

OPTIMISATION D'UNE MÉTHODE DE DÉNOMBREMENT DE GRAINS DE POLLEN ADAPTÉE A L'ÉTUDE DE L'ALIMENTATION DE L'ABEILLE DOMESTIQUE

Optimización de un método de recuento de los granos de polen adaptado a la alimentación de la abeja doméstica

Optimization of a method of pollen grains counting adapted to the study of the food supply for the honeybee

TAMIC, T.; AUPINEL, P.; ODOUX, J. F.; LOUBLIER, Y. & CHABIRAND, M.

INRA, UE 1255 Unité Expérimentale Entomologie. Le Magneraud. F-17700 Surgères, France

Recibido: 2011/10/20; Aceptado: 2012/02/13

INTRODUCTION

Les problèmes actuellement rencontrés par les abeilles sont révélateurs de dysfonctionnements environnementaux et donnent lieu à un nombre croissant de recherches. Dans ce contexte, la palynologie est un outil des plus performants pour appréhender avec précision le spectre d'approvisionnement des insectes dans leur zone de butinage. Dans le cadre d'études de l'impact des pratiques agricoles sur les abeilles, nos recherches portent sur l'alimentation de l'Abeille domestique (*Apis mellifera*

L.). Nous nous intéressons aux espèces « clé » qui fournissent des ressources polliniques en installant des colonies sur des sites d'observation. Sur celles-ci, nous procédons à des prélèvements de pelotes de pollen au moyen de trappes situées à l'entrée de la ruche au cours d'une saison apicole.

En lien avec nos besoins de recherche, le nombre annuel de nos échantillons de pelotes a doublé, passant de 100 à 200, et à raison de 2 lames par échantillon, le nombre d'analyses annuel s'est élevé à 400 en 2011. Notre méthode de comptage étant basée sur un minimum

de 1000 grains de pollens comptés, nous avons été rapidement confrontés à un problème de temps face au nombre d'analyses à effectuer. En s'appuyant sur les références bibliographiques (VERGERON, *Ann. Abeille*, 7 (4): 349-364. 1964; LOUVEAUX *et al.*, *BeeWorld*, 59: 139-157. 1978), nous avons cherché à réduire le nombre de grains comptés, l'objectif étant la diminution du temps d'analyse sachant que nous nous intéressons aux espèces majoritairement butinées par les abeilles (fréquence > 5%). Pour cela, nous avons comparé des numérations sur transects entiers avec des méthodes de comptage alternatives par sous-échantillonnage.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Nous avons travaillé à partir de 10 échantillons de pelotes de pollens récoltés sur des sites d'observation situés dans la plaine de Niort (Deux-Sèvres, France).

Pour chaque échantillon, une goutte issue d'une suspension homogène de pollens (4 g de pollens secs dans 100

ml de sérum physiologique) est séchée, dégraissée et montée sur lame dans de la glycérine gélatinée sous lamelle (18x18 mm). Ensuite, l'identification et le comptage s'effectuent sur écran à partir d'un microscope (grossissement x400) couplé à un logiciel d'imagerie.

Pour chaque lame, le dénombrement a été effectué au long d'un transect centré sur la préparation dont le point de départ a été précisément localisé pour les comptages ultérieurs (selon les axes X et Y de la platine du microscope [Figure 1], complété par photographie).

Pour mener cette étude, plusieurs questions se sont imposées. En premier lieu, est-il possible de déterminer un mode de lecture alternatif en adéquation avec nos objectifs? Sur un transect centré sur la préparation, un « échantillonnage systématique » (non aléatoire), est-il envisageable? Ceci nécessite par ailleurs une vérification préalable: Quel est le niveau d'homogénéité de la distribution spatiale des pollens par espèces dans les préparations? Et doit-on échantillonner sur toute la largeur de celles-ci? L'étude a donc nécessité deux phases pour vérifier (i) le niveau d'homogénéité des échantillons, puis (ii) l'éventualité d'un mode de lecture alternatif.

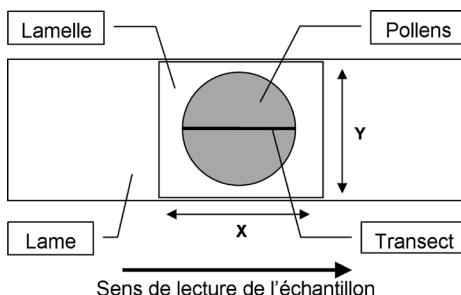


FIGURE 1. Schéma d'une lame.

Phase 1: Quel est le niveau d'homogénéité des lames? Ce travail a été effectué sur 10 échantillons avec répliquât. Pour chaque lame, nous avons d'abord procédé à un comptage exhaustif de chaque espèce présente sur un transect complet, ensuite fractionné en quatre quarts et dénombrés de la même manière.

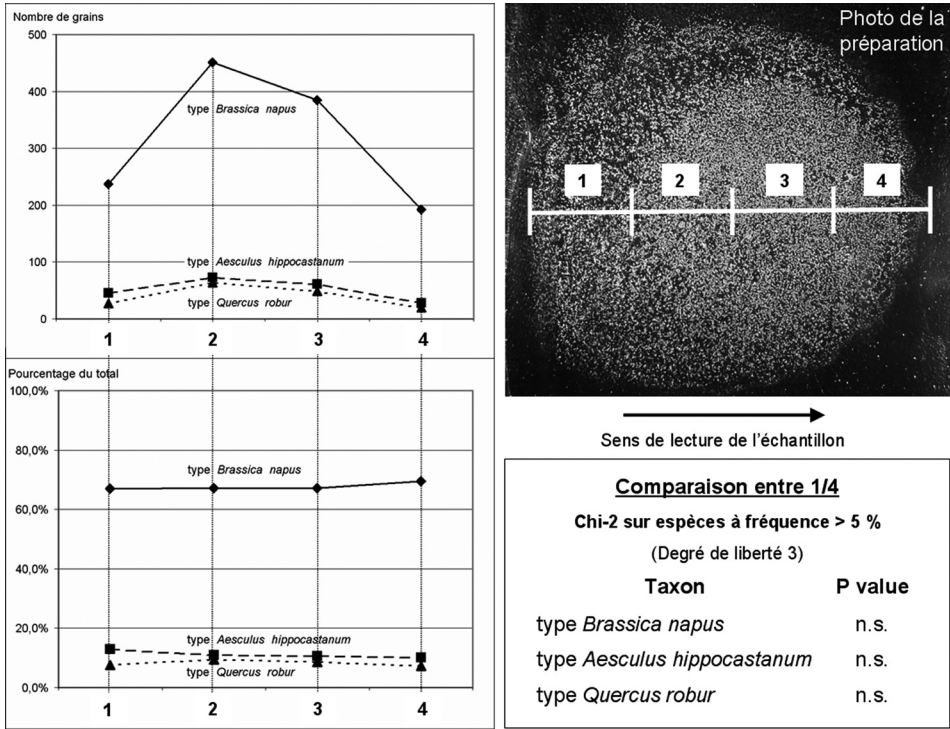


FIGURE 2. Distribution des pollens dominants dans une préparation homogène (détails dans le texte).

Des tests du Chi-2 ont été réalisés sur les espèces dominantes (fréquence > 5%). Le premier test a consisté à comparer les quarts entre eux, puis le second le centre et la bordure de la préparation. Avant de présenter les résultats de la phase 1, voici deux exemples illustrant bien ce que l'on peut observer. La figure 2 représente la préparation avec son transect divisé en quarts (Figure 2, photo en haut à droite). Si on compare le nombre de grains comptés (Figure 2, graphique du haut) à son

expression en pourcentage du total (Figure 2, graphique du bas), on constate qu'il y a un plus grand nombre de grains dans la partie centrale mais que les concentrations restent homogènes sur l'ensemble de la préparation. Les résultats du test Chi-2 le confirment puisqu'il n'y a aucune différence significative pour chaque taxon.

Le second exemple (Figure 3) permet de montrer que cette homogénéité ne se retrouve pas sur l'ensemble des préparations. Ici le Colza (*Brassica*

napus) est inégalement réparti (Figure 3, graphique du haut) et a engendré une augmentation des pourcentages chez le Trèfle violet (*Trifolium pratense*) dans la deuxième partie du transect (Figure 3, graphique du bas). Les statistiques révèlent une différence significative de concentration des pollens entre quarts pour le Trèfle violet et proche de l'être pour le Colza.

L'ensemble des tests Chi-2 a produit les résultats suivants. La comparaison entre quarts a permis de mettre en

évidence des différences significatives pour quatre préparations, soit 20% de cas hétérogènes. La comparaison entre bordure et centre a fait apparaître 35% de préparations hétérogènes. En conclusion, ces résultats montrent qu'il est impératif d'échantillonner sur toute la largeur de la préparation.

Phase 2: Peut-on déterminer un mode de lecture alternatif? Un dénombrement avec occultation de champs microscopiques numériques est-il envisageable ?

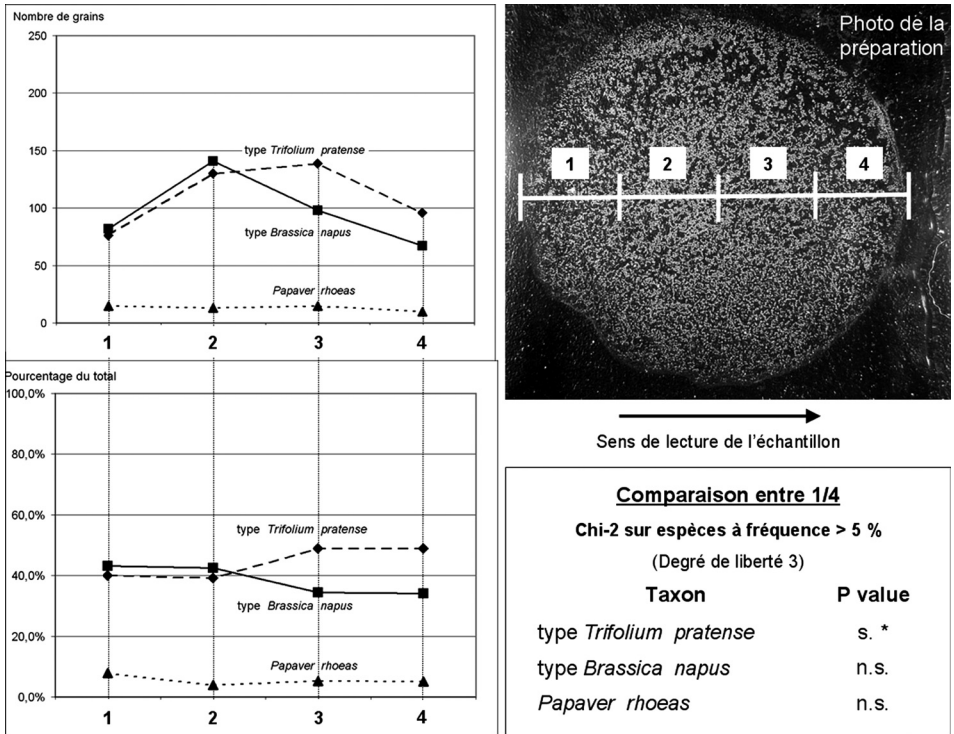


FIGURE 3. Distribution des pollens dominants dans une préparation hétérogène (détails dans le texte).

Cette étude a été réalisée sur les 6 premiers échantillons avec répliquât étudiés dans la phase 1 en conservant exactement le même transect mais cette fois en ne dénombrant qu'un champ microscopique numérique sur trois (Figure 4), puis un sur quatre et enfin un sur cinq. Un transect complet comprend 50 à 60 champs numériques.

Les résultats des tests Chi-2 sur les espèces majoritaires (fréquence > 5%) comparant les comptages alternatifs au transect entier n'ont montré aucune différence significative en mode 1 champ sur 3. Par contre, il est apparu une différence significative en mode 1 sur 4, et quatre en mode 1 sur 5 dans trois préparations.

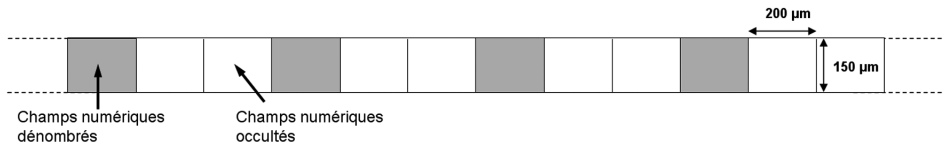


FIGURE 4. Schéma d'un transect avec occultation de deux champs numériques sur trois.

CONCLUSION

La phase 1 a montré que dans 20% des cas, il peut y avoir une hétérogénéité partielle des préparations. L'homogénéité des préparations peut dépendre de la suspension initiale de pollens ainsi que du montage sur lame, notamment la pose de la lamelle sur la préparation qui est une phase critique (maîtrise du geste). On peut parler alors d'effet opérateur. Il est donc impératif de travailler sur l'ensemble d'un transect.

Dans la phase 2, la comparaison des modes alternatifs au transect intégral a vérifié une linéarité des résultats de

dénombrement. Le mode de lecture « un champ sur trois » a donné les résultats les plus satisfaisants.

Ce travail nous permet de reconsidérer une méthode de travail plus adaptée à nos besoins que celles dont nous disposions dans la bibliographie. Le mode un champ sur trois apparaît suffisamment fiable et nous avons pris la décision de modifier notre technique de comptage dont le but est d'estimer les espèces prédominantes butinées par les abeilles pour leur alimentation pollinique. Cette nouvelle méthode nous a ainsi permis de réduire d'au moins 50% le temps consacré au dénombrement.