fraction d'esters cuticulaires. Les résultats montrent la quantité moyenne ainsi que l'écart-type des composés présents chez les abeilles augmentant (Sup) ou diminuant (Inf) la qualité du pollen,  $n=4$ , \* = différence significative à  $p<0,05$ .



**Figure 57 : Profils des composés totaux et cuticulaires de la fraction 2 présents chez les abeilles diminuant (Inf) ou augmentant (Sup) la qualité du pollen. Deux composés ont été détectés en quantités différentes en fonction de l'effet des abeilles sur la viabilité (E1 : 4,757 min ; E2 : 7,500 min).**

## IV. Discussion

Il est connu que des substances de l'abeille domestique altèrent la qualité reproductrice du pollen, notamment les acides gras contenus dans les fluides oraux. Chez d'autres insectes et des abeilles du genre *Trigona*, des substances présentes sur la cuticule induisent une diminution de la viabilité du pollen. Nos recherches ont donc porté sur une substance produite exclusivement par les butineuses, l'oléate d'éthyle et sur les composés majoritaires des cires cuticulaires, les hydrocarbures et les esters.

L'oléate d'éthyle est un ester éthylique produit par les butineuses et qui agit comme inhibiteur chimique en retardant la maturation comportementale des nourrices (Leoncini *et al.*, 2004a et b). Ce composé est présent majoritairement dans le jabot des butineuses. Il peut donc faire partie des fluides oraux qui sont régurgités pour manipuler le pollen. Il est retrouvé en faible quantité sur la cuticule des butineuses (Leoncini *et al.*, 2004b) et même dans les pelotes (Maisonasse, communication personnelle). C'est donc un composé qui, lors du butinage, se retrouve au contact du pollen. Nos résultats ont montré que l'oléate d'éthyle en quantités rencontrées chez les abeilles butineuses (Maisonasse, communication personnelle) ne modifiait pas la qualité reproductrice du pollen. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de Lukoschus et Keularts (1968) car l'oléate d'éthyle est un ester d'acide gras, et ces auteurs précisait qu'une fois estérifiés, les acides gras perdaient leur pouvoir inhibiteur de la germination du pollen.

L'ensemble des hydrocarbures cuticulaires ou totaux ainsi que l'ensemble des esters cuticulaires ou totaux extraits à partir des abeilles de 2008 diminuant la viabilité du pollen n'ont pas eu d'effet sur la viabilité du pollen, même après avoir été rassemblés par type de composés et concentrés. Les hydrocarbures et les esters en synergie n'ont pas eu d'effet sur la viabilité du pollen. Ces résultats s'expliquent par l'absence de différence des profils d'hydrocarbures et d'esters en fonction de l'effet induit par les abeilles.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des substances extraites des abeilles de 2009 (augmentant ou diminuant la viabilité du pollen) n'a pas révélé de différence de profils, ce qui confirme les résultats précédents. Les abeilles qui modifient la viabilité du pollen soit en l'augmentant, soit en la diminuant, ne présentent pas de différences de leur composition en composés biochimiques. Il est possible que les substances qui modifient la viabilité du pollen n'aient pas été extraites avec les solvants utilisés, soit parce qu'elles possèdent des niveaux de polarité différents, soit parce qu'elles n'appartiennent pas à ces familles de substances.

En revanche, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des abeilles de 2009 modifiant l'aptitude à germer du pollen a montré des différences de profils en fonction du type d'effet induit par les abeilles. Cinq composés de la fraction contenant principalement des hydrocarbures ont été détectés en très grande quantité chez les abeilles diminuant la qualité du pollen alors qu'ils étaient minoritaires voire absents chez les abeilles augmentant la qualité du pollen. Ces composés ont été détectés dans la fraction cuticulaire. Donc, soit ils sont localisés à l'intérieur des abeilles, soit le broyage permet de les extraire en grande quantité comparé au trempage. En effet, ces composés sont non polaires et pourraient donc être liés aux membranes. Le broyage qui cause une déstructuration cellulaire permettrait un rendement d'extraction plus important que le trempage en libérant ces composés. Notre résultat met en évidence une corrélation entre la présence de ces composés et l'effet des abeilles sur la qualité du pollen, mais ne permet en aucun cas de définir s'il existe une relation de causalité entre ces composés et la diminution de qualité du pollen. Pour cela, il serait nécessaire (i) de mettre en contact la fraction contenant ces composés avec du pollen pour en estimer l'effet sur la qualité, (ii) de vérifier s'il s'agit d'hydrocarbures et de les identifier par spectrométrie de masse, (iii) de les isoler et (iv) de les tester individuellement. Il est possible que des hydrocarbures modifient la qualité du pollen. Il a, en effet, été montré qu'il existait chez l'abeille des hydrocarbures possédant une activité antibiotique, c'est le cas du 2-heptanone et du 4-méthyl-3-heptanone (Cole and Blum, 1975). Or, les antibiotiques peuvent altérer le pollen (Harriss and Beattie, 1991).

La présence de certains composés présents dans la fraction contenant entre autres des esters semble être corrélée avec l'effet sur la qualité du pollen induit par les abeilles. Ainsi, la présence d'un composé cuticulaire a été mise en évidence chez les abeilles qui diminuaient la qualité du pollen. Il est nécessaire de vérifier que ce composé ait un effet sur le pollen en l'identifiant, en l'isolant et en le mettant en contact avec du pollen. Si cet effet est confirmé, on pourrait alors penser que cette molécule agit par contact direct sur la qualité du pollen. En effet, les esters, de nature lipidique, pourraient passer à travers le pollenkitt qui protège le pollen. La présence d'un autre composé a été corrélée avec l'effet des abeilles sur le pollen. Ce composé est présent à l'intérieur du corps chez les abeilles diminuant la qualité du pollen alors qu'il se retrouve sur la cuticule chez les abeilles qui l'augmentent. Il se peut que lorsque cette molécule est excrétée de l'intérieur vers la cuticule des abeilles, elle joue un rôle protecteur vis-à-vis du pollen.

L'effet des substances extraites a été testé uniquement sur la viabilité du pollen, il serait, cependant, intéressant de tester également leur effet sur l'aptitude à germer du pollen pour déterminer si d'autres mécanismes ont lieu. De plus, en nous basant sur les résultats de Verhoef et Hoekstra (1986) qui montraient que le 10-HDA est pratiquement absent sur le corps de l'abeille, nous n'avons pas vérifié sa présence ou son absence dans nos échantillons. Or, les travaux de Verhoef et Hoekstra (1986) sont relativement anciens, les limites de détection de l'époque étaient peut-être plus élevées que maintenant. Il faudrait donc vérifier sa présence sur le corps de l'abeille et tester son effet sur le pollen en différentes quantités comme nous l'avons fait pour l'oléate d'éthyle.