

ÉTUDE « IN VITRO » DE LA CROISSANCE DES LARVES D'ABEILLES (*APIS MELLIFICA* L.)

Isabelle PETIT

Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, Bures-sur-Yvette (Seine-et-Oise)

— — — — —

SOMMAIRE

L'auteur étudie la croissance des larves d'*Apis mellifica* L. *in vitro* en fonction de régimes alimentaires à base de gelée royale fraîche, totale ou délipidée, de miel et de pollen. Le travail a demandé la mise au point préalable d'une méthode d'élevage appropriée.

— — — — —

INTRODUCTION

Depuis que SCHIRACH (1770) a montré que les reines et les ouvrières peuvent se développer à partir de larves identiques, le processus de différenciation des castes a fait l'objet de nombreuses recherches. Devant les difficultés d'observation et d'expérimentation directe sur les larves, certains chercheurs ont essayé d'étudier la larve d'Abeille *in vitro*.

Ainsi, BERTHOLF (1927) a nourri des larves d'ouvrières de trois jours avec des solutions de sucre, dans une boîte de Pétri humidifiée. A l'étuve à 35°C, il a obtenu des survies de l'ordre de 1 à 2 jours. Aucune larve n'a atteint le stade de nymphe.

VELICH (1930) a élevé des larves d'ouvrières de 4 à 5 jours, dans une étuve, leur permettant de continuer leur développement sans aucune nourriture. En effet, à ce stade, les larves sont capables de se nymphoser sans s'alimenter davantage. Une technique similaire, employée par HAYDAK (1939) fut, elle aussi, couronnée de succès.

Les techniques de VON RHEIN (1933) ont été à la base de la plupart des méthodes d'élevage. Il étudia la différenciation en reines ou en ouvrières, en nourrissant des larves d'ouvrières d'âge variable, avec des aliments prélevés dans des cellules d'ouvrières ou de reines, ou même avec des mélanges de miel, de pollen et d'eau. Beaucoup de nymphes et peu d'adultes, allant de l'ouvrière parfaite à l'individu ressemblant à une reine, furent obtenus au moyen de ces nourritures.

En 1953 et 1954, le même auteur a distribué à plusieurs groupes de larves 100

à 200 mg de nourriture de larves d'ouvrières ou de gelée royale de jeunes larves de reines, ou encore de gelée royale provenant de cellules royales âgées, en plus d'un mélange de miel, de pollen et d'eau. Il en a conclu que la gelée royale des cellules royales âgées est la plus propre à servir de nourriture complémentaire. Ceci montre que la nourriture des larves d'ouvrières et celle de larves de reines sont qualitativement différentes.

Au cours de ces expériences, VON RHEIN a établi qu'il n'y avait aucun rapport entre la taille de l'adulte obtenu et ses caractères de castes ; en effet, il a pu produire des reines vraies dont le poids était en dessous de celui des ouvrières normales et, d'autre part, à partir de larves d'ouvrières abondamment pourvues de leur alimentation habituelle, des ouvrières géantes dont le poids atteignait presque celui d'une reine normale.

WEAVER (1955) réussit à élever plusieurs reines *in vitro*. Son premier essai fut réalisé à l'intérieur d'une ruche. Il fit éclore deux reines en greffant des larves âgées de 36 heures dans des cellules de reines dont on avait enlevé auparavant la larve nourrie normalement. Toutes les deux heures, les larves étaient transférées dans de nouvelles cellules dont les larves du même âge venaient d'être enlevées. Les cellules étaient disposées de telle sorte qu'aucun contact direct ne soit possible entre les nourrices et les larves.

Dans une autre expérience, les larves étaient élevées dans des tubes de verre, à l'étuve à 34°C avec une humidité relative de 75 p. 100 environ. De nouveau, il réussit à obtenir deux reines. Mais il constata que la gelée royale prélevée dans une ruche et conservée au réfrigérateur à 5°C pendant deux semaines ou plus, ne permet d'obtenir que des formes intermédiaires ou des ouvrières. Ceci l'amena à penser que la gelée royale conservée tend à perdre certains constituants essentiels pour la différenciation des castes.

MICHAEL et ABRAMOVITZ (1955) mirent au point une méthode d'élevage des larves *in vitro*, intéressante pour les inoculations de maladies. Un tampon de coton absorbant placé dans une boîte de Pétri, est recouvert d'un grillage de matière plastique. Une solution nutritive à 25 p. 100 de miel et 10 p. 100 d'extrait de levure déshydratée, est versée dans la boîte de Pétri jusqu'au niveau de la grille. Des larves âgées de trois jours sont déposées sur la grille et peuvent se nourrir entre les mailles. A la fin de la période de nourrissage, les larves sont transportées dans des boîtes de Pétri ayant un fond de cire gaufrée. Là, elles se transforment en nymphes, puis en adultes. Un tampon de coton humide est mis dans chaque boîte pour maintenir l'hygrométrie appropriée. Des ouvrières ont été obtenues.

Une technique légèrement différente fut employée par HOFFMANN (1956). Elle prélevait à la pipette la nourriture normale de l'ouvrière et la conservait dans un réfrigérateur à 4 ou 5°C. De cette manière étaient conservées les sécrétions alimentaires données aux jeunes larves et la nourriture mixte des larves plus âgées. Des larves de 1 à 2 jours (2 à 5 mg) déposées dans des cupules de cire individuelles étaient alors placées dans une étuve à 35°C avec 100 p. 100 d'humidité relative et nourries à la pipette toutes les 4 ou 7 heures. Quand elles avaient un peu plus de trois jours, la nourriture mixte était substituée à la gelée royale. Après le tissage du cocon et l'excrétion, les larves étaient déposées sur une mousseline humide dans une boîte de Pétri. HOFFMANN réussit à obtenir 22,6 p. 100 de nymphes vivantes sur 1 973 larves élevées de cette façon.

SMITH (1959) mit au point une nouvelle méthode d'élevage pour tester divers échantillons de gelée royale fraîche ou conservée. Il travailla à 34,5°C et 96 p. 100 d'humidité. Des larves venant juste d'éclore étaient déposées à même la gelée royale contenue dans des petites boîtes de porcelaine de 18 mm de diamètre. Toutes les 24 heures, les larves étaient transportées sur de la nourriture fraîche. Quand des traces jaunâtres apparaissaient, il lavait les larves à l'eau tiède (34,5°C), puis les essuyait sur du papier-filtre avant de les mettre dans une boîte de Pétri au fond tapissé d'une plaque de cire gaufrée. Là, les larves terminaient leur développement puis subissaient la nymphose et la mue imaginale. Il a obtenu 262 adultes sur 1 063 larves dont 86 reines, 98 ouvrières et 78 intermédiaires.

Les travaux de SMITH peuvent être résumés sur le tableau 1.

TABLEAU I

Résumé des tests sur gelée royale en étuve mai 55-avril 57		
Catégorie	Nombre total	% par rapport aux larves
Larves.....	1 033	100
Fin de croissance	676	65,4
Nymphes	334	32,3
Adultes	262	25,4
Reines	86	8,3
Intermédiaires	78	7,6
Ouvrières	98	9,6

Les résultats de SMITH sont les meilleurs car supérieurs à ceux d'HOFFMANN qui n'obtenait que 22,6 p. 100 de nymphes. Ce succès est probablement dû au fait que les larves sont déposées directement sur la gelée royale et transposées chaque jour sur de la nourriture fraîche, contrairement à HOFFMANN qui nourrissait à la pipette des larves toujours contenues dans les mêmes cellules.

Cette revue des différentes recherches faites sur l'élevage des larves d'abeilles *in vitro*, montre combien ce sujet a passionné les chercheurs, mais le petit nombre de travaux couronnés de succès montre aussi combien les expériences sont délicates et difficiles, puisque les résultats de SMITH, qui pourtant sont de loin les meilleurs, ne donnent que 25 p. 100 de réussite.

Nous nous sommes intéressés à ces travaux sur l'élevage des larves d'abeilles, dans le but de découvrir quelles étaient les conditions expérimentales *in vitro* les meilleures pour la croissance larvaire. Nous avons négligé les répercussions de ces conditions sur le stade adulte, car nous nous sommes attachés à suivre uniquement la croissance des larves d'*Apis mellifica* suivant les régimes proposés.

Nous avons d'abord étudié les régimes alimentaires qui se rapprochaient le plus des conditions naturelles, à savoir la gelée royale et le miel, puis nous avons expérimenté avec des gélées royales traitées ou dégraissées, et avec des mélanges contenant d'autres protéines comme la caséine et le pollen.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le premier objectif dans l'élevage des larves d'abeilles au laboratoire est de mettre au point une technique satisfaisante pour obtenir des adultes à partir de larves, en contrôlant les conditions expérimentales. Des mesures préalables et des observations à l'intérieur des ruches servent de base à la technique d'élevage. Les résultats anciens, résumés dans le tableau 2, nous ont beaucoup aidé.

TABLEAU 2

Différents travaux sur l'élevage in vitro des larves d'Apis mellifica.

Auteurs	Age des larves utilisées	Nourriture et matériel	Conditions expérimentales	Résultats
BERTHOLF	3 j	Boîte de Pétri. Solution de sucre.	35°C 100 % IIR	Larves vivant 2 à 3 jours. Pas de nymphes
VELICH	4 à 5 j	Pas de nourriture.	34°C	Ouvrières
VON RHEIN	2 à 4 j	Différents régimes. Boîte de Pétri ou cages de Hansen.	33 à 35°C	Ouvrières
WEAVER	36 h	Tubes en verre. G. R. conservée à 5°C pendant 15 jours.	34°C 75 % IIR	2 reines Ouvrières
MICHAEL et ABRA-MOVITZ	3 j	Boîte de Pétri + grillage + coton absorbant. Solution 25 % miel et 10 % extrait levure déshydratée.	34°C 100 % IIR	Ouvrières
HOFFMANN	1 à 2 j	G. R. conservée à 4° ou 5°C, puis nourriture mixte. Cupules de cire individuelles. Nourriture toutes les 3 h.	35°C 100 % IIR	22,6 % nymphes
SMITH	0 à 24 h	Boîte de porcelaine. G. R. fraîche ou conservée. Transtert toutes les 24 h.	34,5°C 96 % HR	32,3 % nymphes 25,4 % adultes

1°) Importance de l'humidité

Dans la ruche, les nourrices apportent constamment de la nourriture fraîche dans les cellules et maintiennent ainsi l'humidité de la nourriture des larves. Comme il est impossible de nourrir aussi fréquemment les larves dans les conditions expérimentales, il a fallu réaliser un milieu saturé de vapeur d'eau dans lequel la nourriture ne se desséchait pas (la gelée royale en particulier perd très facilement son eau). Nous aurions pu utiliser un tampon de coton hydrophile humide mais nous avons préféré l'emploi de la vermiculite, substance imputrescible.

La vermiculite est déposée au fond d'une boîte de Pétri de 115 mm de diamètre, et nous versons de l'eau de telle manière qu'elle soit totalement absorbée par la vermiculite. Dans la boîte de Pétri

ainsi préparée, l'air est saturé d'humidité. Celle-ci semble nécessaire au développement des larves, comme le montre l'expérience suivante qui porte sur 15 larves pour chaque lot, toutes les larves recevant la même nourriture, composée de gelée royale diluée dans de l'eau distillée.

TABLEAU 3

Conditions expérimentales			Durée de la vie des larves	
Boîte de Pétri.....	couvercle	vermiculite	eau	6 jours
Boîte de Pétri.....	pas de couvercle	vermiculite	eau	0
Boîte de Pétri.....	pas de couvercle	vermiculite	pas d'eau	0

Compte tenu de ces observations, toutes les expériences ont été faites dans des boîtes de Pétri fermées, avec un fond de vermiculite saturée d'eau.

2°) Importance de la température

Le tableau 2 qui résume les conditions expérimentales dans lesquelles ont été faites jusqu'ici les recherches sur l'élevage *in vitro* des larves d'abeilles, montre que la température choisie par les différents auteurs oscille entre 33° et 35°C. MILUM (1930) a étudié l'influence de la température sur la durée du développement larvaire et a constaté qu'à 31°C, la durée du développement était maxima, et qu'à une température variant de 33,5°C. et 34°C, 93,5 p. 100 des adultes se développaient en moins de 21 jours. Tenant compte de ces études, nous avons adopté la température de 34°C pour nos expériences.

3°) Technique d'élevage des larves

Au cours de nos expériences, des larves de tous les âges ont été utilisées, mais les larves de 0 à 24 heures ont été employées de préférence. Nous reconnaissons ces larves au fait qu'elles sont très petites, non encore enroulées, et le plus souvent voisines d'œufs non encore éclos. Pour déterminer l'âge des larves plus âgées, nous avons recours au travail de MYSER (1954) qui permet de déterminer l'âge de la larve grâce à la position et à la forme des bourgeons alaires.

Les larves sont disposées sur quelques gouttes de nourriture au fond d'une cupule de 9 mm de diamètre, creusée dans une plaque de cire. Ces plaques ne comportent que 2 ou 3 cupules, car lorsque nous dessinons les larves à la chambre claire, il importe de ne pas les faire séjourner trop longtemps hors de leurs conditions optimales d'élevage.

Nos cupules de cire ont un diamètre sensiblement égal à celui d'une cellule d'ouvrière, et la larve se retrouve donc dans son milieu habituel. Cette méthode avait été employée par HOFFMANN (1956) qui utilisait des cupules de cire individuelles.

Les plaques de cire sont déposées dans une boîte de Pétri, au-dessus d'une couche de vermiculite saturée d'eau, à raison de 6 par boîte.

Ainsi, au cours de chaque expérience, nous étudions la croissance de 18 larves, d'âge sensiblement identique, soumises au même régime alimentaire et aux mêmes conditions expérimentales.

Les boîtes de Pétri sont placées dans une étuve, à la température constante de 34°C, où nous les empilons les unes sur les autres de manière à avoir exactement la même température pour l'ensemble des expériences.

Toutes les 24 heures, les larves sont transférées dans de nouvelles boîtes contenant des cupules de cire propres avec de la nourriture fraîche. La nourriture est placée dans l'étuve à 34°C, 30 à 60 mn avant le transfert, afin d'être à la même température que les larves transférées, les nourritures larvaires étant conservées, au cours des expériences, dans un réfrigérateur à 5°C. Les larves sont alors transférées avec une aiguille de greffage lorsqu'elles sont jeunes, ou avec des pinces souples lorsqu'elles sont plus âgées.

Lors de ces transferts, nous avons pris soin de replacer les larves dans leur position primitive car des expériences de SMITH (1959) ont montré que des larves retournées 4 fois par jour présentaient une mortalité beaucoup plus grande que celle des larves transposées aussi souvent, mais sans être retournées.

Ces manipulations sont faites le matin de préférence. N'ayant observé ni dessèchement ni pénurie, nous avons pensé que la quantité de nourriture déposée à la pipette était suffisante pour les 24 heures. Les mortalités sont notées au cours de ces transferts.

4°) Mesure de la croissance des larves

Pour mesurer la croissance des larves, nous avons adopté une méthode qui consiste à dessiner chaque jour à la chambre claire, la silhouette des larves couchées dans leur position normale, c'est-à-dire de profil.

Nous n'avons pas pu adopter la méthode de SMITH (1959), car chaque jour il aurait fallu laver, essuyer et peser chaque larve, opérations qui, répétées quotidiennement, influent sur la croissance de la larve d'une manière fâcheuse.

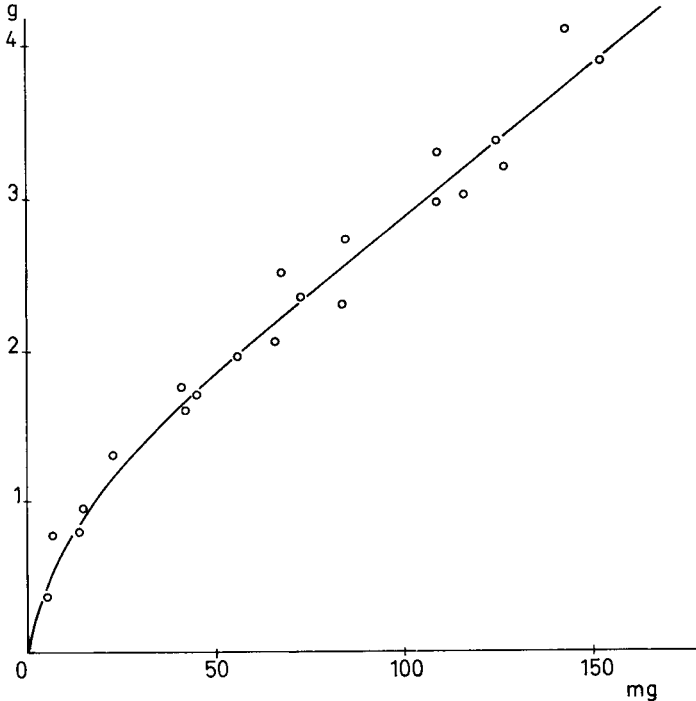


FIG. 1. — Mise en évidence d'un rapport constant entre le poids de la larve (en abscisses) et le poids du bristol représentant la surface de cette même larve (en ordonnées)

Après avoir calculé le grossissement ($17\times$) de notre chambre claire, nous avons vérifié expérimentalement la relation théorique qui existe entre le poids du bristol représentant la surface de la larve et le poids de la larve elle-même. En effet, les différents dessins d'une larve, en fonction de son âge, rendent compte de sa croissance dans deux dimensions, tandis que la croissance se fait dans les trois dimensions.

Pour cette vérification, nous avons donc pris dans une ruche une vingtaine de larves, d'âges différents. Après les avoir soigneusement essuyées sur un papier-filtre, afin d'éliminer le plus possible les causes d'erreur dues à des restes de nourriture autour de la larve, nous les avons pesées une par une au $1/10^{\circ}$ de milligramme près. Puis nous les avons dessinées à la chambre claire. Après découpage, chaque bristol a été pesé au centigramme près. Nous avons obtenu ainsi les deux valeurs qui nous intéressaient.

Sur un graphique, nous avons porté en abscisses le poids des larves et en ordonnées le poids des bristol représentant la surface des mêmes larves. Les points obtenus se placent selon une courbe régulière, ce qui prouve qu'il existe un rapport constant entre le poids et la surface de la silhouette du profil d'une larve (fig. 1).

Par cette méthode, nous obtenons le poids de la larve avec une erreur inférieure à ± 5 mg.

La courbe obtenue présente aussi un autre intérêt : à partir du poids du bristol représentant la surface d'une larve, elle nous permet de déterminer le poids de cette larve, et de là son âge. VON RHEIN (1933) indique en effet que le changement de nourriture pour les larves d'ouvrières survient lorsqu'elles pèsent environ 35 mg. Les larves sont alors âgées de 3 j 1/4.

Nous nous sommes demandés si le fait de dessiner les larves sous la chambre claire de Nachet n'était pas une cause de mortalité plus grande. Nous avons donc élevé des larves sur la même nourriture, soit un mélange de gelée royale et de miel à 50 p. 100, mélange qui, comme nous le verrons ultérieurement, permet une longévité plus grande puisque certaines larves se nourrissent pendant plus de 10 jours (normalement 5 jours de nourrissage dans une ruche). Parmi ces larves, un premier lot était dessiné sous la chambre claire tandis que le second, ou lot témoin, ne l'était pas.

Les résultats obtenus montrent que la mortalité est identique pour les deux lots. Le passage sous la chambre claire n'est donc pas une cause de mortalité plus importante.

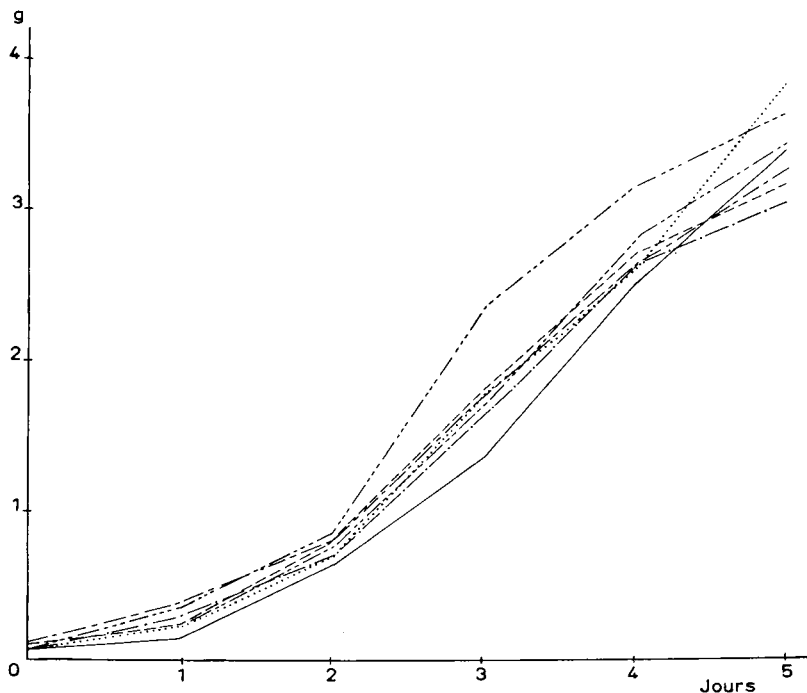


FIG. 2. — Comparaison des courbes de croissance de plusieurs larves élevées sur la même nourriture. En abscisses le nombre de jours à partir du prélèvement ; en ordonnées, l'indice de croissance

L'ensemble des 18 larves n'atteint pas le stade de la nymphose ; certaines meurent au cours de l'expérience. Ceci nous permet de mettre en évidence deux phénomènes :

- la mortalité : rapport du nombre de nymphes ou d'adultes au nombre initial de larves ;
- la croissance : courbe représentant l'évolution du poids de la larve en fonction du temps.

Il est évident que seules sont utilisées les courbes de croissance des larves ayant atteint le stade de nymphes ou d'imagos.

Si nous portons sur un même graphique plusieurs de ces courbes (fig. 2), nous constatons que celles-ci sont presque identiques et que la dispersion des résultats est faible. Nous pouvons donc adopter l'une quelconque de ces courbes pour représenter l'expérience.

5°) Nymphes et adultes

Le but que nous nous proposons est d'étudier la croissance larvaire qui dure 5 jours au plus. La larve subit alors la nymphose et nous avons suivi le développement nymphal et l'éclosion de l'adulte grâce à la méthode suivante :

a) Afin de recréer les conditions de confinement de la larve sous l'opercule, des tubes à hémolyse ont été coupés jusqu'à 2 à 3 cm. Nous avons fermé ces tubes par un bouchon de coton hydrophile assez serré et nous les avons introduits à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn, afin de les stériliser pour éviter tout danger de mycoses, fréquentes chez les larves.

b) Après préparation des tubes, nous avons pris les larves une par une ; nous les avons plongées quelques secondes dans une solution aqueuse de propolis à 2 p. 100, à la température de l'étuve. SMITH lavait les larves dans de l'eau tiède, nous avons simplement ajouté 2 p. 100 de propolis, substance antibiotique de la ruche (LAVIE 1960). Après lavage, les larves étaient essuyées doucement sur un papier-filtre avant d'être déposées individuellement au fond du tube de verre. Le tube contenant une larve était alors fermé par son bouchon de coton autoclavé. Au moyen d'une pipette, ce coton est humidifié avec de l'eau distillée, afin de maintenir une faible humidité à l'intérieur du tube.

Tous les jours, chaque tube était examiné pour noter le développement de la larve, sa transformation en nymphe, puis la pigmentation de la nymphe, et enfin la mue imaginale.

Certaines de ces abeilles écloses ont été mises en cagette avec d'autres abeilles du même âge, nées en ruche, car les conditions de survie des abeilles sont améliorées lorsqu'elles sont encagées avec d'autres congénères. Pour les distinguer des abeilles nées normalement dans la ruche, nos abeilles ont été marquées avec de la peinture blanche sur le thorax, ceci pour observer leur comportement, leur durée de vie, leur aspect morphologique, etc.

PRINCIPAUX RÉSULTATS

Nous nous sommes attachés à suivre la croissance des larves d'*Apis mellifica*, suivant des types de régimes différents, en tenant compte du taux de mortalité afférent à chacun.

Les régimes alimentaires utilisés ont été les suivants :

- 1) gelée royale pure ou diluée avec de l'eau distillée ;
- 2) miel pur ;
- 3) mélanges de gelée royale et de miel à des pourcentages variant de 0 p. 100 à 100 p. 100 ;
- 4) miel et pollen avec ou sans gelée royale ;
- 5) gelée royale dégraissée par l'acétone avec ou sans miel ;
- 6) gelée royale dégraissée par l'acétone et le benzène avec ou sans miel ;
- 7) gelée royale dégraissée par l'acétone et l'éther avec miel ;
- 8) gelée royale dégraissée par l'alcool bouillant, avec ou sans miel ;
- 9) gelée royale lyophilisée avec miel ;
- 10) caséine vitaminée et miel avec ou sans gelée royale.

Pour toutes ces expériences, nous avons utilisé des larves de 0 à 24 heures et parfois des larves de 1 à 2 jours, afin de contrôler la croissance de larves plus âgées en début d'expérience.

A. — CROISSANCE

1° Gelée royale pure ou diluée

Dans les conditions naturelles à l'intérieur d'une ruche, toutes les larves de moins de 3 jours sont nourries avec de la gelée royale. Ensuite, les larves royales continuent à être nourries avec la gelée royale tandis que les larves d'ouvrières reçoivent une nourriture moins riche composée de gelée royale, de nectar et d'une quantité variable de pollen.

Nous avons constaté que les larves nourries avec de la gelée royale diluée (10 p. 100 d'eau distillée) grossissaient mieux que celles élevées avec de la gelée royale pure.

2^o) Miel

Nous avons constaté que la croissance est impossible sur une telle nourriture car celle-ci fermente.

L'addition de quelques traces de gelée royale supprime la fermentation, mais ne permet toujours pas le développement des larves.

3^o Mélanges de gelée royale et de miel

Sachant que la gelée royale donne de meilleurs résultats à l'état dilué, alors que le miel, très hygroscopique, se dilue dans des proportions considérables, nous avons pensé qu'un mélange de ces deux substances donnerait une nourriture larvaire de consistance adéquate.

Les larves ont été nourries avec des mélanges dont on a fait varier le pourcentage en gelée royale. Les résultats obtenus ont été portés sur les figures 3 et 4.

Les courbes se répartissent en un véritable éventail ce qui montre clairement que la croissance est d'autant plus rapide que la quantité de gelée royale contenue dans le mélange est plus grande, et ceci jusqu'à 80 p. 100. Pour les mélanges contenant plus de 80 p. 100 de gelée royale, la croissance est légèrement plus faible. Si nous comparons la courbe obtenue avec la gelée royale à 100 p. 100, aux résultats des expériences faites avec les gélées royales pures ou diluées, nous constatons que la croissance des larves est la même. Nous avons là, une fois encore, la confirmation que la gelée royale diluée est plus assimilable par les larves d'ouvrières qu'elle ne l'est à l'état pur.

On peut résumer ces résultats de la manière suivante : on porte sur un graphique, en fonction du pourcentage de gelée royale du mélange, la vitesse moyenne de la croissance, obtenue en mesurant la pente des courbes de croissance entre leurs points extrêmes. On obtient la figure 4 qui laisse paraître un maximum net pour le mélange à 80 p. 100 de gelée royale.

Compte tenu de ces observations, la courbe de croissance des larves nourries avec le mélange à 80 p. 100 de gelée royale dans le miel a été prise comme référence pour toutes nos expériences.

4^o) Miel et pollen avec ou sans gelée royale

Avec 90 p. 100 de miel et 10 p. 100 de pollen, le développement des larves est très difficile par suite d'une dilution due à l'hygroscopie et suivie de fermentation. L'addition de 10 p. 100 de gelée royale au mélange supprime la fermentation grâce à l'apport d'antibiotiques mais le développement reste toujours très faible.

5^o) Gelée royale dégraissée par l'acétone

Traitement :

Une petite quantité de gelée royale est épuisée à froid par une grande quantité d'acétone. La partie insoluble est de nouveau traitée par l'acétone, et ceci plusieurs

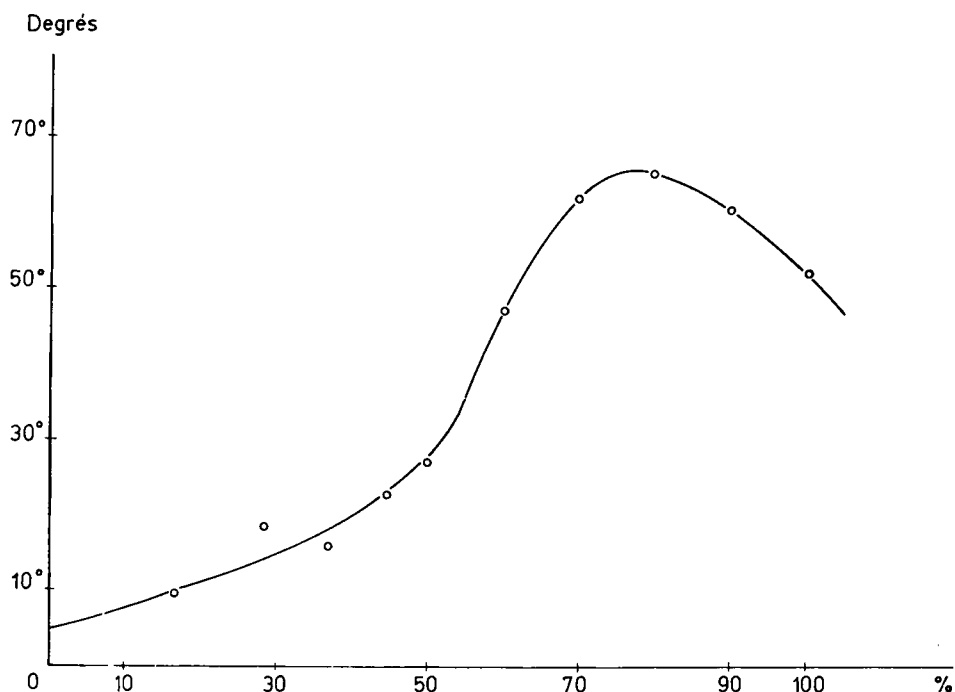


FIG. 3. — Courbe des valeurs maxima de la croissance en fonction du pourcentage de gelée royale dans le miel. En abscisses, pourcentage de gelée royale dans le miel; en ordonnées, pente des courbes de croissance

fois de suite afin que les cénapses lipo-protidiques soient entièrement détruites. Quand le liquide surnageant est limpide, le précipité est séché. On obtient une fine poudre blanche qui est reprise par l'eau (66 p. 100 de son poids) afin d'avoir une pâte homogène.

Nous avons alors une gelée royale partiellement délipidée dans laquelle est éliminé en grande partie l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque, antibiotique de la gelée royale, dont les propriétés bactériostatiques et antibiotiques ont été mises en évidence par MAC CLESKEY et MELAMPY (1939) et LAVIE (1960).

Expériences :

a) *Mélange à 30 p. 100 de gelée royale dégraissée dans le miel.* — La croissance des larves reste très faible, comme elle l'était pour le même mélange non traité.

b) *Mélange à 50 p. 100 de gelée royale dégraissée dans le miel.* — Le développement des larves nourries avec ce mélange est identique à celui des larves nourries avec ce même mélange non dégraissé, mais reste très inférieur à celui des larves élevées sur le mélange témoin (fig. 5).

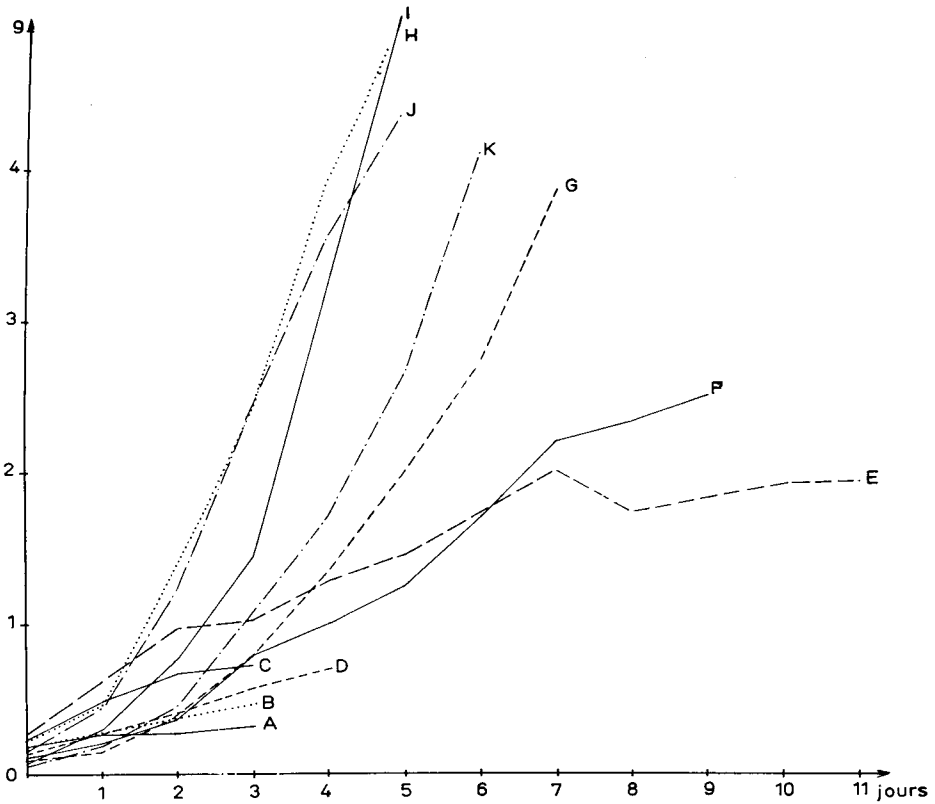


FIG. 4. — Croissance des larves en fonction du pourcentage de gelée royale dans le miel.

A	=	miel pur				
B	=	mélange contenant 16 p. cent de gelée royale				
C	=	— — — — — 28	—	—	—	—
D	=	— — — — — 37,5	—	—	—	—
E	=	— — — — — 44,5	—	—	—	—
F	=	— — — — — 50	—	—	—	—
G	=	— — — — — 60	—	—	—	—
H	=	— — — — — 70	—	—	—	—
I	=	— — — — — 80	—	—	—	—
J	=	— — — — — 90	—	—	—	—
K	=	Gelée royale pure.				

c) *Mélange à 80 p. 100 de gelée royale dégraissée dans le miel.* — Cette expérience a été faite avec deux lots de larves : larves de 0 à 24 heures, larves de 1 à 2 jours.

La croissance des larves élevées sur le mélange expérimental à 80 p. 100 de gelée royale délipidée, dans le miel, est plus importante que celle des larves élevées sur le mélange témoin à 80 p. 100 de gelée royale non traitée (fig. 6).

Un certain nombre de larves ont atteint un développement suffisant pour être mises en tubes : certaines ont subi la nymphose et, parmi elles, nous avons obtenu quelques adultes.

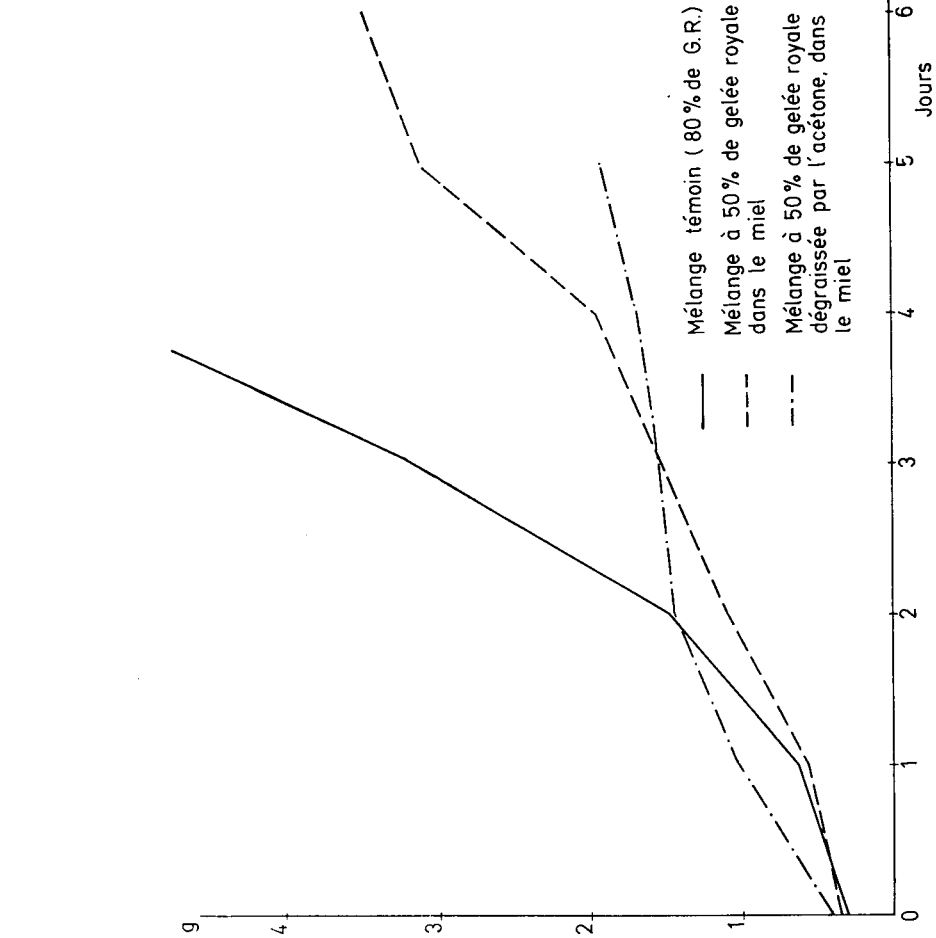


FIG. 5. — Croissance des larves élevées sur un mélange à 50 p. 100 de gelée royale déshydratée par l'acétone dans le miel. En abscisses, nombre de jours à partir du prélèvement ; en ordonnées, indice de croissance.

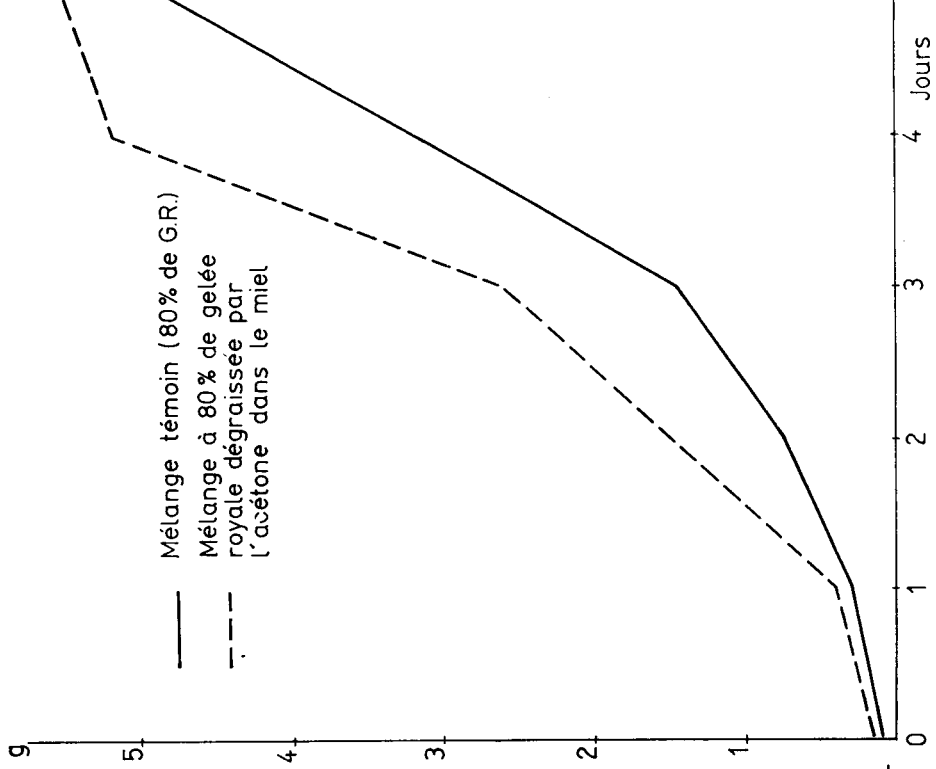


FIG. 6. — Croissance des larves élevées sur un mélange à 80 p. 100 de gelée royale déshydratée par l'acétone, dans le miel. En abscisses, nombre de jours à partir du prélèvement ; en ordonnées, indice de croissance (poids au Bristol).

6°) *Gelée royale dégraissée par l'acétone et le benzène**Traitement :*

La gelée royale est traitée par l'acétone suivant la méthode décrite précédemment, et la poudre blanche obtenue est à son tour traitée par un grand excès de benzène, à chaud et à reflux. Le précipité est filtré et séché. Pour l'utilisation, on reprend cette poudre avec de l'eau distillée (66 p. 100 de son poids), afin d'avoir une pâte homogène.

Expériences :

Cette gelée royale traitée, donnée à l'état pur, ne permet pas le développement des larves. Aucune observation n'est possible concernant la croissance.

7°) *Gelée royale dégraissée par l'acétone et l'éther**Traitement :*

Une petite quantité de gelée royale est traitée par une grande quantité d'acétone, suivant la même technique que précédemment. La poudre blanche obtenue est épuisée par l'éther de la manière suivante :

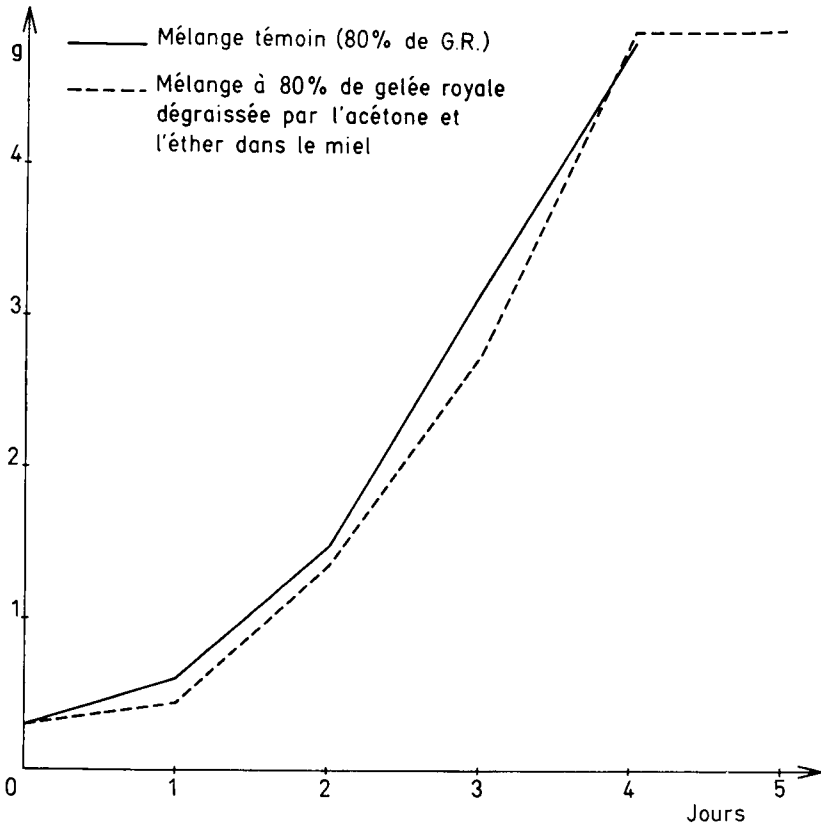


FIG. 7. — Croissance des larves élevées sur un mélange à 80 p. 100 de gelée royale dégraissée par l'acétone et l'éther dans le miel.

On réalise une colonne à lixiviation, dans laquelle on introduit la poudre de gelée royale déjà délipidée par l'acétone. L'éther traverse lentement la colonne de poudre de gelée royale dégraissée et dissout les lipides non solubles dans l'acétone. L'éther tombant goutte à goutte de la partie inférieure de la colonne, est recueilli par un bécher. On laisse évaporer. Pendant les premières heures, après évaporation, on trouve un léger résidu au fond du bécher. On continue à verser de l'éther jusqu'au moment où il n'y a plus aucune trace de substance soluble. La poudre obtenue est reprise par de l'eau distillée (66 p. 100 de son poids) avant de servir aux expériences.

Expériences :

La gelée royale traitée par l'acétone et l'éther a été donnée à des larves de 0 à 24 heures, mélangée à 20 p. 100 de miel.

La croissance des larves élevées sur le mélange expérimental à 80 p. 100 de gelée royale délipidée, dans le miel, est sensiblement identique à celle des larves élevées sur le mélange contenant 80 p. 100 de gelée royale non traitée dans le miel (fig. 7).

Nous avons obtenu un certain nombre de larves ayant terminé leur développement larvaire et qui ont été mises en tube. Quelques-unes ont subi la nymphose, mais nous n'avons pas obtenu d'adultes, les nymphes étaient mortes un ou deux jours seulement avant l'éclosion, alors qu'elles étaient déjà bien pigmentées. Il semble qu'elles n'aient pas pu effectuer la dernière mue.

8°) *Gelée royale dégraissée par l'alcool bouillant*

Traitement :

On fait bouillir, au reflux, une petite quantité de gelée royale dans une grande quantité d'alcool, et ceci trois fois de suite. La poudre obtenue est utilisée après avoir été reprise par de l'eau distillée (66 p. 100 de son poids).

Expériences :

Les expériences faites en utilisant cette gelée royale traitée n'ont donné aucun résultat, les larves étant mortes le lendemain.

9°) *Gelée royale lyophilisée*

La gelée royale lyophilisée a été utilisée en lui ajoutant 20 p. 100 de miel. L'expérience a été faite avec des larves de 0 à 24 heures.

La croissance des larves élevées sur le mélange à 80 p. 100 de gelée royale lyophilisée dans le miel, est sensiblement la même que celle des larves élevées sur le mélange témoin, bien que toujours un peu inférieure (fig. 8).

Un certain nombre de larves ont terminé leur développement larvaire et ont été mises en tube. Parmi elles, nous avons obtenu des nymphes qui ont donné des adultes.

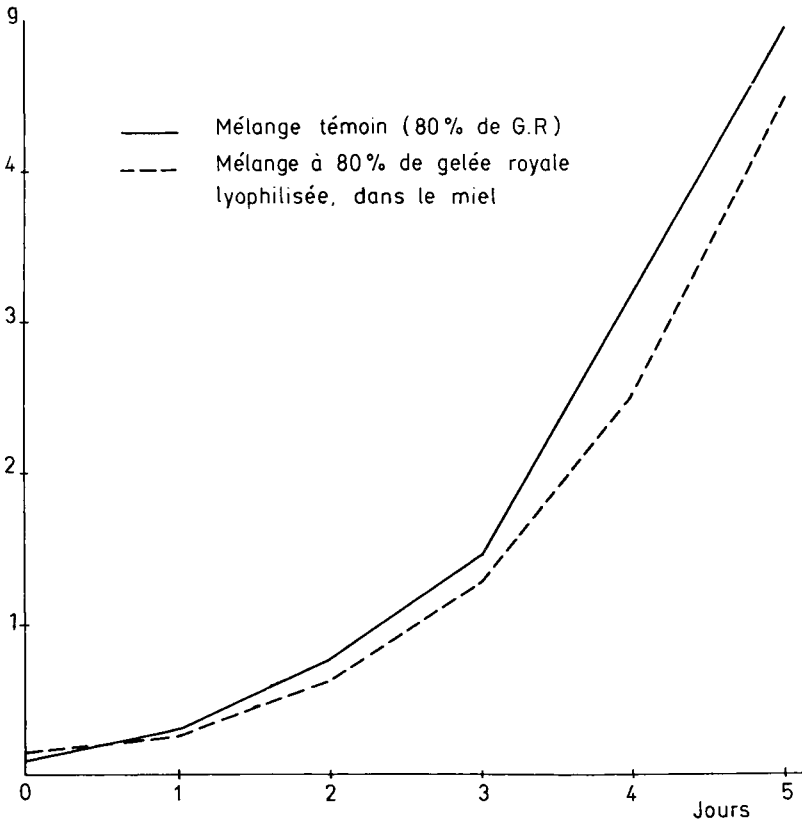


FIG. 8. — Croissance des larves élevées sur un mélange à 80 p. 100 de gelée royale lyophilisée dans le miel

10^o) Expériences sur la caséine

Les expériences sur les gelées royales dégraissées par l'acétone ou par l'acétone et l'éther, ayant donné des résultats intéressants, avec obtention de quelques adultes, nous nous sommes demandés si un mélange synthétique de protéines et de sucres ne permettrait pas le développement larvaire. La protéine généralement utilisée dans les régimes synthétiques étant la caséine, c'est à cette protéine que nous avons eu recours. Pour ne pas faire entrer en jeu de trop nombreux facteurs, nous avons utilisé une caséine vitaminée, bien que, nous le verrons dans une expérience ultérieure, les vitamines n'entrent pas en ligne de compte.

Préparation de la caséine.

La caséine utilisée se présente sous la forme d'une poudre. Nous ajoutons de l'eau distillée, qui est très rapidement absorbée par la caséine, jusqu'à obtention d'une pâte. Remarquons cependant que cette pâte n'est pas homogène, les grains de caséine gonflant dans l'eau mais restant indépendants.

Expériences.

Nous avons constaté qu'un mélange de caséine et de miel ne permet pas le développement larvaire et que cette nourriture fermente. Afin de limiter cette fermentation, nous avons ajouté 10 p. 100 de gelée royale, mais la croissance des larves est restée très faible.

Afin de préciser l'action de la caséine sur le développement des larves, nous avons fait plusieurs séries d'expériences en utilisant comme nourriture des mélanges à 50 p. 100 et 20 p. 100 de caséine, vitaminée ou non, dans la gelée royale. Les résultats sont portés sur la figure 9. La croissance semble peu perturbée, mais le développement reste incomplet.

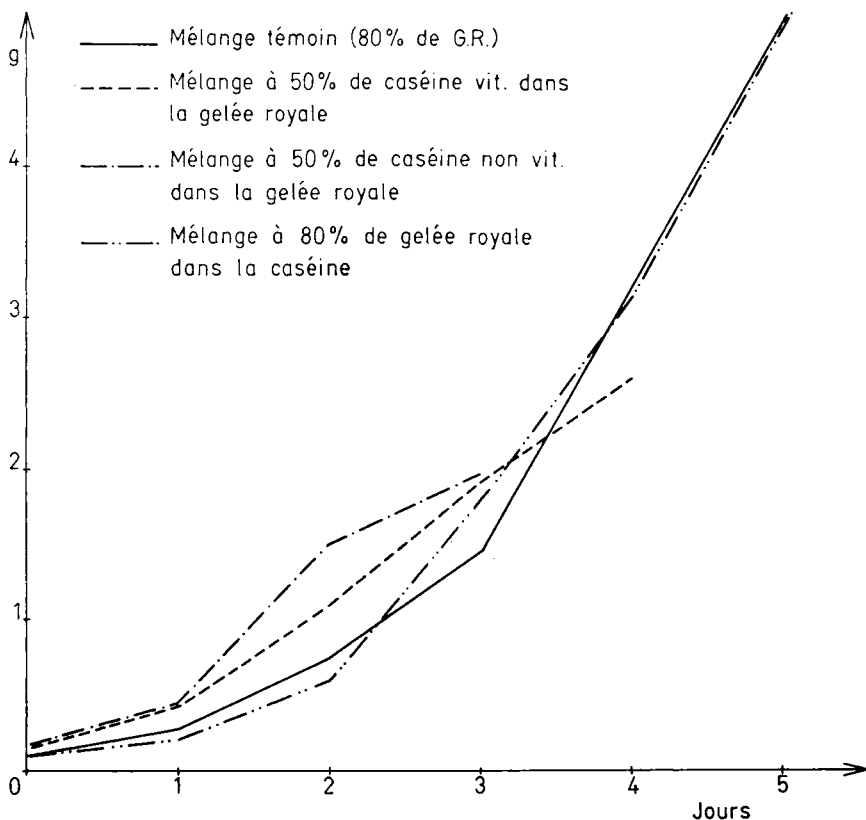


FIG. 9. — Croissance des larves élevées sur des mélanges à 50 p. 100 et 80 p. 100 de gelée royale dans la caséine

B. — MORTALITÉ, NYMPHOSE ET IMAGO

Les expériences réalisées avec :

- le miel pur,
- le miel et le pollen,
- la gelée royale dégraissée par l'acétone et le benzène,
- la gelée royale dégraissée par l'alcool bouillant,
- la caséine et le miel,

n'ont donné aucun résultat, car les larves mouraient rapidement, dans les trois premiers jours. Il y avait donc un taux de mortalité de 100 p. 100.

Les autres expériences ont permis aux larves de se développer. Les résultats (proportions de nymphes et d'adultes obtenus) sont résumés dans le tableau 4.

TABLEAU 4

	Expériences de SMITH	Mélange à 80 % de gelée royale et 20 % de miel	Mélange à 80 % de gelée royale dégraissée par l'acétone et 20 % de miel	Mélange à 80 % de gelée royale dégraissée par l'acétone, l'éther et 20 % de miel	Mélange à 80 % de gelée royale lyophilisée et 20 % de miel	Caséine 20 % . Gelée royale 80%
N° de l'expérience . . .		3	5	7	9	10 %
Larves ayant terminé leur croissance . . .	65,4 %	51 %	64,7 %	64,7 %	50 %	27,7 %
Nymphes	32,3 %	23,4 %	29,3 %	17,6 %	11 %	5,5 %
Adultes	25,4 %	11 %	17,6 %	0	11 %	0

CONCLUSIONS

De cette série d'expériences, il ressort les faits suivants :

— La gelée royale, pour être parfaitement assimilée, doit être diluée dans l'eau ou dans une substance hygroscopique comme le miel. Dans ce dernier cas, les proportions optimales semblent être 80 p. 100 de gelée royale, 20 p. 100 de miel.

— L'addition de pollen dans la nourriture, réalisée naturellement dans la ruche à partir du 3^e jour, n'est pas supportée par les larves durant les premiers jours de leur croissance.

— L'acide hydroxy-10 décène-2 oïque, acide gras caractéristique de la gelée royale, ne joue pas un rôle déterminant dans le développement larvaire. Ses qualités antibiotiques limitent ou suppriment la fermentation de la nourriture, mais il semble qu'un traitement par l'acétone et l'éther, tout en éliminant cet acide, stérilise la gelée royale et interdit le développement des germes.

— L'effet du traitement par l'alcool bouillant peut s'expliquer ainsi : sous l'action de la chaleur, glucides et protides se décomposent donnant des substances non assimilables.

— La gelée royale lyophilisée conserve toutes ses propriétés nutritives.

— Une nourriture composée presque uniquement de sucres, comme le miel, ou d'un mélange quelconque de protéines et de sucres, comme le mélange caséine-miel, ne peut suffire à assurer le développement des larves. L'addition de vitamines à ce mélange ne modifie pas ces conclusions. Certaines substances sont donc indispensables, entre autres certains acides aminés. A ce sujet, il est intéressant de rappeler un travail de DE GROOT (1952) qui montrait que chez l'abeille adulte, les besoins en acides aminés sont sensiblement identiques à ceux du rat.

Reçu pour publication en septembre 1962.

SUMMARY

IN VITRO STUDY OF THE GROWTH OF BEE LARVAE (*Apis mellifica* L.)

This work was a study of the growth of the larvae of *Apis mellifica* L. fed on different diets and reared by techniques designed for the purpose of following the growth of each individual larva and its transformation into nymph and adult. The experiments were carried out at 34° C and at a relative humidity of 100 p. 100.

- Optimum larval growth was obtained with a mixture of 80 p. 100 royal jelly in the honey.
- Experiments with royal jelly defatted by acetone, or acetone and ether, gave a fair percentage of successes which showed that decenoic acid did not play a determining role in larval development.
- Experiments carried out with royal jelly treated with warm benzene or with boiling alcohol gave no results, the jelly having deteriorated.
- Freeze-drying of the royal jelly did not interfere with larval development.
- The addition of proteins to the royal jelly did not improve, but seemed rather to slow down larval development.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERTHOLF L. M., 1927. Utilization of carbohydrates as food by honeybee larvae. *J. Agric. Res.*, **35**, 429-452.
- BUTENANDT A., REMBOLD H., 1957. Ueber den Weiselzellenfuttersaft der Honigbiene. Isolierung. Konstitutionsermittlung und Vorkommen der 10-Hydroxy-2-deceasatire. *Hoffe Seyler's Z.*, **308**, 284-289.
- DE GROOT A. P., 1952. Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Experimentia*, **8**, 192.
- HAYDAK M. H., 1939. Food and development of the worker and queen honeybee. *Glean. Bee Cult.*, **67**-740-742; **68**, 24-26.
- HAYDAK M. H., VIVINO A. E., 1943. Larval food and development of Castes in the honeybee. *J. Econ. Ent.*, **36**, 778-792.
- HOFFMANN I., 1956. Die Auzucht weiblicher Bienenlarven (*Apis mellifica* L.) ausserhalb des Volkes. *Z. Bienenforsch.*, **3**, 134-138.
- HOFFMANN I., 1960. Rearing worker honeybee larvae in an incubator. *Bee World*, **41**, 10-11.
- LAVIE P., 1960. Les substances antibactériennes dans les colonies d'Abeilles (*Apis mellifica* L.). *Ann. Abeille*.
- MAC CLESKEY C. S., MELAMPY R. M., 1939. Bactericidal properties of royal jelly of honeybee. *J. Econ. Ent.*, **32**, 581-587.
- MICHAEL A. S., ABRAMOVITZ M., 1955. A method of rearing honeybee larvae in vitro. *J. Econ. Ent.*, **48**, 43-44.
- MILUM V. G., 1930. Variations in time of development of the honeybee. *J. Econ. Ent.*, **23**, 441-447.
- MYSER W. C., 1954. The larval and pupal development of the honeybee. *Ann. Ent. Soc. Am.*, **47**, 683-711.
- RHEIN W. von, 1933. Ueber die Entstehung des weiblichen Dimorphismus im Bienenstaate. *Roux. Arch. Entw. Mech. Organ.*, **129**, 601-655.
- RHEIN W. von, 1951. Ueber die Entstehung des weiblichen Dimorphismus im Bienenstaate und ihre Beziehung zum Metamorphoseproblem. *Verh. dtsh. Zool. Ges.*, 99-101.
- SCHIRACH A. G., 1770. Eine natürliche Geschichte der Bienenkönigin Drachsted : Budissen. Cited by JOHANSSON, 1955.
- SMITH M. V., 1959. Queen differentiation and the biological testing of royal jelly. *Corn. Exp. Sta. Mém.*, 356.
- VELICH A. V., 1930. Entwicklungsmechanische Studien an Bienenlarven. *Z. wiss. Zool.*, **136**, 210-222.
- WEAVER N., 1955. The rearing of honeybee larvae on royal jelly in the laboratory. *Science*, **121**, 509.