



**HAL**  
open science

# Interactions plante - pollinisateur : caractérisation de la qualité du pollen de deux cucurbitacées durant son ontogenèse, sa présentation et son transport sur le corps de l'abeille domestique

Chloé Dibos

## ► To cite this version:

Chloé Dibos. Interactions plante - pollinisateur : caractérisation de la qualité du pollen de deux cucurbitacées durant son ontogenèse, sa présentation et son transport sur le corps de l'abeille domestique. Biologie végétale. Université d'Avignon, 2010. Français. NNT : 2010AVIG0636 . tel-00587581

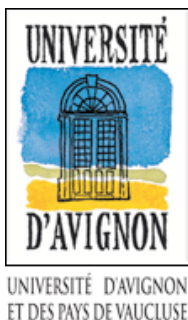
**HAL Id: tel-00587581**

**<https://theses.hal.science/tel-00587581>**

Submitted on 20 Apr 2011

**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.



**UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE**

**ÉCOLE DOCTORALE 477 SIBAGHE**

**“SYSTEMES INTEGRES EN BIOLOGIE, AGRONOMIE, GEOSCIENCES, HYDROSCIENCES,  
ENVIRONNEMENT” SPECIALITE “SCIENCE AGRONOMIQUE”**

**THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR**

**INTERACTIONS PLANTE - POLLINISATEUR**  
CARACTERISATION DE LA QUALITE DU POLLEN DE DEUX  
CUCURBITACEES DURANT SON ONTOGENESE, SA PRESENTATION ET  
SON TRANSPORT SUR LE CORPS DE L'ABEILLE DOMESTIQUE

*PRESENTE PAR*  
**CHLOE DIBOS**

*THESE DIRIGEE PAR*  
**MOHAMED EL MAATAOUI ET SEVERINE SUCHAIL**

**SOUTENANCE : 14 DECEMBRE 2010**  
**DEVANT LE JURY COMPOSE DE**

<b>ISABELLE DAJOZ</b>	Professeur, ENS Paris	RAPPORTEUR
<b>ADNANE HITMI</b>	Maître de Conférence HDR, Université d'Auvergne	RAPPORTEUR
<b>YVES LOUBLIER</b>	Ingénieur de Recherche, CNRS Gif/Yvette	EXAMINATEUR
<b>YVES LE CONTE</b>	Directeur de Recherche, INRA PACA	EXAMINATEUR
<b>MOHAMED EL-MAATAOUI</b>	Professeur, Université d'Avignon	DIRECTEUR
<b>SEVERINE SUCHAIL</b>	Maître de Conférence, Université d'Avignon	CO-ENCADRANTE



**Laboratoire de Pollinisation et Ecologie des Abeilles**  
**UMR A 406 Abeilles et Environnement**

Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse  
74, rue Louis Pasteur  
84029 Avignon Cedex 1

INRA PACA – Domaine Saint-Paul  
Site Agroparc  
84 914 Avignon Cedex 9

## RESUME

Chez de nombreuses Angiospermes, la pollinisation croisée est nécessaire pour le succès de la reproduction. La plupart de ces plantes ont évolué afin de favoriser la pollinisation entomophile, principalement assurée par les abeilles. C'est le cas des Cucurbitacées, dont le melon (*Cucumis melo* L.), importante culture du sud de la France et le concombre d'âne (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) plante spontanée endémique du bassin méditerranéen, les deux modèles de cette étude. Afin de mieux comprendre les relations plante-pollinisateur, nous avons choisi de caractériser le couple pollen de Cucurbitacées/abeille domestique (*Apis mellifera* L.) à travers la production de pollen, sa présentation sur la fleur et son transport sur l'abeille. Nous avons montré que, chez ces plantes, l'ontogenèse du pollen s'accompagne d'erreurs développementales conduisant à la formation de près de 3% de grains de pollen vides. De plus, nous avons mis en évidence que chez *E. elaterium*, des erreurs méiotiques entraînaient la formation de grains de pollen génétiquement anormaux qui pourraient être source d'autopolyploïdie. Chez *C. melo*, nos résultats ont révélé que la mise en contact du pollen avec le milieu environnant entraîne une baisse de 30% de sa viabilité, mais que celle-ci reste stable jusqu'à la fin de l'anthèse. L'aptitude à germer, quant à elle, finit d'être acquise juste avant anthèse et décroît de 12% en fin de période d'anthèse. Nous avons montré que le pollen de *C. melo* transporté sur le corps de l'abeille pouvait soit avoir une viabilité et une aptitude à germer préservée, probablement par protection contre la déshydratation, soit perdre quasi-totalement sa viabilité et son aptitude à germer. Enfin, nous avons détecté des composés biochimiques spécifiques des abeilles protégeant ou diminuant la qualité reproductrice du pollen.

**Mots clé :** *Cucumis melo* L., *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich., pollen, *Apis mellifera* L., viabilité, aptitude à germer, cytologie, composés biochimiques de l'abeille.

## SUMMARY

**PLANT – POLLINATOR INTERACTIONS: CHARACTERISATION OF POLLEN QUALITY DURING ITS ONTOGENESIS, ITS PRESENTATION AND ITS TRANSPORT ON HONEY BEE BODY IN TWO CUCURBITACEAE.**

For many flowering plant species cross pollination is necessary to ensure reproductive success. Most of these plants have evolved to encourage insect pollination which is mainly carried out by bees. Such is the case of plants in the Cucurbitaceae family, including the cantaloupe (*Cucumis melo* L.), an important crop of the South of France, and squirting cucumber (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.), a wild plant restricted to the Mediterranean Basin, the two vegetal models used in this study. To better understand plant-pollinator relations, we proposed to characterise the interaction between Cucurbitaceae pollen and the honeybee (*Apis mellifera* L.) through pollen production, its presentation and its transport on the honeybee body. Our results showed that developmental anomalies took place during pollen ontogenesis in these species leading to 3% of the pollen grains produced to be empty. Moreover, we demonstrated that meiotic abnormalities in *E. elaterium* leading to the production of genetically abnormal pollen grains could be a source of autopolyploidy. At anthesis in *C. melo*, our results showed that pollen viability decreased to 30% when pollen was exposed to environmental conditions, then remained stable during the period of anthesis. The ability for pollen to germinate was completed just before anthesis then decreased to 12% at the end of anthesis. We determined that viability and germinability of cantaloupe pollen carried on the honey bee body can be enhanced or decreased according to which specific honey bee biochemical compounds were detected.

**Keywords:** *Cucumis melo* L., *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich., pollen, *Apis mellifera* L., viability, germinability, cytology, honey bee biochemical compounds.



## REMERCIEMENTS

Je souhaite, tout d'abord, remercier Mohamed El Maâtaoui et Séverine Suchail qui m'ont offert l'opportunité de réaliser cette thèse et qui m'ont accompagné durant ces quatre années. Merci Mohamed pour cette initiation au monde de la microscopie et pour les thés à la menthe réconfortants pendant les manips. Merci Séverine pour tes nombreuses relectures et toute l'écoute dont tu as su faire preuve. Je remercie également toutes les personnes de l'UMR Abeilles et Environnement, avec en premier lieu l'équipe Pollinisation et Ecologie des Abeilles pour tous les échanges que nous avons eus, le plus souvent autour d'une tasse de café. Je remercie donc Bernard Vaissière de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir mis à disposition les techniques et le matériel du laboratoire, Nicolas et Marie-Josée pour votre grand soutien moral, Laurent pour nos discussions littéraires et pour le café toujours prêt en arrivant, Mickaël pour ta disponibilité et ton immense aide en statistiques et enfin Monsieur Guy pour toutes nos discussions scientifiques, culturelles et autres, pour la porte toujours ouverte de ton bureau et ton tableau noir... Un grand merci à Corinne pour ton aide incontournable pour les tâches administratives et tes délicieuses brioches au sucre et à Marianne pour ton soutien depuis toutes ces années et nos moments tricotesques. Merci également à Yves et à Alban pour cette fructueuse collaboration biochimique, à Jean et à Jean-Paul qui m'ont fourni en abeilles durant toutes mes expérimentations, à Colette pour son aide bibliographique et sa patience face à mes nombreux appels et à Cynthia pour la relecture et la correction de mon anglais et à Claude et Mercédès pour vos mots gentils.

J'adresse également mes remerciements à l'Unité Expérimentale d'Avignon, dirigée par Estelle Esbérard, qui m'a grandement aidée dans la mise en place et l'entretien de mes cultures expérimentales, et à Isabelle Bornard du Laboratoire de Microscopie pour la préparation et l'observation des échantillons en microscopie électronique à balayage.

Durant cette thèse, j'ai eu la possibilité d'être monitrice puis ATER à l'Université d'Avignon. Je tiens donc à remercier, pour leurs échanges et leur aide, l'ensemble des enseignants du département de Biologie ainsi que Lise Menet, Franck Lacroix et Jean-Patrick, et notamment Jawad Aarouf qui m'a initiée à l'enseignement. J'adresse une pensée particulière à Laure Valat et Fabien Monnet pour leur disponibilité et leur écoute.

Bien sûr, que serait une thèse sans d'autres thésards et stagiaires avec qui partager cette expérience. Merci à Gabriel pour nos soirées pizza/film (j'attends toujours la Rocky Horror



Picture Show night) et la découverte de Fruit Basket, à Nicola pour ta gentillesse et ton accueil, à Claudia et à Aklesso pour votre bonne humeur, à Tassadit dont le courage me permet toujours de relativiser, à tous les moniteurs, Aurélie, Fanny et Séb pour nos réunions apéritives et Capucine pour toutes ces discussions durant les TP et aux stagiaires Ingrid, Laura, Sophie, Marie et Céline qui savent alléger l'atmosphère du bureau quand c'est nécessaire.

Un grand merci à Caroline, ma super co-équipière et ses carolinades et bien sûr à Rémy, mon partenaire de bureau, de galères et plus encore... C'est grâce à vous, votre aide et votre écoute au quotidien que j'ai pu terminer cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier mes parents, qui m'ont soutenu et remotivé tout au long de ce périple, ma grand-mère qui m'a offert un soutien logistique, Guillaume et Jennifer qui ont apporté un peu d'exotisme à ces quatre années et Margaux, ma little pupuce, qui n'en peut plus de m'entendre parler de la thèse mais qui m'écoute quand même.

*A ma famille,  
A Rémy*

# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>5</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>7</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>14</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>16</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>19</b>
<b>CHAPITRE 1 – INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>25</b>
<b>I. Reproduction des Angiospermes</b> .....	<b>27</b>
1. <i>Structure des fleurs</i> .....	27
2. <i>Production du gamétophyte mâle : le pollen</i> .....	28
2.1. Formation des microspores.....	29
2.2. Synthèse de l'exine .....	30
2.3. Mitose de la microspore.....	30
2.4. Maturation du pollen.....	31
2.5. Présentation du pollen.....	31
3. <i>Production du gamétophyte femelle : le sac embryonnaire</i> .....	32
4. <i>Pollinisation</i> .....	33
5. <i>Fécondation et nouaison</i> .....	33
6. <i>Reproduction chez nos modèles d'étude</i> .....	35
6.1. <i>Cucumis melo var. cantalupensis</i> .....	36
6.2. <i>Ecballium elaterium</i> .....	39
<b>II. Pollinisation entomophile</b> .....	<b>42</b>
1. <i>Interaction mutualiste</i> .....	42
2. <i>Adaptation des plantes pour la pollinisation entomophile</i> .....	43
2.1. Caractéristiques des plantes à pollinisation biotique .....	43
2.2. Récompenses .....	44
3. <i>Insectes pollinisateurs</i> .....	45
4. <i>Pollinisation chez nos modèles d'étude</i> .....	46
4.1. <i>Cucumis melo var. cantalupensis</i> .....	46
4.2. <i>Ecballium elaterium</i> .....	47
5. <i>Facteurs influençant la pollinisation entomophile</i> .....	48

<b>III. Abeille domestique .....</b>	<b>50</b>
1. Anatomie de l'abeille .....	51
1.1. Morphologie externe .....	51
1.2. Systèmes internes .....	53
2. Composés de l'abeille .....	56
3. Développement et nutrition de l'abeille.....	59
3.1. Développement .....	59
3.2. Nutrition .....	60
4. Activités des ouvrières .....	61
4.1. Polyéthisme .....	61
4.2. Butinage .....	61
<b>CHAPITRE 2 – ONTOGENESE ET CONFORMITE DU POLLEN CHEZ <i>ECBALLIUM ELATERIUM</i> ET <i>CUCUMIS MELO</i></b>	<b>63</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>65</b>
<b>II. Ontogenèse du pollen d'<i>E. elaterium</i> et de <i>C. melo</i> .....</b>	<b>67</b>
1. Matériels et Méthodes .....	67
1.1. Matériel végétal.....	67
1.2. Microscopie photonique.....	68
1.3. Microscopie électronique .....	69
2. Résultats .....	69
2.1. Description cyto-morphologique de l'ontogenèse du pollen d' <i>E. elaterium</i> et de <i>C. melo</i> .....	69
2.2. Corrélation diamètre du bouton floral / stade ontogénique chez <i>E. elaterium</i> .....	76
3. Discussion .....	77
<b>III. Anomalies du développement du pollen.....</b>	<b>80</b>
1. Identification des structures anormales et des anomalies .....	80
1.1. Matériels et Méthodes .....	80
1.2. Résultats .....	80
1.3. Discussion .....	83
2. Caractérisation du phénomène de dégénérescence lors de la microsporogenèse .....	85
2.1. Matériels et Méthodes .....	85
2.2. Résultats .....	86
2.3. Discussion .....	90
3. Anomalies post-méiotiques chez <i>E. elaterium</i> .....	94
3.1. Matériels et Méthodes .....	94
3.2. Résultats .....	95
3.3. Discussion .....	97
<b>IV. Conclusions .....</b>	<b>101</b>
<b>CHAPITRE 3 – AUALITE REPRODUCTRICE DU POLLEN DE <i>C. MELO</i> .....</b>	<b>103</b>
<b>I. Méthodes d'évaluation de la qualité reproductrice du pollen .....</b>	<b>106</b>
1. Introduction.....	106
1.1. Les méthodes d'évaluation de la viabilité du pollen .....	106
1.2. Les méthodes d'évaluation de la capacité à germer du pollen .....	107
1.3. L'évaluation de l'aptitude à féconder .....	109
1.4. Variabilité de ces méthodes .....	109
2. Matériels et méthodes .....	110
2.1. Matériel végétal.....	110
2.2. Pollen.....	110
2.3. Evaluation de la viabilité.....	111

2.4.	Evaluation de la capacité à germer.....	112
2.5.	Analyse statistique .....	113
3.	<i>Résultats</i> .....	113
3.1.	Evaluation de la viabilité du pollen.....	113
3.2.	Evaluation de l'aptitude à germer du pollen .....	117
3.3.	Méthodes d'extraction et méthodes d'évaluation de la qualité reproductrice du pollen.....	118
4.	<i>Discussion</i> .....	120
<b>II.</b>	<b>Qualité reproductrice du pollen présenté par la plante.....</b>	<b>123</b>
1.	<i>Introduction</i> .....	123
2.	<i>Matériels et méthodes</i> .....	123
2.1.	Matériel végétal.....	123
2.2.	Récolte des fleurs .....	126
2.3.	Evaluation de la viabilité par FCR .....	127
2.4.	Evaluation de l'aptitude à germer .....	127
2.5.	Données climatiques .....	127
2.6.	Analyse statistique .....	127
3.	<i>Résultats</i> .....	128
4.	<i>Discussion</i> .....	133
<b>III.</b>	<b>Qualité reproductrice du pollen en contact avec l'abeille .....</b>	<b>136</b>
1.	<i>Introduction</i> .....	136
2.	<i>Matériels et méthodes</i> .....	137
2.1.	Matériel végétal.....	137
2.2.	Cohorte d'abeilles naissantes .....	137
2.3.	Stock de pollen.....	138
2.4.	Collecte d'abeilles butineuses .....	138
2.5.	Contact pollen-abeille .....	139
2.6.	Evaluation de la qualité reproductrice du pollen.....	140
2.7.	Analyse statistique .....	140
3.	<i>Résultats</i> .....	140
4.	<i>Discussion</i> .....	144
<b>IV.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>147</b>
<b>CHAPITRE 4 – COMPOSES DE L'ABEILLE POUVANT AVOIR UN EFFET SUR LA QUALITE REPRODUCTRICE DU POLLEN .....</b>		
		<b>149</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>151</b>
<b>II.</b>	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>153</b>
1.	<i>Matériel animal</i> .....	153
2.	<i>Extraction et fractionnement des composés de l'abeille</i> .....	154
3.	<i>Analyse des composés par chromatographie en phase gazeuse</i> .....	154
4.	<i>Effet des composés sur la viabilité du pollen</i> .....	155
<b>III.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>156</b>
1.	<i>Effet des différents solvants sur la viabilité du pollen</i> .....	156
2.	<i>Effet de l'oléate d'éthyle sur la viabilité du pollen</i> .....	157
3.	<i>Effet des extraits d'abeilles sur la viabilité du pollen</i> .....	157
4.	<i>Recherche de composés candidats</i> .....	159

<b>IV. Discussion.....</b>	<b>164</b>
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>168</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>174</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique d'une fleur bisexuée.....	28
Figure 2 : Formation d'un gamétophyte mâle d'Angiospermes.....	29
Figure 3 : Formation d'un gamétophyte femelle d'Angiospermes.....	32
Figure 4 : Croissance du tube pollinique et double fécondation.....	34
Figure 5 : Fleur mâle de <i>C. melo</i> de profil (A) et de face (B).....	37
Figure 6 : Fleur femelle de <i>C. melo</i> de profil (A) et de face (B).....	37
Figure 7 : Fleur mâle d' <i>E. elaterium</i> de profil (A) et de face (B).....	40
Figure 8 : Fleur femelle d' <i>E. elaterium</i> de profil (A) et de face (B).....	40
Figure 9 : Vue d'ensemble d'une abeille ouvrière ( <i>A. mellifera</i> ).....	52
Figure 10 : Développement de l'abeille ouvrière jusqu'à émergence.....	59
Figure 11 : Androcée d' <i>E. elaterium</i> . De droite à gauche, les deux paires d'anthères soudées et l'anthère libre.....	69
Figure 12 : Développement pré-méiotique et méiotique chez <i>E. elaterium</i> .....	71
Figure 13 : Développement pré-méiotique et méiotique chez <i>C. melo</i> .....	72
Figure 14 : Développement post-méiotique du pollen d' <i>E. elaterium</i> .....	73
Figure 15 : Développement post-méiotique du pollen de <i>C. melo</i> .....	75
Figure 16 : Corrélation entre le diamètre du bouton floral d' <i>E. elaterium</i> et le stade ontogénique.....	76
Figure 17 : Structures anormales observées durant l'ontogenèse du pollen d' <i>E. elaterium</i> .....	81
Figure 18 : Structures anormales observées durant l'ontogenèse du pollen de <i>C. melo</i> .....	83
Figure 19 : Dégénérescences durant le développement pollinique chez <i>E. elaterium</i> .....	87
Figure 20 : Proportions de cellules dégénérantes en fonction du stade ontogénique chez <i>E. elaterium</i> .....	88
Figure 21 : Proportions de cellules dégénérantes en fonction du stade ontogénique chez <i>C. melo</i> .....	89
Figure 22 : Dégénérescences durant le développement pollinique chez <i>C. melo</i> .....	90
Figure 23 : Les différents produits post-méiotiques observés chez <i>E. elaterium</i> .....	96
Figure 24 : Les principales anomalies cytologiques responsables de la formation de produits post-méiotiques anormaux et les grains de pollen qui peuvent en résulter.....	99
Figure 25 : Principe de la réaction fluorochromatique.....	107
Figure 26 : Extraction chimique du pollen.....	111
Figure 27 : Germination <i>in vitro</i> du pollen de <i>C. melo</i> .....	113
Figure 28 : Effet de la préhydratation sur l'estimation de la viabilité du pollen.....	114
Figure 29 : Effet de l'acide borique et de la concentration en saccharose sur l'estimation de la viabilité.....	115
Figure 30 : Comparaison de la viabilité du pollen estimée par la coloration d'Alexander ou par la réaction fluorochromatique.....	116
Figure 31 : Coloration des grains de pollen de melon en fonction de la méthode utilisée.....	117
Figure 32 : Effet de l'utilisation d'acide borique sur l'estimation de la viabilité du pollen en fonction de la méthode d'extraction utilisée.....	118
Figure 33 : Evolution de la viabilité du pollen au cours du temps en fonction du mode d'extraction.....	119
Figure 34 : Aptitude à germer <i>in vitro</i> du pollen en fonction du mode d'extraction et du temps d'attente après extraction.....	120
Figure 35 : Culture en plein champ de <i>C. melo</i> .....	124
Figure 36 : Culture de <i>C. melo</i> sous tunnel insect-proof.....	125
Figure 37 : Schéma de la culture divisée en 64 zones.....	125
Figure 38 : Fleurs prélevées aux différents temps d'étude de la journée d'anthèse.....	126
Figure 39 : Fleur choisie et étiquetée la veille de son anthèse et ensachée afin de la protéger d'éventuels pollinisateurs.....	126
Figure 40 : Viabilité du pollen de <i>C. melo</i> durant la journée d'anthèse.....	129
Figure 41 : Effet de la localisation du pollen sur sa viabilité au cours de l'anthèse.....	130
Figure 42 : Suivi de la viabilité du pollen de <i>C. melo</i> durant la journée d'anthèse effectué en 2009.....	131
Figure 43 : Aptitude à germer du pollen de <i>C. melo</i> au cours de la journée d'anthèse.....	132
Figure 44 : Variation de la qualité reproductrice du pollen de <i>C. melo</i> lors de son exposition au milieu environnant.....	133
Figure 45 : Ruchette d'abeilles naissantes.....	137
Figure 46 : Abeilles butinant sur l'abreuvoir rempli de sirop.....	138

<i>Figure 47 : Mise en contact du pollen avec des abeilles et les témoins.....</i>	<i>139</i>
<i>Figure 48 : Viabilité du pollen de C. melo après de courtes durées de contact sur le corps d'abeille.....</i>	<i>141</i>
<i>Figure 49 : Viabilité du pollen de C. melo après différentes durées de contact sur le corps d'abeilles.....</i>	<i>143</i>
<i>Figure 50 : Aptitude à germer du pollen de C. melo après différentes durées de contact sur le corps d'abeilles.....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 51 : Effet des solvants sur la viabilité du pollen de C. melo.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure 52 : Effet de l'oléate d'éthyle sur la viabilité du pollen de C. melo.....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 53 : Effet des différents extraits d'abeilles sur la viabilité du pollen de C. melo.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 54 : Quantité par abeille des différents composés de la fraction 1 détectés sur les abeilles diminuant ou augmentant la qualité reproductrice du pollen.....</i>	<i>160</i>
<i>Figure 55 : Profils de la fraction 1 obtenues par broyage des abeilles diminuant (Inf) ou augmentant (Sup) la qualité du pollen.....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 56 : Quantité par abeille des différents composés de la fraction 2 détectés sur les abeilles diminuant ou augmentant la viabilité du pollen.....</i>	<i>162</i>
<i>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.....</i>	<i>163</i>



## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Les différentes variétés de Cucumis melo classées et regroupées en types variétaux. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tableau 2 : Proportion des différents types de produits post-méiotiques observés chez E. elaterium. ....</i>	<i>95</i>
<i>Tableau 3 : Compositions des milieux germinatifs et conditions d'expérimentation des deux méthodes de germination in vitro testées. ....</i>	<i>112</i>
<i>Tableau 4 : Nombre d'abeilles induisant des viabilités très faibles, intermédiaires ou élevées en fonction de la durée du contact. ....</i>	<i>142</i>
<i>Tableau 5 : Les différents méthodes de chromatographie en phase gazeuse utilisés. ....</i>	<i>155</i>

## LISTE DES ABREVIATIONS

10-HDA : acide (E)-10-hydroxy-2-décénoïque  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ANOVA : analyse de variance  
CMM : cellule mère des microspores  
DAF : diacétate de fluorescéine  
DBF : diamètre des boutons floraux  
FCR : réaction fluorochromatique  
GLM : modèle linéaire généralisé  
IC95 : intervalle de confiance à 95%  
IH : iso-hexane  
IH-E1,5 : éther à 1,5% dans de l'iso-hexane pur  
IH-E6 : éther à 6% dans de l'iso-hexane pur  
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique  
KW : Kruskal-Wallis  
MCP : mort cellulaire programmée  
MEB : microscopie électronique à balayage  
NBB : Naphtol Blue Black  
PAS : acide périodique-réactif de Schiff  
STD : sucres totaux dissous  
US : unité statistique



## INTRODUCTION GENERALE



La famille des Cucurbitacées comprend plusieurs espèces connues pour leurs fruits comestibles et donc pour leur grande importance économique. C'est le cas par exemple de la pastèque (*Citrullus vulgaris*), du concombre (*Cucumis sativus*), du melon (*C. melo*), des courges (*Cucurbita spp.*), des calebasses (*Lagenaria spp.*) et des chayottes (*Sechium edule*).

D'autres espèces de cette famille sont d'intérêt particulier, comme la bryone dioïque (*Bryonia dioica*), l'une des rares Cucurbitacées spontanées en France et dans les pays tempérés et le concombre d'âne (*E. elaterium*) endémique du bassin méditerranéen.

En ce qui concerne plus particulièrement le melon, la France est le 3<sup>ème</sup> producteur européen après l'Espagne et l'Italie (Agreste, 2010a). Avec plus de 300 000 tonnes produites en 2009, le melon représente la 4<sup>ème</sup> culture légumière de France. La région Provence Alpes Côte d'Azur, qui assure 20% de la production nationale, est la première région productrice (Agreste, 2010b).

*Ecballium elaterium*, quant à lui, est une espèce spontanée rudérale qui se développe en petites populations de 50 à 100 individus, dans des sols sableux ou pierreux proches de la mer ou le long des bords de route et dans les décharges. Elle possède de nombreuses propriétés pharmacologiques (Raikhlin-Eisenkraft and Bentur, 2000 ; Attard and Scicluna-Spiteri, 2001) utilisées en médecine traditionnelle dans les pays méditerranéens (Uslu *et al.*, 2006). Elle possède également une activité insecticide notamment sur les Coléoptères (Pascual-Villalobos and Robledo, 1999).

La reproduction sexuée des Cucurbitacées nécessite différentes étapes clé pour être réalisée. Chez nos modèles d'étude, les fleurs sont unisexuées. Il est donc nécessaire, pour que la reproduction ait lieu, que le pollen produit par une fleur mâle soit déposé sur le stigmate d'une fleur femelle. Chez ces espèces, le transport du pollen est assuré par les abeilles.

La reproduction implique donc une interaction pollen-abeille-pistil qui débute par l'ontogenèse du pollen dans les fleurs mâles. Le pollen mature est ensuite présenté aux pollinisateurs durant l'anthèse qui dure une journée chez ces plantes. Le pollen peut alors être récolté par des abeilles butineuses qui vont soit le ramener à la ruche sous forme de pelotes pour leur consommation, soit le transporter passivement sur leur toison. Seul ce dernier type de transport participe efficacement à l'interaction pollen-abeille-pistil car ce pollen pourra ensuite être déposé sur un stigmate conspécifique lorsque les abeilles iront butiner une fleur

femelle. Après avoir été déposé sur un stigmate, le grain de pollen produit un tube pollinique pour atteindre un sac embryonnaire. Les gamètes contenus dans le tube vont alors féconder les gamètes femelles.

Pour que cette interaction pollen-abeille-pistil conduise à la réussite de la reproduction, le pollen doit être conforme et posséder une bonne qualité reproductrice durant les différentes étapes clé de cette interaction. Il est nécessaire (i) que le pollen produit par la plante soit fonctionnel et conforme génétiquement, (ii) qu'il soit viable lorsqu'il est présenté par la plante et (iii) lorsqu'il est transporté par les abeilles, (iv) qu'il soit capable de germer sur un stigmate conspécifique et enfin (v) que les gamètes qu'il contient soient capables de féconder les gamètes femelles.

Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'interaction pollen-abeille-pistil en caractérisant plus précisément le couple « pollen de Cucurbitacées – abeille domestique *Apis mellifera* L. ». Il s'agissait de déterminer la conformité et la qualité reproductrice du pollen au cours des étapes clé décrites précédemment. Pour cela, nous avons voulu :

*1- Déterminer la conformité du pollen durant son ontogenèse.* L'ontogenèse du pollen comporte des étapes comme la méiose pouvant introduire des erreurs et conduire à la formation de pollen non conforme génétiquement ou non fonctionnel.

*2- Caractériser la qualité reproductrice du pollen mis à disposition des abeilles durant l'anthèse* afin de quantifier la proportion de grains de pollen participant efficacement à l'interaction pollen-abeille-pistil et de déterminer s'il existe une période de l'anthèse plus favorable à l'interaction pollen-abeille-pistil.

*3- Evaluer l'effet du contact entre le pollen et le corps de l'abeille sur la qualité reproductrice du pollen* afin de définir si l'abeille domestique affecte la qualité reproductrice du pollen et d'évaluer la proportion de grains de pollen participant efficacement à la reproduction.

*4- Rechercher des composés biochimiques de l'abeille* pouvant induire une modification de la qualité reproductrice du pollen.

Pour répondre à ces différents points, le présent manuscrit est composé de quatre chapitres. Le premier chapitre constitue une introduction bibliographique présentant les différentes étapes de la reproduction des Angiospermes, la pollinisation entomophile et l'abeille domestique. Le deuxième chapitre concerne la conformité du pollen durant son ontogenèse. Basé sur l'analyse cyto-histologique de l'ontogenèse du pollen chez *C. melo* et *E. elaterium*, il en

présente le déroulement normal, puis décrit les anomalies rencontrées durant cette ontogenèse et enfin la quantification des principaux produits non conformes.

Le troisième chapitre porte sur la qualité reproductrice du pollen de *C. melo*. Il présente, après un important travail de méthodologie, un suivi de la qualité reproductrice du pollen au cours de l'anthèse. Ce chapitre s'attache, par la suite, à l'évaluation de l'effet du contact entre le corps de l'abeille et le pollen sur la qualité de ce dernier. L'approche privilégiée lors de cette étude a été de travailler en conditions contrôlées et artificielles.

Le dernier chapitre propose une voie possible pour expliquer l'effet de l'abeille sur la qualité reproductrice du pollen. La démarche adoptée a été la recherche, à partir d'abeilles dont l'effet sur la qualité reproductrice était connu, de composés biochimiques candidats.

Enfin, une conclusion générale rappelle les résultats marquants de ce travail et les replace au sein de l'interaction pollen-abeille-pistil puis en expose les perspectives scientifiques.





## CHAPITRE 1 – INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE



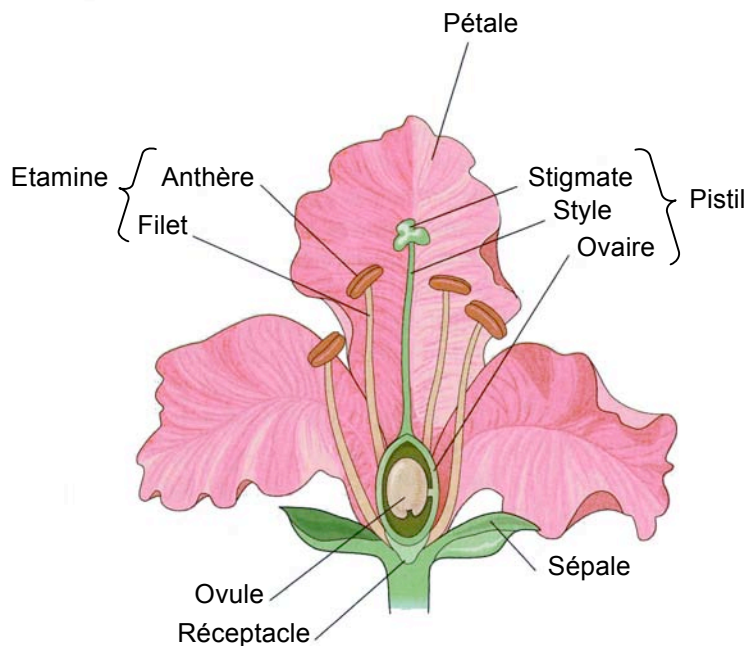
## **I. Reproduction des Angiospermes**

Les Angiospermes sont, avec les Gymnospermes, des plantes à graines ou Spermaphytes. La graine est une structure multicellulaire résistante et complexe qui contient l'embryon et des réserves nutritives. Son rôle est de protéger l'embryon et de permettre sa dissémination. Elle constitue une solution aux problèmes de stress environnementaux et de dispersion de la progéniture (Campbell and Reece, 2004).

Les Angiospermes diffèrent des Gymnospermes par la mise en place de structures reproductrices particulières : les fleurs et les fruits et par la double fécondation. La reproduction des Angiospermes se fait en trois étapes, la production des gamètes contenus dans des gamétophytes portés par les fleurs, la pollinisation ou arrivée des grains de pollen sur le stigmate et la fécondation qui aboutit à la formation de graines. Les Angiospermes sont divisées en deux sous classes, les Monocotylédones et les Dicotylédones en fonction du nombre de cotylédons de l'embryon contenu dans la graine.

### ***1. Structure des fleurs***

La fleur est la structure qui sert à la reproduction des Angiospermes. C'est l'ensemble des organes reproducteurs et des enveloppes qui les entourent. La fleur typique est portée par un pédoncule. Elle est composée d'un réceptacle floral renflé qui est rattaché au pédoncule et qui porte les pièces florales (sépales, pétales, étamines et pistil ; Figure 1) organisées en quatre verticilles concentriques (respectivement calice, corolle, androcée et gynécée). Chacune de ces pièces florales possède une spécificité. Les sépales ont un rôle essentiel de protection du bouton floral avant son ouverture. Les pétales colorés attirent les pollinisateurs. Les étamines et le pistil sont respectivement les organes reproducteurs mâles et femelles (Nabors, 2008). Le réceptacle floral porte également des glandes sécrétoires, les nectaires, qui produisent le nectar. Cette description de fleur est très générale, beaucoup de fleurs ne possèdent pas l'ensemble des pièces florales. De plus, ces caractéristiques correspondent à une fleur hermaphrodite, mais il existe aussi des fleurs unisexuées mâles ou femelles, portées sur une même plante dite alors monoïque, ou sur deux plantes différentes dans le cas de plantes dioïques.



**Figure 1 : Représentation schématique d'une fleur bisexuée.** Modifié d'après Campbell and Reece (2004).

L'étamine est constituée de deux parties, le filet et l'anthère. Le filet est rattaché au réceptacle floral et porte l'anthère. Cette dernière est formée de deux thèques contenant chacune deux sacs polliniques. Elle est constituée de quatre couches qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme, l'endothecium c'est-à-dire la future assise mécanique, la couche moyenne qui formera les assises transitoires et le tapis. Ces quatre couches entourent un locule qui est rempli d'un liquide, le fluide loculaire (Bedinger, 1992).

Les parties femelles des fleurs forment le gynécée ou pistil. A l'anthesis, le pistil est composé de trois parties : (i) l'ovaire se trouvant à la base du pistil et contenant les ovules, (ii) le style, extension de l'ovaire à travers lequel se développe le tube pollinique et (iii) le stigmate se situant au sommet du style et qui est le lieu d'adhésion et de germination des grains de pollen (Gasser and Robinson-Beers, 1993).

## ***2. Production du gamétophyte mâle : le pollen***

Pour se reproduire, les plantes supérieures utilisent un microorganisme multicellulaire particulier, le grain de pollen. Cette structure bi- ou tricellulaire doit être capable de survivre à

l'état libre et d'assurer un certain nombre de fonctions spécialisées avant que la fécondation soit accomplie (Bedinger, 1992).

Les pollens des Angiospermes possèdent tous (i) des réserves glucidiques dédiées au développement du gamétophyte et à son entretien jusqu'à la germination, (ii) deux parois l'intine et l'exine, et (iii) deux gamètes mâles ou leurs précurseurs. Cependant, ils ne possèdent pas de chloroplaste (Pacini, 2000).

Le développement du pollen a lieu dans l'anthere et requiert la participation de cellules somatiques (Figure 2 ; Bedinger, 1992).

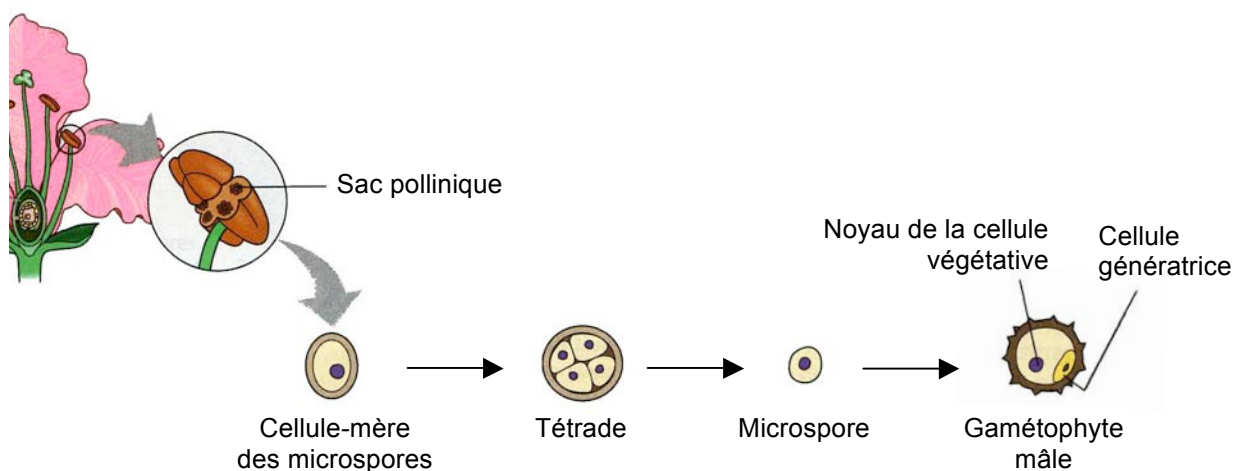


Figure 2 : Formation d'un gamétophyte mâle d'Angiospermes. Modifié d'après Campbell and Reece (2004).

## 2.1. Formation des microspores

Les cellules sporogènes contenues dans le locule se développent en cellules mères des microspores (CMM) ou microsporocytes (Sanders *et al.*, 1999). Les CMM synthétisent une paroi de callose ( $\beta$ -1,3-glucane) qui pourrait agir comme une barrière ou un filtre moléculaire entre ces cellules et le reste du sporophyte (Scott *et al.*, 2004). Les CMM entrent ensuite en phase méiotique. Chez la plupart des plantes, les divisions méiotiques sont synchrones dans une anthère grâce aux connexions existantes entre les CMM (McCormick, 1993).

Durant cette phase, les cellules du tapis deviennent binucléées et dépourvues de paroi primaire. Elles acquièrent alors une fonction sécrétoire (Bedinger, 1992). Les deux divisions méiotiques des CMM conduisent à la formation d'une tétrade de quatre cellules haploïdes, les microspores, entourées de la paroi de callose. Cette paroi est ensuite dissoute sous l'action de callases sécrétées par le tapis, ce qui entraîne la libération des microspores dans le locule. Enfin, les microspores se vacuolisent : de petites vacuoles se forment puis se rassemblent en

une grande vacuole qui occupe l'essentiel du volume cellulaire et repousse le cytoplasme et les organites contre la paroi.

## **2.2.Synthèse de l'exine**

La mise en place de la paroi pollinique ou sporoderme commence par la synthèse de la couche externe, l'exine. Celle-ci est ornementée, majoritairement constituée de sporopollénine, un composé possédant une très grande résistance chimique et physique, et interrompue par des ouvertures, les apertures (Edlund *et al.*, 2004). La synthèse de cette paroi particulière implique l'action conjointe de la microspore et du tapis. La microspore synthétise une trame de surface, la primexine. Cette dernière détermine le motif de dépôt de l'exine (ornementation) qui est propre à chaque espèce (Bedinger, 1992). Le tapis sécrète les précurseurs de la sporopollénine qui seront polymérisés sur la primexine.

Quand l'exine est formée, le tapis dégénère par mort cellulaire. Ce phénomène induit la libération de débris cellulaires et de substances visqueuses dans le fluide loculaire. Dans certains cas, ces reliquats de cellules tapétales, la tryphine, le pollenkitt et la viscine, se déposent à la surface des microspores en recouvrant les ornements de l'exine. Cette couche supplémentaire constitue le manteau pollinique. Sa composition particulière : lipides, protéines, pigments et composés aromatiques, constitue (i) une protection contre la déshydratation, (ii) un moyen de regroupement des grains, (iii) un facteur d'attraction des insectes pollinisateurs et (iv) un moyen d'adhérer sur leur corps (Pacini, 2000).

## **2.3.Mitose de la microspore**

A la suite du dépôt d'exine, les microspores entrent en réorganisation cytotologique. Le noyau migre à la périphérie de la cellule pour se préparer à la mitose. La mitose de la microspore est une division asymétrique qui conduit à la formation de deux cellules aux devenir très différents. Le produit binucléé de cette mitose constitue le grain de pollen. Le noyau adjacent à la membrane plasmique va se cellulariser pour former la cellule génératrice. Cette cellule se caractérise par un noyau condensé, une quantité réduite de cytoplasme et de mitochondries, un réticulum endoplasmique éparpillé et un faible nombre de pores nucléaires, ce qui témoigne d'une activité transcriptionnelle très réduite (McCormick, 1993). La seconde cellule issue de la mitose, la cellule végétative, possède au contraire un noyau volumineux, un grand nombre de pores nucléaires, une chromatine décondensée et par conséquent, une forte activité

transcriptionnelle (Bedinger, 1992). Le rôle de cette cellule est de servir de réserve énergétique pour assurer le développement du grain de pollen et la croissance du tube pollinique. Chez 70% des familles de plantes à fleurs, le pollen reste binucléé jusqu'à sa germination où la cellule génératrice subira une seconde mitose conduisant à la formation des deux cellules spermatiques (spermatozoïdes). Chez les autres familles, la seconde mitose de la cellule génératrice a lieu avant la libération du pollen (McCormick, 1993).

## **2.4.Maturation du pollen**

A ce stade, le pollen n'a pas fini son développement. Différentes étapes de maturation sont nécessaires à sa survie hors de l'anthere. La mise en place de la paroi pollinique se finalise par la sécrétion de la paroi interne de nature pecto-cellulosique, l'intine. Le pollen accumule des réserves sous forme d'amidon. La dernière étape de maturation est la déshydratation du pollen qui perd jusqu'à 40 à 50 % de son contenu en eau (Bedinger, 1992).

Ces diverses étapes conduisent le pollen à un état de dormance lui permettant alors de résister aux stress environnementaux.

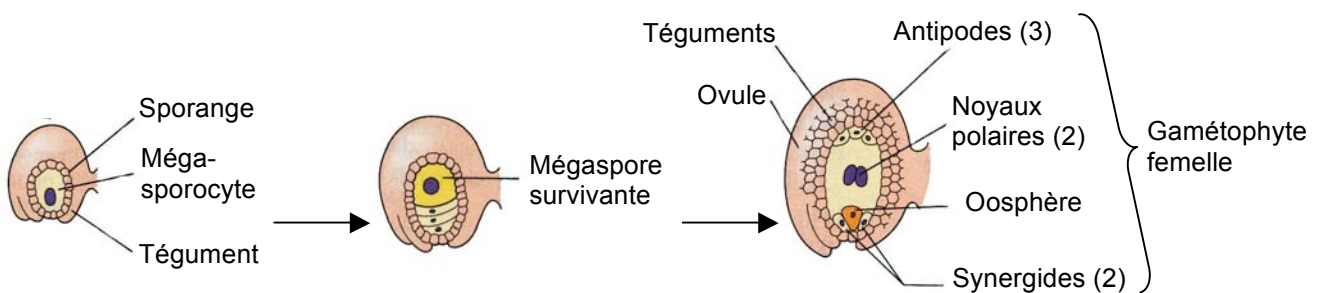
## **2.5.Présentation du pollen**

Avant l'ouverture de l'anthere, le fluide loculaire disparaît par évaporation, réabsorption ou les deux mécanismes ensemble selon les conditions environnementales. L'ouverture de l'anthere, appelée déhiscence, débute par l'ouverture du septum qui sépare les deux locules. Il y a ensuite rupture de l'assise mécanique qui expose les grains de pollen à l'environnement extérieur. La présentation du pollen peut se faire de diverses manières. L'anthere peut s'ouvrir complètement et les grains de pollen sont libérés immédiatement. Autrement, il peut y avoir un mouvement de l'anthere ou du filet qui permet d'éjecter le pollen. Le pollen peut également être retenu par des substances visqueuses (pollenkitt, tryphine, viscine). Ou bien l'anthere peut s'ouvrir progressivement et offrir une exposition graduelle du pollen aux insectes (Pacini, 2000). Ces différents types de présentation conduisent à la mise à disposition du pollen pour la pollinisation.



### 3. Production du gamétophyte femelle : le sac embryonnaire

Il existe plusieurs types de développement du sac embryonnaire. Le plus commun est le type *Polygonum* décrit pour la première fois par Strasburger en 1879. Ce modèle a lieu chez 70% des plantes à fleurs (Yadegari and Drews, 2004). Le gamétophyte femelle du type *Polygonum* est composé à maturité de 7 cellules et de quatre types cellulaires : les 3 cellules antipodales, les 2 synergides, l'oosphère et la cellule centrale contenant les noyaux polaires (Figure 3 ; Maheshwari, 1950). Le développement du gamétophyte femelle se fait en deux phases, la mégasporogénèse et la mégagamétogénèse.



**Figure 3 : Formation d'un gamétophyte femelle d'Angiospermes.** Modifié d'après Campbell and Reece (2004).

La mégasporogénèse consiste en la formation des mégaspores à partir des cellules mères des mégaspores. Ces cellules diploïdes subissent une méiose qui conduit à la formation de quatre mégaspores haploïdes (Yadegari and Drews, 2004). Dans le type de développement le plus commun, le type monosporique (Maheshwari, 1950), les trois mégaspores les plus proches du micropyle dégénèrent et seule la quatrième devient fonctionnelle (Yadegari and Drews, 2004).

La mégagamétogénèse consiste en la formation du gamétophyte femelle. Pour cela, la mégaspore fonctionnelle subit, dans le cas le plus commun, trois mitoses, sans qu'il y ait cytokinèse. Ces divisions conduisent à la formation d'un cœnocyte à huit noyaux répartis en deux groupes de quatre à chaque pôle. Un noyau de chaque pôle migre au centre où ils fusionnent pour former le noyau diploïde de la cellule centrale. Les autres noyaux s'entourent d'une membrane plasmique et d'une paroi cellulaire, formant ainsi un gamétophyte cellularisé (Yadegari and Drews, 2004).

Les gamètes mâles et femelles ayant été produits dans des structures différentes, une étape de rapprochement est nécessaire pour qu'ils puissent fusionner, il s'agit de la pollinisation.

## **4. Pollinisation**

La pollinisation est le transport des grains de pollen depuis les étamines jusqu'au stigmate (Pesson and Louveaux, 1984). Il existe deux types de pollinisation, l'autopollinisation et la pollinisation croisée. L'autopollinisation correspond à la pollinisation entre deux organes reproducteurs d'une même plante. Il peut s'agir des deux organes d'une même fleur dans le cas d'une fleur hermaphrodite ou de deux fleurs différentes d'une même plante dans le cas de plantes monoïques. La pollinisation croisée, quant à elle, correspond au transfert du pollen de l'anthere d'une plante au stigmate d'une autre plante conspécifique. Ce mode de pollinisation est obligatoire chez les plantes dioïques, mais se produit fréquemment chez les plantes monoïques ou à fleurs hermaphrodites car ce type de pollinisation augmente la variabilité génétique de la descendance (Nabors, 2008). Dans ce cas, le transfert de pollen nécessite l'intervention d'un vecteur. Différents modes de pollinisation sont définis en fonction du vecteur :

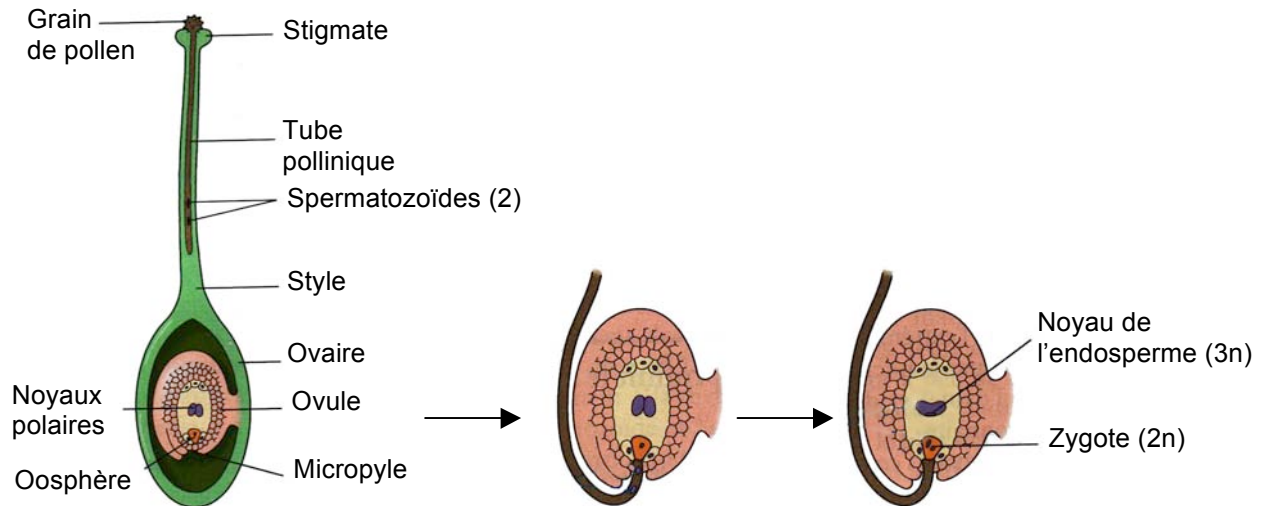
- l'anémophilie ou anémogamie lorsque le pollen est transporté par le vent. Ce mode de pollinisation est majoritaire chez les Gymnospermes ;
- la zoïdophilie : dans ce cas, la pollinisation est assurée par des animaux (insectes, oiseaux, chauve-souris, mollusques gastéropodes) ;
- l'hydrophilie : les espèces utilisant ce mode de pollinisation sont peu nombreuses. Il s'agit de plantes aquatiques totalement immergées dont la floraison et la pollinisation ont lieu dans l'eau (Demalsy-Feller and Demalsy-Feller, 1990).

La mise en contact du pollen et du stigmate, que ce soit de manière directe ou indirecte (*via* des vecteurs biotiques ou abiotiques) ne permet pas encore la rencontre entre les deux gamètes. Plusieurs étapes sont encore nécessaires pour qu'il y ait fécondation.

## **5. Fécondation et nouaison**

Différentes étapes séparent l'arrivée d'un grain de pollen sur un stigmate et la formation de graines (Figure 4). Dans un premier temps, le pollen se réhydrate et émet un tube pollinique. Ce dernier pénètre dans les couches cellulaires stigmatiques, se développe dans le style et atteint l'ovaire. Il pénètre ensuite dans l'ovule puis dans le sac embryonnaire avant de libérer les deux gamètes qu'il contient et qu'il y ait fécondation et développement de l'embryon (Cheung, 1995).

L'ensemble de ces étapes ont lieu uniquement dans le cas de pollinisations compatibles. Dans le cas de pollinisations incompatibles, différents mécanismes empêchent le développement du pollen afin d'éviter l'autofécondation ou le développement de pollen d'espèce différente par exemple.



**Figure 4 : Croissance du tube pollinique et double fécondation.** Modifié d'après Campbell and Reece (2004).

Lorsqu'un grain de pollen arrive sur un stigmate, différents mécanismes d'adhésion se succèdent pour assurer un contact stable entre les deux structures reproductrices (Edlund *et al.*, 2004). Le pollen, plus ou moins fortement déshydraté et métaboliquement inactif, subit une phase de réhydratation nécessaire à sa réactivation métabolique (Swanson *et al.*, 2004). Suite à cette réhydratation, le grain de pollen réorganise son cytoplasme et son cytosquelette pour émettre un tube pollinique. Le noyau végétatif se réoriente de sorte qu'il entre dans le tube en extension avant la cellule génératrice. L'émergence du tube pollinique peut se faire par une ouverture ou par rupture de l'exine et nécessite la dissolution de l'intine (Edlund *et al.*, 2004). Le tube pollinique émis par le grain de pollen pénètre dans le stigmate et traverse les tissus du pistil pour rejoindre l'ovule (Figure 4). Durant cette progression, la cellule génératrice, dans le cas d'un pollen binucléé, subit une mitose conduisant à la formation des deux cellules spermatiques, les gamètes mâles (Weterings and Russell, 2004). Le tube pollinique pénètre dans l'ovule par le micropyle, entre dans le sac embryonnaire en se développant dans une des deux synergides. La croissance du tube s'arrête et une ouverture se forme au niveau de la pointe du tube pollinique. Le contenu du tube incluant les deux cellules spermatiques est libéré rapidement dans le cytoplasme de la synergide qui dégénère (Yadegari

and Drews, 2004). Les cellules spermatiques migrent vers la cellule œuf et la cellule centrale. L'une des cellules spermatiques féconde la cellule œuf, ce qui donne un zygote diploïde (2n). L'autre fusionne avec les deux noyaux polaires de la cellule centrale, formant un noyau triploïde (3n) (Russell, 1992). La double fécondation induit le développement des structures fécondées et la transformation des structures accessoires. Ces transformations conduisent au développement de la graine et du fruit. La graine est constituée des téguments, de l'albumen triploïde et d'un embryon qui se développe à partir du zygote (Boesewinkel and Bouman, 1995). Le fruit, quant à lui, provient de la transformation des tissus de l'ovaire (Campbell and Reece, 2004).

## **6.Reproduction chez nos modèles d'étude**

La famille des Cucurbitacées appartient au groupe des Dicotylédones. Elle comprend environ 800 espèces réparties en 120 genres. La classification phylogénétique place cette famille dans l'ordre des Cucurbitales. Les Cucurbitacées sont principalement des plantes tropicales, présentes dans tous les continents et spécialement en Afrique et en Amérique latine, même s'il en existe des représentants spontanés en Europe (*Bryonia dioica* par exemple). Quelques espèces sont cultivées dans les pays tempérés, mais ne s'y sont pas naturalisées.

Les Cucurbitacées sont généralement des plantes herbacées annuelles ou pérennes, plus ou moins rampantes ou grimpantes grâce à des vrilles spiralées. Les feuilles sont alternes et stipulées. Leur forme peut varier d'un individu à un autre au sein d'une même espèce. Elles sont simples, plus ou moins lobées ou subcordées pour le melon, ou grandes, pentagonales et tri-lobées pour le concombre. Les fleurs sont généralement unisexuées, souvent sur le même individu (espèces monoïques), parfois sur des individus séparés (espèces dioïques). Les pétales, libres ou soudés à la base, sont le plus souvent de couleur jaune à blanchâtre. La fleur est régulière et pentamère. Chez les fleurs mâles, le pistil est non fonctionnel et les étamines sont soudées les unes aux autres. Chez les fleurs femelles, le gynécée est composé d'un ovaire infère tricarpellé qui donnera un fruit. Celui-ci est en général une baie, qui peut être protégée par une écorce dure (Emberger, 1960).

## 6.1. *Cucumis melo* var. *cantalupensis*

*Cucumis melo* est une plante annuelle herbacée constituée de tiges rampantes portant des vrilles (Rosa, 1924). C'est une espèce très polymorphe qui présente une grande variabilité phénotypique au niveau des fruits : taille, forme, teneur en sucre, acidité, amertume et arôme, couleur et fermeté de l'épiderme et de la chair, ornementation de l'épiderme, couleur et grosseur des graines (Pitrat and Risser, 1992). Sept variétés principales sont cultivées pour leurs fruits (Tableau 1) dont la variété *cantalupensis* ou melon Cantaloup majoritaire en France.

Variété	Forme/ taille du fruit	Ecorce	Chair	Répartition géographique
<i>cantalupensis</i>	sphérique	lisse/légèrement écrite	orangée/sucrée parfumée	France
<i>inodorus</i>	sphérique gros calibre	pas/peu écrite	verte/sucrée non parfumée	Etats-Unis Amérique Latine
<i>reticulatus</i>	très gros calibre	très brodée	orangée/sucrée peu parfumée	Etats-Unis
<i>flexuosus</i>	allongé et tordu		non sucrée	
<i>conomon</i>	allongé	lisse	non sucrée	
<i>chito</i> et <i>dudaim</i>	globuleux petite taille		non sucrée	

**Tableau 1 : Les différentes variétés de *Cucumis melo* classées et regroupées en types variétaux.** Modifié d'après Odet (1991).

### a. Biologie florale

#### Morphologie florale

Le melon peut être soit monoïque, soit andromonoïque, dans ce cas il porte des fleurs mâles et des fleurs hermaphrodites sur le même individu, soit très rarement gynomonoïque avec la présence de fleurs femelles et de fleurs hermaphrodites sur le même individu.

La plupart des variétés européennes sont monoïques alors que les variétés américaines sont généralement andromonoïques (Free, 1993).

Les fleurs mâles (Figure 5A et B) sont beaucoup plus nombreuses que les fleurs femelles et de plus petite taille. A la base de la corolle des fleurs mâles se trouve un style non fonctionnel entouré de nectaires (Delaplane and Mayer, 2000) et d'étamines dont les anthères contiennent

le pollen (Free, 1993). L'androcée est composé de cinq étamines dont quatre sont soudées deux à deux (Delaplane and Mayer, 2000). Avant anthèse, les anthères contiennent 8000 à 13000 grains de pollen (Mann, 1953 ; Stangellini *et al.*, 2002). Ceux-ci sont de couleur jaune, de forme sub-sphérique avec une exine épaisse. Leur taille varie entre 45  $\mu\text{m}$  et 55  $\mu\text{m}$  en fonction de la variété (Nandpuri and Brar, 1966).

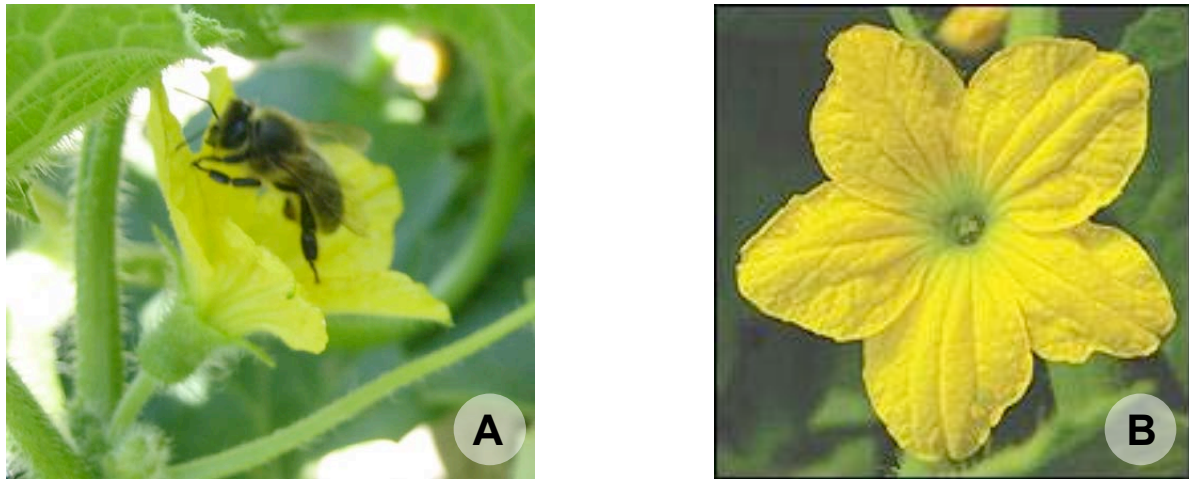


Figure 5 : Fleur mâle de *C. melo* de profil (A) et de face (B).

Chez les fleurs femelles (Figure 6A et B), le gynécée est composé d'un stigmate trilobé vert entouré de nectaires (Delaplane and Mayer, 2000), d'un style court et d'un ovaire infère divisé en trois loges. Chacune de ces loges contient plusieurs rangées longitudinales d'ovules (Free, 1993).

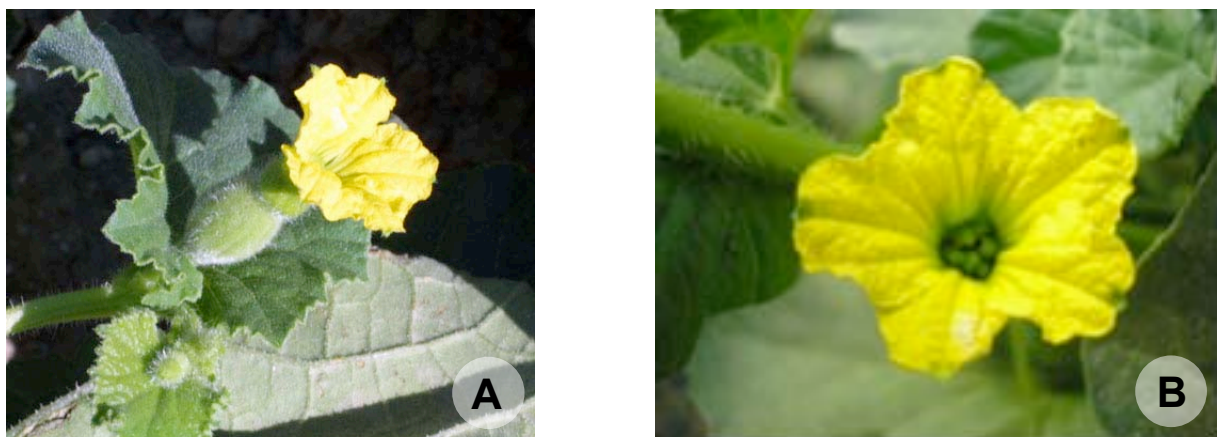


Figure 6 : Fleur femelle de *C. melo* de profil (A) et de face (B).

## **Anthèse**

### *Ouverture des fleurs*

Les fleurs s'ouvrent peu après le lever du soleil et se ferment au cours de l'après-midi du même jour (McGregor and Todd, 1952 ; Delaplane and Mayer, 2000). Le lendemain matin, elles sont fanées (Rosa, 1924). L'heure d'ouverture des fleurs dépend fortement de la température, et par conséquent de la position géographique de la zone de culture. En Californie et en Arizona, zones de latitudes proches de notre zone d'étude, les fleurs s'ouvrent entre 7h00 et 8h00 (Rosa, 1924 ; McGregor and Todd, 1952) alors qu'en Inde, l'anthèse a lieu entre 5h30 et 6h00 (Nandpuri and Brar, 1966). De plus, quand les nuits sont plus chaudes, les fleurs s'ouvrent plus tôt car la température d'anthèse est atteinte plus rapidement (Rosa, 1924).

L'heure de déhiscence de l'anthère de melon est controversée selon les auteurs et semble dépendre de la variété étudiée. Certains auteurs ont observé qu'elle avait lieu 30 minutes avant l'ouverture de la fleur (Nandpuri and Brar, 1966), alors que pour d'autres, elle a lieu de quelques minutes (McGregor and Todd, 1952) jusqu'à 2h30 après (Rosa, 1924).

Différents facteurs peuvent agir sur la déhiscence. La température influence directement l'ouverture des sacs polliniques des Cucurbitacées (Seaton and Kremer, 1939 ; Mann, 1950). L'humidité, la pluie, le vent et l'intensité lumineuse ont une influence indirecte sur la déhiscence car ils affectent la température de la fleur (Mann, 1950). Les fleurs mâles s'ouvrent et libèrent du pollen aussi bien à faible humidité que par temps pluvieux (Whitaker and Pryor, 1946).

La température optimale d'anthèse et de déhiscence du melon se situe entre 20 et 21°C (Seaton and Kremer, 1939). Les températures inférieures à 18°C ou trop fortes ont un effet négatif sur l'anthèse (Nandpuri and Brar, 1966).

## **b.Fécondation et nouaison**

Le pollen germe dans les 30 minutes après son dépôt sur le stigmate. Les tubes polliniques mettent environ 24h pour traverser les tissus du stigmate et du style et entrer dans la cavité ovarienne. La fécondation prend place 48h après (Beharav and Cohen, 1995). La pollinisation et la maturité des fruits sont séparées de 30 à 45 jours (McGregor *et al.*, 1965 ; Loys and Wells, 1995 ; Mary, 1994). Pour que l'ovaire se développe en fruit, un nombre minimum de 30 à 40 grains de pollen doivent être déposés sur le stigmate (Tsyganov, 1953). En revanche, 400 grains de pollen sont nécessaire pour former un fruit de melon convenable (Bohn and

Davis, 1964). En effet, les fruits contenant moins de 400 graines sont mal formés ou en dessous du calibre commercialisable (McGregor and Todd, 1953).

## **6.2.Ecballium elaterium**

*E. elaterium* est une plante herbacée basse à tiges couchées et pourvue de soies (Rust *et al.*, 2003 ; Blamey and Grey-Wilson, 2000). Elle se distingue des autres Cucurbitacées par l'absence de vrilles (Fahn and Shimony, 2001). Elle est pérenne grâce à son caractère hémicryptophyte (Bock, 2010). En effet, sa partie souterraine très développée lui permet de survivre pendant la mauvaise saison alors que les parties aériennes sont desséchées.

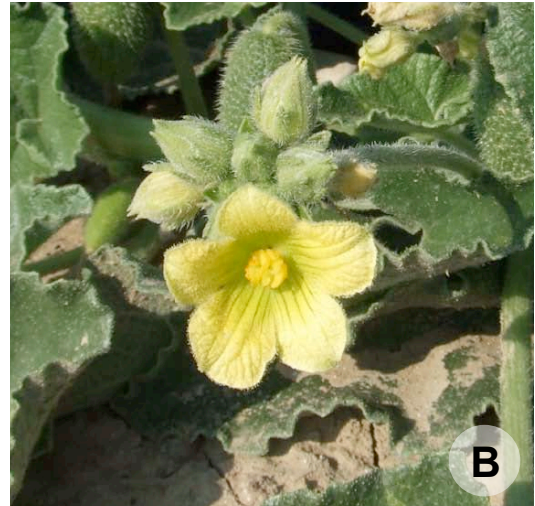
### **a.Biologie florale**

#### **Morphologie florale**

*E. elaterium* est une espèce monoïque dans nos régions, mais il existe quelques individus dioïques dans le nord de l'Afrique et dans le sud de l'Espagne et du Portugal (Costich and Meagher, 1992). Les deux types de fleurs sont de diamètre égal (16-20 mm), ont la même couleur jaune-vert et le même motif de réflexion des ultra-violets (Dukas, 1987 ; Blamey and Grey-Wilson, 2000). Les sépales sont lancéolés, la corolle jaunâtre veinée de vert a une forme de cloche (Fournier, 2000). Les cinq pétales sont soudés à leur base et recouverts de trichomes (Fahn and Shimony, 2001).

Les fleurs mâles (Figure 7A et B) sont regroupées en grappe (Fahn and Shimony, 2001). L'androcée est constitué de cinq étamines charnues avec de courts filets et de larges anthères de couleur orange et sont réparties en deux paires soudées entre elles et une cinquième libre (Dukas, 1987).





**Figure 7 : Fleur mâle d'*E. elaterium* de profil (A) et de face (B).**

Les fleurs femelles (Figure 8A et B) sont solitaires, souvent sur le même axe foliaire que les grappes de fleurs mâles (Fahn and Shimony, 2001). Le pistil est composé de trois stigmates bilobés charnus verdâtres portés par un style épais (Dukas, 1987) et d'un ovaire infère. Le pistil est entouré de trois à cinq staminodes qui sont des vestiges d'étamines (Fahn and Shimony, 2001).



**Figure 8 : Fleur femelle d'*E. elaterium* de profil (A) et de face (B).**

La période de floraison s'étale d'avril à décembre avec un pic entre mai et août.

## **Anthèse**

Les fleurs s'ouvrent très tôt le matin entre 6h00 et 7h00. Les fleurs mâles sont ouvertes un seul jour alors que les fleurs femelles le restent habituellement 2 jours (Dukas, 1987).

## **b.Fécondation et nouaison**

Après fécondation, l'ovaire se développe en fruit contenant environ 30 graines (Dukas, 1987). Le petit fruit charnu, vert et oblong est hérissé de soies et recourbé à l'extrémité d'un long pédoncule dressé (Blamey and Grey-Wilson, 2000).

La dissémination des graines se fait de manière autochore. Les cellules de la paroi du fruit ont une forte pression osmotique. Ces cellules gonflent rapidement lorsque le fruit est mature. Ce processus entraîne le détachement du fruit à partir du pédoncule et l'éjection des graines à plusieurs mètres de la plante par l'ouverture créée (Rust *et al.*, 2003).

La réussite de la reproduction des Cucurbitacées ne dépend pas uniquement des facteurs internes à la plante, comme la mise en place de structures reproductrices fonctionnelles. Elle est très dépendante de facteurs externes à la plante, pour la mise en contact des gamètes mâles et femelles. Elle nécessite l'intervention des insectes pour assurer la pollinisation.

## **II. Pollinisation entomophile**

La pollinisation entomophile est le mode de pollinisation utilisant les insectes comme vecteur biotique pour transporter le pollen. La majorité des Angiospermes utilisent ce vecteur. Les insectes visitent les fleurs principalement pour se nourrir, mais aussi pour s'abriter ou chercher des partenaires sexuels. Ce faisant, ils chargent et déchargent du pollen qu'ils déposent sur le stigmate d'autres fleurs conspécifiques.

### ***1. Interaction mutualiste***

La pollinisation entomophile est une relation où la plante réalise sa reproduction sexuée alors que l'insecte trouve un simple repas. Elle est mutualiste puisque réciproquement positive pour les deux espèces. Les plantes procurent de la nourriture et un abri, en contrepartie, les insectes offrent le transport de pollen. Cette relation mutualiste représente un équilibre fragile entre les intérêts et coûts associés au service de l'autre espèce (Rodet, 2010). La situation optimale pour la plante est d'obtenir un service de pollinisation par un vecteur de pollen, sans lui offrir de récompense. L'animal visitant les fleurs doit, lui, exploiter les ressources disponibles aussi efficacement que possible (Herrera and Pellmyr, 2002).

L'avantage évolutif de la pollinisation entomophile pour les plantes est que le transport du pollen est le résultat d'un comportement et non plus du hasard. L'insecte peut visiter des fleurs conspécifiques parce qu'il peut les reconnaître. L'utilisation d'insectes pour la dispersion de pollen présente différents avantages écologiques pour les plantes qui ne peuvent pas se déplacer : (i) les insectes qui recherchent activement des fleurs augmentent la probabilité qu'un grain de pollen collecté sur une fleur rejoigne le stigmate d'une fleur conspécifique, (ii) la pollinisation croisée faite par les insectes peut prendre place dans des habitats avec très peu de vent tels que la canopée fermée dans les forêts tropicales et (iii) la quantité de pollen à produire est plus faible que dans le cas d'une pollinisation anémophile pour la même efficacité pollinisatrice (Herrera and Pellmyr, 2002).

En contrepartie, de nouveaux coûts pour la plante s'ajoutent avec la pollinisation entomophile. La plante doit produire des signaux visuels et olfactifs qui attirent les visiteurs, et des récompenses telles que du nectar, du pollen supplémentaire, ou des résines. Un autre coût dû à la pollinisation entomophile est celui imposé par les insectes non pollinisateurs qui

exploitent les signaux et les récompenses mis en place par les plantes (Herrera and Pellmyr, 2002).

Les bénéfices pour les insectes pollinisateurs consistent à avoir des récompenses de haute qualité nutritionnelle accessibles aisément dans des zones facilement identifiées.

Dans la plupart des cas, il y a peu de coûts pour les insectes visitant les fleurs. Le transport du pollen risque peu de gêner l'insecte, sauf dans certains cas comme lors de visites de plantes produisant de très grandes quantités de pollen comme le tournesol, où l'insecte se trouve entièrement recouvert de pollen ou dans le cas de la pollinisation des plantes nototribiques qui utilisent un système de levier pour transférer le pollen sur l'insecte. Dans ce cas, le dépôt de pollen sur le corps du pollinisateur peut lui couvrir les yeux (Herrera and Pellmyr, 2002).

Cette relation a nécessité une co-évolution plante-insecte et donc des adaptations de chacun des acteurs de cette interaction pour qu'elle soit efficace.

## ***2. Adaptation des plantes pour la pollinisation entomophile***

### **2.1. Caractéristiques des plantes à pollinisation biotique**

En fonction du mode de pollinisation sélectionné, les plantes ont développé des caractères spécifiques, notamment au niveau de leurs organes reproducteurs pour optimiser leur pollinisation. Ainsi, par rapport à des plantes à pollinisation anémophile, les plantes à pollinisation zoïdophile et plus particulièrement entomophile ont développé des caractéristiques pour être vues de leur vecteurs et pour être attirantes. Elles possèdent ainsi des pièces florales très voyantes, sécrètent des parfums pour être repérées et produisent du nectar pour fournir une récompense aux pollinisateurs. Au niveau de leurs structures reproductrices, elles ont réduit le ratio pollen-ovule car la dispersion du pollen n'est plus aléatoire mais orientée. Ce pollen est souvent de plus grande taille, et aussi plus lourd (car son transport ne dépend plus du vent). Il est ornementé et recouvert de pollenkitt pour pouvoir adhérer au corps des vecteurs (Culley *et al.*, 2002).

## **2.2.Récompenses**

La plupart des insectes pollinisateurs visitent les fleurs pour trouver de la nourriture. Les récompenses les plus abondantes sont le nectar et le pollen, mais il existe d'autres types de récompenses comme des résines ou des fragrances qui une fois qu'elles auront été métabolisées, pourront être réutilisées en phéromones (Kevan and Baker, 1983). Bien que le pollen soit ancestralement la source de nourriture recherchée par les visiteurs primitifs, le nectar est la ressource la plus communément recherchée.

### **a.Nectar**

Le nectar est constitué principalement de sucres en solution aqueuse, bien qu'il contienne également des lipides, des acides aminés, des protéines, des minéraux, des acides organiques, des vitamines, des pigments et des substances aromatiques (Petanidou, 2005 ; Petanidou *et al.*, 2006 ; Pacini *et al.*, 2003). Sa composition varie fortement d'une espèce à l'autre, mais est liée au type de pollinisateur (Petanidou, 2005). Le nectar représente la principale source d'hydrocarbures des insectes visiteurs. Le saccharose, le glucose et le fructose sont les principaux sucres qui le composent, mais il contient également entre autres du maltose, du tréhalose et du melezitose.

Le nectar est produit dans des nectaires. Le terme nectaire n'indique pas une structure anatomique bien définie, car il existe de nombreux types de nectaires avec des positions et des origines anatomiques différentes. Ce terme a plus une signification fonctionnelle car les nectaires sont le lieu de production et de présentation du nectar (Pacini *et al.*, 2003).

### **b.Pollen**

Le pollen est la seconde source de nourriture recherchée dans les fleurs. Il représente un aliment vital pour de nombreux insectes. C'est un aliment hautement nutritif contenant de nombreux acides aminés. Bien que le contenu en protéines et acides aminés libres varie d'une espèce à l'autre, il reste majoritaire. Des sucres ont été mis en évidence dans le pollen mais en quantité bien moins importante que dans le nectar. Le pollen mature peut contenir ou ne pas contenir d'amidon. Il peut être riche en lipides, surtout chez les espèces n'offrant pas d'autres récompenses florales (Kevan and Baker, 1983). Le pollen reste avant tout la structure

reproductrice à transporter. L'utilisation du pollen comme récompense doit donc rester minoritaire pour assurer un succès reproductif à la plante.

Toutes ces adaptations mises en place par les plantes ont pour but d'attirer des insectes qui assureront leur pollinisation.

### ***3. Insectes pollinisateurs***

Pour qu'un insecte soit pollinisateur, il est nécessaire (i) qu'il soit intéressé par les ressources florales et (ii) qu'il transporte du pollen. Principalement quatre ordres d'insectes remplissent les conditions citées ci-dessus, bien que quelques insectes appartenant à d'autres ordres puissent également avoir une activité pollinisatrice. Il s'agit des Coléoptères, des Diptères, des Lépidoptères et des Hyménoptères.

Les Coléoptères sont considérés comme les pollinisateurs les plus primitifs. Ils assurent une pollinisation qualifiée de « mess-and-soil » par Faegri et van der Pijl (1971). Ils déambulent autour des fleurs et consomment toutes les parties florales. Du pollen se dépose sur leur corps lorsqu'ils se déplacent dans la zone contenant les anthères et est déposé sur le stigmate d'autres fleurs. Les fleurs visitées par les coléoptères sont des fleurs ouvertes avec des anthères bien exposées et sentant les fruits fermentés. Les Coléoptères participant à la pollinisation ont des adaptations structurales comme la projection en avant de leurs parties buccales ou l'élongation de leur prothorax, leur permettant d'atteindre les nectaires dans les fleurs profondes et d'extraire le nectar plus rapidement (Kevan and Baker, 1983).

Les Diptères sont également considérés comme des pollinisateurs primitifs à cause de leurs pièces buccales de type lécheur-suceur. Ils visitent les fleurs principalement pour le nectar même si certains se nourrissent de pollen. Les fleurs visitées doivent être facilement accessibles et ne pas être profondes (Kevan and Baker, 1983).

La plupart des Lépidoptères se nourrissent de nectar, mais également d'autres liquides. Généralement, ils ne peuvent boire que les nectars les moins visqueux, bien que certains lépidoptères sécrètent de la salive pour diluer les nectars plus sirupeux. Les papillons diurnes visitent des fleurs de couleur vive avec des corolles tubulaires. Les papillons nocturnes

visitent plutôt des fleurs pâles se distinguant facilement du feuillage foncé et fortement parfumées pour pouvoir les localiser (Kevan and Baker, 1983).

Les Hyménoptères constituent l'ordre qui renferme le plus d'insectes pollinisateurs. Ils se nourrissent de nectar, de pollen et d'autres parties florales. Au sein de cet ordre, les Apoïdés sont les pollinisateurs les plus importants et les plus adaptés. Leurs pièces buccales sont structurées pour la récolte de nectar et leur corps pour la collecte de pollen. Leur comportement est adapté à la connaissance et à la manipulation des fleurs (Kevan and Baker, 1983).

#### **4.Pollinisation chez nos modèles d'étude**

Comme présenté précédemment, chez les Cucurbitacées, plusieurs conformations de fleurs sexuées sont possibles. *C. melo* est généralement monoïque ou andromonoïque, alors que *E. elaterium* est monoïque et très rarement dioïque. Chez les espèces monoïques, le transport de pollen d'une fleur mâle vers une fleur femelle est indispensable. Chez les espèces andromonoïques, les fleurs hermaphrodites sont auto-fertiles (Rosa, 1924). Cependant, la viscosité du pollen fait qu'il adhère à l'anthere après déhiscence, ce qui rend l'auto-pollinisation naturelle improbable (Free, 1993) et favorise la pollinisation croisée (Whitaker and Pryor, 1946). La pollinisation des Cucurbitacées est strictement entomophile (Free, 1993). En effet, elle n'est pas possible par le vent car le pollen est trop lourd et visqueux pour être transporté par ce vecteur (Rosa, 1924 ; Delaplane and Mayer, 2000).

#### **4.1.Cucumis melo var. cantalupensis**

##### **a.Production de nectar**

Peu de temps après l'ouverture des fleurs et la déhiscence des anthers, il y a sécrétion du nectar (McGregor and Todd, 1952). Chez les fleurs mâles, la sécrétion de nectar cesse vers 11h avec environ 3 mg produits. Chez les fleurs femelles, elle dure jusqu'à tard dans l'après-midi quand le nectar n'est pas collecté par les abeilles. On peut retrouver jusqu'à 18 mg de nectar à 16h (Mann, 1953 ; McGregor and Todd, 1952). Le nectar peut contenir jusqu'à 56% de sucres totaux dissous (STD) pour les fleurs mâles et 36% de STD pour les fleurs femelles (McGregor and Todd, 1952).

## **b. Les insectes pollinisateurs**

Les insectes pollinisateurs sont essentiels pour la production de melon cantaloup (McGregor *et al.*, 1965). Le principal insecte pollinisateur est l'abeille domestique, *Apis mellifera* (Rosa, 1924 ; McGregor and Todd, 1953 ; Sarehane, 1997) mais d'autres abeilles interviennent comme les Mégachiles ou les Melissodes (McGregor *et al.*, 1965). Par ailleurs, la coccinelle et d'autres petits coléoptères ainsi que des thrips sont souvent présents dans les fleurs de melon, mais n'ont pas d'activité pollinisatrice (McGregor and Todd, 1952).

## **c. Activité des abeilles**

Les abeilles visitent les fleurs de melon pour le pollen et le nectar (Delaplane and Mayer, 2000). Elles ne font pas de discrimination entre les deux types de fleurs, c'est-à-dire qu'elles visitent autant les fleurs mâles que les fleurs femelles (McGregor and Todd, 1952). Le temps moyen de visite d'une fleur est de 8 à 10 secondes (Mann, 1953 ; McGregor *et al.*, 1965). L'activité des abeilles est liée à la période d'anthèse (Mann, 1953). Les visites ont lieu principalement dans la matinée (McGregor *et al.*, 1965). L'activité des abeilles décroît dans l'après-midi et s'arrête vers 18h (Mann, 1953). Quand les abeilles butinent les fleurs mâles, une masse de pollen s'accumule sur leur corps. Quand une fleur femelle est ensuite visitée, le pollen est déposé par frottement sur la surface stigmatique exposée (McGregor and Todd, 1952). Lorsque la fleur mâle se ferme, 44 à 62% du pollen produit ont été prélevés, dont la moitié pendant les deux heures suivant l'anthèse (Stangellini *et al.*, 2002).

## **4.2. *Ecballium elaterium***

### **a. Production de nectar**

La production de nectar par les fleurs mâles débute après le lever du soleil, augmente rapidement entre 8h00 et 10h00 puis se stabilise (Rust *et al.*, 2003). Le volume de nectar produit par fleur varie en fonction des populations (Rust *et al.*, 2003) entre 0,25 µl/fleur (Fahn and Shimony, 2001) et 3 µl/fleur (Dukas, 1987). Sa concentration en sucres varie entre 23% de STD le matin et 56% de STD à midi (Dukas, 1987). Ce nectar est riche en saccharose (42% de saccharose versus 29% de glucose et 29% de fructose) (Petanidou, 2005).



Les fleurs femelles ne sécrètent pas des quantités mesurables de nectar. Ceci peut s'expliquer par les différences de taille et de structure entre les nectaires de fleurs femelles et mâles. Les fleurs mâles ont des nectaires plus larges et développés que ceux des fleurs femelles (Fahn and Shimony, 2001).

### **b.Pollinisation entomophile par duperie**

La pollinisation chez *E. elaterium* est particulièrement intéressante car elle se fait par duperie. En effet, les fleurs femelles ne produisent pas de quantité mesurable de nectar et n'offrent pas de pollen. Leur stratégie pour se faire visiter par des insectes est basée sur l'imitation, c'est-à-dire sur leur ressemblance morphologique avec les fleurs mâles qui offrent des récompenses (Dukas, 1987).

### **c.Insectes pollinisateurs et leur activité**

Les principaux insectes qui pollinisent *E. elaterium* sont les abeilles domestiques (*A. mellifera*) et les abeilles solitaires *Lasioglossom malachurum* et *Ceratina cyanea* (Rust et al., 2003).

Les abeilles domestiques discriminent les deux types de fleurs. Elles visitent jusqu'à 30% de moins les fleurs femelles que les fleurs mâles et ces visitent durent moins longtemps. Les abeilles sauvages visitent presque autant les fleurs femelles que les fleurs mâles en début de butinage. Au cours de la journée, elles apprennent à discriminer les deux types de fleurs, et les fleurs femelles sont de moins en moins visitées (Dukas, 1987).

## **5.Facteurs influençant la pollinisation entomophile**

Certains facteurs physiques environnementaux ont une influence sur l'activité des pollinisateurs et donc sur la pollinisation, comme la lumière, la température, l'humidité ou le vent.

La lumière intervient dans la perception de la différence jour nuit. Certains insectes sont diurnes alors que d'autres sont nocturnes ou crépusculaires. L'activité de certains insectes pollinisateurs est fonction de la lumière perçue. La lumière peut être modifiée par la présence de nuages ou d'orages qui favoriseront l'activité d'insectes crépusculaires.

L'effet de la température est assez lié à celui de la lumière, et marque plus un effet saisonnier. Ainsi la température la plus basse pour que l'abeille domestique vole activement est 10°C. L'humidité a une incidence indirecte sur la pollinisation, puisque ce facteur n'intervient pas sur l'activité des pollinisateurs mais sur la concentration en sucre du nectar. Enfin, le vent perturbe le vol alors que la pluie empêche toute activité des abeilles (Kevan and Baker, 1983).

### III. Abeille domestique

Comme tous les insectes de l'ordre des Hyménoptères, les abeilles ont une métamorphose complète de larve en nymphe et le métathorax soudé au premier segment abdominal. Leurs caractéristiques propres sont deux paires d'ailes membraneuses couplées par des crochets, des pièces buccales de type broyeur-lécheur, un dimorphisme sexuel bien marqué, un cerveau bien développé et des phénomènes de parthénogenèse fréquents, c'est-à-dire une reproduction sans fécondation (Le Conte, 2002). Les abeilles, au sens large, ont en commun un régime alimentaire exclusivement à base de nectar et de pollen, alors que les guêpes et les fourmis qui font partie du même ordre ont une alimentation d'origine végétale ou animale (Pham-Delègue, 1999).

La super-famille des Apoidea, représentant les abeilles en général, c'est-à-dire les abeilles solitaires et les abeilles sociales, comprend, de par le monde, 25 000 espèces. En Europe, on en retrouve seulement 2 500 dont 900 sont présentes en France. Cette super-famille est subdivisée en six familles : (i) les **Colletidae** qui ont une langue courte et bilobée, et pas de structure pour porter le pollen, (ii) les **Andrenidae** qui nidifient dans le sol, et dont la majorité sont strictement solitaires, (iii) les **Halictidae** qui sont parmi les abeilles les plus communes sur les fleurs et dont la plupart des espèces creusent leur nid dans le sol, (iv) les **Melittidae** dont quelques espèces nidifient dans le bois, mais la plupart dans le sol, (v) les **Megachilidae** dont beaucoup d'espèces sont d'importants pollinisateurs pour les cultures et (vi) les **Apidae** qui comprennent toutes les abeilles hautement sociales ou eusociales, dont l'abeille domestique (O'Toole and Raw, 1991).

Il existe différents niveaux de socialité depuis le stade solitaire où chaque femelle produit la prochaine génération mais ne vit pas avec, jusqu'au stade hautement social où la mère fondatrice vit avec plusieurs dizaines de milliers de descendants, en passant par plusieurs stades intermédiaires où plusieurs individus se tolèrent, jusqu'à s'entraider.

Les abeilles eusociales vivent en colonies pérennes constituées d'une reine, de toutes ses filles ouvrières et des mâles qui assurent la reproduction. Les reines et les ouvrières sont morphologiquement très différentes. De plus, la reine est incapable de vivre seule (elle ne butine jamais) et les ouvrières seules sont incapables de former des colonies viables car elles ne peuvent pas se reproduire et par conséquent constituer une nouvelle génération (Michener, 2000).

Les abeilles du genre *Apis* sont toutes mellifères, c'est à dire productrices de miel. Ce genre est constitué de cinq espèces : l'abeille domestique commune *A. mellifera*, les abeilles mellifères géantes, *A. dorsata* et *A. laboriosa*, l'abeille domestique indienne, *A. cerana* et l'abeille mellifère naine, *A. florea* (Winston, 1991).

L'habitat naturel de l'abeille domestique *A. mellifera* s'étend de la pointe sud de l'Afrique jusqu'au sud de la Scandinavie en passant par la savane, la forêt tropicale, le désert et le climat tempéré méditerranéen. La grande variété d'habitats, de conditions climatiques ou de flores a conduit à une différenciation de nombreuses sous-espèces ou races d'*A. mellifera* adaptées à chaque région (Louveaux, 1966). Ces races sont classées en quatre groupes en fonction de leur répartition : les races européennes, les races africaines, les races orientales, et les races américaines. Parmi les différentes races européennes, les plus utilisées dans le sud de la France sont *A. mellifera mellifera* L. et *A. mellifera caucasica* Gorb.

Dans la suite de ce rapport, l'abeille sera toujours synonyme de l'abeille domestique, *A. mellifera*, sauf mention contraire.

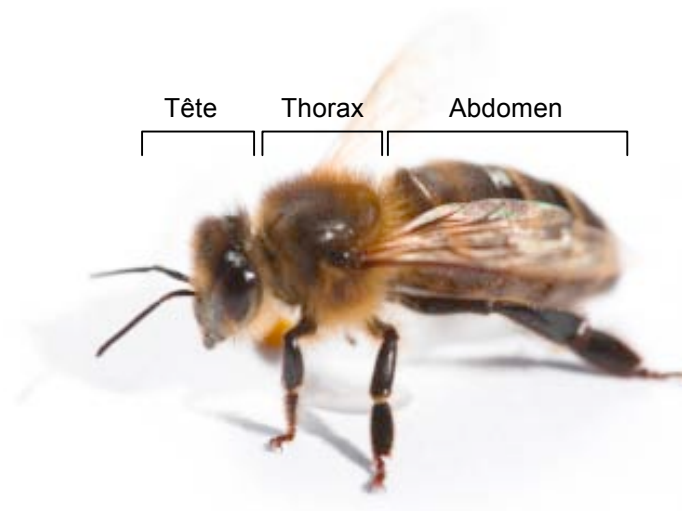
La description qui va suivre est une synthèse des ouvrages de Winston (1991) et Seeley (1995).

## **1. Anatomie de l'abeille**

### **1.1. Morphologie externe**

L'abeille domestique est constituée d'une série de plaques dures connectées entre elles par des membranes et recouvertes dans la plupart des régions par une multitude de poils. Ce squelette externe sert de protection contre les prédateurs, contre les pertes d'eau et sert de structure pour l'attache des muscles.

L'exosquelette et les parties internes sont arrangés en trois régions, la tête, le thorax et l'abdomen (Figure 9).



**Figure 9 : Vue d'ensemble d'une abeille ouvrière (*A. mellifera*).** Modifié d'après WolfWikis (2010).

### *La tête*

La tête porte extérieurement des organes sensoriels permettant d'analyser l'environnement et des pièces buccales permettant d'ingérer les aliments. Elle renferme le cerveau relié au système nerveux et les glandes hypopharyngiennes, labiales et mandibulaires qui participent à la digestion des aliments.

Les organes sensoriels sont constitués (i) d'une paire d'antennes qui permet de capter des odeurs et de percevoir le goût, (ii) de trois ocelles ou yeux simples qui détectent la lumière et régulent l'activité diurne et nocturne et (iii) d'une paire d'yeux composés qui perçoivent la couleur et les mouvements d'air et permettent à l'abeille de s'orienter.

Les pièces buccales de l'abeille domestique sont de type broyeur-lécheur. Elles consistent en une paire de mandibules et un proboscis composé des maxilles, du labre et de la glosse, la langue à proprement parler. Les mandibules permettent d'ingérer le pollen, de couper, de façonner, de manipuler la cire et la propolis, de nourrir le couvain et la reine, de nettoyer ou de se défendre. Le proboscis, quant à lui, permet d'ingérer des liquides tels le nectar, le miel et l'eau et intervient dans les échanges alimentaires et phéromonaux entre individus.

### *Le thorax*

Le thorax est constitué de trois segments, chacun portant une paire de pattes. De plus, les deux derniers segments portent chacun une paire d'ailes membraneuses servant

principalement au vol mais aussi à la ventilation du nid. Le thorax représente donc la principale région locomotrice du corps. Il contient des muscles puissants pour le vol et la marche et pour des fonctions spécialisées comme la collecte du pollen.

Les trois paires de pattes ont la même structure. Elles sont composées de six segments : (i) le coxa qui permet l'articulation avec le corps, (ii) le trochanter, (iii) le fémur, (iv) le tibia, (v) le tarse et (vi) le prétarse. Le tarse est composé de cinq sous-segments, le basitarse allongé et les quatre petits tarsomères. Le prétarse est le segment terminal qui constitue la pointe de la patte. Il comporte deux griffes et un coussinet permettant d'adhérer à un support.

Les pattes des ouvrières assurent les fonctions de nettoyage et de rassemblement du pollen et de la propolis sur les pattes arrière pour le transport au nid. Les pattes avant ont des touffes poilues sur leurs tarses pour nettoyer la poussière, le pollen ou d'autres éléments étrangers présents sur la tête. Ces pattes possèdent également des structures de nettoyage des antennes pour qu'il n'y ait pas de matériel pouvant interférer avec les fonctions sensorielles. Les pattes moyennes, également poilues, servent à débarrasser les poils thoraciques de corps étrangers ou de pollen et à transférer le matériel collecté de l'avant vers les pattes arrière. Les pattes arrière sont hautement modifiées pour le transport de pollen et de propolis. Les tibias élargis possèdent sur la face externe une région concave, la corbicule, portant une soie unique en son centre pour l'ancrage des charges de matériel et entourée de poils (Hodges, 1967). L'extrémité de la face interne du tibia est bordée par un peigne. Le basitarse est également modifié. Il possède contre le tibia une zone aplatie, le pressoir, et il porte sur sa face interne des séries régulières de poils rigides qui forment une brosse.

### *L'abdomen*

L'abdomen qui constitue la partie la plus volumineuse du corps est composé de sept segments visibles et contient la majeure partie des systèmes internes et le dard.

## **1.2.Systèmes internes**

### **a.Système glandulaire**

Les glandes des ouvrières assurent quatre fonctions : (i) la production de cire par des cellules épidermiques modifiées localisées ventralement du 4<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> segment abdominal, (ii) la communication grâce aux glandes de Nasonov, aux glandes mandibulaires et aux glandes du

dard, (iii) la défense par la glande à poison, grande poche associée au dard qui délivre le venin et (iv) le traitement des aliments.

Deux types de glandes interviennent dans le traitement des aliments, celles qui digèrent partiellement la nourriture comme les glandes labiales ou salivaires, et celles qui sont impliquées dans la production de la nourriture du couvain, comme les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires.

La salive que les abeilles incorporent à la nourriture en remplissant leur jabot se compose probablement d'un mélange des sécrétions des glandes hypopharyngiennes et salivaires (Chauvin, 1968).

#### *Glandes impliquées dans la digestion des aliments*

Les glandes salivaires sont présentes chez toutes les castes de l'abeille. Elles sont constituées de deux glandes, la glande postcerebralis située dans la tête et la glande thoracique, et possèdent le même canal excréteur (Chauvin, 1968). Elles sont développées chez les ouvrières et les reines mais réduites chez les mâles. La taille des glandes varie en fonction de l'âge de l'abeille (Costa and Cruz-Landim, 2001). Le pic maximum d'activité de ces glandes a lieu entre 8 et 17 jours, puis il décline rapidement avec le changement d'activité des abeilles en garde ou butineuse (Winston, 1991). La fonction la plus probable de ces glandes est la sécrétion de salive pour ramollir la nourriture stockée dans la ruche avant ingestion, et de la digérer partiellement. Les sécrétions glandulaires semblent également servir à nettoyer les surfaces avec la langue. Elles sont libérées dans le système salivaire et pourraient être mélangées avec la nourriture avant l'ingestion (Costa and Cruz-Landim, 2001). Elles contiennent différentes enzymes dont l' $\alpha$ -glucosidase qui est une invertase. Cette enzyme catalyse la digestion des di-, oligo- et polysaccharides et accomplit la phase finale de la digestion de l'amidon (Bergmeyer, 1984). Elle pourrait agir sur la transformation du nectar en miel (Costa and Cruz-Landim, 2002).

#### *Glandes impliquées dans la production des aliments*

La glande hypopharyngienne se situe dans la tête et se compose de deux tubes garnis de glandules qui déversent leurs sécrétions dans un canal collecteur aboutissant à la plaque pharyngienne. Ce canal s'ouvre en fonction des déplacements de cette plaque. Seules les ouvrières possèdent cette glande à l'état complètement développé. Chez la reine, elle est rudimentaire alors qu'elle est souvent absente chez les mâles (Chauvin, 1968). Le stade de

développement, la fonction et la sécrétion de la glande hypopharyngienne dépendent de l'âge, de la nourriture et de la fonction de l'abeille. Son cycle sécrétoire est étroitement lié à la fonction d'alimentation du couvain, qui est assurée par les nourrices âgées de 3 à 18 jours (Costa and Cruz-Landim, 2005). Le développement est maximum 10 jours après éclosion, et après 3 à 4 semaines (stade butineuse), la glande s'atrophie (Chauvin, 1968). La fonction de cette glande est inconnue chez la plupart des Hyménoptères, mais elle produit des enzymes chez la majorité des espèces. Chez les abeilles eusociales, elle est modifiée pour produire en plus des substances nutritives (Cruz-Landim and Costa, 1998). En effet, chez les nourrices d'*A. mellifera*, la glande hypopharyngienne produit la plupart des protéines de la gelée royale qui est la nourriture donnée principalement aux jeunes larves et à la reine (Costa and Cruz-Landim, 2005). La glande hypopharyngienne produit des  $\alpha$ -glucosidases et des  $\beta$ -glucosidases (Arnold and Delage-Darchen, 1978). Ces dernières se trouvent en grande quantité seulement chez les nourrices et les butineuses. Elles hydrolysent les sucres tels que le cellobiose, l'hémicellulose, le gentiose et les domaines carbohydratés des glycoprotéines (Costa and Cruz-Landim, 2005) et pourraient avoir un effet sur certains composants du pollen (Costa and Cruz-Landim, 2002).

La composition de la sécrétion des glandes mandibulaires varie en fonction de l'âge des ouvrières mais est composée principalement d'acides aliphatiques (Keeling *et al.*, 2000). Chez les jeunes ouvrières nourrices, ces glandes sont impliquées dans la production de la nourriture du couvain, particulièrement en produisant de l'acide (E)-10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA), le principal composant lipidique de cette nourriture (Butenandt and Rembold, 1957), de l'acide octanoïque et d'autres acides volatiles. La sécrétion de la glande mandibulaire sert également à ramollir et à manipuler la cire et la propolis, et à dissoudre le revêtement lipidique du pollen. Elle est nécessaire pour la construction et pour la récolte et l'emploi de la propolis (Chauvin, 1968).

### **b. Autres systèmes internes**

Les autres systèmes internes sont le système digestif, le système excréteur, le système circulatoire, le système respiratoire et le système nerveux.

Le système digestif est composé de l'hypopharynx externe et du pharynx situés dans la tête et reliés par un long œsophage au jabot ou estomac de l'abeille. Cette poche extensible se trouve dans l'abdomen et contient le miel ingéré dans la ruche et utilisé comme source d'énergie



durant le vol ou le nectar et l'eau collectés par les butineuses. Le jabot débouche sur le ventricule où se font la digestion et l'absorption. Ce dernier est séparé de l'intestin antérieur par le pylore, d'où partent les tubes de Malpighi qui filtrent les déchets azotés présents dans l'hémolymphe et les rejettent dans l'intestin. Les déchets solides s'accumulent dans l'ampoule rectale avant d'être excrétés.

Le système circulatoire ouvert assure le transport de l'hémolymphe depuis l'extrémité de l'abdomen où se situent cinq ventricules dorsaux qui projettent l'hémolymphe dans une aorte thoracique jusqu'à la tête. Le retour de l'hémolymphe vers l'abdomen est assuré par des contractions de muscles abdominaux.

Le système respiratoire est constitué de stigmates, ouvertures dans la cuticule permettant l'entrée d'air, reliés à un réseau de trachées qui se ramifient en trachéoles de plus en plus fines apportant l'oxygène à toutes les parties de l'organisme. Les trachées se dilatent localement en de nombreux sacs à air qui diminuent la densité de l'insecte, favorisant ainsi un grand volume pour un poids réduit au minimum.

Le système nerveux est composé de deux parties : (i) le système nerveux central formé du cerveau et de la chaîne nerveuse ventrale ganglionnaire qui commandent les mouvements et assurent les relations entre l'abeille et son environnement, et (ii) le système stomatogastrique, qui commande le fonctionnement des organes internes.

## ***2. Composés de l'abeille***

Les phéromones sont des substances messagères entre les individus. Ce sont des substances chimiques qui peuvent soit stimuler ou inhiber un comportement, soit enrayer un processus physiologique. Elles sont sécrétées par des glandes puis excrétées à l'extérieur de l'individu. A la différence des hormones, les phéromones ne sont pas véhiculées par le sang, mais par les individus dans un groupe social (Pain, 1971). Reçues par un deuxième individu de la même espèce, elles provoquent chez lui une réaction définie qui modifie son comportement ou sa physiologie (Karlson and Butenandt, 1959 ; Karlson and Luscher, 1959).

Wilson (1963) ainsi que Regnier et Law (1968) classent les phéromones en deux groupes, les phéromones de déclenchement et les phéromones d'amorçage. Les phéromones de déclenchement stimulent une réponse comportementale instantanée transmise par le système nerveux, comme les phéromones d'alarme et d'agrégation (Pain, 1971 ; Pankiw, 2004a). Les phéromones d'amorçage, quant à elles, sont capables de modifier profondément la physiologie des individus qui les reçoivent, avec un effet différé. Elles servent à coordonner le

développement physiologique et comportemental de plusieurs individus (Pain, 1971 ; Le Conte and Hefetz, 2008).

Les *phéromones d'alarme* ou d'alerte perturbent le comportement en accélérant la marche ou le vol, en augmentant l'agressivité jusqu'à l'attaque (Pain, 1971). Chez les ouvrières âgées, les glandes mandibulaires produisent du 2-heptanone qui est une des substances d'alarme (Shearer and Boch, 1965). Les phéromones produites par les glandes du dard sont des éliciteurs du comportement de défense. Elles sont libérées lorsque les abeilles sortent leur dard et ventilent ou lorsque leur dard est arraché. Elles contiennent de l'acétate d'isoamyl qui excite les ouvrières et les attire vers la victime potentielle et d'autres composés comme le 2-nonanol qui élicitent également des comportements d'alarme.

La *phéromone de Nasonov* permet l'agrégation des abeilles. Elle assure la cohésion des essaims et permet l'orientation notamment à l'entrée de la ruche ou sur les sites de récolte de l'eau ou sur les fleurs. Il s'agit d'un mélange de sept composés chimiques produits par la glande de Nasonov (Slessor *et al.*, 2005).

La reine induit d'autres types d'agréations. Elle produit la *phéromone sexuelle* lui permettant d'attirer les mâles durant le vol de reproduction (Gary, 1962). Elle produit également une phéromone constituée de cinq composés synthétisés par la glande mandibulaire et de quatre autres composés. Cette *phéromone royale* signale la présence de la reine et attire les ouvrières pour qu'elles s'occupent d'elle, c'est le comportement de cour (Slessor *et al.*, 2005).

La *phéromone de couvain* peut également déclencher un comportement de soin chez les ouvrières. Elle est constituée d'un bouquet de 10 esters d'acides gras présents sur la cuticule des larves et signale aux ouvrières le moment d'operculer les cellules avant la pupation et les recrute pour cette tâche (Le Conte *et al.*, 1990). Les changements dans les proportions des différents esters de cette phéromone permettent d'indiquer aux ouvrières l'âge des larves (Slessor *et al.*, 2005). La phéromone de couvain est également une phéromone d'amorçage. Elle stimule le développement des glandes hypopharyngiennes des nourrices qui produisent des protéines de l'alimentation des larves (Mohammedi *et al.*, 1996).

La phéromone royale et la phéromone de couvain ont des effets modificateurs communs. Elles agissent ensemble pour inhiber le développement ovarien des ouvrières (Slessor *et al.*, 2005). Une des substances impliquées dans cette inhibition a été récemment identifiée par Maisonnasse *et al.* (2009). Il s'agit d'une molécule hautement volatile, l'E- $\beta$ -ocimène, qui est produite par les larves. D'autres substances synthétisées par la reine, plus précisément par les glandes mandibulaires et probablement par les glandes tergaes, participent à cette inhibition (Le Conte and Hefetz, 2008). La phéromone royale et la phéromone de couvain ont également

un effet sur la division des tâches des ouvrières. Elles régulent, en effet, l'âge de butinage des abeilles (Le Conte *et al.*, 2001).

Les butineuses produisent également une *phéromone qui retarde l'âge de butinage*, indépendamment de la reine ou du couvain (Leoncini *et al.*, 2004a). Pankiw (2004b) a montré que des substances extraites de la surface du corps de butineuses produisaient cet effet. De plus, Leoncini *et al.* (2004b) ont identifié une substance produite par les ouvrières adultes, l'oléate d'éthyl, qui agit en tant que facteur inhibiteur chimique retardant également l'âge de début de butinage. Cette substance synthétisée *de novo* est présente en très faible quantité sur la cuticule des butineuses, mais en très grande concentration dans le jabot. Cela suggère que l'oléate d'éthyl est transféré entre les abeilles par trophallaxie.

Il existe d'autres substances présentes sur la surface du corps que Wilson (1965) appelle *phéromones de surface* et les définit comme toutes les odeurs absorbées à la surface du corps des insectes, sur le tégument cireux et perçues par chimioréception de contact. Elles sont constituées des substances glandulaires, de substances propres au groupe, des cires constituant le nid, et également de l'odeur des aliments ou des fleurs visitées (Pain, 1971).

Ces lipides présents sur la cuticule agissent comme une carte d'identité qui permet aux abeilles de reconnaître les membres de leur propre colonie (Zupko *et al.*, 1993). Ce système de communication est basé sur les différences de composition chimique des profils cuticulaires (Leonhardt *et al.*, 2009). Les lipides cuticulaires permettent également de préserver les individus de la dessiccation, de l'abrasion de la cuticule et des infections. Les principales classes de substances de lipides cuticulaires sont des hydrocarbures aliphatiques saturés ou insaturés (alcane et alcènes non-polaires, mono-, di- et tri-méthylés) et des composés polaires comme des acides carboxyliques, des esters ou encore des alcools et des aldéhydes à longues chaînes (Leonhardt *et al.*, 2009). Les hydrocarbures aliphatiques constituent la plus grande fraction de la cire cuticulaire. Leur profil est caractéristique des castes et du type d'ouvrières. Les cires cuticulaires des ouvrières contiennent majoritairement des esters alkyl (34-39%), des alcènes (15-18%) et des alcanes (14-17%). Plus particulièrement chez les butineuses, ces cires contiennent plus d'esters alkyl insaturés et d'alcool et moins d'acides que chez les autres ouvrières (Fröhlich *et al.*, 2001).

La surface du corps des abeilles possède également un système protéolytique composé de protéines cuticulaires et de leurs protéases naturelles associées (Grzywnowicz *et al.*, 2009). Elles pourraient avoir pour origine les sécrétions des glandes tarsales que l'abeille répandrait sur son corps en se nettoyant ou les glandes de l'épiderme, dont les canaux s'ouvrent sur la

surface cuticulaire (Zupko *et al.*, 1993). Ces protéines de surface pourraient participer au système immunitaire. Chez certains insectes, elles possèdent une activité antibactérienne (Zupko *et al.*, 1993). Chez les abeilles, elles pourraient également agir en tant que phéromone de contact ou moduler les réponses aux phéromones en ralentissant la libération de substances (Zupko *et al.*, 1993 ; Grzywnowicz *et al.*, 2009).

### 3. Développement et nutrition de l'abeille

#### 3.1. Développement

Le développement des trois castes d'abeilles passe par quatre stades : (i) l'œuf qui, s'il est fécondé, se développe en ouvrière ou reine, sinon en mâle, (ii) la larve qui subit cinq mues, (iii) la pupa qui subit une maturation interne et (iv) l'adulte (Figure 10). Le temps total moyen de développement depuis la ponte jusqu'à l'émergence pour les abeilles européennes est de 16 jours pour la reine, de 21 jours pour les ouvrières et de 24 jours pour les mâles. Ce temps peut varier (entre 16 et 24 jours pour les ouvrières par exemple) en fonction de la température ou de la nutrition.

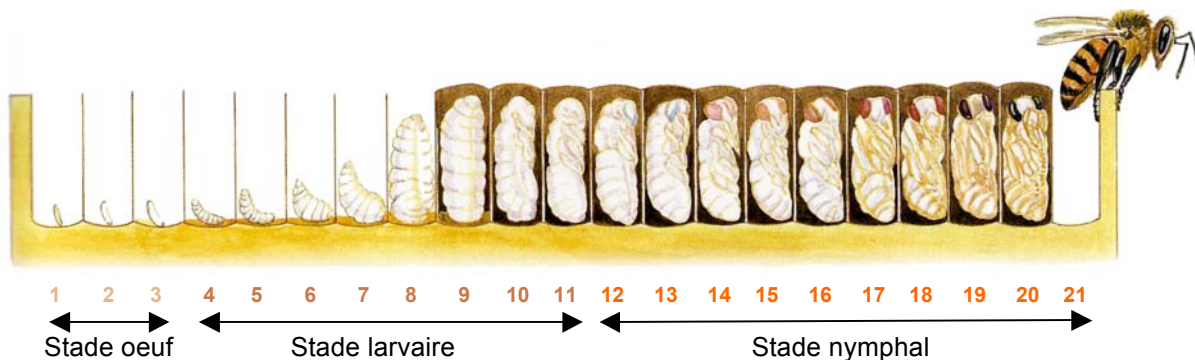


Figure 10 : Développement de l'abeille ouvrière jusqu'à émergence. Modifié d'après Clément (2002).

Après émergence, l'adulte immature finit son développement en 8 à 10 jours. Sa cuticule se renforce et son système glandulaire finit de se développer. Ce dernier ne peut se faire correctement que si la jeune abeille consomme du pollen en quantité suffisante.

La durée de vie des abeilles varie fortement, principalement en fonction de la caste et secondairement en fonction des facteurs saisonniers, de la disponibilité en nourriture, des activités assurées durant leur vie et de la race. De manière générale, en climat tempéré, les ouvrières ont une durée de vie courte en été (15-38 jours), intermédiaire au printemps et à

l'automne (30-60 jours) et longue en hiver (en moyenne 120 jours). Les ouvrières en hiver ont une durée de vie plus longue car elles sont relativement inactives et ont un métabolisme plus lent que les abeilles d'été. Les mâles vivent environ 21 à 32 jours et les reines, qui ont la plus grande longévité, vivent environ 3 ans.

### **3.2.Nutrition**

La base alimentaire de l'abeille, quelque soit la caste ou le stade de développement, est composée de nectar et de pollen. Ces deux produits floraux fournissent tous les éléments nécessaires aux bons développement et fonctionnement de l'abeille.

La source principale d'énergie de l'abeille provient des hydrocarbures contenus sous forme de sucres dans le nectar. Le nectar est collecté par les abeilles butineuses qui le transportent jusqu'à la ruche dans leur jabot. Il peut être donné directement au couvain ou aux adultes, mais il est plus souvent transformé en miel. Dans ce cas, il est transféré à des ouvrières qui lui ajoutent dans leur jabot des enzymes produites par les glandes hypopharyngiennes. Ces enzymes permettent (i) de transformer les polysaccharides en sucres simples plus facilement digérés par les abeilles et (ii) de le protéger d'attaques bactériennes. Le nectar est ensuite évaporé d'abord sur la langue des ouvrières puis par ventilation de la cellule dans laquelle il est placé. Le nectar est mature et appelé miel lorsque les transformations enzymatiques et l'évaporation (contenu en eau inférieur à 18%) sont terminées. La cellule qui le contient est alors operculée par une couche de cire jusqu'à utilisation.

Le pollen constitue la seule source de protéines naturellement disponibles pour l'abeille. Il fournit également d'autres éléments essentiels comme les stérols. Le pollen collecté par les butineuses est traité par les ouvrières dès qu'il arrive à la ruche. Tout en le déposant dans des cellules, elles lui ajoutent du miel régurgité pour limiter le développement bactérien et la germination.

Bien que le nectar et le pollen soient les sources principales de nourriture, l'abeille peut y ajouter d'autres substances dans certains cas. Ainsi, la nourriture du couvain, donnée aux larves en complément du miel et du pollen, est constituée de sécrétions hypopharyngiennes et mandibulaires. De plus, dans le cas particulier des larves de reines, les ouvrières synthétisent

de la gelée royale qui est de la nourriture de couvain additionnée de substances sécrétées par les glandes mandibulaires comme le 10-HDA.

## **4. Activités des ouvrières**

### **4.1. Polyéthisme**

Les activités assurées par les ouvrières sont multiples et liées à leur âge, on parle de polyéthisme. Il dépend surtout de l'état de développement du système glandulaire des ouvrières. De manière générale, après émergence, une ouvrière est nettoyeuse, puis lorsque ses glandes hypopharyngiennes deviennent actives, la jeune ouvrière (3 jours) devient nourrice, elle alimente le couvain à partir de ses sécrétions glandulaires, de miel et de pollen. L'ouvrière d'âge moyen (12 jours), capable de sécréter de la cire, devient maçonne. L'ouvrière plus âgée, dont les glandes hypopharyngiennes produisent les enzymes impliquées dans la transformation du nectar en miel, assure l'activité de manutentionnaire. Elle récupère les charges des butineuses et les stocke dans des cellules en leur ajoutant des sécrétions glandulaires. A partir de 20 jours et jusqu'à la fin de sa vie, l'ouvrière devient butineuse et collecte du nectar, de l'eau, du pollen et de la résine végétale.

En réponse aux changements des conditions d'une colonie, le développement comportemental des ouvrières peut être accéléré, retardé ou même inversé (Robinson, 1992). Ainsi dans des colonies qui manquent de butineuses, certaines abeilles initient le butinage dès 5 jours après émergence, soit deux semaines plus tôt que d'habitude (Leoncini *et al.*, 2004b).

### **4.2. Butinage**

Le comportement de butinage est développé chez les ouvrières les plus âgées. Il sert à récolter des ressources essentielles à la colonie, principalement nutritives comme le nectar, le pollen et l'eau, mais aussi des résines.

La collecte d'éléments liquides s'effectue grâce au proboscis. L'abeille place sa langue au contact de la substance et l'aspire par pompage et capillarité. Le liquide collecté est stocké dans le jabot. Quand ce dernier est plein, la butineuse retourne au nid se décharger auprès des ouvrières manutentionnaires.

En ce qui concerne le pollen, l'abeille le collecte en charge humide, c'est-à-dire que pour faciliter son agglomération et donc son transport, elle le mélange à des régurgitations du jabot pour le rendre plus collant. Le pollen peut être collecté à partir des anthères de deux manières, (i) par des mouvements actifs de frottement des pattes et du proboscis contre les anthères, ou (ii) passivement lors du passage de l'abeille contre les anthères (Thorp, 2000). Le pollen est retenu sur le corps de l'abeille par les poils branchus qui le recouvrent. L'abeille frotte son proboscis avec ses pattes antérieures pour les enduire de régurgitations. Le pollen est ensuite récupéré par frottement des différentes pattes sur le corps puis est transféré sur les brosses des pattes postérieures. Le frottement du peigne sur chaque brosse opposée permet de récupérer et transférer le pollen sur le pressoir. Le pollen est ensuite compacté dans la corbicule par des mouvements de pompage jusqu'à formation d'une pelote.

Il existe différents types de butineuses pour le nectar et le pollen : (i) les butineuses strictes de nectar, (ii) les butineuses strictes de pollen et (iii) les butineuses mixtes. Les butineuses de nectar ne visitent les fleurs que pour récupérer du nectar. Ainsi, elles peuvent se retrouver couvertes de pollen par passage contre les anthères et vont plutôt se nettoyer si ce pollen est présent en trop grande quantité plutôt que de le compacter pour le ramener au nid (Thorp, 2000). Les butineuses de pollen, quant à elles, récoltent également du nectar mais en petite quantité pour consolider les pelotes (Davis, 1997). Enfin, les butineuses mixtes, qui sont minoritaires, récoltent les deux ressources (Free, 1960).

CHAPITRE 2 – ONTOGENESE ET CONFORMITE DU POLLEN  
CHEZ *ECBALLIUM ELATERIUM* ET *CUCUMIS MELO*





## I. Introduction

Chez les Angiospermes, la qualité du pollen est un des facteurs critiques du succès reproductif. Le pollen produit doit être (i) fonctionnel, c'est-à-dire posséder toutes les propriétés biologiques lui permettant d'accomplir la reproduction *via* le convoyage et la production des gamètes mâles, et (ii) génétiquement conforme, les gamètes doivent être garants de l'identité génétique de la plante-mère et de l'espèce. L'ensemble de ces caractéristiques sont déterminées durant son ontogenèse. Celle-ci se déroule en trois grandes étapes, (i) la pré-méiose avec la différenciation de cellules sporogènes puis des cellules mères des microspores (CMM), (ii) la méiose des CMM qui aboutit à la formation de quatre microspores haploïdes et (iii) la post-méiose comprenant la division des microspores formant les grains de pollen et leur maturation (synthèse de réserves et déshydratation). Cependant, cette ontogenèse peut s'accompagner d'anomalies qui conduisent à la formation de grains de pollen non conformes (Bretagnolle and Thompson, 1995). En particulier, des dysfonctionnements peuvent perturber les mécanismes méiotiques, notamment lors de la réduction du nombre de chromosomes, de leur ségrégation et de la cytokinèse. Il en résulte la formation de grains de pollens altérés pouvant être non-réduits ( $2n$ ), polyploïdes, aneuploïdes (Goluboskaya, 1989) ou encore anucléés (Bosco *et al.*, 1999). Mendes-Vieira *et al.* (2005) et Fuzinato *et al.* (2007) ont observé un autre type de dysfonctionnements, la dégénérescence de méiocytes et de microspores. Il est à noter que ces anomalies ont été essentiellement observées chez des hybrides issus de croisements interspécifiques ou chez des plantes ayant des niveaux de ploïdie particuliers, haploïdes ou polyploïdes. Dans le présent travail, nous avons recherché si ces anomalies pouvaient avoir lieu chez les deux espèces qui ont fait l'objet de cette étude : *C. melo* et *E. elaterium*.

Ce chapitre présente l'étude de l'ontogenèse du pollen chez les deux espèces depuis les cellules sporogènes jusqu'au pollen mature en utilisant une approche cytologique en microscopie photonique. La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour décrire la morphologie fine du pollen mature. Les anomalies susceptibles de se mettre en place lors de ce processus ontogénique ont également été abordées. Pour cela, une approche cyto-histologique en microscopie photonique a été utilisée pour (i) identifier les divers types d'anomalies ayant lieu durant l'ontogenèse et plus précisément pour (ii) quantifier les dégénérescences cellulaires aux différents stades de développement du pollen et (iii)

quantifier et caractériser les produits post-méiotiques anormaux. Les résultats ont été discutés en termes de comportement biologique et d'intégrité génétique.

## **II. Ontogenèse du pollen d'*E. elaterium* et de *C. melo***

L'ontogenèse du pollen des Angiospermes est étudiée depuis très longtemps et est maintenant bien connue. Pourtant, peu d'informations sont disponibles à propos de l'ontogenèse du pollen des Cucurbitacées. Quelques travaux, pour la plupart très anciens, ont eu pour objet l'étude du développement des structures reproductrices mâles des Cucurbitacées. Néanmoins, l'ontogenèse a rarement été étudiée dans son ensemble. La majorité des auteurs se sont intéressés uniquement aux aspects cytologiques et cytogénétiques de la microsporogenèse (Castetter, 1926 ; Passmore, 1930), exceptés Kirkwood (1906) et Simeonova *et al.* (1999) qui ont décrit l'ontogenèse complète du pollen chez certaines Cucurbitacées. Une description succincte de la formation du pollen chez *C. melo* a été rapportée par Chauhan et Singh (1968). Cependant, à notre connaissance, aucune description n'a été faite chez *E. elaterium*, et la description de l'ontogenèse chez *C. melo* nécessitait d'être approfondie. Il était donc nécessaire, avant de nous intéresser aux structures non conformes, de caractériser le développement normal du pollen chez *E. elaterium* et *C. melo*.

### **1. Matériels et Méthodes**

#### **1.1. Matériel végétal**

De jeunes plantes d'*E. elaterium* ont été collectées dans une population sauvage localisée à Caumont-sur-Durance (Vaucluse) en janvier 2007. Ces plantes ont été transplantées dans des pots en plastique et placées en serre à la Faculté des Sciences de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse où elles étaient irriguées deux fois par semaine. Ces plantes ont été ensuite transplantées en champ à l'INRA d'Avignon où elles ont reçu des soins horticulturaux limités : faible irrigation, aucun contrôle de ravageurs.

Des graines de melon (*C. melo* L.) var. Thorgal ® (Nunhems) ont été semées en godet individuel et gardées sous serre jusqu'au stade « deux vraies feuilles » à l'unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, INRA Avignon domaine Saint-Maurice. Les jeunes plantules ont été ensuite plantées sur sol paillé sous tunnel insect-proof à l'INRA Avignon domaine Saint-Paul et irriguées trois fois par jour.

## **1.2. Microscopie photonique**

### **a. Récolte et préparations des échantillons**

En octobre 2007, des boutons floraux mâles d'*E. elaterium* de différentes tailles ont été prélevés. Ils ont été classés en fonction de leur diamètre en six classes : < 2 mm, 2-3 mm, 3-4 mm, 4-5 mm, 5-6 mm et > 6 mm. La récolte des échantillons de *C. melo* a été faite en septembre 2009. Des boutons floraux mâles de différentes tailles ont été prélevés mais n'ont pas été triés.

Immédiatement après récolte, tous les échantillons ont été fixés dans une solution extemporanée de paraformaldéhyde à 4% dans du tampon phosphate 0,05 M pH 7,5. Pour assurer une bonne pénétration du fixateur, le périanthe des boutons floraux a été retiré et les échantillons ont été soumis au vide pendant 20 minutes. Après 48 h de fixation à 4°C, les échantillons ont été rincés à l'eau distillée et stockés dans de l'éthanol 70% à 4°C jusqu'à utilisation.

### **b. Préparations et observations microscopiques**

#### *Sections colorées*

Entre 6 et 13 boutons floraux d'*E. elaterium* ont été préparés pour chaque classe de diamètre. Pour *C. melo*, 62 boutons floraux toutes tailles confondues ont été préparés. Les échantillons ont été déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (80%, 90%, 95% et 100%) puis inclus dans de la résine de méthacrylate (Kit Technovit 7100, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Des sections sériées de 3 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome à rétraction (Supercut 2065, Reichert-Young, Vienne, Autriche) et collectées sur des lames porte-objet. Les sections ont été hydratées (eau distillée) avant d'être colorées à l'acide périodique-réactif de Schiff (PAS) et au Naphtol Blue Black (NBB) pour visualiser respectivement les polysaccharides en rose et les protéines en bleu. Après séchage, les sections ont été montées de manière permanente (Isomount, Labonord, Templemars, France).

#### *Montage in toto*

Des anthères d'*E. elaterium* récoltées à l'anthèse ont été immergées dans une goutte de carmin acétique à 1% sur une lame de microscope. Ce colorant permet de visualiser les

cytoplasmes et les noyaux en rouge. Après mise en suspension du pollen, les anthères ont été retirées. L'ensemble a été recouvert d'une lamelle couvre-objet.

### *Observations microscopiques*

Les sections et les montages *in toto* ont été observés avec un microscope (Leica DMR, Wetzlar, Allemagne) et photographiés avec une caméra digitale (Leica DFC 300 FX, Wetzlar, Allemagne).

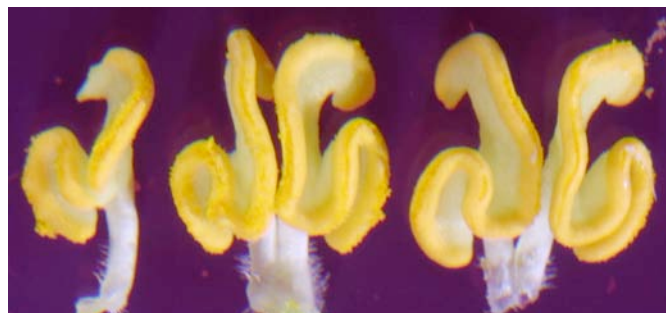
## **1.3. Microscopie électronique**

Des fleurs d'*E. elaterium* et de *C. melo* ont été récoltées à l'anthèse. La préparation des échantillons ainsi que leur observation ont été réalisées par le laboratoire de microscopie de l'INRA d'Avignon. Pour cela, des grains de pollen ont été déposés par tapotement des anthères sur un support métallique recouvert d'un adhésif double face. Ils ont été recouverts d'une fine couche d'or à l'aide d'un métalliseur (Balzers SCD 004, Bal Tec AG, Fürstentum, Lichtenstein). Les échantillons ont ensuite été observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage à 10 KV (Philips FEI XL30, FEG, FEI Company, Hillsboro, USA).

## **2. Résultats**

### **2.1. Description cyto-morphologique de l'ontogenèse du pollen d'*E. elaterium* et de *C. melo***

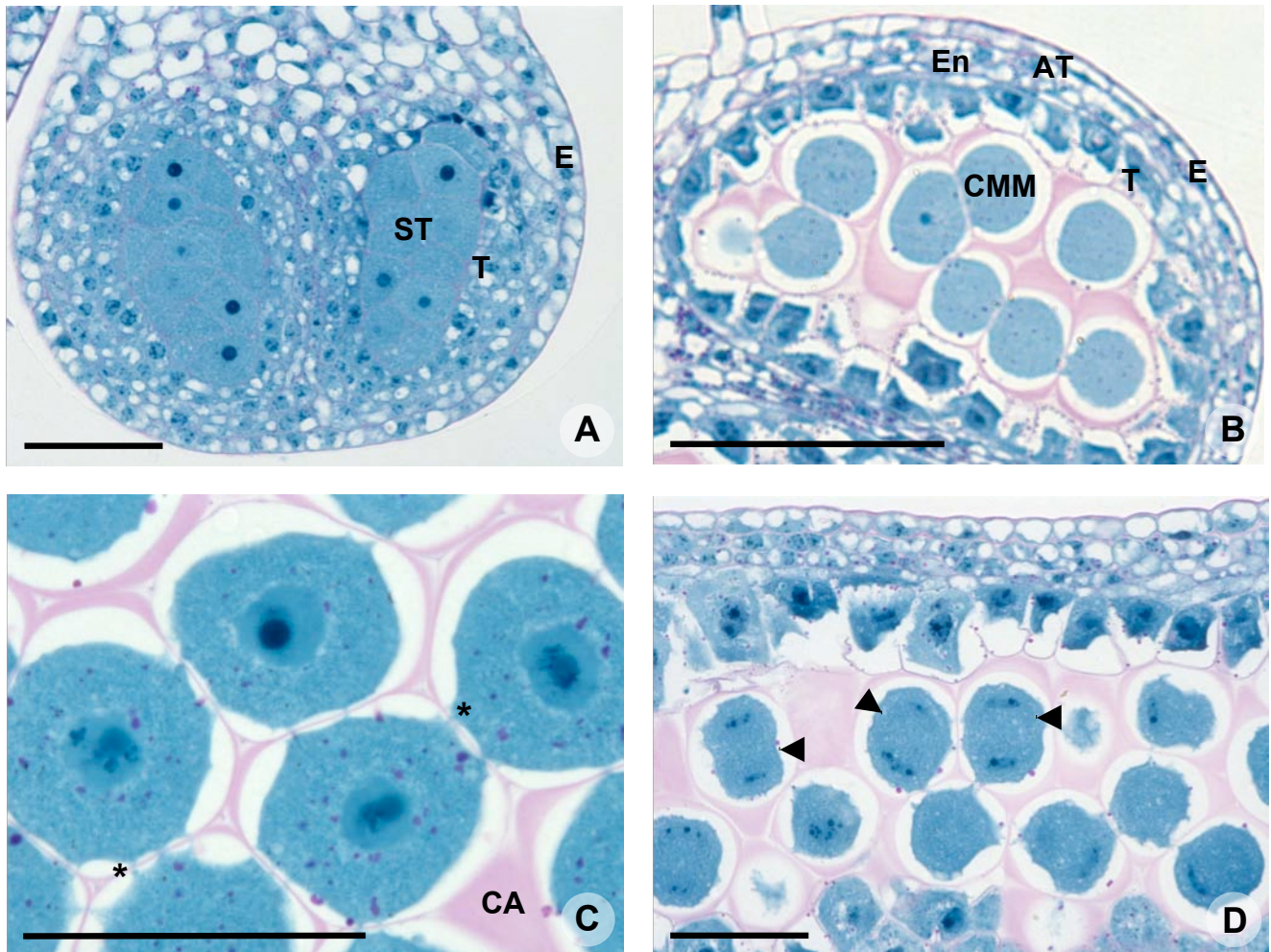
L'appareil reproducteur mâle d'*E. elaterium* et de *C. melo* est composé de deux paires d'anthères soudées et d'une anthère libre (Figure 11). Les anthères d'*E. elaterium* semblent être bisporangées. Les thèques de grande taille présentent d'importants repliements et sont reliées au filet par un connectif bien développé.



**Figure 11 : Androcée d'*E. elaterium*.** De droite à gauche, les deux paires d'anthères soudées et l'anthère libre.

L'observation en microscopie photonique des sections de boutons floraux nous a permis de caractériser les différents stades de l'ontogenèse du pollen chez *E. elaterium* et chez *C. melo*. L'anthère, au début de l'ontogenèse, est composée d'une partie centrale occupée par un tissu massif constitué de cellules sporogènes entourées de plusieurs couches cellulaires et d'un épiderme (Figure 12A et Figure 13A). Les cellules sporogènes présentent un contour anguleux et une paroi fine. Elles contiennent un cytoplasme exempt de vacuole et riche en protéines, et un noyau central volumineux contenant un nucléole important. Ces caractéristiques témoignent d'une forte activité métabolique.

Les cellules sporogènes se différencient par accroissement en méiocytes ou CMM (Figure 12B et Figure 13B). Parallèlement à la préparation de la méiose qui se signale par la condensation des chromosomes, les cellules accumulent des réserves sous forme d'amidon et s'entourent d'une épaisse couche de callose qui les individualise (Figure 12C). A plusieurs endroits, la couche de callose présente des interruptions par lesquels passent des trabécules cytoplasmiques qui établissent un continuum entre les CMM (Figure 12C et Figure 13B). Durant ce stade, les tissus de l'anthère se différencient en trois couches : le tapis, l'endothécium et l'assise transitoire toujours protégées par l'épiderme (Figure 12B et Figure 13B). Les CMM entrent ensuite en méiose (Figure 12D, Figure 13C et D) qui se déroule de manière simultanée. En effet, il n'y a pas de cytokinèse entre les deux divisions méiotiques comme le montre l'absence de phragmoplaste suite à la télophase I (Figure 12D et Figure 13C) et la présence des deux fuseaux lors de la seconde division méiotique (Figure 13D). Les cellules du tapis, quant à elles, augmentent de volume, synthétisent des substances comme l'amidon et deviennent binucléées, ce qui suggère un changement d'activité métabolique. Leurs parois contiguës commencent à se lyser.



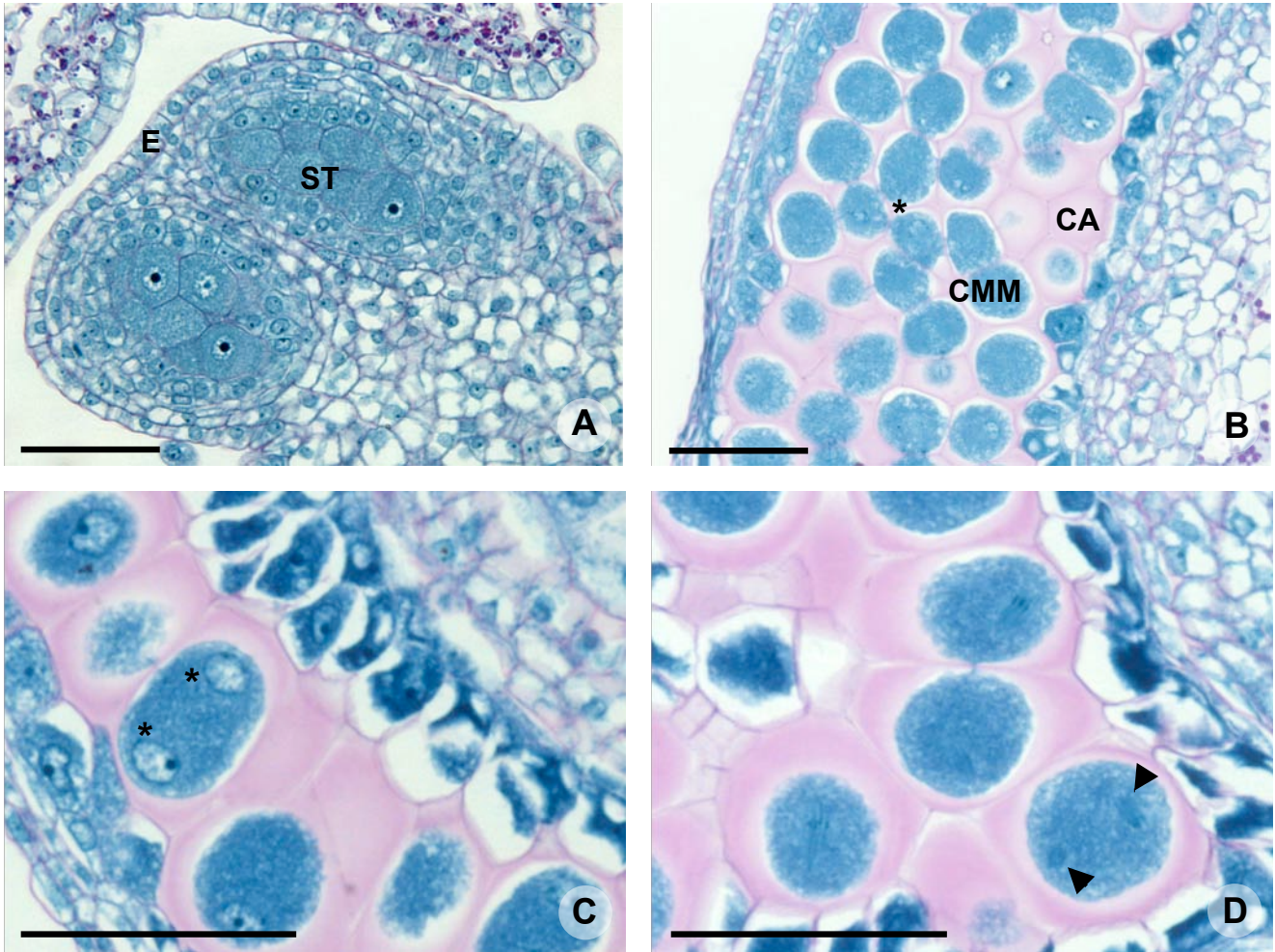
**Figure 12 : Développement pré-méiotique et méiotique chez *E. elaterium*.** **A** Jeune anthere composée des quatre couches cellulaires périphériques dont l'épiderme (E) et le tapis (T), et au centre le tissu sporogène (ST). **B** Cellules mères des microspores (CMM) entourées du tapis (T), de l'endothécium (En), de l'assise transitoire (AT) et de l'épiderme (E). **C** CMM contenant des réserves d'amidon (inclusions roses), entourées d'une couche épaisse de callose (CA) et communiquant par des trabécules cytoplasmiques (\*). **D** CMM à la fin de la première division de la méiose (▶). Barre = 50 µm.

La cytokinèse intervient suite à la deuxième division méiotique donnant ainsi naissance à quatre microspores qui restent groupées en tétrade au sein de la paroi de la cellule-mère suivant un arrangement tétraédrique (Figure 14A et Figure 15A).

La dégradation de la callose entraîne d'une part la libération des microspores et d'autre part le passage, au niveau du locule, d'une structure tissulaire continue à la formation d'une cavité (Figure 14B et Figure 15B). Au sein de cette cavité, les microspores libres présentent un début d'édification de l'exine, un cytoplasme diffus dû à l'apparition de petites vacuoles dispersées.

Dès le stade microspores libres, apparaissent chez *E. elaterium* trois invaginations du système pariétal, conférant une forme trilobée aux microspores (Figure 14C).

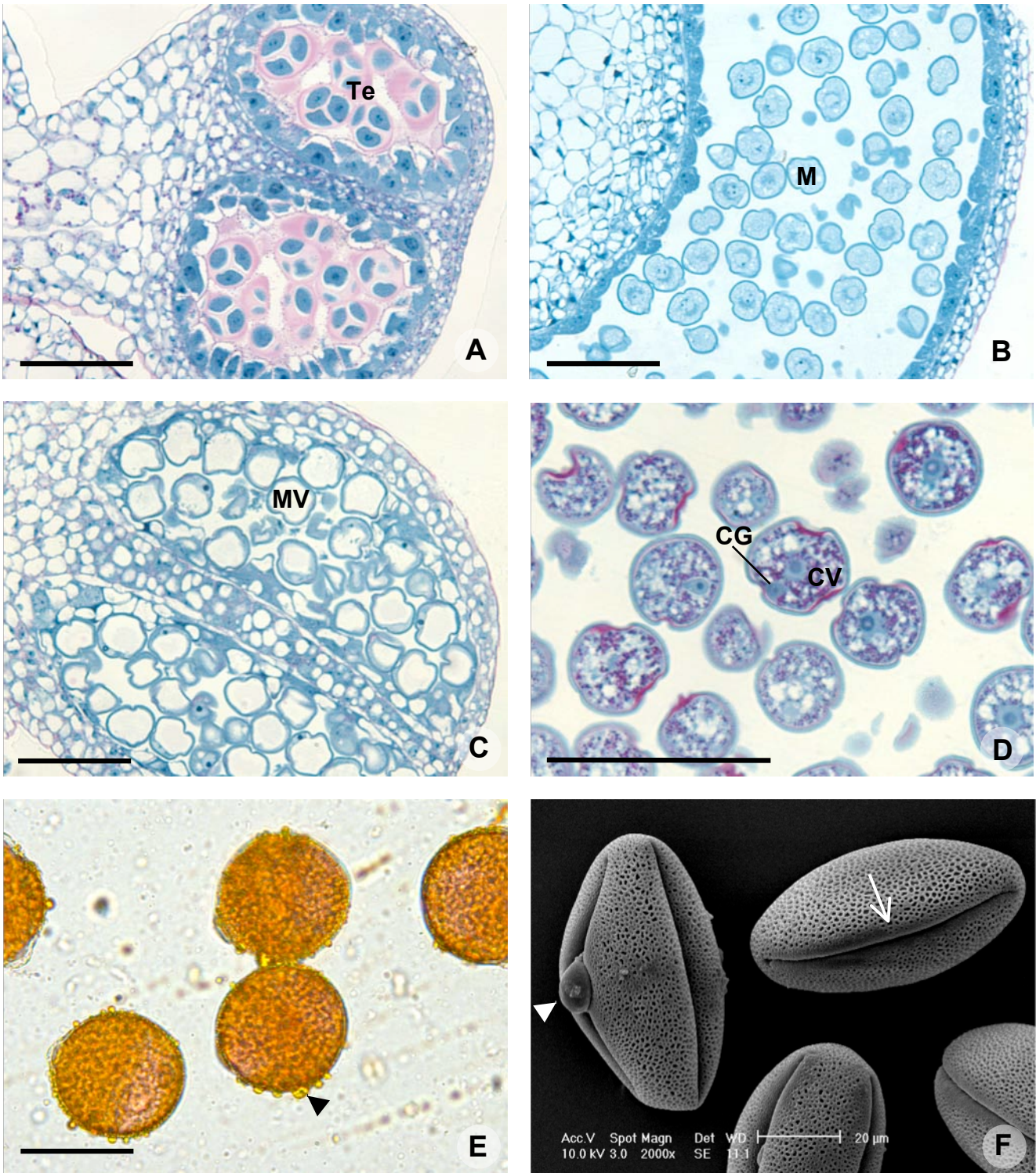




**Figure 13 : Développement pré-méiotique et méiotique chez *C. melo*.** **A** Jeune anthère composée des quatre couches cellulaires de la paroi dont l'épiderme (E) et au centre le tissu sporogène (ST). **B** Cellules mères des microspores (CMM) entourées d'une épaisse couche de callose (CA) et communiquant entre elles par des trabécules cytoplasmiques (\*). **C** CMM à la fin de la première division de la méiose montrant deux noyaux (\*). **D** CMM au cours de la deuxième division de la méiose, les deux fuseaux perpendiculaires sont bien visibles (▶). Barre = 50 µm.

Les cellules du tapis continuent leur accroissement et se vacuolisent. Leurs parois finissent par disparaître complètement formant alors des protoplastes qui se dissocient et envahissent le locule. Chez les microspores, les petites vacuoles fusionnent pour n'en former qu'une seule occupant l'essentiel du volume cellulaire, plaquant ainsi le cytoplasme et le noyau à la périphérie et induisant un accroissement de la cellule (Figure 14C et Figure 15C).





**Figure 14 : Développement post-méiotique du pollen d'*E. elaterium*.** A-D Sections colorées au PAS/NBB. A Tétrades (Te) composées de quatre microspores. B Microspores libres (M) après dissolution de la couche de callose. C Importante vacuolisation des microspores (MV). D Grains de pollen composés de la cellule végétative (CV) et de la cellule génératrice (CG) et présentant d'importantes inclusions d'amidon et de protéines. E Montage *in toto* de pollen mature présentant des gouttelettes de pollenkitt (►). F Photographie au microscope électronique à balayage du pollen à l'anthèse présentant des sillons (→) et des ouvertures (►) © Chifflet Bornard INRA 2008. Barres = 50 µm (A-E) ; 20 µm (F).

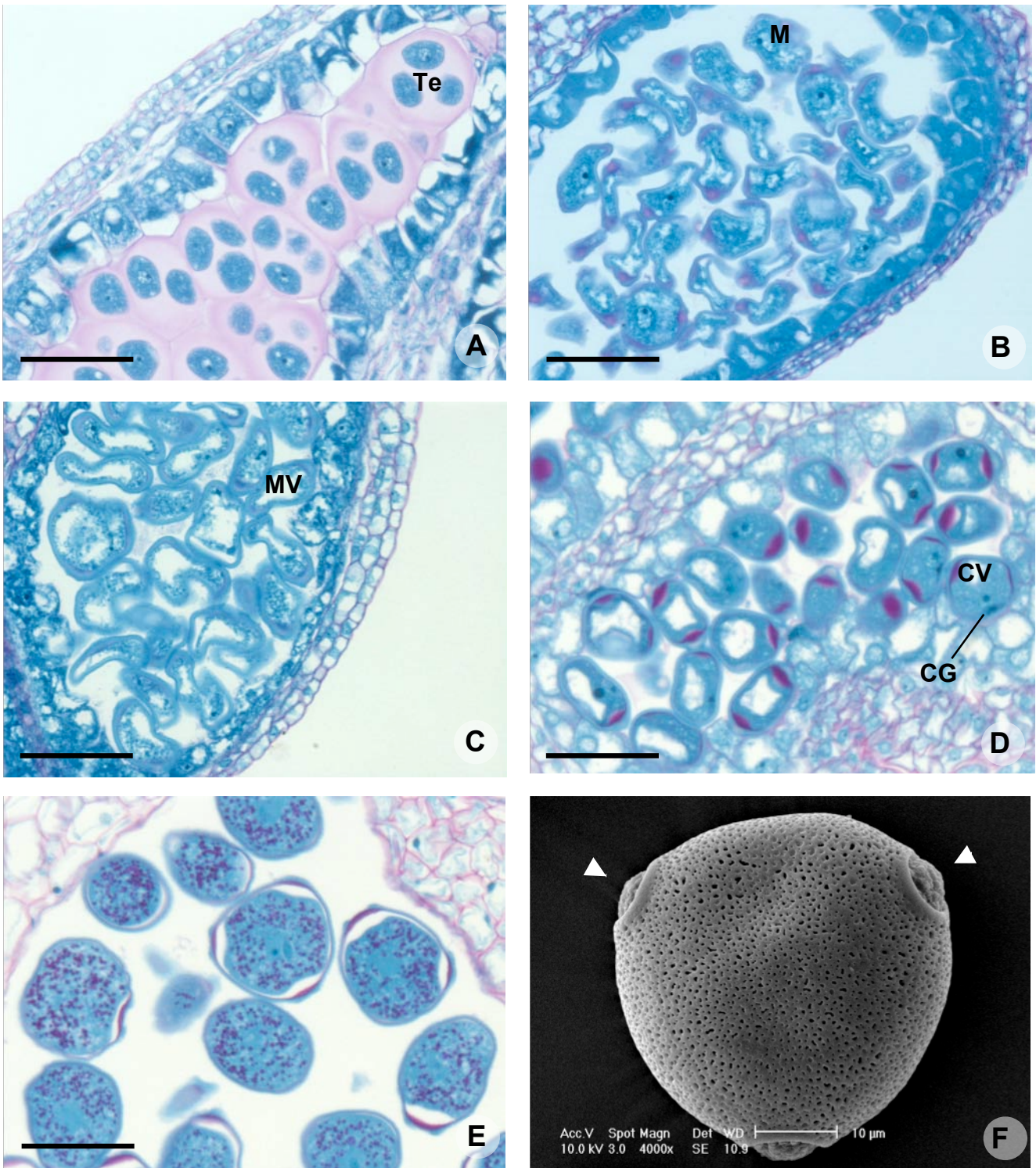
Les microspores subissent ensuite la division pollinique et forment des grains de pollen bicellulaires (Figure 14D et Figure 15D). Chaque grain de pollen présente une cellule végétative volumineuse incluant une petite cellule génératrice. Cette dernière se caractérise par un cytoplasme dense et très réduit et une chromatine condensée, alors que la cellule végétative possède un cytoplasme contenant une multitude de petites vacuoles et une importante population de grains d'amidon. A ce stade peut s'observer le dépôt d'intine qui débute au niveau des apertures pour les deux espèces ainsi qu'au niveau des invaginations pariétales chez *E. elaterium* (Figure 14D et Figure 15D). A ces emplacements, l'exine est déposée en couche fine. Nos observations ont montré que le pollen sectionné à la préanthèse est de type bicellulaire. Il montre un sporoderme bien différencié avec une exine ornementée, d'épaisseur constante exceptée au niveau des apertures chez les deux espèces ainsi qu'au niveau des invaginations pariétales chez *E. elaterium* où elle s'amincit. Le dépôt d'intine est continu sur toute la surface du pollen et particulièrement épaissi sous les apertures. Le cytoplasme de la cellule végétative montre d'importantes quantités de réserves sous forme de volumineux grains d'amidon et de protéines (Figure 14D et Figure 15E). La cellule génératrice reste incluse dans le cytoplasme de la cellule végétative, mais elle est bien individualisée par la présence d'une paroi. Son cytoplasme, très restreint, ne contient pas d'amidon.

Les observations de pollen d'*E. elaterium* à l'anthèse en montage *in toto* montrent la présence de pollenkitt sous forme de goulettes associées à l'exine (Figure 14E). Cette substance de couleur orange n'est pas visible sur les sections cyto-histologiques car elle est éliminée par les solvants organiques employés lors du traitement des échantillons.

Les observations au MEB nous ont permis de caractériser de manière fine l'architecture de l'exine et la structure générale des grains de pollen matures. Nos observations ont montré que le pollen d'*E. elaterium* possède une forme prolée, c'est-à-dire plus long que large, d'environ 60 µm d'axe polaire et de 30 µm d'axe équatorial (Figure 14F). Il montre une structure tricolporée formée de trois sillons longitudinaux avec, en leur milieu, un pore germinatif ou aperture. Son exine est très ornementée avec une architecture réticulée, les ornements forment un réseau.

Quant au pollen de *C. melo* (Figure 15F), nos observations nous ont montré qu'il était de forme sub-sphérique d'environ 40 µm de diamètre avec trois pores germinatifs. Son exine présente également une architecture réticulée.

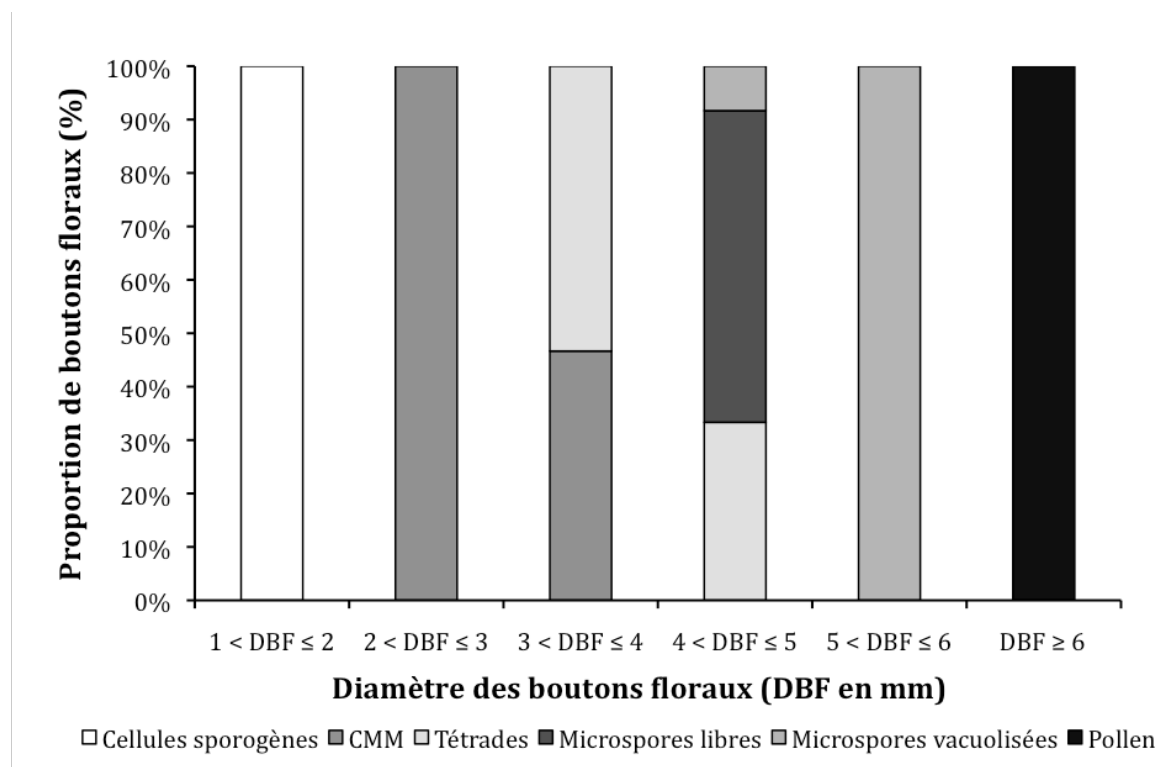




**Figure 15 : Développement post-méiotique du pollen de *C. melo*.** A-E Sections colorées au PAS/NBB. A Tétrades (Te) composées de quatre microspores. B Microspores libres (M) après dissolution de la couche de callose. C Microspores vacuolisées (MV). D Grains de pollen composés de la cellule végétative vacuolisée (CV) et de la cellule génératrice (CG). E Grains de pollen présentant d'importantes inclusions d'amidon (grains roses) et de protéines (en bleu). F Photographie au microscope électronique à balayage du pollen à l'anthèse montrant les trois apertures (▶) © Chifflet Bornard INRA 2008. Barres = 50 µm (A-E) ; 10 µm (F).

## 2.2. Corrélation diamètre du bouton floral / stade ontogénique chez *E. elaterium*

Pour caractériser finement l'ontogénèse du pollen chez *E. elaterium*, nous avons cherché un marqueur morphologique. Pour cela, des boutons floraux ont été triés par classes de diamètre avant d'être sectionnés et observés au microscope photonique. La figure 16 présente la proportion de boutons floraux à un stade ontogénique donné par classe de diamètre. L'examen des résultats montre que les classes de diamètres 1-2 mm, 2-3 mm, 5-6 mm et > 6 mm sont associées à des stades ontogéniques spécifiques qui sont respectivement : cellules sporogènes, CMM, microspores vacuolisées et pollen. Cependant, les classes 3-4 mm et 4-5 mm ne sont pas discriminantes pour le stade ontogénique. En effet, les boutons de 3 à 4 mm peuvent être au stade CMM ou au stade tétrade et les boutons de 4 à 5 mm peuvent être au stade tétrade, au stade microspore libre et, en plus faible proportion, au stade microspores vacuolisées. Il est à noter que le stade microspores libres est spécifique d'une seule classe de diamètres. En effet, il n'a été observé que chez les boutons floraux de 4 à 5 mm de diamètre.



**Figure 16 : Corrélation entre le diamètre du bouton floral d'*E. elaterium* et le stade ontogénique.** Les boutons floraux ont été triés par classe de diamètre avant d'être observés pour identifier les stades ontogéniques des cellules mâles. L'histogramme présente la proportion de boutons floraux à un stade ontogénique donné en fonction de leur diamètre.

### **3. Discussion**

Le présent travail constitue, à notre connaissance, la première analyse de l'ontogénèse pollinique chez *E. elaterium* et un approfondissement de celle de *C. melo*. Dans l'ensemble, l'ontogénèse pollinique chez *C. melo* observée ici est concordante avec les observations de Chauhan et Singh (1968). Nos observations révèlent que chez ces deux espèces la différenciation des cellules sporogènes en CMM semble se faire par accroissement cellulaire comme chez *C. sativus* (Heimlich, 1925), *Micrampelis lobata* et *Cyclanthera explodens*, d'autres Cucurbitacées (Kirkwood, 1906). Cette caractéristique n'est pas commune à l'ensemble de cette famille. En effet, chez d'autres Cucurbitacées, les cellules sporogènes se divisent pour former les CMM, comme chez *Fevillea cordifolia* (Kirkwood, 1906). Les CMM s'entourent d'une épaisse couche de callose qui les isole des tissus sporophytiques, mais sont reliées entre elles par des trabécules cytoplasmiques. Ces derniers créent un continuum qui permet la synchronisation de la méiose dans l'anthère (Boavida *et al.*, 2005). La microsporogénèse d'*E. elaterium* et de *C. melo* est comme chez d'autres Cucurbitacées (Kirkwood, 1906 ; Castetter, 1926 ; Heimlich, 1927 ; Simeonova *et al.*, 1999) de type simultanée : la première division méiotique est suivie directement de la seconde avant que la cytokinèse n'ait lieu et ne forme des tétrades de type tétraédrique. Ce type de microsporogénèse est le plus répandu chez les Angiospermes Eudicotylédones ou Dicotylédones vraies (Furness *et al.*, 2002).

Le développement des microspores puis des grains de pollen décrit ici suit le même déroulement que chez d'autres Cucurbitacées comme *M. lobata* (Kirkwood, 1906) et *C. sativus* (Simeonova *et al.*, 1999). Il s'agit du type normal de développement défini par Wulff (1939) caractérisé par un accroissement de la taille des microspores et par la formation de l'exine juste après la méiose. Ce développement est le plus répandu chez les Angiospermes. Le tapis, quant à lui, est de type pariétal. Les cellules du tapis ne perdent leur paroi qu'après le stade tétrade, n'envahissent pas le locule et dégèrent avant la mitose pollinique. Ce type de tapis a déjà été décrit chez d'autres Cucurbitacées (Ciampolini *et al.*, 1993) et est commun chez les plantes se développant dans des milieux secs (Pacini *et al.*, 1985).

A maturité, les grains de pollen d'*E. elaterium* et de *C. melo* sont bicellulaires comme ceux de *C. sativus* (Simeonova *et al.*, 1999) et *Cucurbita pepo* (Digonnet-Kerhoas *et al.*, 1989). Le pollen d'*E. elaterium*, avec sa forme prolée et sa structure tricolporée, c'est à dire trois sillons et trois pores, ressemble au pollen de *Bryonia dioica* (Franchi *et al.*, 2002). En revanche, il diffère fortement du pollen de melon qui présente une forme sub-sphérique et trois ouvertures.

Les caractéristiques morphologiques rapportées ici pour le pollen d'*E. elaterium* lui confèrent probablement des adaptations aux variations hygrométriques qu'il doit supporter pendant la période de présentation. Sa configuration permet de le classer parmi les pollens dits « partiellement déshydratés » caractérisés par un contenu en eau inférieur à 30% et une forme prolée présentant des sillons (Pacini and Hesse, 2004 ; Pacini *et al.*, 2006). Ces derniers permettent des changements de volume en fonction du statut hydrique (déshydratation, réhydratation) sans dommages structuraux (Pacini and Hesse, 2004). Ces pollens sont, de ce fait, moins sensibles aux stress environnementaux et ont une longévité plus importante mais germent plus lentement car leur réhydratation est plus longue (Franchi *et al.*, 2002).

En revanche, le pollen de melon dont le contenu en eau à l'anthèse est supérieur à 30% est classé parmi les pollens dit « partiellement hydratés » (Franchi *et al.*, 2002). Il est plus sensible aux changements environnementaux, perd rapidement l'eau qu'il contient et a une longévité réduite (Nepi *et al.*, 2001 ; Franchi *et al.*, 2002).

La différence concernant le statut hydrique entre ces deux types de pollens suggère que : (i) les étapes de maturation diffèrent chez les deux espèces et (ii) qu'ils mettent en place des mécanismes différents lors de l'interaction pollen-pistil, notamment lors de l'étape de réhydratation.

La recherche de corrélations entre les dimensions des boutons floraux mâles et les stades ontogéniques du pollen dont ils sont le siège chez *E. elaterium* a révélé des associations spécifiques et d'autres non spécifiques. Les stades ontogéniques précoces et tardifs montrent une corrélation nette avec le diamètre du bouton floral alors que les stades ontogéniques intermédiaires semblent se retrouver chez plusieurs diamètres de boutons. Ceci peut être expliqué soit par la variabilité génétique du matériel végétal utilisé (issu de pollinisations libres), soit par l'asynchronisme des stades ontogéniques en question. Cette étude nous a permis de disposer d'un marqueur (diamètre du bouton) des principales phases du développement des structures reproductrices mâles d'*E. elaterium*, ce qui nous a grandement facilité les expérimentations ultérieures. Des observations similaires ont été obtenues par Koltunow *et al.* (1990) chez le tabac.

Cette approche n'a pas été conduite chez *C. melo* en raison de la taille réduite des boutons floraux mâles qui ne permettait pas un tri précis en classes de diamètre.

L'ontogénèse pollinique présentée ici constitue le développement normal du pollen chez les deux espèces étudiées. Cependant, à l'occasion de ce travail, nous avons également observé la présence de structures anormales suggérant des dysfonctionnements des processus impliqués.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous attacherons à caractériser ces produits non conformes.



### **III. Anomalies du développement du pollen**

Après avoir caractérisé le développement normal du pollen chez nos deux espèces modèles, nous nous sommes intéressés aux anomalies qui pouvaient intervenir lors de ce développement et produire des structures reproductrices non conformes. Dans un premier temps, nous avons recherché et identifié les anomalies et les structures qui en résultent. Puis dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à un phénomène particulier, la dégénérescence des cellules reproductrices dont nous avons évalué le taux en fonction des stades ontogéniques. Enfin, nous nous sommes attachés à caractériser et à quantifier les produits post-méiotiques anormaux qui sont à l'origine de grains de pollen non conformes.

#### **1. Identification des structures anormales et des anomalies**

##### **1.1. Matériels et Méthodes**

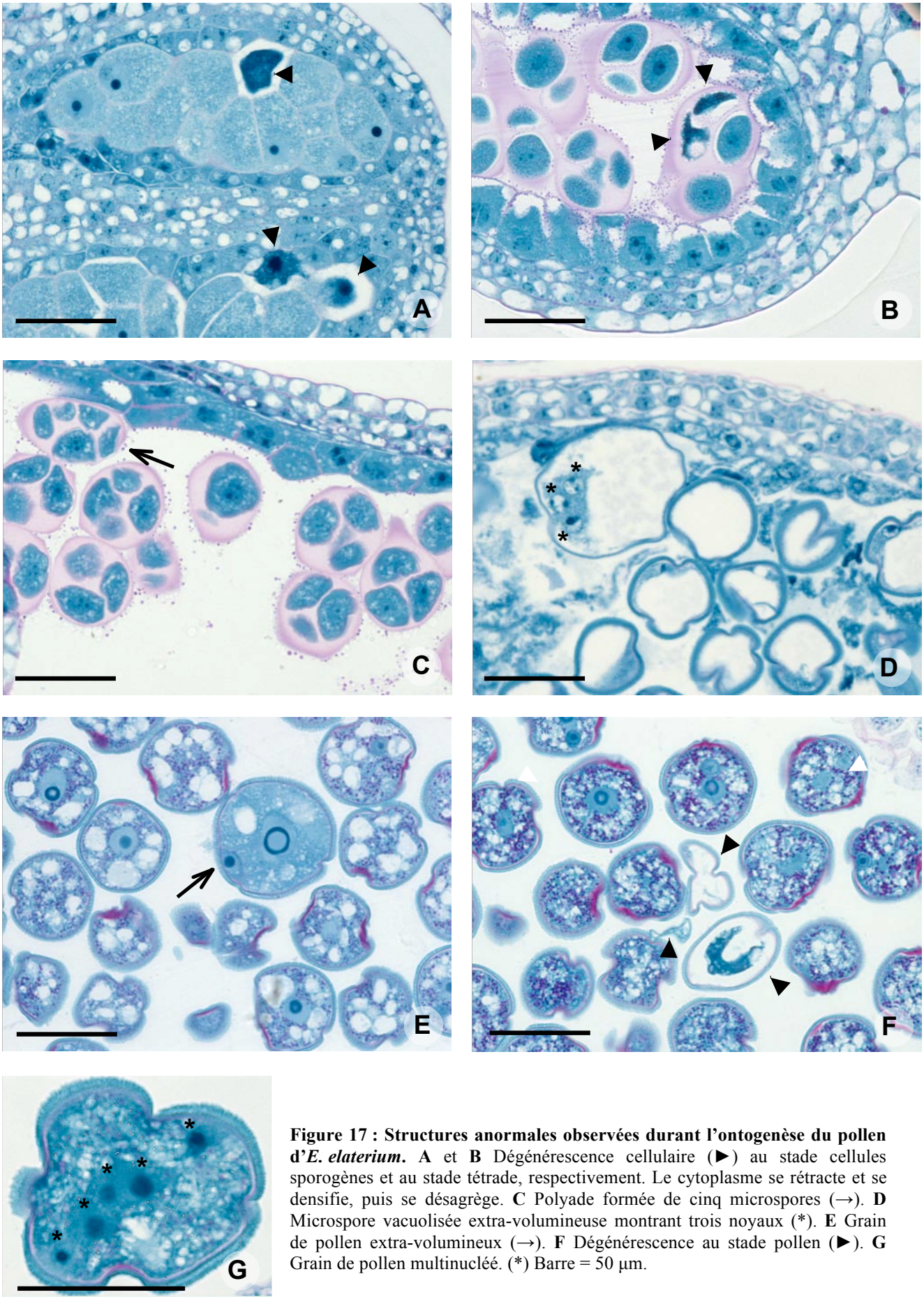
Cette étude a été réalisée en utilisant les sections préparées pour l'étude de l'ontogénèse. Les sections ont été analysées en vue d'identifier les structures anormales.

##### **1.2. Résultats**

*Identification des structures anormales et des anomalies chez E. elaterium*

L'ensemble des observations réalisées sur les sections de boutons floraux d'*E. elaterium* nous ont permis de mettre en évidence que l'ontogénèse du pollen s'accompagnait d'un certain nombre d'anomalies développementales. Celles-ci se manifestaient par la formation de structures anormales dont les plus fréquentes étaient : (i) des cellules dégénérantes, (ii) des produits post-méiotiques anormaux, (iii) des microspores et des grains de pollen de plus grande taille et multinucléés et (iv) des grains de pollen vides.

Des cellules dégénérantes ont été observées à tous les stades ontogéniques. Contrairement aux cellules normales qui ont un cytoplasme clair, diffus et parsemé de petites vacuoles, les cellules dégénérantes présentaient un cytoplasme beaucoup plus dense, qui se rétractait ou encore se résorbait (Figure 17A, B et F).



**Figure 17 : Structures anormales observées durant l'ontogenèse du pollen d'*E. elaterium*.** A et B Dégénérescence cellulaire (▶) au stade cellules sporogènes et au stade tétrade, respectivement. Le cytoplasme se rétracte et se densifie, puis se désagrège. C Polyade formée de cinq microspores (→). D Microspore vacuolisée extra-volumineuse montrant trois noyaux (\*). E Grain de pollen extra-volumineux (→). F Dégénérescence au stade pollen (▶). G Grain de pollen multinucléé. (\*) Barre = 50 µm.

Au stade tétrade, nous avons noté la présence de produits post-méiotiques anormaux. En effet, certains de ces produits n'étaient pas composés de quatre microspores regroupées dans une paroi de callose mais de cinq microspores constituant une polyade (Figure 17C).

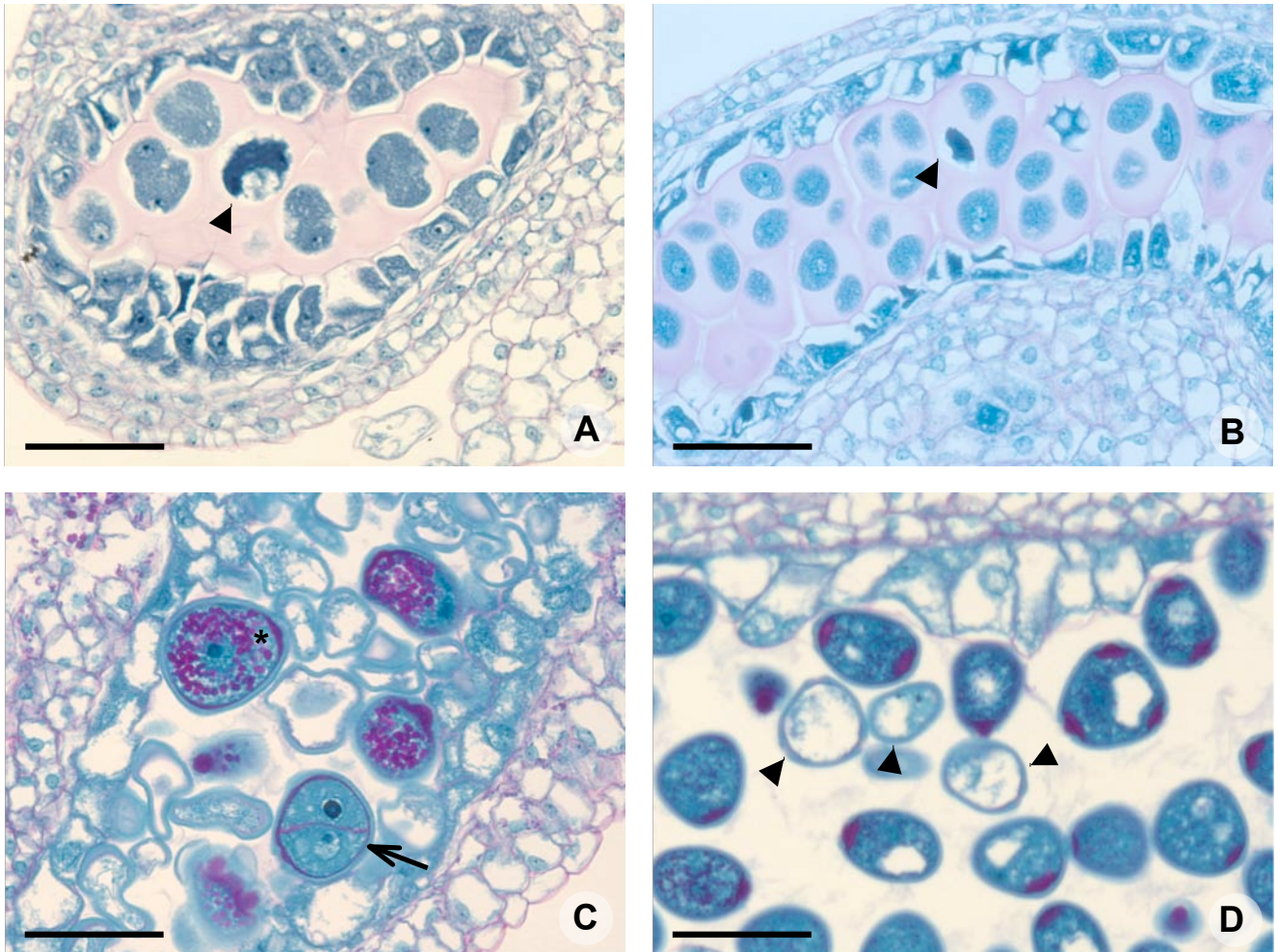
Des structures dont la taille était largement supérieure à la normale ont été observées au stade microspore libre et au stade jeune pollen. Au stade microspore vacuolisée (Figure 17D), les structures volumineuses montraient un cytoplasme plurinucléé. Au stade pollen jeune, nous avons observé deux types d'organisation en fonction du nombre de noyaux et du nombre de cellules : (i) des grains de pollen bicellulaires avec des noyaux plus volumineux en comparaison avec les noyaux des grains de pollen normaux (Figure 17E) et (ii) des grains de pollen pluricellularisés (Figure 17G). Dans ces deux cas, les structures présentaient un épaissement prononcé du système pariétal.

A l'opposé de ces pollens volumineux, nous avons observé des grains de pollen vides, c'est-à-dire sans contenu cellulaire et constitués uniquement de leur sporoderme (Figure 17F).

#### *Identification des structures anormales et des anomalies chez C. melo*

L'examen des sections de boutons floraux de *C. melo* a révélé que son ontogenèse pollinique était également accompagnée d'anomalies. Comme chez *E. elaterium*, des cellules dégénérantes ont été observées à différents stades (Figure 18A, B et D). De plus, au stade pollen, différents types d'anomalies ont été observées, des grains de pollen à accumulation très importante d'amidon et des grains de pollen formés de deux cellules de même taille (Figure 18C).





**Figure 18 : Structures anormales observées durant l'ontogenèse du pollen de *C. melo*.** A et B Cellules dégénérantes (▶) à la fin de la deuxième division méiotique des CMM et au stade tétrade, respectivement. C Grains de pollen à accumulation anormale d'amidon (\*) et grain de pollen ayant subi une division pollinique symétrique (→). D Grains de pollen dégénérantes (▶). Barre = 50  $\mu$ m.

### 1.3.Discussion

Ce travail a permis de mettre en évidence la présence d'anomalies lors de l'ontogenèse du pollen chez *E. elaterium* et *C. melo*, et d'identifier les structures non conformes qui en résultaient. Les anomalies étaient de deux types : (i) létales comme les cellules dégénérantes et les grains de pollen vides et (ii) modificatrices avec les produits post-méiotiques différents des tétrades et les microspores et les grains de pollen plus volumineux que la normale.

L'anomalie la plus fréquemment observée était la dégénérescence des cellules reproductrices mâles. Les cellules dégénérantes étaient si nombreuses que nous avons choisi de les

étudier de manière plus détaillée, en les caractérisant morphologiquement et en évaluant leur proportion. Cette étude approfondie fait l'objet du prochain point.

Ces travaux ont également montré que, durant l'ontogenèse du pollen d'*E. elaterium*, des anomalies survenaient lors de la méiose des CMM conduisant à la formation de produits post-méiotiques non conformes, tels des polyades de cinq microspores. Cependant, la méthode utilisée ici, c'est-à-dire l'observation de sections de boutons floraux ne permettait pas de visualiser les produits post-méiotiques dans leur totalité mais seulement dans un plan donné. En effet, pour la majorité d'entre eux, la section ne permettait d'observer que trois microspores des quatre présentes normalement. De ce fait, l'identification ou l'évaluation de produits post-méiotiques anormaux n'était pas exhaustive. Nous avons donc choisi d'étudier plus soigneusement les produits post-méiotiques avec une méthode qui permet de garder et d'observer ces produits dans leur totalité. Ce travail sera décrit dans la partie III-3.

La production de pollen chez *E. elaterium* s'est révélée être accompagnée d'erreurs comme le montre la présence de grains de pollen de grande taille et/ou extranucléés. Leur plus grand diamètre révèle que ces grains possèdent une plus grande quantité d'ADN. En effet, le volume de la cellule, et donc son diamètre, augmentent avec l'augmentation de la quantité d'ADN nucléaire (Bretagnolle and Thompson, 1995). Ces grains de pollen peuvent être diploïdes, tétraploïdes (jumbo pollen), aneuploïdes ou plurinucléés. La caractérisation du niveau de ploïdie basée sur la morphologie aurait nécessité la mesure du diamètre d'un grand nombre de grains, pour discriminer les haploïdes, diploïdes ou tétraploïdes (Tondini *et al.*, 1993). Une mesure plus précise du niveau de ploïdie ainsi que de la fréquence d'apparition des différents types aurait pu être faite par cytométrie en flux (Bretagnolle and Thompson, 1995). Cependant, ces deux méthodes demandant une importante calibration, n'ont pu être mises en place durant cette étude. Ces grains de pollen anormaux pourraient résulter de dysfonctionnements méiotiques conduisant à une division non réductrice. Ce processus, appelé restitution nucléaire méiotique, a été décrit par Ramanna (1979) comme : « la formation d'un seul noyau avec un nombre de chromosomes non réduit, dû à l'échec de la première ou de la seconde division méiotique » (cité par Bretagnolle and Thompson, 1995). Lors de la restitution de la première division, celle-ci se déroule comme une mitose, sans qu'il y ait appariement et séparation des chromosomes homologues. La seconde division, par contre, se déroule normalement. En revanche, lors de la restitution de la deuxième division, la première division entraîne normalement la séparation des chromosomes homologues, mais les chromatides sœurs ne se séparent pas lors de la deuxième division. Ces restitutions peuvent

résulter d'un positionnement anormal des fuseaux (parallèles, fusionnés ou tripolaires), d'une cytokinèse anormale ou absente à la fin de la deuxième division, ou d'une cytokinèse prématurée à la fin de la première division méiotique, conduisant à la formation de grains de pollen diploïdes ou tétraploïdes. Ces grains de pollen non conformes génétiquement sont néanmoins viables, capables de germer et d'assurer la fécondation et donc la production de zygote non conformes. En effet, la production de gamètes diploïdes est la source principale d'autopolyploïdie (Bretagnolle and Thompson, 1995).

Chez *C. melo*, aucun produit post-méiotique anormal, ni microspores ni grains de pollen extra-volumineux n'ont été observés durant nos investigations. Ceci suggère qu'il y a, chez cette espèce, peu d'erreurs lors de la méiose des CMM. En revanche, l'observation de grains de pollen dont les deux cellules sont de même volume suggère qu'il peut y avoir des erreurs lors de la division pollinique. En effet, cette mitose habituellement asymétrique produit la cellule végétative de grande taille et la cellule génératrice très réduite. Dans le cas de ce type de grain de pollen, la cytokinèse a été symétrique. Ce type de division pollinique a été observé chez des mutants *sidecar* d'*Arabidopsis thaliana* (Chen and McCormick, 1996).

## **2. Caractérisation du phénomène de dégénérescence lors de la microsporogénèse<sup>1</sup>**

### **2.1. Matériels et Méthodes**

#### **a. Observation des échantillons**

Cette étude a été conduite sur les sections préparées pour la description de l'ontogénèse. Pour chaque stade et espèce végétale, une section entière a été étudiée. Toutes les cellules dans les sacs polliniques ont été analysées à la seule condition que les tissus sporophytiques entourant les sacs polliniques soient normaux (présence de toutes les couches cellulaires, absence de dégénérescences).

---

<sup>1</sup> Cette partie a fait l'objet d'un article soumis.

## **b.Analyses statistiques**

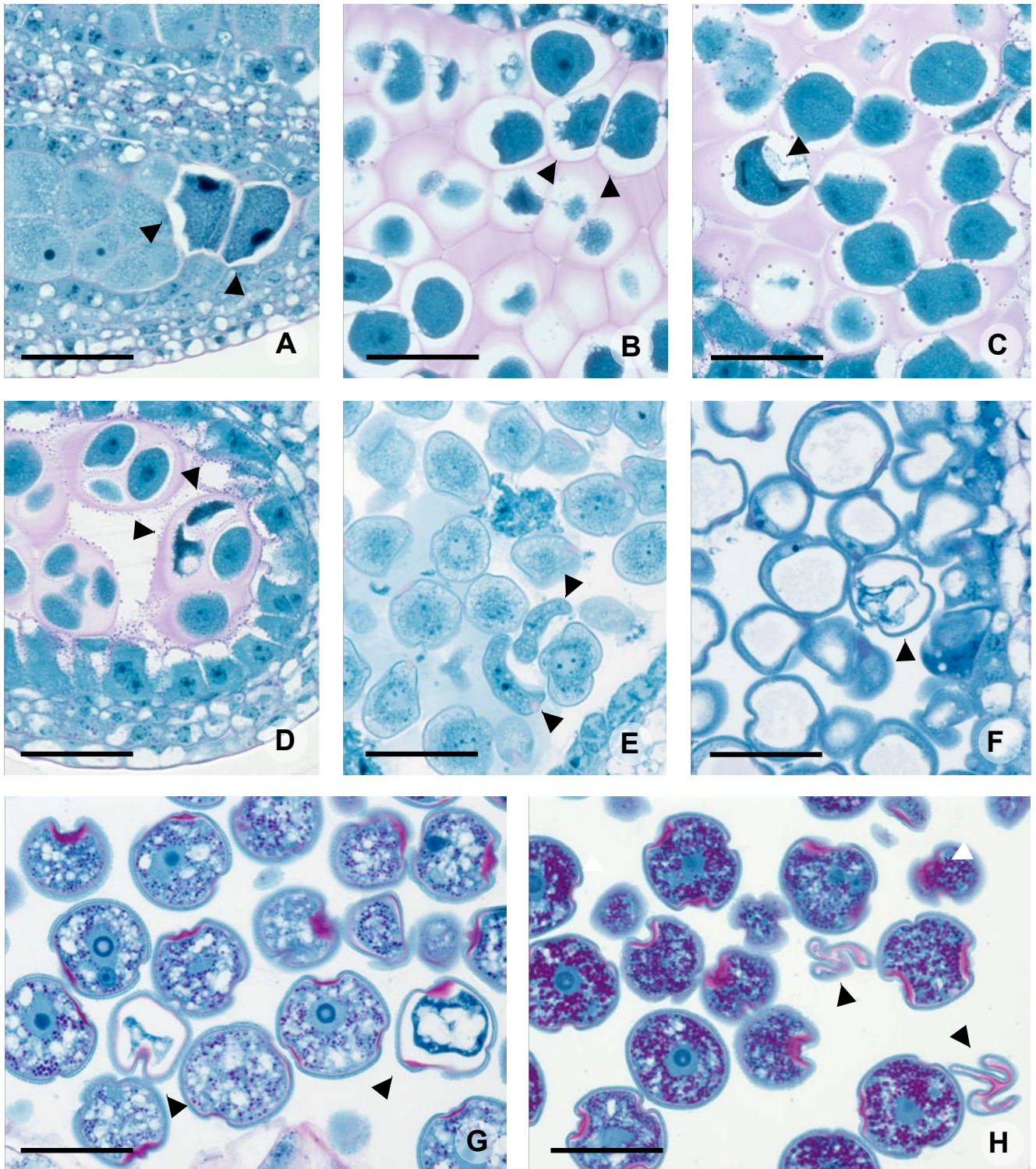
Pour chaque espèce, la distribution des proportions de dégénérescence en fonction des stades ontogéniques a été testée avec un test de Kruskal-Wallis (KW). Si ce dernier révélait une différence significative, les proportions de dégénérescences par stade étaient ensuite comparées deux à deux avec un test post-hoc de Wilcoxon intégrant la correction de Holm. L'ensemble de ces tests a été fait sous le logiciel R (R Core Team).

## **2.2.Résultats**

Des dégénérescences cellulaires ont été observées à tous les stades de l'ontogenèse d'*E. elaterium* (Figure 19) et de *C. melo* (Figure 22). Elles se caractérisent au niveau du cytoplasme par sa forte condensation comme le montre sa coloration plus intense (Figure 19A) et sa rétractation entraînant un détachement de la paroi (Figure 19B et C). Le noyau se condense également et devient pycnotique, le nucléole n'est plus visible (Figure 19A). Par la suite, le cytoplasme se fragmente (Figure 19F). Dans les stades les plus avancés, où le sporoderme est déjà mis en place, la dégénérescence totale du contenu cellulaire conduit à la formation de produits constitués uniquement d'exine (Figure 19H). Ces corps repliés persistent sous cette forme dans l'anthère jusqu'à l'anthèse.

Chez *E. elaterium*, ces dégénérescences n'ont pas été observées en même proportion à tous les stades (KW,  $H=29,42$ ,  $df=5$ ,  $p=1,9.10^{-5}$ ; Figure 20). Au stade cellules sporogènes (Figure 19A), 32,4% des cellules étaient dégénérescentes (Figure 20). Cette proportion s'accompagnait d'une importante variabilité car deux boutons floraux étaient quasiment exempts de dégénérescence. Les CMM (Figure 19B et C) montraient 19,2% de dégénérescence, avec encore une très grande variabilité (Figure 20).

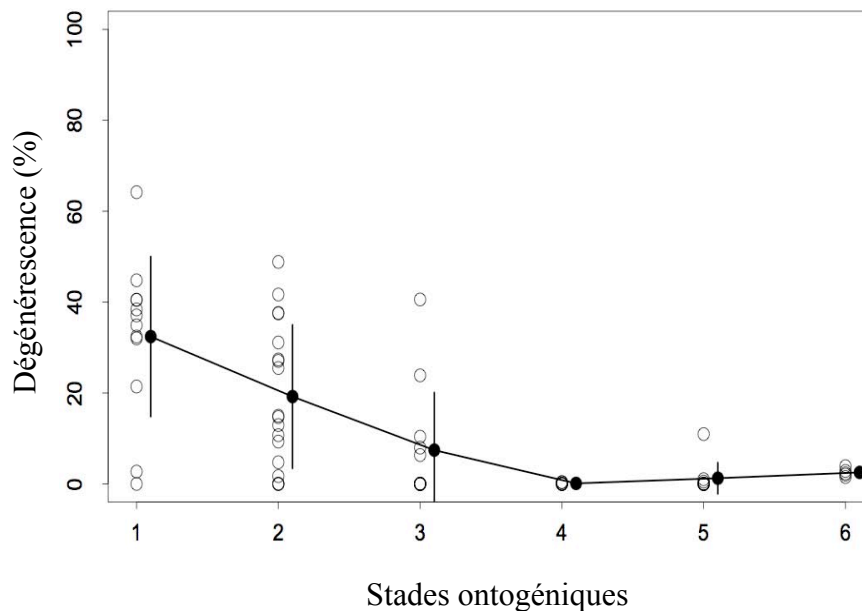




**Figure 19 : Dégénérescences durant le développement pollinique chez *E. elaterium*.** A – C Dégénérescences (▶) durant le développement préméiotique et méiotique. A Cellules dégénérantes au stade cellules sporogènes montrant un cytoplasme condensé. B et C Dégénérescence des CMM et lors première division méiotique présentant une rétraction du cytoplasme. D – H Dégénérescences (▶) durant le développement post-méiotique. D Cellules dégénérantes lors du stade tétrade. E Microspore libre en dégénérescence sous forme de croissant. F Microspore vacuolisée dégénérante montrant la fragmentation du cytoplasme. G et H Deux états de dégénérescence au stade pollen, la rétraction du cytoplasme et la dégénérescence complète du contenu cellulaire conduisant à la formation de grains de pollen vides. Barre = 50  $\mu$ m.

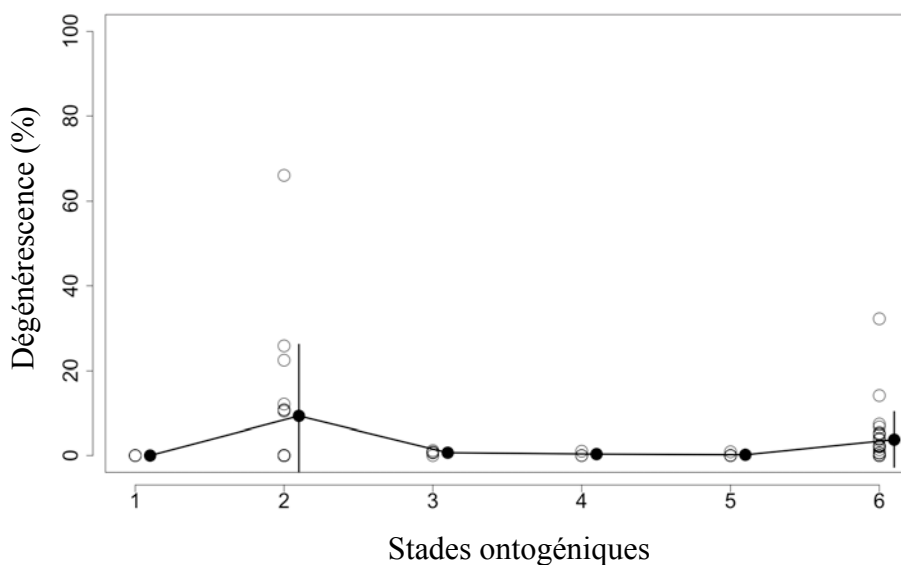


En effet, les proportions de dégénérescence observées par bouton variaient graduellement entre 0% et 49% (Figure 20). Au stade tétrade, il est à noter que les dégénérescences affectaient une, deux, trois ou quatre microspores de la tétrade (Figure 19D). Le pourcentage de microspores montrant des traits de dégénérescence représentait 7,4% des microspores en tétrade. Bien que la plupart des boutons floraux observés ne présentaient aucune dégénérescence (7 boutons sur 12 analysés) certains boutons montraient plus de 40% de dégénérescence cellulaire (Figure 20). Les 0,1% de microspores libres dégénérantes affichaient une forme de croissant (Figure 19E). Au stade microspores vacuolisées (Figure 19F), seulement 1,2% des cellules étaient dégénérantes (Figure 20). Le premier stade de différenciation du pollen (Figure 19G et H) montrait des dégénérescences dans 2,5% des cas (Figure 20).

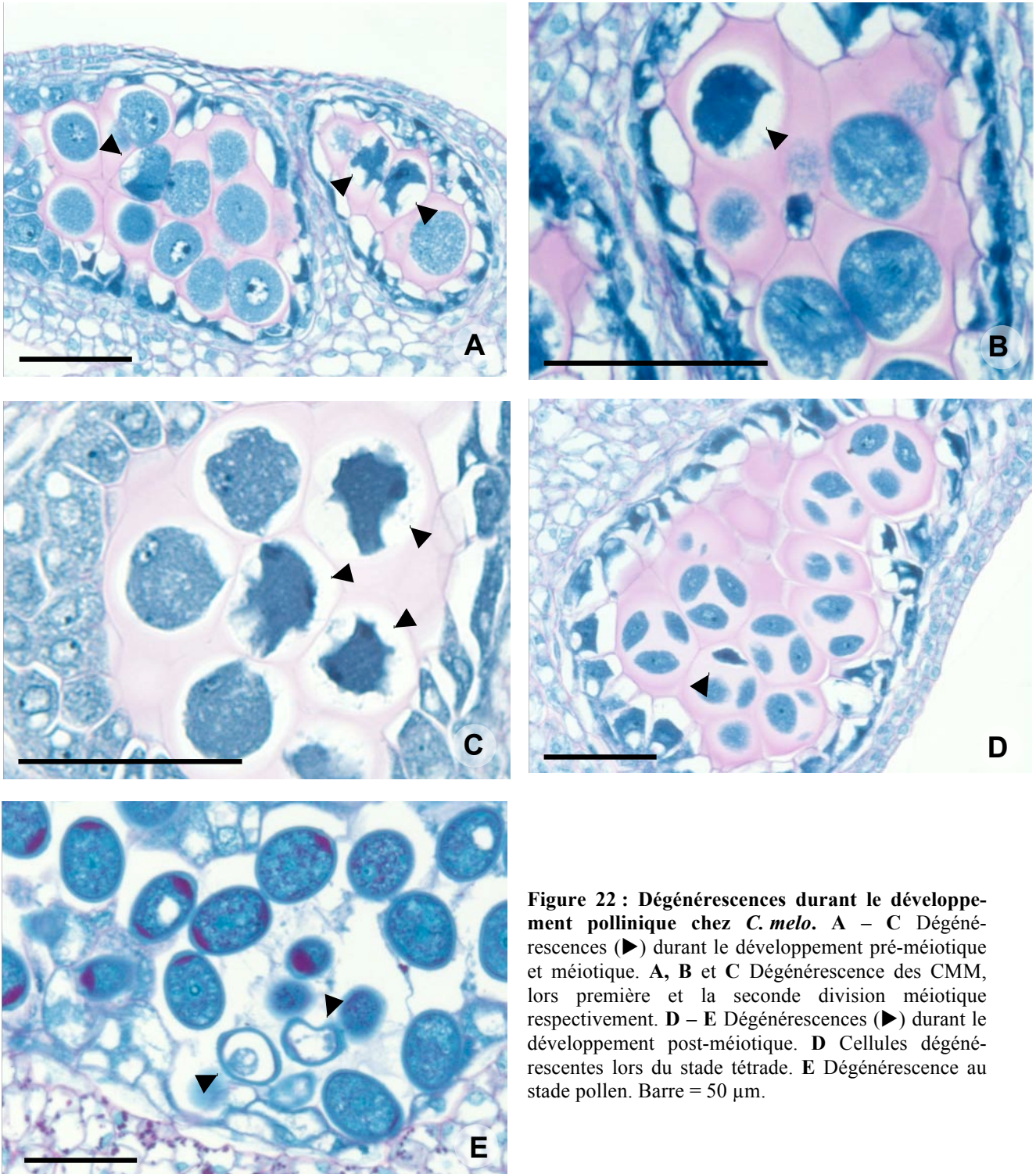


**Figure 20 : Proportions de cellules dégénérantes en fonction du stade ontogénique chez *E. elaterium*.** ● = proportion moyenne de cellules dégénérantes par stade, ○ = proportion de cellules dégénérantes par bouton analysé, les barres représentent l'écart-type, n = nombre de boutons floraux analysés par stade. 1-2 Développement pré-méiotique et méiotique. 1 Stade cellules sporogènes, n = 12. 2 Stade CMM, n = 18. 3-6 Développement post-méiotique. 3 Stade tétrade, n = 12. 4 Stade microspores libres, n = 7. 5 Stade microspores vacuolisées, n = 10. 6 Stade pollen, n = 5.

Chez *C. melo*, en revanche, très peu de dégénérescences ont été observées, et du fait du faible nombre de boutons floraux analysés par stade, aucune différence n'a été mise en évidence entre les stades (KW,  $H=9,649$ ,  $df=5$ ,  $p=0,085$ ). Les cellules sporogènes étaient exemptes de dégénérescences (Figure 22A et Figure 21). Les stades tétrade, microspores libres et microspores vacuolisées n'ont montré que de rares cellules dégénérées, respectivement 0,67%, 0,34% et 0,18% (Figure 22C, D, E et Figure 21). Seuls les stades CMM et pollen montraient de nombreuses cellules dégénérées. La proportion de CMM dégénérées atteignait 9,31% mais avec une très forte variabilité (Figure 22B et Figure 21). En effet, 10 boutons sur 18 étaient complètement exempts de dégénérescence alors qu'un bouton montrait une très forte dégénérescence qui touchait 66% de ses cellules (Figure 21). Au stade pollen, une moyenne de 3,77% de cellules dégénérées a été enregistrée, mais les dégénérescences variaient entre 0% et 32,3% d'un bouton à l'autre (Figure 22F et Figure 21).



**Figure 21 : Proportions de cellules dégénérées en fonction du stade ontogénique chez *C. melo*.** ● = proportion moyenne de cellules dégénérées par stade, ○ = proportion de cellules dégénérées par bouton analysé, les barres représentent l'écart-type, n = nombre de boutons floraux analysés par stade. **1-2** Développement pré-méiotique et méiotique. **1** Stade cellules sporogènes, n = 4. **2** Stade CMM, n = 18. **3-6** Développement post-méiotique. **3** Stade tétrade, n = 5. **4** Stade microspores libres, n = 3. **5** Stade microspores vacuolisées, n = 5. **6** Stade pollen, n = 27.



**Figure 22 : Dégénérescences durant le développement pollinique chez *C. melo*.** A – C Dégénérescences (►) durant le développement pré-méiotique et méiotique. A, B et C Dégénérescence des CMM, lors première et la seconde division méiotique respectivement. D – E Dégénérescences (►) durant le développement post-méiotique. D Cellules dégénérantes lors du stade tétrade. E Dégénérescence au stade pollen. Barre = 50 μm.

### 2.3.Discussion

Nos résultats indiquent que des dégénérescences cellulaires sont susceptibles d'avoir lieu chez une espèce diploïde sauvage, *E. elaterium* et chez une espèce diploïde cultivée, *C. melo*. Les caractéristiques morphologiques des cellules dégénérantes, c'est-à-dire la pycnose du

noyau, la condensation du cytoplasme puis l'élimination complète de cellules, décrites pour d'autres cellules (Wu and Cheung, 2000) indiquent que ces dégénérescences ont lieu par mort cellulaire programmée (MCP). Il s'agit d'un processus actif de mort cellulaire permettant l'élimination sélective de cellules (Ellis *et al.*, 1991). La MCP a été grandement étudiée chez les animaux puis chez les végétaux (Greenberg, 1996 ; Pennell and Lamb, 1997). Elle intervient dans le développement des plantes notamment lors de la genèse des vaisseaux de xylème (Beers, 1997), dans les phénomènes de défense (Jones, 2001) et dans la reproduction (Wu and Cheung, 2000). En effet, c'est par ce processus que trois des quatre mégasporocytes sont éliminées ou que les anthères s'ouvrent. En ce qui concerne l'ontogénèse du pollen, la dégradation totale du tapis par MCP est maintenant bien connue (Wu and Cheung, 2000). Quelques études relatent des événements de MCP chez les cellules reproductrices mâles, comme la MCP des microspores chez *Actinidia deliciosa* qui induit une stérilité mâle (Coimbra *et al.*, 2004).

Chez nos modèles, ces dégénérescences cellulaires n'ont pas été observées à un stade donné mais tout au long du développement pollinique. En revanche, elles n'apparaissent pas dans les mêmes proportions selon le stade observé.

La première partie du développement, c'est-à-dire la phase préméiotique et la phase méiotique présente de fortes proportions de dégénérescence. Dès le stade cellules sporogènes, environ un tiers de ces cellules dégénèrent chez *E. elaterium* alors qu'aucun mécanisme cellulaire susceptible d'introduire des anomalies n'a lieu. D'après nos observations chez *C. melo*, en revanche, les cellules sporogènes ne subissent aucune dégénérescence. A notre connaissance, aucune étude n'a montré des dégénérescences cellulaires à ce stade. L'importante proportion d'élimination cellulaire chez *E. elaterium* reflète probablement un ajustement contrôlé au niveau développemental des populations de cellules en fonction des ressources pouvant être allouées à la fonction mâle. Selon la théorie de l'allocation des ressources pour la reproduction sexuée, les plantes, comme les autres organismes, investissent énormément de ressources pour assurer leur succès reproductif. L'investissement de ces ressources est modulé selon les capacités biosynthétiques et les allocations de ressources pour les autres fonctions (Campbell, 2000 ; de Jong and Klinkhamer, 2005).

Lors du stade CMM, les dégénérescences sont encore importantes (près de 20% pour *E. elaterium* et près de 10% pour *C. melo*). Il a été montré chez d'autres espèces que les CMM ou méiocytes étaient susceptibles de dégénérer par MCP. Chez des croisements interspécifiques du genre *Bracharia*, la mort programmée des méiocytes entraînant la stérilité

des fleurs a été attribuée à l'état polyploïde du génome (Fuzinatto *et al.*, 2007). La mort précoce de cellules durant la méiose a également été rapportée chez un mutant mâle-stérile d'*A. thaliana* dont le gène nommé MALE MEIOCYTE DEATH1 a été isolé. Ce dernier code pour une protéine nécessaire à la méiose (Yang *et al.*, 2003). Chez nos modèles, les dégénérescences observées à ce stade peuvent résulter de l'élimination des cellules incapables de déclencher ou de réaliser correctement la méiose, mais elles peuvent également résulter d'un ajustement cellulaire.

Comparée à la première partie du développement pollinique, lors de la seconde partie, c'est-à-dire lors du développement post-méiotique, les dégénérescences ont lieu en faibles proportions et interviennent de manière comparable chez nos deux modèles. Durant cette phase, nous pouvons supposer que les rares dégénérescences correspondent plutôt à un processus d'élimination de cellules incapables de fonctionner correctement (Pennell and Lamb, 1997).

Au stade tétrade, chez *E. elaterium*, bien que la majorité des boutons floraux montrent des dégénérescences limitées comme chez *C. melo*, certains boutons exhibent des proportions notables de dégénérescences, probablement dues à des défaillances développementales. En effet, une multitude de mécanismes complexes interviennent durant ce stade, notamment durant la cytokinèse post-méiotique et durant la dissolution de la callose et peuvent entraîner des erreurs (Bathia and Malik, 1996 ; Boavida *et al.*, 2005). Il serait nécessaire d'analyser un plus grand nombre de boutons floraux de *C. melo* pour pouvoir conclure avec certitude que ce stade est exempt de dégénérescence ou au contraire qu'il en présente en mêmes proportions que chez *E. elaterium*.

Les microspores libres et vacuolisées montrent des dégénérescences très réduites, suggérant que les microspores défectueuses ont été éliminées dès le stade tétrade. En revanche, les proportions de dégénérescences enregistrées durant le processus de différenciation du pollen sont plus élevées (2,5% et 3,8% pour *E. elaterium* et *C. melo* respectivement). A ce stade a lieu la division pollinique ou mitose de la microspore qui peut entraîner des erreurs et créer des cellules aberrantes. La dégénérescence de ces cellules induit la désintégration du contenu cellulaire uniquement, mais l'exine persiste, conduisant à la formation de grains de pollen vides. Ces anomalies du pollen ont déjà été décrites chez des mutants et des espèces à niveau de ploïdie altéré (Piven *et al.*, 2001), incluant un membre de la famille des Cucurbitacées, un *Cucumis* allotriploïde (Guo *et al.*, 2004). Dans ces cas, ces anomalies ont été attribuées aux altérations génétiques et aux stress environnementaux. Chez les espèces à niveau de ploïdie

conforme qui ont été étudiées pour l'ontogenèse de leur pollen, il a été montré que ce processus produisait aussi des grains structurellement et fonctionnellement aberrants. Par exemple, chez *Passiflora edmundoi*, 2,19% des grains de pollen sont avortés à l'anthèse (Souza *et al.*, 2003), ce qui est en accord avec nos résultats (pour le même stade). Néanmoins, certaines espèces montraient des anomalies polliniques beaucoup plus élevées (> 40%) comme chez *Agave tequilana* (Ruvalcaba-Ruiz and Rodriguez-Garay, 2002).

Comme ces grains de pollen avortés persistent dans l'anthère, ils participent à la proportion de grains de pollen non viables observés à l'anthèse chez plusieurs espèces (Nepi *et al.*, 2001 ; Huang *et al.*, 2004 ; Erickson and Markhart, 2002) et sont susceptibles d'être présentés. Ils peuvent alors être récoltés par des pollinisateurs et déposés sur des stigmates conspécifiques (Mayer and Gottsberger, 2000), mais sont toutefois incapables de permettre la fécondation. De plus, ils n'assurent pas leur fonction de récompense florale pour les pollinisateurs car le cytoplasme riche en nutriments est absent et l'exine riche en hydrocarbures résiste à la digestion (Roulson and Cane, 2000).

Nos résultats montrent que des proportions notables de cellules mâles dégénérantes ont été observées dans des anthères apparemment saines et produisant aussi des cellules normales. Ces observations suggèrent que le phénomène de dégénérescences est cellule-spécifique. De plus, la forte variabilité observée parmi les boutons floraux à un même stade, suggère que la dégénérescence semble ne pas être régulée au niveau de l'espèce, mais au niveau de la fleur. A notre connaissance, il n'y a pas d'information dans la littérature sur la variabilité de la dégénérescence. Chez les espèces étudiées, la dégénérescence a été évaluée sans considération du bouton floral individuel (Souza *et al.*, 2003 ; Ruvalcaba-Ruiz and Rodriguez-Garay, 2002 ; Fuzinatto *et al.*, 2007).

En conclusion, nos résultats montrent clairement qu'une importante dégénérescence cellulaire a lieu, *via* la MCP lors de la différenciation des cellules mâles chez *E. elaterium* et *C. melo* et qu'elle a lieu à différents stades de l'ontogenèse et non pas uniquement lors de la méiose. Cette étude a permis de montrer que le processus de MCP n'intervenait pas de la même façon chez les deux espèces, suggérant que chez *E. elaterium* qui est une espèce sauvage et dont les ressources sont limitées, un important réajustement cellulaire est nécessaire pour mener à bien le développement pollinique alors que chez *C. melo* dont le génome a été amélioré et qui est cultivé dans un milieu riche en ressources, ce réajustement n'est pas nécessaire. Enfin, cette étude a montré que les dégénérescences intervenant lors de la différenciation du pollen

conduisaient à la production de taux notables de grains de pollen vides qui pourront participer à l'interaction plante-abeille.

Bien que la MCP soit un phénomène très présent lors de l'ontogenèse du pollen chez ces deux espèces pour éliminer les cellules défectueuses, elle ne permet cependant pas l'élimination de toutes les cellules résultant de méioses anormales.

### **3. Anomalies post-méiotiques chez *E. elaterium***

#### **3.1. Matériels et Méthodes**

##### **a. Matériel végétal**

Des graines d'*E. elaterium* ont été obtenues à partir de fruits matures récoltés dans une population cultivée à l'INRA d'Avignon. Après récolte, les graines ont été lavées avec de l'eau distillée pour éliminer le mucilage qui les entoure, puis elles ont été séchées à l'étuve à 40°C. Pour faciliter la germination des graines, les téguments ont été partiellement enlevés à l'aide d'un scalpel. Les graines ainsi scarifiées ont été mises à germer sur papier-filtre humide en boîte de Pétri à 26°C. Après germination, les jeunes plantules ont été repiquées en pots et irriguées deux fois par semaine. Au stade deux feuilles, elles ont été transplantées dans un tunnel insect-proof à l'INRA d'Avignon.

##### **b. Récolte, préparation et observation des échantillons**

Dans l'étude précédente, nous avons montré que le stade tétrade qui nous intéresse dans cette étude se déroulait dans les boutons floraux mâles de 3 à 5 mm de diamètre. Ainsi, des boutons floraux mâles de ce diamètre et provenant tous de plantes différentes ont été récoltés en mai 2009. Immédiatement après récolte, ces boutons ont été disséqués pour éliminer le périanthe. Ils ont été fixés dans un mélange éthanol-acide acétique (3/1, v/v) une nuit à température ambiante, puis stockés à 4°C jusqu'à utilisation.

Des lames temporaires ont été préparées en écrasant les anthères d'un bouton floral dans une goutte de carmin acétique à 1%. Les observations ont été faites avec un microscope (Leica DMR). Les coupes ont été photographiées avec une caméra digitale (Leica DFC 300 FX).

### c.Fréquence des différents types de produits post-méiotiques et leurs combinaisons nucléaires

Dix-huit boutons floraux ont été préparés, chacun constituant une répétition. Pour chaque bouton floral, au moins 319 produits post-méiotiques ont été analysés. Pour certains produits post-méiotiques anormaux, le nombre de noyaux par cellule a été déterminé.

#### 3.2.Résultats

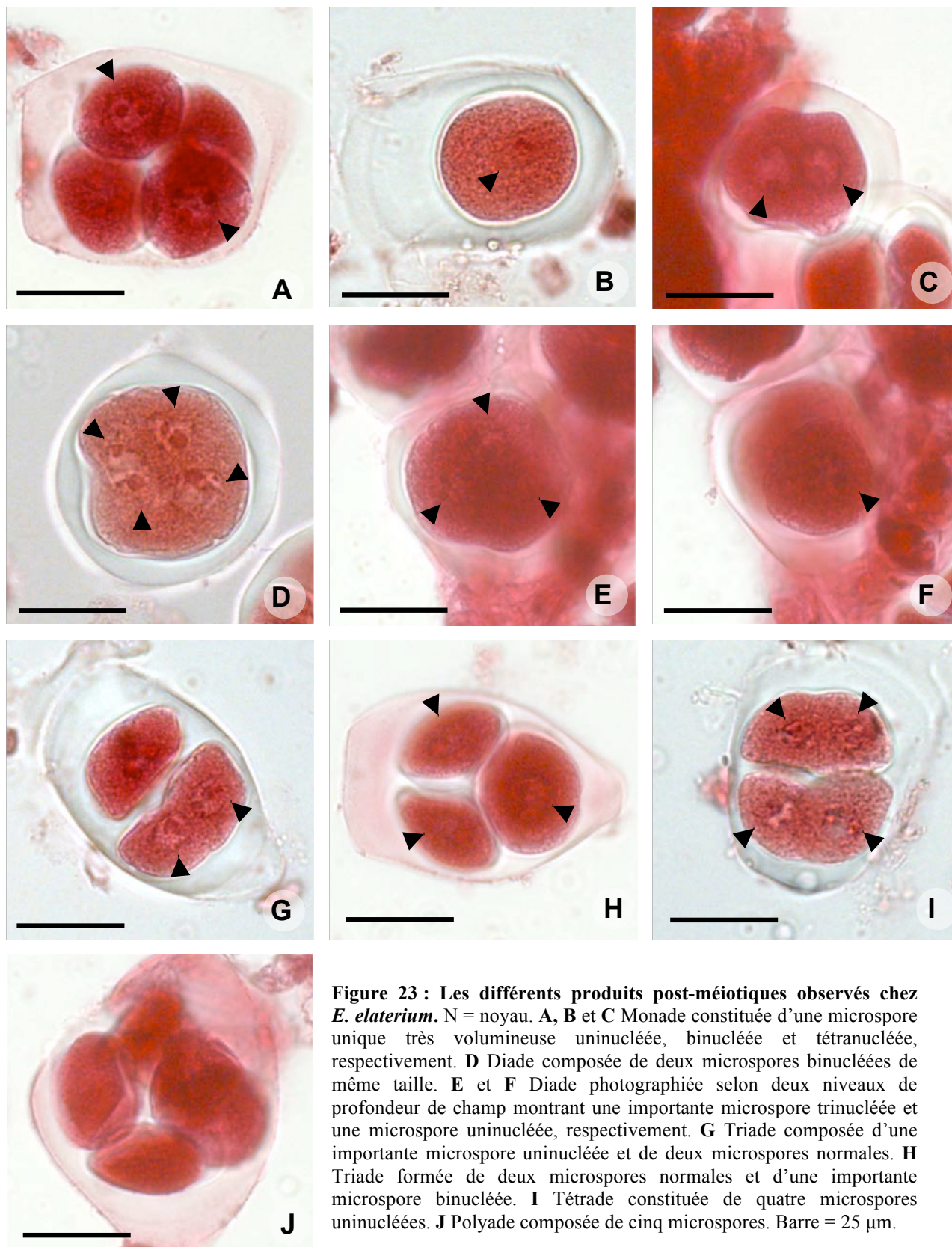
L'observation des écrasements de boutons floraux au stade tétrade a montré en majorité des produits post-méiotiques conformes, c'est-à-dire quatre microspores maintenues ensemble par une épaisse paroi de callose (Figure 23A). Cependant, d'autres produits ont été observés et se sont révélés être non conformes. Des monades sous forme d'une seule microspore très volumineuse entourée de callose (Figure 23B, C et D) étaient présentes. Nous avons également observé des diades formées de deux microspores. Deux types de diades ont été identifiées : (i) des diades avec deux microspores de tailles équivalentes (Figure 23E), et (ii) des diades avec une microspore volumineuse et une microspore de plus petite taille (Figure 23F et G). Des triades composées d'une importante microspore et de deux microspores de taille normale (Figure 23H et I) ont été également observées. Parmi ces produits post-méiotiques, des polyades étaient également présentes. Celles-ci étaient composées de cinq à six microspores, dont quatre de taille égale et les surnuméraires de plus petit volume (Figure 23J).

Bien que les tétrades conformes étaient grandement majoritaires (95,1% ; Tableau 2), les monades, diades, triades et polyades étaient présentes en proportions non négligeables (respectivement 1%, 0,6%, 2% et 1,3% ; Tableau 2).

Répétitions	Monades	Diades	Triades	Tétrades	Polyades
n = 18	87	68	179	8232	95
% ± ET	0,98±1,19	0,61±0,72	2,03±0,96	95,09±2,26	1,29±1,05

**Tableau 2 : Proportion des différents types de produits post-méiotiques observés chez *E. elaterium*. ET = écart-type.**





**Figure 23 : Les différents produits post-méiotiques observés chez *E. elaterium*.** N = noyau. **A, B** et **C** Monade constituée d'une microspore unique très volumineuse uninucléée, binucléée et tétranucléée, respectivement. **D** Diade composée de deux microspores binucléées de même taille. **E** et **F** Diade photographiée selon deux niveaux de profondeur de champ montrant une importante microspore trinucleée et une microspore uninucleée, respectivement. **G** Triade composée d'une importante microspore uninucleée et de deux microspores normales. **H** Triade formée de deux microspores normales et d'une importante microspore binucleée. **I** Tétrade constituée de quatre microspores uninucleées. **J** Polyade composée de cinq microspores. Barre = 25  $\mu$ m.

L'observation plus fine de quelques-uns de ces produits post-méiotiques anormaux a révélé, de manière inattendue, une importante variabilité au niveau de la composition nucléaire. Les monades observées pouvaient être uninucléées (Figure 23A), binucléées (Figure 23B) ou tétranucléées (Figure 23C). En ce qui concerne les diades, les deux microspores de même taille pouvaient être uninucléées ou binucléées (Figure 23D). Sinon, la plus petite microspore était uninucléée (Figure 23F) alors que la plus volumineuse était trinucléée (Figure 23E). Dans le cas des triades, la plus grande microspore pouvait être uninucléée (Figure 23G) ou binucléée alors que les deux autres étaient normalement uninucléées (Figure 23H). Aucune observation de la composition nucléaire de polyades n'a pu être faite.

### 3.3.Discussion

La microsporogénèse normale chez *E. elaterium* est de type simultanée, c'est-à-dire que la CMM subit une première division méiotique formant deux noyaux qui vont subir la seconde division méiotique. Le méiocyte à quatre noyaux subit ensuite une seule cytokinèse qui individualise quatre microspores rassemblées en tétrade par la couche de callose. Or, nos résultats montrent que la microsporogénèse chez *E. elaterium* s'accompagne également de la formation de produits post-méiotiques anormaux, c'est-à-dire des monades, des diades, des triades et des polyades. De tels produits post-méiotiques ont été observés chez d'autres espèces, aussi bien polyploïdes que diploïdes (Misset, 1992 ; Bosco *et al.*, 1999 ; Souza *et al.*, 2003 ; Taschetto and Pagliarini, 2003 ; Boldrini *et al.*, 2006 ; Gallo *et al.*, 2007). Les espèces polyploïdes, plus propices aux erreurs durant la méiose, génèrent des produits post-méiotiques en plus grande proportion que les espèces diploïdes (Bosco *et al.*, 1999 ; Taschetto and Pagliarini, 2003). Cependant, certaines espèces diploïdes sont plus susceptibles que d'autres de former des produits post-méiotiques anormaux. C'est le cas de *Citrus sinensis* et *C. limon* qui produisent respectivement 27% et 7,6% de polyades (Bosco *et al.*, 1999) ou de *Pfaffia glomerata* qui produit 14% de triades (Taschetto and Pagliarini, 2003). D'autres espèces comme *Passiflora edmundoi* génèrent des produits post-méiotiques anormaux en faibles quantités comparables à celles que nous avons enregistrées chez *E. elaterium* (Souza *et al.*, 2003). Le niveau de ploïdie et l'espèce ne sont pas les seuls facteurs favorisant les anomalies méiotiques, les stress environnementaux comme la sécheresse ou la salinité augmentent également la formation de produits post-méiotiques anormaux (Misset, 1992). Ces produits résultent soit d'anomalies lors de la méiose comme une orientation anormale des fuseaux ou l'absence d'une division méiotique, soit d'anomalies ou d'absence de cytokinèse (Taschetto

and Pagliarini, 2003 ; Boldrini *et al.*, 2006 ; Gallo *et al.*, 2007). La formation de ces produits post-méiotiques anormaux implique la production de gamètes avec plus ou moins de chromosomes (Goluboskaya, 1989) et de grains de pollen non réduits ou stériles (Bosco *et al.*, 1999). Nos observations ont montré qu'à chaque type de produits post-méiotiques anormaux rencontrés chez *E. elaterium* correspondaient plusieurs compositions nucléaires. Certaines microspores anormales présentaient un volume plus important que les autres et un état uninucléé. Ces caractéristiques indiquent un niveau de ploïdie anormalement élevé. Les mécanismes impliqués dans la mise en place de ces microspores polyploïdes ont été résumées par Bretagnolle et Thompson (1995) et représentées sur la figure 24. Ces microspores diploïdes, triploïdes ou tétraploïdes sont à l'origine de grains de pollen polyploïdes, comme ceux qui ont été observés chez notre modèle. Des grains de pollen diploïdes ont également été observés chez des clones de *Solanum phureja* et des hybrides de *Solanum* (Veilleux and Lauer, 1981 ; Bani-Aameur *et al.*, 1992) alors que la présence de jumbo pollen (4n) a été montrée chez *Medicago sativa* (McCoy and Smith, 1983). Taschetto et Pagliarini (2003) ont observé des grains de pollen diploïdes et tétraploïdes chez *Pfaffia glomerata* et *P. tuberosa*, les espèces tétraploïdes produisant entre 2 et 10 fois plus de ces grains de pollen. En dehors de ces microspores polyploïdes déjà connues, nous avons identifié des microspores présentant un état plurinucléé. Ce résultat est concordant avec nos précédentes observations sur sections qui montraient une microspore au minimum trinuclée. Des microspores bi-, tri- et tétranucléées ont déjà été observées chez des mutants de soja et d'*A. thaliana* (Brim and Young, 1971 ; Spielman *et al.*, 1997 ; Tavoletti *et al.*, 2000). Chez ces mutants, des cytokinèses partielles ou absentes en sont à l'origine. McCoy et Smith (1983) ont montré que, dans la plupart des cas, les noyaux de ces microspores fusionnaient ensuite pour former une microspore polyplôïde. Cependant, lorsque la fusion nucléaire n'a pas lieu, ces microspores plurinucléées conduisent à la formation de grains de pollen également plurinucléés, comme nous avons pu en observer chez *E. elaterium*.

La figure 24, résumant les différents produits post-méiotiques rencontrés ainsi que les étapes de leur formation, montre que plusieurs anomalies peuvent conduire à la formation d'un même type de produit. Par exemple, quatre voies différentes peuvent résulter en la formation d'une diade contenant deux microspores diploïdes. Cependant, le présent travail ne permet pas de déterminer, dans ce cas, le type d'anomalie impliquée.

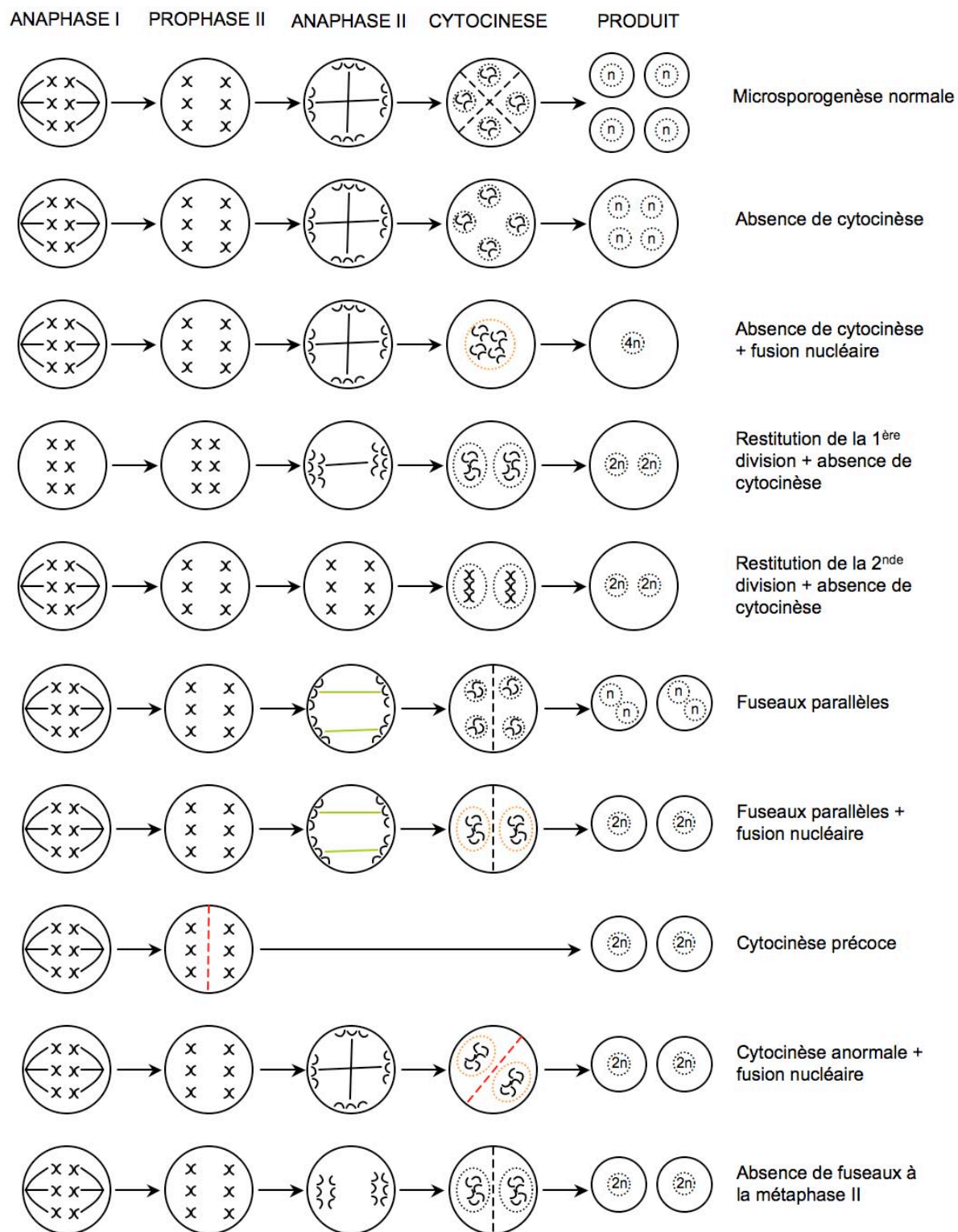


Figure 24 : Les principales anomalies cytologiques responsables de la formation de produits post-méiotiques anormaux et les grains de pollen qui peuvent en résulter. Modifié d'après Bretagnolle and Thompson (1995) et complété.



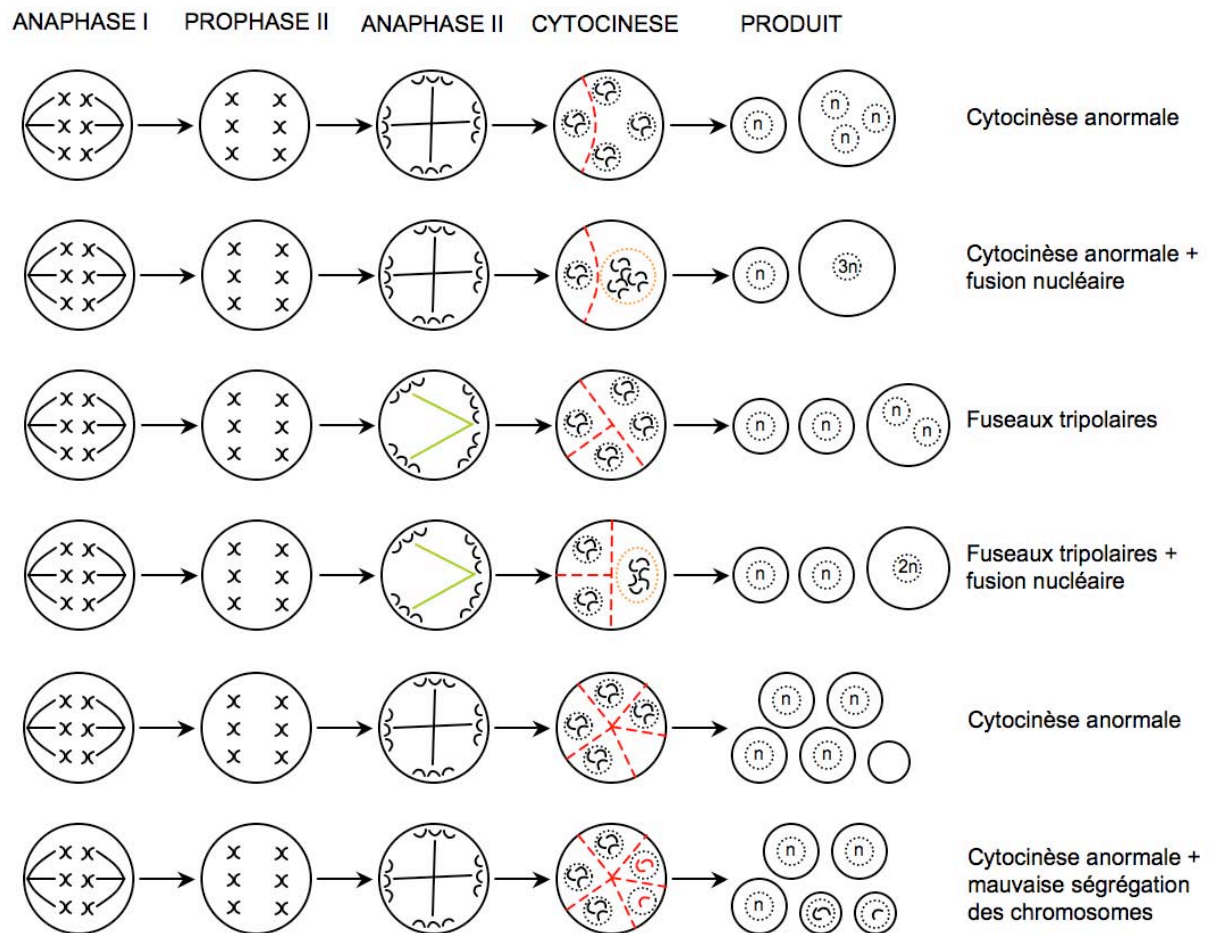


Figure 14 (suite).

## IV. Conclusions

Cette étude a montré que l'ontogenèse du pollen d'*E. elaterium* et celle de *C. melo* différaient peu. En effet, elles sont toutes les deux marquées par une microsporogénèse de type simultanée et une microgamétogénèse normale conduisant à la libération de grains de pollen bicellulaires. En revanche, les étapes de maturation du pollen diffèrent. A l'anthèse, le pollen d'*E. elaterium* est partiellement déshydraté, donc moins sensible aux stress environnementaux et à longévité plus importante alors que le pollen de *C. melo* est partiellement hydraté et donc plus sensible aux changements environnementaux et à longévité réduite. Le niveau d'hydratation du pollen peut avoir une influence sur l'interaction pollen-abeille. En effet, une plante à pollen hydraté dont la longévité est réduite nécessite que la pollinisation soit faite rapidement après anthèse. On peut penser alors qu'une telle plante mette en place des stratégies pour être très attractive comme une plus grande quantité ou une meilleure qualité de ses récompenses florales. Si *C. melo* ne produit pas autant de pollen qu'*E. elaterium*, il offre, en revanche, une plus grande quantité de nectar (3µl/fleur pour *C. melo* contre 0,65 µl/fleur pour les populations locales d'*E. elaterium* ; Rust *et al.*, 2003).

Nous avons mis en évidence que l'ontogenèse du pollen chez ces deux modèles était accompagnée d'une importante dégénérescence cellulaire réalisée par MCP, conduisant à la production d'environ 3% de grains de pollen vides. Ces derniers, composés uniquement de leur exine, sont stériles et non nutritifs pour l'abeille alors qu'ils peuvent être récoltés par cette dernière, déposés sur des stigmates où ils ne pourront germer. Par ailleurs, s'ils sont ramenés et stockés dans la ruche, ils ne pourront pas être digérés par les abeilles.

Cette étude a également montré que la microsporogénèse chez *E. elaterium* était sujette à des erreurs méiotiques. Ces dernières peuvent être favorisées par les stress environnementaux comme la sécheresse et conduisent à la formation de 5% de produits méiotiques anormaux. Ces derniers n'étant pas éliminés par dégénérescence se développaient ensuite en grains de pollen diploïdes, tétraploïdes ou encore aneuploïdes. Dans l'hypothèse que ces grains de pollen non garants de la conformité génétique de la population et de l'espèce interviennent dans la reproduction, nous pouvons nous attendre à la formation de descendants polyploïdes (Bretagnolle and Thompson, 1995). Bien que la littérature ne fasse pas, à notre connaissance, états de génotypes polyploïdes chez *E. elaterium*, il a été rapporté chez des espèces du genre

*Cucumis* (Singh and Yadav, 1984), *Momordica* (Agarwal and Roy, 1976) et *Trichosantes* (Thakur, 1973) la formation de génotypes naturellement autoploïdes.

CHAPITRE 3 – QUALITE REPRODUCTRICE DU POLLEN DE

*C. MELO*





Pour que la reproduction des Angiospermes se déroule correctement, il est nécessaire que le pollen possède une bonne qualité reproductrice. Cette qualité recouvre deux aspects, la qualité physiologique du pollen en tant que microorganisme et sa capacité à accomplir la totalité du programme de reproduction mâle (Jahier, 1992).

Ainsi, pour que le cycle de reproduction mâle s'accomplisse convenablement, le pollen doit en premier lieu être viable lorsqu'il est libéré de l'anthere et doit posséder une bonne longévité, c'est-à-dire rester viable suffisamment longtemps jusqu'à atteindre un stigmate conspécifique (Dafni and Firmage, 2000). Ensuite, le pollen doit être capable de germer sur le stigmate et produire un tube pollinique qui atteigne un ovule (Mayer and Gottsberger, 2000). Enfin, il doit libérer des gamètes capables de féconder l'oosphère et les noyaux polaires, ce qui sera appelé dans la suite de ce travail son aptitude à féconder.

L'ensemble de ces caractéristiques est regroupé sous le terme de qualité reproductrice que certains auteurs englobent sous le terme de viabilité du pollen (Dafni and Firmage, 2000). Dans le présent travail, la qualité reproductrice du pollen sera composée de sa viabilité, de sa capacité à germer et de son aptitude à féconder.

Selon Dafni et Firmage (2000), la qualité reproductrice du pollen dépend de nombreux facteurs qui peuvent être intrinsèques, morphologiques ou environnementaux, comme la microsporogénèse, le métabolisme du pollen, la morphologie des fleurs et des anthers, la période d'anthèse, le vecteur pollinisateur, les sécrétions d'insectes, l'humidité relative et la température.

En fonction de la composante à tester, la qualité reproductrice du pollen peut être évaluée par différentes méthodes. Celles-ci permettent d'évaluer l'effet d'un facteur donné ou de s'assurer de la qualité du pollen avant la pratique de pollinisations manuelles (Heslop-Harrison *et al.*, 1984 ; Kearns et Inouye, 1993).

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps les méthodes d'évaluation de la qualité reproductrice adaptées à notre modèle végétal et à nos conditions d'expérimentation. Dans un deuxième temps, nous étudierons l'évolution de la qualité reproductrice du pollen de *C. melo* au cours de l'anthèse. Et enfin, nous analyserons l'effet du transport par les insectes sur cette qualité reproductrice.

# I. Méthodes d'évaluation de la qualité reproductrice du pollen

## 1. Introduction

Plusieurs approches ont été décrites pour tester chaque composante de la qualité reproductrice du pollen (viabilité, capacité à germer et aptitude à féconder). Pour évaluer la viabilité, il est possible de mesurer la respiration ou la conductivité chimique des lessivats de pollen (rarement utilisées), le contenu en proline ou d'utiliser des tests de coloration. La capacité à germer du pollen, quant à elle, peut être évaluée par des tests de germination *in vivo* ou *in vitro*. Enfin, l'aptitude à féconder est évaluée en mesurant la grenaison, c'est-à-dire la capacité du pollen à induire la mise en place d'une graine (Dafni and Firmage, 2000).

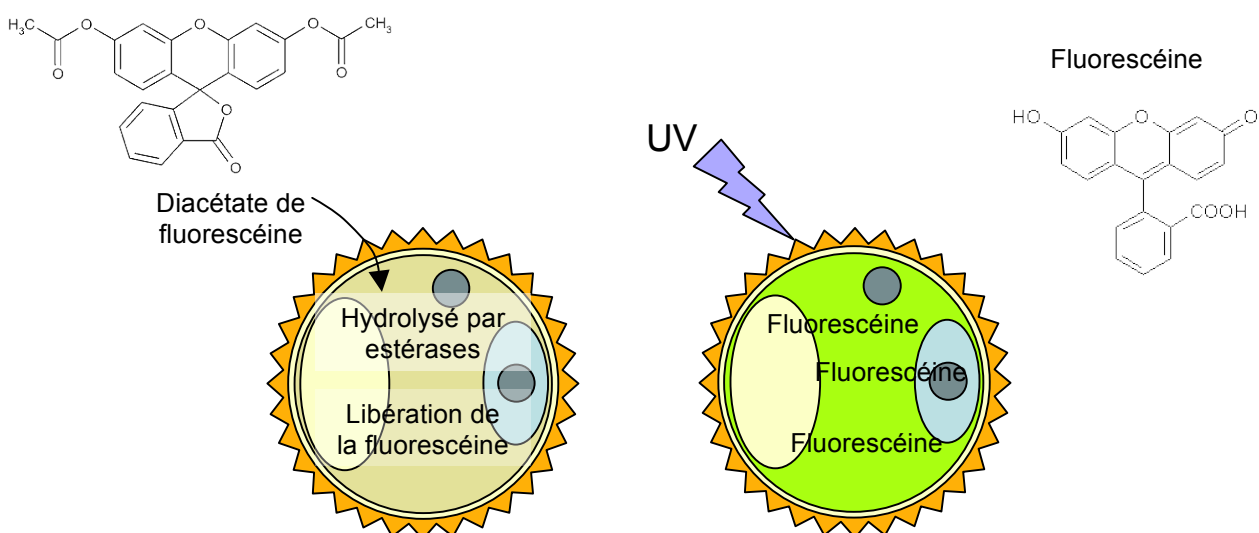
### 1.1. Les méthodes d'évaluation de la viabilité du pollen

Les méthodes d'évaluation de la viabilité du pollen sont des mesures dites indirectes car elles reposent sur la corrélation entre la viabilité d'une cellule et certaines de ses caractéristiques physiologiques et physiques (Heslop-Harrison *et al.*, 1984 ; Kearns and Inouye, 1993). Il existe plusieurs tests d'évaluation de la viabilité comme les colorations de la cellule végétative ou les tests d'activités enzymatiques (Kearns and Inouye, 1993).

Les méthodes de coloration du cytoplasme de la cellule végétative comme la coloration au lactophénol ou au carmin acétique se basent sur le concept que les grains de pollen exempts de cytoplasme sont morts (Nepi and Franchi, 2000). Ces méthodes surestiment la viabilité du pollen car elles colorent les grains viables possédant un cytoplasme, mais également les grains morts (Käpylä, 1991). La coloration d'Alexander (1969) met en évidence la présence de cellulose et d'un protoplasme. Elle est basée sur l'hypothèse que la présence d'un protoplasme rend compte de la viabilité d'un grain de pollen (Kearns and Inouye, 1993). Elle permet selon Barrow (1983) de distinguer les grains de pollen qui avortent tôt car ils ne possèdent pas de protoplasme. En revanche, ceux qui avortent à un stade proche de la maturité ne sont pas détectés (Pline *et al.*, 2002).

Les méthodes enzymatiques utilisent des réactions colorées induites par l'activité métabolique dans le grain de pollen. Ces méthodes reposent sur l'hypothèse que si l'activité est présente, la réaction colorée a lieu et par conséquent que le pollen est viable (Nepi and Franchi, 2000).

Les premières méthodes enzymatiques étaient basées sur les sels de tétrazolium qui changent de couleur lorsqu'ils sont réduits par les enzymes respiratoires des mitochondries. D'autres méthodes permettent de détecter la présence de déshydrogénases, de  $\beta$ -galactosidases ou encore de myéloperoxydases (Rodriguez-Riano and Dafni, 2000). La méthode enzymatique la plus couramment utilisée est celle proposée par Heslop-Harrison et Heslop-Harrison (1970) et modifiée par Shivanna et Heslop-Harrison (1981), la réaction fluorochromatique (FCR). Lors de cette réaction, le diacétate de fluorescéine non-fluorescent et apolaire pénètre dans le grain de pollen où il est hydrolysé par des estérases en fluorescéine, composé fluorescent et polaire retenu dans la cellule par la membrane plasmique (Figure 25). Cette méthode évalue deux caractères : l'intégrité membranaire et l'activité estérasique. Son avantage est de différencier très facilement et rapidement les grains viables des grains non-viables (Pline *et al.*, 2002). Elle peut cependant sous-estimer la viabilité lorsque le pollen est déshydraté (Stone *et al.*, 1995).



**Figure 25 : Principe de la réaction fluorochromatique.** Le diacétate de fluorescéine, apolaire, pénètre dans le grain de pollen où il est hydrolysé par des estérases qui libèrent de la fluorescéine. Cette molécule polaire s'accumule dans la cellule végétative car elle est retenue par la membrane plasmique. Après excitation en lumière ultra-violette, la fluorescéine émet une fluorescence verte.

## 1.2. Les méthodes d'évaluation de la capacité à germer du pollen

La capacité à germer du pollen se mesure en calculant le pourcentage de grains de pollen germés dans un échantillon (Nepi and Franchi, 2000). Pour cela, les grains de pollen sont mis

à germer *in vivo* sur un stigmate réceptif conspécifique ou *in vitro* sur un milieu de germination adapté.

La méthode de germination *in vivo* consiste à compter le nombre de grains de pollen qui ont germé par rapport au nombre total de grains déposés sur le stigmate. Pour cela, on peut (i) compter le nombre de tubes polliniques présents dans le style et visualisés grâce à des colorants tels que le bleu d'aniline et le rapporter au nombre total de grains de pollen (Chacoff *et al.*, 2008 ; Huang *et al.*, 2004 ; Adaniya, 2001 ; Nepi and Franchi, 2000) ou (ii) compter le nombre de grains ancrés dans le stigmate grâce au tube pollinique et le rapporter au nombre total de grains (Mayer and Gottsberger, 2000).

La germination *in vitro* est une technique beaucoup plus rapide que la germination *in vivo*. Elle consiste à immerger des grains de pollen dans une solution germinative ou à les déposer sur un milieu solide et à les observer sous microscope pour visualiser les tubes polliniques formés (Brewbaker and Kwack, 1963). Cette méthode nécessite cependant un important travail d'adaptation du milieu germinatif à l'espèce considérée, plus particulièrement en ce qui concerne la source de carbone. En effet, la concentration en saccharose nécessaire à la germination *in vitro* du pollen varie entre 2% et 40% en fonction des espèces. L'optimum en saccharose doit être déterminé pour chaque espèce à l'aide d'essais de germination à différentes concentrations. Une concentration trop faible en saccharose entraîne un faible taux de germination et des tubes polliniques peu développés alors qu'une concentration trop élevée provoque l'éclatement des tubes polliniques (Kearns and Inouye, 1993). Pour beaucoup d'espèces, de l'acide borique et du calcium sont nécessaires à la germination du pollen. L'acide borique normalement apporté par le style et le stigmate chez ces espèces facilite la consommation des sucres et joue un rôle dans la production de pectine dans le tube pollinique (Richards, 1986 cité par Kearns and Inouye, 1993). Le calcium présent à la surface de certains grains de pollen est impliqué dans la synthèse de pectine et dans le contrôle des conditions osmotiques (Kearns and Inouye, 1993).

La germination *in vitro* fournit un système expérimental contrôlé, permet une importante répétabilité et est rapide à mettre en place. Cependant, elle ne reproduit pas complètement la croissance *in vivo* (Taylor and Hepler, 1997). En effet, avec un milieu de germination hautement optimisé, les tubes polliniques formés n'atteignent que 30 à 40% de la longueur des tubes développés *in vivo* et des anomalies structurales sont fréquemment observées. De plus,

l'interaction dynamique existante entre le pollen et le pistil reste impossible à reproduire *in vitro* (Taylor and Hepler, 1997).

En revanche, la germination *in vivo* qui permet d'obtenir des résultats proches de la réalité demande un plus grand temps de manipulation. De plus, elle nécessite un contrôle précis du nombre de grains déposés sur les stigmates et de la manière dont ils sont déposés pour être reproductible. En effet, ce type de germination est affecté par des effets de masse et de compétition entre grains (Nepi and Franchi, 2000) ou par des réactions d'incompatibilité avec le pistil (Stanley and Linskens, 1974).

### **1.3.L'évaluation de l'aptitude à féconder**

Le test qui évalue la capacité à féconder du pollen est la mesure de la grenaison. Il consiste à déposer du pollen sur un stigmate conspécifique réceptif et à déterminer le nombre de graines produites (Kearns and Inouye, 1993). Cette méthode donne un résultat plus qualitatif que quantitatif de l'aptitude à féconder du pollen (Shivanna and Johri, 1989). En effet, la grenaison ne dépend pas uniquement de la qualité reproductrice du pollen. La maturité des ovules, la réceptivité du stigmate, les réactions d'incompatibilité déterminées par le génotype femelle sont autant de facteurs pouvant interférer avec le test de fécondité du pollen (Heslop-Harrison *et al.*, 1984 ; Knox *et al.*, 1986). De ce fait, nous avons choisi de ne pas mesurer l'aptitude à féconder du pollen.

### **1.4.Variabilité de ces méthodes**

Afin d'apprécier au mieux la qualité reproductrice du pollen, il est nécessaire d'utiliser plusieurs tests simultanément qui évaluent chaque composante de la qualité (Dafni and Firmage, 2000). Les différents tests utilisés pour estimer une de ces composantes peuvent donner des résultats contradictoires en fonction des espèces et des génotypes (Shivanna and Rangaswamy, 1992) et ne correspondent pas toujours à la qualité reproductrice réelle du pollen (Mayer and Gottsberger, 2000). Il est donc souhaitable de tester plusieurs méthodes pour choisir la meilleure pour chaque composante et pour une espèce donnée (Dafni and Firmage, 2000).

Dans cette étude, nous avons déterminé les méthodes les plus adéquates pour évaluer la viabilité et la capacité à germer du pollen de *C. melo*. Nous avons comparé la coloration d'Alexander (1969) et la FCR (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970) pour définir le

test de viabilité le plus adapté à notre modèle végétal. Deux méthodes de germination *in vitro*, la première dérivée de Dumas de Vaulx (1992) et Susin et Alvarez (1997) et la seconde proposée par Matlob et Kelly (1973) ont été testées. Enfin nous avons vérifié que les méthodes d'extraction du pollen n'altéraient pas sa qualité.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Matériel végétal**

Des graines de melon (*C. melo* L. var. *cantalupensis*) var. Thorgal ® (Nunhems) ont été semées individuellement en pots et placées en chambre de culture (photopériode 16h, température 26°C) jusqu'au stade deux vraies feuilles. Les plantes ont par la suite été repiquées sous tunnel. Les plantes ont été arrosées deux fois par semaine et régulièrement taillées.

### **2.2. Sources de pollen**

Cette étude de la qualité reproductrice du pollen de *C. melo* a été réalisée en utilisant soit du pollen provenant directement des anthères soit du pollen ayant été préalablement extrait.

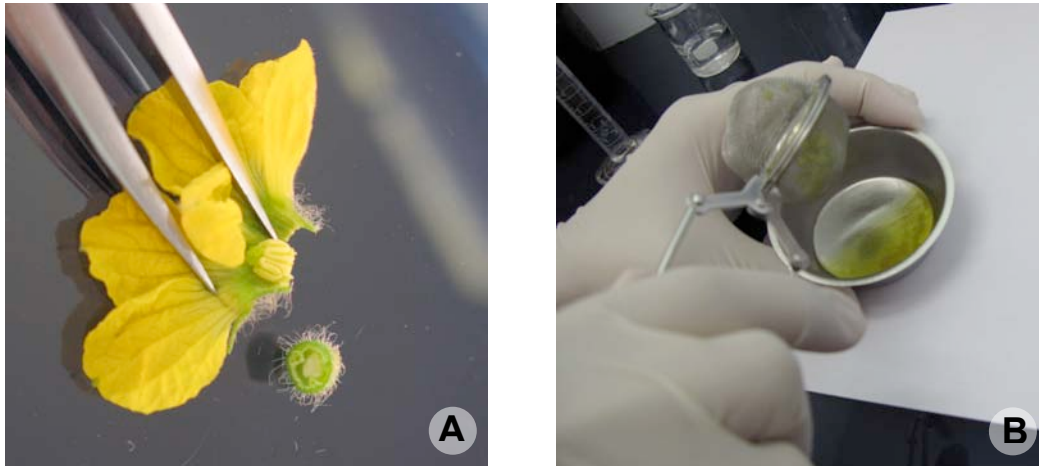
#### *Pollen provenant des anthères*

Des fleurs mâles ont été récoltées juste avant utilisation. Leurs anthères ont été excisées. Les cinq anthères d'une même fleur constituaient une unité statistique (US).

#### *Pollen extrait artificiellement*

Les anthères de fleurs mâles venant d'être récoltées ont été excisées, puis placées dans des boules à thé. Le pollen a ensuite été extrait soit mécaniquement, soit chimiquement. Pour l'extraction mécanique, les boules à thé contenant les anthères ont été soumises à des vibrations au-dessus de coupelles dans lesquelles le pollen a été récupéré. L'extraction chimique a été réalisée en immergeant chaque boule à thé dans 5 ml de pentane. Le pollen ainsi obtenu a été utilisé après évaporation totale de ce solvant (Figure 26).

Après ces extractions, la manipulation du pollen a été conduite en le transférant sur des embouts de coton-tige. Ces derniers ont été utilisés comme supports inertes en vue de prélever des quantités comparables de pollen à partir des différents lots. La mise en contact du pollen extrait artificiellement avec ces supports était la même quel que soit le mode d'extraction. Les embouts de coton-tige ont été placés dans les coupelles contenant le pollen extrait puis mis en contact par vibration. Chaque embout constituait une US pour les tests.



**Figure 26 : Extraction chimique du pollen.** Les anthères des fleurs sont excisées (A) puis placées dans des boules à thé et trempées dans le pentane (B).

## 2.3.Évaluation de la viabilité

### a.FCR

Une solution-mère de diacétate de fluorescéine (DAF) a été préparé quotidiennement en dissolvant 2 mg/ml d'acétone et conservée à l'obscurité et à température ambiante. Pour chaque test, une solution de travail a été préparée extemporanément en diluant 2,5  $\mu$ l de la solution-mère de DAF dans 1 ml de saccharose à 15% (p/v). Chaque US était constituée du pollen provenant soit des cinq anthères d'une même fleur, soit d'un embout de coton-tige dans le cas de pollen extrait artificiellement. Chaque US a été introduite dans un tube contenant 1 ml de solution colorante. Le tube a été agité pendant quelques secondes pour mettre en suspension le pollen. Après 15 minutes de réaction à l'obscurité et à température ambiante, 20  $\mu$ l ont été prélevés et déposés sur une lame de microscope puis recouverts d'une lamelle. Les lames ont été ensuite observées sous microscope à épifluorescence (avec filtre d'émission à 522 nm et filtre d'excitation à 488 nm). Pour chaque US, 100 grains de pollen



ont été examinés et comptés viables ou non viables. Seuls les grains de pollen ayant une fluorescence brillante et uniforme ont été considérés viables.

### **b.Coloration d'Alexander**

La solution colorante a été préparée selon la formulation d'Alexander (1969) en mélangeant 20 ml d'éthanol grade Reagent, 2 ml de vert de malachite (1% dans de l'éthanol à 95°), 50 ml d'eau distillée, 40 ml de glycérol, 10 ml de fuchsine acide (1% dans de l'eau distillée), 1 g de phénol et 2 ml d'acide lactique. Cette solution colorante a été stockée, à l'obscurité et à température ambiante, 3 semaines avant utilisation. Pour chaque test, le pollen a été mis en suspension en plongeant une US dans 500 µl de solution colorante. L'ensemble a été soniqué 30 secondes, puis centrifugé 40 secondes pour sédimenter le pollen. Une goutte (20 µl) prélevée dans le fond du tube a été déposée sur lame. La lame a été chauffée par cinq passages au-dessus d'une flamme et a été ensuite recouverte d'une lamelle. Après cinq minutes de réaction entre le pollen et la coloration, les lames ont été observées sous microscope. Pour chaque US, 100 grains de pollen ont été analysés, les grains de pollen colorés en violet foncé étaient considérés comme viables alors que ceux colorés en vert clair étaient considérés comme non viables.

## **2.4.Evaluation de la capacité à germer**

Les conditions optimales de germination *in vitro* variant d'une espèce et même d'un génotype à l'autre, nous avons choisi de comparer les conditions d'expérimentation utilisées pour du pollen de *C. melo* par Matlob et Kelly (1973) et par Susin et Alvarez (1997).

Le tableau 3 présente la composition des milieux germinatifs ainsi que les conditions expérimentales des deux méthodes testées.

Méthode	Milieu germinatif		Conditions d'incubation	
	Saccharose (p/v)	Acide borique	Température	Durée
1 – dérivée de Dumas de Vault (1992) et de Susin and Alvarez (1997)	15%	5 mg.l <sup>-1</sup>	25°C	1h
2 – Matlob and Kelly (1973)	20%	5 mg.l <sup>-1</sup>	32°C	2h

**Tableau 3 : Compositions des milieux germinatifs et conditions d'expérimentation des deux méthodes de germination *in vitro* testées.**

Pour chaque méthode, une US a été placée dans un tube contenant 500 µl de milieu germinatif. Après incubation, 2 gouttes de carmin acétique à 5% ont été rajoutées. Après 10 min de coloration, 20 µl de solution ont été prélevés et montés entre lame et lamelle. Cent grains de pollen ont été analysés par lame. Un grain de pollen était considéré germé quand la longueur du tube pollinique était supérieure au diamètre du grain (Figure 27).



**Figure 27 : Germination *in vitro* du pollen de *C. melo*.** Contrairement aux grains de pollen non germés (NG), les grains de pollen considérés comme germés (G) présentent un tube pollinique dont la longueur est supérieure au diamètre du grain.

## **2.5.Analyse statistique**

Les données ont généralement été comparées avec un test de Kruskal-Wallis. Si ce dernier révélait une différence significative, elles étaient ensuite comparées deux à deux avec un test de Wilcoxon intégrant la correction de Holm. Dans quelques cas, un test t de Student a été utilisé. L'ensemble de ces tests a été fait sous le logiciel R.

## **3.Résultats**

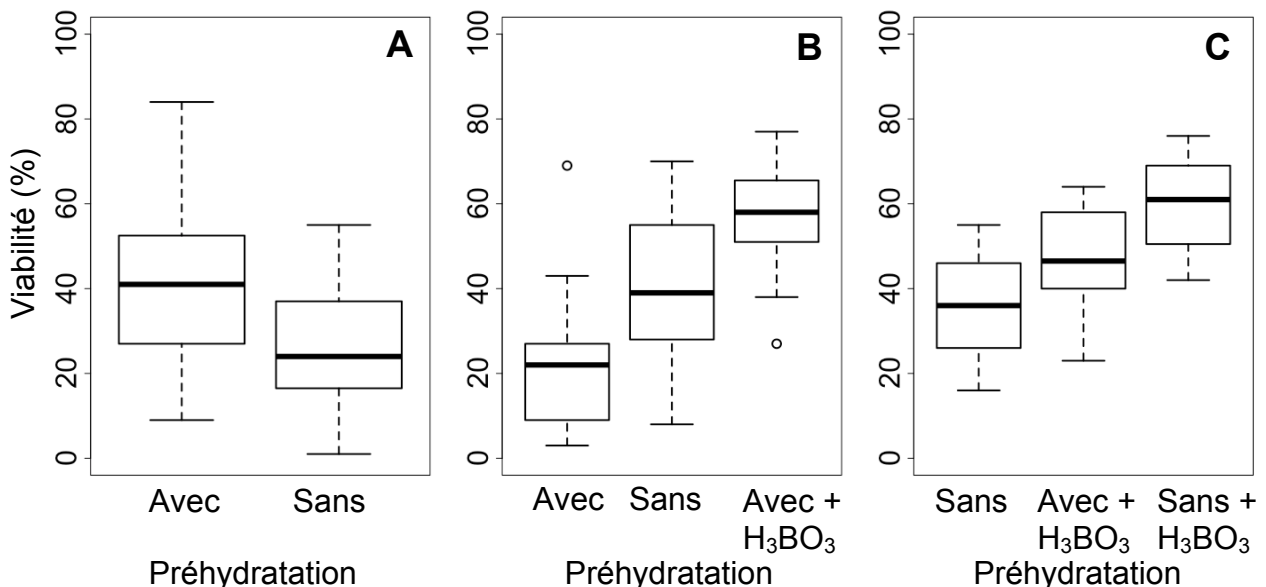
### **3.1.Evaluation de la viabilité du pollen**

#### **a.Amélioration de la FCR**

Une étape d'amélioration de la FCR a été nécessaire en 2009 car cette méthode utilisée sur melon par Vaissière *et al.* (1996) et pendant notre expérimentation de 2008 ne donnait plus des résultats satisfaisants (résultats non montrés).

La FCR étant connue pour sous-estimer la viabilité lorsque le pollen est déshydraté, la première piste que nous avons exploré afin d'améliorer l'évaluation de la viabilité a été la préhydratation du pollen.

La préhydratation des fleurs entières en chambre humide pendant 1h à 32°C a permis d'augmenter la viabilité (41,15% contre 26,8% sans préhydratation ; KW, H=6,200, df=1, p=0,013 ; Figure 28A). Cependant, les valeurs étaient toujours inférieures aux valeurs obtenues en 2008. De plus, la forte variabilité enregistrée ne permettait pas la validation de cette méthode de préhydratation.

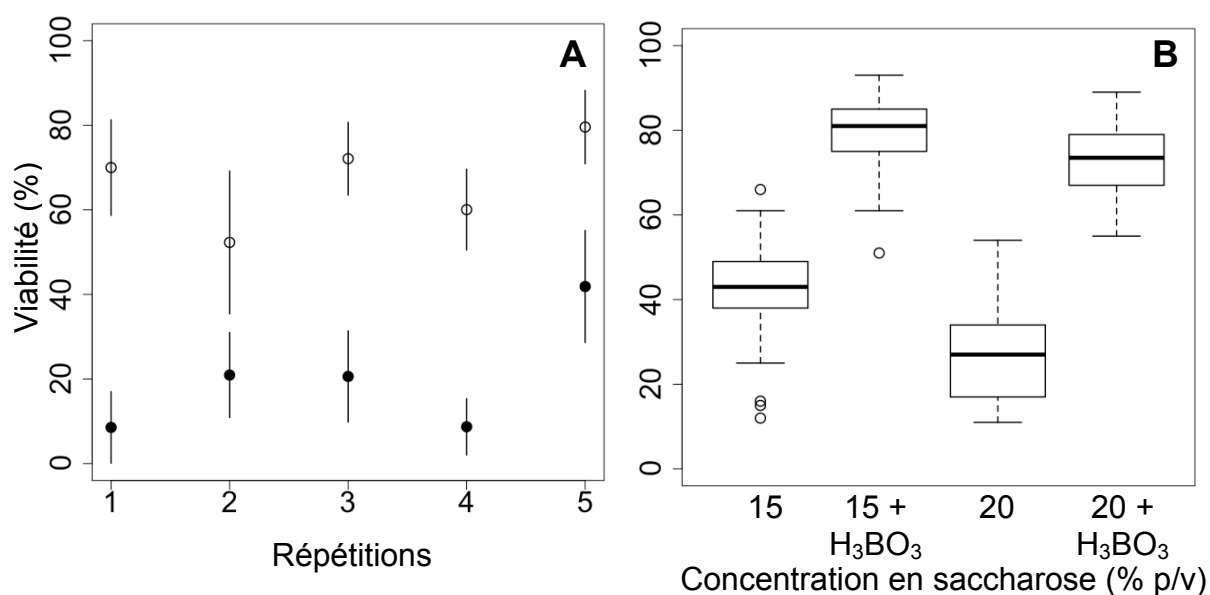


**Figure 28 : Effet de la préhydratation sur l'estimation de la viabilité du pollen.** Différentes méthodes ont été testées: **A** préhydratation des fleurs entières en chambre humide pendant 1h à 32°C, n=20 ; **B** préhydratation du pollen en solution réactionnelle pendant 1h à 32°C avec ou sans ajout d'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) dans la solution, n=20 ; **C** préhydratation du pollen en solution réactionnelle pendant 2h à 32°C avec ou sans ajout d'acide borique dans la solution, n=20. Trait = médiane, boîte = 25%-75%, moustaches = 1<sup>er</sup>-9<sup>e</sup> déciles, cercles = valeurs extrêmes.

Une autre méthode de stabilisation du niveau hydrique du pollen a, par la suite, été testée. Pour cela, le pollen a été réhydraté directement dans la solution réactionnelle de la FCR [saccharose à 15% (p/v)] pendant 1h à 32°C. Cette méthode étant inspirée de la technique de germination *in vitro*, nous avons testé en parallèle l'ajout d'acide borique à 5mg.l<sup>-1</sup> dans la solution réactionnelle. Les résultats présentés dans la Figure 28B montrent que les pourcentages de viabilité estimés après préhydratation en solution standard était plus faible que sans préhydratation (test post-hoc, p=0,0026). En revanche, l'ajout d'acide borique a

permis d'obtenir une viabilité estimée plus importante (test post-hoc,  $p=0,0026$ ). Ce résultat inattendu nous a conduit à déterminer si l'effet constaté était dû simplement à la présence d'acide borique dans la solution ou s'il y avait une interaction avec la préhydratation. Nous avons alors mis en oeuvre une expérimentation pour tester ces deux modalités (Figure 28C). Ceci a révélé que la viabilité du pollen était plus importante en présence d'acide borique (KW,  $H=24,264$ ,  $df=2$ ,  $p=5,38.10^{-6}$ ) et que, dans ce cas, la préhydratation ne permettait pas d'augmenter la viabilité (59,9% sans préhydratation contre 47,1% avec ; test post-hoc,  $p=0,0029$ ).

Pour s'assurer de cet effet de l'acide borique comme élément stabilisant la viabilité du pollen chez *C. melo*, il a été vérifié au cours de cinq répétitions (Figure 29A). Il en est ressorti que même si la viabilité estimée n'était pas constante, elle était toujours supérieure lors de l'ajout d'acide borique (test t,  $t=-29,44$ ,  $p<2,2.10^{-16}$ ).



**Figure 29 : Effet de l'acide borique et de la concentration en saccharose sur l'estimation de la viabilité.** **A** Viabilité moyenne du pollen estimée avec (○) ou sans (●) acide borique dans la solution réactionnelle, les barres représentent l'écart-type, répétitions 1 et 2 :  $n=20$ , répétitions 3, 4 et 5 :  $n=30$ . **B** Différentes concentrations en saccharose supplémentées ou non d'acide borique ont été testées,  $n=30$ . Trait = médiane, boîte = 25%-75%, moustaches = 1<sup>er</sup>-9<sup>e</sup> déciles, cercles = valeurs extrêmes.

L'acide borique ayant un effet sur la métabolisation des sucres, nous avons choisi de tester l'effet d'une augmentation de la concentration en saccharose seule ou couplée avec de l'acide borique à 5 mg.l<sup>-1</sup> sur l'estimation de la viabilité du pollen (Figure 29B). Nos résultats ont montré que l'augmentation de la concentration en saccharose [de 15% à 20% (p/v)] diminuait la viabilité que ce soit en présence ou en absence d'acide borique (test post-hoc, 15% de

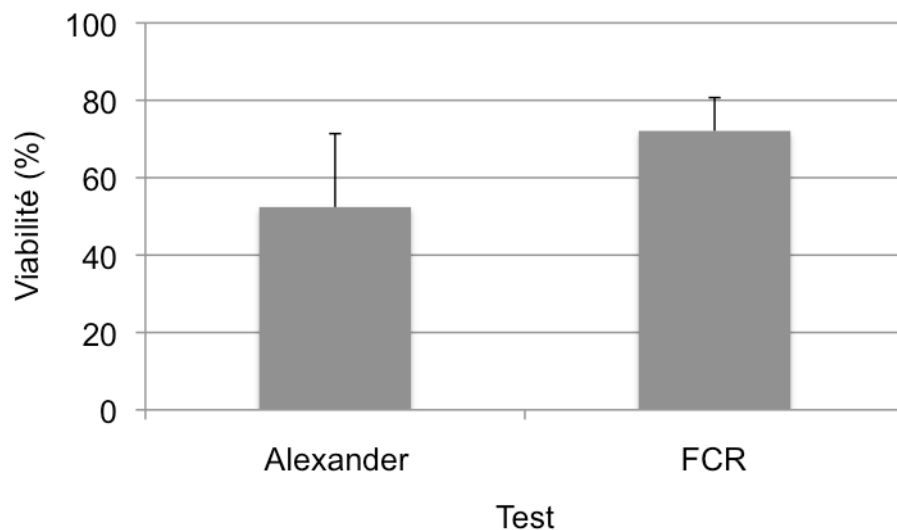
saccharose avec ou sans  $H_3BO_3$ ,  $p=9,2.10^{-5}$  ; 20% de saccharose avec ou sans  $H_3BO_3$ ,  $p=0,0028$ ).

Tenant compte de ces résultats, la méthode que nous avons adoptée pour la suite des expérimentations de 2009 a été la solution réactionnelle composée de saccharose à 15% (p/v) supplémentée d'acide borique à  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ .

### **b.Comparaison de la coloration d'Alexander et de la FCR**

Afin de vérifier que la FCR était la méthode la plus adéquate pour l'évaluation de la viabilité du pollen de *C. melo* dans notre contexte expérimental, nous l'avons comparée à la coloration d'Alexander.

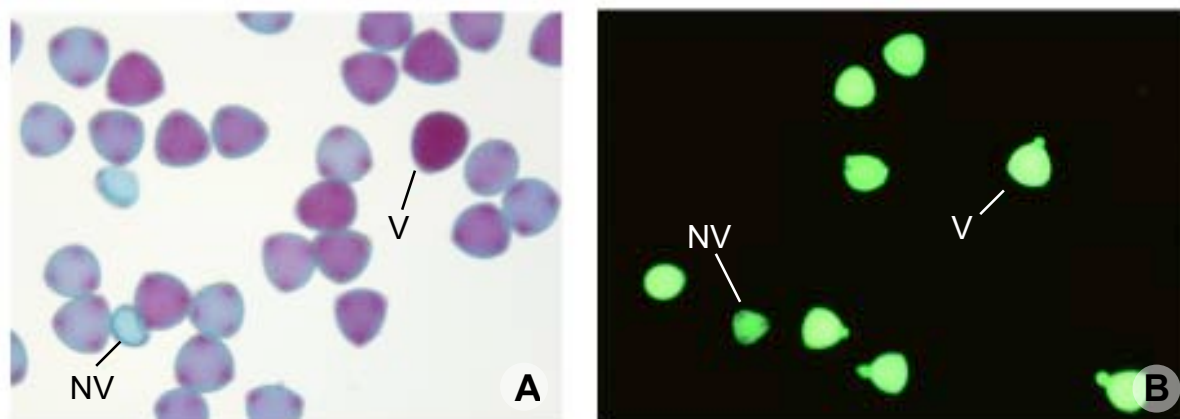
Cette étude comparative a montré que la viabilité estimée par la coloration d'Alexander était plus faible que par la FCR (52,4% contre 72,1% ; KW,  $H=18,852$ ,  $df=1$ ,  $p=1,4.10^{-5}$  ; Figure 30).



**Figure 30 : Comparaison de la viabilité du pollen estimée par la coloration d'Alexander ou par la réaction fluorochromatique.** Les histogrammes représentent la viabilité moyenne du pollen analysé chez 30 fleurs, les barres représentent l'écart-type.

Par ailleurs, la coloration d'Alexander s'accompagnait d'une importante variabilité pouvant s'expliquer par la large gamme de coloration des grains observés qui rendait l'évaluation difficile (Figure 31). En effet, elle n'a pas permis une détermination tranchée du statut des grains de pollen. Selon cette technique, pour être considéré comme viable un grain de pollen doit présenter une coloration homogène et fuchsia du cytoplasme et à l'inverse un grain non viable doit présenter une coloration turquoise homogène de la cellulose. Or, nos observations

ont révélé que cette méthode colorait les grains de pollen dans une gamme allant du turquoise au fuchsia avec de nombreux intermédiaires (Figure 31A). La FCR, quant à elle, a permis une détermination rapide et fiable car elle colorait les grains de pollen de manière tranchée (Figure 31B).



**Figure 31 : Coloration des grains de pollen de melon en fonction de la méthode utilisée.** Avec la coloration d'Alexander (A), les grains viables ont une coloration violette homogène (V) alors que les grains non viables sont turquoise (NV). Néanmoins, de nombreux grains de pollen présentent des colorations intermédiaires et sont difficiles à discriminer. Avec la réaction fluorochromatique (B), les grains viables fluorescent (V) alors que les non viables (NV) ne présentent qu'une faible autofluorescence due à l'exine.

### 3.2. Evaluation de l'aptitude à germer du pollen

L'aptitude à germer *in vitro* du pollen de *C. melo* a été testée par deux méthodes différentes au cours de trois répétitions (Tableau 4). Les tests de germination *in vitro* effectués selon la technique dérivée de Dumas de Vaulx (1992) et de Susin et Alvarez (1997) n'a permis qu'à 15,5% des grains de pollen de germer et avec une très forte variabilité au cours des répétitions. En revanche, les tests de germination *in vitro* que nous avons effectués selon la méthode de Matlob et Kelly (1973) a permis d'obtenir un taux important de germination (85,9% en moyenne) qui variait peu en fonction des répétitions.

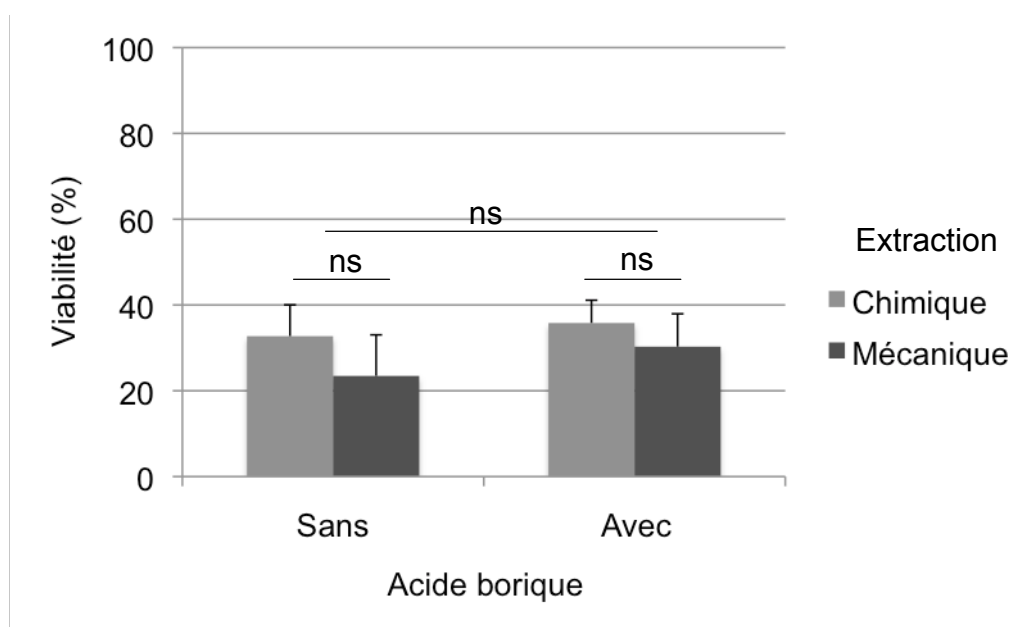
Répétitions	Méthode 1	Méthode 2
1	34,54 ± 15,72 (11)	89,53 ± 7,48 (15)
2	6,11 ± 5,60 (10)	85,94 ± 6,52 (20)
3	3,98 ± 5,05 (10)	84,08 ± 7,87 (30)
Moyenne des répétitions	15,51 ± 17,21 (31)	85,91 ± 7,59 (65)

**Tableau 4 : Estimation de l'aptitude à germer *in vitro* du pollen de *C. melo* selon deux méthodes.** Méthode 1 : technique dérivée de Dumas de Vaulx (1992) et de Susin et Alvarez (1997). Méthode 2 : méthode de Matlob et Kelly (1973). Aptitude à germer moyenne ± l'écart-type enregistrée au cours de trois répétitions, nombre d'échantillons entre parenthèses.

### 3.3.Méthodes d'extraction et méthodes d'évaluation de la qualité reproductrice du pollen

Les expérimentations ultérieures nécessitant l'utilisation de pollen extrait artificiellement, il était essentiel de vérifier que les méthodes d'extraction n'altéraient pas la qualité reproductrice.

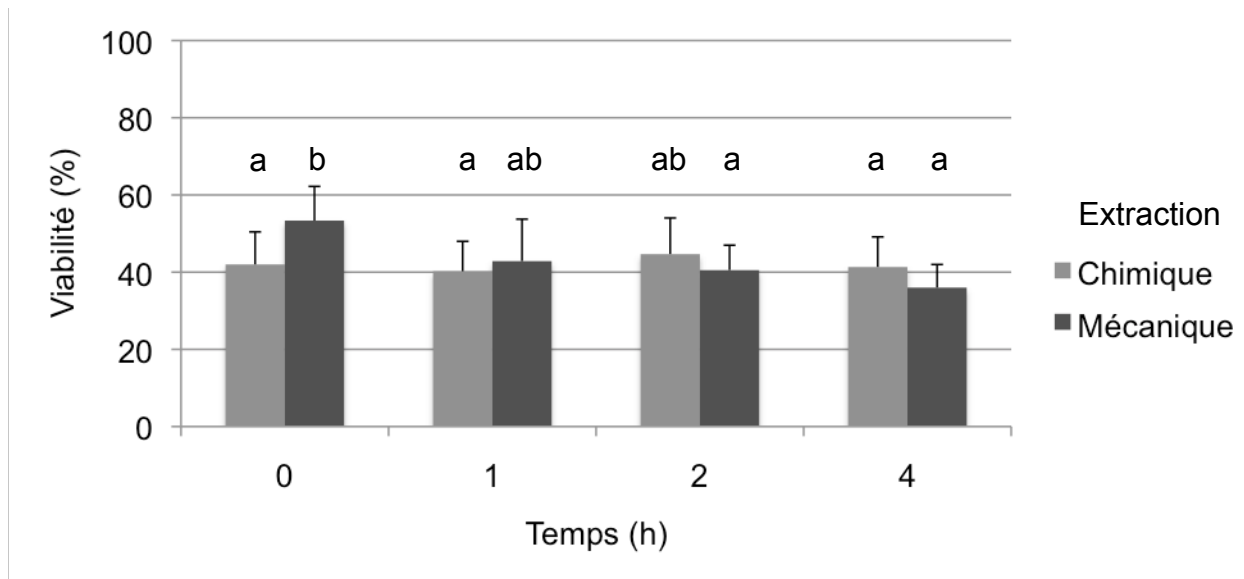
Les résultats ont montré que la viabilité du pollen extrait artificiellement, que ce soit chimiquement ou mécaniquement, était plus faible comparée à celle du pollen provenant directement des anthères (Figure 32). Nous avons également voulu vérifier l'effet de l'acide borique sur du pollen extrait artificiellement. Son utilisation n'a pas amélioré l'estimation de la viabilité du pollen (test post-hoc,  $p=0,27$ ). Cependant, n'induisant pas non plus d'effet négatif, l'acide borique a été utilisé lors des tests ultérieurs pour qu'ils puissent être comparés aux précédents.



**Figure 32 : Effet de l'utilisation d'acide borique sur l'estimation de la viabilité du pollen en fonction de la méthode d'extraction utilisée.** Les histogrammes représentent la viabilité moyenne du pollen analysé chez 15 fleurs, les barres représentent l'écart-type, ns = différence non significative.

La longévité du pollen extrait artificiellement, c'est-à-dire le maintien de sa viabilité au cours du temps, a été évaluée par FCR (Figure 33). Il ressort que, directement après extraction, la viabilité du pollen extrait chimiquement était plus faible que celle du pollen extrait mécaniquement (test post hoc,  $p=0,03$ ). Puis, suite à une, deux et quatre heures d'attente après extraction, les grains de pollen extraits par les deux méthodes présentaient des viabilités similaires. De plus, nos résultats ont montré que la viabilité du pollen extrait chimiquement

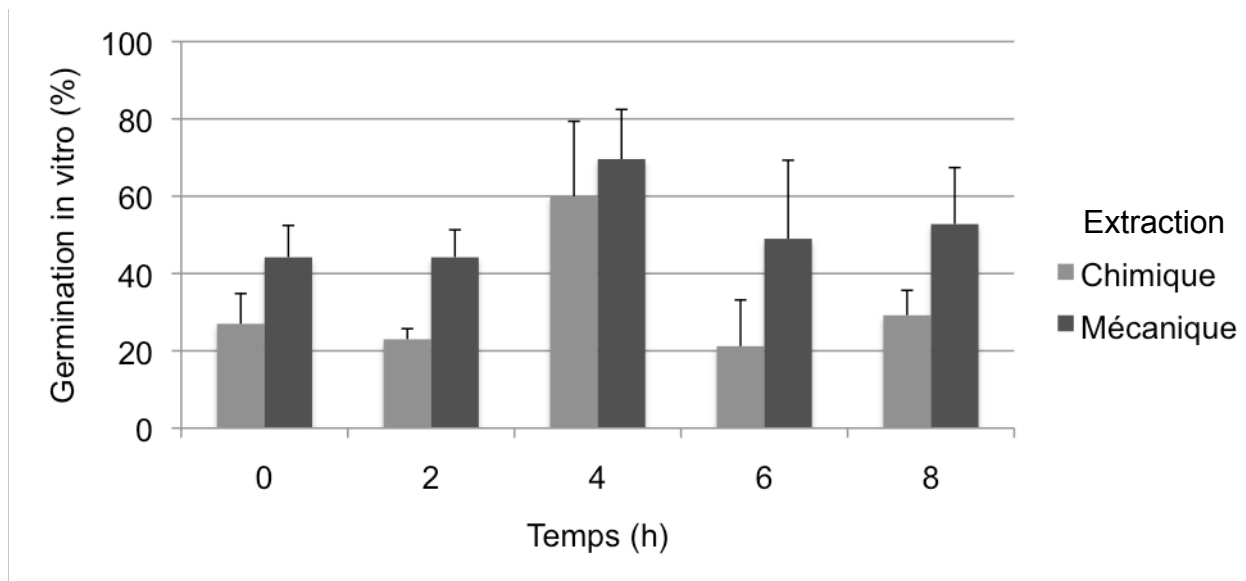
était stable au cours du temps (KW,  $H=0,965$ ,  $df=3$ ,  $p=0,81$ ), alors que celle du pollen extrait mécaniquement a diminué ( $H=22,062$ ,  $df=3$ ,  $p=6,3.10^{-5}$ ).



**Figure 33 : Evolution de la viabilité du pollen au cours du temps en fonction du mode d'extraction.** Les histogrammes représentent la viabilité moyenne du pollen analysé chez 15 fleurs, les barres représentent l'écart-type.

L'aptitude à germer du pollen extrait artificiellement a été évaluée, directement après extraction ou après différents temps d'attente (Figure 34). La méthode de germination *in vitro* utilisée a été celle testée précédemment sur le pollen provenant d'anthère. Les résultats montrent que le pollen extrait mécaniquement a germé en plus grande proportion que le pollen extrait chimiquement (test t,  $p=1,968.10^{-6}$ ). Quel que soit le mode d'extraction, l'aptitude à germer du pollen était plus élevée quatre heures après extraction.





**Figure 34 : Aptitude à germer *in vitro* du pollen en fonction du mode d'extraction et du temps d'attente après extraction.** Les histogrammes représentent l'aptitude à germer moyenne du pollen analysé chez 5 fleurs, les barres représentent l'écart-type.

#### **4. Discussion**

La FCR est actuellement la méthode la plus utilisée pour évaluer la viabilité du pollen. Cette méthode rapide et aisée d'utilisation permet de différencier avec fiabilité un grain de pollen viable d'un grain non viable. Cependant, aux cours de nos différentes campagnes d'expérimentation, la FCR telle qu'elle était utilisée n'a plus permis une estimation fiable de la viabilité des échantillons de pollen testés. L'importante baisse de viabilité que nous avons enregistrée en 2009 pourrait être due au niveau d'hydratation du pollen. En effet, la FCR peut sous-estimer la viabilité lorsque le pollen est déshydraté car son activité enzymatique est réduite (Stone *et al.*, 1995) et la stabilité de ses membranes cellulaires est affectée (Taylor and Hepler, 1997). Cependant, le déclin apparent de viabilité dû à la déshydratation peut être modifié par une réhydratation du pollen (Stone *et al.*, 1995) à condition que les changements structuraux induits par cette déshydratation soient réversibles (Taylor and Hepler, 1997). Il a été montré chez plusieurs espèces que l'équilibration en haute humidité du pollen augmentait sa qualité reproductrice (Bar-Shalom and Mattsson, 1977 ; Shivanna and Heslop-Harrison, 1981). En revanche, chez *C. melo*, la préhydratation des fleurs entières ou du pollen uniquement testée ici n'a pas permis d'améliorer correctement l'estimation de la viabilité du pollen. Ces résultats sont concordants avec ceux de Cuny (1992) qui montraient que la

préhydratation était inefficace, voire néfaste, sur la germination *in vitro* du pollen de *C. melo*. Par contre, nous avons mis en évidence que l'ajout d'acide borique dans la solution réactionnelle améliorerait hautement l'estimation de la viabilité, nous permettant d'obtenir des valeurs similaires à celles obtenues les années précédentes. A notre connaissance, aucune autre étude n'a, auparavant, souligné l'intérêt de l'utilisation de l'acide borique dans la réalisation de la FCR. L'acide borique est habituellement employé lors de la germination *in vitro* pour sa capacité à favoriser la métabolisation des sucres. Il permet, de plus, de prévenir l'éclatement du grain de pollen (Vasil, 1960 ; Visser, 1955) en régulant la pénétration de l'eau (Gauch and Dugger, 1954). Cette propriété permet vraisemblablement d'améliorer l'estimation de la viabilité en réhydratant le pollen. Pour la suite des expérimentations de 2009, la FCR a été réalisée avec une solution réactionnelle composée de saccharose à 15% (p/v) additionnée d'acide borique à 5 mg.l<sup>-1</sup>.

Bien que la FCR soit la technique la plus communément utilisée pour estimer la viabilité du pollen et qu'elle ait déjà été utilisée sur *C. melo* (Vaissière *et al.*, 1996), nous voulions comparer cette méthode enzymatique sensible au niveau d'hydratation du pollen avec une méthode non enzymatique telle que la coloration d'Alexander. Dans nos conditions d'expérimentation, la FCR a permis une meilleure estimation de la viabilité que la coloration d'Alexander, cette dernière ne permettant pas une identification aisée du statut des grains de pollen. Pline *et al.* (2002) ont montré que la FCR permettait une estimation fiable de la viabilité du pollen de coton alors que la coloration d'Alexander pouvait la surestimer. De plus, la FCR est également la méthode la plus fiable pour estimer la viabilité du pollen du genre *Silene* comparée à d'autres colorations (Mayer and Gottsberger, 2000).

En ce qui concerne l'évaluation de l'aptitude à germer, la méthode de germination *in vitro* de Matlob and Kelly (1973) nous a permis d'obtenir une bonne estimation de l'aptitude à germer du pollen de *C. melo*, bien que légèrement plus faible que pour *C. melo* var *flexuosus* et de *C. sativus* (Matlob and Kelly, 1973). Les valeurs de germinations enregistrées pour la méthode dérivée de Dumas de Vaulx (1992) et de Susin et Avarez (1997), en revanche, n'ont pas permis une estimation fiable de l'aptitude à germer du pollen et sont très éloignées des valeurs obtenues dans les mêmes conditions expérimentales par Cuny (1992) et Susin et Avarez (1997).

Cette étude a montré que le pollen extrait artificiellement, chimiquement ou mécaniquement, avait une qualité reproductrice plus faible que le pollen provenant des anthères. Il se peut que les grains de pollen extraits artificiellement soient davantage exposés aux stress environnementaux et présentent une qualité réduite. En effet, durant l'extraction chimique, le solvant utilisé a dissous le pollenkitt présent à la surface du sporoderme qui le protégeait, alors qu'on peut penser que la majorité du pollen extrait mécaniquement provienne principalement de la périphérie de l'anthère et était donc plus exposé. Les deux modes d'extraction ont affecté de la même manière la viabilité du pollen. En revanche, le pollen extrait chimiquement était moins apte à germer que le pollen extrait mécaniquement. Il a été montré que l'utilisation de solvants organiques comme le pentane n'avaient pas d'effet sur la viabilité et sur l'aptitude à germer du pollen de nombreuses espèces (Iwanami and Nakamura, 1972 ; Jain and Shivanna, 1988a et b). Cependant, dans ces études, les temps d'incubation étaient plus longs que dans la présente étude. Il se pourrait que ces grains de pollen fragilisés par l'élimination de leur pollenkitt nécessitent un temps d'incubation plus important pour germer.

En conclusion, nos résultats ont montré que la FCR était la méthode la plus fiable pour estimer la viabilité du pollen de *C. melo*, et qu'elle pouvait être améliorée par l'ajout d'acide borique en cas de déshydratation du pollen. En ce qui concerne la germination *in vitro*, seule la méthode de Matlob et Kelly (1973) a permis d'obtenir une estimation fiable de l'aptitude à germer. Enfin, nous avons montré que l'extraction artificielle, qu'elle soit chimique ou mécanique affectait la qualité reproductrice du pollen, mais qu'elle permettait toutefois son utilisation pour nos expérimentations ultérieures et l'évaluation de sa viabilité et de son aptitude à germer.

## II. Qualité reproductrice du pollen présenté par la plante

### 1. Introduction

La qualité de l'interaction pollen-abeille dont dépend la formation de graines fonctionnelles, est contrôlée en premier lieu par la qualité reproductrice du pollen lorsqu'il est présenté par la plante. Or, il a été montré chez plusieurs espèces que le pollen n'avait pas une qualité reproductrice maximale à l'anthèse (Nepi *et al.*, 2001 ; Erickson and Markhart, 2002). Par exemple, la viabilité du pollen de *Leymus chinensis* n'est au moment de la déhiscence que de 71% (Huang *et al.*, 2004). De plus, la viabilité de grains de pollen collectés à différents moments de la journée peut varier (Stanley and Linskens, 1974). Il a été montré que celle de *Cucurbita pepo* est de 92% à la déhiscence, alors qu'elle n'est plus que de 75% six heures après (Nepi and Pacini, 1993). Cependant, la longévité du pollen varie fortement en fonction des espèces. Alors que le pollen de certaines Liliacées et Rosacées peut rester viable pendant 100 jours (Leduc *et al.*, 1990), la viabilité du pollen d'*Erythronium* décroît significativement en une heure d'exposition à l'air après déhiscence (Kearns et Inouye, 1993).

Qu'en est-il du pollen de *C. melo* dont l'anthèse ne dure qu'une journée ? Quelle est la qualité reproductrice du pollen présenté par la plante et comment évolue-t-elle au cours de l'anthèse ? Pour répondre à ces interrogations, un suivi de la viabilité et de l'aptitude à germer du pollen de *C. melo* a été réalisé tout au long de l'anthèse.

Le but de cette étude était de déterminer s'il existait une période durant laquelle le pollen possédait une qualité reproductrice optimale qui augmenterait l'efficacité de l'interaction pollen-abeille.

### 2. Matériels et méthodes

#### 2.1. Matériel végétal

Cette étude a été menée en 2007, 2008 et 2009 avec du melon (*C. melo* L. var. *cantalupensis*) var. Thorgal® (Nunhems) cultivé sur sol paillé. Le dispositif expérimental était composé de 64 plantes réparties sur trois rangs en 2007 et quatre rangs en 2008 et 2009 espacés de 0,90 m. La distance inter-plante dans chaque rang était de 0,85 m. Différentes conditions de culture ont été utilisées en fonction des années. En 2007, la culture a été mise en place en plein champ (mode de culture préconisé pour cette variété ; Figure 25). L'irrigation était d'une

heure trois fois par semaine. La culture était protégée de façon conventionnelle, par lutte chimique.



**Figure 35 : Culture en plein champ de *C. melo*.**

En 2008, la culture a été menée sous tunnel insect-proof (filet limitant grandement le passage d'arthropodes) pour éviter la pollinisation par les insectes (Figure 36). L'irrigation était, comme l'année précédente, d'une heure trois fois par semaine. En revanche, la protection de la culture a été faite par lutte intégrée.

Les mêmes conditions culturales ont été utilisées en 2009, exceptée l'irrigation qui était de 7 minutes trois fois par jour (à 4h, 12h et 20h).





Figure 36 : Culture de *C. melo* sous tunnel insect-proof.

Notre travail étant à l'échelle d'une population et non de la plante, la culture a été découpée en 64 zones géographiques (Figure 37). Le melon ayant une croissance avec des tiges rampantes en lianes, chaque rang devient rapidement un enchevêtrement de tiges appartenant à des plantes différentes. Chaque zone contient des tiges de différentes plantes. Les fleurs présentes sur une zone provenaient donc de différentes plantes.

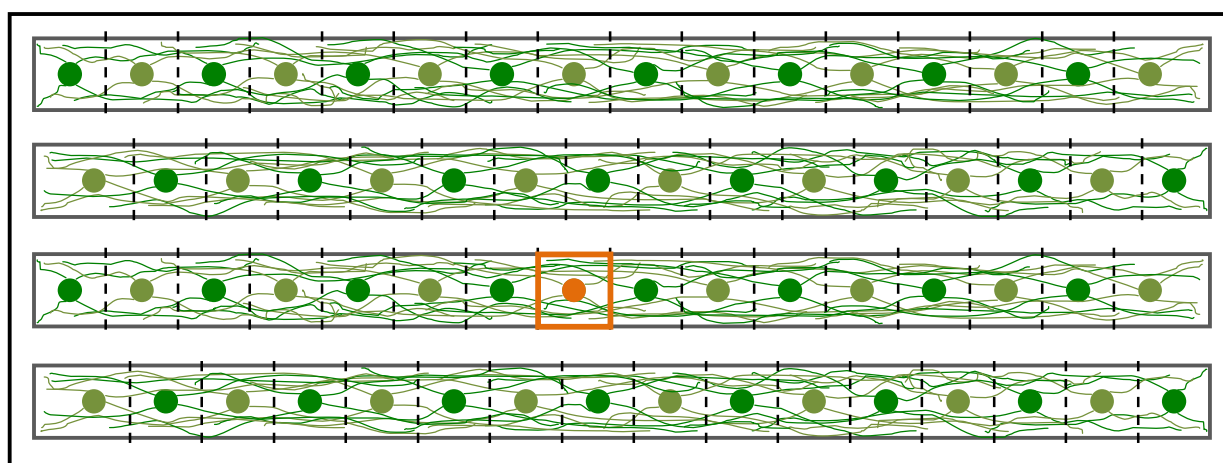


Figure 37 : Schéma de la culture divisée en 64 zones. Chaque zone est centrée sur le pied d'une plante (● et ●) et couvre la largeur du rang depuis la moitié de la distance entre son centre et le pied précédent (↑) jusqu'à la moitié de la distance entre son centre et le pied suivant. Elle contient des tiges de différentes plantes (≈). Exemple d'une zone (□) et de son centre (●).

## 2.2.Récolte des fleurs

Cette étude de la viabilité du pollen a été réalisée durant la période d'anthèse. L'heure de début d'anthèse a été fixée à 8h (heure d'été) sur la base des observations de Rosa (1924) et McGregor et Todd (1952). La période d'anthèse a été étudiée selon un pas de temps de trois heures, depuis 3 heures avant anthèse (en 2008 et 2009 uniquement), jusqu'à 9 heures après anthèse, soit 5h, 8h, 11h, 14h et 17h (heure d'été).

Pour chaque temps d'étude, les fleurs mâles ont été choisies la veille de l'expérimentation, par tirage aléatoire des zones de prélèvement réalisé avec logiciel R. Dans chacune de ces zones, un bouton floral au stade un jour avant anthèse a été choisi. Pour cela, il devait être fermé, mais présenter des pétales jaunes. Ces boutons ont été identifiés avec une étiquette portant le temps d'étude et le numéro de fleur (Figure 38). Dans le cas de la culture en plein-champ (2007), ces boutons ont été ensachés avec un sac en tulle pour éviter que des pollinisateurs ne prélèvent leur pollen lors de la période d'anthèse (Figure 39).



**Figure 38 : Fleurs prélevées aux différents temps d'étude de la journée d'anthèse.** Fleurs choisies et étiquetées la veille de l'expérimentation et prélevées à 5h (A), 8h (B), 11h (C), 14h (D) et 17h (E).



**Figure 39 : Fleur choisie et étiquetée la veille de son anthèse et ensachée afin de la protéger d'éventuels pollinisateurs.**

Le jour de l'expérimentation, les fleurs d'un temps d'étude ont été récoltées. En 2007, trois répétitions ont été réalisées. Pour chacune d'entre elles, 12 fleurs par temps ont été étudiées. En 2008, deux répétitions ont été réalisées, avec 12 et 24 fleurs analysées par temps lors de la

lère et de la 2<sup>nd</sup>e répétition respectivement. Une seule journée d'anthèse a été étudiée en 2009, avec 30 fleurs analysées par temps et par composante de la qualité à évaluer.

### **2.3.Evaluation de la viabilité par FCR**

Les anthères de chaque fleur constituaient une US. Elles ont été excisées puis placées dans un tube contenant 1 ml de solution réactionnelle, composée soit de saccharose à 15% (p/v), soit de saccharose à 15% (p/v) et d'acide borique à 5 mg.l<sup>-1</sup>. A chaque tube ont été rajoutés 2,5 µl de diacétate de fluorescéine à 2 mg/ml dans de l'acétone.

Après 15 minutes de réaction, 20 µl de mélange réactionnel contenant le pollen ont été prélevés et déposés sur une lame de microscope puis recouverts d'une lamelle. Les lames ont ensuite été observées sous microscope à épifluorescence. Un total de 100 grains de pollen par lames ont été analysés et notés viables ou non viables.

### **2.4.Evaluation de l'aptitude à germer**

Les anthères de chaque fleur constituaient une US. Elles ont été excisées puis placées dans un tube contenant 500 µl de milieu germinatif composé de saccharose à 20% (p/v) et d'acide borique à 5 mg.l<sup>-1</sup>. Après deux heures d'incubation à 32°C, 2 gouttes de carmin acétique à 5% ont été rajoutées dans chaque tube. Après 10 min de coloration, 20 µl de solution ont été prélevés et montés entre lame et lamelle. Cent grains de pollen ont été analysés par lame et notés germés ou non germés.

### **2.5.Données climatiques**

Les données climatiques des journées d'expérimentation ont été fournies par l'unité Agroclim de l'INRA d'Avignon.

### **2.6.Analyse statistique**

Les proportions de pollen viable ou germé ont été transformées par la fonction arc sinus (Sokal and Rohlf, 1994). Cependant, même après transformation, elles ne remplissaient pas la condition de normalité (test Shapiro,  $p=7,6.10^{-8}$ ). Les données ont alors été traitées en utilisant un modèle linéaire généralisé (GLM) qui permet de prendre en compte le fait que les

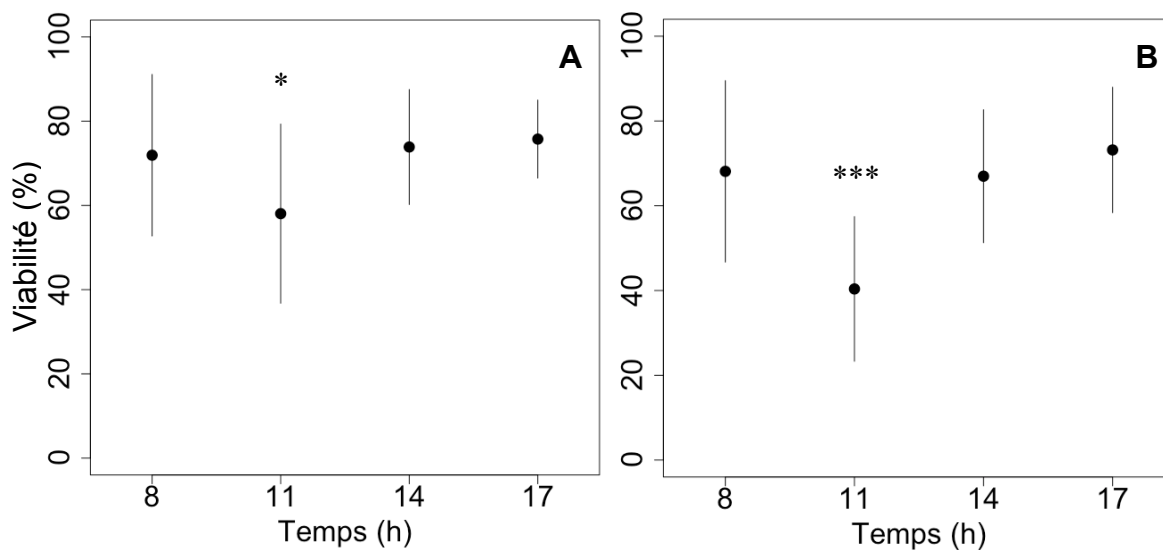


conditions de normalité ne soient pas respectées (Faraway, 2005). Dans ce GLM, une distribution des données de type binomiale a été spécifiée (par exemple, pollen viable vs pollen non viable). Les données présentaient une tendance à la surdispersion. De ce fait, la famille « quasi-binomiale » a été privilégiée afin de pouvoir réaliser des comparaisons de modèles par un test de déletion (likelihood-ratio test) avec la fonction ANOVA (Library stats, R Core Team). En outre, la contribution respective des variables introduites dans un modèle a été estimée par le test de Wald. Ce dernier utilise la valeur t de Student pour évaluer si les coefficients associés aux variables sont significativement différents de 0. Un seuil de signification  $\alpha=0,05$  a été utilisé et ces tests ont été réalisés avec le logiciel R.

### **3.Résultats**

Durant les trois années d'expérimentations, certains paramètres expérimentaux ont été changés, notamment la méthode d'estimation de la viabilité. Nous avons comparé les valeurs de viabilité à 5h (3 heures avant anthèse) obtenues en 2008 (92,9% ; méthode normale) et en 2009 (92,4% ; ajout d'acide borique). Ce temps a été choisi pour s'affranchir de l'effet de l'environnement sur la viabilité du pollen car la déhiscence n'a pas encore eu lieu. Ainsi cette comparaison nous a permis de vérifier que ce changement de méthode n'avait pas d'effet sur l'estimation de la viabilité (ANOVA,  $F_{1,63}=0,25$ ,  $p=0,62$ ).

Le suivi de la viabilité du pollen de *C. melo* durant la journée d'anthèse en 2007 a montré qu'à l'anthèse, environ 72% des grains de pollen étaient viables (Figure 40A).

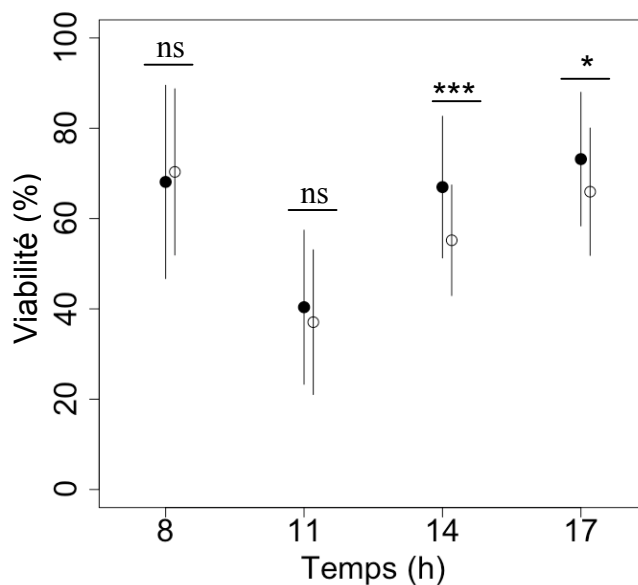


**Figure 40 : Viabilité du pollen de *C. melo* durant la journée d'anthèse.** Suivis réalisés en 2007 (A) et en 2008 (B). Les barres représentent l'écart-type, n=36, \* = différence significative à  $p < 0,05$ , \*\*\* = différence significative à  $p < 0,001$ .

La viabilité a ensuite diminué de plus de 13% à 11h (soit 3 heures après l'anthèse) avant d'augmenter, d'une manière inattendue, jusqu'à 75,7% à 17h. La même tendance a été observée en 2008, bien que la chute de viabilité à 11h soit encore plus importante (près de 28% ; Figure 40B). L'analyse de variance a montré qu'il n'y avait pas d'interaction significative entre le temps et l'année, c'est-à-dire, que le pattern temporel reste inchangé durant ces deux années (ANOVA,  $F_{1, 276}=0,15$ ,  $p=0,70$ ), bien que le temps et l'année aient des effets significatifs ( $F_{1, 277}=12,53$ ,  $p=4,7 \cdot 10^{-3}$  ;  $F_{1, 277}=15,20$ ,  $p=1,2 \cdot 10^{-3}$  respectivement). L'effet année ne peut pas s'expliquer par des changements climatiques car la température (test de Wald,  $t=1,48$ ,  $p=0,15$ ) et l'humidité relative (test de Wald,  $t=-0,31$ ,  $p=0,75$ ) ne diffèrent pas significativement.

A cause des variations « réversibles » de la viabilité au cours du temps, ce facteur ne peut pas être considéré en tant que variable continue, mais en tant que catégorie. L'effet année étant fort, chaque année a été analysée séparément. Il en ressort que pour les deux années, la viabilité du pollen enregistrée à 11h est significativement plus faible qu'aux autres temps (test de Wald, pour 2007 :  $t=-2,60$ ,  $p=0,01$  ; pour 2008 :  $t=-6,21$ ,  $p=5,85 \cdot 10^{-9}$ ).

La viabilité n'étant pas, normalement, une propriété réversible, nous avons émis l'hypothèse que le pollen non viable se déshydratât et perdait son adhérence. De ce fait, il ne resterait pas aggloméré dans l'anthère, mais se retrouverait piégé par les trichomes des pétales et ne serait donc plus enregistré comme non viable à 14h. Pour tester cette hypothèse, les estimations de viabilité ont été réalisées en prélevant les anthères et la portion de pièces florales les entourant (Figure 41).



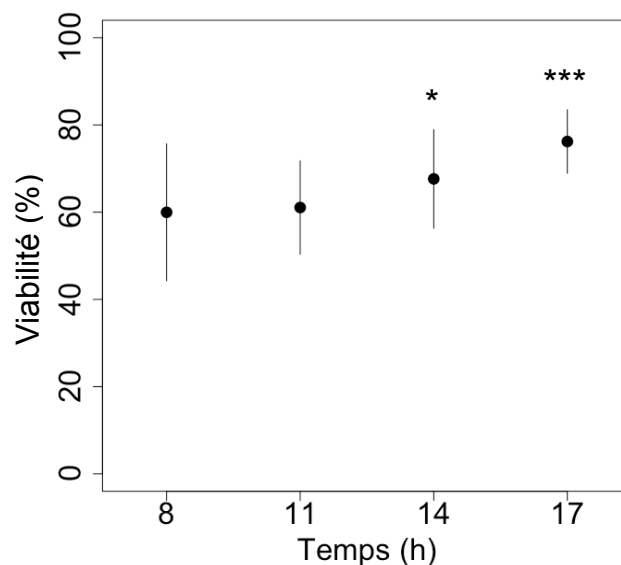
**Figure 41 : Effet de la localisation du pollen sur sa viabilité au cours de l'anthèse.** Viabilité moyenne du pollen présent dans les anthères (●) et dans les anthères et les pièces florales (○), n=36. Les barres représentent l'écart-type, ns = différence non significative, \* = différence significative à  $p < 0,05$ , \*\*\* = différence significative à  $p < 0,001$ .

La viabilité du pollen est significativement plus faible à 14h et à 17h lorsque le pollen provient des anthères et des pièces florales que lorsqu'il provient uniquement des anthères (ANOVA,  $F_{1, 70} = 12,24$ ,  $p = 0,0008$  pour 14h ;  $F_{1, 70} = 4,43$ ,  $p = 0,038$  pour 17h). Cependant, même dans ce cas, la viabilité du pollen redevient plus élevée après 11h. Cette hypothèse ne permet donc pas d'expliquer la chute de viabilité à 11h.

La FCR est une méthode connue pour être sensible au niveau d'hydratation du pollen. Il se pourrait alors que les variations quotidiennes d'humidité relative affectent la viabilité du pollen. Pour vérifier cette hypothèse deux analyses ont été envisagées : (i) analyse statistique en incluant l'humidité relative dans le modèle linéaire généralisé et en vérifiant si elle augmente la proportion de déviance expliquée et (ii) analyse expérimentale en testant l'effet d'une augmentation de la fréquence d'irrigation sur la viabilité.

Pour l'analyse statistique, il a fallu dans un premier temps calculer les résidus de la relation humidité relative/temps pour fixer la corrélation entre ces deux facteurs car l'humidité relative est dépendante du temps. Nos résultats montrent que celle-ci a un effet positif sur la viabilité du pollen (ANOVA,  $F_{1,275}=4,37$ ,  $p=0,037$ ).

Après avoir vérifié statistiquement que l'humidité relative influençait la viabilité du pollen, nous avons testé expérimentalement l'effet d'un changement de conduite d'irrigation. La parcelle, irriguée précédemment 1 heure 3 fois par semaine, a été irriguée 7 minutes 3 fois par jour. Ce changement de conduite a entraîné une variation de la viabilité du pollen (Figure 42).

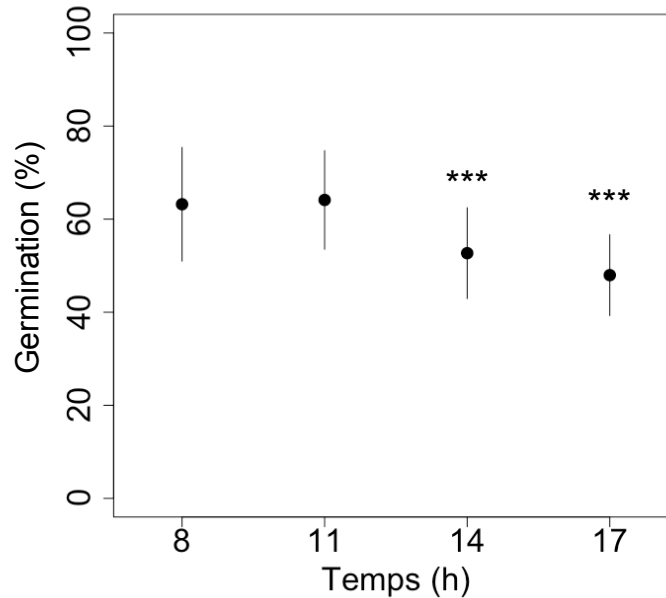


**Figure 42 : Suivi de la viabilité du pollen de *C. melo* durant la journée d'anthèse effectué en 2009.** Chaque point représente la viabilité moyenne du pollen mesurée sur 30 fleurs. Les barres représentent l'écart-type, \* = différence significative à  $p<0,05$ , \*\*\* = différence significative à  $p<0,001$ .

La viabilité enregistrée à l'anthèse est plus faible que les années précédentes (60% en 2009 contre 70% en 2008). Cependant, le changement d'irrigation a permis d'obtenir une viabilité du pollen qui ne diminuait pas à 11h (test de Wald,  $t=0,36$ ,  $p=0,72$ ). En revanche, la viabilité à 14h et à 17h est significativement plus élevée qu'à 8h et 11h ( $t=2,52$ ,  $p=0,01$  et  $t=5,46$ ,  $p=2,69.10^{-7}$  respectivement), jusqu'à atteindre 76% à 17h.

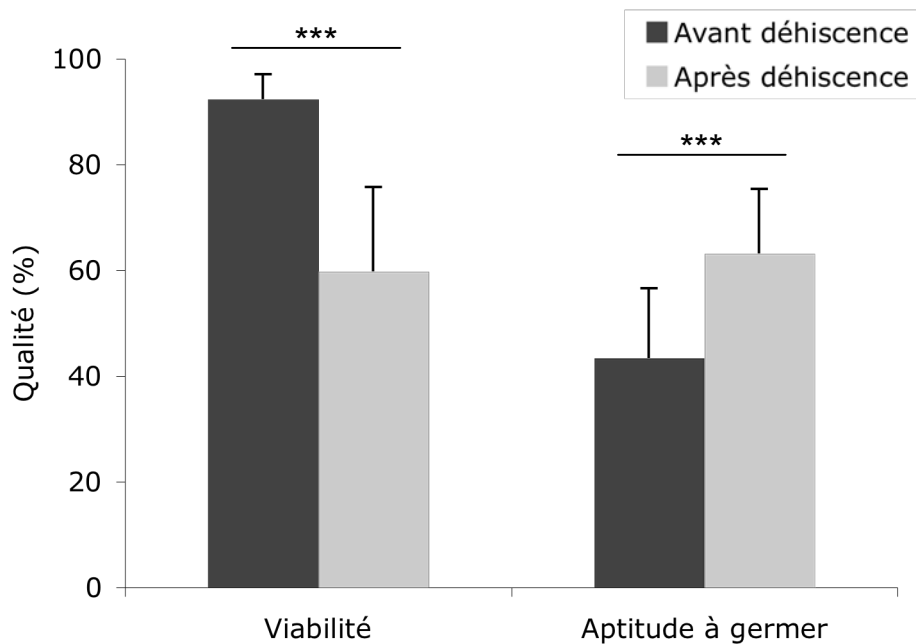
En comparant les valeurs de viabilité enregistrées avec deux fréquences d'irrigation différentes (trihebdomadaire en 2008 et quotidienne en 2009), il ressort que la fréquence d'irrigation influence significativement la variation de viabilité au cours de la journée d'anthèse (interaction temps/conduite, ANOVA,  $F_{3,255}=9,29$ ,  $p=7,47.10^{-6}$ ). En considérant les variations de viabilité heure par heure, on s'aperçoit que l'effet du mode d'irrigation est significatif uniquement à 11h.

L'aptitude à germer *in vitro* a été estimée en 2009 (Figure 43). Celle-ci est en moyenne de 63% à l'anthèse. Elle est stable pendant les trois premières heures (test de Wald,  $t=0,35$ ,  $p=0,73$ ) puis diminue pour atteindre 48% en fin de journée ( $t=-5,55$ ,  $p=1,86.10^{-7}$ ).



**Figure 43 : Aptitude à germer du pollen de *C. melo* au cours de la journée d'anthèse.** Chaque point représente l'aptitude à germer moyenne du pollen mesurée sur 30 fleurs. Les barres représentent l'écart-type, \*\*\* = différence significative à  $p < 0,001$ .

La qualité reproductrice du pollen de *C. melo* n'a pas été uniquement suivie au cours de la journée d'anthèse. Nous nous sommes également intéressés à sa variation due à l'exposition au milieu environnant. Autrement dit, la qualité du pollen a été évaluée avant et après ouverture des anthères (Figure 44). Nos résultats ont montré qu'avant anthèse (à 5h), le pollen possède une viabilité moyenne de plus de 92% alors que celle-ci n'est plus que d'environ 60% à l'anthèse. L'exposition aux conditions environnementales a donc entraîné une diminution de plus de 30% de la viabilité (test de Wald,  $t=-10,12$  ;  $p=2,47.10^{-14}$ ). Quant à l'aptitude à germer, elle est d'environ 44% avant anthèse alors qu'elle est d'environ 63% à l'anthèse. Il y a donc une augmentation de l'aptitude à germer de 20% juste avant anthèse ( $t=-5,76$ ,  $p=3,38.10^{-7}$ ).



**Figure 44 : Variation de la qualité reproductrice du pollen de *C. melo* lors de son exposition au milieu environnant.** Chaque histogramme représente la qualité moyenne du pollen mesurée sur 30 fleurs. Les barres représentent l'écart-type, \*\*\* = différence significative à  $p < 0,001$ .

#### **4. Discussion**

Avant anthèse, 92% des grains de pollen sont viables. La proportion de grains non viables enregistrée peut correspondre à la production de grains vides comme cela a été montré dans le chapitre précédent. Bien que la proportion de grains vides évaluée était plus faible, il est à noter qu'elle avait été mesurée chez des boutons floraux plus jeunes que les fleurs analysées ici. Il est donc possible que des dégénérescences cellulaires supplémentaires aient eu lieu entre le dernier stade que nous avons étudié et 3 heures avant anthèse. La déhiscence, c'est-à-dire la mise en contact avec le milieu environnant, induit une perte de près de 25% de la viabilité. Il est en effet connu que les stress environnementaux affectent la viabilité du pollen (Dafni and Firmage, 2000). Nos résultats ont montré que la viabilité du pollen de *C. melo* était de 70% à l'anthèse comme chez *Leymus chinensis* (Huang *et al.*, 2004) alors qu'elle est de 92% chez *Cucurbita pepo* (Nepi and Pacini, 1993). La viabilité du pollen de *C. melo* ne décroît pas au cours des heures qui suivent l'anthèse. Ainsi, 6 heures et 9 heures après anthèse, la proportion de grains de pollen viables était similaire que celle enregistrée à l'anthèse. Ce résultat est inattendu car le pollen de *C. melo* est du type partiellement hydraté

(Franchi *et al.*, 2002). Il devrait supposément avoir une longévité réduite (Nepi *et al.*, 2001 ; Franchi *et al.*, 2002), comme le pollen de *Cucurbita pepo*, dont la viabilité diminue de 15% 6 heures après anthèse et n'est plus que de 20% 11 heures après l'anthèse (Nepi and Pacini, 1993). Cependant, dans nos conditions d'expérimentation, la dernière mesure de viabilité n'est pas faite à la fin de l'anthèse. En effet, les fleurs prélevées à 17h et servant à l'analyse n'étaient pas fanées. Il serait intéressant de connaître la viabilité du pollen à la fin de la journée d'anthèse en faisant une mesure supplémentaire à 20h. Néanmoins, nous avons choisi de réaliser un suivi de la qualité du pollen jusqu'à 17h car ce travail est focalisé sur l'interaction pollen-abeille or l'activité de butinage est très faible en fin d'après-midi.

Bien que la viabilité du pollen soit globalement constante durant la journée d'anthèse, une diminution de la viabilité a été enregistrée à 11h. Nos résultats ont montré que cette baisse momentanée de la viabilité n'était pas imputable à la fraction de grains non viables ne se trouvant plus dans les anthères. Cette diminution pourrait alors être le résultat d'une déshydratation réversible du pollen. Pour vérifier si le pollen a subi des variations de son niveau d'hydratation au cours de la journée, un suivi de la perte en eau aurait pu être mené. Néanmoins, pour s'assurer que la déshydratation était réversible, il aurait fallu comparer la viabilité du pollen avec et sans réhydratation, or nous n'avons pas réussi à développer une méthode satisfaisante. En revanche, nous avons montré statistiquement que l'humidité relative influençait positivement la viabilité du pollen. Et en augmentant la fréquence d'irrigation, nous avons réussi à éviter cette diminution momentanée de la viabilité.

Il est à noter que lors de cette dernière expérimentation, la viabilité du pollen était plus faible à l'anthèse que les années précédentes. Des températures plus élevées ont été enregistrées cette année-là. Or, plus la température est élevée, plus l'anthèse est précoce (Rosa, 1924). Il est donc possible qu'en 2009, l'anthèse ait eu lieu plus tôt que les années précédentes et que le pollen étant en contact avec le milieu extérieur depuis plus longtemps soit légèrement déshydraté et apparaisse moins viable. Par contre, la viabilité du pollen était plus élevée à partir de 14h. Cette augmentation peut s'expliquer par le fait qu'une irrigation avait lieu à 12h, permettant au pollen de se réhydrater.

Comme le montrent nos résultats, l'aptitude à germer du pollen de *C. melo* n'est pas totalement acquise avant l'anthèse. En effet, seulement 43% des grains sont capables de germer à cet instant. Avant sa présentation, le pollen subit différentes étapes de maturation dont une importante déshydratation (Bedinger, 1992). Il se pourrait que 3 heures avant anthèse, le pollen n'ait pas fini sa déshydratation. Dans ce cas, des problèmes d'osmolarité

entre le pollen à fort contenu en eau et la solution germinative trop concentrée induiraient l'éclatement des grains de pollen, ce qui justifierait la faible aptitude à germer enregistrée. Cependant, les mêmes problèmes d'osmolarité devraient être rencontrés avec la solution de FCR. Or, avant anthèse, le pollen possède une viabilité de plus de 90%. L'étape de déshydratation n'est donc pas la cause de cette faible aptitude à germer. D'autres mécanismes de maturation doivent avoir lieu durant les dernières heures avant anthèse et conférer au pollen la capacité à germer.

L'aptitude à germer du pollen de *C. melo* est d'environ 60% à l'anthèse. Chez des espèces du genre *Philodendron*, elle varie entre 40 et 85% (Barabé *et al.*, 2008). À partir de 14h, soit 6 heures après anthèse, l'aptitude à germer diminue, jusqu'à atteindre une baisse de 15% en fin de journée.

Bien que la viabilité du pollen de *C. melo* reste constante durant la période d'anthèse, excepté lorsque le pollen subit une déshydratation réversible, son aptitude à germer diminue en fin de journée. Donc les abeilles qui butinent en fin de journée transportent du pollen moins apte à réaliser la reproduction.



### III. Qualité reproductrice du pollen en contact avec l'abeille

#### 1. Introduction

Comme cela a été présenté précédemment, *C. melo* est une plante chez laquelle la pollinisation croisée est nécessaire pour assurer la production de graines (Free, 1993). Chez cette espèce, la pollinisation est de type entomophile (Free, 1993), et le principal pollinisateur est l'abeille domestique (Rosa, 1924 ; McGregor and Todd, 1953). Au cours de ce chapitre, il a été montré que le pollen devait posséder une bonne qualité reproductrice pour assurer sa fonction de reproducteur mâle. Après avoir évalué la qualité reproductrice du pollen présenté sur la plante, nous nous sommes intéressés ici à évaluer la qualité reproductrice du pollen lors de son transport sur le corps de l'abeille. En effet, il est nécessaire que le pollen possède toute sa qualité, c'est-à-dire qu'il soit viable et apte à germer et à féconder lorsqu'il est déposé sur le stigmate.

Différentes études ont montré, qu'en fonction des espèces, la qualité reproductrice du pollen transporté sur le corps de l'abeille pouvait être modifiée. Alors que Kendall (1973) a montré que le pollen de pommier transporté sur le corps d'abeille avait la même viabilité que le pollen sur fleur à la déhiscence, Mesquida et Renard (1989) ont montré que le pollen de colza porté sur le corps de l'abeille pouvait perdre jusqu'à 45% de son aptitude à germer immédiatement après butinage, et jusqu'à 85% après deux heures de contact.

La viabilité du pollen de *C. melo* transporté par les abeilles a été étudiée par Vaissière *et al.* (1996), qui ont montré que celle-ci était plus faible lorsque le pollen était transporté par les abeilles que lorsqu'il était dans la fleur. Dans cette étude, les abeilles ont été capturées en train de butiner, sur une période de 3 heures. De ce fait, le temps de contact entre le pollen et le corps de l'abeille pouvait varier d'une abeille à l'autre. De plus, les fleurs servant de témoin ont été récoltées après la capture des abeilles. Le pollen prélevé comme témoin n'était donc pas collecté en même temps que le pollen prélevé par les abeilles.

Dans notre étude, la qualité reproductrice du pollen sur le corps de l'abeille a été étudiée en contrôlant les durées de contact. Pour cela, il a été nécessaire de travailler en conditions artificielles en réalisant manuellement un contact entre le pollen et le corps des abeilles, afin que les conditions expérimentales soient identiques d'un individu à l'autre. L'effet de ce contact a été étudié sur deux composantes de la qualité reproductrice du pollen de *C. melo*, la viabilité et l'aptitude à germer.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Matériel végétal**

Cette étude a été menée sur les cultures expérimentales réalisées en 2008 et 2009 et présentée précédemment.

### **2.2. Cohorte d'abeilles naissantes**

Afin d'homogénéiser au maximum le matériel animal (âge et conduite de cultures évitant toute contamination par des produits phytosanitaires) et d'éviter des contaminations de nos essais par du pollen étranger, une cohorte d'abeilles naissantes a été utilisée, dans laquelle une reine en ponte a été introduite. Pour obtenir des abeilles naissantes, des cadres de couvain operculé ont été placés à l'étuve (36°C, 80% d'humidité relative) durant une nuit. Les abeilles naissantes ont ensuite été placées dans une ruche trois cadres avec la reine pondreuse (Figure 45). Un cadre de couvain était placé entre deux cadres bâtis sans couvain contenant des réserves de miel et de pollen.



**Figure 45 : Ruchette d'abeilles naissantes.**

La cohorte d'abeilles a été placée dans la partie nord du tunnel de culture du melon, dans une chambre séparée de la culture par une cloison en filet. Cette chambre a été régulièrement désherbée manuellement afin qu'il n'y ait pas de contamination par une source étrangère de pollen. Une réserve d'eau était à disposition des abeilles dans cette chambre. Les prélèvements de butineuses n'ont été effectués qu'à partir de 16 jours après la mise en place de la cohorte afin de laisser le temps aux abeilles émergentes de se développer en butineuses. Bien que le temps nécessaire à une abeille pour devenir butineuse soit normalement de 20

jours (Winston, 1991), dans des conditions perturbées comme ici, ce délai est réduit à 5 jours (Robinson, 1992).

Afin de s'assurer que les abeilles ne soient pas en contact avec du pollen avant les expérimentations, le cadre contenant du pollen a été retiré 10 jours avant le début des expérimentations.

### **2.3. Stock de pollen**

Pour constituer le stock de pollen, 320 (2008) et 640 (2009) fleurs mâles ont été récoltées sur l'ensemble de la culture avant chaque expérimentation. Les anthères ont été excisées, puis placées dans deux boules à thé. Le pollen de ces anthères a ensuite été extrait soit mécaniquement, soit chimiquement, comme décrit précédemment.

### **2.4. Collecte d'abeilles butineuses**

Vingt minutes avant le début des expérimentations, un abreuvoir contenant une solution de saccharose à 60% (p/v) et des billes en verre permettant aux abeilles de butiner sans s'engluer dans le sirop a été placé à deux mètres de la ruchette (Figure 46). Après quelques minutes de butinage, une vingtaine d'abeilles « butineuses » ont été prélevées en plaçant un sac en plastique perforé sur l'abreuvoir. Les abeilles ont ensuite été anesthésiées par le froid.



**Figure 46 : Abeilles butinant sur l'abreuvoir rempli de sirop.**

## 2.5.Contact pollen-abeille

Des embouts de coton-tige ont été utilisés comme témoins des abeilles car ils présentent une forme et une taille similaires ainsi qu'une surface « pileuse ». Pour chaque répétition, 16 abeilles et 20 embouts de coton-tige ont été placés dans les coupelles contenant le stock de pollen. Le pollen a été déposé uniformément sur les US (abeilles et témoin) par vibration au vortex pendant une minute. Chaque US a ensuite été placé dans un tube dont le couvercle était perforé de cinq trous pour permettre une aération. Les US sont restés dans leur tube durant toute la durée de contact étudiée (Figure 47).



**Figure 47 : Mise en contact du pollen avec des abeilles et les témoins.** Les individus sont placés dans les coupelles contenant le pollen (A) puis l'ensemble est vortex (B) pour permettre la mise en contact entre le pollen et les individus (C). Chaque individu est placé individuellement dans un tube percé (D, E et F).

Deux séries de durées de contact ont été testées: (i) des durées courtes 0h, 0,25h, 0,5h, 0,75h et 1h (en 2008) et (ii) des durées de contact plus longues 0h, 0,5h, 1h, 2h et 4h (en 2009).

En 2008, du fait des durées courtes, seulement quatre abeilles et quatre témoins étaient traités par durée. De ce fait, huit répétitions ont été réalisées. Pour l'évaluation de la viabilité, les plus longues durées de contact étudiées en 2009 ont permis de traiter huit abeilles et huit témoins par durée. Quatre répétitions ont été réalisées avec du pollen extrait chimiquement, alors trois ont été réalisées avec du pollen extrait mécaniquement. En ce qui concerne l'évaluation de l'aptitude à germer, 16 abeilles et 16 témoins ont pu être traités par durée, et deux répétitions ont été réalisées par type de pollen employé.

## **2.6.Évaluation de la qualité reproductrice du pollen**

Après le temps de contact requis, les US ont été placés dans un tube contenant 1ml de solution de saccharose 15% (p/v). Les tubes étaient soniqués afin de mettre en suspension les grains de pollen portés par les individus. Après avoir retiré les US des tubes, ces derniers ont servi soit (i) à la réalisation de la FCR, soit (ii) à l'évaluation de l'aptitude à germer selon les méthodes décrites précédemment. Un total de 100 grains de pollen par lame ont été analysés.

## **2.7.Analyse statistique**

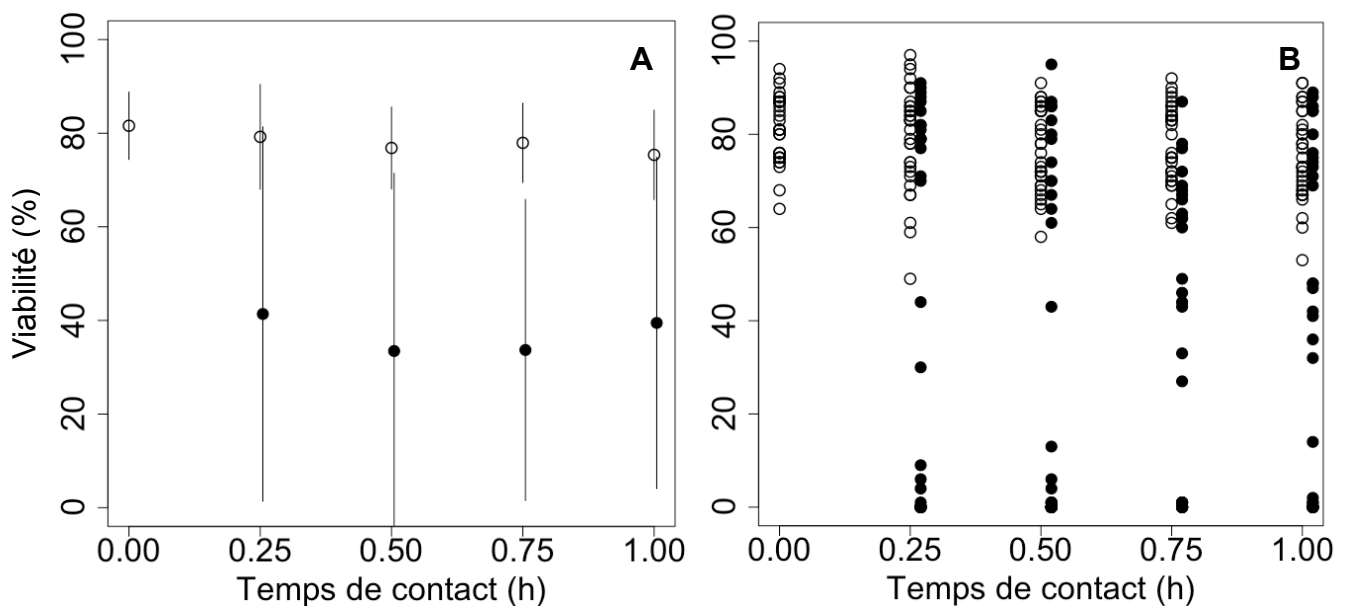
Les données ne respectaient pas la condition d'homoscédasticité (c'est-à-dire de l'uniformité de la variance dans l'ensemble des données) permettant d'utiliser un GLM. Nous avons donc privilégié l'utilisation de tests t de Student pour échantillons appariés (pollen sur témoin vs pollen sur abeille). Ces tests nous ont permis de comparer (i) les moyennes et (ii) l'étendue des valeurs (c'est-à-dire la différence entre la valeur maximale et la valeur minimale) entre les différentes modalités. Un test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour évaluer l'effet du temps sur la viabilité du pollen en 2008. Un seuil de signification de  $\alpha=0,05$  a été choisi et ces tests ont été réalisés avec le logiciel R.

## **3.Résultats**

L'effet du contact sur la qualité reproductrice du pollen a été testé avec différentes modalités. Dans un premier temps, l'expérimentation a été menée avec du pollen extrait chimiquement. Ainsi, en 2008, seule la viabilité a été mesurée, et nous nous sommes intéressés à des durées de contact courtes. Par la suite, nous avons augmenté les durées de contact et l'aptitude à germer

a pu être mesurée. Enfin, ce travail a été mené sur du pollen extrait mécaniquement, dont le sporoderme est intact.

La viabilité du pollen de *C. melo* en contact avec des corps d'abeille est deux fois plus faible que celle du pollen témoin en contact avec des embouts de coton-tige (test t,  $t=10,72$ ,  $p=5,60.10^{-12}$  ; Figure 48A). Nos résultats montrent que le contact avec le corps d'abeille induit un effet rapide, puisqu'il est mesuré dès le premier quart d'heure de contact. En revanche, durant la première heure de contact, il n'évolue pas avec la durée (KW,  $H=1,705$ ,  $df=3$ ,  $p=0,636$ ).



**Figure 48 : Viabilité du pollen de *C. melo* après de courtes durées de contact sur le corps d'abeille.** Viabilité du pollen en contact avec les témoins (●) et avec le corps d'abeille (○). **A** Viabilité moyenne du pollen mesurée sur 32 individus. Les barres représentent l'écart-type. **B** Viabilité du pollen mesurée pour chaque individu.

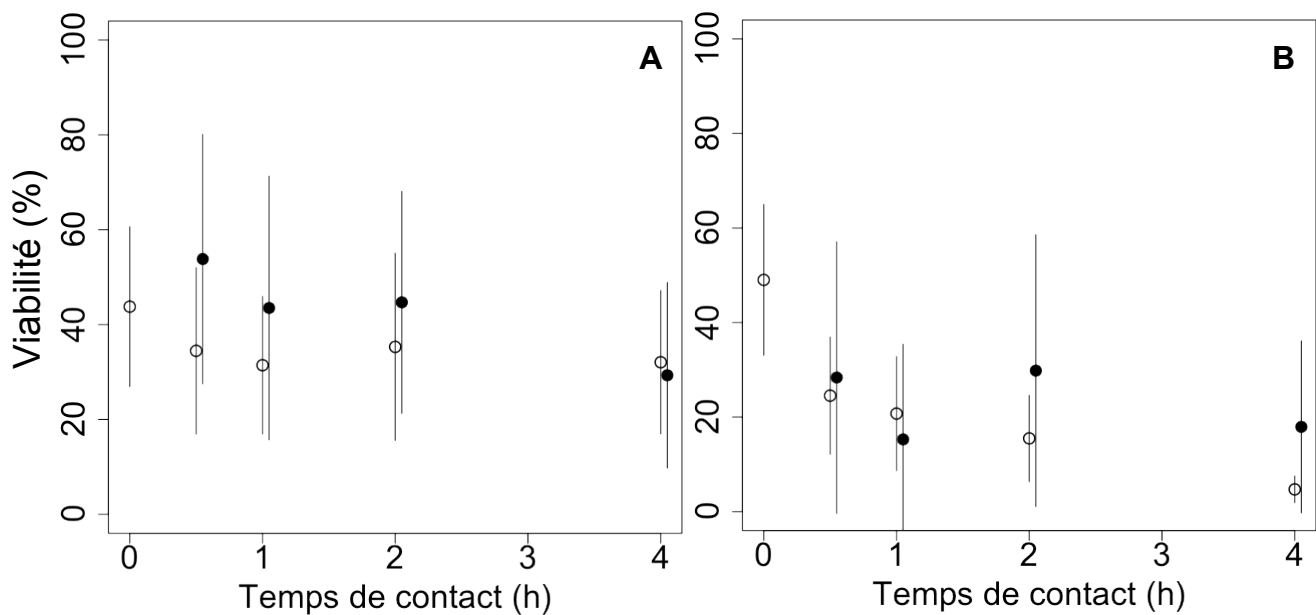
Les viabilités mesurées s'accompagnent de très fortes variabilités différentes de celles du témoin (test t,  $t=-11,08$ ,  $p=2,60.10^{-12}$ ), ce qui signifie que l'effet induit par le contact varie en fonction des abeilles. En effet, en observant la viabilité du pollen mesurée pour chaque individu (Figure 48B), nous pouvons nous apercevoir que certaines abeilles induisent des viabilités similaires aux témoins alors que d'autres induisent des viabilités quasiment nulles, et quelques-unes induisent des viabilités intermédiaires. Le tableau 5 montre qu'il y a à peu près autant d'abeilles qui diminuent fortement la viabilité du pollen que d'abeilles qui ne la modifient pas.

Viabilité du pollen	Durée du contact (h)			
	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>0,75</b>	<b>1</b>
≤ 20%	15	18	14	13
20% - 60%	2	1	6	7
≥ 60%	15	13	12	12

**Tableau 5 : Nombre d'abeilles induisant des viabilités très faibles, intermédiaires ou élevées en fonction de la durée du contact.**

L'effet du corps d'abeille sur la viabilité du pollen ne variant pas en fonction de la durée quand celles-ci sont courtes, elles ont été prolongées jusqu'à 4 heures pour voir si l'effet s'intensifiait au-delà d'une heure de contact (Figure 49A). De courtes durées de contact ont été également testées pour pouvoir comparer les résultats entre les deux années d'expérimentation. Les résultats obtenus ont révélés, d'une part, que la viabilité du pollen témoin était beaucoup plus faible et variable que l'année précédente. D'autre part, le corps de l'abeille a induit une modification significative de la viabilité du pollen mise en évidence par des moyennes et des étendues significativement différentes (test t,  $t=-3,10$ ,  $p=0,007$  ;  $t=-7,43$ ,  $p=2,1.10^{-6}$  respectivement). La modification enregistrée n'était pas une diminution comme c'était le cas précédemment, mais une augmentation de la viabilité du pollen. En effet, nos résultats ont montré qu'un grand nombre d'abeilles augmentaient la viabilité. Cependant, la forte variabilité de ces résultats révèle que, comme précédemment, certaines abeilles induisaient des viabilités quasiment nulles, alors que d'autres ne la modifiaient pas.

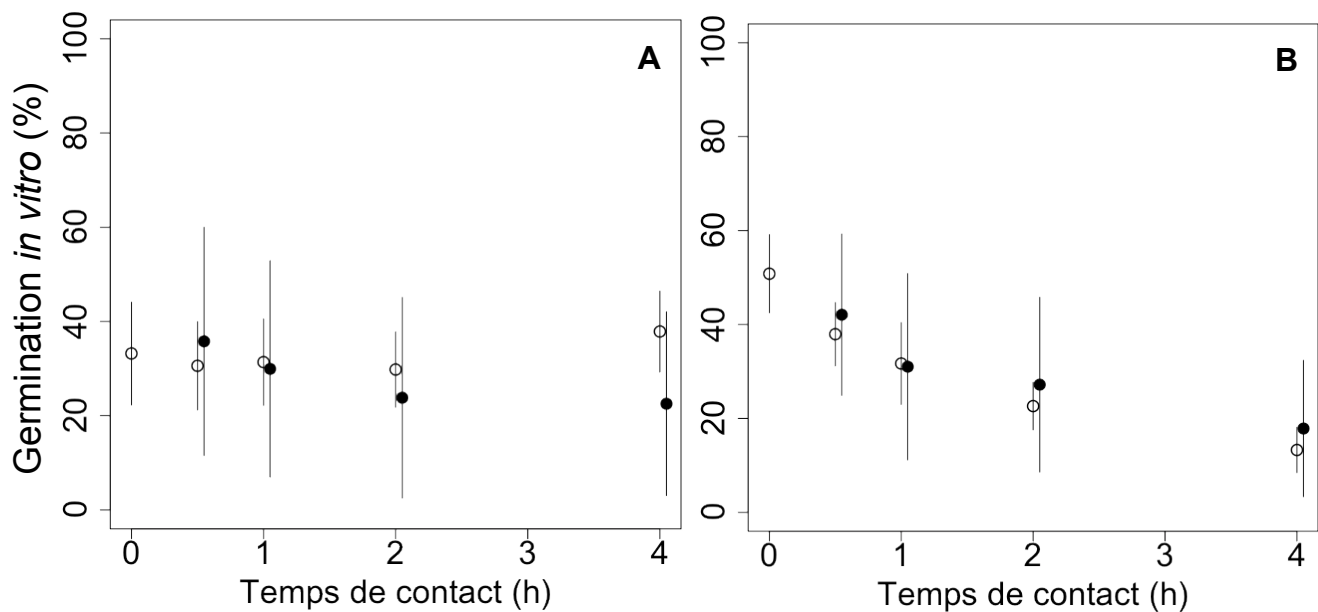
La même expérimentation menée avec du pollen extrait mécaniquement a montré des résultats plus contrastés (Figure 49B) avec des viabilités moyennes pouvant être similaires à celles du témoin ou plus élevées. L'importante variabilité des viabilités enregistrées a montré à nouveau que l'effet induit par le corps de l'abeille variait d'un individu à l'autre.



**Figure 49 : Viabilité du pollen de *C. melo* après différentes durées de contact sur le corps d'abeilles.** La viabilité a été mesurée sur du pollen extrait chimiquement (A) et mécaniquement (B). Viabilité du pollen en contact avec les témoins (●) et avec le corps d'abeille (○), les barres représentent l'écart-type, n=32.

L'effet du corps de l'abeille sur l'aptitude à germer du pollen a été évalué (Figure 50). Nos résultats ont montré que le corps de l'abeille ne modifiait pas l'aptitude à germer moyenne du pollen, que ce soit sur du pollen extrait chimiquement ( $t=0,90$ ,  $p=0,40$  ; Figure 50A) ou sur du pollen extrait mécaniquement ( $t=-1,07$ ,  $p=0,32$  ; Figure 50B). En revanche, l'étendue des valeurs significativement plus grand dans le cas d'un contact avec le corps d'abeilles a montré que l'aptitude à germer pouvait être modifiée de diverses manières par le corps de l'abeille, soit en augmentant l'aptitude à germer, soit en la diminuant ( $t=-3,72$ ,  $p=0,007$  et  $t=-6,51$ ,  $p=0,0003$  pour le pollen extrait chimiquement et mécaniquement, respectivement).





**Figure 50 : Aptitude à germer du pollen de *C. melo* après différentes durées de contact sur le corps d'abeilles.** L'aptitude à germer a été mesurée sur du pollen extrait chimiquement (A) et mécaniquement (B). Aptitude à germer du pollen en contact avec les témoins (●) et avec le corps d'abeille (○), les barres représentent l'écart-type, n=32.

#### 4. Discussion

Nos résultats ont montré, dans un premier temps, que la viabilité du pollen de *C. melo* porté sur le corps de l'abeille était diminuée de près de moitié. Ces résultats sont concordants avec ceux de Vaissière *et al.* (1996) qui ont enregistré une baisse de 25 à 75% de la viabilité. Néanmoins, contrairement à leur étude, nos résultats présentaient une très forte variabilité qui s'est révélée être une distribution de type « binomiale » de nos résultats. En effet, près de la moitié des abeilles utilisées ont induit une perte quasi-totale de la viabilité du pollen alors que les autres abeilles ne l'ont peu ou pas modifiée. Nos résultats ont donc mis en évidence que le corps de l'abeille n'induisait pas une modification homogène et constante de la viabilité, mais qu'en fonction des individus, des effets très contrastés pouvaient être enregistrés. Vaissière *et al.* (1996) avaient montré qu'en fonction du type de butineuses, les abeilles pouvaient diminuer différemment la viabilité du pollen, les butineuses mixtes induisant une baisse plus importante de la viabilité du pollen que les butineuses strictes de nectar. Dans notre dispositif expérimental, il n'était possible de déterminer le type de butineuses. Cependant, les abeilles ayant été collectées sur un abreuvoir à sirop, elles peuvent être considérées comme des

butineuses de nectar, mais il n'était pas possible de les différencier en butineuses strictes de nectar ou mixtes. Il serait possible que les résultats contrastés que nous avons obtenus soient liés au type de butineuses, c'est-à-dire que la perte quasi-totale de viabilité serait causée par des butineuses mixtes alors que l'absence de modification de la viabilité serait enregistrée sur des butineuses strictes de nectar. Cependant, dans l'étude de Vaissière *et al.* (1996), il a été montré que les butineuses strictes induisaient une perte notable de viabilité, ce qui n'est pas notre cas.

Ces effets ont été mesurés après seulement un quart d'heure de contact et ne se sont pas accentués lorsque la durée de contact a été augmentée jusqu'à une heure. La diminution très importante de la viabilité semblerait donc être induite par le contact direct du corps de l'abeille, ce qui corrobore l'hypothèse de Mesquida et Renard (1989) quant à la présence de substances modificatrices sur le corps de l'abeille plutôt qu'une perte de viabilité due à des causes physiques comme la déshydratation qui, dans ce cas, s'accentuerait avec le temps.

Lorsque la viabilité du pollen témoin était plus faible, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois à notre connaissance, que les abeilles pouvaient également augmenter la viabilité du pollen, alors que d'autres induisaient toujours une perte quasi-totale de celle-ci. Il n'est pas surprenant que la viabilité puisse être augmentée, car il ne s'agit pas d'une mesure du nombre de grains de pollen morts ou vivants mais de l'aptitude à vivre. La faible viabilité du pollen témoin peut donc révéler une déshydratation réversible de ce dernier. L'augmentation de la viabilité causée par les abeilles pourrait être due à des composés qui passeraient du corps de l'insecte au pollen et qui le préserveraient de la déshydratation. En effet, certains lipides présents à la surface de son corps la protègent de la dessiccation (Leonhardt *et al.*, 2009). La grande variabilité de la viabilité du pollen témoin ne permet pas de conclure quant à l'effet de longues durées de contact sur la modification de la viabilité.

Dans cette étude, nous nous sommes également intéressés à l'effet du corps de l'abeille sur l'aptitude à germer du pollen de *C. melo*. Nos résultats ont montré que les abeilles induisaient également les trois réponses observées sur la viabilité. Néanmoins, l'aptitude à germer du pollen porté sur le corps de l'abeille a été globalement plus diminuée que la viabilité. Il semblerait donc que le corps de l'abeille possède des éléments qui altèrent la viabilité du pollen et d'autres qui altèrent spécifiquement l'aptitude à germer.

Nos résultats ont montré des effets beaucoup plus marqués que ceux rapportés par d'autres auteurs (Mesquida et Renard, 1989 ; Vaissière *et al.*, 1996). Cela pourrait être dû au fait que nous avons travaillé avec du pollen extrait chimiquement et mis en contact artificiellement sur

le corps des abeilles. Ce pollen, dont le pollenkitt a été retiré par le solvant d'extraction, a donc un sporoderme moins protecteur qui pourrait laisser passer davantage de substances modificatrices, ce qui expliquerait que nos résultats soient plus marqués. Néanmoins, lorsque du pollen extrait mécaniquement (qui possède un sporoderme intact) a été utilisé, les mêmes réponses ont été enregistrées, c'est-à-dire, (i) des abeilles induisant une perte quasi-totale de la viabilité, (ii) des abeilles ne la modifiant pas et (iii) des abeilles l'augmentant.

En résumé, nos résultats ont confirmé les travaux de Vaissière *et al.* (1996) en montrant par un autre dispositif expérimental que la viabilité du pollen de *C. melo* était modifiée lorsque ce dernier était en contact avec le corps de l'abeille. Par ailleurs, nous avons montré que l'aptitude à germer était également modifiée. La qualité reproductrice du pollen de *C. melo* est donc, comme chez le colza (Mesquida et Renard, 1989) modifiée par le corps de l'abeille.

Le corps de l'abeille affecterait la qualité reproductrice du pollen dès la mise en contact mais sans évolution en fonction de la durée. La modification de la qualité du pollen semblerait être différente en fonction des individus. Ainsi, certaines abeilles pourraient diminuer fortement la qualité du pollen alors que d'autres pourraient l'augmenter, enfin certaines pourraient ne pas la modifier.

## IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré (i) que la réaction fluorochromatique permettait une meilleure estimation de la viabilité du pollen de *C. melo* que la coloration d'Alexander (1969), et qu'elle pouvait être optimisée par l'ajout d'acide borique dans la solution réactionnelle, (ii) que la méthode de germination *in vitro* décrite par Matlob and Kelly (1973) permettait une bonne estimation de l'aptitude à germer du pollen chez notre modèle et (iii) que l'extraction artificielle du pollen, chimique ou mécanique, diminuait la qualité reproductrice du pollen, mais permettait toutefois son utilisation.

De plus, nous avons mis en évidence que la viabilité du pollen de *C. melo* avant anthèse était de 92% et qu'elle diminuait de 25% lors de la déhiscence mais qu'elle se maintenait au cours de la journée d'anthèse. Alors que nous avons montré que l'aptitude à germer n'était pas entièrement acquise avant anthèse, qu'elle était de 62% à la déhiscence et qu'elle diminuait au cours de la journée. Nous pouvons donc en conclure que les pollinisateurs qui butinent à différents moments de la journée transportent du pollen ayant la même viabilité. Cependant, le pollen transporté en fin de journée est moins apte à germer et donc à assurer la reproduction.

Enfin, cette étude a montré que le corps de l'abeille modifiait la qualité reproductrice du pollen de *C. melo*, et ce dès 15 minutes de contact (aucune mesure n'a été faite pour des durées de contact plus courtes) et que différentes modifications étaient engendrées. En effet, le corps de certaines abeilles diminue très fortement la qualité reproductrice du pollen alors que chez d'autres abeilles, il l'augmente. Chez quelques individus, la qualité reproductrice du pollen porté sur le corps n'est pas modifiée. Il se pourrait que des substances présentes sur le corps des abeilles induisent ces réponses contrastées.



**CHAPITRE 4 – 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.

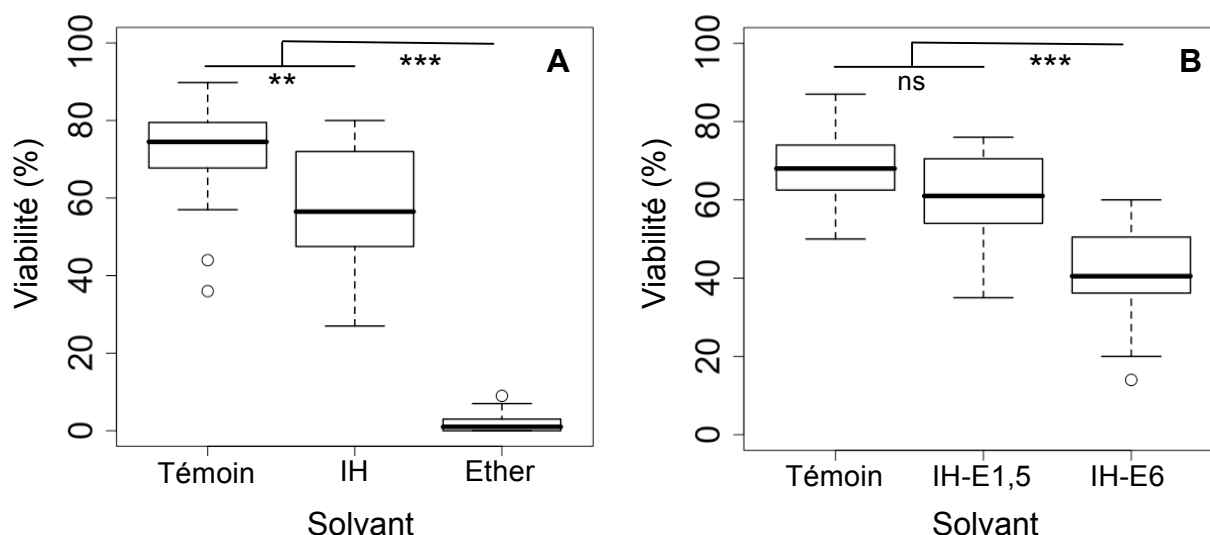
### III. Résultats

#### 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,  $H=1,961$ ,  $df=7$ ,  $p=0,96$ ).

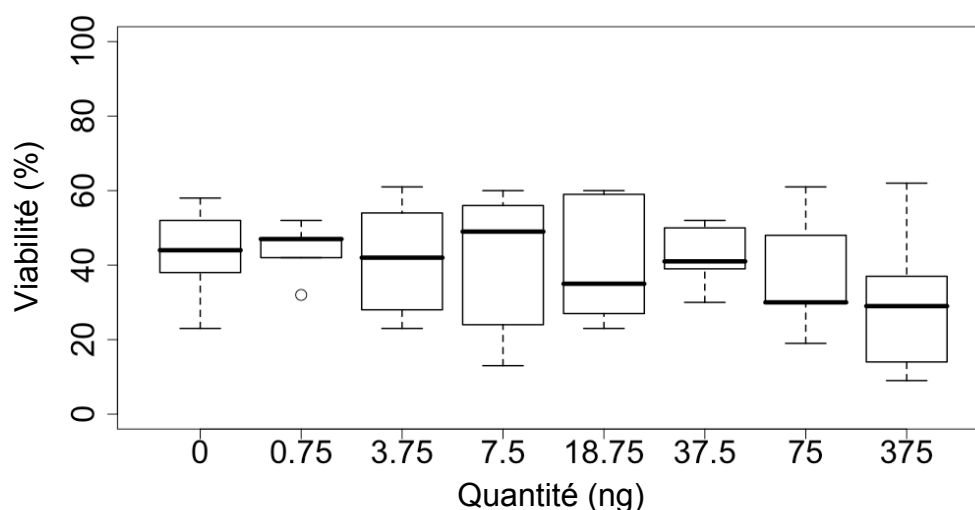


Figure 52 : Effet de l'oléate d'éthyle sur la viabilité du pollen de *C. melo*. Trait = médiane, boîte = 25%-75%, moustaches = 1<sup>er</sup>-9<sup>e</sup> déciles, cercles = valeurs extrêmes, n=5.

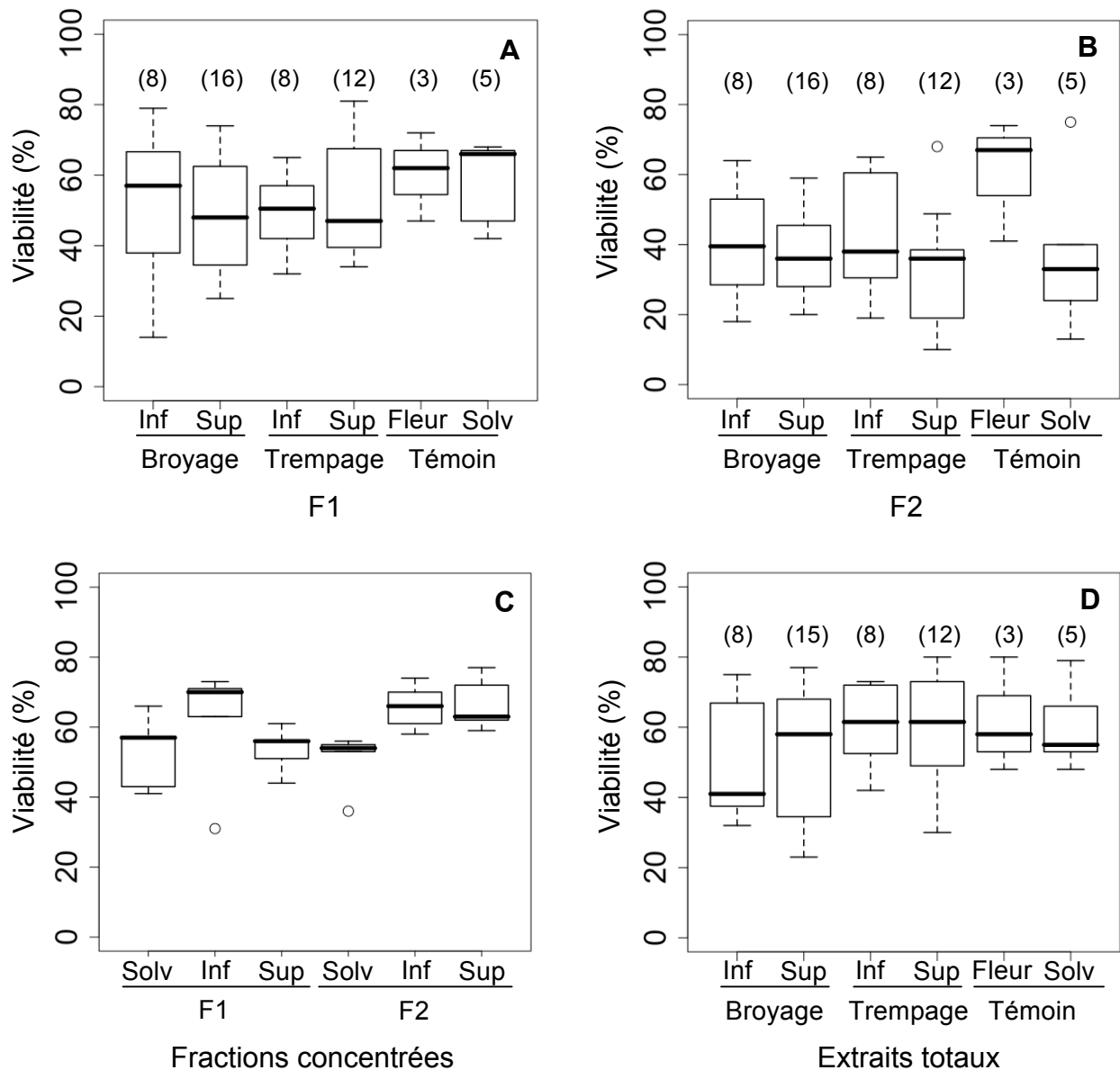
## 3.Effet des extraits d'abeilles sur la viabilité du pollen

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).

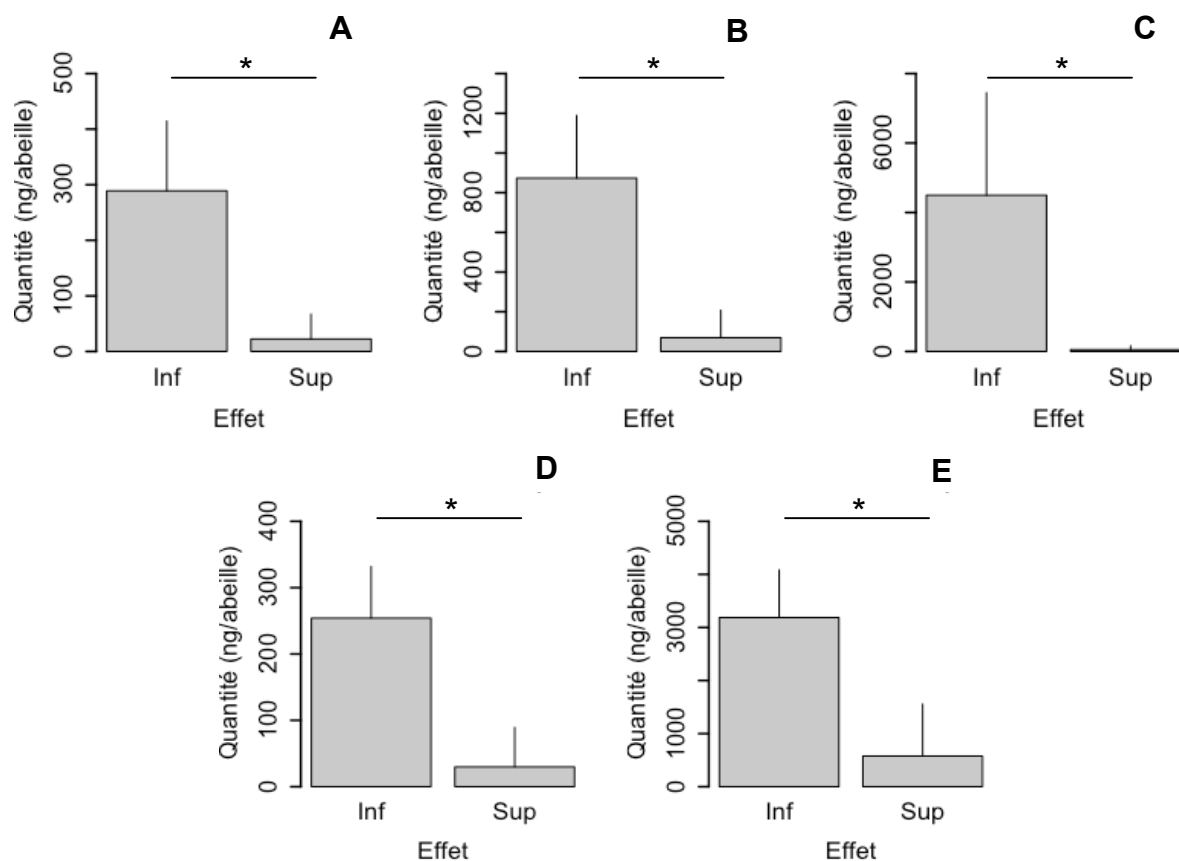
Bien que les résultats de 2008 n'ont montré aucune différence en fonction de l'effet des abeilles sur le pollen, nous avons mener la même expérimentation en 2009 car les abeilles ont montré trois effets différents sur le pollen et pour tester également les abeilles utilisées pour l'évaluation de l'aptitude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

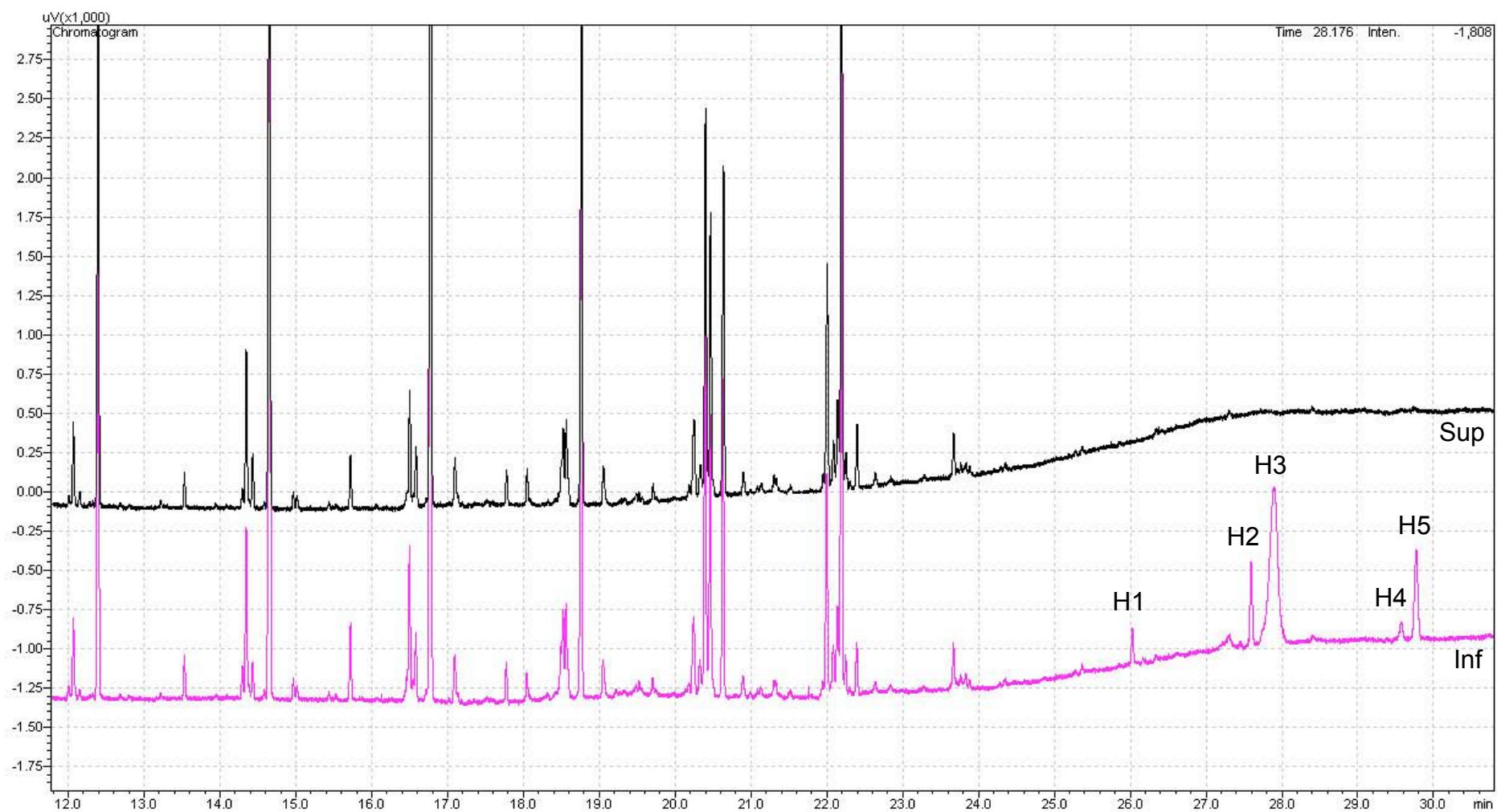
Cinq composés candidats (fraction 1) ont été détectés chez les abeilles qui induisaient une diminution de la qualité du pollen (Figure 55). Ils ont été mis en évidence uniquement dans la fraction d'hydrocarbures totaux. Ils possèdent des temps de rétention longs, ce qui indique un nombre important de 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).





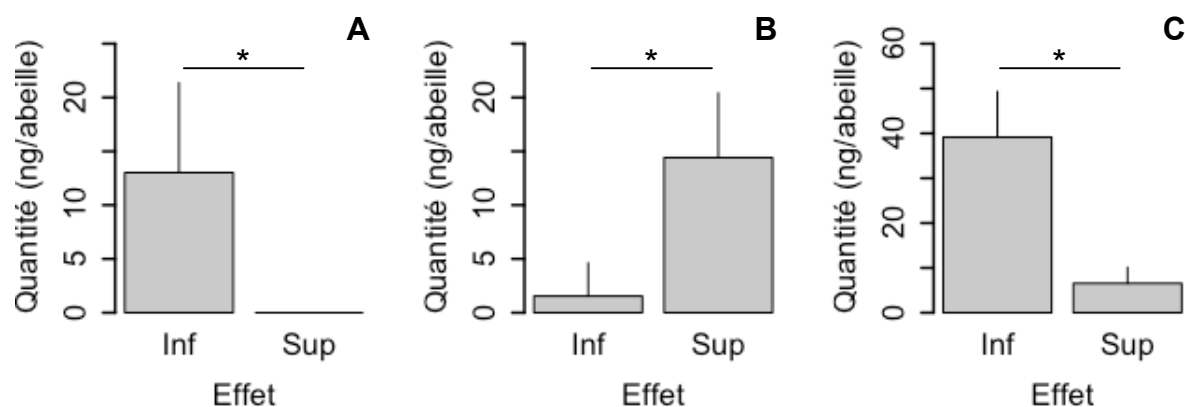
**Figure 54 : Quantité par abeille des différents composés de la fraction 1 détectés sur les abeilles diminuant ou augmentant la qualité reproductrice du pollen. A H1 détecté à 26,047 min. B H2 détecté à 27,581 min. C H3 détecté à 27,875 min. D H4 détecté à 29,564 min. E H5 détecté à 29,776 min. Les 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  $p < 0,05$ .**



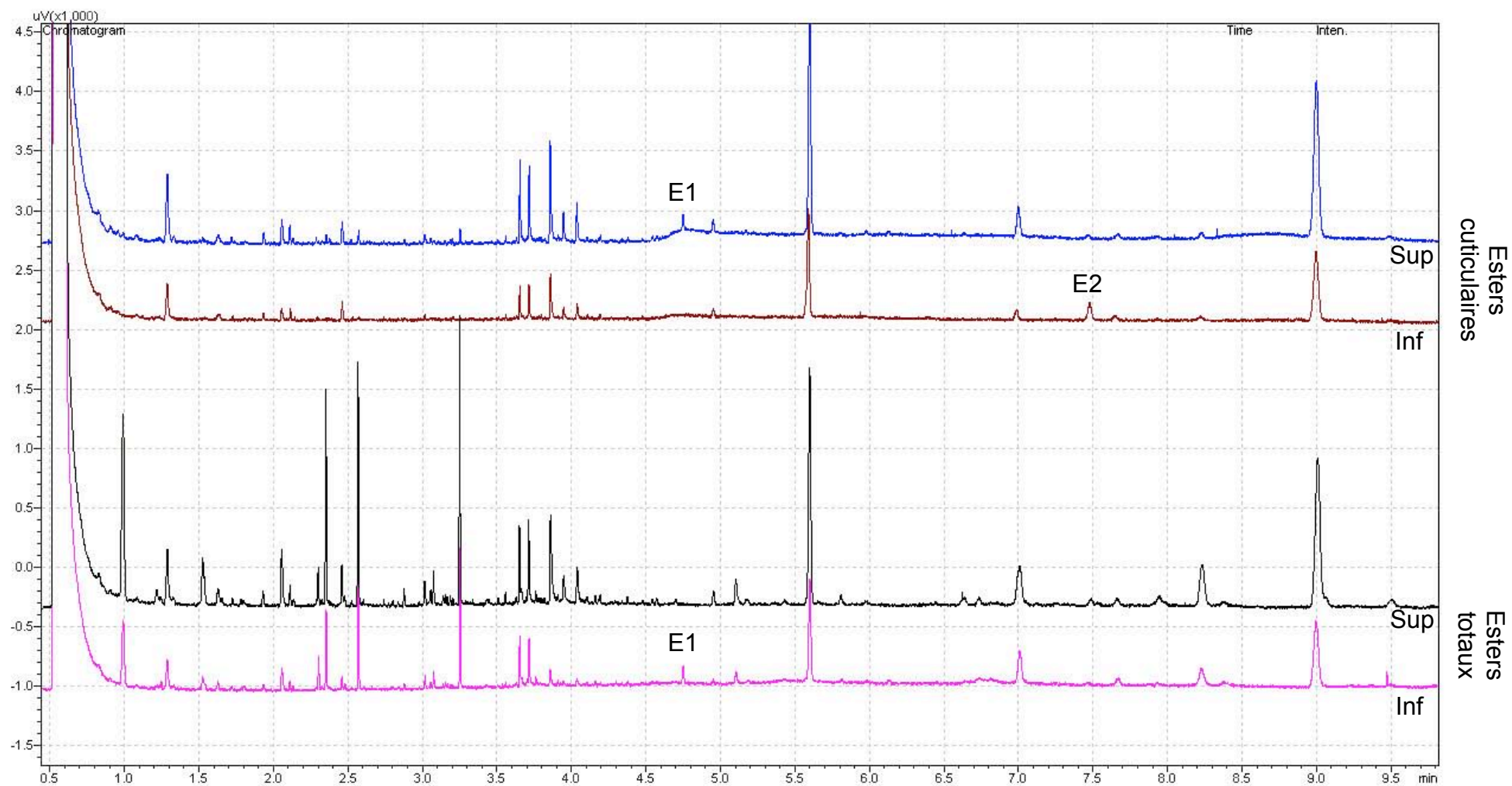
**Figure 55 : Profils de la fraction 1 obtenues par broyage des abeilles diminuant (Inf) ou augmentant (Sup) la qualité du pollen. Cinq composés ont été détectés uniquement chez les abeilles diminuant la qualité du pollen (H1 : 26,047 min ; H2 : 27,581 min ; H3 : 27,875 min ; H4 : 29,564 min ; H5 : 29,776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

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES





Chez les Cucurbitacées, la reproduction sexuée nécessite une allopollinisation. Du fait de la structure du pollen, la pollinisation est de type entomophile et il a été montré que les abeilles sont les principaux pollinisateurs. La reproduction de nos modèles d'étude se fait donc *via* une interaction pollen-abeille qui nécessite que le pollen produit par la plante soit fonctionnel et conforme génétiquement et qu'il soit viable lorsqu'il est présenté par la plante et transporté par les abeilles.

#### *Rappel des principaux résultats*

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés aux phénomènes ayant lieu durant la production du pollen qui pouvaient affecter la reproduction chez nos modèles. Nos travaux ont montré que durant l'ontogenèse du pollen chez les deux modèles étudiés, une importante dégénérescence cellulaire a lieu et qu'elle conduit à la production d'environ 3% de grains vides qui ne participent pas à la reproduction et qui ne sont pas nutritifs pour l'abeille. De plus, nous avons mis en évidence, que chez *E. elaterium*, des erreurs méiotiques se produisent et conduisent à la formation de 5% de produits post-méiotiques anormaux pouvant se développer, s'ils ne sont pas éliminés, en grains de pollen polyploïdes ou aneuploïdes.

Par la suite, nous avons étudié la qualité reproductrice du pollen. Pour cela, nous avons déterminé les méthodes permettant les meilleures estimations de la viabilité et de l'aptitude à germer du pollen de *C. melo*. De plus, une amélioration de la méthode fluorochromatique chez *C. melo* a été mise au point par ajout d'acide borique dans la solution réactionnelle. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à adapter ces méthodes au pollen d'*E. elaterium*. De ce fait, les études portant sur la qualité reproductrice du pollen n'ont été menées que chez *C. melo*.

Dans un premier temps, nous avons étudié la qualité reproductrice du pollen présenté sur la fleur, c'est-à-dire disponible pour les pollinisateurs. Nous avons montré que la viabilité du pollen de *C. melo* est affectée par les conditions environnementales. Ainsi, lors de la déhiscence, une perte entre 25 et 30% de la viabilité a été enregistrée. Nos résultats ont permis de montrer que durant les quelques heures qui précèdent la déhiscence, des processus biologiques conférant la capacité à germer devaient avoir lieu. De plus, il a été mis en évidence, durant ce travail, que contrairement à d'autres Cucurbitacées à pollen partiellement hydraté, la viabilité du pollen de *C. melo* ne diminue pas au cours de l'anthèse. En revanche, son aptitude à germer décroît en fin de journée. Les abeilles butinant à différents moments de

la journée n'ont donc pas la même efficacité pollinisatrice, car celles qui butinant en fin d'après-midi transportent du pollen moins apte à assurer la reproduction.

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet du corps de l'abeille sur la qualité reproductrice du pollen de *C. melo* qu'il transporte. Cette étude a confirmé que le corps de l'abeille pouvait diminuer la viabilité du pollen de *C. melo*. Le même effet a été enregistré sur l'aptitude à germer. Cependant, nos résultats ont montré qu'en fonction des individus, le corps de l'abeille pouvait également augmenter la qualité reproductrice du pollen, ce qui n'avait, à notre connaissance, jamais été montré auparavant.

Enfin, nous avons recherché les causes de la modification de la qualité reproductrice du pollen par le corps de l'abeille parmi les substances présentes à sa surface. Sept composés ont été détectés en grande quantité chez les abeilles induisant une diminution de la qualité du pollen. Il pourrait s'agir de cinq hydrocarbures et de deux esters, dont l'identification reste à préciser par analyse en spectrométrie de masse. De plus, il faudrait isoler chacun de ces composés et les mettre au contact du pollen, puis en mesurer la qualité reproductrice pour certifier qu'ils soient directement liés à la diminution de celle-ci.

Aucune mesure de la qualité du pollen n'a été faite après dépôt sur le stigmate. Il se pourrait qu'il y ait des mécanismes, comme la réhydratation, permettant de rétablir la qualité du pollen et d'augmenter le nombre de grains capables d'assurer la reproduction.

#### *Vers l'évaluation de la qualité reproductrice du pollen d'un autre modèle végétal*

Mener cette étude sur *E. elaterium* permettrait de comparer l'évolution de la qualité reproductrice du pollen au cours de l'anthèse en fonction du niveau d'hydratation du pollen. En effet, le pollen d'*E. elaterium* est de type partiellement déshydraté. Nous pouvons donc supposer que la qualité reproductrice du pollen d'*E. elaterium* n'évolue pas de la même façon. De plus, chez cette espèce, l'abeille domestique n'étant pas le principal pollinisateur, il serait intéressant de rechercher si les autres pollinisateurs, en fonction de leur activité pollinisatrice, transportent du pollen ayant la même aptitude à assurer la reproduction.

#### *Vers la confirmation de l'effet du corps de l'abeille sur la qualité du pollen dans d'autres conditions*

Dans un premier temps, nos résultats mériteraient d'être confirmés en utilisant un dispositif expérimental qui permette d'utiliser du pollen témoin dont la viabilité serait plus faible que

celle du pollen à l'anthèse mais peu variable pour pouvoir observer distinctement les deux réponses induites par les abeilles.

Cette étude constituant une première étape, elle a été réalisée en conditions contrôlées avec du pollen extrait artificiellement que nous avons mis en contact manuellement avec le corps de l'abeille et dont la durée de contact était fixée. Il faudrait donc, dans un deuxième temps, vérifier que ces deux effets causés par le corps de l'abeille aient également lieu avec du pollen naturel, c'est-à-dire non extrait artificiellement, et récolté par les abeilles, afin de prendre en compte l'effet mécanique du butinage. De plus, il serait intéressant de réaliser cette étude sur du pollen d'*E. elaterium* ou d'une autre espèce pour voir si ces deux effets contrastés ont également lieu chez d'autres modèles.

#### *Vers l'élargissement de la recherche de composés de l'abeille modifiant la qualité du pollen*

Nos recherches ont été concentrées sur deux familles de composés. Il serait intéressant, dans un premier temps, de réaliser des extractions avec des solvants de polarité croissante pour augmenter la gamme de familles de substances analysées. Enfin, les recherches pourraient être orientées vers les protéines de surface. Il a été en effet montré que chez certains insectes, ces protéines possédaient une activité antibactérienne (Zupko *et al.*, 1993) susceptibles d'altérer la qualité du pollen. De plus, nous nous sommes limités à rechercher des substances de type cuticulaires. Néanmoins, lorsque l'abeille butine, elle peut régurgiter du nectar qu'elle vient de prélever, il faudrait donc rechercher également des substances modificatrices de la qualité dans le nectar des fleurs et le contenu du jabot des butineuses. En effet, le contenu du jabot peut renfermer des sécrétions des glandes mandibulaires et hypopharyngiennes qui peuvent avoir un effet sur le pollen.

#### *Vers l'étude de la modification de la qualité reproductrice du pollen par d'autres abeilles*

Ce travail a été mené sur l'abeille domestique. Il serait intéressant de tester l'effet d'autres abeilles sur la qualité reproductrice du pollen. En effet, il a été montré que la viabilité du pollen d'oignon récupéré sur abeilles solitaires est plus élevée que celui récupéré sur abeille domestique (Parker and Hatley, 1979). De plus, certaines substances dont l'effet sur la qualité reproductrice du pollen a été démontré, comme le 10-HDA, sont liées à l'eusocialité de l'abeille domestique. Nous pouvons donc nous demander si les pollinisateurs sauvages affectent également la viabilité du pollen de Cucurbitacées.

### *Vers d'autres approches de la problématique*

Ce travail constitue une première étape de la caractérisation du couple pollen de Cucurbitacées/abeille domestique. Nous avons choisi d'utiliser une approche cytohistologique qui nous a permis de quantifier le nombre de grains de pollen participant efficacement à l'interaction pollen/abeille, que ce soit lors de la production, lors de la présentation sur la fleur et lors du transport sur l'abeille. Après ce travail de quantification d'évènements biologiques, d'autres approches sont nécessaires pour les comprendre. Ainsi, nous avons choisi une approche biochimique pour rechercher des composés du corps de l'abeille pouvant modifier la qualité reproductrice du pollen. Une approche génétique et moléculaire permettrait d'identifier les mécanismes mis en jeu lors de la production de grains de pollen anormaux. Une approche physiologique permettrait de comprendre les mécanismes à l'échelle cellulaire lors de la modification de viabilité du pollen au contact des substances cuticulaires. Enfin, une approche d'écologie évolutive permettrait de comprendre pourquoi dans certains cas, l'abeille peut altérer la qualité reproductrice du pollen alors que l'évolution des plantes à fleurs repose sur le choix de ce type de pollinisateurs.

## BIBLIOGRAPHIE



- Adaniya, S. (2001) Optimal pollination environment of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) evaluated by in vitro pollen germination and pollen tube growth in styles. *Scientia Horticulturae*, **90**, 219-26.
- Agreste. (2010a). Infos Rapides - Légumes - Melon. In, p 4. Service de la Statistique et de la Prospective.
- Agreste. (2010b). PACA Etude n°51. In, p 10. Service de la Statistique et de la Prospective.
- Alexander, M.P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology*, **44**(3), 117-22.
- Agarwal, P.K. & Roy, R.P. (1976) Natural polyploids in Cucurbitaceae: 1. Cytogenetical studies in triploid *Momordica dioica* Roxb. *Caryologia*, **29**(1), 7-13.
- Arnold, G. & Delage-Darchen, B. (1978) Nouvelles données sur l'équipement enzymatique des glandes salivaires de l'ouvrière d'*Apis mellifica* (Hyménoptère, Apidé). *Annales des sciences naturelles. Zoologie et biologie animale*, **12**, 401-22.
- Attard, E.G. & Scicluna-Spiteri, A. (2001) *Ecballium elaterium*: an in vitro source of cucurbitacins. *Fitoterapia*, **72**(1), 46-53.
- Bani-Aameur, F., Lauer, F.I. & Veilleux, R.E. (1992) Frequency of 2n pollen in diploid hybrids between *Solanum phureja* Juz. & Buk. and *Solanum chacoense* Bitt. *Potato Research*, **35**, 161-72.
- Bar-Shalom, D. & Mattsson, O. (1977) Mode of hydration, an important factor in the germination of trinucleate pollen grains. *Botanisk Tidsskrift*, **71**, 245-51.
- Barabé, D., Lavallée, K. & Gibernau, M. (2008) Pollen viability and germination in some neotropical aroids. *Botany*, **86**, 98-102.
- Barrow, J.R. (1983) Comparisons among pollen viability measurement methods in cotton. *Crop Science*, **23**, 734-36.
- Beattie, A.J., Turnbull, R.B., Knox, R.B. & Williams, E.G. (1984) Ant inhibition of pollen function: a possible reason why ant pollination is rare. *American Journal Of Botany*, **71**, 421-26.
- Beattie, A.J., Turnbull, R.B., Hough, T., Jobson, S. & Knox, R.B. (1985) The vulnerability of pollen and fungal spores to ant secretions: evidence and some evolutionary implications. *American Journal Of Botany*, **72**, 606-14.



- Beattie, A.J., Turnbull, R.B., Hough, T. & Knox, R.B. (1986) Antibiotic production: a possible function for the metapleural glands of ants. *Annals of Entomologic Society of America*, **79**, 448-50.
- Bedinger, P. (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell*, **4**, 879-87.
- Beers, E.P. (1997) Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ*, **4**, 649-61.
- Beharav, A. & Cohen, Y. (1995) Attempts to overcome the barrier of interspecific hybridization between *Cucumis melo* and *Cucumis metuliferus*. *Israel Journal Of Plant Sciences*, **43**(2), 113-23.
- Bhatia, D.S. & Malik, C.P. (1996). Significance of callose in reproduction of higher plants with special reference to male gametophyte. In *Pollen-spore research emerging strategies. Advances in pollen-spore research* (ed C.P. Malik), pp. 221-40. Today and tomorrow's printers and publishers, New Delhi.
- Blamey, M. & Grey-Wilson, C. (2000) *Toutes les fleurs de Méditerranée* Delachaux et Niestlé, Paris.
- Boavida, L.C., Becker, J.D. & Feijo, J.A. (2005) The making of gametes in higher plants. *The International Journal of Developmental Biology*, **49**, 595-614.
- Bock, B. (2010). *Ecballium elaterium* subsp. *elaterium*. In. Tela Botanica - Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France.
- Boesewinkel, F.D. & Bouman, F. (1995). The seed: Structure and function. In *Seed development and germination* (eds J. Kigel & G. Galili), Vol. 41, pp. 1-24. CRC Press, Jerusalem.
- Bohn, G.W. & Davis, G.N. (1964) Insect pollination is necessary for the production of muskmelons (*Cucumis melo* V. *veticulatus*). *Journal Of Apicultural Research*, **3**, 61-63.
- Boldrini, K.R., Pagliarini, M.S. & do Valle, C.B. (2006) Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Bracharia humidicola* (Poaceae: Paniceae). *Journal of Genetics*, **85**(3), 225-28.
- Bosco, S.F., Tusa, N. & Conicella, C. (1999) Microsporogenesis in a citrus interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. *Heredity*, **83**, 373-77.

- Bretagnolle, F. & Thompson, J.D. (1995) Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopoloid plants. *New Phytologist*, **129**, 1-22.
- Brewbaker, J.L. & Kwack, B.H. (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal Of Botany*, **50**(9), 859-65.
- Brim, C.A. & Young, M.F. (1971) Inheritance of a male-sterile character in soybeans. *Crop Science*, **11**(4), 564-66.
- Butenandt, A. & Rembold, H. (1957) Royal jelly of the honeybee. I. Isolation, constitution analysis, and incidence of 10-hydroxy-delta 2-decenoic acid. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, **308**, 284-89.
- Campbell, D.R. (2000) Experimental tests of sex-allocation theory in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**(6), 227-32.
- Campbell, N. & Reece, J. (2004) *Biologie*, 2 edn. De Boeck université, Bruxelles.
- Castetter, E.F. (1926) Cytological studies in the Cucurbitaceae I. Microsporogenesis in *Cucurbita maxima*. *American Journal Of Botany*, **13**(1), 1-10.
- Chacoff, N.P., García, D. & Obeso, J.R. (2008) Effects of pollen quality and quantity on pollen limitation in *Crataegus monogyna* (Rosaceae) in NW Spain. *Flora*, **203**(6), 499.
- Chauhan, S.V.S. & Singh, S.P. (1968) Studies on pollen abortion in *Cucumis melo* L. *Agra University Journal of Research*, **2**, 11-22.
- Chauvin, R. (1968) *Traité de biologie de l'abeille* Masson, Paris.
- Chen, Y.C.S. & McCormick, S. (1996) Sidecar pollen, an *Arabidopsis thaliana* male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. *Development*, **122**(10), 3243-53.
- Cheung, A.Y. (1995) Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **92**(8), 3077-80.
- Ciampolini, F., Nepi, M. & Pacini, E. (1993) Tapetum development in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Plant Systematics And Evolution [Suppl.]*, **7**, 13-22.
- Clément, H. (2002) *Le traité Rustica de l'apiculture* Editions Rustica, Paris.

- Coimbra, S., Torrao, L. & Abreu, I. (2004) Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiology*, **42**, 537-41.
- Cole, L.K., Blum, M.S. & Roncadori, R.W. (1975) Antifungal properties of the insect alarm pheromones, citral, 2-heptanone, and 4-methyl-3-heptanone. *Mycologia*, **67**(701-708).
- Costa, R.A.C. & Cruz-Landim, C. (2001) Enzymes present in the thoracic gland extracts from workers and males of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, **37**(3B), 563-69.
- Costa, R.A.C. & Cruz-Landim, C. (2002) Enzymatic activity of hypopharyngeal gland extracts from workers of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Sociobiology*, **40**(2), 403-11.
- Costa, R.A.C. & Cruz-Landim, C. (2005) Hydrolases in the hypopharyngeal glands of workers of *Scaptotrigona postica* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). *Genetics and Molecular Research Genetics and Molecular Research*, **4**(4), 616-23.
- Costich, D.E. & Meagher, T.R. (1992) Genetic-variation in *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae) - Breeding system and geographic-distribution. *Journal Of Evolutionary Biology*, **5**(4), 589-601.
- Cruz-Landim, C. & Costa, R.A.C. (1998) Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach. *Journal of Computational Biology*, **3**(2), 151-63.
- Culley, T.M., Weller, S.G. & Sakai, A.K. (2002) The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 361-69.
- Cuny, F. (1992) *Processus d'induction d'embryons haploïdes par du pollen irradié chez le melon (Cucumis melo L.)*, Thèse, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon.
- Dafni, A. & Firmage, D. (2000) Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics And Evolution*, **222**(1-4), 113-32.
- Davis, A.R. (1997). Pollination efficiency of insects. In *Pollen biotechnology for crop production and improvement* (eds K.R. Shivanna & V.K. Sawhney), pp. 87-120. Cambridge University Press.
- de Jong, T.J. & Klinkhamer, P.G.L. (2005) *Evolutionary ecology of plant reproductive strategies* Cambridge University Press.

- Delaplane, K.S. & Mayer, D.F. (2000) *Crop pollination by bees*, Cambridge University Press.
- Demalsy-Feller, P. & Demalsy-Feller, M.-J. (1990) *Les plantes à graines: structure, biologie, développement* Décarie, Québec.
- Digonnet-Kerhoas, C., Gay, G., Duplan, J.C. & Dumas, C. (1989) Viability of *Cucurbita pepo* pollen - Biophysical and structural data. *Planta*, **179**(2), 165-70.
- Dukas, R. (1987) Foraging behavior of three bee species in a natural mimicry system: female flowers which mimic male flowers in *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae). *Oecologia*, **74**, 256-63.
- Dumas de Vaulx, R. (1992). Germination du pollen - *In vitro* - Melon. In *Techniques de cytogénétique végétale* (ed J. Jahier), p 119. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- Edlund, A.F., Swanson, R. & Preuss, D. (2004) Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell*, **16**, S84-S97.
- Ellis, R.E., Yuan, J. & Horvitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology*, **7**, 633-98.
- Emberger, L. (1960). Cucurbitales. In *Traité de Botanique Systématique* (eds M. Chadeffaud & L. Emberger), Vol. 2, pp. 1280-97. Masson & Cie, Paris.
- Erickson, A.N. & Markhart, A.H. (2002) Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant Cell And Environment*, **25**(1), 123-30.
- Faegri, K. & van der Pijl, L. (1971) *The principles of pollination ecology* Pergamon Press, Oxford, New York.
- Fahn, A. & Shimony, C. (2001) Nectary structure and ultrastructure of unisexual flowers of *Ecballium elaterium* (L.) a. Rich. (Cucurbitaceae) and their presumptive pollinators. *Annals Of Botany*, **87**(1), 27-33.
- Faraway, J.J. (2005) *Extending the linear model with R* Chapman and Hall/CRC.
- Fournier, P. (2000) *Les quatre flores de France* Dunod, Paris.

- Franchi, G.G., Nepi, M., Dafni, A. & Pacini, E. (2002) Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance. *Plant Systematics And Evolution*, **234**(1-4), 211-27.
- Francis, B.R., Blanton, W.E., Littlefield, J.L. & Nunamaker, R.A. (1989) Hydrocarbons of the cuticle and hemolymph of the adult honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Entomological Society of America*, **82**(4), 486-94.
- Free, J.B. (1993) *Insect pollination of crops*, 2 edn. Academic Press, London.
- Free, J.B. (1960) The behaviour of honeybees visiting flowers on fruit trees. *Journal of Animal Ecology*, **29**, 385-95.
- Fröhlich, B., Riederer, M. & Tautz, J. (2001) Honeybees discriminate cuticular waxes based on esters and polar components. *Apidologie*, **32**, 265-74.
- Furness, C.A., Rudall, P.J. & Sampson, F.B. (2002) Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International Journal Of Plant Sciences*, **163**(2), 235-60.
- Fuzinato, V.A., Pagliarini, M.S. & Valle, C.B. (2007) Evidence of programmed cell death during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) hybrid. *Genetics And Molecular Research*, **6**, 308-15.
- Gallo, P.H., Micheletti, P.L., Boldrini, K.R., Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M.S. & do Valle, C.B. (2007) 2n gamete formation in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). *Euphytica*, **154**, 255-60.
- Gary, N.E. (1962) Chemical mating attractants in the queen honeybee. *Science*, **136**, 773-74.
- Gasser, C.S. & Robinson-Beers, K. (1993) Pistil development. *Plant Cell*, **5**, 1231-39.
- Gauch, H.G. & Dugger, W.M. (1954) The physiological action of boron in higher plants: A review & interpretation. *University of Maryland Bulletin*, **A-80 (technical)**.
- Golubovskaya, I. (1989) Meiosis in maize: mei genes and conception of genetic control of meiosis. *Advances in Genetics*, **26**, 149-92.
- Greenberg, J.T. (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **93**, 12094-97.
- Grzywnowicz, K., Ciolek, A., Tabor, A. & Jaszek, M. (2009) Profiles of the body-surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors. *Apidologie*, **40**, 4-19.

- Guo, J.-Y., Chen, J.-f., Cao, Q.-H., Luo, X.-D. & Chen, L.-Z. (2004) Cytological studies on microsporogenesis and male gametophyte development in a *Cucumis* allotriploid derived from *Cucumis hytivus* x *C. sativus*. *Cytologia*, **69**(3), 335-40.
- Harriss, F.C.L. & Beattie, A.J. (1991) Viability of pollen carried by *Apis mellifera* L., *Trigona carbonaria* Smith and *Vespula germanica* (F.) (Hymenoptera: Apidae, Vespidae). *Journal of Australian Entomological Society*, **30**, 45-47.
- Heimlich, L.F. (1927) The development and anatomy of the staminate flower of the cucumber. *American Journal Of Botany*, **14**(5), 227-37.
- Herrera, C.M. & Pellmyr, O. (2002) *Plant-animal interactions - An evolutionnary approach* Blackwell Science, Malden.
- Heslop-Harrison, J. & Heslop-Harrison, Y. (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, **45**(3), 115-20.
- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. & Shivanna, K.R. (1984) The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical And Applied Genetics*, **67**, 367-75.
- Hodges, D. (1967) The function of the single hair on the floor of the honeybee's corbicula. *Bee World*, **48**, 58-61.
- Huang, Z.H., Zhu, J.M., Mu, X.J. & Lin, J.X. (2004) Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. *Annals Of Botany*, **93**(3), 295-301.
- Iwanami, Y. & Nakamura, N. (1972) Storage in an organic solvent as a mean for preserving viability of pollen grains. *Stain Technology*, **47**(3), 137-39.
- Jahier, J., Chevre, A.M., Eber, F., Delourme, R. & Tanguy, A.M. (1992) *Techniques de cytogénétique végétale* INRA, Paris.
- Jain, A. & Shivanna, K.R. (1988a) Storage of pollen grains in organic solvents: Effects of organic solvents on leaching of phospholipids and its relationship to pollen viability. *Annals Of Botany*, **61**, 325-30.
- Jain, A. & Shivanna, K.R. (1988b) Storage of pollen grains in organic solvents: effects of solvents on pollen viability and membrane integrity. *Journal of Plant Physiology*, **132**, 499-501.

- Jones, A.M. (2001) Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology*, **125**, 94-97.
- Kapyla, M. (1991) Testing the age and viability of airborne pollen. *Grana*, **30**(2), 430-33.
- Karlson, P. & Butenandt, A. (1959a) Pheromones (ectohormones) in insects. *Annual Review of Entomology*, **4**, 39-48.
- Karlson, P. & Luscher, M. (1959b) "Pheromones": a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, **183**, 55-56.
- Kearns, C.A. & Inouye, D.W. (1993) *Techniques for pollination biologists* University of Colorado, Niwot.
- Keeling, C.I., Slessor, K.N., Koeniger, N., Koeniger, G. & Punchihewa, R.W.K. (2000) Quantitative analysis of the mandibular gland components of the dwarf honey bee (*Apis florea* Fabricius). *Apidologie*, **31**(2), 293-99.
- Kendall, D.A. (1973) The viability and compatibility of pollen on insects visiting apple blossom. *Journal Of Applied Ecology*, **10**, 847-53.
- Keularts, J.L.W. & Linskens, H.F. (1968) Influence of fatty acids on petunia pollen grains. *Acta Botanica Neerlandica*, **17**(4), 267-72.
- Kevan, P.G. & Baker, H.G. (1983) Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*, **28**, 407-53.
- Kirkwood, J.E. (1906) The pollen-tube in some of the Cucurbitaceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, **33**(6), 327-42.
- Knox, R.B., Williams, E.G. & Dumas, C. (1986) Pollen, pistil and reproductive function in crop plants. *Plant Breeding Reviews*, **4**, 9-79.
- Koidsumi, K. (1957) Antifungal action of cuticular lipids in insects. *Journal Of Insect Physiology*, **1**(1), 40-51.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M. & Goldberg, R.B. (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell*, **2**(12), 1201-24.
- Le Conte, Y. (2002). Mieux connaître l'abeille. In *Le traité Rustica de l'apiculture* (ed H. Clément), pp. 12-51. Editions Rustica, Paris.

- Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J. & Masson, C. (1990) Identification of a brood pheromone in honeybees. *Naturwissenschaften*, **77**, 334-36.
- Le Conte, Y. & Hefetz, A. (2008) Primer pheromones in social Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, **53**, 26.1-26.20.
- Le Conte, Y., Mohammedi, A. & Robinson, G.E. (2001) Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biological Sciences*, **268**(1463), 163-68.
- Leduc, N., Monnier, M. & G.C., D. (1990) Germination of trinucleated pollen: formulation of a new medium for *Capsella bursa-pastoris*. *Sexual Plant Reproduction*, **3**, 228-35.
- Leoncini, I., Crauser, D., Robinson, G.E. & Le Conte, Y. (2004a) Worker-worker inhibition of honey bee behavioural development independent of queen and brood. *Insectes Sociaux*, **51**(4), 392-94.
- Leoncini, I., Le Conte, Y., Costagliola, G., Plettner, E., Toth, A.L., Wang, M.W., Huang, Z., Becard, J.M., Crauser, D., Slessor, K.N. & Robinson, G.E. (2004b) Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **101**(50), 17559-64.
- Leonhardt, S.D., Blüthgen, N. & Schmitt, T. (2009) Smelling like resin: terpenoids account for species-specific cuticular profiles in Southeast-Asian stingless bees. *Insectes Sociaux*, **56**, 157-70.
- Louveaux, J. (1966) Les modalités de l'adaptation des Abeilles (*Apis mellifica* L.) au milieu naturel. *Annales de l'Abeille*, **9**, 323-50.
- Lukoschus, F.S. & Keularts, J.L.W. (1968) Eine weitere Funktion der Mandibeldrüse der Arbeiterin von *Apis mellifica* L. Produktion eines die Pollenkeimung hemmenden stoffes. *Zeitschrift Bienenforschung*, **9**, 333-43.
- Maheshwari, P. (1950) *An introduction to the embryology of angiosperm* McGraw-Hill Book Compagny, New York.
- Maisonasse, A., Lenoir, J.C., Costagliola, G., Beslay, D., Choteau, F., Crauser, D., Becard, J.M., Plettner, E. & Le Conte, Y. (2009) A scientific note on E-beta-ocimene, a new volatile primer pheromone that inhibits worker ovary development in honey bees. *Apidologie*, **40**(5), 562-64.



- Mann, L.K. & Robinson, J. (1950) Fertilization, seed development, and fruit growth as related to fruit set in the cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *American Journal Of Botany*, **37**(9), 685-97.
- Mann, L.K. (1953) Honey bee activity in relation to pollination and fruit set in the cantaloupe (*Cucumis melo*). *American Journal Of Botany*, **40**, 545-53.
- Matlob, A.N. & Kelly, W.C. (1973) The effect of high temperature on pollen tube growth of snake melon and cucumber. *Journal of American society of Horticultural Science*, **98**(3), 296-300.
- Maurizio, A. (1958) Pollenkeimung hemmende Stoffe im Körper der Honigbiene. *Proceedings from the 17th international Apiculture Congress (Rome)*, 1-2.
- Mayer, E. & Gottsberger, G. (2000) Pollen viability in the genus *Silene* (Caryophyllaceae) and its evaluation by means of different test procedures. *Flora*, **195**(4), 349-53.
- McCormick, S. (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell*, **5**, 1265-75.
- McCoy, T.J. & Smith, L.Y. (1983) Genetics, cytology, and crossing behavior of an alfalfa (*Medicago sativa*) mutant resulting in failure of the post meiotic cytokinesis. *canadian Journal of Genetics and Cytology*, **25**(4), 390-97.
- McGregor, S.E. & Todd, F.E. (1952) Cantaloup production with honey bees. *Journal of Economic Entomology*, **45**(1), 43-47.
- McGregor, S.E. & Todd, F.E. (1953) No bees, no melons. *Gleanings Bee Culture*, 726.
- McGregor, S.E., Levin, M.D. & Foster, R.E. (1965) Honey bee visitors and fruit set of cantaloups. *Journal of Economic Entomology*, **58**(5), 968-70.
- Mendes-Vieira, D., Mendes-Bonato, A.B., Pagliarini, M.S. & Valle, C.B. (2005) Abnormal meiotic behavior in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) leading to microspore degeneration. *Caryologia*, **58**, 396-402.
- Mesquida, J. & Renard, M. (1989) Etude de l'aptitude à germer in vitro du pollen de colza (*Brassica napus* L.) récolté par l'abeille domestique (*Apis mellifica* L.). *Apidologie*, **20**, 197-205.
- Michener, C.D. (2000) *The bees of the world* The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Misset, M.T. (1992) Meiotic abnormalities during microsporogenesis and low fertility in prostrate ecotypes of *Ulex* species (Papilionoideae, Genisteae). *Canadian Journal of Botany*, **70**(6), 1223-27.

- Mohammedi, A., Crauser, D., Paris, A. & Le Conte, Y. (1996) Effect of a brood pheromone on honeybee hypopharyngeal glands. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la vie*, **319**, 769-72.
- Nabors, M. (2008) *Biologie végétale - Structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies* Pearson Education France, Paris. Nandpuri, K.S. & Brar, J.S. (1966) Studies on the floral biology in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Journal of Research of the Punjab Agricultural University, Ludhiana*, **3**, 395-99.
- Nepi, M. & Pacini, E. (1993) Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals Of Botany*, **72**(6), 527-36.
- Nepi, M. & Franchi, G.G. (2000) Cytochemistry of mature angiosperm pollen. *Plant Systematics And Evolution*, **222**(1-4), 45-62.
- Nepi, M., Franchi, G.G. & Pacini, E. (2001) Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma*, **216**(3-4), 171-80.
- Odet, J. (1991) *Le melon* Ctifl.
- O'Toole, C. & Raw, A. (1991) *Bees of the world* Blandford Publishing, London.
- Pacini, E., Franchi, G.G. & Hesse, M. (1985) The tapetum: Its form, function, and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systematics And Evolution*, **149**, 155-85.
- Pacini, E. (2000) From anther and pollen ripening to pollen presentation. *Plant Systematics And Evolution*, **222**(1-4), 19-43.
- Pacini, E., Nepi, M. & Vesprini, J.L. (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics And Evolution*, **238**, 7-21.
- Pacini, E. & Hesse, M. (2004) Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. *Flora*, **199**, 273-85.
- Pacini, E., Guarnieri, M. & Nepi, M. (2006) Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma*, **228**(1-3), 73-77.
- Pain, J. (1971) Pheromones et comportement chez quelques Hyménoptères. *Apidologie*, **2**(4), 319-55.
- Pankiw, T. (2004a) Cued in: honey bee pheromones as information flow and collective decision-making. *Apidologie*, **35**(2), 217-26.

- Pankiw, T. (2004b) Worker honey bee pheromone regulation of foraging ontogeny. *Naturwissenschaften*, **91**(4), 178-81.
- Parker, F.D. & Hatley, C.L. (1979) Onion pollination: viability of onion pollen and pollen diversity on insect body hairs. *Hybrid Crop Pollination*, **1**, 201-06.
- Pascual-Villalobos, M.J. & Robledo, A. (1999) Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. *Biochemical Systematics And Ecology*, **27**(1), 1-10.
- Passmore, S. (1930) Microsporogenesis in the Cucurbitaceae. *Botanical Gazette*, **90**, 213-23.
- Pennell, R.I. & Lamb, C. (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, **9**, 1157-68.
- Pesson, P. & Louveaux, J. (1984) *Pollinisation et productions végétales*, INRA edn., Paris.
- Petanidou, T. (2005) Sugars in Mediterranean floral nectars: An ecological and evolutionary approach. *Journal Of Chemical Ecology*, **31**(5), 1065-88.
- Petanidou, T., Van Laere, A., Ellis, W.N. & Smets, E. (2006) What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos*, **115**(1), 155-69.
- Pham-Delègue, M.H. (1999) *Les abeilles* Minerva, Paris.
- Pitrat, M. & Risser, G. (1992). Le melon. In *Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection* (eds A. Gallais & H. Bannerot), pp. 448-59. INRA, Paris.
- Piven, N.M., Barredo-Pool, F.A., Borges-Argaez, I.C., Herrera-Alamillo, M.A., Mayo-Mosqueda, A., Herrera-Herrera, J.L. & Robert, M.L. (2001) Reproductive biology of henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I Gametophyte development. *American Journal Of Botany*, **88**, 1966-79.
- Pline, W.A., Edmisten, K.L., Oliver, T., Wilcut, J.W., Wells, R. & Allen, N.S. (2002) Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. *Crop Science*, **42**(6), 2193-200.
- Raikhlin-Eisenkraft, B. & Bentur, Y. (2000) *Ecbalium elaterium* (squirting cucumber) - remedy or poison? *Journal of Toxicology, Clinical Toxicology*, **38**(3), 305-08.
- Ramanna, M.S. (1979) A re-examination of the mechanisms of 2n gametes formation in potato and its implications for breeding. *Euphytica*, **28**, 537-61.
- Regnier, F.E. & Law, J.H. (1968) Insect pheromones. *Journal of Lipid Research*, **9**, 541-51.

- Richards, A.J. (1986) *Plant breeding systems* George Allen and Unwin, London, England.
- Richards, J.S., Stanley, J.N. & Gregg, P.C. (2005) Viability of cotton and canola pollen on the proboscis of *Helicoverpa armigera*: implications for spread of transgenes and pollination ecology. *Ecological Entomology*, **30**(3), 327-33.
- Robinson, G.E. (2002) Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. *The American Naturalist*, **160**, S160-S72.
- Rodet, G. (2010). Les mutualismes entre insectes et plantes, des ennemis réconciliés. In *Des insectes et des plantes* (ed D. Thiery, Calatayud, P.A., Sauvion, N., Marion-Poll, F.) (sous presse).
- Rodriguez-Riano, T. & Dafni, A. (2000) A new procedure to assess pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, **12**(4), 241-44.
- Rosa, J.T. (1924) Fruiting habit and pollination of cantaloupe. **21**, 51-57.
- Roulston, T.H. & Cane, J.H. (2000) Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics And Evolution*, **222**(1-4), 187-209.
- Russell, S.D. (1992) Double fertilization. *International Review of Cytology*, **140**, 357-88.
- Rust, R.W., Vaissiere, B.E. & Westrich, P. (2003) Pollinator biodiversity and floral resource use in *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae), a Mediterranean endemic. *Apidologie*, **34**(1), 29-42.
- Ruvalcaba-Ruiz, D. & Rodriguez-Garay, B. (2002) Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. azul. *BMC Plant Biology*, **2**(1), 10.
- Sanders, P.M., Bui, A.Q., Weterings, K., McIntire, K.N., Hsu, Y.C., Lee, P.Y., Truong, M.T., Beals, T.P. & Goldberg, R.B. (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction*, **11**(6), 297-322.
- Sarehane, M. (1997). Vers une pollinisation raisonnée du melon par les abeilles domestiques. In *Symposium international - Production et protection intégrées des cultures*, p 83, Agadir, Morocco.
- Schmitt, T., Herzner, G., Weckerle, B., Schreier, P. & Strohm, E. (2007) Volatiles of foraging honeybees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and their potential role as semiochemicals. *Apidologie*, **38**, 164-70.
- Scott, R.J., Spielman, M. & Dickinson, H.G. (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell*, **16**, S46-S60.

- Seaton, H.L. & Kremer, J.C. (1939) The influence of climatological factors on anthesis and anther dehiscence in the cultivated cucurbits. A preliminary report. *Proceedings Of The American Society Of Horticulture Sciences*, **36**, 627-31.
- Seeley, T. (1995) *The wisdom of the hive* Harvard University Press, Cambridge.
- Shearer, D.A. & Boch, R. (1965) 2-heptanone in the mandibular gland secretion of the honeybee. *Nature*, **206**, 530.
- Shivanna, K.R. & Heslop-Harrison, J. (1981) Membrane state and pollen viability. *Annals Of Botany*, **47**, 759-70.
- Shivanna, K.R. & Johri, B.M. (1989) *The angiosperm pollen. Structure and function* Wiley, New York.
- Shivanna, K.R. & Rangaswamy, N.S. (1992) *Pollen biology - A laboratory manual* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Simeonova, E., Wypioriewicz, E. & Charzynska, M. (1999) Pollen development in *Cucumis sativus* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, **41**, 139-42.
- Singh, A.K. & Yadav, K.S. (1984) Cytogenetics of *Cucumis* L.: 4. Comparative study of natural and induced polyploids. *Cytologia*, **49**(1), 183-92.
- Slessor, K.N., Winston, M.L. & Le Conte, Y. (2005) Pheromones communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal Of Chemical Ecology*, **31**(11), 2731-45.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1994) *Biometry*, 3 edn. W.H. Freeman.
- Souza, M.M.d., Pereira, T.N.S., Viana, A.P., Pereira, M.G., Bernacci, L.C., Sudre, C.P. & Silva, L.d.C. (2003) Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). *Caryologia*, **56**(2), 161-69.
- Spielman, M., Preuss, D., Li, F.L., Browne, W.E., Scott, R.J. & Dickinson, H.G. (1997) TETRASPORE is required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **124**(13), 2645-57.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T. & Schultheis, J.R. (2002) Diurnal activity, floral visitation and pollen deposition by honey bees and bumble bees on field-grown cucumber and watermelon. *Journal Of Apicultural Research*, **41**(1-2), 27-34.
- Stanley, R.G. & Linskens, H.F. (1974) *Pollen. Biology Biochemistry Management* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

- Stone, J.L., Thomson, J.D. & Dent-Acosta, S.J. (1995) Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: A review. *American Journal Of Botany*, **82**, 1186-97.
- Susin, I. & Alvarez, J.M. (1997) Fertility and pollen tube growth in polyploid melons (*Cucumis melo* L). *Euphytica*, **93**(3), 369-73.
- Swanson, R., Edlund, A.F. & Preuss, D. (2004) Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annual Reviews of Genetic*, **38**, 793-818.
- Thakur, G.K. (1973) A natural tetraploid in the genus *Trichosanthes* from Bihar. *Proceedings of Indian Science Congress*, **60**(3), 324.
- Taschetto, O.M. & Pagliarini, M.S. (2003) Occurrence of 2n and jumbo pollen in the Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* and *P. tuberosa*). *Euphytica*, **133**(1), 139-45.
- Taylor, L.P. & Hepler, P.K. (1997) Pollen germination and tube growth. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology*, **48**, 461-91.
- Thorp, R.W. (2000) The collection of pollen by bees. *Plant Systematics And Evolution*, **222**(1-4), 211-23.
- Tondini, F., Tavoletti, S., Mariani, A. & Veronesi, F. (1993) A statistical approach to estimate the frequency of n, 2n and 4n pollen grains in diploid alfalfa. *Euphytica*, **69**, 109-14.
- Tsyganov, S.K. (1953) Remarks on the pollinating activity of honey bees. *Uzbekistan Akadademii Nauk Institut Zoologiya i Parasitologiya Trudy*, **1**, 91-122.
- Uslu, C., Karasen, R.M., Sahin, F., Taysi, S. & Akcay, F. (2006) Effect of aqueous extracts of *Ecballium elaterium* rich, in the rabbit model of rhinosinusitis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, **70**(3), 515-18.
- Vaissiere, B.E., Malaboeuf, F. & Rodet, G. (1996) Viability of cantaloupe pollen carried by honeybees *Apis mellifera* varies with foraging behavior. *Naturwissenschaften*, **83**(2), 84-86.
- Vasil, I.K. (1960) Studies on pollen germination of certain Cucurbitaceae. *American Journal Of Botany*, **47**(4), 239-47.
- Veilleux, R.E. & Lauer, F.I. (1981) Variation for 2n pollen production in clones of *Solanum phureja* Juz. and Buk. *Theoretical And Applied Genetics*, **59**, 95-100.
- Verhoef, H.C.M. & Hoekstra, F.A. (1986). Absence of 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) in bee-collected pollen. In *Biotechnology and ecology of pollen* (eds D.L. Mulcahy, G.B. Mulcahy & E. Ottaviano), pp. 391-96. Springer-Verlag, New York.

- Visser, T. (1955) Germination and storage of pollen. *Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen/Nederland*, **55**(1), 1-68.
- Weterings, K. & Russell, S.D. (2004) Experimental analysis of the fertilization process. *Plant Cell*, **16**, S107-S18.
- Whitaker, T.W. & Pryor, D.E. (1946) Effect of plant growth regulators on the set of fruit from hand-pollinated flowers of *Cucumis melo* L. *Proceedings Of The American Society Of Horticulture Sciences*, **48**, 417-22.
- Wilson, E.O. (1965) Chemical communication in the social insects. *Science*, **149**, 1064-71.
- Winston, M.L. (1991) *The biology of the honey bee* Harvard University Press, Cambridge.
- WolfWikis (2010) <http://wikis.lib.ncsu.edu/> (vu le 15-07-10)
- Wu, H.-M. & Cheung, A.Y. (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology*, **44**, 267-81.
- Wulff, H.D. (1939) Die Pollenentwicklung der Juncaceen nebst einer Auswertung der embryologischen Befunde hinsichtlich einer Verwandtschaft zwischen den Juncaceen und Cyperaceen. *Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik*, **87**, 533-56.
- Yadegari, R. & Drews, G.N. (2004) Female gametophyte development. *Plant Cell*, **16**, S133-S41.
- Yang, X.H., Makaroff, C.A. & Ma, H. (2003) The Arabidopsis MALE MEIOCYTE DEATH1 gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis. *Plant Cell*, **15**(6), 1281-95.
- Zupko, K., Sklan, D. & Lensky, Y. (1993) Proteins of the honeybee (*Apis Mellifera* L.) body-surface and exocrine gland secretions. *Journal Of Insect Physiology*, **39**(1), 41-46.