



**HAL**  
open science

# Cryoconservation des embryons de l'abeille domestique, *Apis mellifera*

Cécile Burette

► **To cite this version:**

Cécile Burette. Cryoconservation des embryons de l'abeille domestique, *Apis mellifera*. [Stage] Université de Versailles Saint-Quentin; Institut de recherche sur la biologie de l'insecte; IRBI. 2015. hal-03822718

**HAL Id: hal-03822718**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03822718>**

Submitted on 20 Oct 2022

**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.

## Mémoire de stage

Licence professionnelle Biotechnologies

**BURETTE Cécile**

3 janvier 2015 – 3 juillet 2015

# Cryoconservation des embryons de l'abeille domestique, *Apis mellifera*



Butineuse sur le Cirse des champs, (*Cirsium arvense*), T. TAMIC

Encadrants : Florence GUIGNOT (INRA de Nouzilly, maître de stage),

Dominique FORTINI (INRA du Magneraud)

Christophe BRESSAC (IRBI de Tours).



# Sommaire

## REMERCIEMENTS

<b>I. PRESENTATION DES STRUCTURES D'ACCUEIL .....</b>	<b>1</b>
1. OBJECTIFS DE STAGE .....	1
2. PRESENTATION DES STRUCTURES DE STAGE ET IMPLICATIONS .....	2
a. <i>L'Institut de la Recherche sur la Biologie de l'Insecte – l'IRBI.....</i>	2
b. <i>L'Unité Mixte de Recherche PRC, site de Tours, Centre Val de Loire.....</i>	3
c. <i>L'Unité expérimentale d'Entomologie, Centre Poitou-Charentes.....</i>	3
<b>II. ETUDE .....</b>	<b>4</b>
1. ECOLOGIE ET BIOLOGIE DE L'ABEILLE, <i>APIS MELLIFERA</i> .....	4
a. <i>L'organisation d'une ruche.....</i>	4
b. <i>La reproduction et la ponte.....</i>	6
c. <i>Leurs régimes alimentaires .....</i>	7
d. <i>Leurs rôles .....</i>	7
e. <i>L'importance de l'abeille dans la pollinisation .....</i>	8
f. <i>Les menaces de l'abeille domestique .....</i>	9
g. <i>L'embryologie.....</i>	10
h. <i>La cryoconservation .....</i>	11
2. MATERIELS ET METHODES.....	12
a. <i>Encagement des reines et collecte des embryons .....</i>	12
b. <i>Etude de la structure interne de l'embryon.....</i>	13
c. <i>Déchorionisation .....</i>	13
d. <i>Perméabilisation .....</i>	14
e. <i>Tests de survies, in vitro .....</i>	16
f. <i>Vitrification .....</i>	16
g. <i>Statistiques.....</i>	17
3. RESULTATS .....	18
a. <i>Structure des embryons .....</i>	18
b. <i>Déchorionisation : efficacité des traitements et taux de survie in vitro obtenus .....</i>	19
c. <i>Perméabilisation : efficacité des traitements / taux de survie in vitro.....</i>	21
d. <i>Vitrification .....</i>	23
4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES DU PROJET .....	23
5. CONCLUSION .....	27
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>28</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	
<b>RESUMES (FRANÇAIS, ANGLAIS)</b>	



## Remerciements

Tout d'abord, un grand merci à mes deux maîtres de stage, Florence GUIGNOT et Dominique FORTINI, pour m'avoir offert cette opportunité, pour m'avoir encadrée, aidée et guidée tout au long de ce stage. Merci d'avoir partagé vos connaissances, vos expériences et pour vos nombreux conseils tout au long de la réalisation de ce rapport.

Je voudrais remercier Stéphane GRATEAU pour tous les milliers d'œufs qu'il a pu m'amener et pour les deux agréables visites des ruchers !

Je remercie également Christophe BRESSAC pour sa disponibilité durant les deux semaines de formation à l'IRBI et pour les précieux conseils qu'il a pu m'apporter.

Je tiens aussi à remercier, toute l'équipe de l'Unité expérimentale d'Entomologie de l'INRA du Magneraud, pour leur accueil, leurs conseils, leur bonne humeur et leur sympathie au quotidien.

Enfin, merci à tous les stagiaires rencontrés, pour toutes ces soirées et agréables moments passés avec vous.



Dans le cadre de ma licence professionnelle Biotechnologies, spécialité technicien en détection de marqueurs biologiques (MB), mon stage d'une durée de 6 mois, sur le thème « cryoconservation des embryons d'abeille domestique », s'est déroulé dans deux structures différentes et sur trois lieux différents.

## I. Présentation des structures d'accueil

### 1. Objectifs de stage

Le projet « CRB Anim » (2012-2016) est destiné à intégrer et renforcer les centres de ressources biologiques (CRB) pour les espèces d'animaux domestiques élevées en France, l'abeille domestique a été choisie pour représenter les insectes.

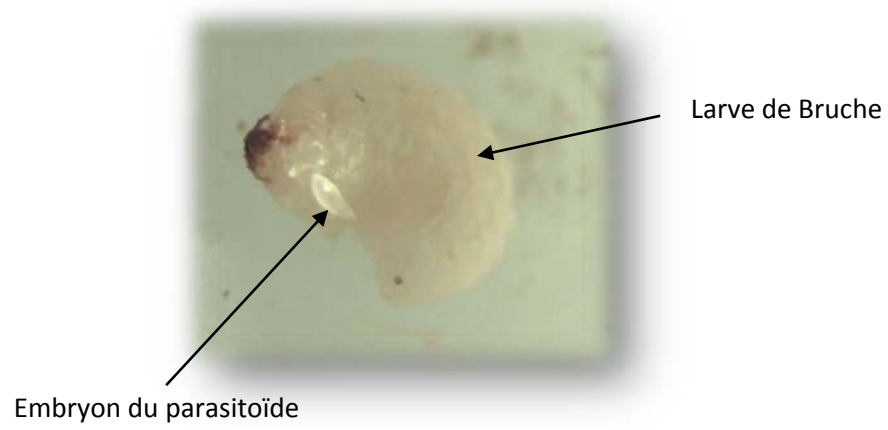
Le but de cette étude sur l'abeille domestique, *Apis mellifera*, est de constituer à terme des collections de cellules/tissus, afin de mieux connaître le développement de l'embryon, de maintenir la biodiversité de cette espèce et de la sauvegarder : c'est en effet une espèce menacée de disparition. Ce projet serait alors intéressant afin de conserver des lignées sélectionnées pour la production de gelée royale, de miel ou de propolis

L'objectif final visé est de mettre au point des méthodes de cryoconservation du matériel reproductif sur des œufs (embryon) de reine.

Pour cela, ma première mission a été de me familiariser à la manipulation des embryons d'insectes et d'étudier plus précisément les stades de développement embryonnaire de cette espèce après ponte, afin de mieux connaître la structure et la croissance de l'embryon.

Ma deuxième mission a été de trouver des traitements permettant de cryoconserver les embryons. De ce fait, une étape cruciale, la déchorionisation partielle (Cf. partie II, 1, g) couplée à la perméabilisation des deux membranes protectrices constituant l'embryon a été réalisée, afin de permettre l'entrée des cryoprotecteurs lors de la cryoconservation. La capacité de survie des embryons aux différents traitements a ensuite été testée, *in vitro*, jusqu'à leur éclosion en larve





**Figure 1** : Larve de Bruche et embryon du parasitoïde, *Dinarmus basalis*

## 2. Présentation des structures de stage et implications

### a. L'Institut de la Recherche sur la Biologie de l'Insecte – l'IRBI

Créé en 1965, l'IRBI est une unité mixte de recherche de l'Université de Tours et du CNRS basée à l'Université François Rabelais de Tours sud, regroupant 37 permanents. Les recherches de cette structure s'appuient sur l'écologie, la biologie évolutive, la morphologie des insectes et leur génétique.

Au début de mon stage, j'ai pu suivre une formation de deux semaines qui m'a permis de me familiariser davantage avec le monde des insectes. J'ai également découvert les différentes unités de recherches et d'élevages qui la composent et j'ai appris à manipuler les embryons d'insectes et à perméabiliser leurs membranes avec différents solvants. Le modèle d'étude disponible était un hyménoptère parasitoïde, *Dinarmus basalis*. Les embryons étaient prélevés sur son hôte, la larve de Bruche, *Callosobruchus maculatus*, (Figure 1).

### L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA):

Premier institut de recherche agronomique en Europe et deuxième dans le monde, l'Institut National de la Recherche Agronomique a été fondé en 1946. C'est un organisme de recherche scientifique publique, placé sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Les recherches sont orientées vers les défis planétaires posés par l'alimentation, l'environnement et la valorisation des territoires, que l'agriculture et l'agronomie ont relevés. Avec plus de 8000 personnes, l'INRA mène des recherches finalisées pour une alimentation saine et de qualité, pour une agriculture compétitive et durable, et pour un environnement préservé et valorisé. L'INRA est composé d'Unités de recherche et d'Unités expérimentales réparties sur tout le territoire français, départements et régions d'outre-mer compris. Mon stage s'est déroulé au sein de deux d'entre elles : l'Unité Mixte de Recherche (UMR) sur la 'Physiologie de la Reproduction et des Comportements' (PRC) du Centre Val de Loire et l'Unité expérimentale d'Entomologie, du Centre Poitou-Charentes.



Entrée/sortie des ruches

A

**Figure 2** : Rucher couvert

**A/** vue extérieure

**B/** vue intérieure



B

Une ruche

### b. L'Unité Mixte de Recherche PRC, site de Tours, Centre Val de Loire

Le Centre Val de Loire regroupe les sites d'Orléans (45), Tours (37) et de Bourges (18). Le site de Tours est ma structure d'accueil principale. Il est plus précisément localisé sur la commune de Nouzilly (37). Ce site comprend plus de 650 permanents. L'Unité Mixte de Recherche 'Physiologie de la Reproduction et des Comportements' (PRC) dans laquelle j'ai travaillé, comprend 142 permanents. Elle a pour mission des recherches fondamentales et appliquées sur la fonction de reproduction, d'adaptation et sur les comportements émotionnels, sociaux, alimentaires et sexuels d'espèces domestiques. Mon encadrante est spécialisée dans le domaine des biotechnologies de la reproduction des mammifères domestiques et plus particulièrement sur la cryoconservation et le génotypage des embryons.

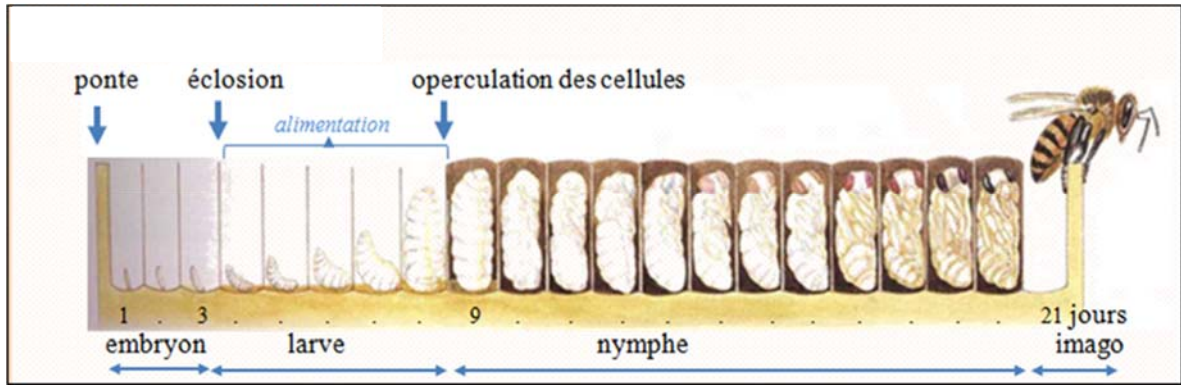
Dans un premier temps, pour mieux cerner mon sujet, j'ai réalisé une étude bibliographique. Cette étape a été pour moi une partie incontournable, afin de connaître et de comprendre le fonctionnement et l'embryologie de l'abeille.

Par la suite, les études structurales des embryons par microscopie confocale et mon apprentissage des techniques de cryoconservation se sont déroulés sur ce site.

### c. L'Unité expérimentale d'Entomologie, Centre Poitou-Charentes

Le centre Poitou-Charentes regroupe les sites de Lusignan-Rouillé (86), le Magneraud (17), Saint Laurent de la Prée (17) et Chizé (79). Le site du Magneraud est ma structure d'accueil secondaire. Il est plus précisément situé sur la commune de Surgères. Ce site comprend 85 agents. Les axes scientifiques du Centre relèvent des thématiques "Prairies et environnement", "Systèmes d'élevage" et "Production innovants". Au sein de ce site, l'Unité expérimentale d'Entomologie, dans laquelle j'ai travaillé, est composée de 12 permanents. Elle conçoit des méthodes expérimentales pour mesurer les effets des pratiques agricoles sur le développement des colonies d'abeilles, et conduit des expérimentations en laboratoire et en plein champ sur l'abeille. L'unité gère un rucher expérimental extérieur, comprenant 140 ruches, et un rucher intérieur appelé rucher couvert, comprenant 10 ruches (Figure 2). Ce dernier se trouve dans un bâtiment chauffé à 20°C. Il permet de pouvoir garder une activité expérimentale en période hivernale.

Durant mon stage, j'ai pu réaliser de nombreux essais sur des embryons d'abeille apportés par l'apiculteur de l'unité, responsable du rucher expérimental. De fin janvier à mi-avril, ces embryons provenaient du rucher couvert et de mi-avril à début juillet, du rucher extérieur.



**Figure 3** : Cycle biologique de l'abeille ouvrière



**Figure 4** : L'œuf dans son alvéole (faune-et-flore.haplosciences.com)

## II. Etude

### 1. Ecologie et biologie de l'abeille, *Apis mellifera*

L'abeille domestique fait partie de la famille des Hyménoptères qui signifie étymologiquement « ailes membraneuses ». L'abeille utilisée au cours de mon stage est plus précisément du genre *Apis* et de l'espèce *mellifera*. C'est un insecte vivant en colonie, faisant partie de la superfamille des apoïdes et regroupant en France sept familles et 1 200 espèces. (Annexe 1). Le séquençage du génome de l'abeille a été publié pour la première fois en 2006. Il regroupe 245 millions de paires de bases, répartis sur 16 chromosomes (ITSAP-Institut de l'abeille, 2015).

#### a. L'organisation d'une ruche

Une ruche est composée de trois castes en période estivale : 30 000 à 60 000 ouvrières, 1000 à 2000 mâles, appelés des faux-bourçons et d'une seule et unique reine.

L'abeille passe par 4 stades de développement distincts au cours de sa vie (Figure 3).

- ❖ L'œuf (Figure 4), blanc nacré, puis légèrement grisâtre, de forme cylindrique, est le premier stade du développement. Il mesure environ 1,5 mm de long, 0,5 mm de diamètre et pèse approximativement 0,13 mg. Uniquement pondu par la reine, l'œuf fécondé se développe individuellement dans le fond de l'alvéole. Une fois pondu, il reste dressé durant un jour grâce à une sécrétion collante. La structure intérieure de l'œuf évolue continuellement, il est alors appelé embryon jusqu'à la transformation larvaire. Ce stade dure en moyenne 72 heures. Durant ce temps, l'œuf va progressivement se pencher dans sa cellule jusqu'à finalement être couché au fond de celle-ci. Parallèlement, le chorion, membrane externe de l'embryon va s'affiner, jusqu'à disparaître. Au bout de trois jours, l'œuf éclot alors et donne naissance au premier stade larvaire appelé stade L1 (Cf partie II, 1, g) (Regard *et al*, 1977).

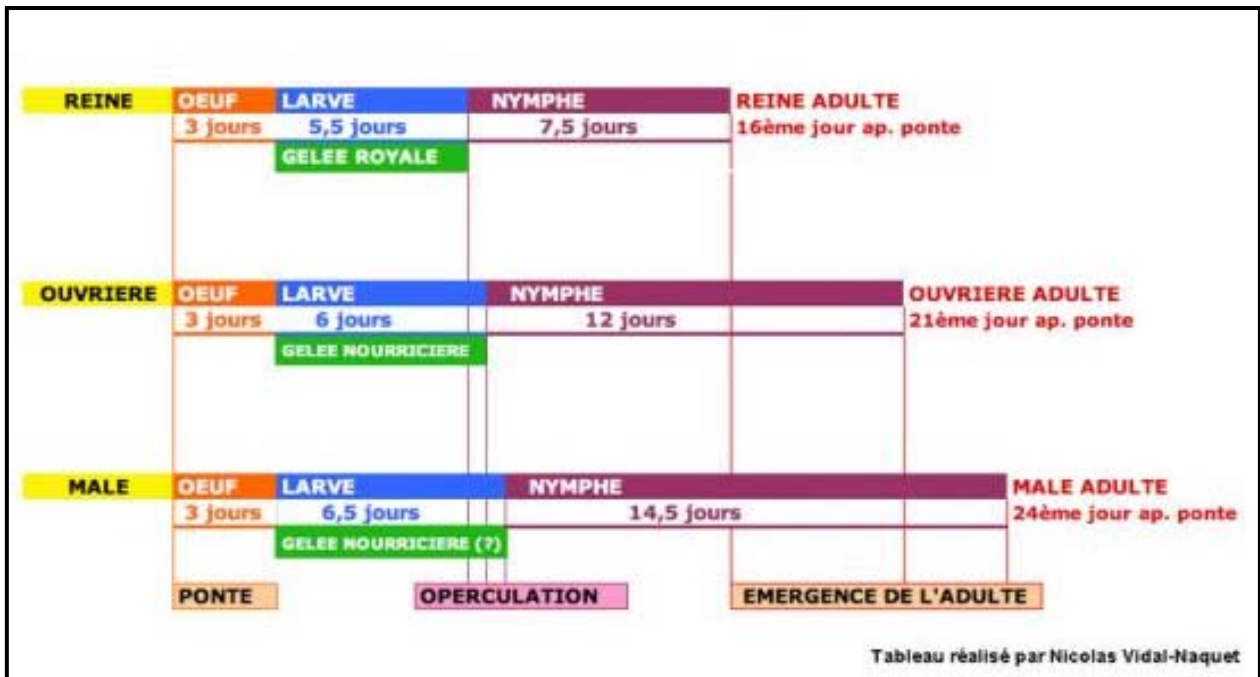


Figure 5 : Cycle évolutif des trois castes d'abeille

- ❖ **Le stade larvaire** est le deuxième stade de développement. Ce stade connaît cinq mues différentes. Lors de chaque mue, le poids de la larve est doublé. L'alimentation des larves est un élément clé dans la détermination de 2 castes (ouvrière et reine). En effet, c'est durant cette phase que les deux castes femelles vont se définir, grâce à la nourriture que les ouvrières apportent aux larves. Durant les trois premiers jours, les larves reçoivent une nourriture à base de sécrétions appelées bouillie larvaire, puis les larves d'ouvrières seront nourries avec du miel et un peu de pollen, Par contre, les larves de futures reines reçoivent principalement une nourriture à base de gelée royale pendant tout le stade larvaire. La larve possède un système digestif, respiratoire et nerveux. A la fin de la période larvaire, les alvéoles sont operculées pour la phase nymphale, avec de la cire fabriquée par les ouvrières et la larve mue une dernière fois avant de fabriquer son cocon (stade pré-nymphal).
  
- ❖ **Le stade nymphal** (encore nommé pupe) est le troisième stade du développement. C'est durant ce stade que les trois régions caractéristiques des insectes (tête, thorax, abdomen) apparaissent. La majeure partie des changements que subissent les nymphes sont internes, les muscles ainsi que les organes se modifiant vers leur forme adulte.
  
- ❖ **Le stade adulte**, dernier stade du développement. Après quelques jours sous cette forme nymphale, une dernière mue donne naissance à un insecte adulte qui émerge de la cellule fermée après avoir découpé l'opercule de cire grâce à ses mandibules. L'insecte adulte est alors appelé **imago**. Ce stade est la transformation définitive de l'insecte. De l'œuf à l'imago, le temps de développement est différent selon les castes : 16 jours pour une reine, 21 jours pour une ouvrière et 24 jours pour un faux-bourdon (Figure 5) (Winston M.L., 1993).





## b. La reproduction et la ponte

La fécondation d'une reine vierge est réalisée lors d'un vol nuptial par plusieurs mâles (10 à 15). Ce vol a lieu généralement pendant les mois de mai, juin, lorsque la température extérieure est supérieure à 20°C et aux périodes où les mâles sont présents. L'instinct d'accouplement de la reine se stoppe lorsque sa spermathèque est remplie. Suite à l'accouplement, les mâles meurent, leur appareil reproducteur restant accroché à celui de la femelle qui s'en débarrassera par la suite. La reine fécondée retourne à la ruche et quelques jours après l'accouplement, la reine se met alors à pondre. La ponte d'effectue dans le centre du nid et du centre du rayon, vers l'extérieur. La reine inspecte la cellule, préalablement préparé par les ouvrières, puis introduit son abdomen au fond de la cellule et y dépose un œuf. Elle peut pondre au maximum 2 000 œufs par jours, soit en moyenne 50 000 dans l'année et régule sa ponte en fonction des besoins de la ruche et de son apport en nourriture donné par les ouvrières. La reine reconnaît la taille des cellules à l'aide de sa première paire de pattes. En effet chaque caste a une taille différente d'alvéole, celle de la future reine étant la plus grande et celle du mâle plus large que celle de l'ouvrière. La reine peut pondre à volonté, par l'action des fibres musculaires de la spermathèque et pondre deux types d'œufs, en laissant sortir un spermatozoïde de sa spermathèque ou non.

Le spermatozoïde féconde l'œuf juste avant la ponte en passant par le micropyle, trou situé à l'extrémité antérieure de l'œuf. Ainsi, les castes mâles et femelles sont déterminées dès la ponte des œufs. La différenciation des femelles se fera plus tard, au stade larvaire, en fonction de l'alimentation apportée par les ouvrières. Les cellules royales sont conçues seulement lorsque la ruche a besoin d'une nouvelle reine. Dans le premier cas, la reine pond un ovule qui est fécondé par un spermatozoïde, l'œuf fécondé donnera naissance à une femelle (reine ou ouvrière), elles sont diploïdes ; dans le second cas, où un ovule non fécondé est pondu, il donnera naissance à un faux-bourdon, il est haploïde.

Les mâles sont donc issus d'œufs haploïdes, ils sont issus d'un seul représentant, la reine, qui transmet seulement 16 chromosomes et un seul allèle sexuel par chromosome. Le mâle est hémizygote. Tandis que les femelles possèdent 16 paires de chromosomes, elles héritent du patrimoine génétique de deux individus, la reine et un faux-bourdon, elles sont donc diploïdes et détiennent 2 allèles sexuels différents par paire de chromosomes. Ce mode de reproduction est dit parthénogénèse arrhénotoque et évite la consanguinité (Winston M.L., 1993 ; Le Conte Y. et Barbançon J.M., 2002).



### c. Leurs régimes alimentaires

Dans une ruche, les individus adultes ne mangent pas tous la même chose. Les ouvrières et les mâles se nourrissent principalement de miel, composé de sucres, et de pollen, qui leur apporte protéines, lipides et vitamines. Ce dernier est essentiellement consommé lors des 9 premiers jours de la vie d'une ouvrière, pour permettre le développement des glandes nourricières qui produisent l'aliment larvaire. La reine est alimentée au prorata du volume de sa ponte. Elle consomme également du miel provenant des réserves, mais elle préfère se laisser nourrir bouche à bouche par ses ouvrières qui lui délivrent une nourriture surtout à base de gelée royale et de miel. La gelée royale est sécrétée par les glandes nourricières des ouvrières et contient une quantité considérable d'acides aminés, d'acides gras et de vitamines. Cette dernière entre aussi dans l'alimentation des larves d'ouvrières durant les 3 premiers jours après l'éclosion. Ensuite ces larves sont nourries de miel et de pollen. En revanche, les futures reines sont exclusivement nourries de gelée royale en très grande quantité, ce qui induit leur différenciation morphologique et physiologique.

L'eau est un élément important et vital dans l'alimentation de l'abeille. Elle est utilisée pour humecter le miel et fabriquer la gelée royale qui contient environ 70% d'eau. L'abeille utilise aussi l'eau pour la thermorégulation de la colonie. L'évaporation de l'eau permet de rafraîchir et climatiser la température de la colonie (Winston M.L., 1993 ; Le Conte Y. et Barbançon J.M., 2002).

### d. Leurs rôles

Chacune des trois castes assure un ou plusieurs rôles dans la ruche. La reine détient le rôle central de la colonie en assurant la reproduction et la survie de celle-ci. Elle sécrète d'une part des phéromones qui régulent l'activité de la colonie et, d'autre part, elle pond continuellement après sa fécondation (environ 2 000 œufs par jour), afin de permettre le renouvellement des ouvrières de la ruche. Les faux-bourçons, présents seulement durant l'été, ont pour unique rôle de féconder la reine durant son vol nuptial, pour que cette dernière puisse pondre des œufs fécondés. Les ouvrières, quant à elles représentent la véritable force de travail de la colonie. Elles sont stériles et ne pondent pas d'œufs fécondés, mais elles assurent de nombreux rôles. Elles sont nourrices du couvain, gardiennes, nettoyeuses, ventileuses, bâtisseuses de la ruche, puis terminent leurs vies en tant que butineuses pour ramener les réserves alimentaires à la ruche.

Les pattes de l'abeille sont dotées d'une « corbeille » à pollen. Comme le nom l'indique, c'est l'endroit où est stocké le pollen pour son transport. Les poils répartis sur tout le corps des



**Figure 6 :** Butineuses munies de leurs sacs à pollen

**A/** en vol, vers une fleur de Saule marsault (*Salix caprea*),

**B/** posée sur une Anémone des Apennins (*Anemone apennina*).

ouvrières, et même sur leurs yeux, permettent également de récolter et de transporter le pollen de fleur en fleur, assurant alors le rôle de pollinisation (Winston M.L., 1993).

Grâce aux ouvrières, la température de la ruche est d'environ 34,5°C tout au long de l'année et ne descend pas en dessous de 25°C en hiver, pour le développement optimal des immatures (Chauvin R., 1968). La température varie aussi en fonction du nombre d'individu, mais elle reste tout de même égale en moyenne à 30°C. C'est en battant des ailes et en se regroupant que les ouvrières créent de la chaleur qui permet de maintenir la température de la ruche.

#### e. L'importance de l'abeille dans la pollinisation

La pollinisation est le transport du grain de pollen vers le stigmate de la fleur. Dans le monde, plus de 20 000 espèces d'abeilles sont dénombrées. L'abeille domestique est considérée, à l'échelle mondiale, comme l'espèce la plus importante pour la pollinisation des cultures.

*Apis mellifera* est polylectique, elle contribue au maintien de la biodiversité en favorisant la pollinisation de nombreuses espèces végétales ne pouvant se reproduire autrement (Figure 6).

Plantes et abeilles réalisent le mutualisme, elles s'apportent réciproquement des bénéfices. Les abeilles dépendent des plantes à fleurs qui leur fournissent leurs principales sources de nourriture, le pollen et le nectar, ainsi que des matières premières utilisées pour la fabrication de cire et de propolis. L'entomophilie est aussi source de fécondation d'une majorité d'espèces végétales à reproduction sexuée, ne pouvant pas se reproduire autrement. Ces plantes sont cultivées pour leur graine (colza, tournesol), leur fruit (pomme, poire, cerise), leur racine ou leur bulbe (carotte, radis, oignon), leur feuillage (chou, salade)... Cette activité contribue à polliniser 80% des plantes à fleurs (angiospermes). L'abeille domestique est la principale pollinisatrice pour la plupart des plantes sauvages et agricoles. En effet, elle est capable de visiter jusqu'à 250 fleurs en l'espace d'une heure seulement. Son intérêt économique est également lié à la commercialisation du miel, surtout, mais aussi d'autres produits, comme les pelotes de pollen, la cire, la gelée royale ou encore la propolis (Gallai, *et al*, 2009).

En moyenne, chaque ouvrière butineuse transporte dans son jabot 0,025 g de nectar de fleur (matière-première pour la fabrication du miel). Pendant une bonne année, une ruche peut produire près de 100 kg de miel et en consomme entre 60 à 80 kg (Bruneau E., 2006 ; Le Conte, *et al*, 2009). Les faux-bourdon, quant à eux, sont incapables de butiner car leur langue est trop courte.

En 2005, une étude franco-allemande a estimé la valeur économique et écologique de l'activité pollinisatrice des insectes, majoritairement des abeilles, à 153 milliards d'euros, soit



**Figure 7** : Nympe parasité par un varroa (Happy-miel.fr)

9,5% de la production agricole mondiale (Gallai, *et al*, 2009). Beaucoup d'agriculteurs ont pris conscience de l'importance de la pollinisation pour l'obtention de bons rendements et louent des ruches auprès d'apiculteurs.

#### f. Les menaces de l'abeille domestique

De nos jours, l'abeille domestique est menacée par de nombreux et divers ennemis, responsables de son déclin progressif.

Ses ennemis sont notamment des prédateurs, comme les oiseaux, les araignées ou encore le frelon asiatique à pattes jaunes, *Vespa velutina nigrithorax*, qui s'attaque aux ruches, mais également des agents pathogènes, champignons (nosérose), bactéries (loques) virus et parasites (varroa). Ainsi, *Varroa destructor* (Figure 7), donnant la varrose, représente à ce jour la plus grande menace pour l'apiculture d'après le dossier presse INRA de mai 2014 : 1 à 2 varroas pour 100 abeilles entraînent une perte de 5 à 6 kg de miel par ruche. Le parasite du couvain, *Tropilae lapsclareae* et le coléoptère des ruches, *Aethina tumida*, sont aussi une menace pour l'état sanitaire des colonies.

Les changements environnementaux et les modifications anthropiques causent principalement la perte de biodiversité, avec notamment l'extension des monocultures et l'emploi massif de désherbants et de pesticides. La régression des friches et le remembrement entraînant une modification des paysages induite par l'agriculture intensive privent les abeilles d'une alimentation constante et de qualité (Dossier-presse INRA, 2014).

La commercialisation et les transports d'abeilles augmentent les risques d'échanges de maladies et de parasites (Le Conte *et al*, 2009). Pour finir, comme tout être-vivant, l'abeille doit s'adapter aux changements climatiques.

Le déclin des abeilles a pour conséquence une diminution de la production agricole et des ressources alimentaires ce qui par la suite conduira à des ressources alimentaires moins variées et plus coûteuses.

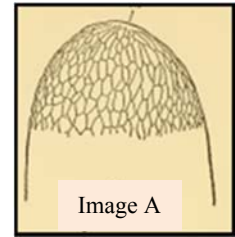
Certes, il existe d'autres pollinisateurs, comme d'autres hyménoptères (bourdons et guêpes), les diptères (mouches), les lépidoptères (papillons) et les coléoptères (charançons, cétoines), mais leur nombre est minoritaire comparé à l'espèce *Apis mellifera*. De plus, les espèces d'abeilles pollinisatrices sauvages, comme l'osmie ou la mégachile déclinent de manière inquiétante. L'abeille domestique occupe donc une position privilégiée parmi les pollinisateurs. La cryoconservation de cellules/tissus reproducteurs pourrait donc être une solution permettant de préserver les abeilles si elles venaient à disparaître.





### g. L'embryologie

L'œuf de forme cylindrique et allongé est polarisé. Son extrémité la plus large constitue la partie antérieure de l'embryon où se trouve le champ micropylaire avec en son centre le micropyle (Image A). Ce dernier constitue l'ouverture par laquelle passe le spermatozoïde pour venir féconder l'ovocyte dans le cas d'une future femelle. C'est le pôle oral ou céphalique. L'autre extrémité, plus étroite, constitue la partie postérieure, appelée pôle anal ou caudal. C'est cette extrémité qui est pondue en premier par la reine et qui se retrouve légèrement collée dans le fond de l'alvéole.



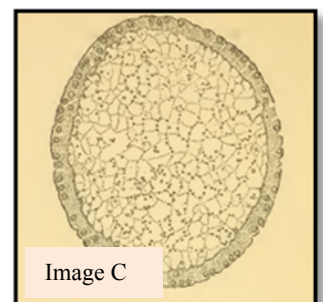
L'embryon est recouvert de deux enveloppes protectrices : une membrane externe épaisse, le chorion puis une membrane interne, plus fine, appelée membrane vitelline. Au niveau du micropyle (zone de la future tête de la larve), tout comme sur les côtés ventral et dorsal, le chorion est plus épais

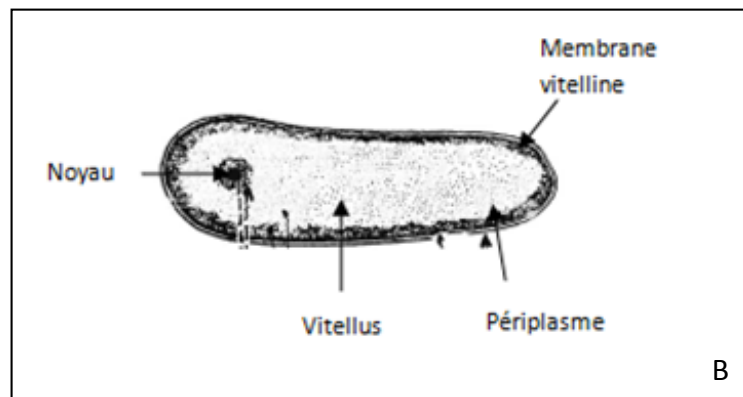
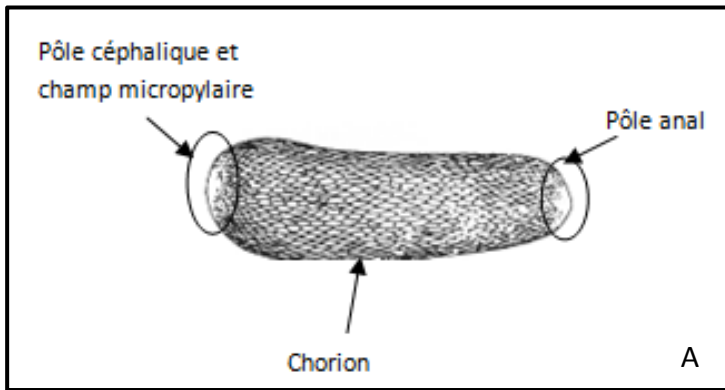
Le chorion, chez les d'abeilles n'est pas lisse, il est formé d'un maillage de forme pentagonale et hexagonale (Image B), avec au milieu, des petites nodules sphériques en forme de crête. Composé de chitine et de lipides, il forme une cuticule rigide autour de l'embryon qui a pour rôle de protection vis-à-vis du milieu extérieur, même contre les cryoprotecteurs. Cette cuticule rigide est cependant poreuse, permettant ainsi l'oxygénation de l'embryon.



L'embryon renferme une substance nutritive, le vitellus, dans lequel se trouve le neuroplasma qui entoure le noyau, contenant le matériel génétique. Sur les pourtours de l'œuf à l'intérieur, se trouve une couche dense de cytoplasme : le périplasme (Winston M.L., 1993).

L'œuf connaît trois stades de développement interne. Dès les premières heures suivant la ponte, le noyau de l'embryon subit plusieurs divisions cellulaires pour former un syncytium, en moyenne dix mitoses : c'est le stade morula. Dès 7h, arrivée à la onzième mitose, la structure initiale de l'œuf commence à changer et le blastoderme se forme. Les nouveaux noyaux migrent petit à petit vers la couche périphérique de l'embryon pour former une couche cellulaire, c'est le stade blastula (Image C, coupe transversale). Au bout de 10h environ, la dernière et quatorzième mitose a lieu. Après 15h environ de développement, les nouvelles cellules arrivées en périphérie forment une seconde couche et sont enrobées de cytoplasme. Entre ces deux couches se trouve du vitellus. Ces deux couches s'associent ensuite et forment alors une couche cellulaire plus épaisse et





**Figure 8 :** Anatomie de l'embryon (Regard *et al*, 1977)

**A/** externe

**B/** interne

uniforme. Le troisième stade de développement de l'embryon se forme entre 17 à 20h, c'est la gastrula. Il s'agit de la formation des muscles, du système nerveux et des organes (Nelson J.A., 1915 ; Regard *et al*, 1977 ; Fleig R. et Sander K., 1985 ; Winston M.L., 1993) (Figure 8).

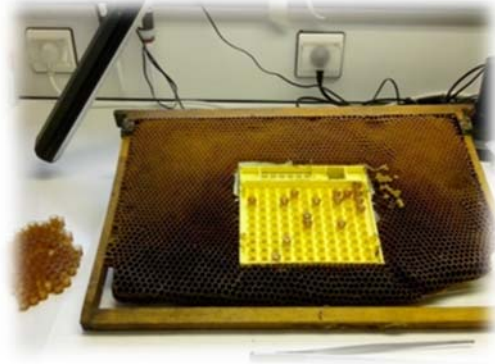
#### h. La cryoconservation

Les premières conservations d'embryons par le froid ont été réalisées dans les années 70 (chez la souris : Whittingham *et al*, 1972 ; chez la vache : Wilmut I. et Rowson L.E.A., 1973 ; chez la drosophile : Mazur *et al*, 1992). Aujourd'hui, grâce aux énormes progrès réalisés, la cryoconservation des embryons fait partie des biotechnologies de la reproduction de pointe. Elle porte un intérêt économique et génétique non négligeable, permettant de sauvegarder des espèces et des races en voie d'extinction, de maintenir et de stocker la biodiversité dans une cryobanque nationale et de transporter du matériel génétique plus facilement que l'animal sur pied. La cryoconservation permet également une régénération plus facile et plus rapide des lignées lors de maladies ou de catastrophes impliquant la disparition de l'espèce. La cryoconservation des embryons est généralement réalisée sur des stades embryonnaires jeunes : au maximum, ils sont au stade blastula.

La cryoconservation consiste à placer des tissus et des cellules à des températures très basses à  $-196^{\circ}\text{C}$ . A ces températures, tout phénomène biologique est ralenti, voire arrêté. Pour supporter ces très basses températures, les tissus et cellules doivent être protégés. Cette protection est réalisée par l'ajout de cryoprotecteurs. Ce sont généralement des alcools à faible poids moléculaire, comme le glycérol, l'éthylène glycol ou le diméthylsulfoxyde (DMSO). Ils ont un rôle d'antigel intracellulaire et vont permettre la sortie d'une partie de l'eau des tissus et prendre sa place. Cependant, à forte concentration, ces composés organiques sont toxiques pour les cellules, c'est pourquoi, ils sont souvent associés par deux, ce qui permet d'augmenter leur efficacité et de réduire la concentration finale de chacun d'eux, réduisant de ce fait la toxicité. D'autres cryoprotecteurs qui ne pénètrent pas dans les cellules sont aussi utilisés. Ce sont généralement des sucres, comme le saccharose ou le galactose. Ces composés ont un rôle osmotique en favorisant la sortie de l'eau des cellules (Guignot F., 2005).



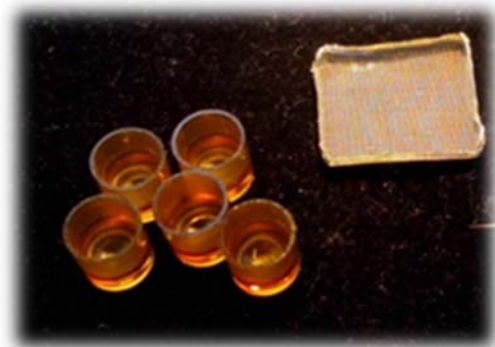
**Figure 9** : Encagement de la reine



**Figure 10** : Dispositif cupules



**Figure 11** : Prélèvement des embryons sur cadre



**Figure 12** : Cinq cupules et une grille en inox

## 2. Matériels et méthodes

### a. Encagement des reines et collecte des embryons

Pour obtenir des œufs en grande quantité, il est possible de forcer la reine à pondre sur un cadre bâti vierge (sans réserves, couvain etc ...). L'encagement consiste à enfermer une reine dans un cadre bloqué dans une cage (Figure 9), afin qu'elle se consacre uniquement à son activité de ponte. Les ouvrières peuvent rentrer dans la cage pour la nourrir et en ressortir, mais la reine, plus grosse, ne peut pas franchir les grilles de la cage et reste donc enfermée. Cette opération est réalisée par un apiculteur de l'Unité d'Entomologie. Soit les reines pondaient directement dans les alvéoles de cire bâties par les ouvrières, soit l'apiculteur fixait au milieu de chaque cadre, un dispositif comportant 110 alvéoles artificielles en plastique appelées « cupules » dans lesquelles la reine pondait (Figures 10 et 12). Ces cupules ont l'avantage de pouvoir être manipulées une par une, afin de prélever les embryons plus délicatement sous loupe binoculaire.

Afin d'avoir des embryons le plus jeune possible, des encagements de 7h ont été réalisés entre 9h et 16h le même jour : les embryons devaient alors avoir au plus 7h de développement. D'autres encagements, sur la nuit entre 16h le soir et 9h le lendemain matin, ont été réalisés pour avoir des embryons âgés de 17h maximum. Après libération des reines, si les cadres ou dispositifs cupules contenaient des embryons, ceux-ci étaient ramenés par l'apiculteur au laboratoire. Mes manipulations dépendaient donc entièrement de l'activité de ponte des reines.

Le prélèvement des embryons, étape cruciale et très délicate, a été réalisé à l'aide d'un pinceau extra fin en poil de martre (taille : 3/0, diamètre : 1,1mm). Les embryons étaient récupérés, soit directement à l'œil au fond des alvéoles de cire (Figure 11), soit dans les cupules sous loupe. Pour faciliter le prélèvement des embryons dans les cupules, 50  $\mu$ L de milieu Schneider (voir composition en annexe 2) étaient déposés juste avant le prélèvement, au fond de celles-ci.

Après prélèvement, les embryons étaient déposés sur de petites grilles en inox servant de support (Figure 12). Grâce à ces dernières, les embryons ont pu subir différents traitements sans jamais être une seconde fois manipulés par le pinceau.

Seuls les embryons des lots témoins ont été laissés dans les cupules et n'ont donc pas subi de prélèvement au pinceau.



### b. Etude de la structure interne de l'embryon

Cette étude a été réalisée sur des embryons âgés de 7h et de 17h au maximum. Ils ont été prélevés puis fixés au paraformaldéhyde (PAF) 4%, afin de stopper tout développement et de pouvoir étudier leur anatomie à un moment précis. Ce fixateur pénètre rapidement dans les tissus et stabilise les protéines. Les fixations ont été réalisées soit pendant 2h à température ambiante, pour les embryons collectés le matin, soit toute une nuit à 4°C, pour les embryons collectés en fin de journée. Après fixation, les embryons ont été rincés dans du milieu Schneider durant 2 minutes.

Les embryons ont ensuite été incubés avec différents marqueurs colorés. Pour visualiser les noyaux des cellules, les embryons ont été incubés dans une solution de Hoechst 33342, marqueur fluorescent qui s'intercale sur l'ADN double brin des cellules vivantes et mortes. Afin de visualiser les cellules, membrane et cytoplasme, un double marquage à l'iodure de propidium (IP) (2 µL d'une solution 2,4 mM dans 500 µL de milieu Schneider pendant 5 minutes) et à la phalloïdine (dilution 2/1000 pendant 20 minutes), respectivement, a été réalisé. La phalloïdine est une toxine qui empêche la dépolymérisation de l'actine, ce qui permet de la visualiser.

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de ces marqueurs sont respectivement 346 et 460 nanomètre (nm) pour le Hoechst, 540 et 620 nm pour l'IP et 495 et 518 nm pour la phalloïdine couplée à l'alexafleur. Les observations ont été réalisées en microscopie confocale qui permet de faire des coupes optiques et en microscopie en épi-fluorescence.

### c. Déchorionisation

La déchorionisation consiste à fragiliser et ôter partiellement la membrane externe de l'embryon, le chorion. Cette étape est incontournable pour que les cryoprotecteurs puissent pénétrer dans l'embryon et donc pour espérer pouvoir les cryoconserver. Elle a été réalisée sur des embryons âgés de 7h et de 17h au plus.

Deux techniques ont été testées, une chimique et une mécanique :

- **L'eau de Javel (NaOCl 9,6%)**, utilisée précédemment sur les embryons de mouche domestique, *Musca domestica* (Wang *et al*, 2000) et d'abeille (Li *et al*, 2010) a été testée à différents temps et différentes concentrations. L'eau de Javel du commerce à 9,6% de chlore actif a été diluée à 3% avec de l'eau osmosée (eau purifiée, sans sels minéraux) afin d'obtenir ensuite des solutions à 0,3%, 0,7% et à 0,8%. Ces solutions ont été réfrigérées à 4°C avant utilisation sur les embryons et préparées juste avant





**Figure 13** : Sonicateur

leur emploi. Des temps d'incubation de 30 secondes à une minute ont été appliqués. Les embryons étaient ensuite rincés une fois dans le milieu Schneider.

- **Le sonicateur** (Figure 13) est un appareil permettant le nettoyage par dissolution des produits grâce à l'effet mécanique d'ondes ultrasonores. Cet appareil a été utilisé dans notre étude pour déchorioniser partiellement le chorion, suivant les conseils d'Elisabeth Blesbois, chercheuse à l'UMR PRC à l'INRA de Nouzilly. Les grilles sur lesquelles étaient déposés les embryons ont été recouvertes par une seconde grille, puis mises dans un bécher contenant du sérum physiologique (NaCl 0,9%), à température ambiante, de telle sorte qu'elles soient immergées près de la sonde émettrice. Plusieurs durées ont été testées, de 5 à 20 secondes. Après passage dans le sonicateur, les grilles étaient asséchées sur papier absorbant, 10 minutes à température ambiante.

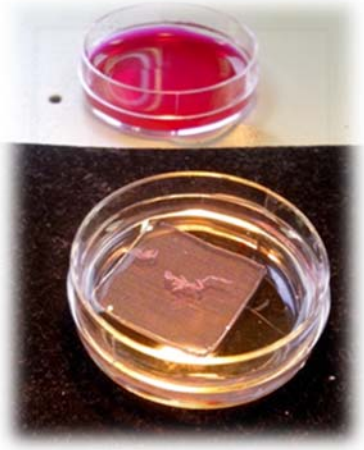
Les observations se faisaient sous loupe binoculaire, afin d'observer si structure et forme de l'embryon étaient conservées et non abîmées par le traitement appliqué. Si plus de 50% des embryons gardaient leur aspect, le traitement de déchorionisation était validé.

#### d. Perméabilisation

La perméabilisation consiste à rendre poreuse la membrane vitelline. Tout comme la déchorionisation, cette étape est incontournable pour que les cryoprotecteurs puissent pénétrer dans les embryons et donc pour espérer pouvoir les cryoconserver.

Plusieurs produits ont été testés à température ambiante et à différentes concentrations sur des embryons de 7h et de 17h maximum de développement :

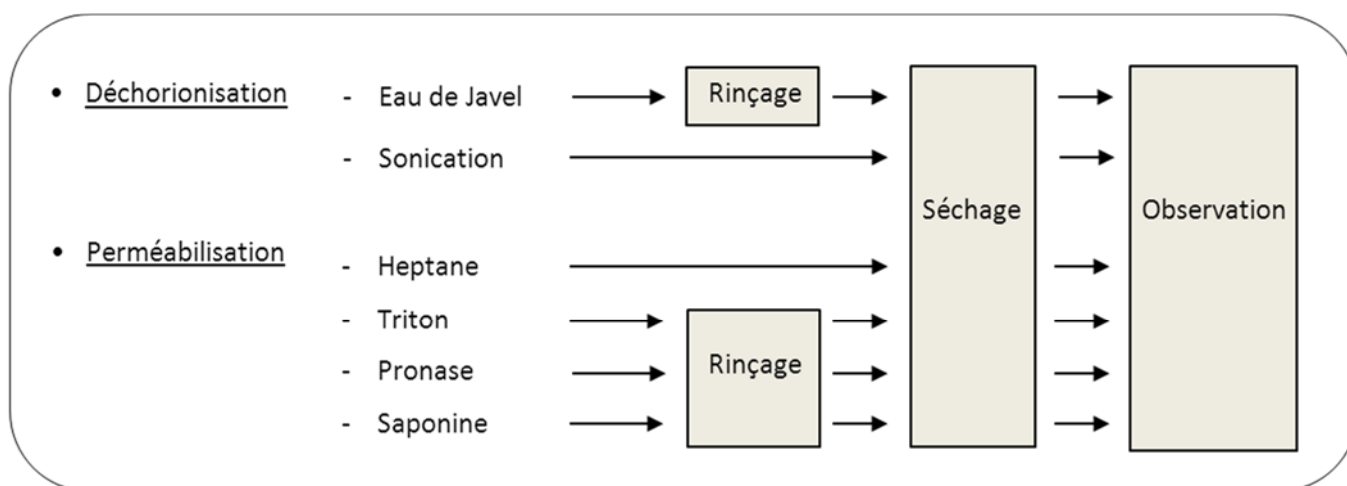
- **la pronase**, qui est un mélange de plusieurs endo- et exo-protéases permettant de digérer les protéines. Elle a été testée à différents temps à 0,5% et 1% dans du sérum physiologique.
- **la saponine**, qui est un ensemble de molécules totalement naturelles produites par certains animaux et certaines plantes (quinoa, lierre, soja, salsepareille, etc). C'est un détergent assez doux qui provoque la lyse de cellules ou de tissus. Elle a été testée à 0,5%, 2,5% et 5% dans du sérum physiologique.



**Figure 15 :** Embryons dans du milieu Schneider après un passage dans une solution de rhodamine B à 0,1%

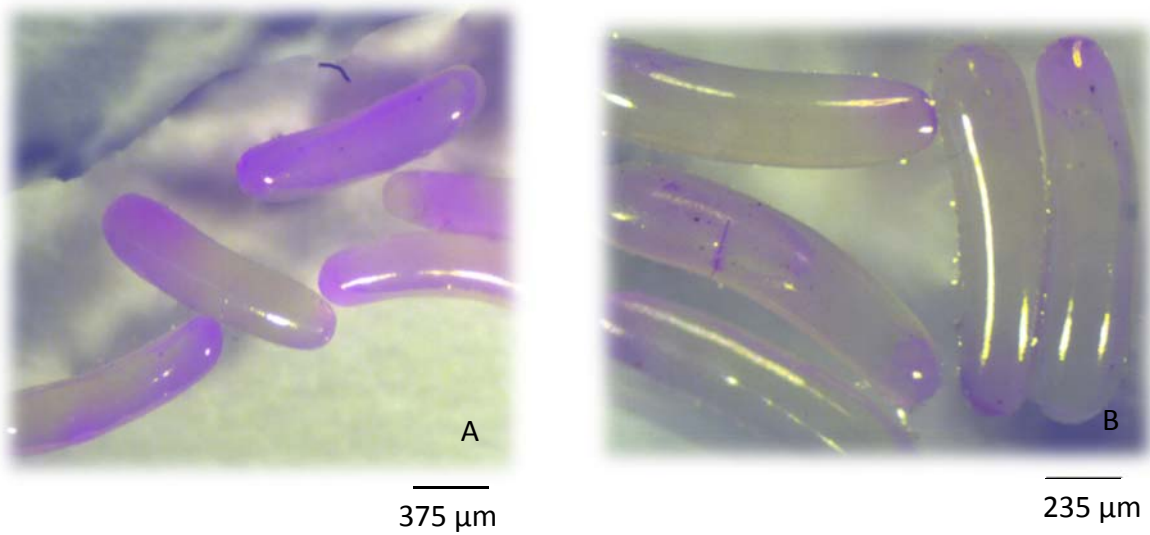
- **l'heptane pur**, qui est connu comme étant un bon solvant des graisses, cires et résines. C'est un hydrocarbure saturé de la famille des alcanes linéaires de formule C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>. Il est volatile et insoluble dans l'eau. Ce produit a été précédemment utilisé avec succès pour perméabiliser la membrane des embryons de mouche (Wang *et al*, 2000) et des embryons de Bruche, lors de sa formation à l'IRBI au début de mon stage. Des embryons ont été incubés dans l'heptane pur pendant 5, 10 et 30 secondes sous hotte.
- **le triton x100**, qui est un détergent très efficace contre les lipides. Il est classiquement utilisé en biologie cellulaire et moléculaire pour perméabiliser les membranes cytoplasmique et nucléaire. Il a été utilisé à 0,5% pendant 1, 2, 3, 5 et 10 minutes, puis à 1% pendant 2, 4 et 5 minutes dans du milieu Schneider.

Après chaque traitement, les embryons ont été rincés dans le milieu Schneider (Figure 14), sauf pour le traitement à l'heptane, où là, les grilles d'embryons ont été asséchées à température ambiante pendant environ 5 à 10 minutes, puisque c'est un hydrocarbure, il est donc hydrophobe et très volatile.



**Figure 14** : Détail des étapes réalisées après traitements

L'efficacité de la perméabilisation des embryons a été vérifiée après coloration à la rhodamine B, à 0,1% dans du sérum physiologique, pendant 1 minute (Figure 15). Après coloration, les embryons ont été rincés deux fois dans le milieu Schneider, puis observés sous loupe binoculaire. Seuls les embryons entièrement ou partiellement colorés en rose étaient bien perméabilisés.



**Figure 16** : Embryons d'abeille après coloration à la rhodamine B, observations sous loupe binoculaire

**A/** embryons de 7h au maximum traités à l'eau de Javel 0,8% pendant 1 min et au triton 0,5% pendant 10 min

**B/** embryons de 17h au maximum, sans aucun traitement (témoin)



**Figure 17** : Caissons K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans l'étuve

Nous avons considéré que l'essai était perméabilisé si au minimum 50% des embryons de celui-ci étaient colorés (Figure 16 A). Si au contraire moins de 50% des embryons étaient colorés ou seulement au niveau de leur micropyle, comme pour les embryons non traités (Figure 16 B), l'essai n'était pas considéré 'perméabilisé'.

#### e. Tests de survies, *in vitro*

Les tests de viabilité *in vitro* ont été réalisés sur des embryons de 17h maximum de développement après traitement. Les embryons ont été placés dans un caisson contenant un bac d'un litre de solution de sulfate de potassium (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) saturée, afin d'obtenir une humidité relative de 90% et ce caisson a été placé dans une étuve à 34,5°C (Figure 17). Ces conditions de température et d'hygrométrie reproduisent au mieux les conditions *in vivo*. Selon l'âge des embryons testés, les éclosions s'observent sous la loupe au bout de 3 jours au plus. La viabilité des embryons après traitement a donc été observée après 24 heures, 48 heures et 72 heures de développement *in vitro*. Le taux d'éclosion a été noté. Parallèlement, des embryons témoins pondus en cupules ont été mis en survie *in vitro* pour contrôler les conditions de développement dans l'étuve.

#### f. Vitrification

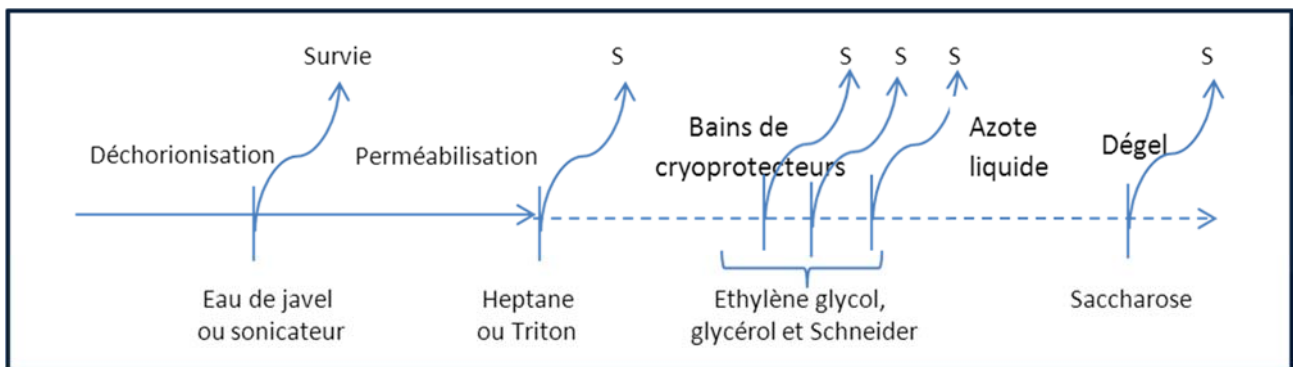
La méthode de cryoconservation utilisée dans cette étude est la vitrification. Cette technique permet d'éviter au maximum la formation de cristaux de glace au cours du refroidissement en transformant la phase liquide (cytoplasme cellulaire) en phase solide amorphe, encore appelé « état vitreux ». Elle nécessite pour cela des concentrations importantes en cryoprotecteurs, de 35 à 50% dans le dernier bain de vitrification. Les embryons ont été placés dans trois bains successifs à concentration croissante en cryoprotecteurs, afin que ceux-ci pénètrent progressivement dans les embryons sans les abîmer et que les chocs osmotiques, liés aux concentrations élevées en cryoprotecteurs, soient limités. Les cryoprotecteurs utilisés durant ce stage, sur les embryons, sont le glycérol couplé à l'éthylène glycol et non au DMSO comme précédemment sur l'embryon d'abeille (Li *et al*, 2010). En effet, il a été démontré dans le laboratoire, avant le début de mon stage, que le DMSO était plus toxique que l'éthylène glycérol pour les embryons d'abeille (Dominique Fortini, communication personnelle).

Les 3 bains de vitrification ont été préparés à partir d'une solution mère contenant 10% d'éthylène glycol, 30% de glycérol et 60% de milieu Schneider à 0,25M de saccharose.



Les grilles contenant les embryons sont immergées dans le premier bain composé de 25% de la solution mère dans du milieu Schneider, pendant 20 minutes, à 4°C. Les grilles sont ensuite rapidement séchées sur un papier absorbant, puis immergées pendant 10 minutes dans le second bain composé de 50% de la solution mère. Un dernier bain d'immersion est fait dans la solution mère pure durant 5 minutes.

Après passage dans le dernier bain avec les cryoprotecteurs, les grilles avec les embryons sont ensuite rapidement plongées dans l'azote liquide à -196°C. La rapidité du refroidissement permet d'éviter les chocs thermiques et donc d'abimer les embryons. Lors de la décongélation, les embryons sont une nouvelle fois rapidement plongés dans des bains à concentrations décroissantes en saccharose. Les grilles sont ensuite asséchées et transférées dans une étuve pour tester la survie des embryons, *in vitro* (voir détails opératoire en annexe 3). Cette technique de cryoconservation est très rapide, elle est peu coûteuse et nécessite très peu de matériel.



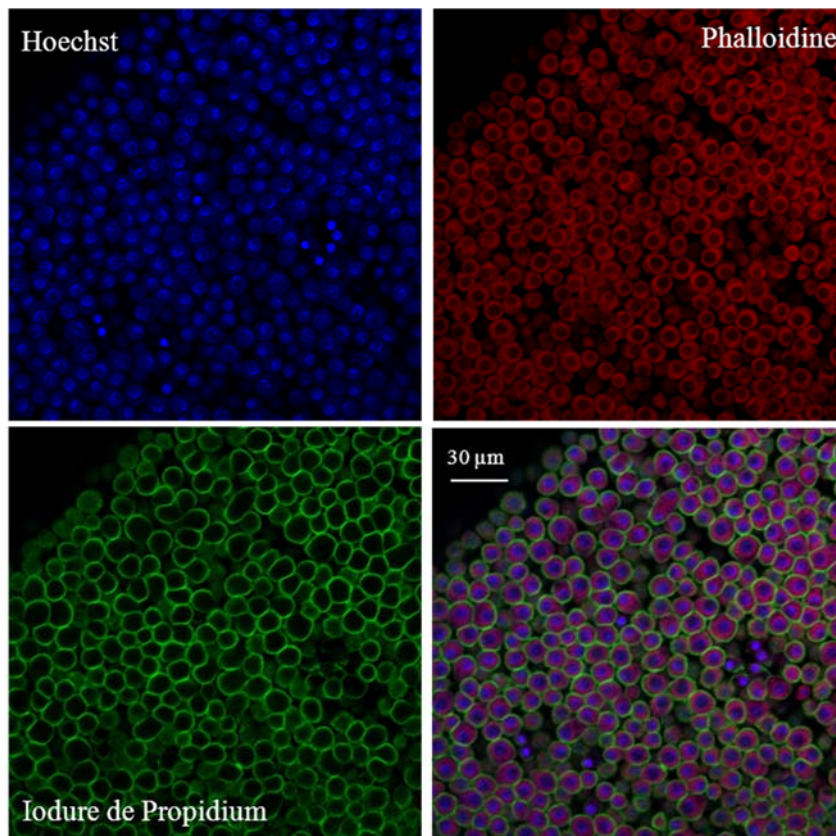
**Figure 18 :** Schéma expérimental global du projet

La figure 18 synthétise le plan expérimental du projet de cryoconservation des embryons d'abeille dans son ensemble.

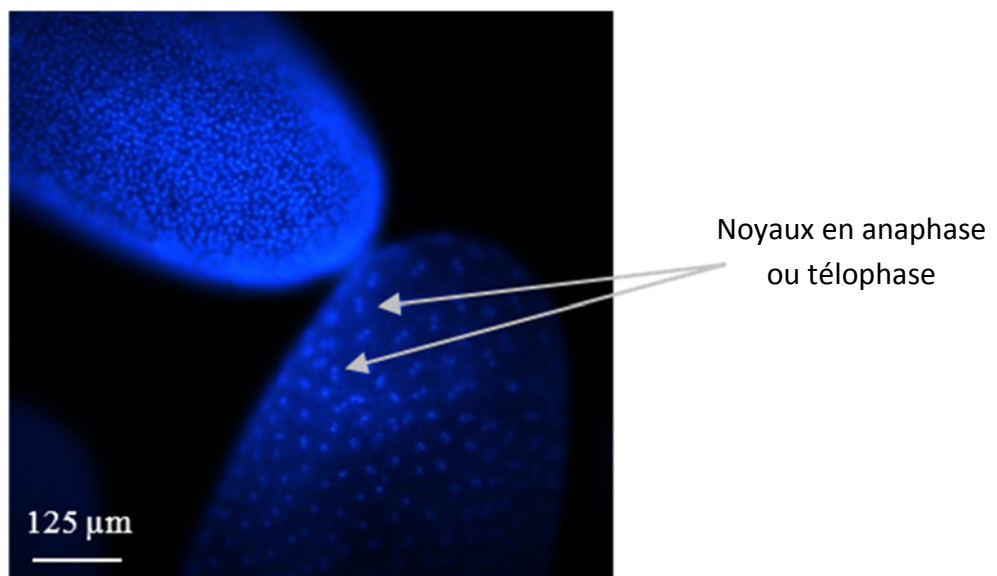
#### g. Statistiques

Afin de comparer les taux de survie *in vitro* obtenus après les différents traitements de déchorionisation, des tests non paramétriques ( $n < 30$ ) d'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur ont été réalisés (test de Kruskal-Wallis) à l'aide du logiciel de statistiques SYSTAT10 (Cytel, Cambridge, MA, USA). Cette analyse a permis d'étudier l'efficacité des différents traitements.





**Figure 19** : Embryons d'abeille âgé de 17h au maximum après coloration au Hoechst, à la phalloïdine et à l'iodure de propidium, en microscopie confocal



**Figure 20** : Embryons d'abeille âgé de 17h au maximum après coloration au Hoechst, observés au microscope à épi-fluorescence

Le même test statistique a été appliqué pour comparer les taux de survie obtenus après déchorionisation et perméabilisation, pour les différents traitements. Les différences entre lots ont été considérées significatives pour une probabilité inférieure à 0,05.

### 3. Résultats

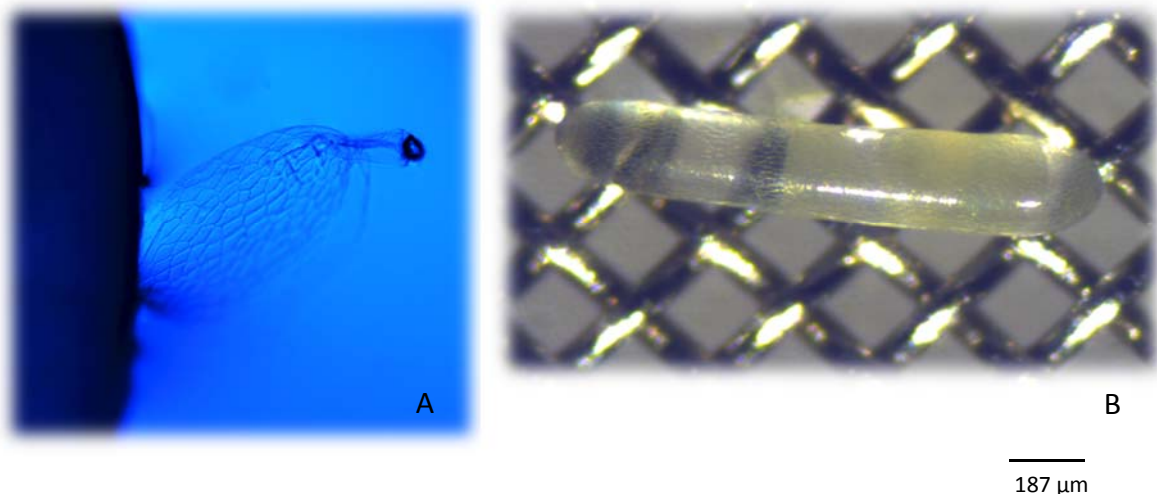
#### a. Structure des embryons

Après fixation, coloration et observation au microscope confocal, nous avons obtenu des coupes optiques d'embryons âgés de 17h au maximum comme celles représentées sur la figure 19. La photo en haut à gauche correspond à la coloration au Hoechst qui permet de visualiser les noyaux des cellules de l'embryon (coloration bleue). La photo en haut à droite représente l'embryon après coloration à la phalloïdine couplée à l'alexafleur qui permet de visualiser le cytoplasme des cellules (couleur rouge). La photo en bas à gauche a été obtenue après coloration à l'IP, qui permet de visualiser la membrane des cellules embryonnaires. La photo en bas à droite est une superposition des 3 photos précédentes. Cet embryon de 17h d'âge au plus, d'après le prélèvement réalisé, possède de nombreuses cellules comme confirmé par la triple coloration réalisée. Sur la figure 20 se trouvent deux embryons qui ont été colorés au Hoechst seulement et observés au microscope en épi-fluorescence. La densité des noyaux n'est pas la même pour les deux embryons, ce qui traduit une différence d'âge entre eux. L'embryon situé en haut à gauche présente énormément de noyaux qui sont de plus petits. Il a subi beaucoup de divisions mitotiques. Il est plus âgé que l'embryon qui se trouve en bas à droite. Dans ce dernier, on peut observer des noyaux en anaphase. Après de nombreux tests de coloration au Hoechst sur des embryons de 7h d'âge au maximum, aucune coloration n'a jamais pu être obtenue et donc aucun noyau mis en évidence, comme si le colorant ne pénétrait pas jusque dans le syncytium où se trouvent les noyaux à ce stade de développement. Un autre fixateur que le PAF a alors été testé pour essayer de dissoudre les lipides du vitellus que nous soupçonnions de gêner la pénétration du Hoechst. Ce dernier était composé d'éthanol (3 volumes) et d'acide acétique (1 volume). Les résultats n'ont pas été fructueux. Un autre fixateur, encore plus drastique pour les lipides a été essayé : le mélange éthanol / acide acétique / chloroforme (6/3/1), mais toujours sans succès. Aucun noyau n'a pu être observé sur ces embryons de 7h d'âge au plus.

Traitement	Concentration (%)	Durée (sec)	embryon < 7h			embryon < 17h		
			N essai	N embryon total testé	essai déchorionisé	N essai	N embryon total testé	essai déchorionisé
Eau de Javel	0,1	30	1	20	0/1 (0%)	0	0	/
	0,2	30	1	20	0/1 (0%)	0	0	/
	0,3	10	0	0	/	2	20	1/2 (50%)
		20	0	0	/	5	50	4/5 (80%)
		30	0	0	/	12	271	8/12 (67%)
		40	0	0	/	4	35	4/4 (100%)
		50	0	0	/	1	5	1/1 (100%)
	0,5	30	0	0	/	1	20	1/1 (100%)
		60	5	100	5/5 (100%)	3	50	3/3 (100%)
	0,7	60	3	60	3/3 (100%)	0	0	/
	0,8	60	23	146	23/23 (100%)	19	320	16/19 (84%)
1,0	60	3	60	3/3 (100%)	5	70	4/5 (80%)	
Sonication	5	0	0	/	1	20	0/1 (0%)	
	10	0	0	/	2	40	0/2 (0%)	
	15	0	0	/	9	245	4/9 (45%)	
	20	0	0	/	3	33	2/3 (75%) *	

\*: aspect aplati ; les valeurs en rouge correspondent aux conditions retenues.

**Tableau 1** : Résultats de déchorionisation en fonction des produits, concentrations et durées appliquées



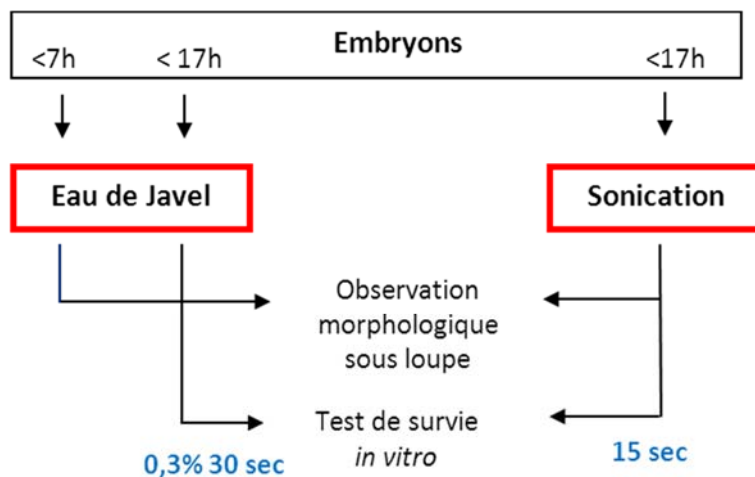
**Figure 22** : Embryons d'abeille âgés de 17h au maximum. Visualisation du chorion,

**A/** après 1 minute d'incubation dans l'eau de Javel 0,8%, observation au microscope en épi-fluorescence, x200.

**B/** après 10 secondes de sonication observé au microscope en lumière blanche.

## b. Déchorionisation : efficacité des traitements et taux de survie *in vitro* obtenus

Le plan expérimental pour cette étude est détaillé dans la figure 21.



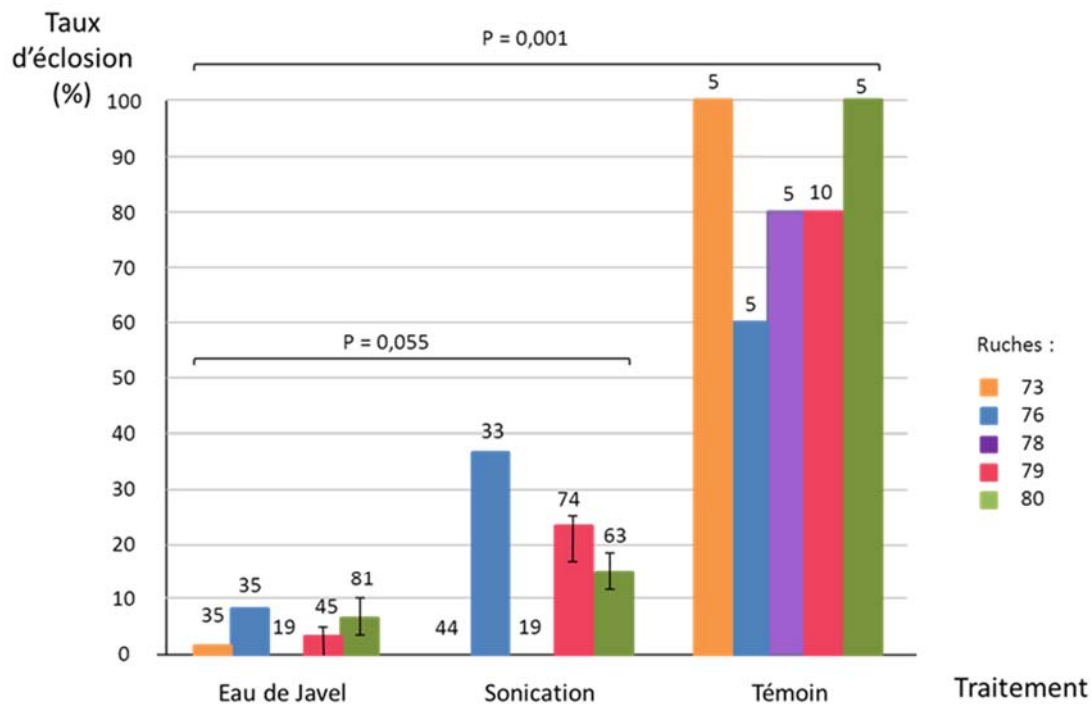
**Figure 21:** Schéma expérimental de la déchorionisation

Les taux de déchorionisation obtenus avec les différents traitements, concentration en produit et durée d'action se trouvent dans le tableau 1. Pour les embryons de 7h au maximum, seule une concentration comprise entre 0,5% et 1% d'eau de Javel et ce durant 1 minute était efficace. Entre ces deux valeurs, nous avons retenu une concentration moyenne de 0,8% pendant 1 minute. Pour les embryons de 17h au maximum, dès 0,3% durant 20 sec, les embryons commençaient à être déchorionisés. A partir de 40 sec pour cette même concentration de 0,3%, ils étaient tous déchorionisés. Nous avons retenu un temps intermédiaire de 30 sec pour avoir un embryon assez déchorionisé et qui puisse survivre jusqu'à l'éclosion. La figure 22 A/ montre un embryon ayant perdu son chorion : pour ce dernier, le traitement appliqué était trop fort.

La technique de sonication a été testée seulement sur des embryons de 17h au maximum. Avec des temps de 5 et 10 sec, comme nous le montre la figure 22 B, le chorion est encore visible. C'est seulement à partir de 15 sec que le traitement commence à être efficace, avec 45% d'essais déchorionisés. Après 20 sec de sonication, le traitement est justement trop efficace pour déchorioniser les embryons, en effet, ces derniers étaient complètement abîmés. Nous avons donc validé un temps de sonication de 15 secondes pour déchorioniser des embryons de 17h d'âge au maximum.



Les résultats des tests de survie *in vitro* réalisés sur des embryons de 17h au maximum après traitement de déchorionisation à l'eau de Javel et après sonication avec les concentrations et temps d'action validés se trouvent sur la figure 23.



**Figure 23** : Taux d'éclosion *in vitro* en fonction des traitements de déchorionisation. Sur chaque barre de l'histogramme sont indiqués les nombres d'embryons testés. Les barres verticales correspondent à l'erreur standard par rapport à la moyenne.

Cette expérience a été réalisée sur cinq ruches du rucher extérieur. Une moyenne de 83% d'éclosion a été obtenue pour les embryons témoins, ce qui valide les conditions de température et d'hygrométrie de l'étuve appliquées, alors que moins de 5% d'éclosion en moyenne ont été obtenus après traitement eau de Javel et 15% d'éclosion en moyenne après sonication. Ces taux d'éclosion sont significativement différents entre les 3 lots ( $P= 0,001$ ). Entre les deux traitements de déchorionisation, une probabilité de 0,055 a été obtenue. Les deux traitements semblent néfastes à l'embryon, mais l'eau de Javel semble l'être encore plus que la sonication. Sur 5 ruches, 4 n'atteignent même pas les 10% d'éclosion après traitement à l'eau de Javel, alors qu'après sonication, 3 ruches donnent entre 15 et 36% d'éclosion.

Traitement	Concentration (%)	Durée (min, sauf si précisé)	embryon < 7h			embryon < 17h		
			N essai	N embryon total testé	essai perméabilisé	N essai	N embryon total testé	essai perméabilisé
Pronase	0,5	1	2	40	1/2 (50%)	2	40	0/2 (0%)
		2	2	40	1/2 (50%)	1	10	0/1 (0%)
		5	1	20	0/1 (0%)	0	0	/
	1	5	0	0	/	2	40	0/2 (0%)
		10	0	0	/	1	20	0/1 (0%)
Saponine	0,5	5	0	0	/	1	10	0/1 (0%)
		10	0	0	/	1	20	0/1 (0%)
		20	0	0	/	1	20	0/1 (0%)
		30	2	40	0/2 (0%)	1	30	1/1 (100%)
	2,5	10	1	20	0/1 (0%)	2	40	1/2 (50%)
		20	0	0	/	2	40	0/2 (0%)
	5	5	0	0	/	1	20	0/1 (0%)
		10	0	0	/	1	20	0/1 (0%)
		15	1	20	0/1 (0%)	0	0	/
		20	1	20	0/1 (0%)	0	0	/
		30	4	73	1/4 (25%)	0	0	/
Heptane	pur	5 sec	3	60	3/3 (100%)	25	290	20/25 (80%)
		10 sec	1	20	1/1 (100%)	2	20	2/2 (100%)
		30 sec	0	0	/	1	10	1/1 (100%)
Triton	0,5	1	1	20	0/1 (0%)	0	0	/
		2	1	20	0/1 (0%)	0	0	/
		3	0	0	/	4	400	3/4 (75%)
		5	5	100	2/5 (40%)	3	50	2/3 (75%)
		10	2	40	1/2 (50%)	0	0	/
	1	2	0	0	/	1	10	1/1 (100%)
		5	1	20	1/1 (100%)	0	0	/

Les valeurs en rouge correspondent aux conditions retenues.

**Tableau 2** : Résultats de perméabilisation en fonction des produits, concentrations et durées appliquées

c. Perméabilisation : efficacité des traitements / taux de survie *in vitro*

Le plan expérimental pour cette étude est détaillé dans la figure 24.

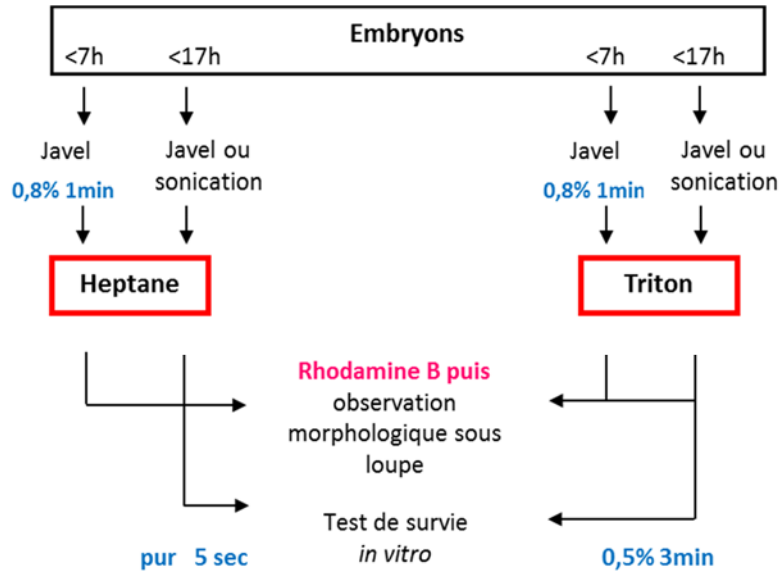


Figure 24 : schéma expérimental de la perméabilisation

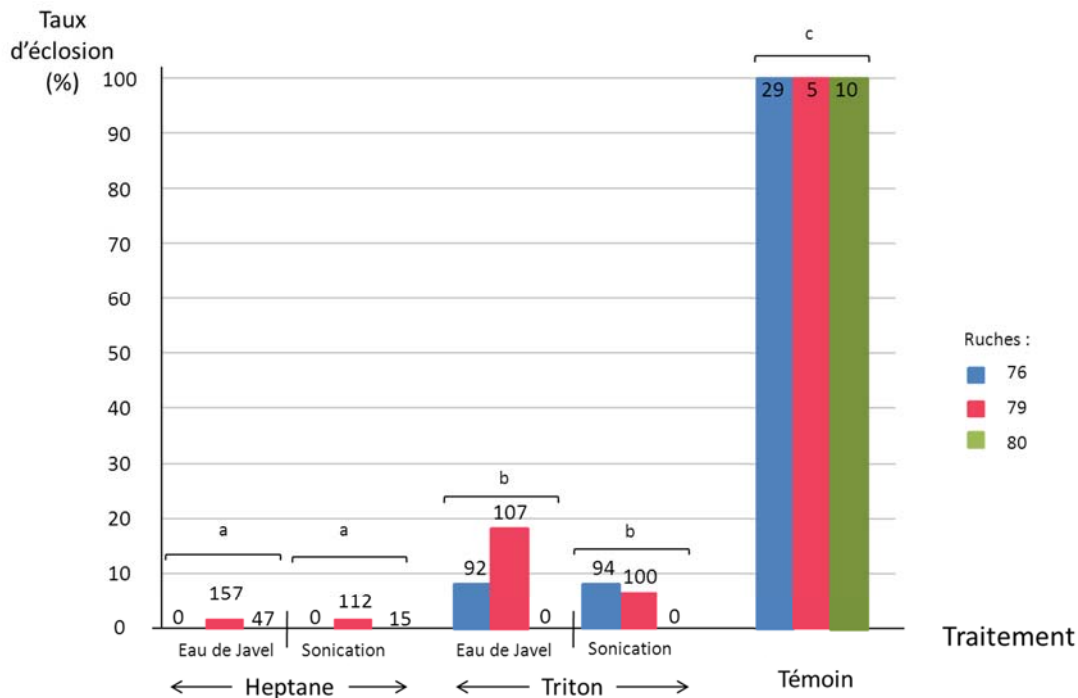
Les taux de perméabilisation obtenus avec les différents traitements, concentration en produit et durée d'action se trouvent dans le tableau 2.

Que ce soit pour des embryons de 7h ou de 17h au maximum, la pronase et la saponine n'ont pas donné de résultats de perméabilisation satisfaisants. Ils étaient soit trop hétérogènes ou nécessitaient des temps d'incubation trop longs (plus de 30 min pour la saponine avec des embryons de 7h). Ces deux produits, dans les conditions testées, n'ont pas été validés pour la perméabilisation de la membrane vitelline des embryons. Au contraire, le triton et l'heptane ont permis d'obtenir des résultats de perméabilisation assez prometteurs. Concernant l'heptane pur, 5 sec d'incubation ont suffi pour avoir une perméabilisation correcte et surtout pour que les embryons gardent leur forme. Un temps plus long, 10 sec pour des embryons de 7h et 30 sec pour des embryons de 17h, les abiment totalement : ils semblent 'se vider'. Concernant le triton, une concentration de 0,5% pendant 5 min pour des embryons de 7h et pendant 3 min pour des embryons de 17h semblent suffisantes. Ces produits sont tout de même des agents assez toxiques, il faut les appliquer le temps juste nécessaire et pas plus.





Les résultats des tests de survie *in vitro* réalisés sur des embryons de 17h au maximum après traitement de perméabilisation à l’heptane ou au triton, suivant les concentrations et temps d’action validés, et suite à une déchorionisation à l’eau de Javel ou par sonication, se trouvent sur la figure 25.



**Figure 25:** Taux d’éclosion *in vitro* en fonction des traitements de déchorionisation et de perméabilisation.

Sur chaque barre de l’histogramme sont indiqués les nombres d’embryons testés.

a, b : les traitements avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux,  $P < 0,05$ .

Cette expérience a été réalisée sur trois ruches du rucher extérieur. Un taux d’éclosion de 100% a été obtenu avec des embryons témoins, ce qui est excellent. Par contre, après traitement à l’heptane ou au triton, les taux d’éclosion chutent significativement comparés aux témoins ( $P = 0,004$ ), avec en moyenne 1% avec l’heptane et 10% avec le triton. Entre les deux traitements de perméabilisation, quel que soit le traitement de déchorionisation appliqué avant, le taux d’éclosion est significativement différent, avec une probabilité de 0,0022. Le triton à 0,5% appliqué pendant 3 minutes est moins dommageable pour l’éclosion de la future larve qu’avec l’heptane pur appliqué pendant 5 sec. Ces deux techniques, eau de Javel ou sonication couplées avec le triton ont seulement été testées sur deux ruches. Il faudrait pour s’assurer des résultats les tester sur plus de ruches.



#### d. Vitrification

La cryoconservation des embryons n'a pas été effectuée pour l'instant. Il était impératif auparavant de valider des conditions de déchorionisation et de perméabilisation permettant une survie *in vitro* des embryons jusqu'à l'éclosion. Or ces tests ont été longs à réaliser. De nombreux perméabilisants ont été testés et surtout, la période de ponte des reines n'était pas favorable au début du stage (janvier/février/mars) pour pouvoir travailler sur un grand nombre d'embryons, et ainsi valider des conditions expérimentales. La technique de vitrification a tout de même été détaillée dans ce rapport, car il est prévu que cette partie du projet soit démarrée entre le rendu du mémoire de stage et la fin de mon stage.

#### 4. Discussion et perspectives du projet

L'étude des embryons d'abeille, âgés de 17h maximum que nous avons réalisée en microscopie confocale et en épi-fluorescence nous a permis de bien visualiser la structure de ces embryons après coloration des noyaux, membrane et cytoplasme cellulaires. A ce stade du développement, les embryons d'abeille sont composés d'une couche cellulaire périphérique, renfermant de nombreux noyaux ce qui indique que les divisions cellulaires se font très rapidement chez cette espèce. Nos observations sont en accord avec celles réalisées par Nelson, il y a déjà un siècle (1915), sur des embryons au même stade de développement. Par contre, pour les embryons âgés de 7h maximum, malgré plusieurs tentatives avec différents fixateurs pour dissoudre les lipides du vitellus et différents marqueurs nucléaires, nous n'avons jamais réussi à mettre en évidence des noyaux. Ce résultat est surprenant et doit être dû à un problème technique que nous n'avons pas réussi à résoudre. En effet, à ce stade de développement, l'embryon se présente sous la forme d'un syncytium renfermant quelques noyaux en son centre (Nelson J.A., 1915 ; Fleig R. et Sander K., 1985). Une éventuelle solution serait peut-être de réaliser des coupes semi-fines ou fines des embryons, de les déposer sur lame et ensuite de les colorer avec les marqueurs de l'ADN comme précédemment. Les noyaux seraient peut-être plus accessibles aux marqueurs.

La cryoconservation des embryons nécessitant une entrée des cryoprotecteurs au cœur des cellules embryonnaires pour les protéger du froid, nous avons testé deux agents pour fragiliser le chorion des embryons, l'eau de Javel et la sonication.



Pour des embryons de 17h d'âge au maximum, nous avons validé un traitement de 0,3% d'eau de Javel pendant 30 secondes et un traitement de sonication durant 15 secondes permettant de déchorioniser les embryons tout en conservant leur forme et leur structure. Le traitement à l'eau de Javel a déjà été utilisé pour déchorioniser l'embryon d'abeille avant cryoconservation (Li *et al*, 2010). Ces auteurs ont utilisé une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 3% pendant 3 minutes sur des embryons de 17h avec succès sur la survie des embryons. Dans notre étude, avec des embryons de la même tranche d'âge, cette concentration en eau de Javel aurait totalement détruit l'embryon puisqu'une concentration de 0,8% pendant 1 minute était déjà trop forte. Cette diversité de réponse peut s'expliquer par la différence de sous espèces expérimentées dans les deux études. Ces auteurs ont travaillé sur des embryons d'abeille, *Apis mellifera carnica*, alors que nous, nous avons travaillé sur *Apis mellifera ligustica*. Cette sous espèce a peut-être un chorion plus épais et plus résistant. La deuxième hypothèse serait que la solution mère NaOCl de base utilisée dans cette publication soit à une concentration différente, ce qui n'est pas précisé.

La seconde technique de déchorionisation que nous avons testée, la sonication, est une technique tout à fait originale sur ce modèle et dans ce contexte. Les tests réalisés ont permis d'obtenir un taux moyen d'éclosion de 15% contre seulement 5% avec l'eau de Javel. C'est donc plutôt un point positif dans la perspective du projet. De plus, ce procédé physique comparé à l'utilisation de l'eau de Javel qui est un produit chimique, occasionne moins de dégâts secondaires sur l'embryon.

Si la technique de l'eau de Javel est maintenue en parallèle de celle de la sonication, il faudrait la tester à des concentrations encore plus faibles que 0,3% pendant 30 secondes sur des embryons de 17h, par exemple 0,2% voire même 0,1%. Le taux de survie devrait être meilleur et il est possible que la déchorionisation soit suffisante pour que les cryoprotecteurs pénètrent dans l'embryon.

Nous avons tenté de rendre poreuse la membrane vitelline, second frein à l'entrée des cryoprotecteurs, grâce à l'action d'une enzyme (la pronase), de détergents (la saponine et le triton) et d'un solvant (l'heptane). Pour des embryons de 17h d'âge au maximum, nous avons validé un traitement pendant 5 secondes d'heptane pur et un traitement à 0,5% de triton pendant 3 minutes, permettant de perméabiliser les embryons tout en conservant leur aspect initial. Le traitement à l'heptane avait déjà été validé précédemment chez des embryons de mouche domestique (Wang *et al*, 2000).



Sur plus de 300 embryons, ces auteurs ont obtenu un meilleur taux d'éclosion après traitement des embryons à l'heptane pur qu'à l'hexane, hydrocarbure à chaîne plus courte, 80% contre 70%.

Dans notre étude, les taux de survie après traitement à l'heptane sont très faibles comparés à ceux obtenus avec le triton, 1% contre 10%. Sur l'embryon d'abeille, à la différence de l'embryon de mouche domestique, l'heptane ne semble pas bien adapté, dans les conditions expérimentales de perméabilisation que nous avons validées, pour la survie de l'embryon. Le détergent semble plus efficace pour une perméabilisation des embryons couplée à une survie des embryons jusqu'à leur éclosion en larve. Comme nous pensions que le triton ferait de trop gros trous dans la membrane vitelline, la saponine, détergent moins drastique, avait été testée. Même à des concentrations très élevées, aucune perméabilisation n'a pu être obtenue. Ce détergent ne paraît pas efficace sur les embryons d'abeille dans les conditions où nous l'avons testé. Les résultats sont hélas identiques avec la pronase.

En perspective de cette étude de perméabilisation pour tenter d'augmenter les taux de survie des embryons après traitement, il faudrait se recentrer sur l'utilisation unique du triton, mais à des concentrations et/ou temps un peu plus faibles que ceux validés dans ce travail, tout en vérifiant que la membrane vitelline soit rendue suffisamment perméable aux cryoprotecteurs. Par exemple, une concentration à 0,5% pendant un temps de moins de 3 min pourrait commencer à être testée.

Au fil du temps et grâce aux nombreux essais réalisés, nous nous sommes rendus compte qu'il existait une forte variabilité de réponse des embryons aux traitements de déchorionisation et de perméabilisation, et ce même si les encagements étaient réalisés de la même manière. L'épaisseur du chorion s'affine très vite durant cette période. Pour pallier à ce biais, les effectifs d'embryons expérimentés pour l'étude de la survie *in vitro* ont été augmentés. Cette variabilité est due pour une grande partie à l'hétérogénéité de l'âge réel des embryons prélevés sur un même cadre qui a une influence sur l'épaisseur du chorion, celui-ci s'affinant au cours du développement embryonnaire jusqu'à disparaître au moment de l'éclosion. Les images que nous avons obtenues en fluorescence et qui montrent, pour un même lot d'embryons collectés à 17h d'âge au plus, un nombre très différents de noyaux sont une bonne illustration de l'hétérogénéité de l'âge des embryons. En effet, la reine a peut-être commencé à pondre après 4h comme après 14h d'encagement ou plus. Et même si elle a pondu dès 4h après encagement, au moment de la libération, c'est à dire au bout de 17h, les derniers œufs pondus peuvent avoir un écart d'âge de 13h comparés aux premiers.





Donc chaque cadre contient des embryons d'âge inconnu et probablement différent, ce qui influence l'épaisseur du chorion et fait varier les réponses des embryons aux tests de déchorionisation et de perméabilisation.

Afin de réduire cette hétérogénéité, il paraît important de changer le dispositif expérimental en réduisant les temps d'encagement, par exemple en engageant les reines uniquement de 11h du matin à 17h dans le dispositif à cupules. Comme il faut à la reine environ 4h d'acclimatation dans le cadre avant qu'elle ne pondre, nous pourrions obtenir avec ce protocole des embryons âgés de 2h maximum. Les embryons seraient ensuite placés en étuve, de 17h au lendemain 8h, dans les conditions *in vitro* de développement, qui nous ont donné de très bons taux de survie pour les témoins, de 80 à 100%. En fin de développement *in vitro*, les embryons seraient âgés de 17h au maximum, comme dans notre étude, mais l'écart d'âge de ces embryons, collectés sur un même cadre, serait de seulement 2h au maximum au lieu de 15h dans notre étude. Les réponses des embryons aux traitements de déchorionisation et de perméabilisation devraient être plus homogènes. Ce dispositif avec les cupules, ne peut être réalisé que sur des ruches qui sont en pleine activité de ponte, ce qui est le cas dès mai - juin dans nos régions. C'est pourquoi nous ne pouvions pas le tester pour ce stage et qu'un autre dispositif a été utilisé (cadre bâti). Les traitements de déchorionisation et de perméabilisation validés dans cette étude et les nouveaux proposés ci-dessus seront testés sur ces nouveaux embryons d'âge plus contrôlé.

L'étude proprement dite de la cryoconservation pourra alors être démarrée.



## 5. Conclusion

Les résultats obtenus durant ce stage, d'une durée de six mois, ont permis de mettre au point, sur des embryons d'abeille de 17h d'âge maximum, deux techniques de déchorionisation et une de perméabilisation efficaces. Des taux d'éclosion *in vitro* encourageants ont été obtenus avec ces traitements. Cependant, ce projet n'a pas entièrement abouti, par rapport à ce qui avait été envisagé, puisque le volet 'cryoconservation' n'a pas pu être abordé. Mais il ne faut pas oublier que travailler sur du matériel vivant impose des contraintes expérimentales plus ou moins drastiques. Dans notre cas, le travail ne pouvait avancer qu'en fonction de l'activité de ponte des reines. Même si le dispositif de rucher couvert, permet de maintenir une activité de ponte, celle-ci est réduite comparée à celle de la période estivale, d'avril à août, en rucher extérieur. Il n'en reste pas moins que grâce aux nombreux tests tout de même réalisés lors de mon stage (sur environ 12 000 embryons) et aux résultats obtenus, l'étape suivante, à savoir la vitrification, va pouvoir être abordée.

### Conclusion personnelle :

Ce projet, comme beaucoup d'autres en recherche, est un long travail de découverte et de prospection. Même si le projet n'est pas arrivé à ses fins, ces six mois de stage étaient très importants et incontournables pour l'avancée du projet.

Ce stage m'a également permis de découvrir, connaître le monde des abeilles et surtout m'a permis d'étudier l'embryologie de cette espèce.

Ces nombreuses manipulations m'ont également permis d'acquérir de solides notions sur le vocabulaire en laboratoire, sur la façon d'interpréter les résultats et de les exploiter.

## Références bibliographiques

- Bruneau E., 2006. Nutrition et Malnutrition des abeilles. Académie d'Agriculture de France, Abeille et Agriculture.
- Chauvin R., 1968. Le traité de l'abeille. Ed Elsevier/Masson.
- Dossier-presse INRA, 2014. Les chercheurs volent au secours des abeilles.
- Fleig R., Sander K., 1985. Blastoderm Development in Honey Bee Embryogenesis as Seen in the Scanning Electron Microscopy. International journal of invertebrate Reproduction and Development, Ed Elsevier. 8 (4-5): 279–286.
- Gallai N., Salles J.M., Vaissière E., Settele J., Economic Valuation of the Vulnerability of World Agriculture Confronted with Pollinator Decline. Ecologicals economics, Ed Elsevier. 2008 ; 68 : 810 – 821.
- Guignot F., 2005. Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. INRA Productions Animales. 18 (1): 27–35.
- ITSAP-Institut de l'abeille, 2015. 3<sup>ème</sup> journée de la recherche apicole. Synthèse de colloque, Paris. 57.
- Le Conte Y., Mollier P., Sarazin M., Savini I., Vaissière B., 2009. Le déclin des abeilles. n°9.
- Le Conte Y., Barbançon J-M., 2002. Le traité de l'apiculture. Ed Rustica 48344. p 528  
ISBN: 2-84038-421-3.
- Li Z., Xue Y., Wang Z., Li X., 2010. Cryopreservation of Queen Honeybee (*Apis Mellifera Carnica*) Born Worker Eggs by Vitrification. Agricultural Sciences in China. Ed Elsevier. 9 (9): 1353–1361.
- Mazur P., Cole K.W., Mahowald A.P. 1992. Critical factors affecting the permeabilization of *Drosophila* embryos by alkanes. Cryobiology. 29 : 210-39.
- Nelson J.A., 1915. The Embryology of the Honey Bee. Princeton University Press.
- Regard A., Adam, L., Douhet, D., 1977. L'abeille de A à Z. Ed 2. 10-17.
- Wang W.B., Leopold D.R., Nelson J.A., Freeman, T.P., 2000. Cryopreservation of *Musca Domestica* (Diptera: Muscidae) Embryos. Cryobiology. 41: 153–166,  
doi: 10.1006/cryo.2000.2278.



Wegener J., Blenefeld K., Al-Kahtani S., 2009. Collection of Viable Honey Bee (*Apis mellifera*) Larvae after Hatching in vitro. Journal of Apicultural Research. 48: 115–120, doi: 10.3896/ibra.1.48.2.05.

Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. Science, 178, 411-414.

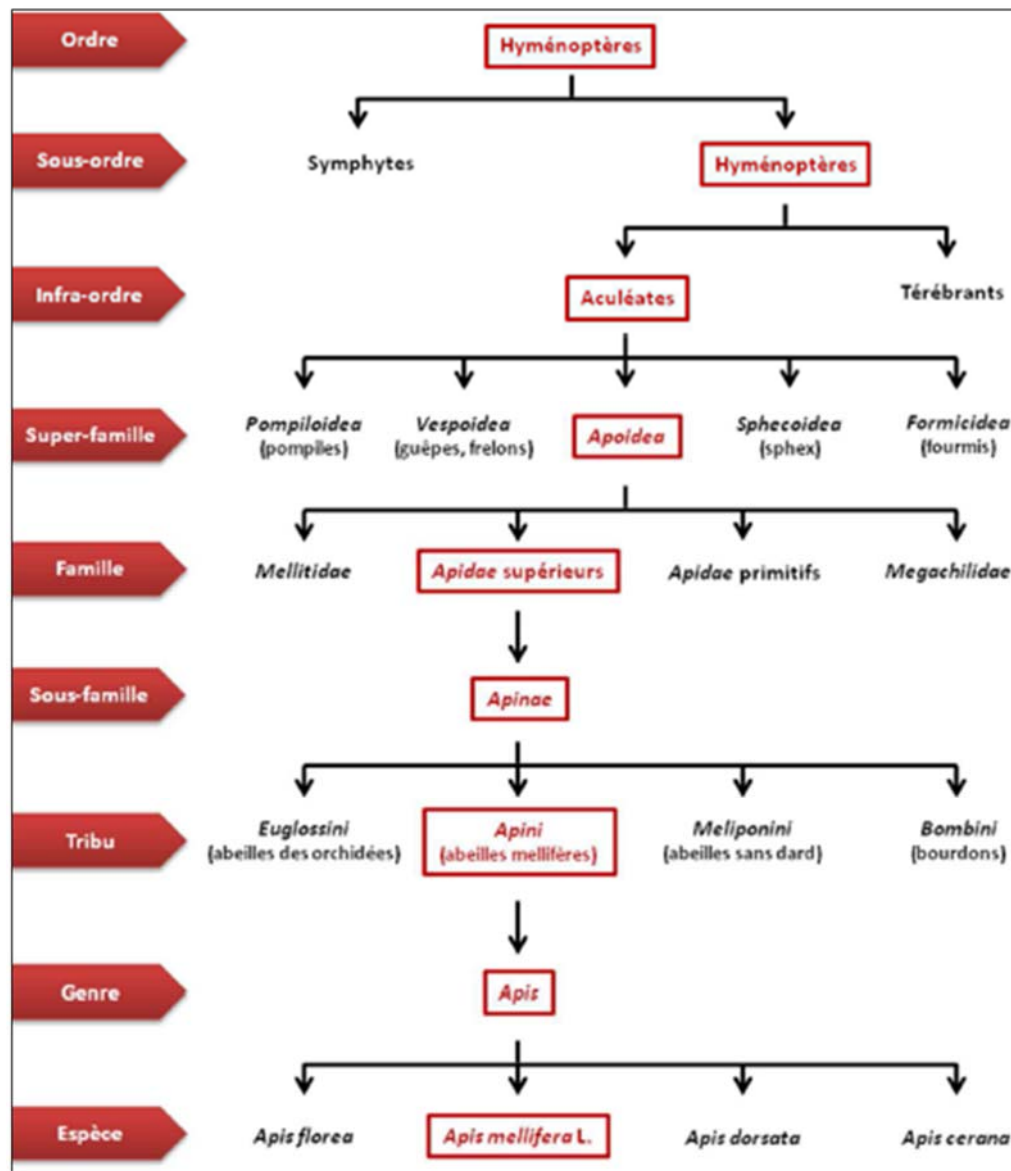
Wilmut I., Rowson L.E.A. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec., 1973, 92, 686-690.

Winston M.L., 1993. La Biologie de l'abeille. Ed Frison-Roche, Paris. p 276.





**Annexe 1 :** Classification systématique de l'abeille mellifère (d'après Le Conte Y., 2002)





**Annexe 2** : Milieu insecte Schneider (Sigma-Aldrich, S 0146)



Le milieu Schneider est composé de glutamine (acide aminé) ayant un rôle de protection immunitaire et réputé pour accélérer la guérison après une opération chirurgicale.



### Annexe 3 : Mode opératoire pour vitrifier des embryons d'abeille domestique - avril 2015 -

- **S1 : Sucrose 0,25 M :**

- Dans un tube à 100 ml, peser 3.42 g de sucrose et ajuster à 40 ml avec du milieu Schneider.
- Dissoudre entièrement le sucre en homogénéisant doucement (de haut en bas).
- Sera à utiliser aussi pour le bain de lavage après le premier bain avec les cryoprotecteurs.

- **S2 : Solution mère de vitrification** : (40/60 (v/v)), (final 0,17 M sucrose).

Pour infos : Densité du Glycérol : 1.25g/ml ; densité de EG : 1.11g/ml ; densité du milieu Schneider : 1g/ml.

- Dans un tube à 100 ml, pour faire 60 ml de solution mère, mettre 36 ml de S1.
- Ajouter les cryoP sur la balance : 22.5 g de glycérol (équivalent à 18 ml) et 6.66 g d'éthylène glycol (équivalent à 6 ml).
- Homogénéiser doucement.

- **Premier bain** avec les cryoprotecteurs : 25% de S2, ce qui donne pour 10 ml :

- 2.5 ml de S2 + 7.5 ml du milieu Schneider, pendant 20 minutes au frigo.

- **Deuxième bain** avec les cryoprotecteurs : 50% de S2, pour 10 ml (pour mimer l'ajout progressif réalisé dans la publication de Li Z., *et al en* 2010).

- 5 ml de S2+ 5 ml du milieu Schneider pendant 10 minutes (au frigo).

- **Troisième bain** (et dernier) avec les cryoprotecteurs : solution S2 pure,

- 5 min (ou + ?)

### Congélation dans l'azote liquide

#### Pour étudier la survie après le 1<sup>er</sup> bain de cryoprotecteurs :

- Mettre les embryons dans S1 pendant 10 min,
- Puis dans le milieu Schneider sans sucrose, pendant 2 min → étuve.

#### Pour étudier la survie après le 2<sup>ème</sup> bain de cryoprotecteurs :

- Mettre les embryons dans le premier bain pendant 10 min,
- Puis dans S1 pendant 5 min,
- Puis dans le milieu Schneider sans sucrose, pendant 2 min → étuve.

#### Pour étudier la survie après le 3<sup>ème</sup> bain de cryoprotecteurs:

- Mettre les embryons dans le deuxième bain pendant 10 min,
- Mettre les embryons dans le premier bain pendant 5 min,
- Puis dans S1 pendant 5 min,
- Et dans le milieu Schneider sans sucrose, pendant 2 min → étuve.



## **Abréviations**

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**CNRS** : Centre National de la Recherche Scientifique

**CRB** : Centre de Ressources Biologiques

**DMSO** : Dyméthylsulfoxyde

**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique

**IP** : Iodure de Propidium

**IRBI** : Institut de la Recherche sur la Biologie de l’Insecte

**K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Sulfate de Potassium

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NaOCl** : Hypochlorite de sodium (eau de Javel)

**PAF** : Paraformaldéhyde

**PRC** : Physiologie de la Reproduction et des Comportements

**UMR** : Unité Mixte de Recherche





## Résumé

L'abeille domestique, *Apis mellifera*, est considérée mondialement comme l'une des espèces les plus indispensables à la survie des êtres-vivants. Or de nombreuses menaces font diminuer leur effectif. L'objectif de ce projet est de réussir à cryoconserver des embryons d'abeille domestique afin de préserver son matériel génétique. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses étapes sont à franchir. Dans un premier temps, l'étude de la structure interne et externe des embryons de 7h et 17h d'âge au maximum a été réalisée en microscopie confocale et en épi-fluorescence après coloration. Dans un second temps, des tests de déchorionisation et de perméabilisation des membranes de l'embryon ont été réalisés. Un traitement à l'eau de Javel 0,3% pendant 30 secondes ainsi qu'une sonication pendant 15 secondes ont été validés pour déchorioniser des embryons de 17h au maximum. Parmi les 4 agents de perméabilisation testés, une enzyme (la pronase), deux détergents (la saponine et le triton) et un solvant (l'heptane), le triton 0,5% pendant 3 minutes et l'heptane pur pendant 5 secondes ont été validés sur des embryons de 17h. En outre, le triton 0,5% pendant 3 minutes, couplé à l'eau de Javel ou à la sonication, a permis d'obtenir le meilleur taux d'éclosion *in vitro* à partir d'embryons de 17h, en moyenne 10%, contre 1% seulement avec l'heptane. La prochaine étape à réaliser sera la cryoconservation des embryons par vitrification.

**Mots clés** : abeille, embryon, déchorionisation, perméabilisation, cryoconservation

## Abstract

The honeybee, *Apis mellifera*, is considered worldwide as one of the most vital species. However, nowadays, a lot of different threats decline their number. The objective of this study is to cryopreserve honeybee embryos in order to preserve its genetic material. To achieve this aim, a lot of steps are to be taken. First, the study of the internal and external structure of the embryos on at 7h-17h maximal age was performed by confocal microscopy and epi-fluorescence after staining. Secondly, the dechorionation tests and permeabilization of membranes were conducted. A dechorionation on of 17h old embryos was successfully performed with a bleach treatment of 0.3% for 30 seconds and a sonication for 15 seconds. Among the 4 permeabilizing agents tested, an enzyme (pronase), two detergents (saponin and triton) and a solvent (pure heptane), only triton at 0,5% for 3 minutes and heptane for 5 seconds showed positive results on embryos of 17h maximal age. In addition, 0.5% triton for 3 minutes, coupled with bleach or sonication, yielded the best hatching rate for *in vitro* embryos of 17h maximal age, on average 10%, against only 1% with heptane. The next step is the embryo cryopreservation using vitrification technique.

**Keywords**: honeybee, embryo, dechorionation, permeabilization, cryopreservation,

