

FIXATION ET INCLUSION EN PARAFFINE DE TISSUS D'ABEILLE POUR UNE OBSERVATION HISTOLOGIQUE

Mireille LEDEVIN ^{1,*}, Monique L'HOSTIS ², Thibaut LARCHER ¹

* mireille.ledevin@oniris-nantes.fr

1. INRA, UMR0703 PAnTher, Oniris, La Chantrerie, 44307 NANTES, France.

2. Oniris, Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Écosystèmes des Pays de la Loire, La Chantrerie, 44307 NANTES, France.

RESUME

La pollinisation d'environ deux tiers des plantes à inflorescence repose sur l'intervention d'insectes dits pollinisateurs dont les populations montrent un déclin progressif depuis une trentaine d'années. Parmi ces espèces, l'abeille domestique fait l'objet d'études afin d'identifier les facteurs à l'origine des mortalités observées. Afin de déterminer au niveau tissulaire l'impact des différents facteurs de stress sur les différentes castes d'abeilles, nous proposons ici une méthode originale de préparation d'échantillons entiers pour l'histologie. Nous avons optimisé les étapes de fixation et d'inclusion afin de permettre des coupes sagittales sériées d'individus à différents stades de développement et appartenant aux différentes castes (ouvrière, faux-bourdon et reine). Nous présentons les résultats obtenus et illustrons ici quelques spécificités tissulaires observées des différentes catégories d'individus observés.

MOTS CLES

Apis mellifera, Abeille, histologie

ABSTRACT

The pollination of about two-thirds of plants with inflorescence relies on so-called pollinator insects whose populations have been declining steadily over the past thirty years. Among these species, the honeybee is being studied to identify factors causing mortalities. In order to determine the impact of different stressors at the tissue level, we propose here an original method for the preparation of whole bee samples for histology. We have optimized the fixation and inclusion steps to allow serial sagittal sections of individuals at different stages of development and belonging to different castes (worker, drone and queen). Results are illustrated with some tissue specificities of the different individuals.

KEY WORDS

***Apis mellifera*, bee, histology**

INTRODUCTION

La pollinisation et donc la reproduction d'environ deux tiers des plantes à inflorescence reposent sur l'intervention d'insectes dits pollinisateurs. En sus de son importance écologique, la pollinisation revêt aussi une importance économique majeure sur les cultures pour une valeur globale estimée selon les études entre 153 milliards et 215 milliards de dollars [5, 12]. L'ensemble des abeilles assure un rôle majeur dans la pollinisation [13, 8]. De nombreuses populations de pollinisateurs sont aujourd'hui en déclin même si ce constat est à nuancer en fonction des zones géographiques [6]. Ce déclin peut prendre diverses formes : diminution des populations, diminution de la diversité des espèces, contraction de l'aire de répartition... L'identification des facteurs à l'origine de ce déclin repose principalement sur les études faites sur l'abeille domestique, *A. mellifera*. À ce jour, ces dangers, considérés la plupart du temps individuellement et encore rarement en association, restent encore partiellement caractérisés et nécessitent donc la mise en place de programmes de recherche intégrée, faisant intervenir de nombreuses disciplines scientifiques pour identifier, caractériser et quantifier l'impact relatif de ces dangers en considérant non seulement l'échelle de l'individu, mais aussi le cas échéant celui de la colonie et de la population.

L'étude de l'anatomie et de l'histologie de l'abeille contribue à caractériser l'état de santé des individus et des colonies et identifier les causes de mortalité. On trouve de belles et anciennes illustrations anatomiques notamment avec les travaux de C. Janet ou ceux de R.E Snodgrass [11] mais les descriptions et études histologiques sont rares [3]. Elles sont de fait plus souvent réalisées sur des tissus disséqués, dissection nécessitant une grande technicité du fait de la petite taille des organismes. Ces dissections sont souvent à l'origine d'artéfacts et surtout ne permettent pas d'étudier l'ensemble des tissus et les relations anatomiques qu'ils entretiennent entre eux. L'observation de coupes longitudinales d'Abeilles entières est rarement rapportée, elle permet pourtant d'étudier de manière exhaustive l'ensemble des tissus et de caractériser les tableaux lésionnels associés aux dangers biologiques et chimiques.

L'étude de la santé des abeilles doit prendre également en compte le fait qu'elles vivent en colonies pérennes dans lesquelles on distingue trois castes d'adultes morphologiquement différents : une reine unique, seule femelle apte à la reproduction, quelques centaines de mâles, aussi appelés faux-bourçons,

qui fécondent la reine lors du vol nuptial, et entre 10 000 et 60 000 ouvrières en fonction de la dynamique saisonnière de la colonie dont le rôle et les attributs évoluent avec l'âge. Le cycle biologique de l'abeille démarre par la ponte d'un œuf dans une alvéole par la reine. Le stade suivant correspond à celui de larve dont la fin de développement correspond à l'operculation. La nymphe se développe ensuite pour finalement donner naissance à une abeille. Au cours de ce cycle qui dure 21 jours pour une ouvrière, se mettent progressivement en place les caractéristiques de l'adulte. Toujours dans un objectif d'exhaustivité, il convient de réaliser les observations des tissus aux différents stades de la vie de l'abeille.

Fort de l'expérience acquise dans la préparation de coupes histologiques d'organismes entiers de différentes espèces (poisson zèbre, *Drosophile*), nous avons testé différents protocoles de préservation des tissus et de préparation de sections histologiques d'abeilles entières, à différents stades de développement et issues de castes différentes et nous présentons ici les principaux résultats obtenus.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons travaillé sur des colonies d'abeilles noires de l'île d'Ouessant, en collaboration avec le Conservatoire de l'île d'Ouessant. En raison de leur insularité, ces colonies présentent un état sanitaire remarquable, avec une reconnaissance officielle depuis 2014 du statut indemne de *Varroa destructor*. Différents stades de développement et différentes castes sont prélevés dans une dizaine de colonies fin août 2012.

1. Couvain

Les différents stades de couvain (ouvert et operculé) sont prélevés après repérage visuel dans les cadres. Un fragment (3 cm x 3 cm) est découpé puis immergé dans du formol tamponné à 4 % pendant sept jours. Après cette fixation, l'œuf, la larve ou la nymphe sont extraits mécaniquement de leur alvéole, placés en cassette histologique puis, selon un protocole classiquement utilisé pouvant se faire sur une nuit, déshydraté dans des solutions de concentrations croissantes d'éthanol, de méthylcyclohexane et enfin inclus en paraffine au moyen d'un automate à déshydrations sous vide (VIP6, Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq). Des sections

histologiques séries sagittales de 4 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (HM355S, MM France, Brignais) sur la base de repères anatomiques (pour la nymphe, les plans passant par l'œil, le nerf optique et le plan médian sont facilement repérables) avant d'être colorées en hémalun-éosine safran (HES) ou à l'acide périodique de Schiff (APS) et montées entre lame et lamelle.

2. Adultes

Des individus adultes des 3 castes (229 ouvrières, 29 faux-bourçons et 15 reines) sont capturés dans la ruche. Les individus sont d'abord anesthésiés par le froid positif puis euthanasiés par immersion dans du formol à 4 %. Nous comparons différents milieux de fixation composés (**Tableau 1**), d'un fixateur (mélange de formol ou alcool 60 % avec chloroforme 30 %) d'une solution acide (acide acétique ou nitrique) et d'acide picrique. Après fixation, les échantillons sont déshydratés

Désignation du fixateur	Composition	
Carnoy et acide nitrique à 6%	Alcool absolu Chloroforme Normapur (CAS 67-66-3, VWR Fontenay Sous-Bois) Acide acétique Normapur (CAS 64-19-7, VWR) Acide nitrique Normapur (CAS 7697-37-2, Prolabo, Sion)	53 % 30 % 10 % 7 %
Formol	Formaldéhyde stabilisé à 4 % (MM France, Brignais)	
Formol et acide nitrique 6 %	Formaldéhyde stabilisé à 4 % Acide nitrique Normapur	94 % 6 %
Liquide de Bouin	Solution aqueuse saturée en acide picrique (CAS 88-89-1, Sigma, Saint Louis Missouri) Formaldéhyde stabilisé à 4 % Acide acétique Normapur (CAS 64-19-7, VWR,)	75 % 20 % 5 %
Mekerji	Solution acide picrique saturée dans alcool 90° (Acide picrique, CAS 88-89-1, PANREAC, Lyon) Formaldéhyde stabilisé à 4 % Acide nitrique Normapur	70 % 23 % 7 %

Tableau 1 : Composition des différents fixateurs testés.

et inclus en paraffine à l'aide d'un automate à déshydratation sous vide selon un cycle allongé par rapport aux cycles classiquement utilisés (**Tableau 2**). Sont ensuite réalisées des sections sagittales sériées de 4 µm d'épaisseur tous les 50 µm entre le plan passant par l'œil et le plan médian. Les sections sont déposées sur lames polysine (Menzel, VWR, Fontenay Sous-Bois) puis séchées à l'étuve à 37 °C pendant une nuit avant coloration à l'HES et montage entre lame et lamelle.

Étape	Réactif	Durée	Température	Cycle vide / pression
1	Formol	2h30	35 °C	Oui
2	Formol	2h30	35 °C	Oui
3	Alcool 95°	2h00	35 °C	Oui
4	Alcool 95°	2h00	35 °C	Oui
5	Alcool 100°	2h00	35 °C	Oui
6	Alcool 100°	2h00	35 °C	Oui
7	Alcool 100°	2h00	35 °C	Oui
8	MCH	2h00	35 °C	Oui
9	MCH	2h00	35 °C	Oui
1	MCH	2h00	35 °C	Oui
11	Paraffine	2h00	58 °C	Oui
12	Paraffine	2h00	58 °C	Oui
13	Paraffine	2h00	59 °C	Oui

MCH : Méthylcyclohexane.

Tableau 2 : Programme de fixation utilisé sur l'automate à déshydratation sous vide.

RESULTATS

Une évaluation de la qualité des préparations histologiques est réalisée systématiquement par observation microscopique. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous pour les différents stades de développement et castes d'abeille. La qualité de fixation du prélèvement est d'abord évaluée lors de la coupe sur la base de l'absence de rétraction du prélèvement, de la facilité de coupe, de l'absence de formation de plis et de l'étalement au bain-marie. Après coloration, l'homogénéité de celle-ci et le respect des structures tissulaires sont également évalués. Les meilleures préparations permettent une observation histologique des différents tissus dont les plus caractéristiques sont illustrés ci-dessous à titre d'exemple.

1. Couvain

La préparation pour l'histologie des premiers stades de développement ne présente pas de difficultés particulières. La fixation au formol et l'inclusion en paraffine selon des protocoles classiques permettent une coupe des échantillons relativement aisée. Une coloration topographique à l'HES met en évidence les principales structures internes (**Figure 1**). Au stade de larve, la segmentation du corps n'est pas encore visible. Dans la cavité interne, on remarque l'abondance des cellules de réserve riches parmi lesquelles on distingue les trophocytes plus nombreux et au contenu granuleux et les œnocytes. Au stade de nymphe, la segmentation du corps en 3 parties, tête, thorax et l'abdomen est alors visible (**Figure 2**). Quel que soit le stade de développement de la nymphe, on n'observe pas de variations sensibles des résultats obtenus malgré la maturation progressive de la cuticule dont la pigmentation apparaît.

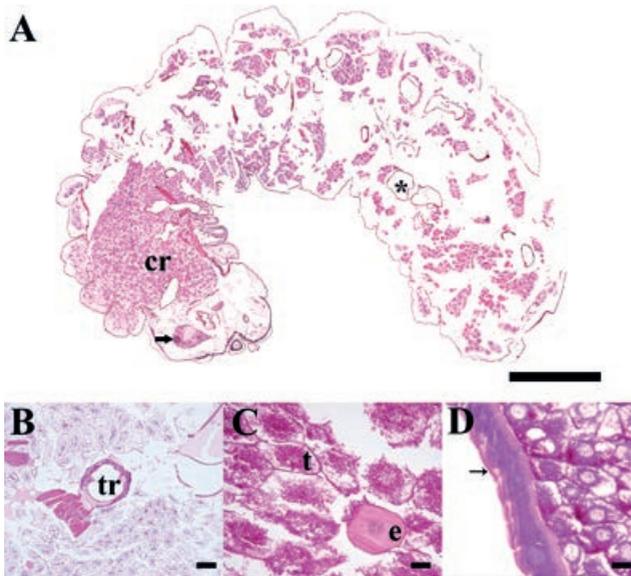


Figure 1 : A. Section para-médiale de larve. La larve vermiforme présente une accumulation importante de cellules de réserve (cr) réparties en îlots autour du tube digestif (*) et formant un volumineux amas dans la région antérieure dans laquelle on reconnaît le système nerveux central (flèche noire). B. Trachée (tr). C. Parmi les cellules de réserves, à plus fort grossissement, on distingue les trophocytes (t) et les œnocytes (e). D. Paroi du tube digestif au sein duquel on distingue la membrane péritrophique (flèche noire). A. Hémalum-Éosine-Safran (HES), barre = 1000 µm. B. HES, barre = 100 µm. C et D. Acide périodique de Schiff (APS), barre = 50 µm.

A

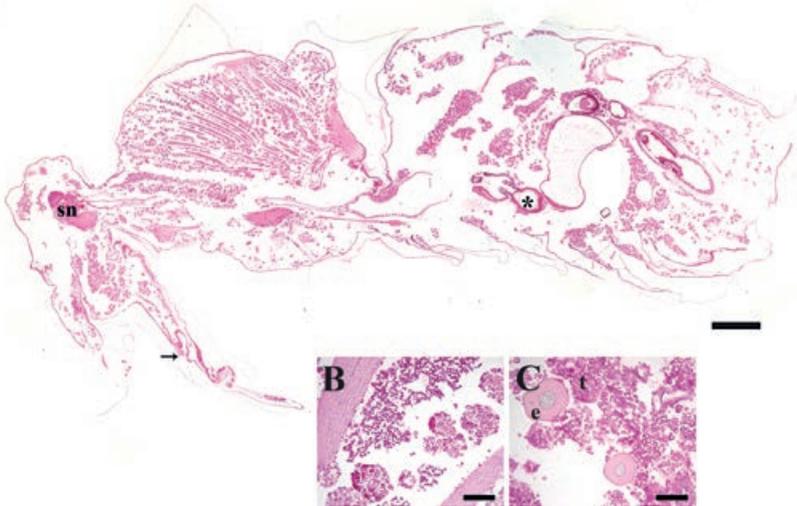


Figure 2 : A. Section médiale de nymphe. La nymphe présente une segmentation du corps en 3 parties caractéristiques (tête, thorax, abdomen). Au niveau de la tête, on reconnaît les pièces buccales (flèche noire) et le système nerveux central (sn) autour duquel sont présents des lobules de glandes salivaires. Le thorax présente des faisceaux de fibres musculaires squelettiques s'insérant sur la cuticule et entre lesquelles sont présentes de nombreuses cellules de réserve. Au sein de l'abdomen, le tube digestif (*) est différencié en différentes portions autour desquelles sont aussi présentes des cellules de réserve. B. À plus fort grossissement en région thoracique, on distingue entre des faisceaux de fibres musculaires, les granulations cytoplasmiques des trophocytes colorées à l'APS. C. En région abdominale, de nombreux trophocytes (t) et aenocytes (e) sont colorés par la coloration d'APS. A. HES, barre = 1000 µm. B et C. APS, barre = 50 µm.

2. Adultes

Les principales difficultés rencontrées chez l'adulte résultent de la présence de la cuticule. La fixation optimale est obtenue avec une immersion pendant 7 jours dans une solution de formol 4 % à laquelle on ajoute de l'acide nitrique 6 % pour ramollir la cuticule (**Tableau 3**). Devant la difficulté pratique à utiliser sur le terrain une solution d'acide nitrique concentrée (codes de danger : H272, H314), un protocole alternatif consiste à fixer le spécimen pendant 48 heures dans une solution de formol tamponné classique (durée usuelle d'acheminement après l'acte de prélèvement) puis de remplacer cette solution par un mélange de formol 4 % et d'acide nitrique 6 % pour une durée de 5 jours (étape pouvant être assurée à réception au laboratoire). Dans tous les cas, la coupe est l'étape la plus délicate du

Fixateur	Résultat
Carnoy et acide nitrique	Fixation sub-optimale Cuticule légèrement ramollie
Formol	Fixation optimale Cuticule légèrement ramollie
Formol et acide nitrique	Fixation optimale Cuticule ramollie
Liquide de Bouin	Fixation insuffisante Cuticule dure
Mekerji	Fixation sub-optimale Cuticule ramollie

Tableau 3 : Résultats obtenus avec les différents fixateurs sur les ouvrières adultes.

fait de la différence de consistance entre la cuticule et le reste du corps. Une coupe sur deux environ présente des détachements de tout ou parties de la cuticule entraînant des arrachements des tissus s'insérant sur celle-ci et des superpositions de tissus à l'étalement. Les résultats sont comparables pour toutes les castes adultes considérées. Selon le niveau de coupe, les tissus et organes observés diffèrent. Chez la reine par exemple, une section proche du plan médian permet d'observer le dard, la glande à venin ou encore la spermathèque tandis que les ovaires sont visibles sur la plupart des niveaux de coupe. La qualité des sections histologiques permet l'observation à plus fort grossissement des détails tissulaires et cellulaires (Figures 3, 4 et 5).

DISCUSSION

L'analyse histologique de sections tissulaires est un outil utilisé en routine pour l'étude de la pathologie des maladies des vertébrés. Cette approche est plus rarement utilisée chez les insectes en raison d'une part du manque de descriptions des tissus normaux et lésionnels rendant l'interprétation des observations difficiles et d'autre part de la difficulté à réaliser des coupes histologiques de qualité satisfaisante [9].

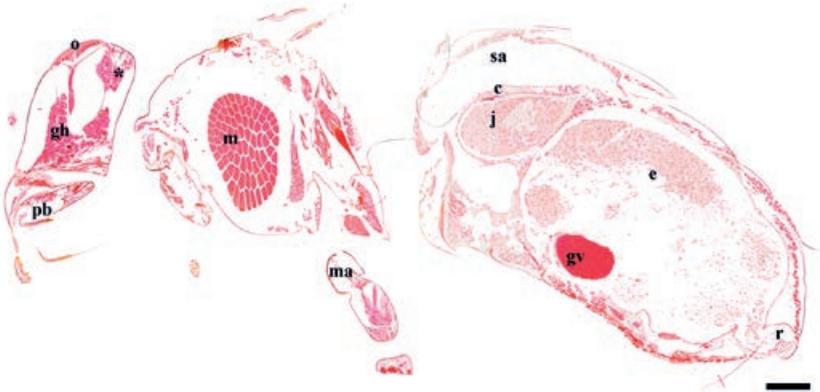


Figure 3 : Section sagittale d'une ouvrière adulte passant par l'œil. Au niveau de la tête sont présents les pièces buccales (pb) et l'œil composé (o). En partie interne, on distingue différentes glandes salivaires (*) et hypopharyngiennes (gh). Sur le thorax s'insèrent les membres articulés (ma) et les ailes. La musculature alaire (m) est proéminente. Chez l'ouvrière, la majeure partie de l'abdomen est occupé par un tube digestif volumineux (j = jabot, e = estomac, r = rectum) et par les sacs aériens (sa). Le cœur (c) et la glande à venin (gv) sont également visibles. HES, barre = 1000 μ m.

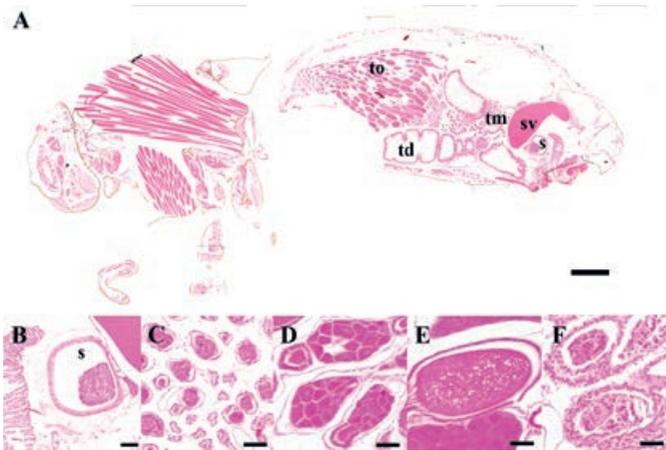


Figure 4 : A. Section sagittale d'une reine adulte passant par l'œil. La tête et le thorax présentent une organisation comparable à celle de l'ouvrière. Dans l'abdomen, en plus du tube digestif (td), on distingue les tubes de Malpighi (tm), le sac à venin (sv), la spermathèque (s) et le dard. Les tubes ovariens (to) occupent une large portion de l'abdomen antérieur. B. À plus fort grossissement, on distingue le contenu de la spermathèque (s). C à E. Dans les tubes ovariens, les follicules mûrissent en respectant une organisation spatiale antéro-postérieure : follicules immatures (C), en cours de maturation (D) et pré-ponte (E). F. Aspect du tube ovarien post-ponte. A. HES, barre = 1000 μ m. B. HES, barre = 50 μ m. C à F. HES, barre = 50 μ m.

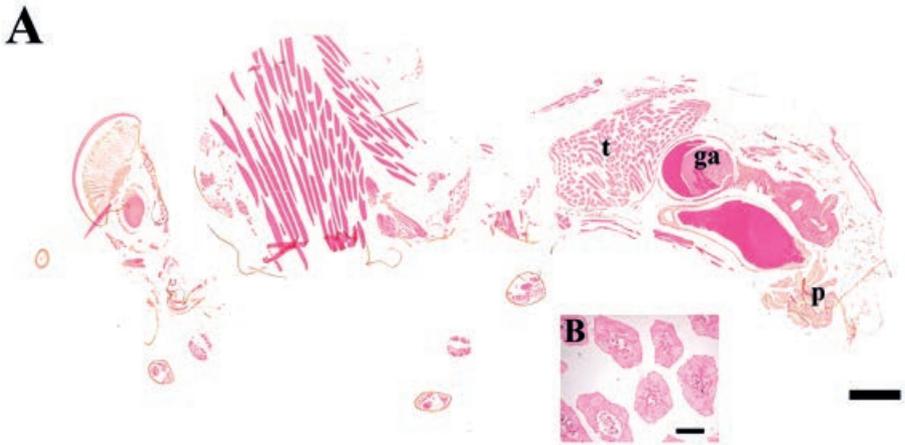


Figure 5 : A. Section sagittale d'un faux-bourdon adulte passant par l'œil. La tête et le thorax présentent une organisation comparable à celle de l'ouvrière et de la reine. Dans l'abdomen, on distingue en particulier l'appareil reproducteur mâle comprenant les testicules (t), les glandes annexes (ga) et le pénis (p). B. À plus fort grossissement, on visualise le contenu des canaux séminifères. A. HES, barre = 1000 μm . B. HES, barre = 50 μm .

Contraintes techniques propres à l'abeille

Une des particularités des arthropodes est de posséder un exosquelette qui entoure l'ensemble des tissus et organes. Chez les insectes, cet exosquelette comprend un hypoderme, une cuticule riche et une couche cireuse. Parmi les composants de la cuticule, on trouve la cuticuline dont la teneur augmente au cours du développement et qui est responsable des propriétés imperméable et rigide de l'exosquelette [4, 15]. Les propriétés de cette cuticule conditionnent en grande partie les choix techniques pour la préparation en histologie.

Perméabilisation et ramollissement de la cuticule

La fixation est la première étape de préparation des échantillons en vue de leur observation histologique. La fixation bloque les processus de dégradation tissulaire *post-mortem* et augmente la consistance des tissus mous. De nombreuses méthodes sont décrites pour techniquer les tissus durs de mammifères [2] mais chez les insectes, ces méthodes sont souvent décevantes [9]. Notre étude compare

donc différents milieux de fixation dont les propriétés doivent permettre de diffuser à travers la cuticule pour permettre la fixation de l'ensemble des tissus. Cette diffusion du fixateur est favorisée par l'usage d'un agent perméabilisant parmi lesquels un certain nombre répertorié dans la littérature sont aujourd'hui considérés de toxicité trop élevée pour un usage courant voire même ne sont plus disponibles [1]. Nos essais comparatifs ont permis de démontrer l'utilité de l'acide nitrique. Son ajout à la solution de formol contribue à perméabiliser et à ramollir la cuticule rendant possibles les étapes techniques suivantes chez l'adulte. La larve et la nymphe à l'inverse ne nécessitent pas de milieu de fixation particulier. Afin de tenir compte des contraintes de prélèvements sur le terrain, une solution de fixation ne contenant pas d'acide nitrique peut être alternativement utilisée pendant les premières heures de fixation. Les résultats obtenus lors de nos tests sont proches de ceux obtenus avec le mélange de formol et d'acide nitrique 6 % utilisé dès le début de l'étape de fixation.

Inclusion

L'inclusion du prélèvement doit se faire dans une matrice suffisamment rigide pour permettre une coupe fine. Les techniques de routine utilisant la paraffine et des temps d'inclusion sur la nuit produisent des blocs difficiles à couper quand il s'agit d'abeilles adultes (fragmentation des tissus). Une technique d'inclusion alternative dans un mélange de paraffine et d'agar a été décrite, ce dernier est néanmoins à l'origine d'une coloration artéfactuelle de l'ensemble du prélèvement qui, sans gêner l'observation morphologique, nécessite cependant un post-traitement des images en vue de leur publication sur fonds blanc [9]. Le recours à une inclusion en résine (Technovit, méthacrylate) a aussi été décrit chez les stades larvaires [10]. La finesse des détails cytoplasmique est alors maximale. L'inconvénient majeur de cette méthode est lié à l'impossibilité d'automatiser l'inclusion en résine dans un automate classique. Afin de proposer une méthode utilisable en routine sur un grand nombre de prélèvements, nous avons fait le choix dans la présente étude de conserver la paraffine, matrice d'inclusion la plus répandue dans tous les laboratoires d'histologie, très simple d'utilisation et d'augmenter les temps du processus d'inclusion. Aussi, l'utilisation d'un automate à déshydratation et à inclusion qui en faisant varier la pression, permet une meilleure circulation des fluides produit des résultats satisfaisants [14]. Dans ces conditions, il est possible de réaliser des coupes histologiques à tous les stades de développement et pour

toutes les castes. Cette étape de coupe reste critique avec un taux élevé de coupes ne respectant pas la morphologie générale. Dans la plupart des cas néanmoins, les détails cellulaires sont très bien conservés.

Perspectives

Les préparations tissulaires générées par cette méthode serviront à mieux décrire les structures normales et les lésions de l'abeille. Il s'agit d'un prérequis nécessaire à la compréhension des processus morbides à l'échelle tissulaire et cellulaire.

En plus de définir les conditions de préparation optimales pour étudier l'histologie d'abeilles entières, la campagne de prélèvements réalisée au cours de cette étude sur les colonies d'abeilles noires d'Ouessant a permis de constituer une banque de tissus de référence. Cette île est en effet reconnue indemne de *Varroa spp.*, statut sanitaire aujourd'hui limité à de très rares zones géographiques dans le monde (Australie, île de La Réunion). Cette banque pourra servir de support à la description des lésions spontanées observées dans des colonies préservées, lésions qui pourront ensuite être comparées à celles de colonies soumises à différents stress biologiques et chimiques et servir de base à l'établissement de tableaux lésionnels spécifiques. L'objectif est à terme de proposer une méthodologie d'orientation diagnostique permettant de mieux cibler les examens complémentaires (virologie, bactériologie, toxicologie) à réaliser en présence de colonies affaiblies. La connaissance de l'histopathologie de l'abeille permettra également de compléter l'identification de marqueurs tissulaires de l'état de santé des colonies [7], marqueurs utiles au suivi de l'élevage apicole et à l'évaluation de la toxicité environnementales des produits phytosanitaires.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'association Bee My Friend (Menou) pour son soutien et l'association pour la conservation, la sélection et le développement de l'Abeille Noire (écotype breton) pour son accueil à Ouessant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barbosa P. Manual of basic techniques in insect histology. Autumn Publishers, Massachusetts, 1994
2. Callis GM. Theory and practice of histological techniques. Ed. Bancroft and Gamble. 6th edition. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2008
3. Carr J, Chen K-J, Scudamore CL. Beauty is in the "eye" of the beholder. *Bee World*. 2012; **8** (3): 8–9
4. von Frisch K. Vie et moeurs des abeilles. Ed. Albin Michel, Paris, 1969
5. Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*. 2009; **68** (3): 810–21
6. Goulson D, Lye GC, Darvill B. Decline and conservation of bumble bees. *Annu. Rev. Entomol.* 2008; **53** :191–208
7. Malaspina OM, da Silva-Zacarin ECM. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Braz. J. Morphol. Sci.* 2006; **23** (3-4): 303-309
8. Murray TE, Coffey MF, Kehoe E, Horgan FG. Biological Conservation. *Biological Conservation*. 2013; **159** (C): 269–76
9. Scudamore CL, MacMillan I, Carr J. An improved double embedding technique for the microscopic evaluation of honey bees. *J. Api Res.* 2012; **51** (4): 365–6
10. da Silva-Zacarin ECM, Chauzat MP, Zeggane S, Drajnudel P, Schurr F, Faucon JP. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*. 2012; **8**: 696–703
11. Snodgrass R.E. Anatomy and Physiology of the Honeybee. Ed. McGraw-Hill, New York, 1925
12. Vanbergen AJ, Initiative TIP. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2013; **11** (5): 251–9
13. Williams PH, Osborne JL. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*. 2009; **40** (3): 367–87
14. Winsor L. Laboratory Histopathology, A complete reference, Ed. Anthony E Woods, Roy C, Paris, 1994
15. Winston ML. La biologie de l'abeille. Ed. Frison-Roche, Paris, 1993