

# Une nouvelle méthode d'élevage *in vitro* de larves d'ouvrières d'abeille domestique : un outil pour l'évaluation des pesticides

Dominique Fortini<sup>1</sup>

**Résumé.** Les insecticides sont utilisés pour lutter contre les insectes ravageurs des cultures. L'abeille domestique (*Apis mellifera*) fait partie des insectes intégrés dans le schéma d'évaluation des risques liés à l'utilisation des pesticides. Des tests sur adultes existent mais aucun ne permet de mesurer les effets directs de ces molécules sur le couvain (larves, nymphes). A l'Institut national de recherche agronomique (INRA), l'Unité expérimentale Entomologie située au Magneraud, Centre Poitou-Charentes, a donc mis au point une méthode d'élevage larvaire d'abeille domestique en conditions contrôlées au laboratoire. Cette méthode permet de suivre individuellement chaque abeille du premier stade larvaire jusqu'au stade adulte. Standardisée, reproductible, elle permet d'ajouter dans l'aliment larvaire des molécules à des doses connues et de mesurer leur effet sur larve, nymphe ou adulte. Cette méthode a fait l'objet de deux tests interlaboratoires en mode d'exposition aiguë et répétée et est désormais validée par l'OCDE (Organisation de coopération et de développements économiques) au niveau international.

**Mots clés :** abeille domestique, larve, élevage *in vitro*, pesticide, exposition aiguë, exposition répétée

## Introduction

L'abeille domestique joue un rôle important pour la reproduction d'un grand nombre de plantes, cultivées ou non. Préserver cet insecte est donc indispensable pour maintenir la durabilité des systèmes de production agricole ainsi que la biodiversité.

Les pesticides (insecticides, fongicides, herbicides ...) sont utilisés pour le traitement des cultures et sont soumis à des tests d'homologation, avant leur autorisation de mise sur le marché (AMM). Parmi ces tests, certains ont trait à l'écotoxicologie et notamment à leurs effets toxiques sur abeilles. L'évaluation des effets de nouvelles molécules fait l'objet d'exigences accrues de la part des instances chargées de l'homologation des pesticides, tant en France qu'en Europe. Sur abeilles adultes, des tests existent et sur le couvain (larves) une méthode indirecte était jusqu'à présent utilisée (Oomen et al., 1992) mais elle ne permet pas de connaître précisément l'exposition des larves à la molécule testée.

De nombreuses méthodes d'élevage *in vitro* de larves ont été publiées (Malone et al., 2002, Peng et al., 1992, Vandenberg et al., 1987, Weaver et al., 1955) mais leur fiabilité est remise en cause, entre autres par la forte mortalité des larves « témoins. » Elles ne peuvent donc pas être utilisées en routine pour l'évaluation d'une molécule et n'ont pas fait l'objet d'un test interlaboratoires démontrant leur reproductibilité.

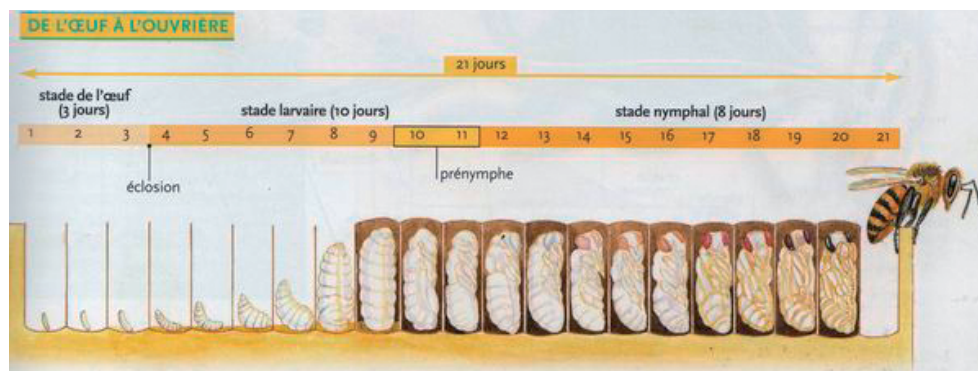
Pour répondre à la demande des experts, l'INRA et plus précisément l'unité Entomologie, dans le cadre d'un programme européen, a mis au point une méthode d'élevage sur les larves d'abeilles ouvrières, où l'exposition au pesticide est contrôlée. Cette méthode d'élevage des larves *in vitro* standardisée, reproductible est conçue pour être facilement transposable aux laboratoires agréés en charge de l'évaluation des pesticides (Aupinel et al., 2007). En conditions contrôlées de laboratoire, elle permet d'élever des abeilles ouvrières du premier stade larvaire (L1), jusqu'au stade adulte avec une mortalité larvaire inférieure à 15 %.

## Descriptif de la méthode d'élevage

Dans la ruche, le cycle d'une abeille ouvrière, de la ponte à l'émergence de l'adulte se décompose en quatre stades successifs : le stade œuf (3 jours), le stade larvaire (10 jours), le stade nymphal (8 jours), puis le stade adulte soit

<sup>1</sup> Unité expérimentale Entomologie, INRA, Domaine du Magneraud, 17700 Surgères, France  
dominique.fortini@inra.fr

au total 21 jours (**Figure 1**). La méthode décrite ci-dessous reproduit ce cycle, à partir du stade larvaire (post-éclosion) et jusqu'à l'adulte, en conditions de laboratoire.



*Figure 1. Cycle biologique de l'abeille ouvrière en ruche (image issue du Traité de l'apiculture).*

### Engagement de la reine

La méthode d'élevage nécessite au préalable de créer les conditions favorables pour l'obtention d'un nombre de larves suffisant et homogène en âge. Il est donc nécessaire de sélectionner une ruche saine avec une reine à forte activité de ponte. Quatre jours avant le début de l'élevage *in vitro*, l'apiculteur isole la reine dans une cage contenant un cadre bâti avec un grand nombre d'alvéoles vides (**Figure 2**) où elle pourra pondre. Cette cage, qui ne permet que le passage des ouvrières, est replacée dans la ruche entre des cadres de couvain (**Figure 3**). L'engagement, qui dure 24 h (30 h maximum en conditions moins favorables), permet à la reine de pondre exclusivement sur le cadre présent. Parfois, la reine ne pond pas ou peu pendant ce temps d'engagement (blocage de ponte), il est donc nécessaire de préparer au moins trois ruches.



*Figure 2. Cadre bâti avec alvéoles vierges et cage (photo : INRA).*



*Figure 3. Mise en ruche de la cage contenant le cadre (photo : INRA).*

### Incubation des œufs

Le lendemain, l'apiculteur libère la reine et la remet dans la ruche. Il vérifie la présence d'œufs en nombre suffisant pour l'élevage, remplace le cadre dans la cage, puis dans la ruche à l'endroit initial, entre des cadres de couvain. La reine présente dans la ruche n'a plus accès à ce cadre mais la grille permet le passage des ouvrières. Elles

vont pouvoir inspecter les œufs pendant l'incubation (3 jours), et dès leur éclosion déposer une goutte d'aliment larvaire près de la jeune larve (L1).

## Matériels d'élevage

Au laboratoire, plusieurs jours avant le prélèvement des jeunes larves L1 (greffage), le matériel d'élevage doit être préparé : une étuve ventilée à la température de la ruche ( $34,5 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ ) dont la conformité a été vérifiée, contenant deux caissons hermétiques (par exemple Nalgène : ref 5314-0120 ou 5317-0180) l'un avec une solution saturée en  $\text{K}_2\text{SO}_4$  pour avoir dans le caisson une hygrométrie à  $90 \% \pm 5 \% \text{ HR}$ , et l'autre, une solution saturée en  $\text{NaCl}$  pour avoir dans le caisson une hygrométrie à  $80 \% \pm 5 \% \text{ HR}$  (**Figure 4**), ainsi que des supports d'élevage.



Figure 4. Étuve et caissons d'élevage (photo : INRA).

Ces derniers sont composés d'une plaque 48 puits (portoir), où dans chaque puits est placé un morceau de coton dentaire imbibé d'une solution utilisée pour la stérilisation à froid des biberons (type Milton<sup>®</sup>) à 15 % de glycérol. Cette solution garantit un environnement aseptisé proche de chaque larve. Puis, au-dessus de chaque coton imbibé, on pose une cupule en plastique alimentaire, également désinfectée à froid. Ces cupules (réf CNE/3, société Nicoplast) sont couramment utilisées par les apiculteurs pour l'élevage de reines. Elles s'adaptent parfaitement au diamètre des puits, sont plus larges que des alvéoles d'un cadre de ruche, et donc plus pratiques pour le dépôt d'une larve par cupule (**Figures 5 et 6**).

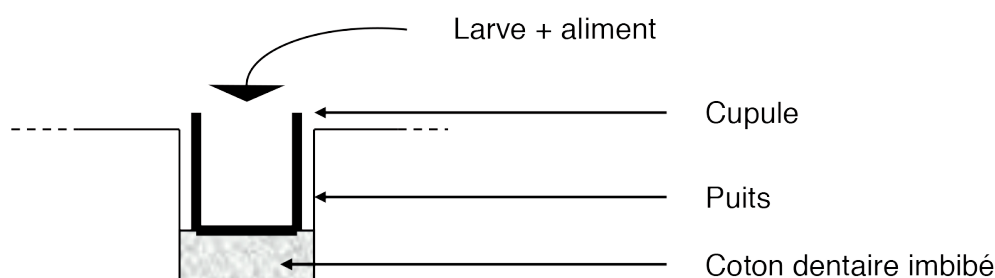


Figure 5. Schéma d'une cupule.





Figure 6. Plaque de greffage (photo : INRA).

## Aliments larvaires

### Préparation

La méthode d'élevage nécessite la préparation d'aliments dont la composition et la quantité distribuée évolueront en fonction de l'âge de la larve.

Dans la ruche, la jeune larve est alimentée par des abeilles « nourrices ». Pendant environ 3 jours, elles vont nourrir les larves avec une sécrétion issue de glandes situées dans leur tête (appelée « bouillie larvaire »). Puis la larve est nourrie avec du miel et un peu de pollen.

Pour l'élevage *in vitro*, on prépare des aliments composés de 50 % de gelée royale fraîche (achetée à un producteur de gelée royale français) et de 50 % d'une solution sucrée (glucose, fructose) enrichie en extrait de levure (par exemple : 3 g de gelée royale + 3 g de solution). La composition de la solution sucrée évolue en fonction du stade de l'abeille. Nous les avons nommés, aliments A, B et C et leur composition est détaillée dans le **Tableau 1**. La part de gelée royale dans les trois aliments reste à 50 %, seules les proportions de sucres et d'extrait de levure augmentent pour élever le taux de matière sèche, reproduisant ainsi l'aliment qui est donné dans la ruche. Bien que la gelée royale soit présente tout au long de l'alimentation larvaire *in vitro*, les abeilles issues de l'élevage sont bien des ouvrières. D'autres paramètres (phéromones, quantités de gelée royale, tailles des alvéoles...) sont nécessaires pour obtenir des reines. Les aliments peuvent être préparés quelques jours avant utilisation et conservés à 5 °C.

Tableau 1. Composition des aliments larvaires

	Aliment A	Aliment B	Aliment C
Glucose (g)	1,2	1,5	1,8
Fructose (g)	1,2	1,5	1,8
Extrait de levure (g)	0,2	0,3	0,4
Eau osmosée qsp	10 mL	10 mL	10 mL

### Mode de distribution

La distribution des aliments est réalisée avec une micropipette distributrice. Elle permet de nourrir plusieurs larves à la suite, rapidement. Les aliments étant liquides mais denses, on utilise des pointes à orifice large (ou dont l'extrémité de la pointe est légèrement coupée). Le volume d'aliment dépend de l'âge de la larve (**Tableau 2**). Il



est donc identique entre les larves, quelle que soit la ruche utilisée et quelle que soit leur taille au moment de la distribution. Au total et sur toute la durée de l'élevage, chaque larve recevra 160  $\mu\text{L}$  d'aliment.

*Tableau 2. Volume d'aliments distribués par jour*

Jours	J1	J3	J4	J5	J6
Aliment	A	B	C	C	C
Volume par larve	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

## Prélèvement des larves (L1) et alimentation

### Greffage

Le jour de l'éclosion (J1) des jeunes larves, le cadre les contenant est ramené rapidement au laboratoire dans une cage de transport. On dépose 20  $\mu\text{L}$  d'aliment A dans chaque cupule (**Figure 7**). A l'aide d'un pinceau très fin (3/0 en poil de martre) les larves sont prélevées une à une (technique dite de **greffage**) et déposées sur l'aliment (une par cupule) (**Figure 8**). Cette opération, très technique, exige de s'entraîner auparavant, en effet la larve L1 est très fragile et sa manipulation brutale peut générer une surmortalité.

Après greffage, les plaques, sans couvercle, sont déposées dans le caisson K2SO4 à 90 %  $\pm$  5 % HR, dans l'étuve à 34,5  $^{\circ}\text{C} \pm 0,5$   $^{\circ}\text{C}$ . L'hygrométrie est élevée pour limiter l'évaporation et l'assèchement des aliments fournis. L'aliment est mis en excès dans la cupule le jour du greffage, de façon à ce qu'il ne soit pas nécessaire d'alimenter les larves à J2. Dans la ruche, à l'éclosion des larves l'aliment est également mis en excès.



*Figure 7. Dépôt de l'aliment A avant greffage (photo : INRA).*



*Figure 8. Prélèvement au pinceau de la larve (photo : INRA).*

### Alimentation des larves (J3 à J6)

La distribution de l'aliment a lieu une fois par jour, de J3 à J6, de préférence à heure fixe. L'aliment est préalablement préchauffé à 34  $^{\circ}\text{C}$  avant sa distribution. Pour ne pas noyer la larve, il est déposé sur le côté de la cupule (**Figure 9**).

Le temps de sortie des plaques hors de l'étuve doit être limité à 10 - 15 min maximum. Le planning de distribution ainsi que les volumes doivent être respectés, même si de l'aliment résiduel est présent dans la cupule. A la fin du stade larvaire, chaque larve a reçu au total 160  $\mu\text{L}$  d'aliment, qui, si la larve est viable, sera entièrement consommé avant son entrée en nymphose. Les individus morts doivent être régulièrement retirés avec leur cupule, leur présence pouvant générer le développement de moisissures. Pendant toute la phase larvaire, la larve n'excrète rien et la cupule n'est pas souillée par des défécations.



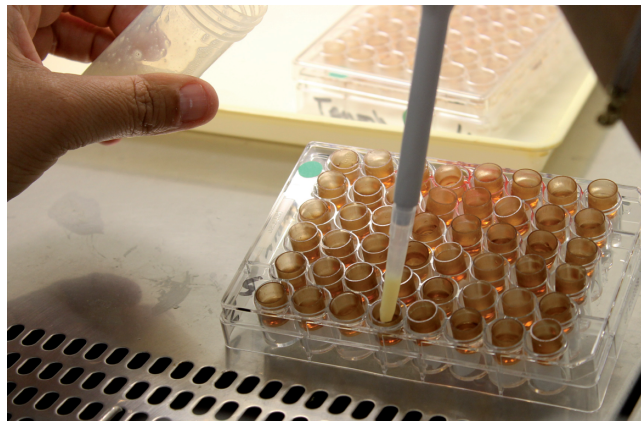


Figure 9. Distribution de l'aliment (photo : INRA).

### Nymphose (J7 à J17)

À partir de J7, les larves ne sont plus alimentées car elles entrent dans le processus de nymphose. La larve est alors appelée prénymphe, et sécrète une défécation qui peut être brunâtre, au fond de la cupule.

Pour éviter la sortie de la prénymphe de la cupule, les cotons préalablement placés sous chaque cupule sont retirés. En effet, la prénymphe peut se redresser pour sécréter par la bouche une soie d'opercule.

La plaque est alors transférée (J7 - 8) dans un caisson à NaCl (80 %  $\pm$  5 % HR) en étuve à 34,5 °C  $\pm$  0,5 °C. A ce stade, il ne doit plus rester d'aliment dans la cupule, la prénymphe ne pouvant se nymphoser que dans une cupule sèche. Elle conserve la forme de la larve durant 2-3 jours avant de se transformer en nymphe (J10 - 11). Ce stade est extrêmement fragile et toute manipulation est à éviter. Les plaques étant posées à l'horizontale dans le caisson, la larve peut se nymphoser la tête au fond de la cupule ou sur le « dos » (Figure 10). Ces positions ne sont pas du tout gênantes pour l'émergence des adultes (si la plaque n'a pas été « operculée »). Le fait de ne pas operculer la plaque, permet de contrôler l'évolution de la nymphose.

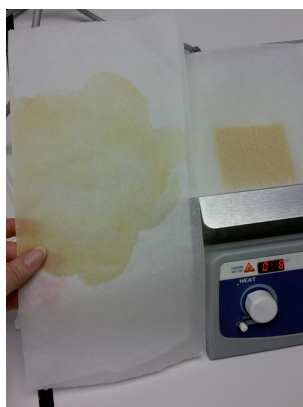


Figure 10. Prénymphe à J7 (photo : INRA).

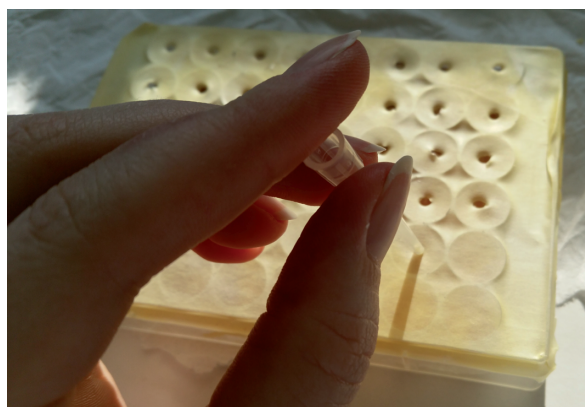
### Operculation des plaques (J7-J8)

La méthode permet de produire des adultes viables, mais la nymphose en position horizontale peut induire des malformations (abeille bossue si la nymphose se déroule sur le « dos » par exemple). Afin de limiter ce phénomène,

notamment pour l'obtention d'abeilles pouvant être réintroduites dans des ruches pour des études de comportement, une méthode d'operculation des plaques a été élaborée. Elle consiste à recouvrir la plaque d'un opercule de cire (J7-8), fabriqué à partir d'un morceau de cire gaufrée (5 x 5 cm). Placé entre deux feuilles de papier sulfurisé sur une plaque chauffante à 60 °C, il est étalé à la taille de la plaque à l'aide d'un rouleau à pâtisserie (**Figure 11**). Puis il est posé sur la plaque contenant les prénymphes. La cire étant non poreuse, il est indispensable de faire un petit trou au-dessus de chaque puits (avec un cône par exemple) pour permettre les échanges gazeux (**Figure 12**).



**Figure 11.** Fabrication d'un opercule de cire (photo : INRA).



**Figure 12.** Pose et perçage de l'opercule (photo : INRA).

## Emergence

### *Plaques non operculées*

Quelques jours avant l'émergence des adultes (J16 - 17), les plaques contenant les nymphes (**Figure 13**) sont transférées dans des boîtes d'élevage, préparées au laboratoire. Pour une bonne aération de la plaque, la boîte est percée de petits trous, et le couvercle peut être grillagé. Un abreuvoir à oiseaux contenant du sirop (saccharose à 50 % p/v) est placé sur le côté de la boîte. Si on veut maintenir l'élevage plusieurs jours après l'émergence (jusqu'à 2-3 semaines) il est préférable de donner aussi du pollen broyé. Il augmentera la survie des abeilles et permettra leur développement physiologique.

Les boîtes sont alors placées dans une étuve à  $34,5 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$  avec une hygrométrie de  $50 \% \pm 5 \% \text{ HR}$  jusqu'à émergence des adultes (**Figure 14**). Pour obtenir ce taux d'humidité, on peut mettre des bacs remplis d'eau dans le bas de l'étuve.



**Figure 13.** Nymphes à J15 (photo : INRA).







Figure 14. Boîte d'émergence plaque non operculée (photo : INRA).

### Plaques operculées

Après l'operculation des plaques (J7 - 8), celles-ci sont placées à la verticale à l'aide d'un ruban adhésif double face posé à l'arrière de la plaque. Cette position va permettre à chaque prénympe de se développer horizontalement pour l'émergence. Du sirop dans un abreuvoir est également placé quelques jours avant l'émergence. La boîte est placée dans l'étuve à  $34,5 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$  avec une hygrométrie de  $50 \% \pm 5 \% \text{ HR}$  (Figure 15). L'operculation des plaques entraîne une augmentation de la mortalité nymphale. En effet, alors que dans la ruche au moment de l'émergence, les abeilles vont aider les jeunes abeilles à émerger, dans ce dispositif, la jeune abeille est seule à franchir l'opercule, ce qui constitue un facteur de mortalité affectant les individus les plus faibles.



Figure 15. Emergence de plaque operculée (photo : INRA).

### Contrôle de la mortalité

Pendant toute la durée de l'élevage, les plaques sont régulièrement observées pour contrôler la mortalité, sous la loupe pendant la phase larvaire, au moment de la distribution de l'aliment, et pendant la nymphose (tous les 2-3 jours pour les plaques non operculées). Tous les individus morts sont retirés à chaque observation. Avec cette méthode d'élevage standardisée, le taux de mortalité à J8 est inférieur à 15 %, celui à J22 inférieur à 30 % (pour les plaques non operculées). Ces taux de mortalité sont comparables à ceux observés *in vivo*.



L'ensemble de la méthode est résumé dans la **Figure 16**.

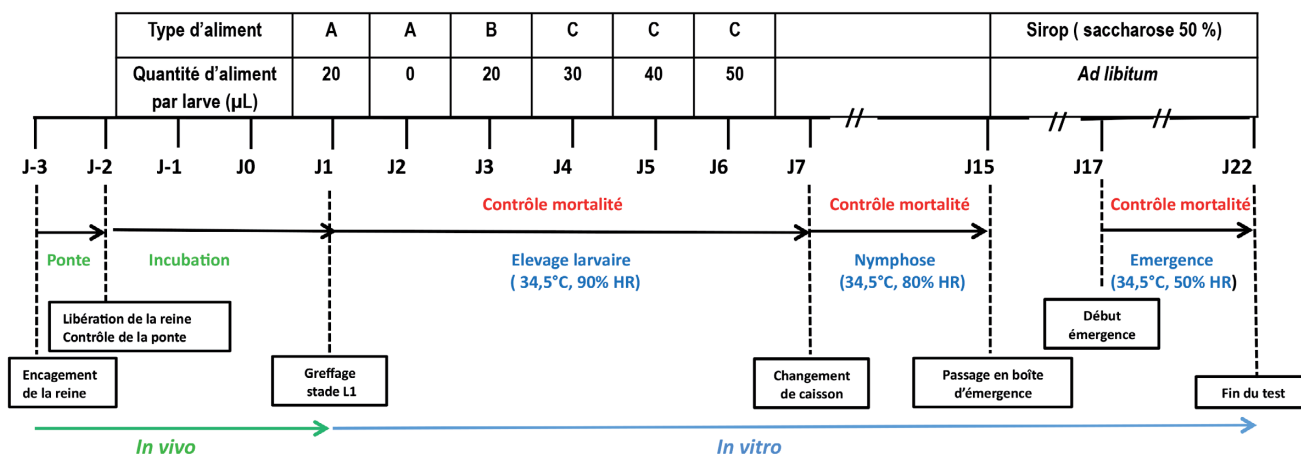


Figure 16. Schéma de l'élevage larvaire.

## Exemple de résultats : tests de molécules

Cette méthode de laboratoire permet de calculer la DL50 (dose létale 50), la DSEO (dose sans effet observé), sur larves, nymphes et adultes, après exposition au stade larvaire à une substance active. Plusieurs modes d'exposition sont possibles : en aigu à un jour défini (par exemple à J4), en chronique (de J1 à J6), en semi chronique (J3 à J6).

### Exemple d'une exposition aiguë des larves au diméthoate

Le diméthoate est un insecticide et acaricide à large spectre de la famille des organophosphorés, efficace contre de nombreuses espèces d'insectes. En France, cet insecticide est autorisé dans diverses spécialités commerciales pour plusieurs usages : traitement de légumes (asperges, carottes, chicorée) contre les mouches, de rosiers contre les acariens et pucerons. Il a été retiré du marché le 1<sup>er</sup> février 2016 pour le traitement des cerisiers.

Sur l'abeille domestique, la dose létale 50 (DL50) orale sur adulte est connue, elle est de 0,1 µg / abeille (source Agritox). La méthode d'élevage larvaire permet de calculer la DL50 sur 48 h sur larve après une exposition aiguë à J4.

#### Méthode

Le principe du test est d'exposer des larves à J4 à une gamme de cinq doses de diméthoate allant de 0,8 µg à 12,8 µg par larve (facteur 2 entre les doses). Concrètement les solutions d'insecticide sont ajoutées directement dans l'aliment et la méthode permet de comparer les mortalités 48 h après l'exposition, soit à J6.

#### Résultats

La mortalité sur la plaque témoin à J7 est inférieure à 10 % et respecte les critères de validité de la méthode. Les taux de mortalité obtenus après 48 h montrent qu'ils augmentent avec les doses de diméthoate. La relation dose/effet permet de calculer une DL50 (les doses sont exprimées en log). Pour le diméthoate, elle est de 1,8 µg/ larve (**Figure 17**). Dans le cadre d'un test, trois répétitions valides sont nécessaires pour confirmer le résultat.



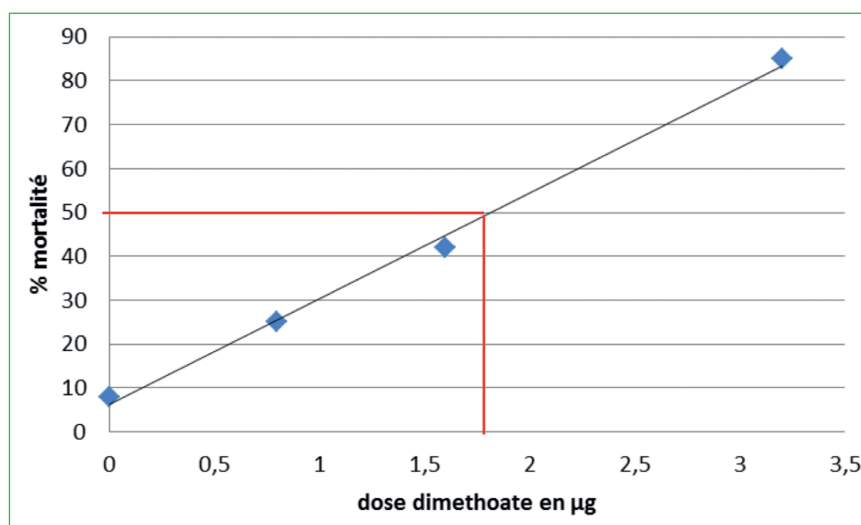


Figure 17. Calcul de la DL50 du diméthoate.

## Conclusion et perspectives

La mise au point de la méthode d'élevage larvaire (Aupinel et al., 2005) a démontré qu'il était possible d'obtenir des adultes issus d'un élevage *in vitro*. Comparée aux autres méthodes proposées, sa standardisation a démontré sa robustesse, sa fiabilité et sa reproductibilité. Elle permet aussi d'exposer les larves à plusieurs molécules en même temps et peut également être utilisée pour mesurer des effets de co exposition pathogène /molécules (par exemple : loque américaine /insecticide). La validation de la méthode en exposition aiguë a abouti à sa reconnaissance au niveau mondial en 2013 (OECD TG237). La ligne directrice validée par l'OCDE permet de tester une molécule en exposition aiguë et de calculer sa DL50 sur larve à 48 h. Désormais les nouvelles molécules pourront être soumises à ce test pour leur autorisation de mise sur le marché.

Depuis 2016, la méthode en mode d'exposition répétée (J3 à J6) a également été validée par l'OCDE (OECD, Guidance Document 239) sous la forme d'une « guidance » (recommandations). Elle permet de tester toute molécule du premier stade larvaire jusqu'à l'émergence des adultes (J22), avec deux molécules de référence, le diméthoate mais aussi un régulateur de croissance : le fenoxycarbe.

Cette méthode est également référencée dans le BEEBOOK (Coloss BEEBOOK 2013), un ouvrage recensant les méthodes standardisées de recherche sur abeille domestique ; elle est aujourd'hui largement utilisée par la communauté scientifique pour toute étude qui s'intéresse aux divers facteurs de stress sur le couvain (pathologie, température...). Utilisée au niveau international, sa mise au point a permis de mieux connaître les effets des pesticides sur le couvain. La surmortalité des abeilles constatée depuis plusieurs années par les apiculteurs met en cause les pesticides mais aussi les maladies connues chez les abeilles (bactéries, champignons, virus ...). En utilisant cet outil dans des conditions maîtrisées, des réponses complémentaires pourraient être apportées aux causes de cette surmortalité.

## Références bibliographiques

Aupinel P, Fortini D, Dufour H, Tasei J, Michaud B, Odoux J, Pham-Delègue M (2005) Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bull Insectol* **58** : 107-111.

Aupinel P, Medrzycki P, Fortini D, Michaud B, Tasei JN, Odoux JF (2007) A new larval *in vitro* rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. *Redia* **90** : 91-94.

- Clément H (2015). *Le traité Rustica de l'apiculture*. (Les traités Rustica) Rustica Editions. 560 p.
- Malone LA, Tregidga EL, Todd JH, Burgess E, Philip BA, Markwick NP, Poulton J, Christeller JT, Lester MT, Gatehouse HS (2002) Effects of ingestion of a biotin-binding protein on adult and larval honeybees. *Apidologie* **33** : 447-458.
- Oomen PA, De Ruijter A, Van der Steen J (1992) Method for honeybee brood feeding tests with insect growth-regulating insecticides. *Bull OEPP/EPPO* **22** : 613-616.
- Peng YSC, Mussen E, Fong A, Montague MA, Tyler T (1992) Effects of chlortetracycline on honey-bee worker larvae reared *in vitro*. *J Invertebr Pathol* **60** : 127-133.
- Vandenberg JD, Shimanuki H (1987) Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. *J Apic Res* **26** : 90-97.
- Weaver N (1955) Rearing of honeybee larvae on royal jelly in the laboratory. *Science* **121** : 509-510.
- OECD, 2013. Guideline for the Testing of Chemicals No. 237: Honey Bees (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure, Section 2: Effects on Biotic Systems, DOI: 10.1787/9789264203754-fr
- OECD (2016) Guidance Document on Honey Bee Larval Toxicity Test following Repeated Exposure, Series on Testing & Assessment No. 239.
- Coloss BEEBOOK (2013), volume II, Standard methods for *Apis mellifera* test and pathogen research, Edition IBRA.

