



République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie – El-Harrach – Alger

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش – الجزائر

Département : Zoologie agricole et forestière

Ecole doctorale : Biologie et Ecologie en Zoologie Agro Forestière

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences agronomiques

Sujet

Importance de l'action de quelques espèces de bactéries entomopathogènes sur certaines glandes de l'abeille domestique *Apis mellifera* - possibilités de traitements

Présentée par : M. GUERZOU Mokhtar

Soutenue le 21 /12 / 2017

Soutenu devant le jury :

Président : M. DOUMANDJI S.

Professeur (E.N.S.A. El Harrach)

Directeur de thèse : Mme. DOUMANDJI A.

Professeur (U.S.D.B Blida)

Co-directeur de thèse : M. HAMMACHE M.

M.C.A. (E.N.S.A. El Harrach)

Examineurs : Mme. BOUTEKRABT L.

Professeur (U.S.D.B Blida)

M. BICHE M.

Professeur (E.N.S.A. El Harrach)

Mme. BELAID M.

M.C.A (U.M.B Boumerdès)



Remerciements

Au terme de ce travail, **Je** tiens à exprimer mes remerciements à ma Directrice de thèse Madame DOUMANDJI Amel, Professeur à l'université Saâd Dahleb, Blida, pour le temps qu'elle a consacré pour achever ce travail, ses précieux conseils et ses encouragements, pour sa gentillesse et surtout pour ses qualités humaines, Merci infiniment madame.

Ji bien aussi à remercie Dr ALILI Dahmane, Maître de Conférences B à l'université de BBA pour son aide.

Ma profonde gratitude, ma reconnaissance et mes remerciements vont à Monsieur HEMMACHE Miloud, Maître de Conférences à Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie – El-Harrach -Alger, qui a codirigé ce travail, ses précieux remarques et ses conseils m'ont beaucoup apporté. Merci beaucoup Monsieur.

Ma reconnaissance et mes remerciements s'adressent également à M. DOUMANDJI Salaheddine. Professeur au département de Zoologie agricole et forestière, qui a bien voulu présider le jury pour ses encouragements et ses précieux conseils durant la période de ce travail.

Je tiens à remercier Madame BOUTEKRABT L. Professeur à l'Université de Blida, et Monsieur BICHE Mohammed, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie – El-Harrach – Alger ainsi que Madame BELAID Messaouda, Maître de Conférences A à l'Université M'Hamed BOUGARA, Boumerdes, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Ma gratitude va également à Mme DOUMANDJI - MITICHE Bahia Professeur au département de Zoologie agricole et forestière pour son aide pour l'obtention du matériel et produit et surtout pour sa gentillesse et sa disponibilité au niveau de département.

Je tiens à remercier aussi Monsieur MAAMAR F. qui m'a facilité l'apport des abeilles domestiques de sa ruche durant toute la période de l'expérimentation.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Monsieur SILIMI A., Directeur générale d' EM- Algeria pour avoir mettre à ma disposition une grande quantité de EM-A ce qui m'a permet de réaliser la partie originale de l'étude.

Je remercie également Mme BENCHERIF S., Responsable de laboratoire vétérinaire régionale de Laghouat, ainsi que Monsieur KHELIFI A. Directeur du laboratoire CAQUE de la wilaya de Djelfa pour m'avoir faciliter l'accès à ces laboratoires pour effectuer ce travail.

Que M. Aissa ingénieur à la faculté SNV de l'université de Djelfa trouve ici l'expression de mes remerciements

Mes vifs remerciements vont aussi à M. AZOUZI Bilel Professeur à l'université Ziane Achour, Djelfa pour le traitement statistique des résultats

Ma gratitude s'adresse aussi à Mme GUERZOU F. et M. GUERZOU L. pour leurs aides et pour leurs encouragements qui m'ont permis d'arriver à ce jour là.

Je remercie également Mmes SAADA N. et BENZARA F. de la bibliothèque du département de Zoologie agricole et forestière ainsi que à M. RAHMOUNE de la bibliothèque de département de biologie de l'université de Djelfa pour leur disponibilité.

Un grand merci pour tous ceux qui ont de près ou de loin participé à la réalisation de ce travail.

Mokhtar

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| Remerciements | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Introduction | 01 |
| Chapitre I - Généralités sur l'abeille domestique <i>Apis mellifera</i> | 04 |
| 1.1- Position systématique de l'abeille domestique <i>Apis mellifera</i> | 04 |
| 1.2 - Quelques mœurs caractérisant la colonie d'abeille..... | 05 |
| 1.3 - Cycle de développement naturel de la colonie d'abeilles..... | 06 |
| 1.4 - Morphologie et anatomie de l'abeille..... | 08 |
| 1.4.1 - Morphologie de l'abeille..... | 08 |
| 1.4.1.1. - Morphologie du corps d'abeille..... | 08 |
| 1.4.1.2. - Tête des abeilles..... | 08 |
| 1.4.1.3. - Description du thorax des abeilles..... | 09 |
| 1.4.1.4. - Abdomen des abeilles..... | 09 |
| 1.4.2. - Anatomie interne..... | 10 |
| 1.4.2.1. - Système nerveux..... | 10 |
| 1.4.2.2. - Système respiratoire..... | 10 |
| 1.4.2.3. - Système digestif..... | 11 |
| 1.4.2.4. - Système circulatoire..... | 12 |
| 1.5. - Structure de la colonie d'abeille..... | 12 |
| 1.5.1. - La reine..... | 13 |
| 1.5.2. - L'ouvrière | 13 |
| 1.5.3. -Le mâle (Faux bourdon)..... | 14 |
| 1.6. - Les glandes de l'abeille domestique | 14 |
| 1.6.1. - La glande hypopharyngéenne..... | 16 |
| 1.6.2. - La glande cirière..... | 17 |
| Chapitre II - Déclin de l'abeille domestique <i>Apis mellifera</i> | 20 |
| 2.1. - Effet du climat sur les populations d'abeilles..... | 20 |
| 2.1.1. - Actions anthropiques sur les abeilles | 20 |
| 2.1.2. - Effets des pesticides sur les abeilles mellifères | 21 |
| 2.2. - Effets des prédateurs..... | 21 |
| 2.2.1. - <i>Aethina tumida</i> | 21 |
| 2.2.2. - <i>Vespa velutina</i> et autres frelons..... | 22 |
| 2.2.3. - La fausse teigne..... | 23 |
| 2.2.4. - Autres prédateurs..... | 24 |
| 2.3. - Effet des bactéries pathogènes..... | 25 |
| 2.3.1. - La loque américaine | 26 |
| 2.3.2. - La loque Européenne | 28 |
| 2.4. - Effet des parasites | 30 |
| 2.4.1. - la varroase..... | 30 |
| 2.4.2. - <i>Acarapis woodi</i> | 31 |
| 2.5. - Effet des virus | 32 |
| 2.5.1. - Le virus des ailes déformées (Deformed Wing Virus)..... | 32 |
| 2.5.2. - Le virus de couvain sacciforme (Sacbroodbee virus)..... | 34 |
| 2.5.3. - Le virus de la paralysie aiguë (Acute beeparalysis virus)..... | 35 |
| 2.5.4. - Le virus de la paralysie chronique, ou maladie noire (Chronicbeeparalysis virus)..... | 35 |
| 2.5.5. - Le virus de la cellule royale noire (Black queen cell virus)..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 2.5.6. - Le virus du Cachemire (Kashmirbee virus)..... | 36 |
| 2.6. - Effet des champignons | 36 |
| 2.6.1. - Nosémose..... | 36 |
| 2.6.2. - <i>Ascospheara Apis</i> | 38 |
| 2.6.3. - <i>Aspergillus flavus</i> | 39 |
| 2.6.4. - <i>Ascosphearaalvei</i> | 39 |
| 2.6.5. - <i>Aspergillus niger</i> | 39 |
| Chapitre III - Matériel et méthodes | 41 |
| 3.1 - Récolte du matériel biologique..... | 41 |
| 3.2. - Travail réalisé aux laboratoires..... | 42 |
| 3.2.1 - Les bactéries entomopathogènes utilisés | 42 |
| 3.2.2. - Effets sur la quantité de la cire produite et le nombre des lamelles cirières..... | 43 |
| 3.2.3. - Effets des bactéries entomopathogènes sur la glandehypopharygienne(G.H.P)..... | 47 |
| 3.2.3.1. - Préparation de l'échantillon de protéines..... | 47 |
| 3.2.3.2. - Dosage des protéines | 50 |
| 3.2.4. - Essai de l'effet du biopesticide produit à base des micro-organismes efficaces (E.M-Activé)..... | 52 |
| 3.2.4.1. - Description du produit..... | 52 |
| 3.2.4.2. - Préparation de produits testé EM- activé..... | 53 |
| 3.3. - Isolement des <i>Bifidobacterium</i> | 55 |
| 3.3.1. - Principe..... | 55 |
| 3.3.2. - Mode opératoire..... | 55 |
| 3.3.2.1. - Pré- enrichissement..... | 55 |
| 3.3.2.2. - Incubation..... | 55 |
| 3.3.2.3. - Lecture..... | 55 |
| 3.3.2.4. - Dénombrement | 56 |
| 3.4. - Identification biochimique de la souche bifide..... | 59 |
| 3.4.1. - Test de la catalase..... | 59 |
| 3.4.2. - Coloration de Gram..... | 60 |
| 3.4.2.2. - Protocole | 60 |
| 3.4.2.3. - Test biochimique de la galerie Api 20 A..... | 60 |
| 3.4.2.3.1. - Technique | 60 |
| 3.4.2.3.2. - Lecture | 61 |
| 3.5. - Etude de la sensibilité des <i>Bifidobacterium</i> aux antibiotiques..... | 62 |
| 3.5.1. - Préparation de l'inoculum standard..... | 62 |
| 3.5.2. - La méthode de diffusion sur gélose..... | 62 |
| 3.6. - Analyse statistique des résultats | 65 |
| CHAPITRE IV - Résultats de l'effet de la bactérie entomopathogene, l'action de biopesticide,de l'étude de la sensibilité de Bifidobacterie aux antibiotiques | 67 |
| 4.1. - Effets des bactéries entomopathogènes sur les deux glandes cirières ethypophryngienne | 67 |
| 4.1.1. - Effets des bactéries entomopathogènes sur la glande cirière..... | 67 |
| 4.1.1.1. - Effets des <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633..... | 67 |
| 4.1.1.1.1. - Effets des <i>Bacillus subtilis</i> sur le poids de la cire | 67 |
| 4.1.1.1.2. - Effets de <i>Bacillus subtilis</i> sur le nombre des lames cirières..... | 69 |
| 4.1.1.2. - Effets de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 | 70 |
| 4.1.1.2.1. - Effets de <i>Bacillus cereus</i> sur le poids de la cire..... | 70 |
| 4.1.1.2.2. - Effets de <i>Bacillus cereus</i> sur le nombre des lames cirières..... | 72 |
| 4.1.1.3. - Effets de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27883..... | 73 |

| | |
|---|------------|
| 4.1.1.3.1. - Effets de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur le poids de la cire..... | 73 |
| 4.1.1.3.2. - Effets de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur le nombre des lames cirières.... | 74 |
| 4.1.2. - Effets des bactéries entomopathogènes sur la glande hypopharyngienne..... | 75 |
| 4.1.2.1. - Effet de bactérie de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633..... | 76 |
| 4.1.2.1.1. - Effet de <i>Bacillus subtilis</i> sur la quantité des protéines..... | 76 |
| 4.1.2.1.2. Effet de <i>Bacillus subtilis</i> sur le volume des acini | 76 |
| 4.1.2.2. - Effet de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 | 78 |
| 4.1.2.2.1. - Effet de <i>Bacillus cereus</i> sur la quantité des protéines | 78 |
| 4.1.2.2.2. - Effet de <i>Bacillus cereus</i> sur le volume des acini..... | 79 |
| 4.1.2.3. - Effet de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27883..... | 79 |
| 4.1.2.3.1 - Effet de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur la quantité des protéines | 79 |
| 4.1.2.3.2 - Effet de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur le volume des acini | 80 |
| 4.2. - Résultats de l'utilisation d'un biopesticide E.M-A..... | 81 |
| 4.2.1. - Effet de l'utilisation d'E.M-A. sur le poids de la cire et le nombre des lames cirière.... | 81 |
| 4.2.1.1. - Effet sur le groupe traité par <i>B. subtilis</i> C1 (0,72 mg/ml)..... | 81 |
| 4.2.1.2. - Effet sur le groupe traité par <i>B. cereus</i> C1 (0,4 mg/ml) | 83 |
| 4.2.1.3. - Effet sur le groupe traité par <i>P. aeruginosa</i> C3 (0,22 mg/ml) | 85 |
| 4.2.2. - Effet de l'utilisation d'E.M-A. sur la quantité des protéines et le volume des acini..... | 86 |
| 4.2.2.1. - Effet sur le groupe traité par <i>B. subtilis</i> C1 (0,72 mg/ml) | 86 |
| 4.2.2.2. - Effet sur le groupe traité par <i>B. cereus</i> C2 (0,35 mg/ml)..... | 88 |
| 4.2.2.3. - Effet sur le groupe traité par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3 (0,22 mg/ml)..... | 91 |
| 4.3. - Résultats de test de dénombrement des bifidobactéries et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques..... | 92 |
| 4.3.1. - Identification et dénombrement de la souche de bifidobactéries isolée..... | 92 |
| 4.3.2. - Résultats de l'étude de la sensibilité de la souche bifide autochtone isolée | 94 |
| CHAPITRE V - Discussions sur l'effet de la toxicité des bactéries entomopathogène sur l'abeille domestique et l'étude des souches de bifidobactérie aux antibiotiques..... | 98 |
| 5.1 - Discussions sur l'effet des <i>Bacillus subtilis</i> et <i>B. cereus</i> et des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur les deux glandes retenues..... | 98 |
| 5.1.1 - Discussions sur l'effet de <i>Bacillus</i> et de <i>Pseudomonas</i> sur la glande cirière..... | 98 |
| 5.1.2. - Discussions sur l'effet de <i>Bacillus</i> et de <i>Pseudomonas</i> sur la glande hypopharyngienne..... | 100 |
| 5.2- Discussion des résultats de l'utilisation d'un biopesticide E.M-A..... | 101 |
| 5.3 - Discussions sur sensibilité de <i>Bifidobacterium</i> aux antibiotiques..... | 101 |
| Conclusion | 104 |
| Perspectives..... | 105 |
| Références bibliographiques..... | 107 |
| Annexe..... | 131 |

Liste des abréviations

A.B.P.V : Virus de la paralysie aiguë.

A.N.S.E.S : Agence nationale de sécurité sanitaire.

A.T.C.C : American Type Culture Collection.

AM.C : Amoxicilline + Clavulanic.

AMP : Ampicilline.

B. Cereus : *Bacillus cereus*.

B. subtilis : *Bacillus subtilis*.

B.Q.C.V : Virus de la cellule royale noire.

B.S.A : Bradford protein assay.

C : Chloromphénicole.

C.B.P.V : Virus de la paralysie chronique.

CIP : Ciprofloxacine.

CN : Cefalexine.

D.M.R.T : Test à distance multiple de Ducan.

D.O : Densité optique.

D.W.V : Virus des ailes déformées.

E : Erythromycine.

E.M-1 : Efficace micro-organismes- 1.

E.M-A : Efficace micro-organismes- Activé.

F.A.O : Food and Agriculture Organization.

F.I.B.L : Forschungsinstitut für Biologischen Landbau Research (Institute of Organic
Agriculture).

FOX : Cefoxitine.

G.H.P: Gland hypopharyngienne.

K.B.V : Virus Cachemire.

Kan : Kanamycine.

LARG : Largeur

LONG : Longueur

M.H : Gélose Mueller-Hinton.

M.R.S : Gélose de Man, Rogosa, Sharpe.

O.I.E : Organisation mondiale de la santé animale.

O.S.A.V : Office fédéral de la Sécurité Alimentaire et des affaires Vétérinaires.

OX1 : Oxacilline.

P : Pénicilline.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa* .

P.B: Buffer phosphate.

R : Résistante.

S : Sensible.

S : Streptomycine.

S.B.V : Virus du couvain sacciforme.

TE : Tétracycline.

U.F.C : Unité format de la colonie.

VA : Vancomycine.

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 -Abeille domestique en train de butiner (VEREECKEN <i>et al.</i> , 2015)..... | 05 |
| Figure 2 - Schéma des 3 castes de l'abeille (RASOLOFOARIVAO, 2014)..... | 135 |
| Figure 3 - Fluctuation de la population d'une colonie d'abeille au cours de l'année (CHIRON et HATTENBERGER, 2008)..... | 07 |
| Figure 4 - Corps de l'ouvrière (DIOUF, 2002)..... | 135 |
| Figure 5 - Schéma de la tête et des pièces buccales d'une abeille ouvrière (MAURIZIO, 1968)... | 136 |
| Figure 6 - Abdomen et thorax d'une abeille ouvrière (LE CONTE, 2003)..... | 09 |
| Figure 7 - Système nerveux d'une abeille ouvrière (LE CONTE, 2003)..... | 10 |
| Figure 8 -Système respiratoire d'une abeille ouvrière (LE CONTE, 2003)..... | 11 |
| Figure 9 - Schéma de l'anatomie du tube digestif de l'abeille (MAURIZIO, 1968)..... | 12 |
| Figure 10 -Cycle de vie de la reine (MARNEFF, 2011)..... | 13 |
| Figure 11 -Cycle de vie d'une ouvrière (MARNEFF, 2011)..... | 14 |
| Figure 12 - Cycle de vie de faux bourdon (MARNEFF, 2011)..... | 14 |
| Figure 13 - Coupe schématique d'une abeille avec situation des différentes glandes exocrines (DECHAUME-MONCHARMONT, 2003)..... | 15 |
| Figure 14 -Structure de la glande hypopharyngienne d'une ouvrière (AUPINEL <i>et al.</i> , 2005)..... | 16 |
| Figure 15 -Les glandes hypopharyngiennes d'une abeille ouvrière (CHARPENTIER, 2013)..... | 17 |
| Figure 16 - Quatre paire de plaques de la glande cirière (CHARPENTIER, 2013)..... | 18 |
| Figure 17 -Construction les alvéoles hexagonales(LE CONTE, 2003)..... | 18 |
| Figure 18 -Larves <i>Aethina tumida</i> dans une ruche (HOOD, 2004)..... | 22 |
| Figure 19 - <i>Vespa. velutina</i> attaque des abeilles ouvrières (CHAUZAT et MARTIN,2009)..... | 23 |
| Figure 20 - Larve filante (LINDSTRÖM <i>et al.</i> , 2008)..... | 27 |
| Figure 21 - Écaille sombre (LINDSTRÖM <i>et al.</i> , 2008)..... | 27 |
| Figure 22 -La coloration de Gram de <i>Melissococcus plutonius</i> . (FORSGREN,2010)..... | 28 |
| Figure 23 (a, b) -Larves infectées par la loque européenne (CHARRIERE <i>et al.</i> , 2012)..... | 29 |
| Figure 24 - Mites varroa sur la tête d'abeille(LE CONTE et FAUCON, 2002..... | 30 |
| Figure 25 - <i>Varroa destructor</i> (ROSE <i>et al.</i> , 2014)..... | 30 |
| Figure 26 - Acariose de trachée (REY, 2012)..... | 31 |
| Figure 27 - Des abeilles mortes avec des ailles complètement déformées (ADJLANE, 2012)..... | 33 |
| Figure 28 - Larve morte en forme typique de sac, remplie de liquide (CHARRIERE <i>et al.</i> , 2012) | 34 |
| Figure 29 - Larves infectées par le S.B.V. (CLEMENT, 2003)..... | 34 |
| Figure 30 - Aspect d'une abeille infectée par la maladie noire (CLEMENT, 2003)..... | 35 |
| Figure 31 -Symptômes cliniques sur des cadres de dysenterie typique pour <i>Nosema</i> <i>apis</i> . (CHARRIERE <i>et al.</i> , 2012)..... | 37 |
| Figure 32 -Spores de <i>Nosema apis</i> (PATRELLE, 2011)..... | 37 |
| Figure 33 - Larves ouvrières momifiées par <i>Ascoshera apis</i> donnant le couvain dit "calcifié" (CHARRIERE J.D <i>et al.</i> , 2002)..... | 38 |
| Figure 34 - Cagette d'élevage type Pain (photographie originale)..... | 41 |
| Figure 35 - Les bactéries entomopathogènes utilisés (a : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,b: <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> et c: <i>Bacillus cereus</i>). (Photographie originale)..... | 42 |
| Figure 36 -Préparation des suspensions bactériennes et détermination des concentrations (Photographie originale)..... | 137 |

| | |
|---|-----|
| Figure 37(a, b, c et d) - Préparation d'abeille domestique pour l'expérimentation (Photographies originales)..... | 44 |
| Figure 38 - Candé préparé pour abeilles domestiques (Photographie originale)..... | 45 |
| Figure 39(e, f, g, h, i, et j) - Prélèvement d'une lamelle de cire d'un dix abeilles domestiques (Photographies originales)..... | 46 |
| Figure 40(a, b, c, d, e et f) -Les étapes de l'extraction des protéines de G.H.P (Photographies originales)..... | 48 |
| Figure 41 - Préparation du tampon phosphate pH=7,4 (Photographie originale)..... | 138 |
| Figure 42 - Préparation de l'échantillon de protéines (Photographie originale)..... | 49 |
| Figure 43 - Courbe étalon établi pour le B.S.A..... | 139 |
| Figure 44 - Etapes de dosage des protéines (Photographie originale)..... | 51 |
| Figure 45(a) - Produit EM-1 utilisé..... | 52 |
| Figure 45(b) - La fiche technique du produit utilisé..... | 140 |
| Figure 46 - Les étapes du la préparation EM-Activé et du traitement d'abeille domestique (Photographie originale)..... | 54 |
| Figure 47 - Les étapes du la préparation de EM-Activé..... | 141 |
| Figure 48 (a, b, c, d, e et f) - Les étapes de la dissection d'une ouvrière (GUERZOU <i>et al.</i> , 2015)..... | 56 |
| Figure 49 -Protocole d'isolement des bifidobactéries à partir du tube digestif/œsophage de l'abeille (GUERZOU <i>et al.</i> , 2015)..... | 58 |
| Figure 50 -Test de catalase (GUERZOU <i>et al.</i> , 2015)..... | 59 |
| Figure 51 -Préparation de l'inoculum (GUERZOU <i>et al.</i> , 2015)..... | 61 |
| Figure 52 -Préparation des alvéoles avec l'eau physiologique (GUERZOU <i>et al.</i> , 2015) | 61 |
| Figure 53 -Préparation les cupules des tests avec la suspension bactérienne/huile de paraffine..... | 61 |
| Figure 54 -Préparation de l'inoculum 1,0 de McFarland (Photographies originales)..... | 63 |
| Figure 55 -Test de la sensibilité de la souche bifide aux antibiotiques (Photographie originale)..... | 64 |
| Figure 56 - Valeurs de la quantité de cire produite par des abeilles avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de <i>Bacillus subtilis</i> | 68 |
| Figure 57 - Valeurs des nombres des lames produites par des abeilles domestiques avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de <i>Bacillus subtilis</i> | 70 |
| Figure 58 -Valeurs de la quantité de cire produite par des abeilles avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de <i>Bacillus cereus</i> | 71 |
| Figure 59 - Valeurs des nombres des lames produites par des abeilles domestiques avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de <i>Bacillus cereus</i> | 72 |
| Figure 60 - Variation de la quantité de cire produite par des abeilles avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 74 |
| Figure 61 - Valeurs des nombres des lames produites par des abeilles domestiques avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 75 |
| Figure 62 - Moyenne des quantités de protéines des abeilles en fonction des doses en <i>B.</i> <i>subtilis</i> | 76 |
| Figure 63 - Diamètres des acini des abeilles traitées par <i>B. subtilis</i> | 77 |
| Figure 64 - Moyennes des acini d'abeilles domestiques en fonction des doses en <i>Bacillus subtilis</i> ... | 153 |

| | |
|---|-----|
| Figure 65 -Moyenne des quantités de protéine des abeilles traitées par <i>B. cereus</i> | 78 |
| Figure 66 - Diamètres des acini des abeilles traitées par <i>B. cereus</i> | 79 |
| Figure 67 - Moyenne des acini d'abeilles domestiques en fonction des doses en <i>Bacillus cereus</i> ... | 153 |
| Figure 68 - Moyenne des quantités de protéines des abeilles traitées par <i>P. aeruginosa</i> | 80 |
| Figure 69 - Moyenne des acini d'abeilles domestiques en fonction des concentrations en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 154 |
| Figure 70 -Diamètres des acini des abeilles traitées par <i>P. aeruginosa</i> | 81 |
| Figure 71 -Valeurs des poids de la cire des abeilles domestique avant (<i>B.subtilis</i> C1) et après le traitement par le produit EM-Activé..... | 83 |
| Figure 72 -Valeurs des poids de la cire des abeilles domestique avant (<i>B.cereus</i> C1) et après le traitement par le produit EM-Activé..... | 84 |
| Figure 73 -Valeurs des poids de la cire des abeilles domestique avant (<i>P.aeruginosa</i> C3) et après le traitement par le produit EM-Activé..... | 85 |
| Figure 74 -Moyenne des quantités de protéines des abeilles avant (<i>B. subtilis</i> C1) et après le traitement par le produit E. M-Activé..... | 86 |
| Figure 75 -Valeurs des quantités de protéines des abeilles avant (<i>B.subtilis</i> C1) et après le traitement par le produit E. M-Activé..... | 87 |
| Figure 76 -Diamètre des acini des abeilles avant (<i>B.subtilis</i> C1) et après le traitement par le produit E. M-Activé..... | 88 |
| Figure 77 -Moyenne des quantités de protéine des abeilles avant (<i>B. cereus</i> C2) et après le traitement par le bio pesticide EM-Activé..... | 99 |
| Figure 78 - Valeurs des quantités de protéines des abeilles avant (<i>B.cereus</i> C2) et après le traitement par E. M-Activé..... | 90 |
| Figure 79 -Diamètre des acini des abeilles avant (<i>B.cereus</i> C2) et après le traitement par le bio pesticide EM-Activé..... | 90 |
| Figure 80 - Valeurs des quantités de protéines des abeilles avant (<i>P.aeruginosa</i> C3) et après le traitement par E.M-Activé..... | 91 |
| Figure 81 -Moyenne des quantités de protéines des abeilles avant (<i>P.aeruginosa</i> C3) et après le traitement par le bio pesticide EM-Activé..... | 91 |
| Figure 82 -Diamètre des acini des abeilles avant (<i>P.aeruginosa</i> C3) et après le traitement par le bio pesticide EM-Activé..... | 92 |
| Figure 83 -Résultats de test biochimique galerie API 20 A. (Photographie originale) | 93 |
| Figure 84 - Résultats du dénombrement de la souche isolée..... | 93 |
| Figure 85 -Diamètres de la zone d'inhibition..... | 95 |
| Figure 86 -Résultat de teste aux antibiotiques..... | 96 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau n° 1 - Principaux agents pathogènes viraux, bactériens et fongique de l'abeille domestique..... | 25 |
| Tableau n° 2 - Autres ennemis biologiques de l'abeille domestique..... | 131 |
| Tableau n° 3 - Principaux virus des abeilles (DAINAT <i>et al.</i> , 2008, KHONGPHINITBUNJONG <i>et al.</i> ,2016)..... | 32 |
| Tableau n° 4 - La gamme d'étalonnage des protéines..... | 139 |
| Tableau n° 5 - Quantité de la cire issue de l'abeille domestique en fonction de la dose de <i>Bacillus subtilis</i> | 145 |
| Tableau n° 6 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite d'abeille traitée par <i>B. subtilis</i> | 69 |
| Tableau n° 7 - Nombre des lames cirières issues de l'abeille domestique en fonction de concentration de <i>Bacillus subtilis</i> | 145 |
| Tableau n° 8 - Quantité de la cire issue de l'abeille domestique en fonction de la dose de <i>Bacillus cereus</i> | 146 |
| Tableau n° 9 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite d'abeille traitée par <i>B. cereus</i> | 71 |
| Tableau n° 10 - Nombre des lames cirières issues de l'abeille domestique en fonction la dose de <i>Bacillus cereus</i> | 146 |
| Tableau n° 11 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite par <i>P. aeruginosa</i> | 73 |
| Tableau n° 12 - Poids de la cire produite par abeille en fonction de concentration de <i>P. aeruginosa</i> | 147 |
| Tableau n° 13 - Nombre des lames cirières issues de l'abeille domestique en fonction des concentrations de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 147 |
| Tableau n° 14 - Quantité des protéines secrétés par d'abeille domestiques traitée par <i>Bacillus subtilis</i> | 148 |
| Tableau n° 15 - Diamètre des acini des glandes hyopharyngiennes traitées par <i>Bacillus subtilis</i> | 148 |
| Tableau n° 16 - Analyse de la variance des acini d'abeille domestique en fonction des concentrations <i>B.subtilis</i> | 148 |
| Tableau n° 17 - Quantité de protéines secrétées par l'abeille domestique traitée par <i>B. cereus</i> | 148 |
| Tableau n° 18 - Diamètre des acini du gland hyopharyngien traitée par <i>B. cereus</i> | 149 |
| Tableau n° 19 - Analyse de la variance des acini d'abeille domestique en fonction des concentrations <i>B.cereus</i> | 149 |
| Tableau n° 20 - Quantité de protéine d'abeilles domestiques traitée par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 149 |
| Tableau n° 21 - Analyse de la variance des acini d'abeille domestique traitée par <i>P. aeruginosa</i> | 149 |
| Tableau n° 22 - Diamètre des acini du gland hyopharyngien traitée par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 150 |
| Tableau n° 23 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite par d'abeille domestique avant (<i>B.subtilis</i> C1) et après le traitement par E.M-A..... | 82 |
| Tableau n° 24 - Quantité de la cire d'abeille domestiques avant (<i>B.subtilis</i> C1) et après le traitement par le produit E.M-A..... | 150 |

| | |
|--|-----|
| Tableau n° 25 - Quantité de la cire d'abeille domestiques avant (<i>B.cerues</i> C1) et après le traitement par le produit M.E-A | 151 |
| Tableau n° 26 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite par d'abeille domestique avant (<i>B.cereus</i> C1) et après le traitement par E.M-A..... | 84 |
| Tableau n° 27 - Quantité de la cire d'abeille domestiques avant (<i>P.aeruginosa</i> C3) et après le traitement par le produit E.M-A..... | 151 |
| Tableau n° 28 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite par d'abeille domestique avant (<i>P.aeruginosa</i> C3) et après le traitement par E.M-A..... | 86 |
| Tableau n° 29 - Quantités de protéine contenant dans la glande G.H.P. d'abeille domestiques avant (<i>B.subtilis</i> C1) et après le traitement par la biopesticide E.M-A..... | 152 |
| Tableau n° 30 - Quantité de protéine contenant dans la glande G.H.P. d'abeilles domestiques avant (<i>B.cereus</i> C2) après le traitement par le produit ' E.M-A.' | 152 |
| Tableau n° 31 - Quantité de protéine contenant dans la glande G.H.P. d'abeilles domestiques avant (<i>P.aeruginosa</i> C3) et après le traitement par la biopesticide E.M-A..... | 152 |
| Tableau n° 32 - Résultats de la sensibilité de bifidobactérie aux antibiotiques..... | 94 |

Introduction

Introduction

Dans la nature 20000 espèces d'hyménoptères sont recensées, la plus importante étant l'abeille domestique *Apis mellifera* L., 1758 (SHAHROUZI, 2009). Cette espèce polinisatrice remplit une fonction très importante dans la nature. Elle assure la propagation et la survie d'une part importante de la vie et en participant à l'équilibre environnemental dans le monde. Les abeilles contribuent l'évolution de plus de 80% des espèces de plantes à fleurs (CLEMENT, 2003). Elles présentent aussi d'autres intérêts dont les plus importants sont la production de miel, de propolis, de gelée royale et de cire (ADJLANE *et al.*, 2012). De même, la flore intestinale est très riche en *Bifidobacterium* qui joue un rôle fondamental pour la santé humaine (GUERZOU *et al.*, 2015).

Cette abeille, pour les besoins de la colonie, prospecte des surfaces importantes de son environnement. Elle récolte du nectar, des miellats, du pollen et également des matières cireuses pour élaborer la propolis.

Elle effectue, 10 à 20 voyages par jour (LOUVEAUX, 1958). C'est au cours de ces voyages que l'abeille (de 10000 à 25000 butineuses dans la colonie) entre en contact avec de nombreux micro-organismes et substances chimiques qu'elle retient à la surface de son corps, sur les poils, la cuticule, les pattes et qu'elle absorbe ce qui est l'origine d'un certain nombre de maladies et de plusieurs cas de mortalités dans les colonies et par la suite un déclin des populations d'abeilles dans le monde. Cette situation est sans doute imputée à des parasites, à des maladies, à la malnutrition ou à des toxines présentes dans l'environnement (ATKINS et KELLUM, 1986 ; THOMPSON., 2005 ;KAJOBE *et al.*,2010; MOCKEL *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011 ; HONGXIA *et al.*, 2012; ROSE *et al.*, 2014). Ainsi, certaines matières actives, qui sont pertinentes en agriculture, ont une très haute toxicité pour les pollinisateurs (BONMATIN *et al.*,2014; KAIRO *et al.*,2017).Elles provoquent également des altérations morphologiques aux stades immatures (DA SILVA CRUZ *et al.*,2010; GREGORC et ELLIS, 2011), des troubles de butinage (FRIEDLER, 1987; RAMIREZ-ROMERO *et al.*, 2005 ; YANG *et al.*, 2008) et de comportement (COLIN *et al.*, 2004; ALIOUANE *et al.*, 2009).Les abeilles sont aussi sensibles aux bactéries (CHARRIERE *et al.*,2012).

L'effet des bactéries entomopathogènes sur la santé de l'abeille a fait l'objet de plusieurs études à travers le monde. Parmi ces travaux ceux de BABENDREIER *et al.* (2005) en Suisse, d'ALETRU (2012) en France, de JOUNG et COTE (2008) au Canada sont à citer. En Algérie, certes que les maladies affectant les colonies d'abeilles sont déterminées par le décret exécutif n°95-66 du février 1995 ; la varroase, les loques américaines et européennes, la nosérose et l'acariose des abeilles sont les principales pathogènes des abeilles mais les

travaux étudiant les maladies des abeilles ne sont pas nombreux, nous citons à titre d'exemple ce de ACHOU, 2007; de BELAÏD et DOUMANDJI (2010) ainsi que celui de ADJLANE et HADDAD (2015).

En ce qui concerne, les maladies causées par les bactéries entomopathogènes aucune étude n'est réalisée auparavant. Cette étude est considérée comme une première de son genre dans la région. L'objectif de la présente étude est de voir que pourra être les effets bactéries entomopathogènes sur l'activité de deux glandes chez l'abeille locale de Djelfa, soit la glande hypopharyngienne et la glande cirière ?? et qu'elle est le traitement biologique possible contre ces effets ??

Pour répondre à ces questions nous avons choisi 3 bactéries entomopathogènes soit *Bacillus subtilis*, *B. cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* Pour la deuxième question nous avons proposé un biopesticide à base des micro-organismes E.M -A (EM- Activé) sur les trois bactéries entomopathogènes testés.

Le présent document comporte deux parties essentielles : la partie bibliographique qui est divisée en 2 chapitres, le premier englobe quelques généralités sur les abeilles, le deuxième est une revue bibliographique sur les causes de déclin de l'abeille mellifère *Apis mellifera*. La deuxième partie est réservée aux matériels et méthodes utilisés, et les résultats avec discussions. Ce travail se termine par une conclusion assortie de quelques perspectives.

Chapitre I - Généralités
sur l'abeille domestique
Apis mellifera

Chapitre I - Généralités sur l'abeille domestique *Apis mellifera*

Le premier chapitre est réservé à l'étude bibliographique de l'abeille domestique dont lequel plusieurs volets sont évoqués. D'abord, un aperçu sur la systématique des abeilles, suivi par quelquesmœurs caractérisant les abeilles, ensuite par leur cycle de développement. Les caractères morphologiques des abeilles et leur anatomie sont détaillés ensemble. Juste après, se trouve un petit aperçu sur l'organisation spécifique de la société d'abeille. En dernier, une petite bibliographie rassemblant les principales glandes qui existent chez les abeilles domestiques en s'intéressant de plus sur les glandes hypopharyngiennes et cirières.

1.1. - Position systématique de l'abeille domestique *Apis mellifera*

L'abeille domestique européenne, *Apis mellifera* a été décrite en 1758 pour la première fois par Linné (JOYEUX et BOUGUET, 2014). *Mellifera* vient du latin '' *mellis* '' qui signifie miel et ''*ferre* '' qui signifie porter. Cependant, le termemellifica serait plus approprié puisque l'abeille ne fait pas que transporter le miel mais elle le produit à partir du nectar des fleurs butinées (LE CONTE, 2003 et BOGDANOV *et al.*,2006). Elle fait partie du règne animal, et est classée dans l'embranchement des Arthropodes,car elle possède un corps chitineux à symétrie bilatéral sur le quel sont fixé desappendicescomposés de plusieurs articles articulés entre eux (ALIZEE, 2014). Elle fait partie dela classe des insectes car elle dispose trois paires de pattes (MACKOWIAK, 2009). On la retrouve dans l'ordre des hyménoptères, puisqu'elle a deux paires d'ailes membraneuses qui peuvent se réunir par une rangée de crochets sur l'ailepostérieure (MOORE et KOSUT, 2013 et KIUPEL, 2013).Au sein du sous-ordre des apocrites caractérisépar un net étranglement thorax-abdomen, et de groupe des aculéates qui est caractérisé par des antennes de moins de treize articles et dont les femellesportent un aiguillon venimeux (MACKOWIAK, 2009). Ainsi, l'abeille est classée dans la famille des Apidés car elle possède une languesuffisamment longue permettant un butinage optimal des fleurs (Fig.1). L'abeille domestiqueeuropéenne est l'espèce *mellifera* du genre *Apis* (OIE, 2009 ; PELLETIER, 2010 et CAMBY, 2011).

Aujourd'hui, la plupart desscientifiques admettent qu'il existe plutôt 09 espèces d'abeilles réparties en 03 grands groupes (LECONTE et FAUCON, 2002 et HARDY, 2012). Les abeilles naines; *Apis florea* et *Apis andreniformis*, les abeilles géantes : *Apis dorsata* et *Apis laboriosa*, (*Apis binghami* et *Apis breviligula* seraient des sous-espèces de *Apis dorsata*), et les abeilles cavitaires : *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis koschevnikovi*, *Apis nuluensis* et *Apis nigrocincta*.



Fig.1 -Abeille domestique en train de butiner (VEREECKEN *et al.*, 2015)

Parmi ces espèces, l'*Apis mellifera* est la plus intéressante dans le monde, grâce à leur propriété telle que l'adaptation aux conditions climatiques, la production du miel et les produits de la ruche (IMDORF *et al.*, 1996; LE CONTE et FAUCON, 2002 ;CHIRON et HATTENBERGER, 2009; LEMOINE, 2010).

1.2.- Quelques mœurs caractérisant la colonie d'abeille

L'abeille (*Apis mellifera*) vit en société, celle-ci étant caractérisée par la division et la spécialisation du travail (SCHULZ *et al.*, 2002). Dans les colonies d'abeille, une seule caste, celle de la reine, est capable de pondre des œufs; les mâles, appelés aussi faux bourdons, ont pour principal rôle social celui de féconder la reine (LE CONTE et FAUCON, 2002). Elle possède une biologie bien particulière, due à son comportement social et sa coévolution avec les plantes à fleurs (MAISONNASSE, 2010). Il existe des différences marquées entre les trois castes d'abeilles : la reine, l'ouvrière et le mâle (LE CONTE et FAUCON, 2002 ; DUARTE *et al.*, 2011) (Fig.2 , Annexe 1). L'appareil buccal est adapté à l'ingestion de liquides, tels que le nectar ou le miellat. Les pattes de l'abeille sont dotées d'une « corbeille » à pollen. Les poils répartis sur tout le corps, même sur les yeux, permettent de récolter un maximum de pollen lorsque l'abeille butine une fleur. La brosse à pollen permet la récolte du pollen accroché aux poils de l'abeille (LE CONTE, 2003; BECHER *et al.*, 2010 et ROSSANT, 2011).

1.3.- Cycle de développement naturel de la colonie d'abeilles

Le rythme du développement du couvain d'abeilles est influé par plusieurs facteurs, qui jouent un rôle très important pour le développement de la colonie essentiellement la récolte, Et la ponte de la reine (IMDORF *et al.*, 2010).

Il dépend principalement des saisons et la qualité des végétaux qui se trouvent dans l'environnement (KLUSER *et al.*,2010). En particulier de la qualité et la quantité des fleurs mellifères disponibles (LEMOINE, 2010). Selon CHIRON et HATTENBERGER (2009), le rythme se déroule en 04 étapes (Fig.3).

1-Pendant la période d'hivernage, la reine cesse de pondre et vit au ralenti, et les ouvrières regroupées autour de la reine. La population est faible (10 000 abeilles) et vit sur les réserves accumulées à l'automne ;

2-A partir du mois de mars, les besoins en nourriture sont forts car la ponte reprend, permettant le développement de la colonie. C'est aussi le début de la saison apicole (LE CONTE, 2003; MARTIN, 2012);

3- Lorsque la colonie est suffisamment développée (60 000 individus ou plus), la période d'essaimage commence. L'essaimage constitue le mode de dissémination des colonies d'abeilles. La reine, après avoir pondu des œufs destinés à doter la colonie d'une nouvelle reine, quitte la ruche avec une bonne partie de la colonie (environ les 2/3) pour aller s'installer ailleurs (BIRI, 2002; FAYET, 2014);

4- A la fin d'août, commence la préparation à l'hivernage. Les abeilles vivent sur les réserves accumulées pendant la belle saison cela correspond à la fin de la saison apicole (LE CONTE, 2003).

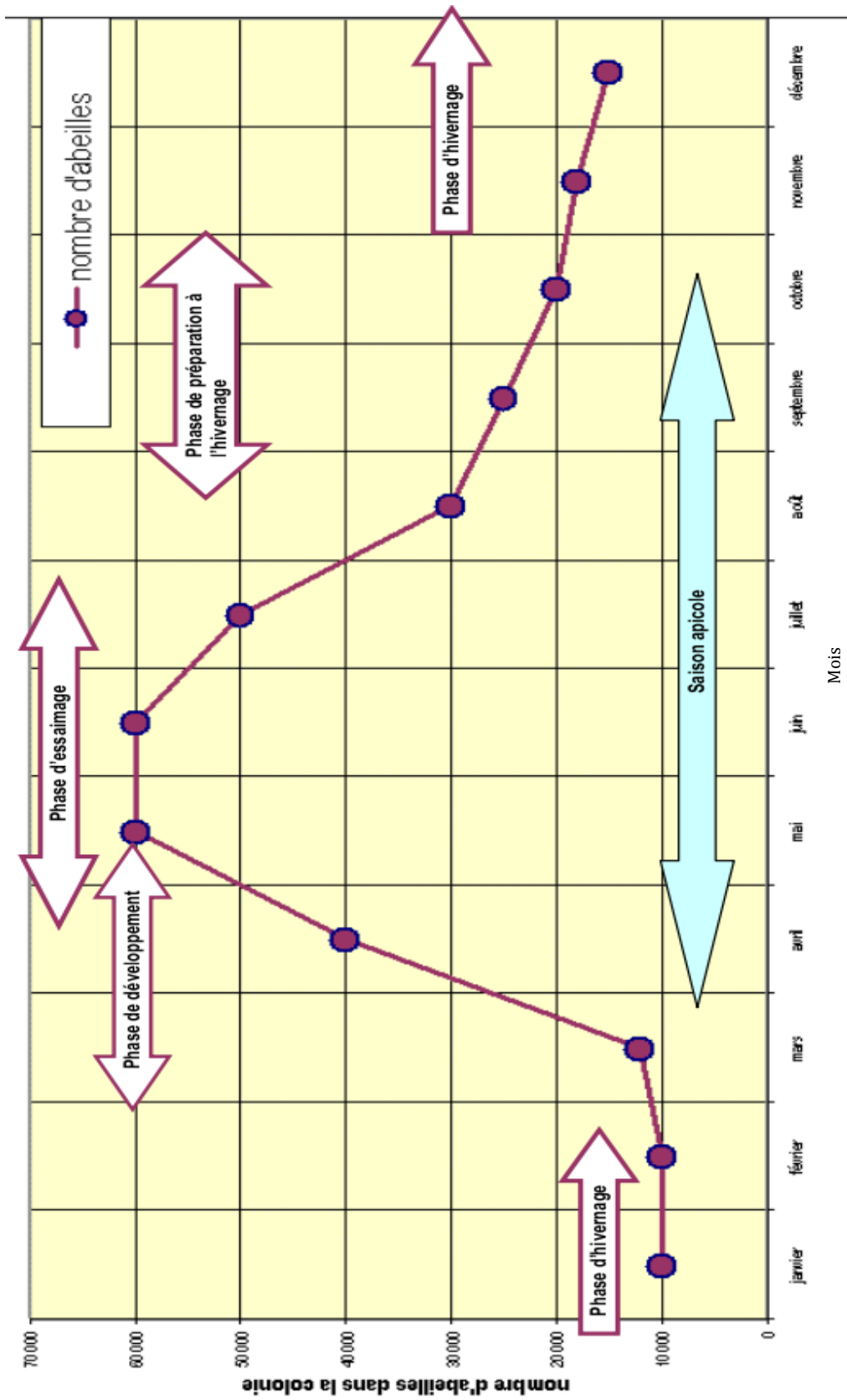


Fig. 3 - Fluctuation de la population d'une colonie d'abeille au cours de l'année (CHIRON et HATTENBERGER, 2008)

1.4. - Morphologie et anatomie de l'abeille

Les principaux caractères morphologiques et anatomiques de l'abeille sont détaillés dans ce qui va suivre.

1.4.1. - Morphologie de l'abeille

Les abeilles font partie de la classe des Insectes. Elles ont donc les caractéristiques de cette classe. Leur corps est divisé en trois segments, la tête, le thorax et l'abdomen (Fig.4 , Annexe 1), et est enveloppé d'une cuticule faite de chitine, qui assure un exosquelette rigide (LE CONTE et FAUCON, 2002).

1.4.1.1.-Morphologie du corps d'abeille

Le corps de l'abeille est entouré par une couche épaisse cuticulaire dure et recouverte de poils, et forme un exosquelette en trois parties formant son corps (la tête, le thorax et l'abdomen). Les muscles qui agissent directement sur les articulations de ces parties se trouvent à l'intérieur du corps (SEELEY, 1995; LE CONTE et FAUCON, 2002).

1.4.1.2. - Tête des abeilles

La tête des abeilles est très visible, les deux gros yeux sont composés de 4000 à 6 000 tubes fixes, dotés d'une rétine, sans capacité d'accommodation. Ils donnent une vision floue à 360°. Ainsi, trois ocelles, petits yeux placés sur le sommet de la tête, permettent de mesurer l'intensité lumineuse et de percevoir les changements de direction (CLEMENT, 2003). Ses antennes servent à la communication, à mesurer la température et la concentration en CO₂ dans la ruche qui conditionnent leur comportement de ventilation (RIONDET, 2013). La partie buccale comporte les mandibules, qui servent à pétrir la cire et à malaxer le pollen (EON, 2011). Les têtes en générales sont peu puissantes et ne peuvent pas percer la peau des fruits comme le fait la guêpe. La langue, de longueur variable selon les races, sert à pomper le nectar. Dans la tête se trouvent les glandes labiales, hypopharyngiennes, qui sont productrices de la gelée royale (Fig.5, Annexe 1).

1.4.1.3. - Description du thorax des abeilles

Le thorax situé entre la tête et l'abdomen est constitué de trois segments communs à tous les insectes, plus une extension du premier segment abdominal (spécifique des hyménoptères) (CHINERY, 1998). Il porte les éléments locomoteurs de l'abeille : deux paires d'ailes membraneuses et trois paires de pattes, et contient des muscles puissants pour les faire fonctionner. Trois paires d'orifices respiratoires appelés stigmates débouchent symétriquement sur le côté du thorax. Les pattes sont composées de pièces articulées : la hanche; le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse avec ses cinq parties, dont la dernière porte des griffes et une pelote adhésive. Le thorax abrite aussi les glandes labiales thoraciques, qui sont connectées aux canaux des glandes labiales de la tête et s'ouvrent dans la bouche (LE CONTE et FAUCON, 2002).

1.4.1.4. - Abdomen des abeilles

L'abdomen comprend sept segments reliés entre eux par une membrane intersegmentaire et formés chacun d'une partie supérieure; le tergite ; qui recouvre en partie le sternite (CHINERY, 1998). La taille de l'abdomen peut varier grâce à un système musculaire permettant l'extension ou le repli de la membrane qui relie les tergites et les sternites ainsi que les abdominaux (LE CONTE et FAUCON, 2002)(Fig.6).

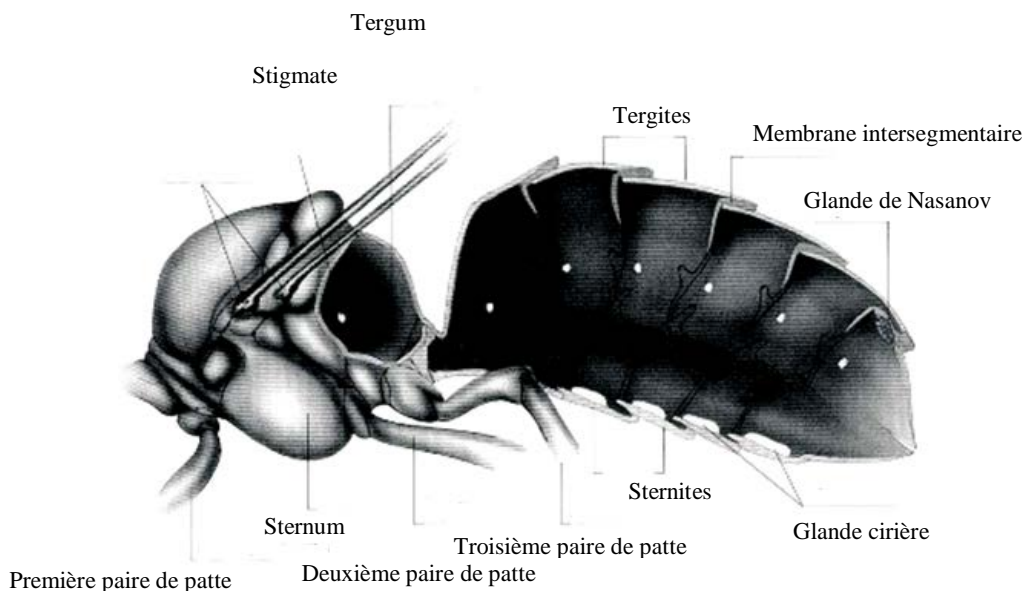


Fig.6- Abdomen et thorax d'une abeille ouvrière
(LE CONTE, 2003)

1.4.2. - Anatomie interne

Comme tous les insectes, l'anatomie des abeilles est très complexe. L'abeille réalise ses fonctions biologiques en faisant intervenir plusieurs systèmes soit le système nerveux, le système respiratoire, le digestif et le circulatoire. Dans cette partie du présent chapitre, chaque système est décrit séparément (WINSTON, 1987).

1.4.2.1.- Système nerveux

Le système nerveux de l'abeille est extrêmement complexe. Il est le siège de l'intégration des signaux des cinq sens, qui proviennent des différents récepteurs sensoriels, en particulier des antennes, des yeux et de la langue (LE CONTE, 2003) (Fig.7).

Le système nerveux de l'abeille est constitué de deux ensembles complémentaires :

- Le système nerveux central, avec le cerveau et la chaîne nerveuse ventrale;
- le système nerveux stomatogastrique, lié à l'activité et au fonctionnement des organes internes, et est l'équivalent du système nerveux sympathique des mammifères.

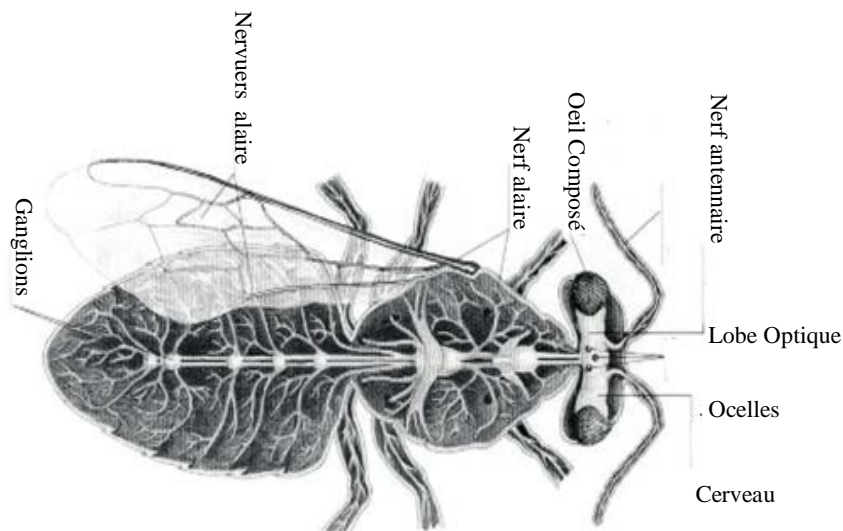


Fig.7 - Système nerveux d'une abeille ouvrière (LE CONTE, 2003)

1.4.2.2.- Système respiratoire

Il assure les échanges gazeux par un réseau de sacs aériens et de trachées qui se ramifient en trachéoles pour apporter directement l'oxygène (MALLICK, 2013) (Fig.8). Il en existe trois paires au niveau thoracique et sept sur l'abdomen (DEROTH et D'ALLAIRE, 1980). Ces stigmates comprennent une valve et une chambre munie de poils permettant la filtration de l'air. En fonction de l'activité de l'abeille et donc de ses besoins en oxygène, la

respiration peut être passive ou nécessite l'intervention des sacstrachéens qui se gonflent et se dégonflent sous l'action des contractions de l'abdomen (MACKOWIAK, 2009).

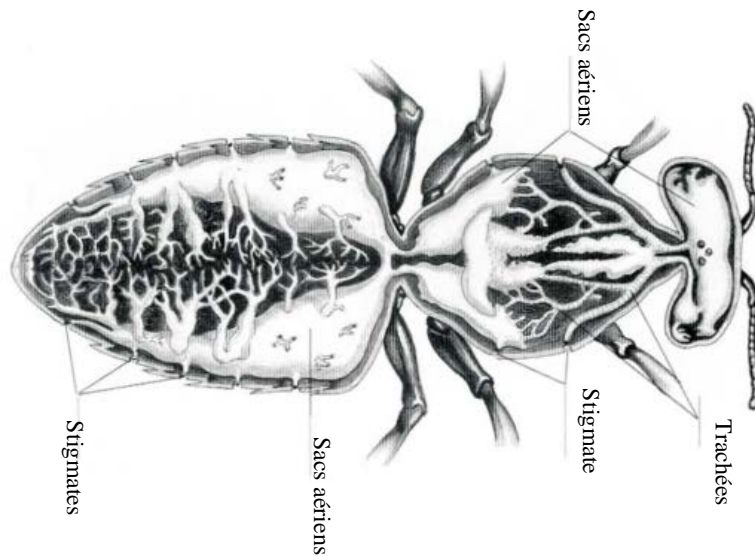


Fig.8 - Système respiratoire d'une abeille ouvrière (LE CONTE, 2003)

1.4.2.3.-Système digestif

Le système digestif permet à l'abeille d'utiliser les éléments nutritifs qu'elle ingère: le miel, le nectar et le pollen. Chez l'ouvrière, le jabot, organe de stockage des liquides et de transit de la nourriture, joue un rôle particulièrement important. A l'âge de 03 semaines, l'abeille devient une butineuse et commence la récolte du nectar, du pollen, de propolis et d'eau (LE CONTE, 2003). Elle transporte à la ruche, dans son jabot, les matières premières liquides sucrées (nectar, miellat) qu'elle aspire avec sa trompe, qui se compose d'un suçoir. Ce dernier est formé des galéa, des maxillaires et des palpes labiaux, dans lequel la langue se meut d'avant en arrière. Cet ensemble est complètement étanche ce qui provoque une aspiration permettant l'envoi de la nourriture liquide dans le pharynx et le jabot. Dans ce dernier, pendant le processus de la succion et la réception, la salive; mélange de sécrétions des glandes labiales riche en enzymes qui agissent sur le nectar, thoracique et pharyngiennes puis se mélange à la goutte de matière première reçue qui doit être épaissie et transformée en un produit apte à la conservation (MAURIZIO, 1968 et MARCHENAY et BERARD, 2007). Grâce à la proventricule les matières solides de petite taille qui se trouvent dans le contenu du jabot sont retenues et envoyées dans l'intestin moyen (Fig.9). Cette démarche permet aux

abeilles d'éloigner les graines de pollen, les spores provoquant des maladies de la nourriture absorbée (MAURIZIO, 1968).

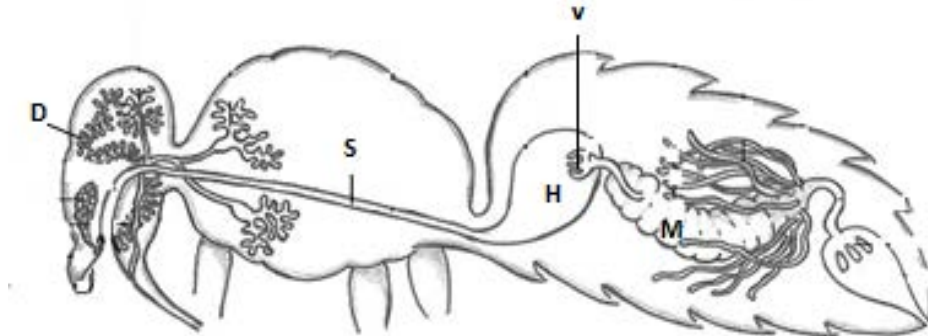


Fig.9 - Schéma de l'anatomie du tube digestif de l'abeille (MAURIZIO, 1968)

D : glandes pharyngiennes, **S** : œsophage, **H** : jabot, **V** :proventricule, **M** : intestin moyen

1.4.2.4.- Système circulatoire

Le système circulatoire de l'abeille permet le transport des différents éléments nécessaires aux cellules dans toutes les parties du corps de l'individu. Les échanges, gazeux sont réalisés plus spécifiquement par le système respiratoire, qui amène directement l'air aux cellules (LE CONTE, 2003). Il correspond à un système ouvert soit un cœur dorsal, situé dans l'abdomen, propulse le liquide circulatoire, appelé hémolymphe, dans une aorte reliant l'abdomen à la tête. L'hémolymphe se propage ensuite de façon lacunaire tout autour des organes. Deux diaphragmes, l'un ventral, l'autre dorsal, mus par des muscles abdominaux, aident à la circulation et au retour de l'hémolymphe vers le cœur composé de cinq ventricules abdominaux, séparés par des ostioles (LE CONTE, 2003; MALLICK, 2013).

1.5.-Structure de la colonie d'abeille

L'habitat de la colonie est la ruche. Ce terme englobe les ruches sans rayons et celles à rayons fixes ou mobiles. Un rucher désigne un groupe de ruches partageant le même environnement. Chaque abeille dépend des autres individus dans un système où des mécanismes de communication complexes régulent la division des tâches et assurent la cohésion sociale (JOYEUX et BOUGUET, 2014).

Une colonie d'abeilles mellifères compte en moyenne de 40 000 à 50 000 individus pendant la belle saison. En hiver elle chute à 15 000 parfois jusqu'à 5 000 (JOYEUX et BOUGUET, 2014). Cette colonie se différencie en trois castes la reine, les ouvrières et les faux-bourdons.

1.5.1. - La reine

La morphologie de la reine est adaptée à la reproduction ce qui la différencie des ouvrières et des mâles et facilite son repérage par l'apiculteur. Ses deux principales fonctions consistent à pondre des œufs et à réguler par des phéromones les activités de la colonie (LE CONTE, 2003). Il n'y a qu'une seule reine par ruche. Elle peut vivre jusqu'à 5 ans. La reine naît d'un œuf fécondé et grandit dans une cellule royale qui est plus grande que celle des autres abeilles. L'œuf se transforme en larve au 3^{ème} jour (CHAUVIN, 1960). De 0 à 6 jours, l'œuf, puis la larve, est nourri uniquement avec de la gelée royale. Au 9^{ème} jour son alvéole est operculée avec de la cire et la larve se transforme en nymphe. Seize jours après la ponte, une nouvelle reine émerge par le bas (Fig.10).

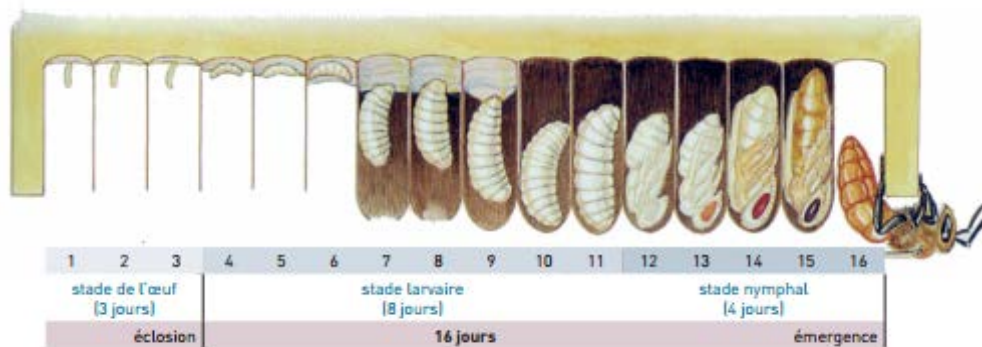


Fig.10 - Cycle de vie de la reine (MARNEFF, 2011)

1.5.2.- L'ouvrière

On peut dénombrer jusqu'à 50 000 abeilles ouvrières dans une seule ruche. En été, les ouvrières vivent environ six semaines, elles meurent d'épuisement à la tâche. En hiver elles peuvent atteindre l'âge de six mois. L'ouvrière naît d'un œuf fécondé. L'œuf est nourri exclusivement avec de la gelée royale durant les trois premiers jours. Au 4^{ème} jour, l'œuf devient larve et reçoit du « pain d'abeilles ». Au 9^{ème} jour son alvéole est operculée et la larve se transforme en nymphe. 21 jours après la ponte, la jeune abeille émerge par le haut (Fig.11).

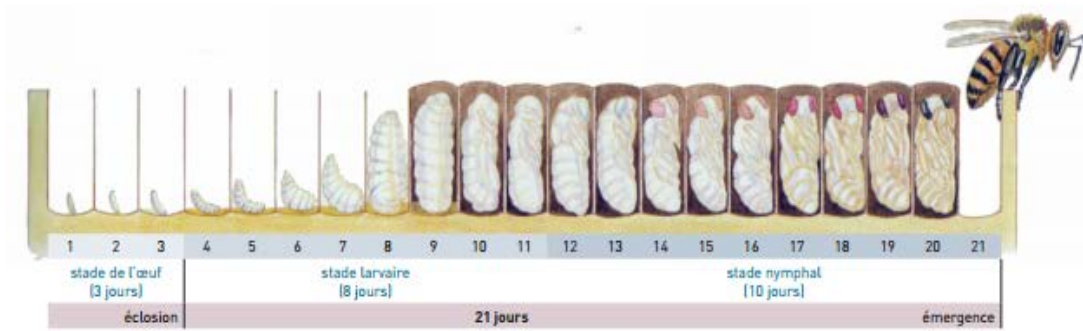


Fig.11 - Cycle de vie d'une ouvrière (MARNEFF, 2011)

1.5.3.-Le mâle (Faux bourdon)

En été, on dénombre environ 3000 fauxbourdons par ruche. Le faux-bourdon naît d'un œuf non fécondé. L'œuf est nourri exclusivement avec de la gelée royale durant les trois premiers jours. En 4^{ème} jour l'œuf devient larve et reçoit du « pain d'abeilles ». Au 10^{ème} jour la cellule est operculée. Au 24^{ème} jour, le jeune faux bourdon émerge par le haut (Fig.12) (LE CONTE, 2003).



Fig.12 - Cycle de vie de faux bourdon (MARNEFF, 2011)

1.6.-Les glandes de l'abeille domestique

L'abeille domestique est la plus évoluée de tous les insectes sociaux (DEPAUW, 2005). La plupart des tâches nécessaires au bon fonctionnement de la société se déroulent sans arrêt à l'intérieur de la ruche (nid). Seul le butinage cesse durant la nuit. Le travail des ouvrières varie selon leurs âges. Leurs tâches sont souvent en relation avec le développement de diverses glandes (MAISONNASSE, 2010). Soit les glandes buccales des ouvrières âgées entre 6 à 13 jours qui sécrètent la gelée royale pour nourrir les larves. Après leur 13^{ème} jour, ce

sont les glandes abdominales qui vont sécréter la cire pour la fabrication des rayons de la ruche, les glandes mandibulaires, les glandes protocérébrales, et les glandes thoraciques del'abeille (LE CONTE et FAUCON, 2002; MACKOWIAK, 2009) (Fig.13).

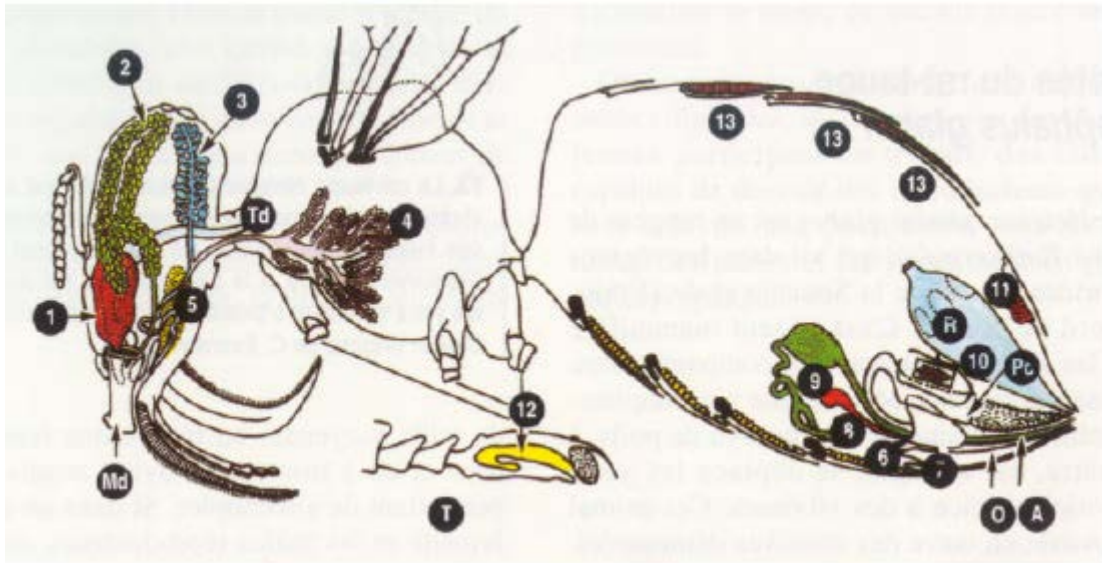


Fig. 13- Coupe schématique d'une abeille avec situation des différentes glandes exocrines(DECHAUME-MONCHARMONT, 2003).

1 glande mandibulaire (phéromone de cour, ph. sexuelle, ph. d'alarme, ph. d'orientation), **2** gl. hypopharyngienne (aliment des larves), **3-4**gl. labiale (production d'enzymes digestives), **5**gl. pharyngienne, **6**gl. cirière (production de cire), **7-8**gl. à poison (sécrétion du venin), **9** gl. de Dufour (phéromone de marquage des oeufs), **10**gl. deKoschewnikov (phéromone de cour, **ph.** sexuelle, **ph.** de stress, **ph.** d'alarme), **11**gl. deNasanov (phéromone de marquage, ph d'orientation), **12**gl. tarsale (phéromone de cour, **ph.** d'orientation), **13**gl. tergaes (phéromone de cour, ph. sexuelle). **T** tarses, **Md** mandibules, **Td** Tube digestif, **R** ampoule rectale, **A** aiguillon, **O** oviducte.

1.6.1. - La glande hypopharyngienne

La glande hypopharyngienne, située dans la tête des ouvrières d'abeilles domestiques, est constituée de groupes de cellules sécrétrices qui déversent leur sécrétion dans un conduit principal débouchant dans la partie proximale du pharynx (Fig.13) (DESEYN et BILLEN, 2005). La glande hypopharyngienne est le principal organe responsable de la sécrétion de la gelée royale développée dès les premiers jours de vie de l'abeille (PINTO *et al.*, 2012). Selon DESEYN et BILLEN (2005), les glandes hypopharyngiennes subissent des modifications importantes de point de vue formes et tailles selon l'âge des abeilles. Au bout de trois jours, les nourrices sont capables de nourrir des larves grâce à leurs glandes mandibulaires et à leurs glandes hypopharyngiennes qui produisent respectivement une sécrétion blanche riche en lipides et une substance riche en protéines (Fig.14).

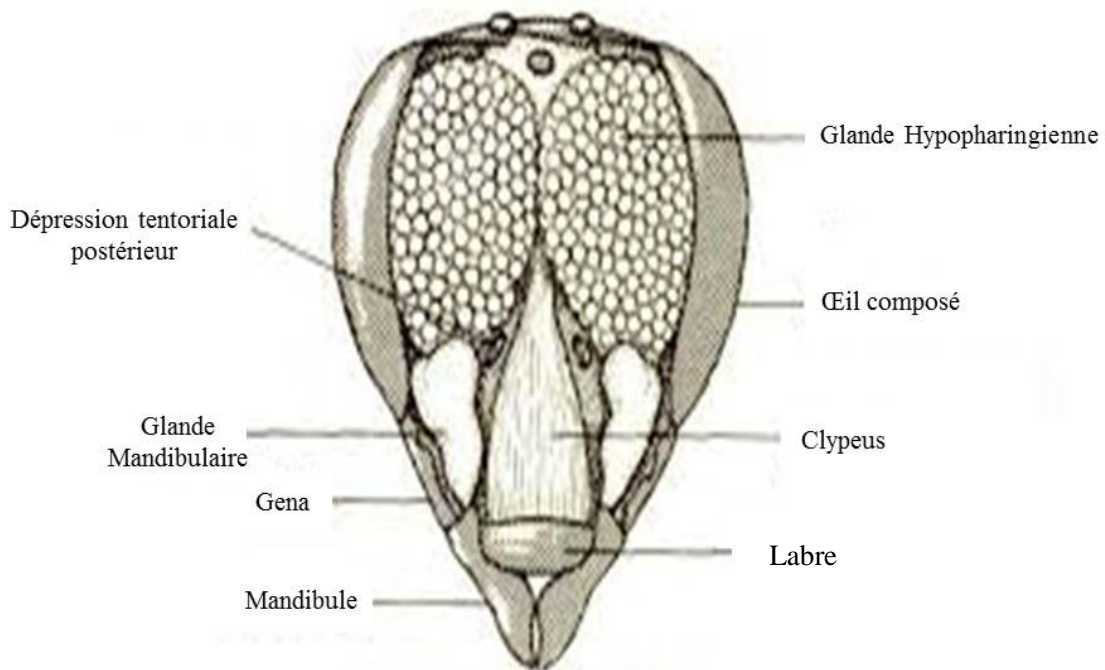


Fig.14- Structure de la glande hypopharyngienne d'une ouvrière(AUPINEL *et al.*, 2005)



Fig. 15 - Les glandes hypopharyngiennes d'une abeille ouvrière (CHARPENTIER, 2013)

1.6.2.- La glande cirière

Les glandes cirières sont quatre paires de plaques situées sous les sternites abdominaux IV à VII, qui produisent la cire (CASSIER et LENSKEY, 1995) (Fig.15). C'est un mélange complexe (de hydrocarbures et des acide gras et protéine) (TULLOCH, 1980 ;HEPBURN *et al.* (1991), produit par des glandes cirières à partir des cellules épithéliales (PIEK, 1964; SANFORD et DIETZ, 1976). Ces glandes cirières, des abeilles âgées de 15 jours, deviennent mûres et produisent de petites écailles de cire ou lamelles, auxquelles l'abeille ajoute de la salive et qu'elle malaxe avec ses mandibules (Fig. 16) (LE CONTE, 2003).

Selon LE CONTE (2003), Les abeilles maçonnet et seront employées à la construction de nouvelles alvéoles hexagonales inclinées à 13° vers le haut pour stocker le miel et empêcher les larves de tomber (Fig. 17). Les alvéoles sont de tailles différentes selon la caste du couvain élevé : plus petites pour les ouvrières situées au centre du nid, grandes pour les mâles et plutôt en périphérie, et encore plus grandes pour l'élevage de reines). Ces lamelles ne pesant que 0.8 mg, il faut environ 1250 écailles pour obtenir 1 g de cire. La température idéale pour la sécrétion de la cire est entre 33 et 36°C. (HEPBUR, 1986).



Fig.16- Quatre paire de plaquesde la glande cirière
(CHARPENTIER,2013)



Fig.17- Construction les alvéoles hexagonales
(LE CONTE,2003)

Chapitre II - Déclin de l'abeille domestique

Apis mellifera

Chapitre II - Déclin de l'abeille domestique *Apis mellifera*

Il est admis que le déclin des abeilles est un phénomène multifactoriel (MACKOWIAK, 2009). Les populations de pollinisateurs, notamment celles des abeilles ne peuvent échapper aux impacts nombreux et massifs de l'agriculture (TIRADO *et al.*, 2013). Elles souffrent de la fragmentation des habitats qui contribue à la baisse de la biodiversité dans les zones agricoles (WEIBULL *et al.*, 2003), aux perturbations des différentes fonctions physiologiques causées principalement par l'utilisation intensive des pesticides (WALORCZYK et GNUSOWSKI, 2009). Dans cette partie, une synthèse de quelques facteurs qui agissent sur les populations des abeilles sera présentée :

2.1. - Effet du climat sur les populations d'abeilles

Les paramètres climatiques ont un impact direct sur la dynamique des populations d'insectes notamment les populations d'abeilles (ROBINET et ROQUES, 2010). L'impact des changements climatiques sur l'abeille peut s'envisager à plusieurs niveaux. Il peut agir directement sur leur comportement et leur physiologie. Ainsi, il peut modifier la qualité de l'environnement floral et augmenter, ou réduire, les capacités de récoltes et de développement des colonies (LE CONTE et NAVAJAS, 2008 ; WALORCZYK et GNUSOWSKI, 2009). En outre, les longues périodes de mauvais temps ou de basses températures empêchent les abeilles de récolter du pollen ou du nectar (IMDORF *et al.*, 2010). ELLIS *et al.* (2010) ajoutent que certains apiculteurs peuvent même perdre jusqu'à 90 % de leurs colonies durant certains hivers sans aucuns symptômes apparents dus à un agent connu.

2.1.1. - Actions anthropiques sur les abeilles

Les activités humaines ont une incidence sur l'environnement ambiant en altérant la structure et la dynamique des écosystèmes (KIMOTO *et al.*, 2006). Comme de nombreuses espèces sauvages, la diversité de l'abeille, sur son aire de répartition naturelle, subit les effets des pratiques humaines en général (GARNERY, 2013). Parmi les activités humaines qui ont modifié les écosystèmes et leur fonctionnement, les plus importantes sont l'urbanisation (RICKETTS et IMHOFF 2003). Plusieurs auteurs sont en accord pour dire que la richesse spécifique des abeilles en milieu urbain est moindre comparativement aux milieux plus sauvages (EREMEEVA et SUSHCHEV, 2005; WINFREE *et al.*, 2009; MATTESON et LANGELLOTTO, 2009). En termes des abondances, WINFREE *et al.* (2007) confirment

que l'abondance des abeilles peut être plus élevée dans les milieux modérément modifiés par l'activité humaine que dans les milieux naturels non perturbés.

2.1.2. - Effets des pesticides sur les abeilles mellifères

L'usage inadapté des pesticides entraîne une forte diminution des populations d'abeilles (RICHARDS, 2001; WEIBULL *et al.*, 2003, TIRADO *et al.*, 2013; COMO *et al.*, 2016). Ces pratiques menacent le réservoir génétique des abeilles et fragilisent les capacités d'adaptation. Un essai réalisé en France a permis de montrer que les pyréthrinoïdes qui sont des insecticides largement utilisés dans les cultures mellifères entraînent une grande toxicité vis-à-vis les abeilles mellifères (DECOURTYE *et al.*, 2015). Ce même effet, est aussi noté pour les Thiamethoxam et l'imidaclopride en Algérie (CHAHBAR *et al.*, 2011; NABTI *et al.*, 2014). Les organophosphates sont aussi une des causes très connues de la mortalité des abeilles (SUCHAIL *et al.*, 2003). Les abeilles domestiques consomment également de l'eau ou du miellat de pucerons pollués par des pesticides, ce dernier est également ingéré lors de la consommation du nectar contaminé. Les molécules toxiques agissent généralement en désorganisant la conduction de l'influx nerveux. Cependant, des produits d'une génération nouvelle; régulateurs de croissance; inhibent la synthèse des constituants du tégument et, de ce fait, perturbent les larves (TASEI, 1996).

2.2. - Effets des prédateurs

Plusieurs prédateurs sont inféodés aux abeilles mellifères. Ces prédateurs, peuvent être soit des insectes, des mammifères ou bien des oiseaux (DAWSON *et al.*, 2016). Les principaux prédateurs des abeilles, décrits dans la bibliographie sont détaillés.

2.2.1.-*Aethina tumida*

Parmi les insectes, les ruches sont très attaquées par un petit coléoptère de la famille des Nitidulidae. Il s'agit de *Aethina tumida* Murray, 1867. Cette espèce originaire d'Afrique est devenue un problème important dans les zones d'introduction. L'infestation par le petit coléoptère de la ruche est une épizootie à combattre (OSAV, 2015), car il menace les colonies d'abeilles à l'échelle mondiale (HAUSER, 2004). Ce coléoptère, tant au stade larvaire qu'adulte, se nourrit de larves, de pollen et du couvain. Il s'attaque surtout aux colonies infestées (ELZEN *et al.*, 1999). Les femelles adultes pondent leurs œufs, dont l'apparence est similaire à celle des abeilles, dans la ruche (SANFORD, 2008). Le nombre d'œufs est estimé à 1000 et dans les conditions les plus favorables ce nombre est avancé à 2000 (HOOD, 2004) (Fig.18). Les larves éclosent et se nourrissent de couvain, de pollen et de miel, ensuite elles abandonnent la ruche pour effectuer leur nymphose dans le sol d'où émergent les adultes de 15 à 60 jours (SANFORD, 2008), puis s'envolent pour rechercher de

nouvelles ruches. Dans certains cas, il détruit les cadres et cause une fermentation du miel par ses défécations. En cas d'infestation élevée, les coléoptères peuvent entraîner la mort de la colonie ou une désertion des abeilles (AMBROSE *et al.*, 2000). Selon le code sanitaire des animaux terrestres (OIE, 2010), l'infestation par *A. tumida* doit être inscrite parmi les maladies à déclaration obligatoire.



Fig.18 - Larves *Aethina tumida* dans une ruche (HOOD, 2004)

2.2.2. -*Vespa velutina* et autres frelons

En Europe, le frelon à pattes jaunes, *Vespa velutina*, Lepelletier, 1836 est devenue un grand prédateur de l'abeille domestique (COUTO *et al.*, 2014, MONCEAU *et al.*, 2014). Selon VILLEMANT *et al.*, (2006), le frelon asiatique *V. velutina* est facilement identifiable grâce au thorax entièrement brun-noir velouté et aux segments abdominaux bruns, bordés d'une fine bande jaune d'une part. Au 4^{ème} segment de l'abdomen est presque entièrement jaune orangé d'autre part. Les pattes brunes sont jaunes à l'extrémité. La tête est noire et la face jaune orangé (VILLEMANT *et al.*, 2006). S'attaque essentiellement à *Apis mellifera* et à *Apis cerana* (Fig.19). Il agresse ses proies en les attendant en vol stationnaire devant la ruche (DARCHEN, 2012). Cette stratégie de vol stationnaire devant la ruche, lui permet d'attendre le retour d'une butineuse pour la capturer ; puis il se pose et la dépèce, n'emportant que son thorax (VILLEMANT *et al.*, 2006). Ces dégâts peuvent ne pas être importants mais il est à

signaler que le nombre total d'individus produit par un nid est 6000 mais les plus grosses colonies peuvent produire jusqu'à 15000 individus d'où la gravité de ces attaques (VILLEMANT *et al.*, 2011a). Les dégâts peuvent causer directement la disparition des colonies, de nombreux petits apiculteurs voient leur cheptel anéanti (LABBE et LANIO, 2014). Ces attaques peuvent aboutir à l'extermination de 30 % d'une colonie d'abeilles asiatiques, *Apis cerana* (SHAH et SHAH, 1991). Les abeilles domestiques représentent 37 % des proies en milieu agricole (VILLEMANT *et al.*, 2011b). Une enquête réalisée en France a révélé que 98% apiculteurs professionnels et amateurs pensent que le frelon asiatique soit dangereux pour les abeilles.



Fig.19 - *Vespa.velutina* attaque des abeilles ouvrières (CHAUZAT et MARTIN, 2009)

2.2.3. - La fausse teigne

La fausse teigne appelée également papillon de la ruche est l'un des ravageurs les plus largement répandus dans les ruches (BALLIS, 2013). Selon REY (2012), aux États-Unis la fausse teigne est considérée comme étant responsable de la perte de plusieurs dizaines de milliers de ruches chaque année. De même, au Cameroun, la fausse teigne attaque 69 % des ruches (TCHOUMBOUE *et al.*, 2001). Il est à signaler qu'il existe en fait deux espèces de fausses teignes. La plus connue et qui est de grande taille est *Galleria mellonella* (L., 1758) dont l'adulte mesure 20 à 25 mm de long, est de couleur grise avec des tâches très foncées. L'autre de plus petite taille et dépasse rarement 18mm de long, *Achroea grisella* (Fabricius), 1794. Le mâle est légèrement plus petit que la femelle. Les deux fausses teignes ont un mode de vie identique et occasionnent les mêmes types de dégâts. Les adultes vivent très peu de

temps (quelques jours) et ne se nourrissent pas. Après l'émergence, ils sortent de la ruche (RAZAFINDRAZAKA, 2010). La reproduction a lieu dans les arbres à proximité des ruches. Les femelles fécondées s'introduisent dans la ruche (généralement le soir ou la nuit) puis elles pondent dans les coins sombres et les anfractuosités du bois de la ruche pour éviter la piqûre des ouvrières (RAZAFINDRAZAKA, 2010). Ce sont les larves des fausses teignes qui causent plus de dégât en creusant des galeries dans les cadres de couvain et pollen qu'elles détruisent rapidement (ADAM, 2012). Les larves de ce papillon se développent en se nourrissant des cocons laissés par les larves d'abeilles et du pain d'abeilles contenu dans les cadres (DROZ et CHARRIERE, 2015). La chenille creuse des galeries soyeuses pour se protéger des abeilles ce qui détruit le cadre qui deviennent tout miteux. Selon la FAO (2006), la fausse teigne est souvent signalée pour provoquer des endommagements à la fois aux colonies d'abeilles et à leurs produits. Ces attaques peuvent atteindre même les colonies fortes. Les dégâts causés par ces chenilles peuvent arriver jusqu'au blocage de la ponte et une destruction du couvain existent si les galeries faites par les teignes sont nombreuses (RAZAFINDRAZAKA, 2010).

2.2.4. - Autres prédateurs

Il existe d'autres prédateurs des abeilles qui ne sont pas considérées comme étant une nuisance sérieuse pour les colonies d'abeilles, mais ils peuvent causer des dégâts importants aux niveaux des ruches. Le cas des fourmis qui peuvent pénétrer à l'intérieur des colonies pour dérober de la nourriture. Ces espèces friandes de miel s'attaquent aussi aux larves et aux nymphes qu'elles dépècent. Elles établissent parfois leur nid sur les couvre cadres où elles jouissent d'un lieu d'élevage parfait (RAZAFINDRAZAKA, 2010). Ainsi, il est important de signaler le cas des Asilides qui renferment beaucoup d'insectes carnivores qui guettent les abeilles ou les chassent au vol (POUVREAU, 1974). Ce dernier auteur ajoute le cas de *Phora incrassata* qui sont diptères, de petites mouches bossues de moins de 5 mm qui déposent ses œufs sur les larves d'abeilles, la larve de *Phora* pénètre ensuite à l'intérieur du corps de la larve d'abeille et finit par la détruire. Mouches à miel *Senotainia tricuspis* (Meigen, 1838) est aussi citée. Cette mouche pond sur l'abeille en se jetant sur elle. Sa larve détruit l'abeille. Ce phénomène est reconnu comme une maladie, qu'on appelle myase de l'abeille (JAVON *et al.*, 2002). Même si les attaques des petits mammifères comme les musaraignes, les souris et les mulots sont réduites mais il est très important de les signaler car elles finissent parfois de détruire toute la colonie surtout en hivers où ces espèces installent leurs nids à l'intérieur des colonies d'abeille (GHARBI, 2011). Les oiseaux insectivores comme les hirondelles et les guêpiers sont considérés aussi comme une vraie

menace pour les abeilles (LAIR,2005). En Algérie, TAIBI (2012) a signalé que *Apis mellifera* représente 1,99 % du régime alimentaire de la pie-grièche méridionale *Lanius meridionalis* au niveau de la Mitidja orientale.

2.3.-Effet des Bactéries pathogènes

La santé de l'abeille peut soumise à certains nombre d'agents pathogènes infectieux, comme les bactéries, les champignons, les microsporidies (*Noesmos apis* et *Noesmos cerana*) et les virus (CARLETTO *et al.*, 2010; VIDAU *et al.*, 2011; RIBIERE-CHABERT, 2013; RITTER, 2014 ; KANG *et al.*, 2016) (Tab.1). La transmission des maladies et ennemis de l'abeille domestique peut se faire de façon verticale, c'est-à-dire de la reine vers ses descendants, ou de façon horizontale, entre les différents individus. Elle peut de plus se produire entre individus d'une même colonie (transmission intracolonic) ou entre individus de colonies différentes (transmission intercolonie) (MACKOWIAK, 2009). Les principaux ennemis des abeilles ainsi leurs traitements sont mentionnés dans le tableau 2 (Annex1). Tout de ces agents pathogènes sont très contagieux; mais certains d'entre eux (par exemple, *Paenibacillus larvae*) conduisent la mort de toute la colonie et d'autres tels que *Ascosphaera apis* devraient normalement tuer seulement un sous ensemble de la population de la colonie, néanmoins affecter de manière significative la santé des colonies (ARONSTEIN et HOLLOWAY, 2013; EVANS et SPIVAK, 2010).

Tableau° 1 -Principaux agents pathogènes viraux, bactériens et fongique de l'abeille domestique(MACKOWIAK, 2009)

| Agents bactériens | Agents parasitaires | Agents viraux (Virus à ARN) | Agents fongiques |
|--|--------------------------|---|--|
| <i>Paenibacillus larvae</i> (Agent responsable de la loque américaine) | <i>Varroa destructor</i> | Les principaux agents viraux sont mentionnés dans le tableau 3. | <i>Ascosphaera apis</i> (Agent responsable du couvain plâtré) |
| <i>Melissococcus plutonius</i> (Agent principal de la loque européenne) | <i>Acarapis woodi</i> | | <i>Nosema apis</i> (Agent responsable de la Nosérose) |
| | | | <i>Nosema ceranae</i> |

Les bactéries les plus importantes qui provoquent des maladies chez les insectes sains appartiennent aux familles des Bacillaceae, des Pseudomonadaceae et des Enterobacteriaceae. Normalement, elles pénètrent dans leurs hôtes par la bouche, parfois par les blessures ou encore sont libérées dans l'hémocoel par les nématodes avec lesquels elles vivent en symbiose (MOHANDKACI *et al.*, 2014). Parmi les bactéries pathogènes les plus connues de l'abeille, deux espèces peuvent infecter les larves d'abeilles, *Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius* (FLURI, 2003; VIDAL-NAQUET, 2012 et REY, 2012).

Ces maladies s'attaquent au couvain de différents âges (couvain ouvert pour la loque européenne et couvain fermé pour la loque américaine) provoquant la mort des larves ou des nymphes, parfois en grand nombre. Le couvain affecté, présente des larves affaissées de couleur blanc crémeux, marron ou noirâtre (CHAUZAT, 2011).

2.3.1. - La loque américaine

La loque américaine, est l'une des maladies bactériennes très grave d'abeille domestique, qui affecte le couvain operculé d'une colonie. L'agent causal, *Paenibacillus larvae* (VIDAL-NAQUET, 2011; LEQUEUX *et al.*, 2009; RITTER, 2014) est une bactérie Gram positive, est en forme de bâtonnet arrondi, droit ou/et parfois incurvé, taille variable (0,5 µm de large par 1,5 ± 6 µm de long), s'attaque aux jeunes larves et provoque leur mort au stade du couvain operculé (DE GRAAF *et al.*, 2001; CHIRON et HATTENBERGER, 2009; NGUYEN *et al.*, 2009; CHAUZAT, 2011). Lorsque les butineuses nettoient les cellules et retirent les larves mortes, l'aspect du couvain présente des trous où les alvéoles n'abritent plus de larves et/ou de nymphes, d'où le nom de couvain en mosaïque ou couvain lacunaire (FORSGREN, 2010; GENERSCH, 2010). La bactérie peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée. Les spores germent dans l'intestin moyen des larves de jeunes larves et pénètrent dans l'épithélium de l'intestin moyen (BEHRENS *et al.*, 2007). Ces spores sont extrêmement résistantes à la chaleur et aux agents chimiques, et elles peuvent survivre pendant plusieurs années sur les écailles dans les couvains morts après infection (SIMONEAU, 2002; BIRI, 2002; CHIRON et HATTENBERGER, 2009 et OIE, 2015).

Selon SIMONEAU (2002), la loque américaine n'affecte pas l'abeille adulte, mais seulement les jeunes larves du couvain. Elle affecte surtout la larve d'un jour, alors que celle-ci est nourrie par les abeilles nourricières qui lui transmettent du miel contaminé avec des spores de *P. larvae* (CHIRON et HATTENBERGER, 2009). La dissémination est très facile à l'intérieur de la ruche par les ouvrières, d'une ruche à l'autre par la dérive, le pillage, l'essaimage et les manipulations de l'apiculteur, ainsi que d'un rucher à l'autre par ce dernier

également, et par les mâles à la fécondation des reines, enfin, par les transactions commerciales (RATNIEKS,1992;BIRI, 2002; LINDSTRÖM *et al.*, 2008).

Un nid à couvain affecté par la loque américaine présente des cellules operculées de façon désordonnée (CHIRON et HATTENBERGER, 2009); celles qui contiennent des larves mortes ont souvent une couleur foncée.Elles sont plus ou moins déchirées, voire trouées (OIE, 2008). Les larves mortes portent une odeur très désagréable, douceâtre et putride, se décomposent en une bouillie visqueuse brunâtre, et l'on peut les étirer en fils à l'aide d'un bâtonnet (Fig.20) (BIRI, 2002 ; LINDSTRÖM *et al.*, 2008). Cette bouillie se dessèche rapidement et se transforme en écailles sombres qui adhèrent fortement au fond et aux parois des cellules (Fig.21).



Fig.20 - Larve filante (LINDSTRÖM *et al.*, 2008)

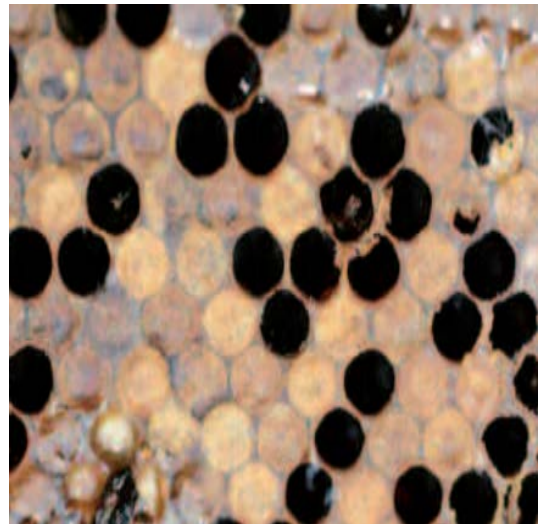


Fig.21 - Écaille sombre (LINDSTRÖM *et al.*, 2008)

2.3.2. - La loque Européenne

La loque européenne est une épizootie des abeilles contagieuse. Elle est déclenchée par la bactérie *Melissococcus plutonius*, bactérie à Gram positif (Fig.22) (FORSGREN *et al.*,2013 et LEQUEUX *et al.*, 2009; RITTER, 2014). Seul le couvain est atteint par la loque européenne (FORSGREN,2010 ; BUDGE*etal.*, 2010). Elle attaque tant les larves des ouvrières que celles de reines ou de mâles, et a été longtemps considérée comme moins dangereuse que la loque américaine (CHIRON et HATTENBERGER, 2009 et CHARRIERE*et al.*, 2012).



Fig.22 - La coloration de Gram de *Melissococcus plutonius*. (FORSGREN, 2010)

Les larves sont sensibles à l'infection par voie orale, par l'intermédiaire de spores bactériennes que les ouvrières nourricières leur transmettent (SPIVAK et REUTER, 2001). Dans les alvéoles ouvertes, les larves perdent leur couleur de nacre, deviennent terne puis jaunes et enfin grisâtres ou brunes, ainsi une odeur acidulée typique émane du couvain malade au cours de la maladie (Fig.23 a. et b.) (IMDORF *et al.*, 2008; CLEMENT, 2003). La cause principale du développement de cette maladie réside dans la carence en protéine de la colonie due à de mauvaises conditions météorologiques (CLEMENT, 2003).

Des agents pathogènes secondaires apparaissent. Les larves étant affaiblies par *Melissococcus plutonius*, les agents secondaires, comme *Achromobacter eurydice*, *Enterococcus faecalis* ou *Bacillus alvei*, peuvent aisément se multiplier (IMDORF *et al.*, 2008).

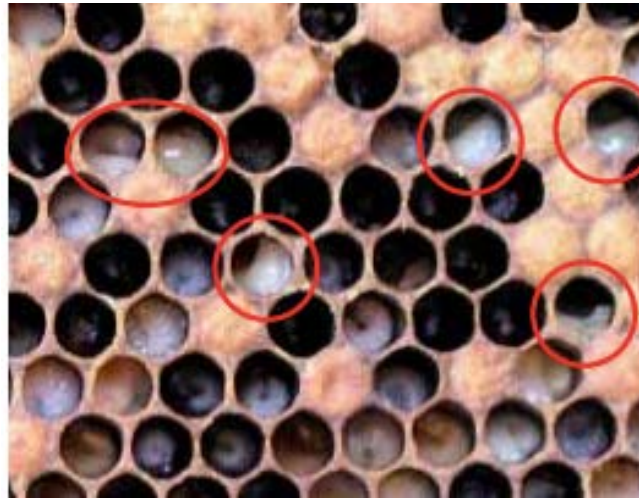


Fig.23 (a) - Larves mourantes avec teinte jaunâtre (IMDORF *et al.*, 2008)



Fig.23 (b) - Larves infectées par la loque européenne (CHARRIERE *et al.*, 2012)

2.4. - Effet des parasites

Le parasite, est un organisme constitué d'un ensemble de cellules. Ils se nourrissent de l'hémolymphe de l'abeille ou bien des larves et pupes. Parmi ces parasites, il y a le *Varroa Destructor* ou *Jacobsoni* et l'*Acarapis woodi* ou Tarsonémidé (POUVREAU ,1974).

2.4.1.- Lavarroase

La varroase est une maladie parasitaire grave (FAUCON et CHAUZAT, 2008), très contagieuse, qui atteint les abeilles adultes et le couvain ; elle est due au développement et à la multiplication d'un acarien parasite externe macroscopique (COLIN, 1982). L'agent causal de la varroase est *Varroa destructor*, Anderson & Trueman 2000, est un acarien ectoparasite obligatoire de l'abeille domestique (Fig.24) (LE CONTE et FAUCON, 2002; SHEN *et al.*, 2005). La mite de varroa, un des grands fléaux de l'apiculture mondiale (WENDLING, 2014). La mite varroa est cependant beaucoup plus petite, environ 1 mm, et vit sur les larves, les pupes et les abeilles adultes (KLUSER *et al.*, 2010). Les femelles mesurent environ 1,1 mm de long sur 1,6 mm de large; sa coloration varie du marron clair au marron foncé (COLIN, 1982) (Fig.25). Elles pondent environ 6 œufs dans la cellule d'une larve d'abeille. Les jeunes mites au nourrissent du sang les larves. L'action des mites est due à l'affaiblissement de la population des abeilles, pour ensuite décliner complètement en raison de la mauvaise qualité des aliments des abeilles nourricières (VANOPPEN *et al.*, 2001; CHARPENTIER *et al.*, 2013).



Fig.24 - Mites varroa sur la tête d'abeille (LE CONTE et FAUCON, 2002).



Fig.25 - *Varroa destructor* (ROSE *et al.*,2014)

2.4.2. - *Acarapis woodi*

L'acariose des trachées est une maladie parasitaire interne et contagieuse de l'abeille adulte *Apis mellifera* (GARCIA FERNANDEZ, 1999). *Acarapis woodi*, acarien de 0,10 à 0,18 millimètre de long, est l'agent causal de l'acariose intrachéenne des abeilles (Fig.26) qui se localise dans les trachées de l'abeille et ne sort à l'extérieur que pour infester de nouvelles abeilles (CHIRON et HATTENBERGER, 2009; CHARRIERE *et al.*, 2012). Il se nourrit de l'hémolymphe en perforant la paroi trachéale. Ce parasite peut toucher les trois castes d'abeilles adultes : reines, ouvrières, faux-bourçons (VIDAL-NAQUET, 2011 et REY, 2012).

Les symptômes cliniques de l'acariose des trachées se manifestent par des troubles qui peuvent être observés dans le comportement de la colonie de même que dans le comportement et l'apparence des abeilles atteintes : un en vol pénible, un vol lent et lourd, une chute devant la ruche, une démarche lente et difficile. Enfin, les abeilles malades se rassemblent en petits groupes avant de mourir (CHIRON et HATTENBERGER, 2009).



Fig.26- Acariose de trachée d'abeille (REY,2012)

2.5. -Effet des virus

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires (BERTHOUD *et al.*, 2005). Ils utilisent la machinerie cellulaire de l'hôte infesté pour se répliquer et causent, de ce fait, des dommages. Des virus ont été observés chez tous les êtres vivants (MACKOWIAK, 2009;SIMON, 2012; BEAUVAIS, 2013; ADJLANE *et al.*,2015).

L'abeille domestique, *Apismellifera*, est soumis à de nombreuses infections virales, et un total de 15 virus ont été identifiés dans cette espèce (CLEMENT, 2003;TENTCHEVA *et al.*, 2004;COX-FOSTER *et al.*, 2007). Les plus importants sont recensés dans le tableau3. (DAINAT *et al.*, 2008). Ces virus subsistent généralement à l'état latent dans les colonies et c'est souvent leur association avec d'autres facteurs qui déclenche la maladie virale (CLEMENT, 2003;ADJLANE *et al.*,2015).

Tableau° 3-Principaux virus des abeilles (DAINAT *et al.*, 2008, KHONGPHINITBUNJONG *et al.*,2016).

| DWV | SBV | CBPV | ABPV | BQCV | KBV |
|-----------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| (Virus des ailes déformées) | (Virus du couvain sacciforme) | (Virus de la paralysie chronique) ou maladie noir | (Virus de la paralysie aiguë) | (Virus de la cellule royale noire) | (Virus du Cachemire) |

2.5.1. - Le virus des ailes déformées (Deformed Wing Virus)

Le virus DWV (Deformed Wing Virus) est présent en Europe, en Amérique, en Afrique et en Asie (CHARPENTIER *et al.*, 2013, KHONGPHINITBUNJONG *et al.*,2016). La quantité de virus augmente chez les individus infectés durant l'hiver et diminue donc le temps de vie des abeilles (PRISCO *et al.*, 2011;DAINAT *et al.*, 2012). A cette période, les dommages (mortalités de couvain d'abeilles naissantes, et adultes) engendrés par ce virus sont positivement corrélés avec la densité de Varroa (CLEMENT, 2003). Le virus des ailes déformées (DWV) est le virus le plus souvent cité dans les recherches effectuées (CHEN *et al.*, 2004,TENTCHEVA *et al.*, 2004;ANTUNEZ *et al.*,2004;BERENYI *et al.*, 2006; COX-FOSTER *et al.*, 2007; GISDER *et al.*, 2010; MARTIN *et al.*, 2010; ZIONI *et al.*, 2011;HONGXIA *et al.*, 2012; ADJLANE*et al.*, 2015).Il est responsable de malformations morphologiques nettement visibles sur le corps d'abeilles, plus particulièrement au niveau des ailes, d'où le nom du virus (Fig.27) (DAINAT *et al.*, 2008). Ces abeilles ne sont pas viables et sont rapidement éliminées de la ruche par les abeilles encore saines (CLEMENT,

2003;YUE et GENSCH, 2005). Les nourrices infectées transmettent le virus aux jeunes larves par le biais de la gelée larvaire (CHARRIERE *et al.*, 2012;ADJLANE *et al.*, 2015). Les abeilles adultes s'infectent par les échanges trophallactiques (FLURI *et al.*, 1998 ;FLURI,2003; MARTIN,2012). C'est aujourd'hui le virus le plus prévalent dans les ruchers et sa présence est souvent mise en cause dans les phénomènes de mortalités observées (KAJOBE *et al.*, 2010 ; ADJLANE *et al.*, 2015). La présence d'abeilles aux ailes déformées est donc à mettre en relation avec l'infection par le varroa (CLEMENT, 2003;PRISCO *et al.*, 2011).

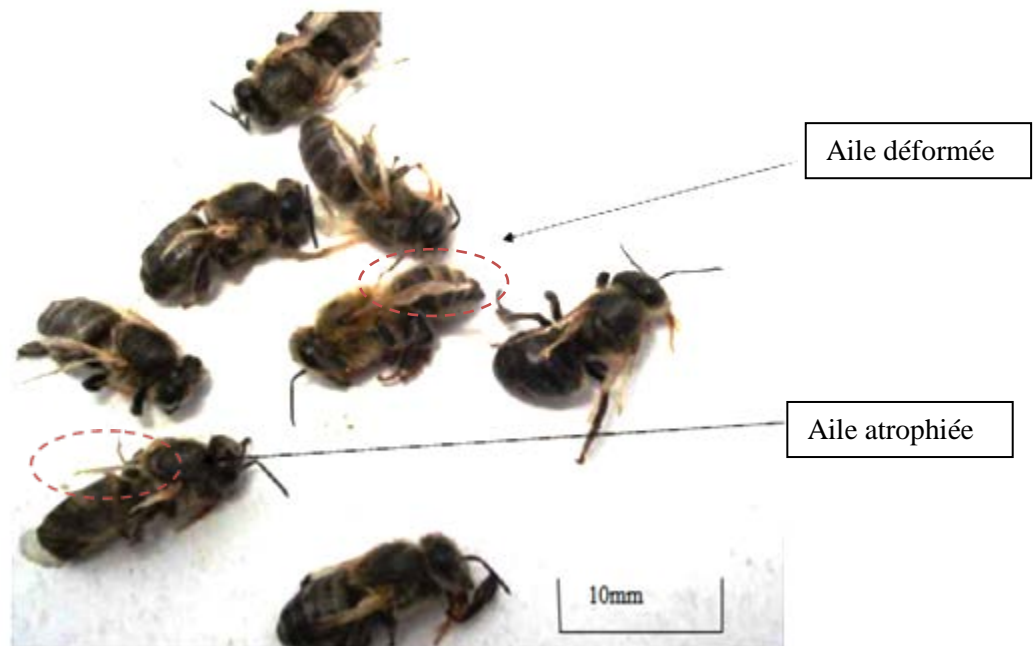


Fig. 27-Des abeilles mortes avec des ailles complètement déformées (ADJLANE, 2012)

2.5.2. - Le virus de couvain sacciforme (Sac broodbee virus)

Le couvain sacciforme est une maladie contagieuse du couvain sous forme mosaïque (GRABENSTEINER *et al.*, 2001;REY, 2012; HEE-KWEON, 2015). Il doit son nom du symptôme typique de la larve morte, lorsqu'on l'extraites de la cellule, elles se présentent sous la forme d'un petit sac rempli de liquide "ecdysial"(Fig.28) (DAINAT *et al.*, 2008). Selon JIN-LONG *et al.*(2012) ainsi que RANA *et al.* (2011), les larves infectées sont apparues on couleur blanc nacré à jaune pâle dans leur partie céphalique. Elle forme un sac qui explose entre les doigts et qui possède un fort pouvoir contaminant (CHARRIERE *et al.*, 2012) (Fig.29). Le virus bloque la larve au tout début de la nymphose, l'empêchant d'atteindre le stade de nymphe, juste après l'operculation, entrainant ainsi la mort de la larve (REY, 2012).



Fig.28- Larve morte en forme typique de sac, remplie de liquide (CHARRIERE *et al.*,2012)

La maladie qui apparait souvent au printemps, favorisée par les mauvaises conditions climatiques (DAINAT *et al.*, 2008).Le varroa joue un rôle de déclencheur de la multiplication du virus par lésion des tissus, ainsi que de vecteur car il contamine ses pièces buccales en ponctionnant une abeille malade (CLEMENT, 2003;CHARRIERE*et al.*, 2012).

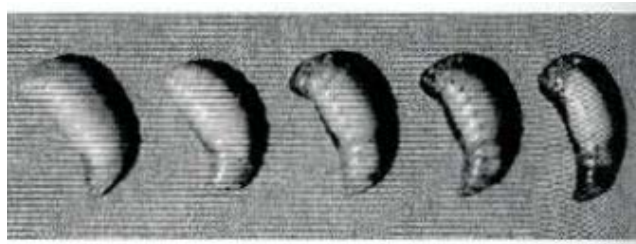


Fig.29- Larves infectées par le S.B.V. (CLEMENT, 2003)

2.5.3. - Le virus de la paralysie aiguë (Acute bee paralysis virus)

Le virus de la paralysie aiguë est aujourd'hui mis en relation avec le phénomène des pertes de colonies en tant que facteur associé (FAUCON *et al.*, 1992; BAKONYI *et al.*, 2002). Cette pathologie peut toucher le couvain ou les abeilles adultes, et il sera observé une mortalité larvaire à tous les stades des larves décolorées, et chez les adultes des insectes trainants, incapables de voler, errant hors de la ruche avant de mourir (CHIRON et HATTENBERGER, 2009; ANSES, 2016).

L'ABPV peut, comme le CBPV (virus de paralysie chronique des abeilles) provoquer des symptômes chez les abeilles adultes tels que tremblement et incapacité de voler (CLEMENT, 2003). Les abeilles atteintes se déplacent alors en rampant devant le trou de vol ou dans la colonie, leurs ailes tremblent et finissent par mourir dans les 4 à 7 jours (CHARRIERE *et al.*, 2012). Il a aussi été observé que des abeilles infectées par ce virus perdaient leurs poils et leur corps devenait foncé. Visiblement, les abeilles atteintes de l'ABPV sont exclues de la colonie et attaquées par leurs congénères (BALLIS, 2013).

2.5.4. - Le virus de la paralysie chronique, ou maladie noire (Chronic bee paralysis virus)

Cette maladie infectieuse contagieuse n'atteint que les abeilles adultes (CHARRIERE *et al.*, 2012). Les abeilles qui ont contracté cette maladie perdent plus ou moins leurs poils partant par la partie dorsale du thorax pour atteindre progressivement le corps tout entier (CLEMENT, 2003). Suite à cette affection, les abeilles subissent des difficultés pour voler et deviennent alors complètement noires (BALLIS, 2012) (Fig.30).



Fig. 30-Aspect d'une abeille infectée par la maladie noire (CLEMENT, 2003).

2.5.5. - Le virus de la cellule royale noire (Black queen cell virus)

La larve malade serait de couleur jaune pâle et présenterait des symptômes similaires au SBV, comme de sac lorsque l'on prend la larve avec une pince. Les parois des cellules royales peuvent devenir noires ce qui est caractérisé l'infection par ce virus (AUFAURE *et al.*, 2012). Il est également possible de retrouver le BQCV chez la puppe des ouvrières. Cette maladie est souvent associée à des infections par *Nosema apis* (CHEN et SIEDE, 2007). Lorsque de fortes infections de *N. apis* surviennent, la probabilité de rencontrer BQCV est forte (DAINAT *et al.*, 2008).

2.5.6. - Le virus du Cachemire (Kashmir bee virus)

Kashmir bee virus ou virus du cachemire (d'où son nom) (AUFAURE *et al.*, 2012) a été isolé pour la première fois sur *Apis cerana* au Cachemire en 1974 puis sur *l'Apis mellifera* aux Etats-Unis et en Europe (BAILEY et WOODS, 1977). Il cause des mortalités importantes sans symptômes particuliers. Le KBV atteint le couvain et l'abeille adulte (COFFEY, 2007; MEEUS *et al.*, 2014). Les adultes atteints meurent dans les 3 jours, suivant l'infection tandis que les larves infectées continuent à se développer, mais ne présentent pas de symptômes particuliers (DAINAT *et al.*, 2008). A l'état latent dans la ruche, l'infection se développe lorsqu'il est mis en relation avec *Varroa destructor*, ce dernier peut transmettre le virus entre abeilles adultes et entre les nymphes (HUNG *et al.*, 2000; VANOPPEN *et al.*, 2011).

2.6. - Effet des champignons

Les maladies provoquées par les champignons, appelées également moisissures ou mycoses, atteignent les adultes et les larves : citons parmi les moisissures susceptibles de rendre les abeilles malades *Aspergillus flavus*, *Ascospaera apis*, *Ascospaera alvei* (BIRI, 2011).

2.6.1. - Nosémose

La nosémose est une maladie qui affecte uniquement l'abeille au stade adulte (WEBSTER *et al.*, 2004). Elle est causée par un champignon microscopique unicellulaire du genre *Nosema*. On retrouve deux espèces de ce parasite intracellulaire causant des infections fongiques chez l'abeille européenne *Apis mellifera* soit *Nosema apis* et *Nosema ceranae* (TREMBLAY, 2007 et DOUBLET *et al.*, 2016). L'infection à *Nosema apis* est bien connue et identifiée depuis près d'un siècle. Par contre, les pathologies associées à l'infection par

Nosema ceranae chez l'abeille européenne sont beaucoup plus contemporaines et ne sont pas bien connues, car affectant l'abeille asiatique initialement *Apis cerana*. Selon TRAVER et FELL (2012), la nosérose est une pathologie touchant les trois castes d'abeilles domestiques (HIGES *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2007) et les mâles (TRAVER et FELL, 2011), causée par la prolifération des agents dans les cellules intestinales de l'insecte (GEOFFREY, 2013 et REY, 2012). Selon HIGES *et al.*, (2007), l'infection par le parasite, produit principalement par le biais l'ingestion de spores avec de la nourriture ou de l'eau. Les spores germent dans l'intestin moyen (MAIOLINO *et al.*, 2014). Ce parasite provoque une diminution de leur défense contre des pathogènes, diminue le temps de vie et peut aboutir à des diarrhées (Fig.31) (ADJLANE *et al.*, 2012) et les larves ont souvent une couleur jaune soufre avec une odeur distincte (OIE, 2008). Ainsi, ce parasite, décrit dans certaines régions comme la cause majeure de la mortalité des abeilles et affectant 96,9 % des pays qui réalisent un contrôle (FLECHE, 2001). Dans d'autres cas, il est soupçonné d'affaiblir les colonies par l'interaction avec d'autres facteurs de pression de l'environnement (DUSSAUBAT-ARRIAGADA, 2012). Les muqueuses stomacales des abeilles atteintes, vues au microscope, sont complètement remplies de spores de *Nosema* (HIGES *et al.*, 2010) (Fig.32), elles ont une forme elliptique avec 5 microns de longueur et 3 microns de largeur (BIRI, 2011). Les symptômes et les dommages sont constatés principalement au printemps (DUSSAUBAT - ARRIAGADA, 2012). Des colonies infestées s'affaiblissent ou périssent, s'atténuent en été et les reines malades ne pondent plus d'œufs et peuvent mourir (CHARRIERE *et al.*, 2012).

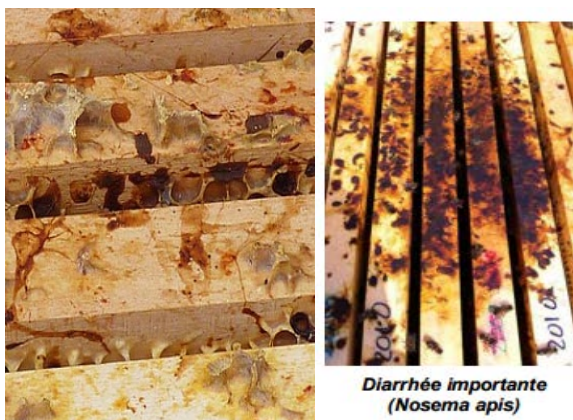


Fig.31 -Symptômes cliniques sur des cadres de dysenterie Typique pour *Nosema apis*. (CHARRIERE *et al.*, 2012)

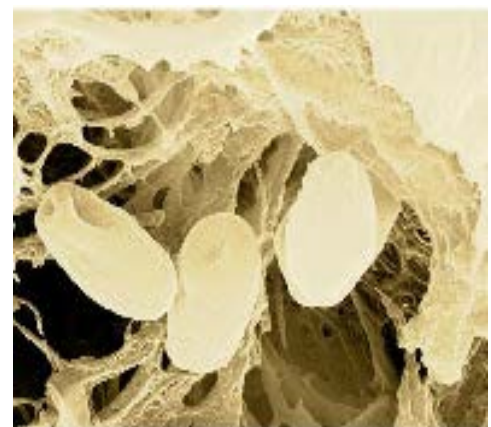


Fig.32 -Spores de *Nosema apis* (PATRELLE, 2011)

Les colonies affaiblies offrent des possibilités de développement à d'autres agents pathogènes (infections mixtes). La nosémose a souvent été diagnostiquée en relation avec des virus, par exemple le Black Queen Cell Virus (BQCV) (CHARRIERE *et al.*,2012).

2.6.2. - *Ascospheara apis*

Ascospheara apis est un champignon filamenteux qui appartient à la classe des ascomycètes hétérothallique (ARONSTEIN et HOLLOWAY, 2013). Cette mycose est causée par *Ascospheara apis* (ARONSTEIN et MURRAY,2010). La maladie " du couvain plâtre" apparaît au cours des mois les plus chauds et provoque la couvée calcifiée qui affecte les larves (CHRISTENSEN et GILLIAM, 1983; BAMFORD, 1987; ARONSTEIN et MURRAY, 2010) qui deviennent blanchâtre ou verdâtre (Fig.33). Les larves d'abeilles peuvent ingérer les spores pathogènes à tout âge (BIRI, 2002). Généralement, ce sont les larves de faux bourdons qui sont atteintes en premier, puis les larves d'ouvrières, voire celles des reines (HEMMERLE, 2015). Les spores se développent dans le tube digestif des larves et donnent naissance à un mycélium (forme végétative du champignon) qui traverse d'abord la paroi intestinale, puis envahit tous les tissus de l'insecte en formation et passe finalement à travers la cuticule (CORNMAN *et al.*, 2012). L'équipement enzymatique d'*Ascospheara apis* est néanmoins capable de lyser des constituants de l'exosquelette de l'abeille (HEMMERLE, 2015).



Fig.33 - Larves ouvrières momifiées par *Ascospheara apis* donnant le couvain dit "calcifié".
(CHARRIERE J.D *et al.*, 2002)

2.6.3. - *Aspergillus flavus*

Autre mycose, l'aspergillose des abeilles est occasionnée également par un champignon de la classe des Ascomycètes et du genre *Aspergillus*, ordinairement de l'espèce *Aspergillus flavus* (CHIRON et HATTENBERGER, 2009). Elle se reconnaît par la présence à la surface des cadavres de larves d'un duvet grisâtre ou vert foncé à noir, à la consistance très dure des larves mortes, et à l'adhérence des cadavres à la paroi des alvéoles par l'intermédiaire du mycélium du champignon (BIRI,2002).Selon FOLEY *et al.* (2014),les abeilles adultes ont également été confirmées pour être très sensibles à l'infection par *A. flavus*.

2.6.4.- *Ascospaera alvei*

Plusieurs dizaines de champignons microscopiques peuvent se développer en saprophytes dans la ruche (BRUNEAU, 2012),sans y provoquer des dégâts économiquement mesurables (HEMMERLE,2015).Seul *Ascospaera alvei*, champignon saprophyte spécifique du nid des abeilles, peut occasionner des moisissures et quelques pertes dans les réserves de pollen surtout par printemps humide et frais (de 15 à 18°C)(CHIRON et HATTENBERGER, 2009, SHUTLER *et al.*, 2014). Le mycélium de ce champignon apparaît comme un feutrage recouvrant le pollen des cadres, prenant d'abord une teinte blanchâtre puis grisâtre et enfin noirâtre (CHIRON et HATTENBERGER, 2009).

2.6.5. - *Aspergillus niger*

Plusieurs mycéliums peuvent se développer dans le pollen, parmi lesquelles *Aspergillus niger* (BRUNEAU, 2012) qui toutefois, contamine rarement les abeilles (FOLEY *et al.*, 2014) ;il atteint surtout les larves vieilles de quelques jours; les spores de ce champignon sont noirâtres;les cellules atteintes sont recouvertes d'une poudre noire (BIRI, 2002 et SARWAR,2016).

Chapitre III – Matériel et méthodes

Chapitre III - Matériel et méthodes

L'objectif principal du présent travail est d'étudier l'effet des bactéries entomopathogènes (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) sur les abeilles domestiques. Cette étude est divisée en 3 parties. La première est l'étude de l'impact de quelques souches de bactéries, sur la glande hypopharyngienne d'une part et sur la glande cirière d'autre part. La deuxième étant une essaie de traitement des abeilles infectées par ces bactéries en utilisant le produit "E.M-A" contre les bactéries entomopathogènes testées dans l'intention de trouver une solution biologique contre ces bactéries. Dans la 3^{ème} partie la sensibilité d'une souche de *bifidobacteries*, isolées de ces abeilles ; aux antibiotiques a été réalisée.

3.1. - Récolte du matériel biologique

Les ouvrières faisant l'objet de la présente étude sont récoltées à partir d'une ruche située dans la station d'Ain El Ibel (Latitude: 34.3548 et Longitude: 3.2226/ 34° ; 21,17" Nord, 3° ; 13,22" Est) qui se trouve près de la région de Djelfa. Ces ouvrières sont élevées à nouveau dans une nouvelle station pour avoir une nouvelle population d'abeilles qui sera amené au laboratoire pour réaliser les différentes expérimentations.

Les abeilles domestiques sont introduites dans des cagettes à Pain (PAIN, 1966). Ces cagettes en bois de dimensions 10,5 x 7,5 x 11,5 cm, sont constituées d'un plateau en bois et d'un couvercle en verre plexiglas. L'un des deux côtés parallèles est pourvu d'un nourrisseur à candi et d'un abreuvoir. La cagette est pourvue d'orifices d'aération (Fig.34).



Fig.34-Cagette d'élevage type Pain (photographie originale)

3.2.-Etapes réalisées aux laboratoires

Le travail aux laboratoires est divisé en 3 parties : La première consiste à l'utilisation des bactéries entomopathogènes pour examiner leurs effets sur les deux types de glandes retenues. La deuxième partie est une proposition d'un biopesticide produit à base de micro-organismes 'E.M-A' ; alors que la troisième partie est un test antibactérien de la souche de *Bifidobacterium* isolée à partir de tube digestif vis-à-vis les antibiotiques testés.

3.2.1. - Les bactéries entomopathogènes utilisés

Nous avons testé l'effet des bactéries entomopathogènes (des souches références ATCC) de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), et *Bacillus cereus* (ATCC 11778) sur quelques fonctions des abeilles domestiques, *Apis mellifera* (Fig.35), à savoir la quantité des protéines produites par la glande hypopharyngienne ainsi que sur la quantité de la cire et le nombre des lamelles produites par la glande cirière. Ces souches que nous avons ramenées du laboratoire vétérinaire régional et faculté de microbiologie de l'université de Laghouat ; elles sont isolées à partir des sols (*Pseudomonas a.* et *Bacillus c.*) et le tube digestif d'une volaille (*Bacillus s.*). Ce sont des souches à majorité pathogènes et qui peuvent influencer la santé de l'homme à cause de la contamination des produits de la ruche surtout le miel. Ces bactéries sont responsables de plusieurs types d'infections telles que : La mortalité, contamination des larves...

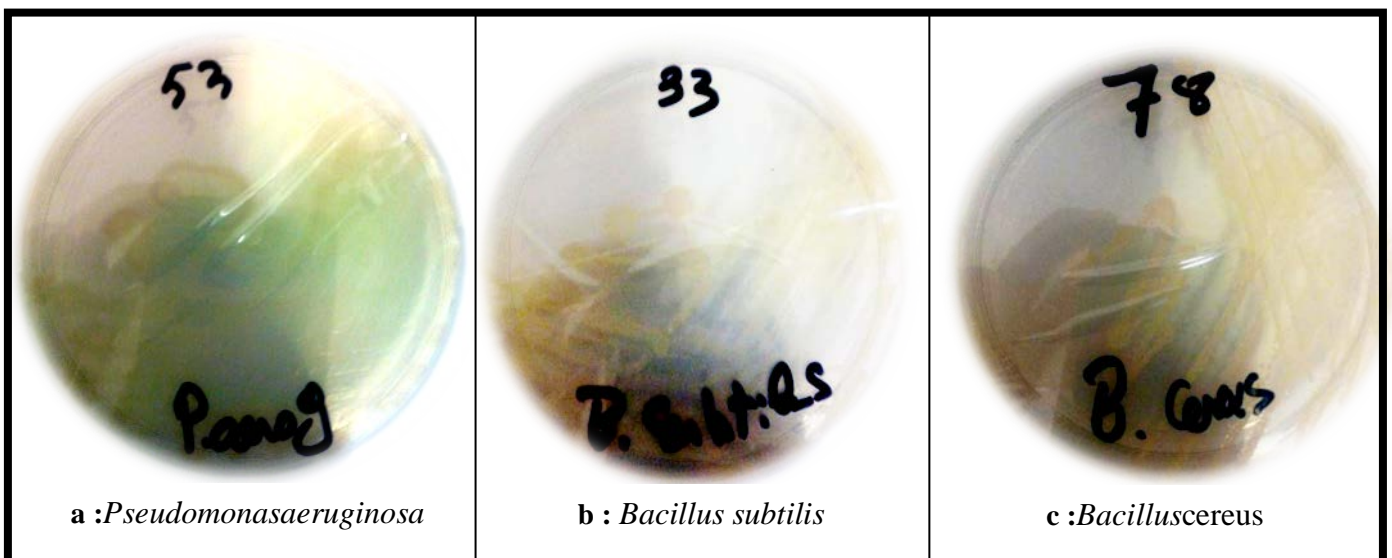


Fig.35- Les bactéries entomopathogènes utilisés (**a** : *Pseudomonas aeruginosa*, **b** : *Bacillus subtilis* et **c** : *Bacillus cereus*). (Photographie originale)

- **Préparation des suspensions bactériennes et détermination des concentrations**

Pour la préparation de la solution mère des bactéries ;on procède à un ensemencement sur gélose nutritive. Après l'incubation à 37°C pendant 24 heures, la solution mère est préparée en prélevant quelques colonies et en les inoculant dans un tube contenant 9mL de l'eau physiologique (GUIRAUD, 2003). Des dilutions successives sont ensuite préparées, en prélevant 1 mL de la suspension mère et en l'introduisant dans un tube contenant 9 mL d'eau physiologique. Pour déterminer la concentration des dilutions bactériennes utilisées dans les traitements biologiques, on a suivi la méthode de la turbidimétrie (Fig.36, Annexe 2) (GUIRAUD, 2003).

3.2.2. - Effets sur la quantité de la cire produite et le nombre des lamelles cirières

L'effet des bactéries étudiées sur la glande cirière d'une part et sur la glande hypopharygienne d'autre part. Pour réaliser cette partie on a choisi une ruche dans un champ contenant des légumes et quelques arbres fruitiers, où l'apiculteur n'a pas utilisé auparavant la transhumance et ceci afin de diminuer le risque de contamination par les parasites et les maladies d'abeilles. Dans cette ruche, on a pris un cadre de couvain d'abeille au stade nymphal prêt à l'éclosion.

L'émergence des abeilles a eu lieu après vingt-quatre heures d'incubation à 33 ± 2 °C. Les abeilles naissantes sont mises en cagette à raison de 100 ± 20 abeilles/cagettes. Les cagettes utilisées sont de type Pain. (Fig. 37 a, b, c, d).

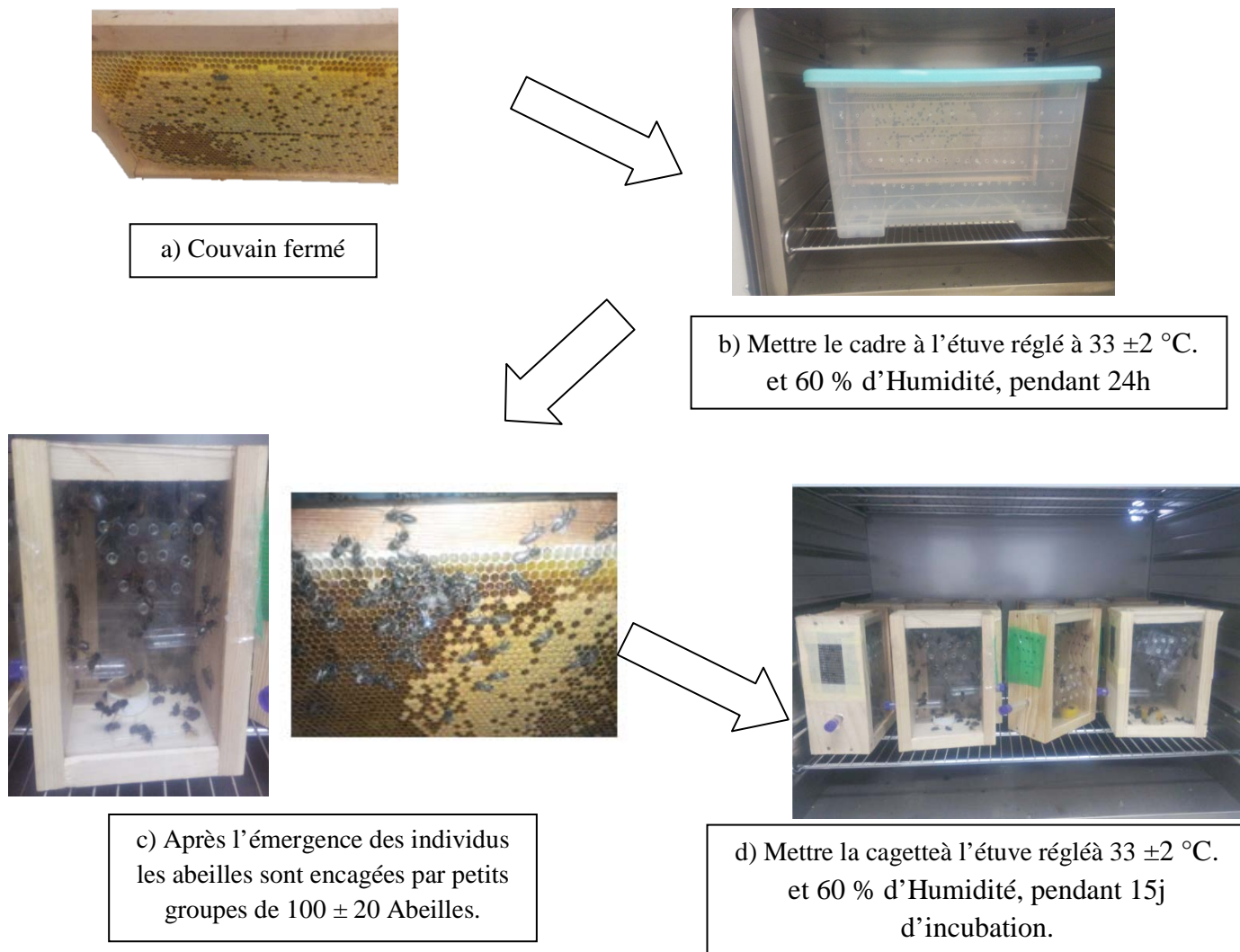


Fig.37 (a, b, c et d)-Préparation d'abeille domestique pour l'expérimentation
(Photographies originales)

Après l'émergence des individus des abeilles, elles sont encagées par petits groupes de 120 ± 20 Abeilles dont 9 boîtes (à raison de 3 boîtes de chaque concentrations différentes pour chaque bactérie) et 3boîtes pour les témoins. Durant les trois premiers jours, les abeilles sont nourries avec une solution sucrée (500g du sucre, 1Ld'eau) et avec de l'eau par le biais d'un tube flacon et avec la pâte qui contient du pollen 20% et du 40% de sucre glace avec du miel 40%. (Fig.38).Elles sont par la suite nourries avec du sirop contaminé par les souches de trois

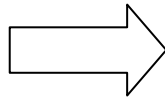
bactéries entomopathogènes choisies, pour chaque concentration, on a utilisé de 15 à 20 μL de suspensions bactériennes (*Bacillus subtilis*, $C_1 = 0,72$; $C_2 = 0,50$ et $C_3 = 0,35\text{mg/mL}$), (*Bacillus cereus*, $C_1 = 0,4$; $C_2 = 0,35$ et $C_3 = 0,22\text{mg/mL}$) et (*Pseudomonas aeruginosa*, $C_1 = 0,4$; $C_2 = 0,33$ et $C_3 = 0,22\text{mg/mL}$) pendant 15 jours consécutifs. Enfin, les cagettes sont maintenues à l'étuve ($33^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$., 60 % d'humidité relative et à l'obscurité) jusqu'au 15^{ème} jour d'âge où le pic de la production cirière a eu lieu. Au 15^{ème} jour d'âge, on tue les abeilles en mettant les cagettes dans le congélateur durant 15 minutes. De chaque cagette, on a prélevé au hasard douze groupes dont chacun contient dix abeilles. La dissection a été effectuée sous une loupe binoculaire. L'abeille ouvrière est fixée à l'aide d'une aiguille entomologique dans une boîte de pétri de 9 cm de diamètre contenant la cire solidifiée, la face abdominale en haut (Fig. 39 e, f, g, h, i et j). On prélève ensuite de chaque abeille les lamelles de cire qui feront l'objet d'un comptage sous la loupe et d'un pesé (DI PASQUALE, 2014). Maintenu entre deux épingles dans une boîte de Petri contenant de la cire, à l'aide d'une pince nous avons prélevé et avons compté le nombre d'écailles de cire sous une loupe binoculaire.



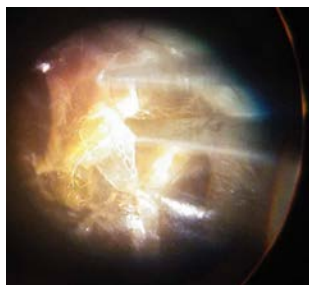
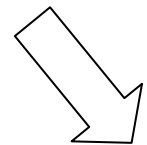
Fig.38 - Candé préparé pour abeilles domestiques
(Photographie originale)



e) Des ouvrières choisies 10 abeilles domestiques



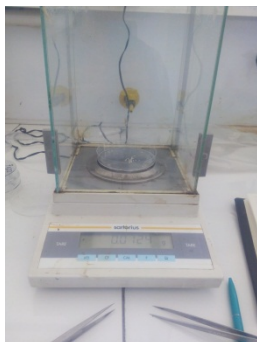
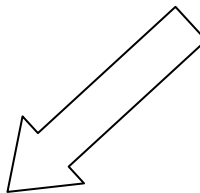
f) Observation microscopique des éléments d'une ouvrière



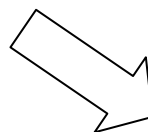
h) Prélèvement d'une lamelle de cire



g) Lamelles de la cire



j) peser lamelles de la cire



i) Lamelle de cire

Fig.39 (e, f, g, h, i et j) - Prélèvement d'une lamelle de cire d'un dix abeilles domestiques
(Photographies originales)

3.2.3. - Effets des bactéries entomopathogènes sur la glande hypopharyngienne (G.H.P)

L'impact des *Bacillus subtilis*, *cereus* et de *Pseudomonas aeruginosa*, sur la quantité des protéines produites par la glande hypopharyngienne.

La glande hypopharyngienne est le principal organe responsable de la sécrétion de la gelée royale (PINTO *et al.*, 2012; CRUZ-LANDIM, 2009; SEEHUUS *et al.*, 2007; GATEHOUSE *et al.*, 2004). Ainsi que d'autres substances telles que α -glucosidase (DESEYN et BILLEN, 2005). La taille de la G.H.P. est en relation avec l'âge et la quantité des protéines secrétées (HUANG et OTIS, 1989; CRAILSHEIM et STOLBERG, 1989 et BABENDREIER *et al.*, 2005). Dans cette partie, nous avons utilisé les mêmes abeilles testées dans le premier essai des glandes cirières. Ces individus ont fait l'objet d'une dissection afin de séparer les têtes, pour être pesées, et d'extraire les glandes hypopharyngiennes. L'extraction se fait dans une solution saline soit 0,9% de NaCl (CRAILSHEIM et STOLBERG, 1989; DI PASQUALE *et al.*, 2013) (Fig.40.a, b, c, d, e, et f).

3.2.3.1. - Préparation de l'échantillon de protéines

Dix abeilles ouvrières ont été collectées pour représenter chaque espèce et tuées sur de la glace pendant 15 minutes. L'extraction de protéines provenant de G.H.P. a été modifiée à partir du protocole de LI *et al.* (2008). Les glandes de G.H.P. ont été transférées de 50 à 100 μ L. de tampon phosphate 0,1 M (PB) pH 7,4 (Fig.41, Annexe 3) dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 mL, homogénéisés pendant 10 minutes sur la glace, soignés pendant 2 min, puis centrifugés à 1500 tr / min pendant 10 min à 4°C. afin de fragmenter les glandes hypopharyngiennes et libérer les protéines (Fig.42).

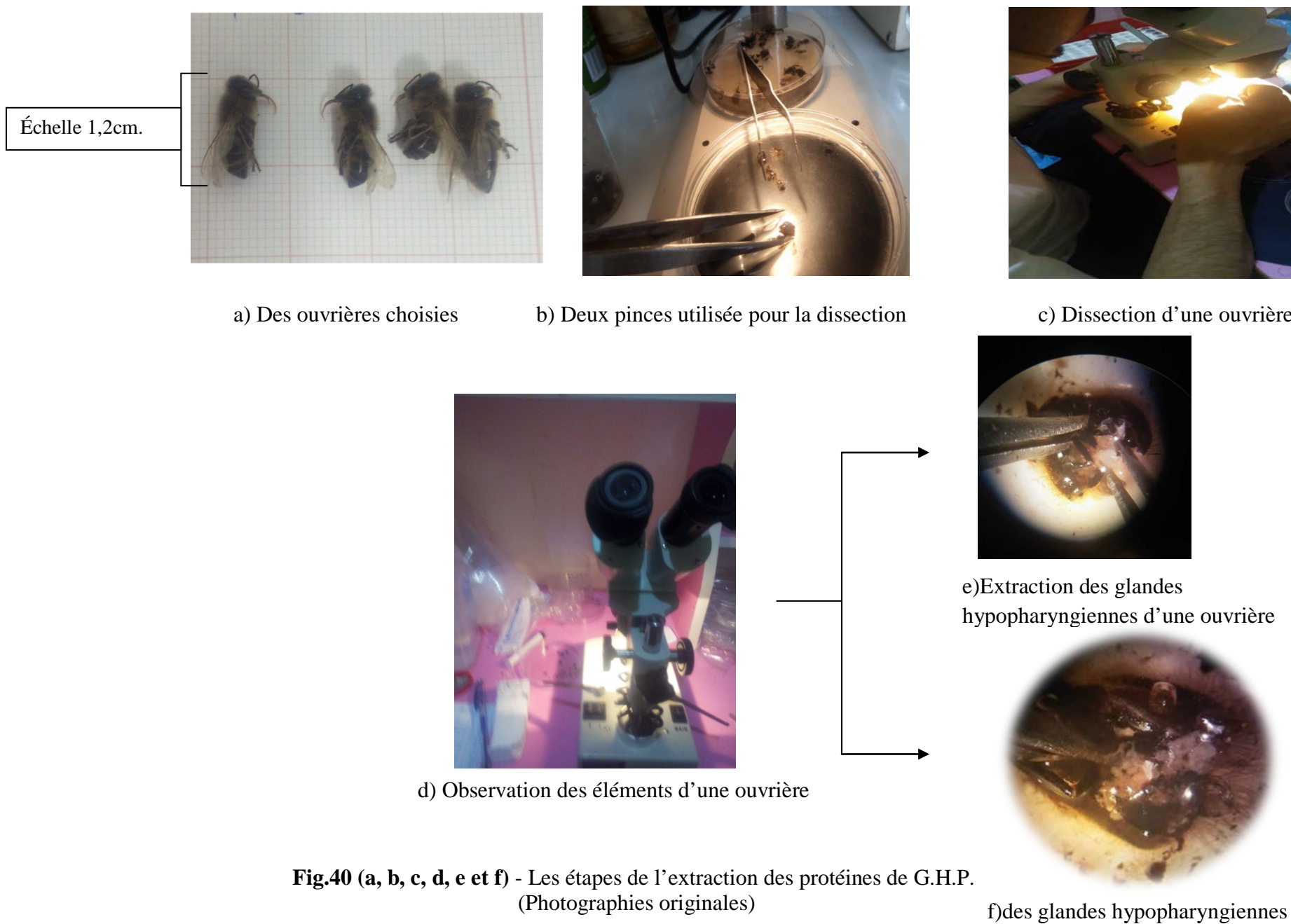


Fig.40 (a, b, c, d, e et f) - Les étapes de l'extraction des protéines de G.H.P. (Photographies originales)

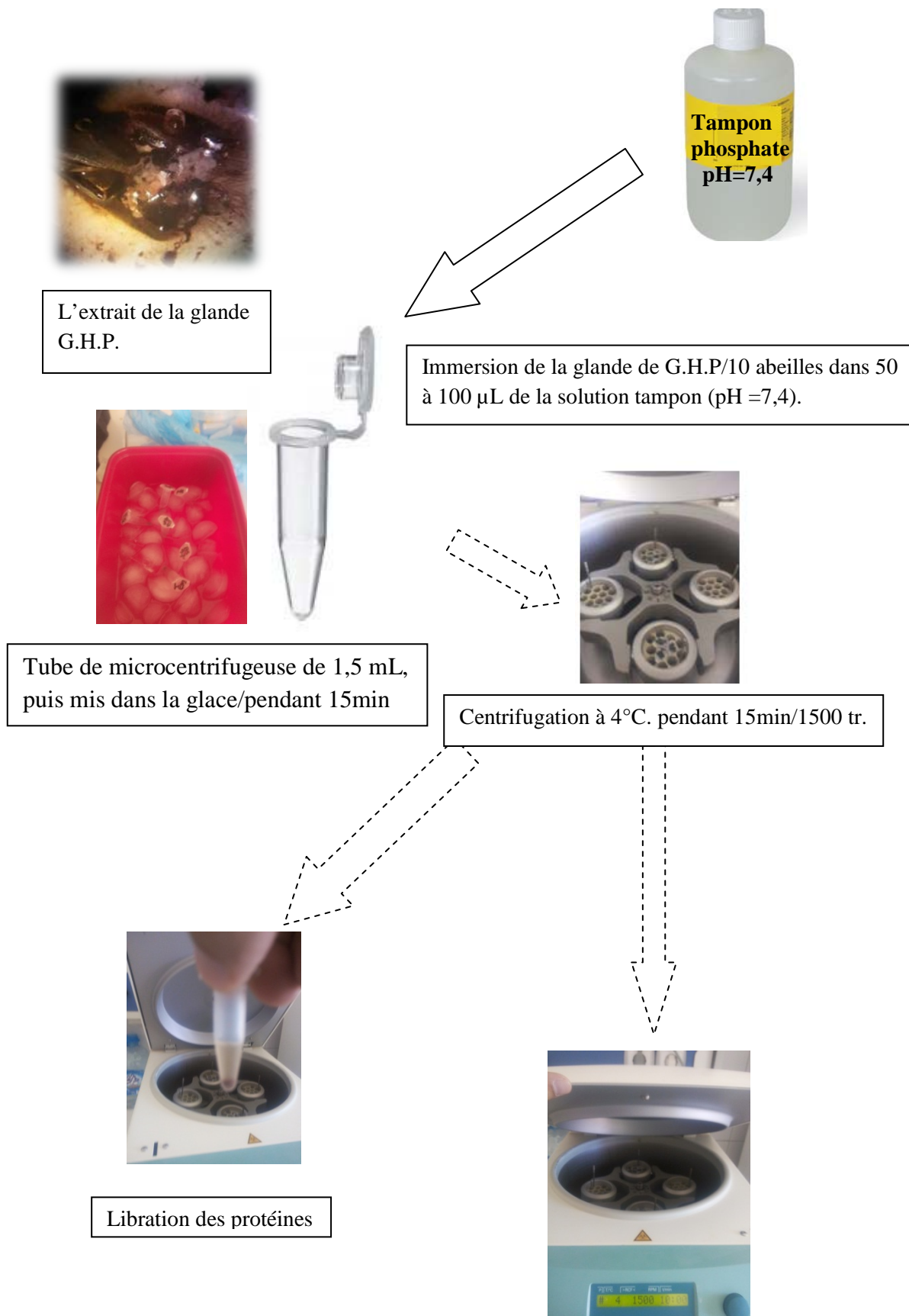


Fig. 42- Préparation de l'échantillon de protéines (Photographies originales)

3.2.3.2. - Dosage des protéines

La quantité de protéines totale des glandes hypopharyngiennes est mesurée selon la méthode de Bradford (1976) qui est un dosage colorimétrique se basant sur un changement de coloration du bleu de Coomassie (laboratoire Bio- Rad) en présence de protéines (SAGILI *et al.*, 2005; SAGILI et PANKIW, 2007). Une courbe étalon est réalisée à partir des densités optiques (D.O.), de solutions protéiques, de différentes concentrations connues, issues d'une solution mère d'albumine bovine à 1%.

Les densités optiques sont lues à la longueur d'onde de 595 nm. Pour la préparation de la solution mère de BSA (sérum albumine bovine) à 1% à partir de laquelle nous avons des dilutions de concentrations croissantes. Nous ajoutons la même quantité du réactif de Bradford préparé préalablement, puis mis à l'abri de la lumière. Les tubes sont incubés à une température ambiante pendant 10 minutes à l'obscurité. La lecture des D.O. nous a permis d'établir la courbe étalon (Fig.43, Annexe 4) (SUWANNAPONG *et al.*, 2010).

Dans un tube à essai stérilisé, nous ajouterons 5 mL du réactif de Bradford (Annexe 4) à 100 µL de la solution contenant les glandes hypopharyngiennes, puis agiter pendant quelques minutes à l'aide d'un Vortex. Les tubes sont par la suite incubés à la température ambiante à l'obscurité pendant 10 minutes. La lecture des D.O. se fait à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible 1800 (Shimadzu) à la longueur d'onde de 595 nm (Fig.44). Pour calculer les quantités de protéines contenues dans les glandes hypopharyngiennes nous appliquons l'équation de régression linéaire déduite de la courbe étalon établie pour le B.S.A. (DEGRANDI-HOFFMAN *et al.*, 2010) (Tab.4, Annexe 4).

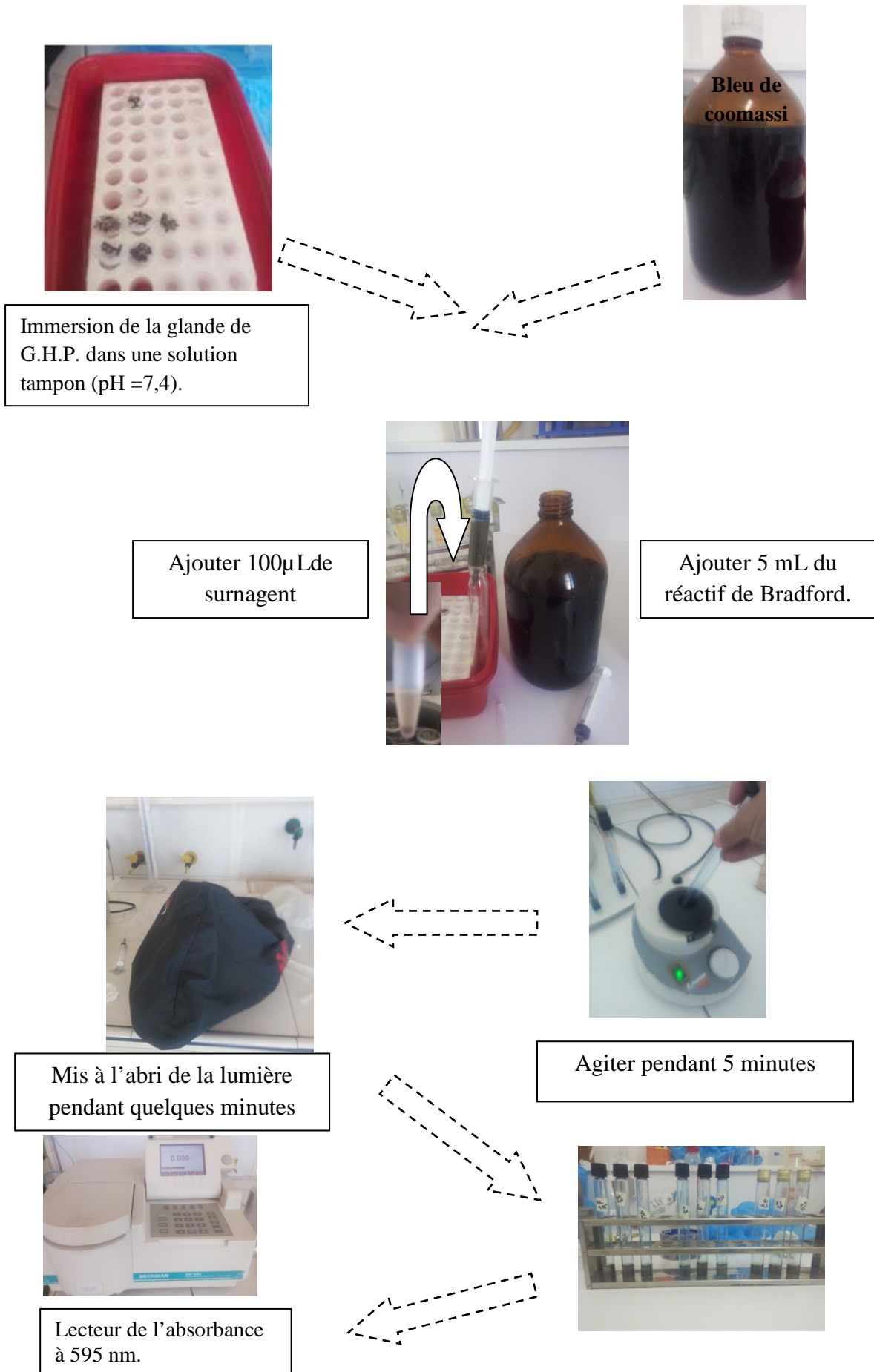


Fig.44- Etapes de dosage des protéines (Photographies originales)

3.2.4. - Essai de l'effet du biopesticide produit à base des micro-organismes efficaces (E.M-Activé)

Notre objectif dans cette partie est de tester l'impact du produit bio qui contient la technologie EM-A (EM Activé), ce produit qu'a connu récemment une propagation dans le domaine d'agriculture, dans le traitement des eaux, l'environnement, dans l'industrie alimentaire, la production d'énergie, la biodégradation des déchets et des substances nocives et bien plus encore, au niveau mondial surtout au Japon. Cependant, il n'est pas encore introduit en Algérie.

Ajoutons que ce produit a été importé par (EM-Algeria) l'unique représentant d'EMRO-Japan en Algérie ; mais l'utilisation de ce produit sur les abeilles, dans le cadre d'une lutte biologique contre les bactéries entomopathogènes est faite originalement au sein de la présente étude.

3.2.4.1. - Description du produit

EM signifie micro-organismes efficaces, c'est un liquide microbien brun, de saveur aigre-doux, développé par le Professeur Teruo Higa, Professeur d'horticulture à l'Université de Ryukyus à Okinawa (Japon) pour l'agriculture exempte de chimie, qui a développé en 1982 la combinaison et la technologie pour la production des micro-organismes et la combinaison idéale de micro-organismes régénératifs et constructifs

Notre étude a ciblé EM-A (EM Activé), à base d'EM-1, ce dernier contient quasiment 80 micro-organismes naturellement présents dans la nature (Fig.45 a et b, Annexe 05), dans la plus importants : des levures, des bactéries lactiques et des bactéries photosynthétiques...



Fig. 45 (a)-L'étiquetage du produit EM-1 utilisé.

3.2.4.2. - Préparation de produits testé EM-Activé

Nous avons pratiqué le traitement par EM-A uniquement sur les cagettes qui possèdent un impact clair sur la quantité des protéines de la glande hypopharyngienne d'une part et d'autre part sur la quantité de la cire produites par les abeilles domestiques, cette application vise notamment les concentrations qui représentent la plus faible quantité de la cire ainsi que la protéine des trois bactéries entomopathogènes .

La technique consiste à la préparation d'un biopesticide à base des micro-organismes sous forme d'une solution. Nous avons utilisé deux tubes de capacité 5mL dans le traitement que dans chacun nous avons ajouté 20 μ L (concentrations bactériennes qui ont l'impact le plus clair sur la quantité de protéine de la glande hypopharyngienne et la quantité de la cire produite par l'abeille) et compléter le reste du volume du tube avec le produit EM-A (EM- Activé) (Fig.46).Le protocole de la préparation se déroule ainsi :

- ✓ Dissoudre entièrement 3% de mélasse de sucre de canne dans de l'eau chaude ;
- ✓ verser le tout dans un récipient en plastique avec couvercle (par ex. une bouteille en PET, un bidon, un tonneau, un réservoir) ;
- ✓ Remplir d'eau le récipient ; la température de l'eau ne doit pas dépasser 35°C.
- ✓ Ajouter enfin 3% d'EM1 ;
- ✓ Conserver le récipient plein et fermé 7 à 10 jours dans un endroit chaud à une température idéale de 30 à 35°C (chauffer si besoin est) à l'abri des rayons du soleil ;
- ✓ purger l'air à intervalles réguliers ;
- ✓ L'EM-A une fois mature, présente une valeur pH de 3,5 et dégage une odeur acide, l'EM-A qui ne sera prêt à l'utilisation qu'après son dilution avec l'eau de source (1L EM-A/20L d'eau) (Fig.47,Annexe 5).

Remarque : dans les trois premiers jours, les abeilles sont nourries juste avec le produit EM-A, ensuite elles sont traitées avec la dose (1L de EM-A /20L d'eau), déjà citée précédemment, qui doit être renouvelée chaque trois jours dans les quinze jours du traitement.

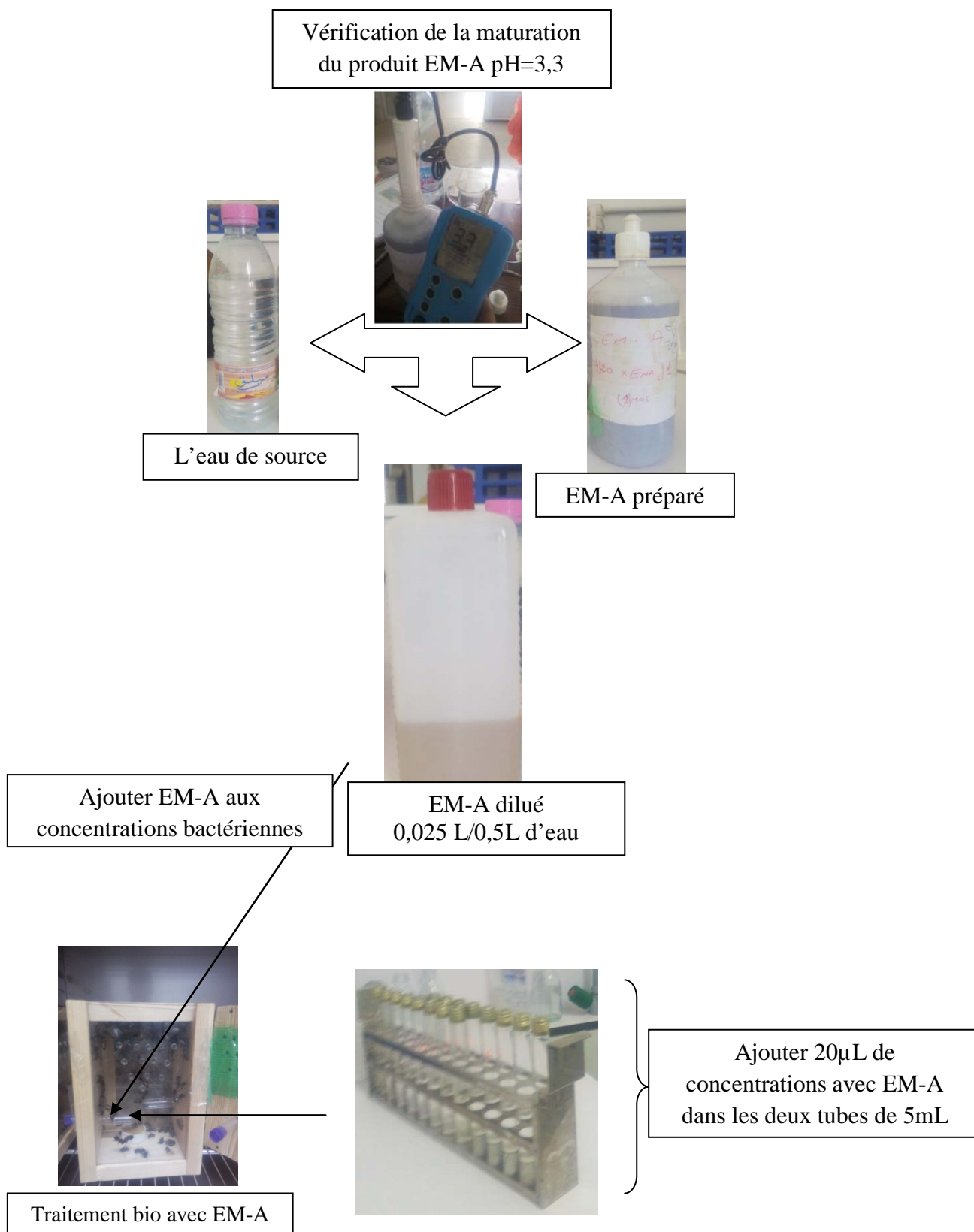


Fig. 46- Les étapes de la préparation EM-A et du traitement d'abeille domestique (Photographie originale)

3.3. - Isolement de *Bifidobacterium*

Le but visé est de chercher dans quelle partie du corps de l'abeille se trouvent les bifidobactéries qui sont actuellement très utilisées dans la fabrication de quelques produits laitiers telle que le yaourt ; l'idée de l'isolement des bifidobactéries à partir des abeilles a été proposée pour la première fois par (GUERZOU *et al.*, 2015).

3.3.1. - Principe

Les bifidobactéries proviennent du tube digestif de l'abeille. L'échantillonnage est effectué au niveau de l'hôpital de Messâad–Djelfa et au niveau laboratoire de répressions des fraudes « CAQUE » de la wilaya de DJELFA. Pour cette étude on a choisi deux niveaux sur l'abeille (tube digestif et l'œsophage). Une fois la dissection de l'abeille est faite, le tube digestif et l'œsophage sont prélevés stérilement et acheminés au laboratoire dans une glacière

3.3.2. - Mode opératoire

3.3.2.1. - Pré - enrichissement

- ◇ Mélanger 1 g prélevé de tube digestif avec 9 mL de bouillon MRS sous l'hôte (dans un environnement stérile). Après la décessions (Fig. 48.a, b, c, d, e et f), et mis dans un tube à essai hermétiquement fermé. Ensuite mettre quelques gouttes d'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose dans chaque tube et incubé à 37°C. et comme suite :
 - Pendant 18h (pour les 3 tubes de série 1), jeune culture (Pré-culture),
 - Pendant 24h (pour les 3 tubes de série 2),
 - Pendant 48h (pour les 3 tubes de série 3).
- ◇ Après l'incubation de chaque série on prépare 9 dilutions (1 mL de solution à partir de la solution pré-enrichie) et ainsi de suite. Chaque tube contient préalablement 9 mL d'eau physiologique. Enfin faire l'ensemencement aseptiquement dans 3 boîtes de Pétri stériles.
- ◇ Une fois la gélose MRS,Cys fondue et refroidie elle sera versée sur les dilutions puis un mouvement de « 8 » pour homogénéiser le milieu et la dilution (Fig. 49).

3.3.2.2. - Incubation

Les boîtes de Pétri sont placés à l'étuve à 37°C pendant 48h.

3.3.2.3. - Lecture

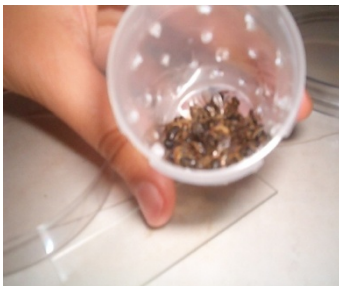
Les colonies des bifidobactéries se présentent sous forme lenticulaire blanche. La lecture se fait après 48h.

3.3.2.4. - Dénombrement

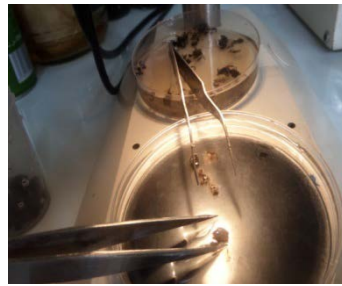
Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs de dilutions, de plus :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies et multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution.

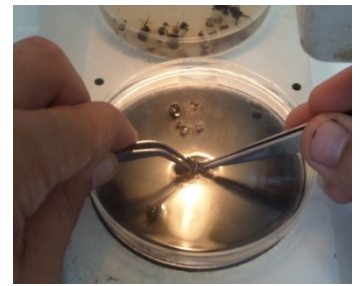
- NB :**
- Le même protocole est établi pour l'œsophage d'abeille domestique.
 - La composition chimique de gélose (MRS) Cys et le Bouillon est décrite au niveau de l'Annexe 6



a) Des ouvrières choisies



b) Deux pinces utilisées pour la dissection



c) Dissection d'une ouvrière



d) Observation des éléments d'une ouvrière

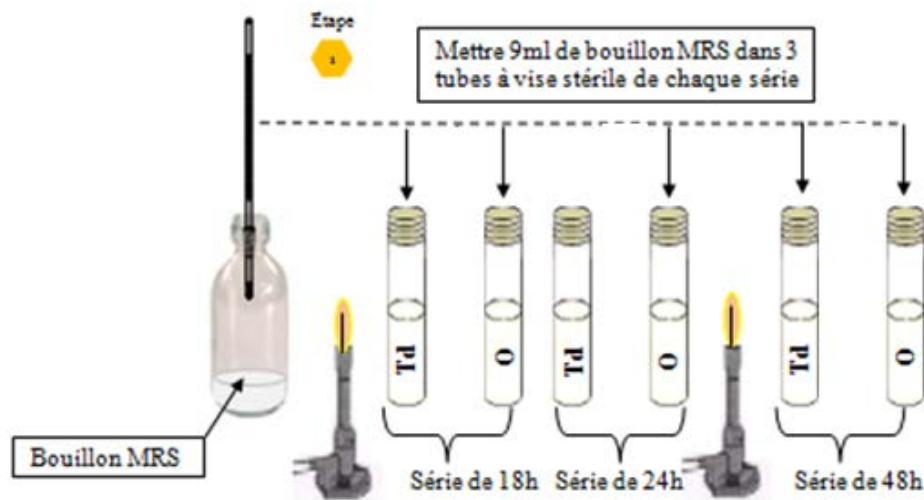


e) Œsophage d'une ouvrière
(Gross : 10× 63)

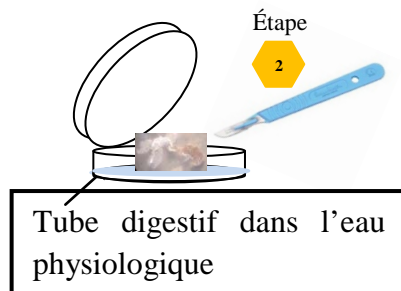


f) Tube digestif d'une ouvrière
(Gross : 10 × 63)

Fig. 48 (a, b, c, d, e et f) - Les étapes de la dissection d'une ouvrière
(GUERZOU *et al.*, 2015)



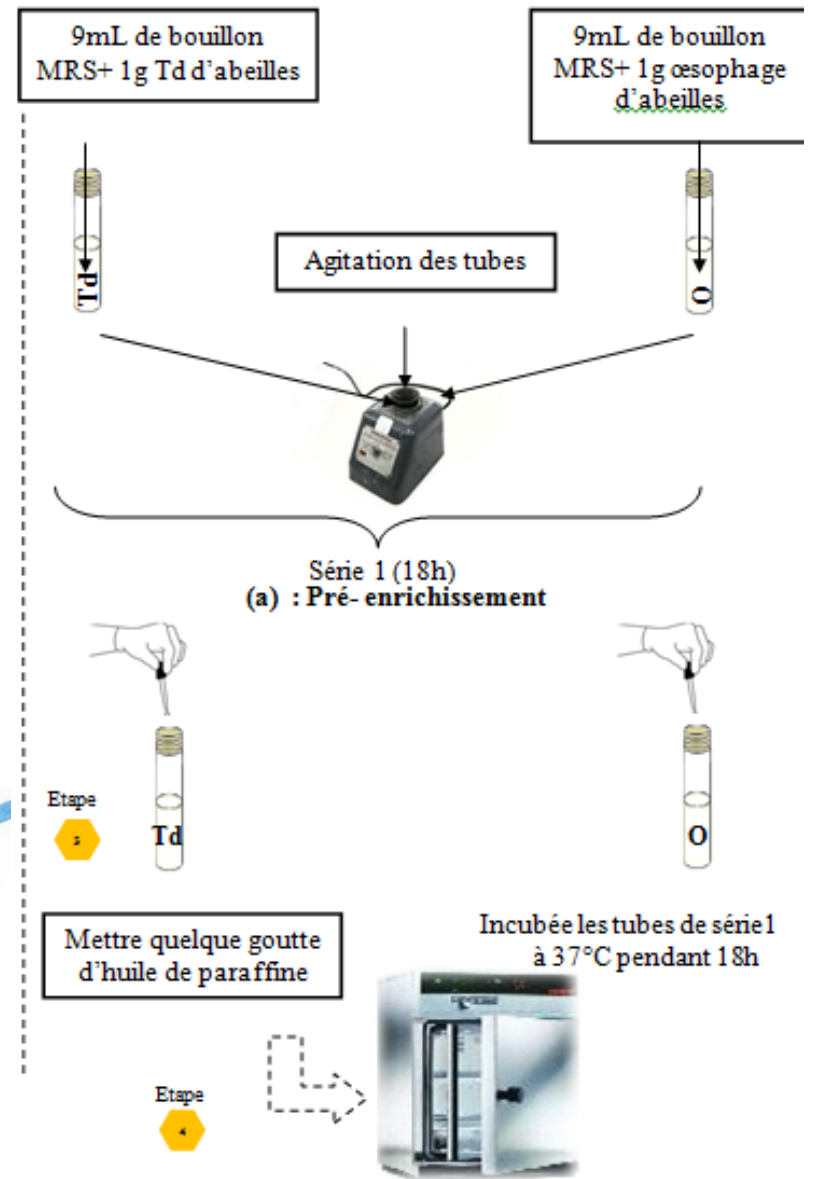
- Préparer 1g de tube digestif, et œsophage (après la dissection des abeilles)



Découpé finement à l'aide d'une lame



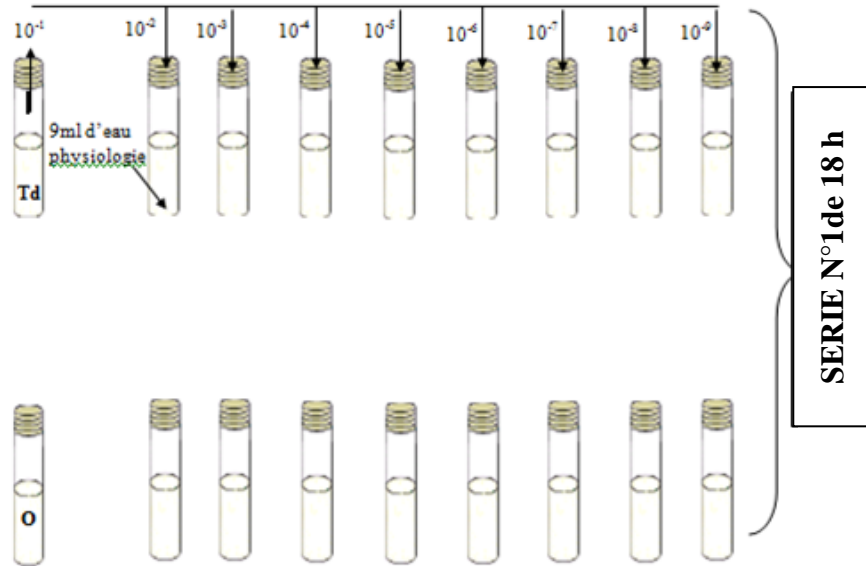
Découpé finement à l'aide d'une lame



Après l'incubation, on enlève la série 1 (18h) pour préparer les dilutions (de 10^{-1} à 10^{-9}).

Étape

1



(b) : Préparation des 9 dilutions

Ensemencement en profondeur de 1 mL des différentes dilutions

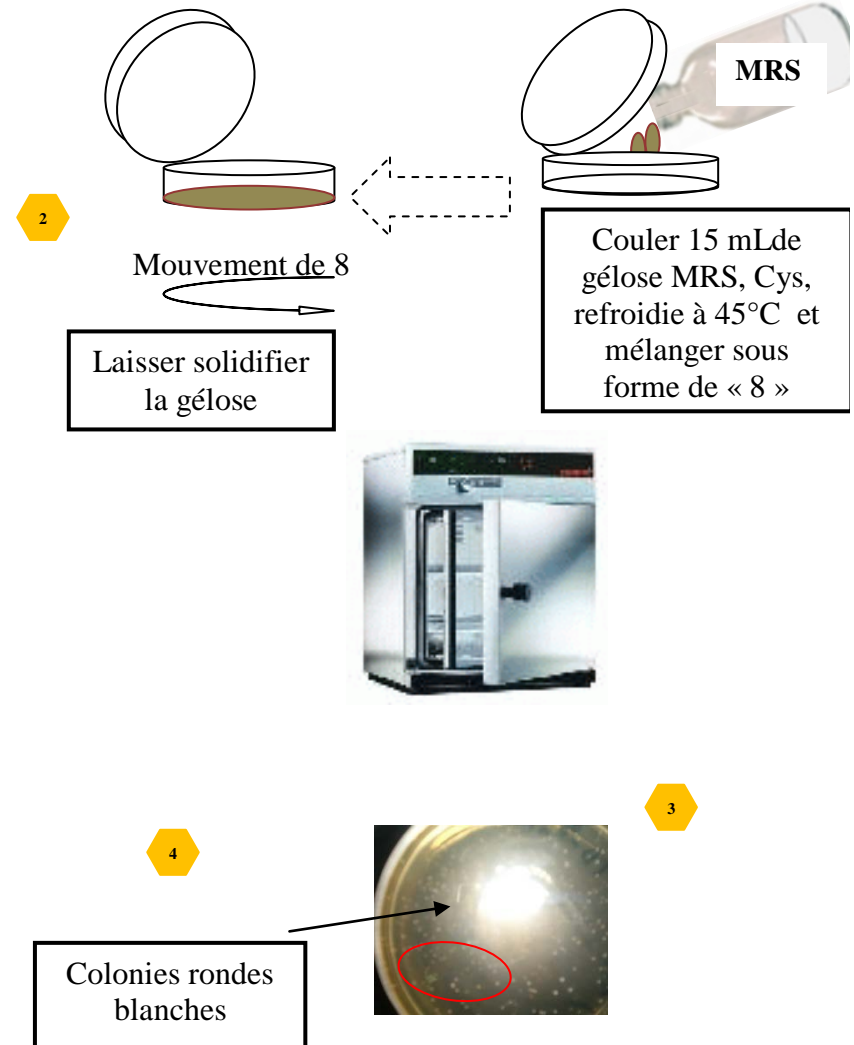
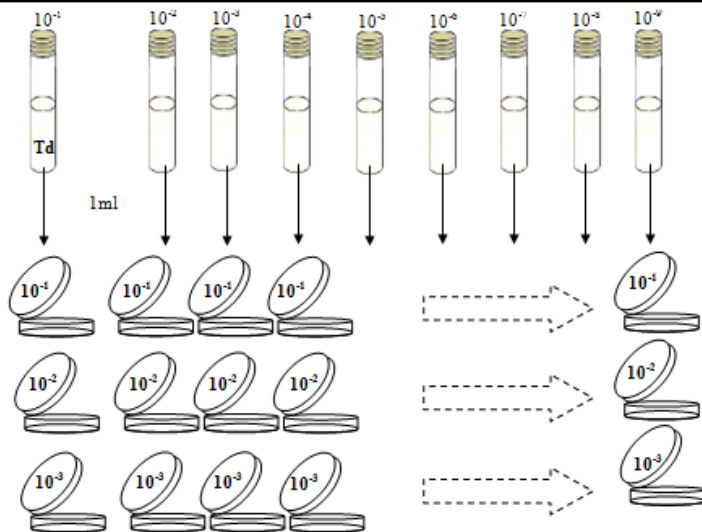


Fig.49 -Protocole d'isolement des bifidobactéries à partir du tube digestif/œsophage de l'abeille (GUERZOU *et al.*, 2015)

- Même procédé pour les autres tubes (œsophage) : Inoculer 3 séries des boites avec 1 mL des différentes dilutions,
- Pour les autres séries (24 et 48h) on suit les mêmes étapes :
 - ◇ Faire les dilutions (de 10^{-1} à 10^{-9}),
 - ◇ Inoculer 3 séries des boites avec 1 mL des différentes dilutions.

3.4. - Identification biochimique de la souche bifide

Les souches de bifidobactéries sont identifiées selon les principes de la technique de LARPENT (1997). Des observations macroscopiques et microscopiques, des tests de la catalase, des colorations de Gram, et des tests biochimiques de la galerie API20A sont réalisés

3.4.1. - Test de la catalase

Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles (effervescence) (Fig.50).

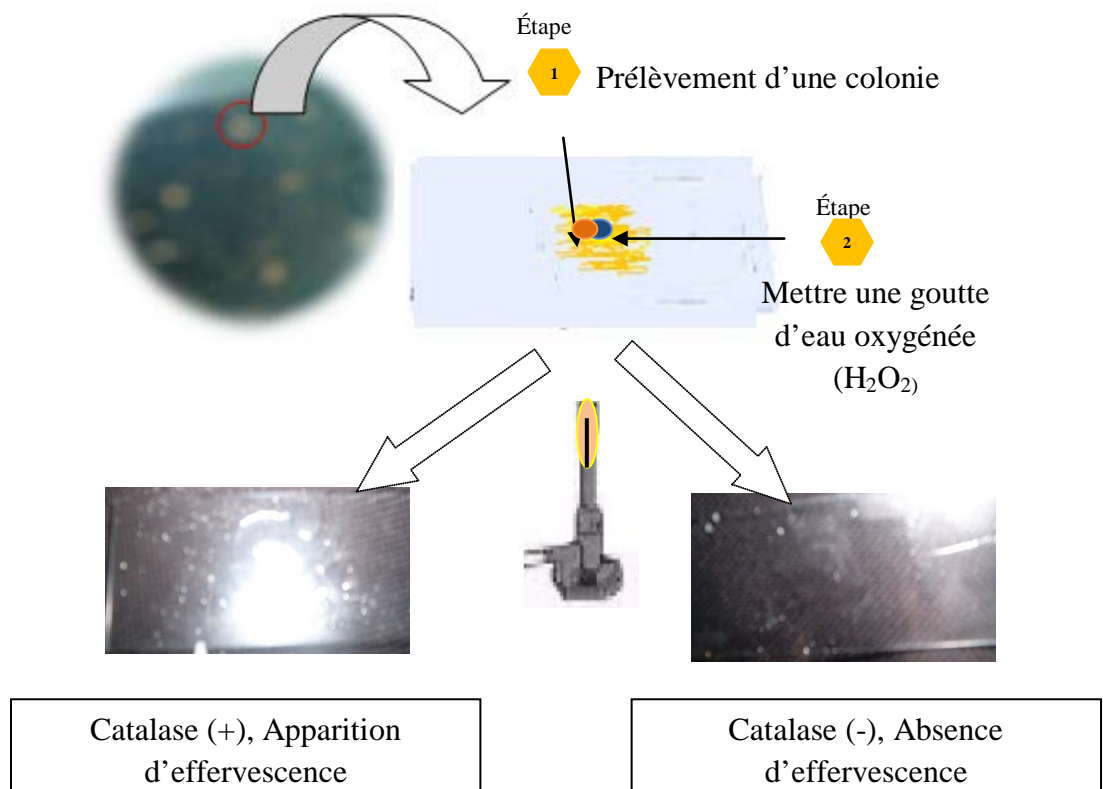


Fig.50 -Test de catalase

3.4.2. - Coloration de Gram

3.4.2.1. - Principe

La coloration de Gram, est une coloration différentielle. Elle permet de classer les bactéries en deux groupes sur la base de la perméabilité de leur paroi à l'Alcool. Cette perméabilité dépend de la composition de la paroi bactérienne (épaisseur de la paroi liée à sa richesse en peptidoglycanes). On distingue deux types de Grams (positif et négatif)

3.4.2.2.- Protocole

- Préparer un frottis d'une culture bactérienne ;
- Recouvrir le frottis avec de cristal violet, laisser agir une minute, rincer à l'eau distillée ;
- Verser du Lugol et laisser agir pendant une minute, rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95° entre 15 et 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec la fuchsine, pendant 10 seconde si elle est concentrée ou 1 minute si elle diluée. Rincer à l'eau distillée ;
- Sécher au dessus de la flamme d'un bec bunsen ;
- Observer au microscope optique puis recouvrir la lame d'huile à immersion grossissement (G×100) ;
- Les bactéries (Gram-positif) apparaissent en violet, les bactéries (Gram-négatif) en rose ou rouge.

3.4.2.3. - Test biochimique de la galerie Api 20A

La galerie API 20A compte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux (Fig.51). Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

3.4.2.3.1. - Technique

◇ Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide (Fig. 52) ;
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation ;

◇ **Inoculation de la galerie**

- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne (Fig.52 et 53) ;
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine,(Fig. 52) ;
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

3.4.2.3.2. - Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant avec un logiciel d'identification api WEB. (Version 1.2.1)

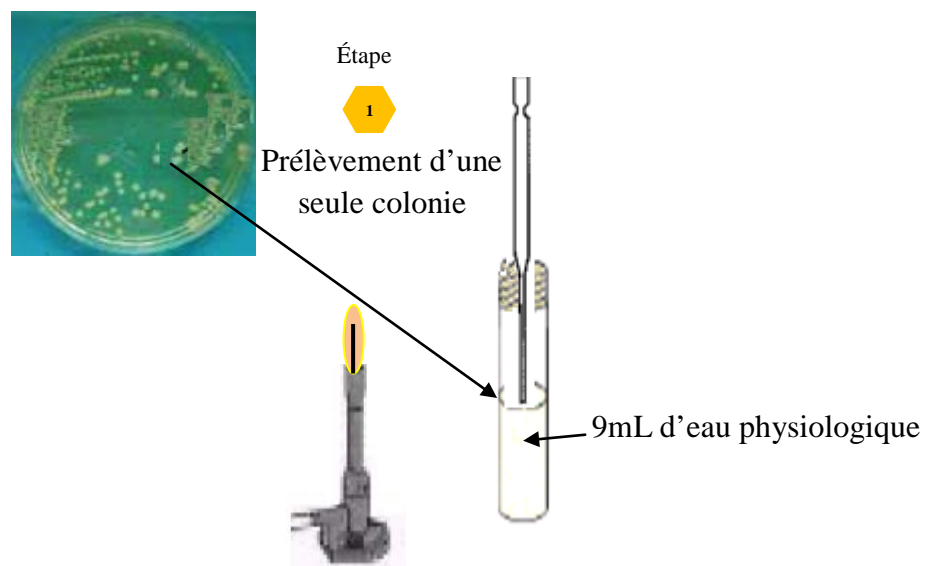


Fig. 51 - Préparation de l'inoculum



Fig.52- Préparation des alvéoles avec l'eau physiologique



Fig.53 - Préparation les cupules des tests avec la suspension bactérienne/huile de paraffine (GUERZOU *et al.*, 2015)

3.5. - Etude de la sensibilité des *Bifidobacterium* aux antibiotiques

Le but de ce test c'est l'étude de la sensibilité des *Bifidobacterium* aux antibiotique notamment l'ampicilline (AMP;10µg), la pénicilline G (P ;6µg), l' érythromycine (15 ;µg) , la vancomycine (VA ;30µg), la chloromphénicole (C ;30µg), la tétracycline (TE ;30µg), la kanamycine (Kan ;30µg), la cefoxitine (FOX ;30µg), la cefalexine (CN ;30µg), la ciprofloxacine (CIP ;5 µg), l' oxacilline (OX1 ;1µg), la streptomycine (S ;10 µg), l'-amoxicilline + Clavulanic (AMC ;20+10 µg).

Nous avons utilisé la méthode de diffusion sur gélose "méthode des disques", la méthode consisté à :

3.5.1. - Préparation de l'inoculum standard

La préparation de l'inoculum bactérien, en suspendant des colonies de *bifidobaterium* dans 9 mL. d'eau physiologique. On ajuste par la turbidité "équivalent à 1 à l'échelle de McFarland (Annexe 06), suivi d'une dilution à 1 :10 ($\approx 10^7$ bactérie/mL)(Fig.54).

3.5.2. - La méthode de diffusion sur gélose

L'inoculum est ensemencé en surface de milieu M.H gélose (1mL d'inoculum). En dépose à la surface du milieu des disques d'antibiotiques après séchage à température ambiante (Fig.55). Enfin, les boîtes sont incubées à des conditions anaérobies à 37 °C.pendant 24 et 48h. On a mesuré les diamètres des zones d'inhibition, même le diamètre du disque en millimètre.

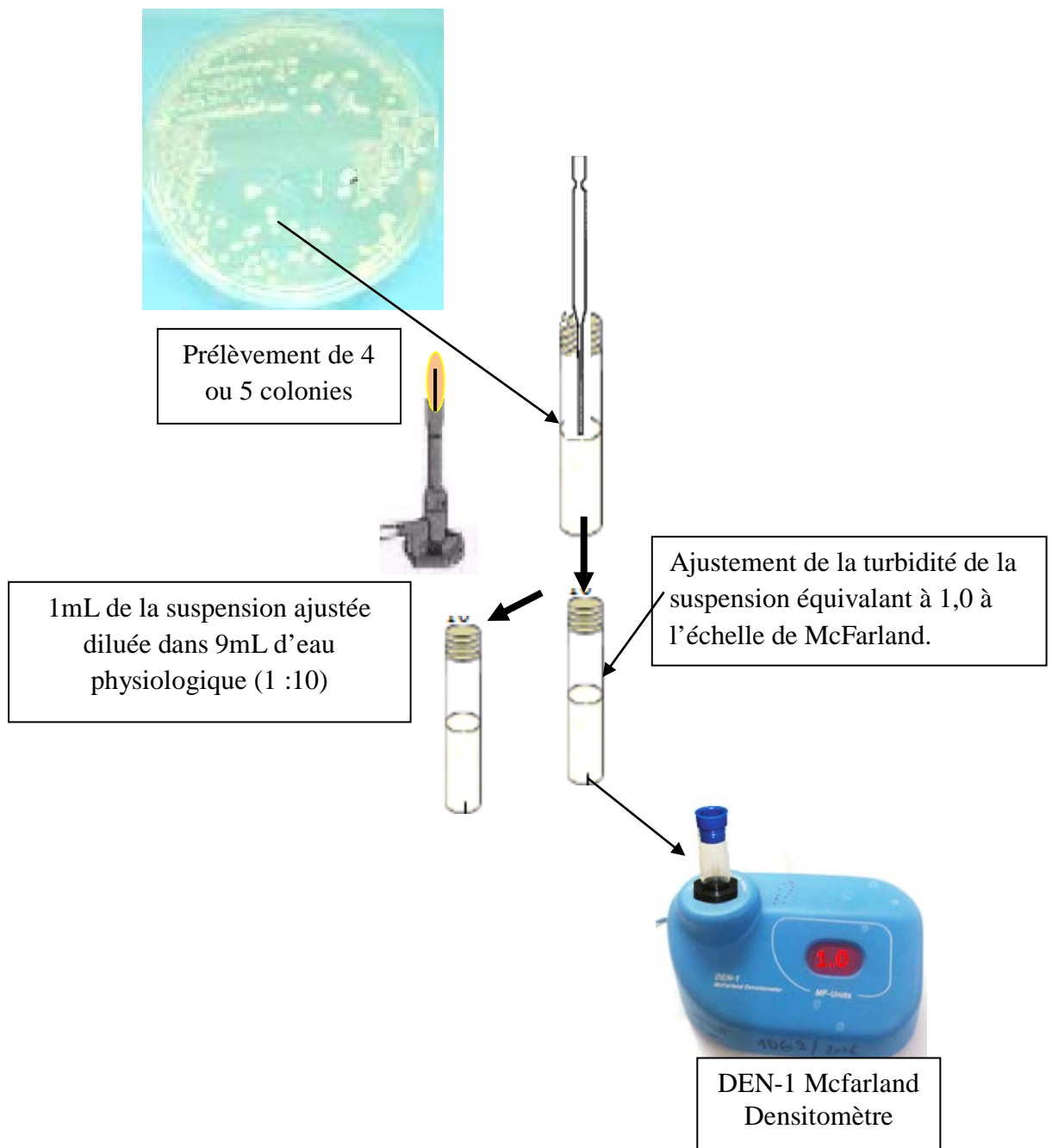


Fig. 54 - Préparation de l'inoculum 1,0 de McFarland (Photographies originales)

NB : La composition chimique de gélose M.H. est décrite en Annexe 6.

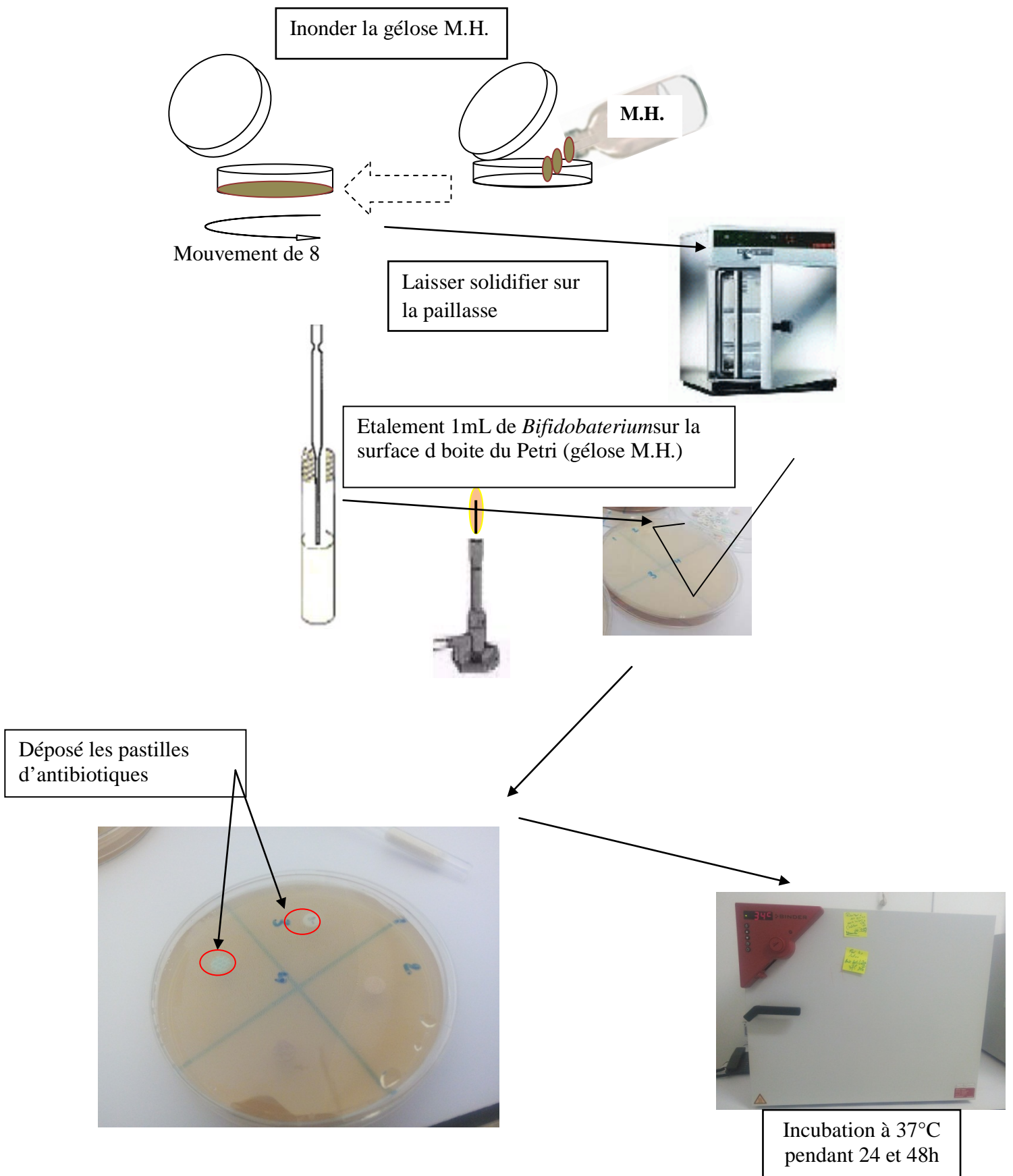


Fig. 55 -Test de la sensibilité de la souche bifide aux antibiotiques (Photographies originales)

3.6. - Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus de la quantité des protéines, le poids et le nombre de lames sont exprimés par application du l'ANOVA et le test à distance multiple de Ducan (D.M.R.T.), en utilisant le logiciel statistica (Version 6,0). Les différences sont considérées significatives pour $p < 0,01$ et hautement significatives pour $p < 0,001$.

CHAPITRE IV - Résultats

CHAPITRE IV - Résultats de l'effet de la bactérie entomopathogène, l'action de biopesticide, test de dénombrement des bifidobactéries et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Les résultats détaillés dans cette partie sont divisés en 3 volets. Le premier concerne les analyses de l'effet des bactéries entomopathogènes testés sur les glandes : cirière et hypophryngienne d'abeilles domestiques. Le deuxième est réservé aux résultats d'utilisation d'un produit biologique E.M-A (EM-Activé). Alors que le troisième est consacré aux résultats de dénombrement des bifidobactéries et de leur test de sensibilité de la souche isolée aux antibiotiques.

4.1. - Effets des bactéries entomopathogènes sur les deux glandes cirières et hypophryngienne

Nous avons testé l'effet des bactéries entomopathogènes sur l'abeille domestique

4.1.1. - Effets des bactéries entomopathogènes sur la glande cirière

Les paramètres testés dans cette partie sont le nombre des lamelles et la quantité de la cire produite.

4.1.1.1. - Effets des *Bacillus subtilis* ATCC 6633

4.1.1.1.1. - Effets des *bacillus subtilis* sur le poids de la cire

Les valeurs de la quantité de la cire produite par l'abeille domestique du groupe témoins varient entre 0,013 et 0,018 g. une moyenne de $0,015 \pm 0,001$ g. Alors que le groupe traité par la bactérie *B.subtilis* a produit des valeurs varient entre 0,0079 et 0,0096 g de cire avec une moyenne de $0,0087 \pm 0,005$; pour la concentration C1 (0,72 mg/ml) de la bactérie *B.subtilis*. Les quantités de la cire produites pour la concentration C2 (0,50 mg/ml) de *B.subtilis* varient de 0,0084 à 0,0113g avec une moyenne de $0,0096 \pm 0,0007$ g. Enfin, cette quantité varie entre 0,010 et 0,014 g avec une moyenne de $0,012 \pm 0,001$ g pour les abeilles traitées par la concentration C3 (0,35 mg/ml) de la bactérie *B.subtilis* (Tab.5, Annexe 7 ; Fig.56).

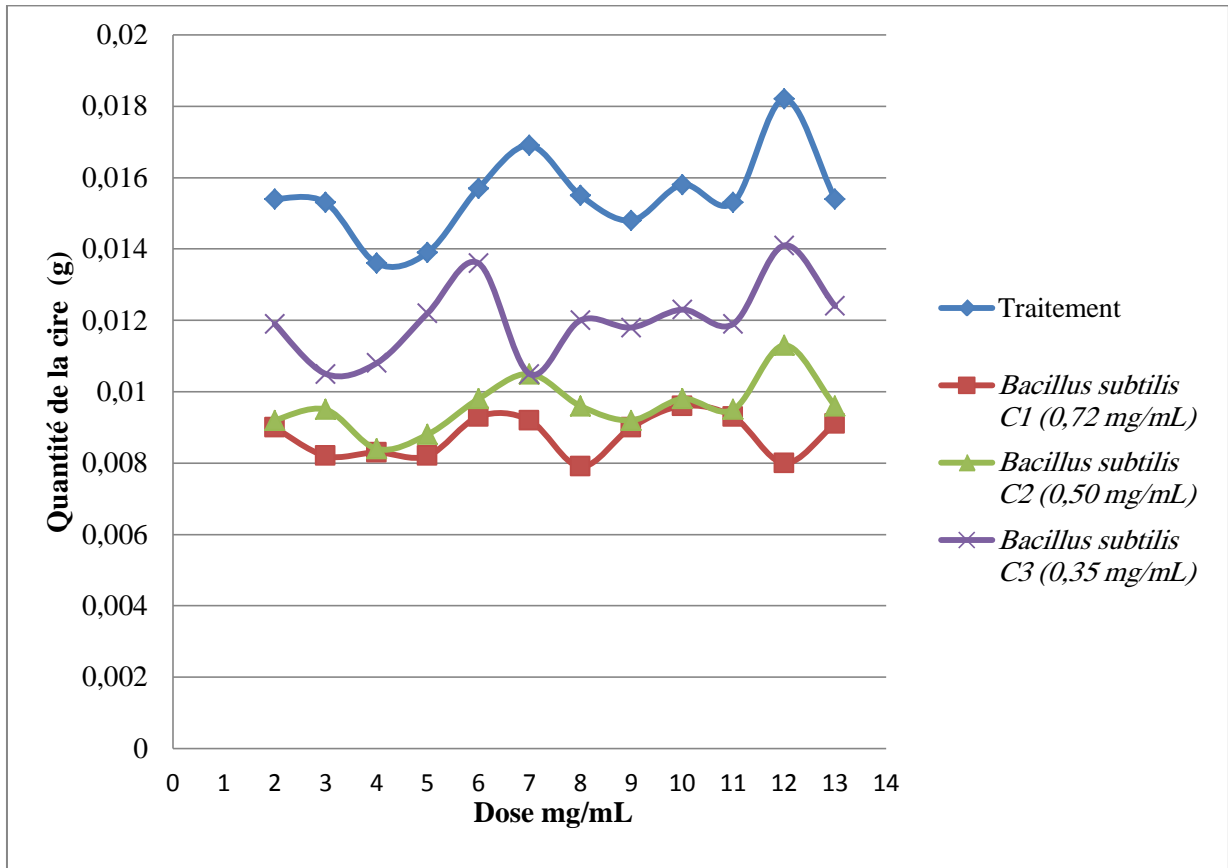


Fig. 56 - Valeurs de la quantité de cire produite par des abeilles avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de *Bacillus subtilis*.

La comparaison entre la quantité de cire produite par le groupe d'abeilles témoins et les groupes d'abeilles traitées ont révélé des différences très hautement significatives (ANOVA $F_{3,44}=121,47$; et $P < 0,0001$) (Tab.6).

Tableau n° 6 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite d'abeille traitée par *B. subtilis*

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|--------|
| ord. origine | 0,006304 | 1 | 0,006304 | 7028,675 | 0,0001 |
| Traitement | 0,000327 | 3 | 0,000109 | 121,467 | 0,00 |
| Erreur | 0,000039 | 44 | 0,000001 | | |

4.1.1.1.2. - Effets de *Bacillus subtilis* sur le nombre des lames cirières

La moyenne la plus faible en nombre de lame est produite par les *A. mellifera* traitées par la concentration C1 (0,72 mg/mL) de la *B. subtilis* est 2,5 ; alors qu'elle est de 3,5 lamelles/10 abeilles, pour les abeilles domestiques traitées avec C2 (0,50 mg/mL) de bactérie *B.subtilis*. Pour la concentration C3 (0,35 mg/mL) de *B. subtilis*, la moyenne est de 4,0 lamelles/10 abeilles. Cette valeur est proche de celle du lot témoin ($M = 4,5$) (Tab.7 annexe 7 ; Fig.57).

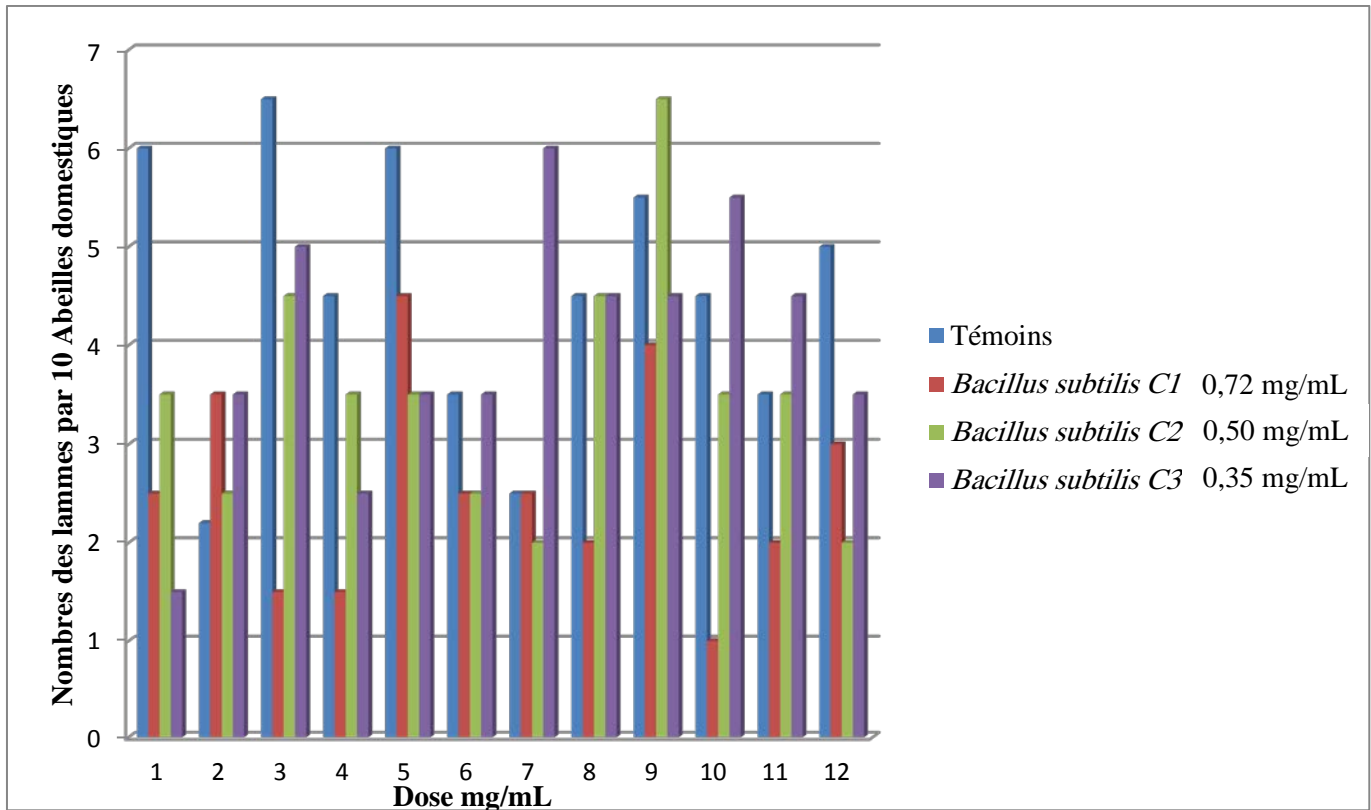


Fig. 57 - Valeurs des nombres des lames produites par des abeilles domestiques avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de *Bacillus subtilis*

4.1.1.2. - Effets de *Bacillus cereus* ATCC 11778

4.1.1.2.1. - Effets de *Bacillus cereus* sur le poids de la cire

Dans le groupe des abeilles domestique traitées avec C2 (0,35mg/ml) de *Bacillus cereus*, le poids de la cire secrétée est de $0,0123 \pm 0,001$. Cette quantité est proche de celle de lot témoin qui est $0,0160 \pm 0,001$ g de cire. Par contre les abeilles traitées avec C1 (0,4 mg/mL) et C3 (0,22 mg/mL) de *Bacillus cereus*, ont les quantités de cire les moins développée que celle du groupe témoin ($0,0077 \pm 0,0005$ g de cire) (Tab.8 annexe 7 ; Fig.58).

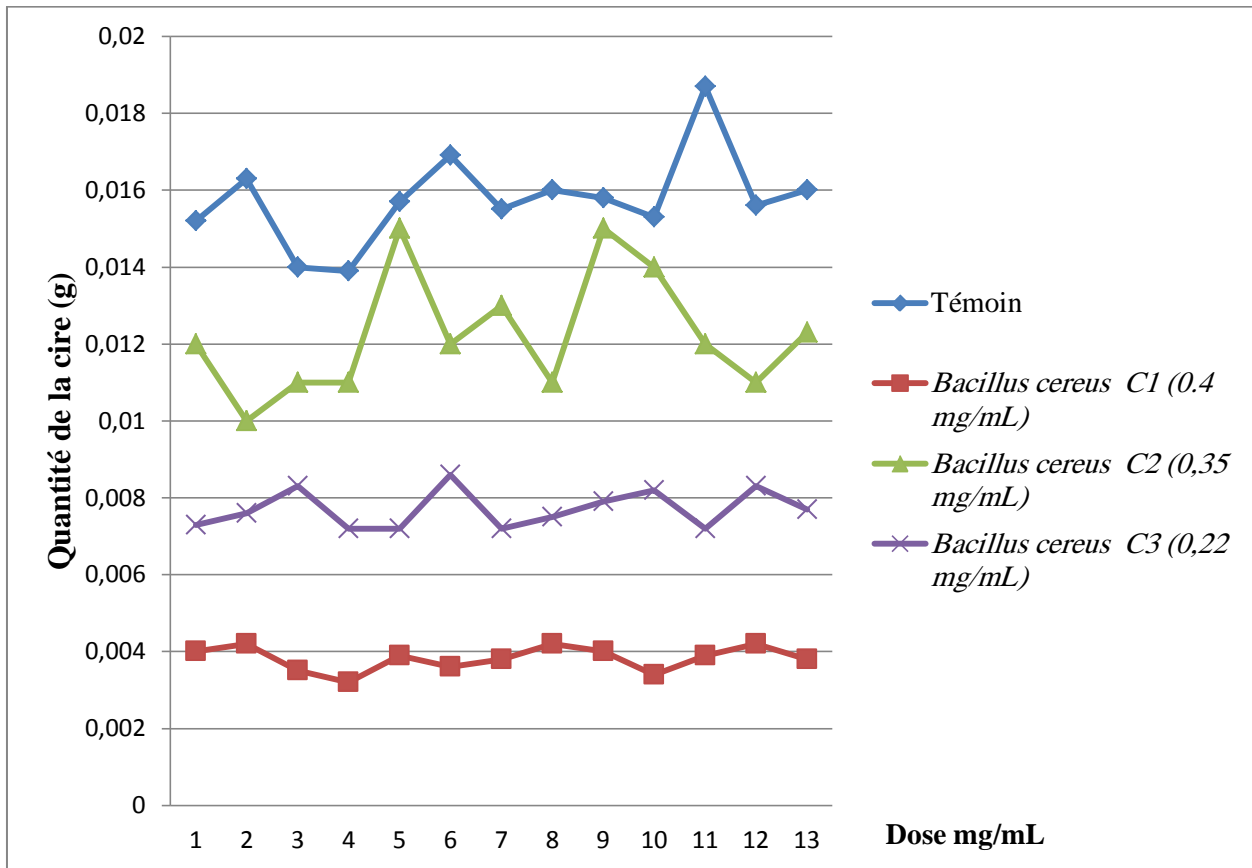


Fig. 58 - Valeurs de la quantité de cire produite par des abeilles avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de *Bacillus cereus*

Il y a eu une différence hautement significative dans les quantités de la cire d'abeilles domestiques traitées par la bactérie *Bacillus cereus* ($F_{3,44} = 275,51$; $P < 0,0001$) (Tab.9).

Tableau n° 9 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite d'abeille traitée par *B. cereus*

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|--------|
| ord. origine | 0,004687 | 1 | 0,004687 | 3967,875 | 0,0001 |
| Traitement | 0,000976 | 3 | 0,000325 | 275,511 | 0,0000 |
| Erreur | 0,000052 | 44 | 0,000001 | | |

4.1.1.2.2. - Effets de *Bacillus cereus* sur le nombre des lames cirières

Nous remarquons que la moyenne la plus faible est produite par *A. mellifera* traitées par la concentration C1 (0,4 mg/ml) de la *B. cereus* (M =2,5); alors qu'elle est de 4,0 lamelles/10 abeilles pour les groupes traités avec C2 (0,35 mg/ml) de la bactérie *B. cereus*, de même pour la concentration C3 (0,22 mg/ml) de *Bacillus cereus* qui représente une moyenne 4,5 lamelles/10 abeilles. Ces deux dernières concentrations sont proches de celle du lot témoin (M = 5,0) (Tab.10 annexe 7 ; Fig.59).

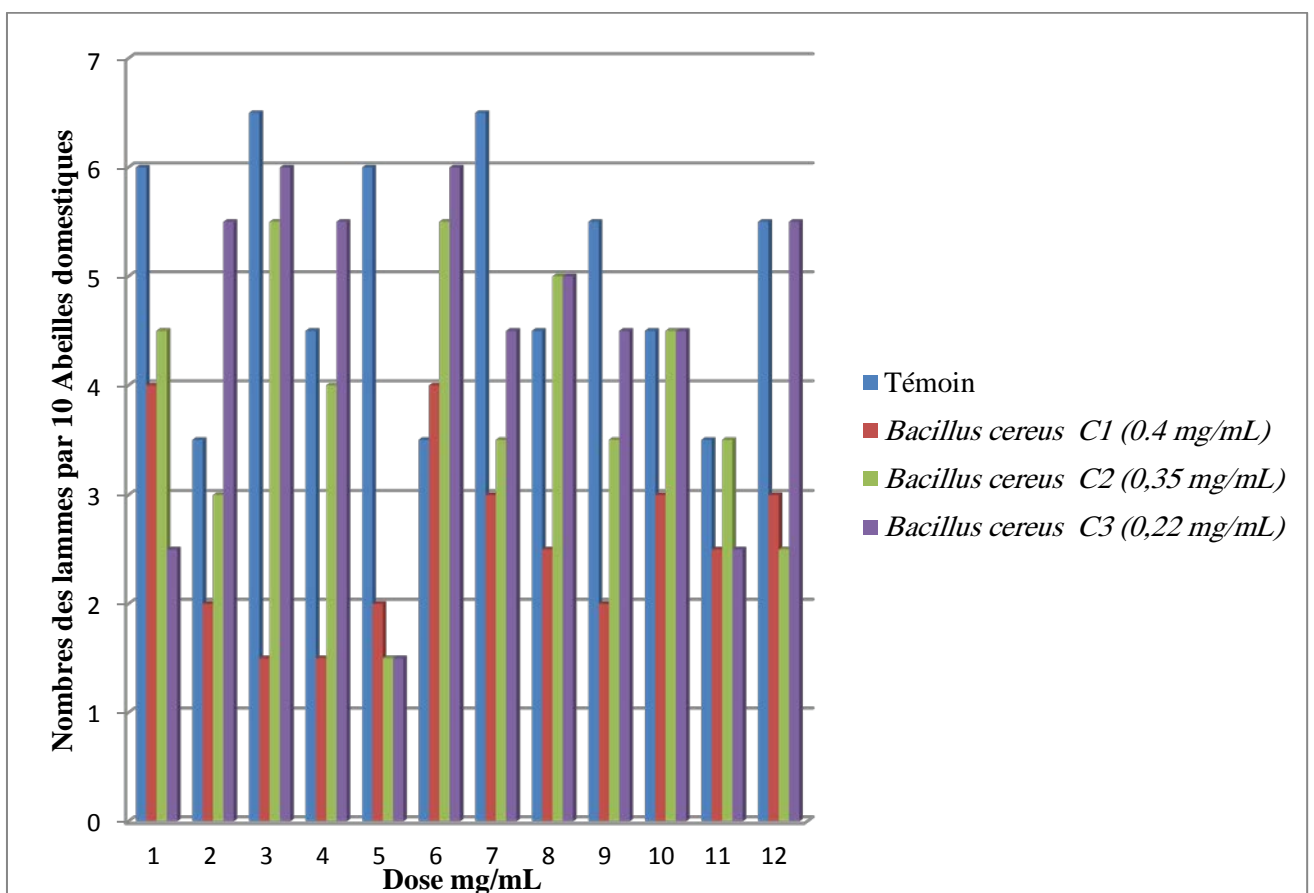


Fig. 59 - Valeurs des nombres des lames produites par des abeilles domestiques avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de *Bacillus cereus*

4.1.1.3. - Effets de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27883

4.1.1.3.1. - Effets de *Pseudomonas aeruginosa* sur le poids de la cire

La comparaison entre la quantité de cire produite par le groupe d'abeilles témoins et les groupes d'abeilles traitées a révélé des différences très hautement significatives (ANOVA $F_{3,44}=103,35$; et $p < 0,0001$) (Tab. 11). Les abeilles qui ont produit des valeurs faibles variant entre 0,006 et 0,009 g de cire avec une moyenne de $0,0075 \pm 0,001$ sont celles de la concentration C2 (0,33 mg/ml) de *Pseudomonas aeruginosa*. Pour la concentration C3 (0,22 mg/ml) de *P. aeruginosa* les abeilles ont produit de 0,0024 à 0,0074g de la cire avec une moyenne de $0,0040 \pm 0,001$ g. Enfin, des valeurs entre 0,008 et 0,018 g de cire avec une moyenne de $0,012 \pm 0,002$ g, sont marquées pour les abeilles domestiques traitées par la concentration C1 (0,4 mg/ml) de la bactérie *P. aeruginosa*.

Tableau n° 11 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite par *P. aeruginosa*

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|--------|
| ord. origine | 0,005461 | 1 | 0,005461 | 1210,969 | 0,0001 |
| Traitement | 0,001398 | 3 | 0,000466 | 103,350 | 0,000 |
| Erreur | 0,000198 | 44 | 0,000005 | | |

Il est à noter que ces valeurs sont proches de celles du lot témoin qui est de 0,011 et 0,025g de cire avec une moyenne de $0,019 \pm 0,003$ g/10 abeilles (Tab.12, Annexe 7 ; Fig.60).

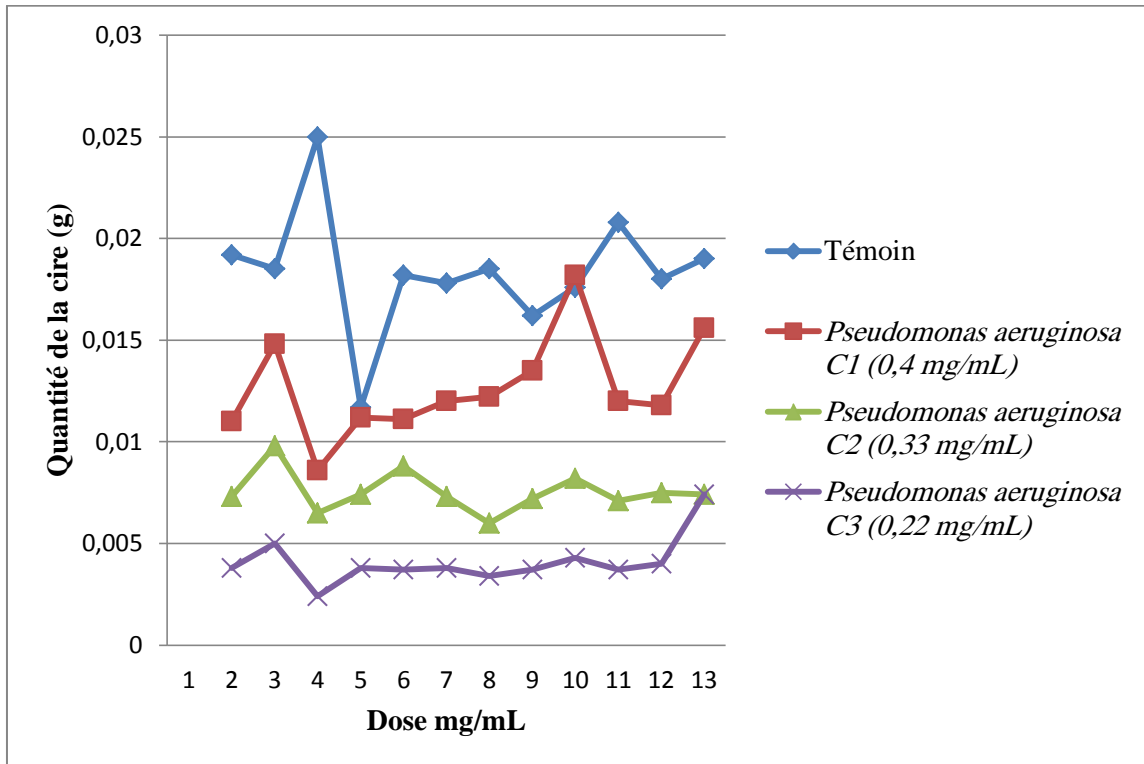


Fig. 60 - Variation de la quantité de cire produite par des abeilles avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1.1.3.2. - Effets de *Pseudomonas aeruginosa* sur le nombre des lames cirières

Nous observons que la moyenne la plus faible est produite par les abeilles ayant ingérées une concentration renfermant C1 (0,4 mg /ml) de *P. aeruginosa*, qui est de 2,5 lamelles/10 abeilles. Les abeilles traitées avec les concentrations C2 (0,33 mg/ml) et C3 (0,22 mg/ml) de *P. aeruginosa*, ont une moyenne de 4,5 et 04 lamelles/10 abeilles respectivement, ce qui est proches de celle du groupe témoin (M = 5) (Tab.13 annexe 7 ; Fig. 61).

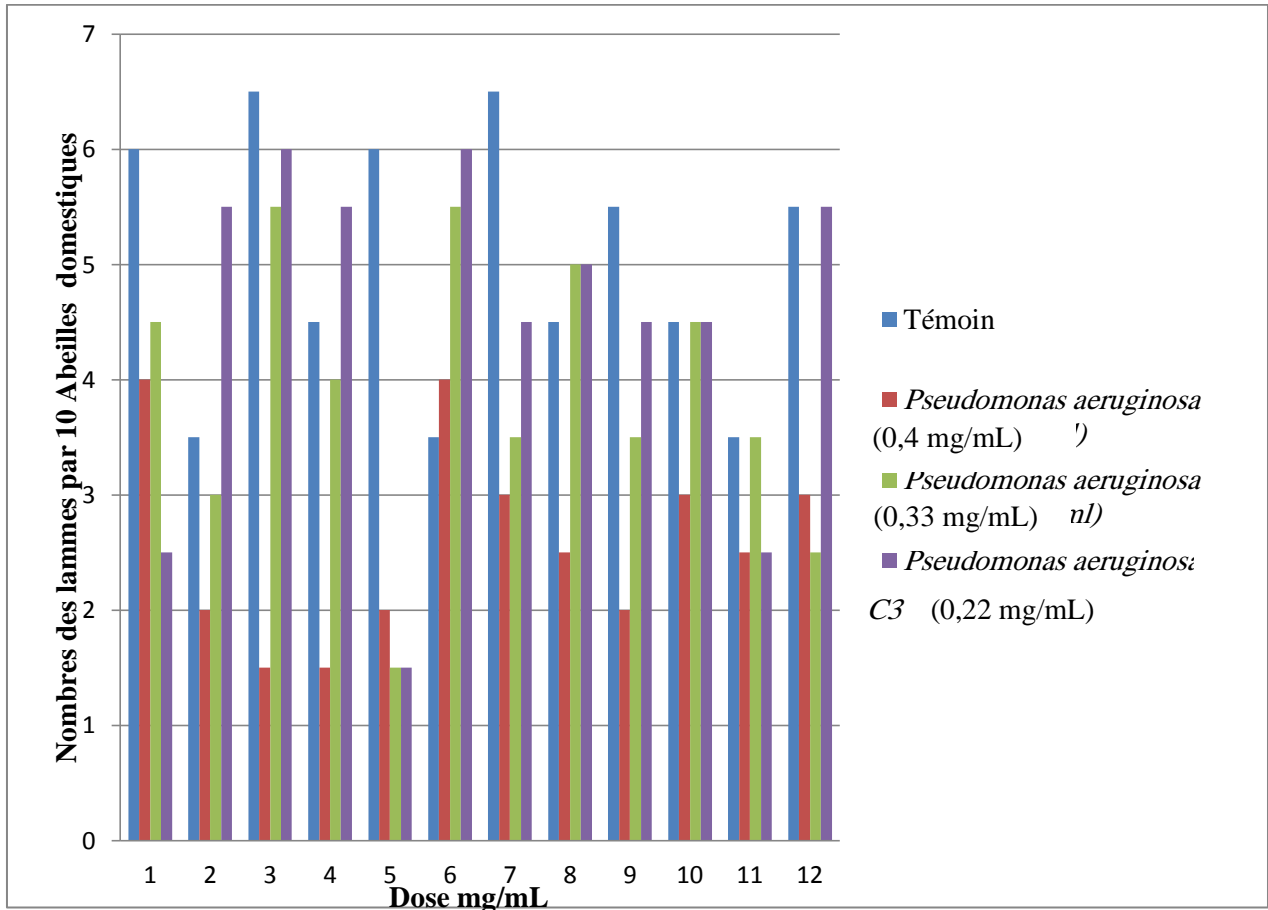


Fig. 61 - Valeurs des nombres des lames produites par des abeilles domestiques avant et après le traitement par (C1, C2 et C3) de *Pseudomonas aeruginosa*

4.1.2. - Effets des bactéries entomopathogènes sur la glande hypophrygienne

Les paramètres testés dans cette partie sont la quantité de la protéine produite par l'abeille domestique et les diamètres des acini de la glande hypophrygienne. La quantité des protéines est d'abord testé pour les glandes traitées par *B. subtilis* et *B. cereus* puis par les glandes traitées par *P. aeruginosa*.

4.1.2.1. - Effet de bactérie de *Bacillus subtilis* ATCC 6633

4.1.2.1.1. - Effet de *Bacillus subtilis* sur la quantité des protéines

La quantité de protéines observée dans le groupe, traité par C2 (0,50 mg/ml) et C3 (0,35 mg/ml) de bactérie *B. subtilis*, est respectivement de 1,24 et 1,32 mg. Ces valeurs sont relativement fortes. Par contre la quantité des protéines élaborée dans le groupe traité par C₁ (0,72 mg/ml) est de 1,21 mg de protéine. Ces résultats sont très hautement significatives ($F_{3,4}=121,47$; $P < 0,0001$) par rapport aux témoins (Tab.14 annexe 7 ; Fig.62).

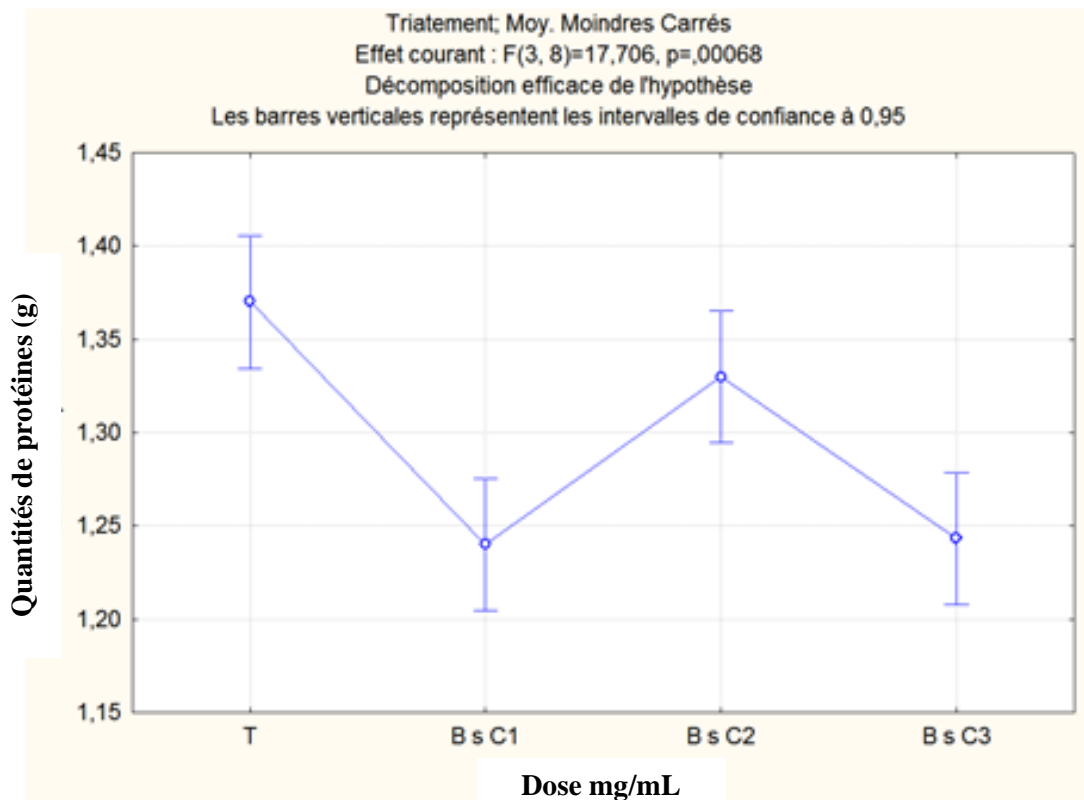


Fig. 62 - Moyenne des quantités de protéines des abeilles en fonction des doses en *B. subtilis*

4.1.2.1.2. Effet de *Bacillus subtilis* sur le volume des acini

Le plus grand effet des *Bacillus subtilis* sur le développement des glandes hypopharyngiennes est noté à la dose C1 = 0,72 mg/mL. A cette dose, les dimensions des acini ont chuté jusqu'à $85,75 \pm 2,22 \mu\text{m}$ pour la longueur et $63,21 \pm 2,07 \mu\text{m}$ pour la largeur (Tab.15 annexe 7 ; Fig.63). Il est suivi par celui noté en C3 = 0,35 mg/ml où les dimensions

des acini sont $88,87 \pm 2,13 \mu\text{m}$. Pour la longueur et $67,08 \pm 2,04 \mu\text{m}$ pour la largeur. La concentration C2 = 0,50 mg/mL n'a pas vraiment affecté les diamètres des acini. En revanche, la longueur des acini de GPH a montré des différences statistiquement très hautement significatives entre les concentrations du traitement par *Bacillus subtilis* et les stades de développement ($F_{7,16} = 67,444$; $P < 0,0001$) (Tab.16, annexe 7 ; Fig.64).

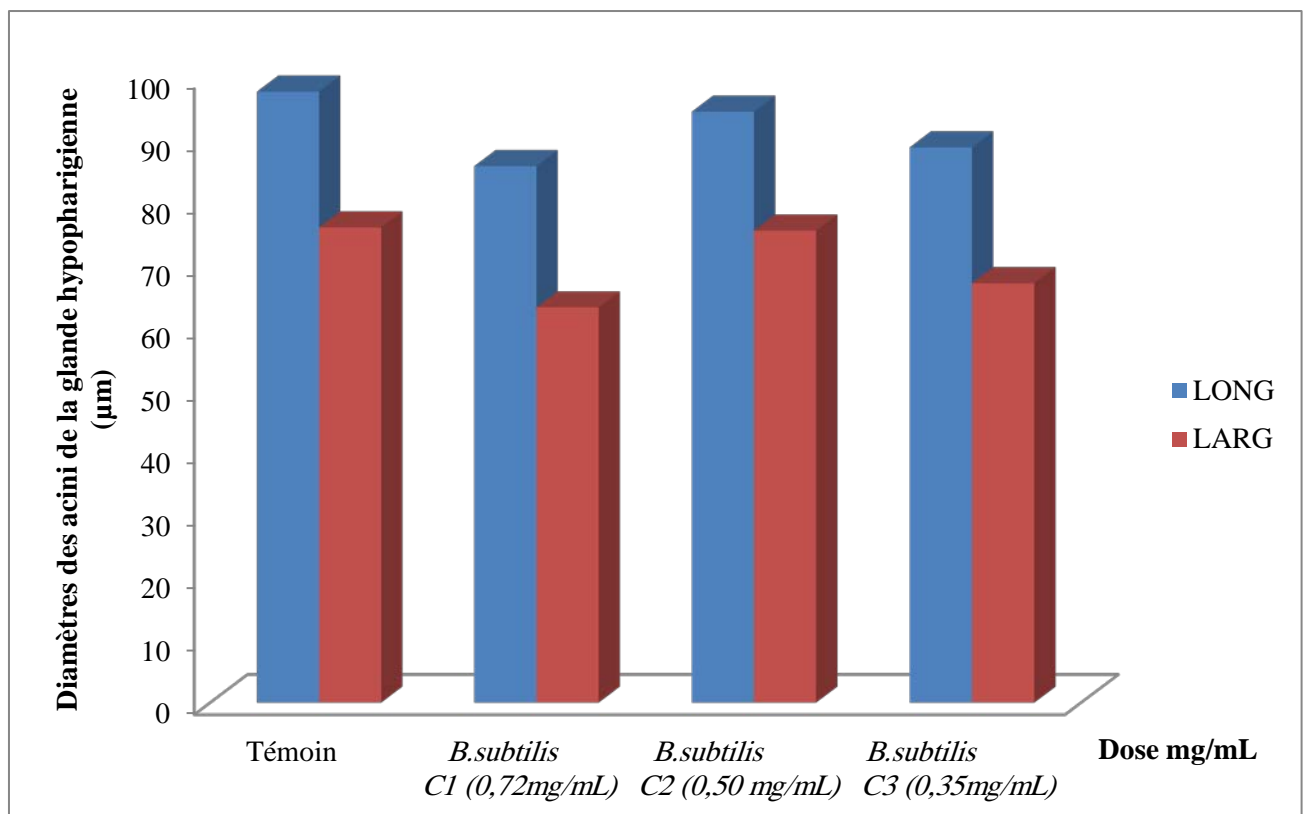


Fig. 63 - Diamètres des acini des abeilles traitées par *B. subtilis*

4.1.2.2. - Effet de *Bacillus cereus* ATCC 11778

4.1.2.2.1. - Effet de *Bacillus cereus* sur la quantité des protéines

La quantité des protéines sécrétées par la glande hypopharyngienne d'abeilles domestiques après le traitement par les deux concentrations C1 (0,4 mg/mL) et C3 (0,22 mg/mL) de bactérie *B. cereus* sont respectivement de 1,36 mg et 1,34mg de protéine. Ce sont les quantités les plus proches de celles du groupe témoin (1,38 mg de protéine).

Par contre, la quantité du groupe traité par C2 (0,35 mg/mL) présente la valeur les plus faibles 1,20 mg de protéine. Il y a une différence très hautement significative dans les concentrations de protéine chez les abeilles domestiques traitées par la bactérie *Bacillus cereus* ($F_{3,8} = 32,727$; $P < 0,0008$) (Tab.17, annexe 7 ; Fig.65).

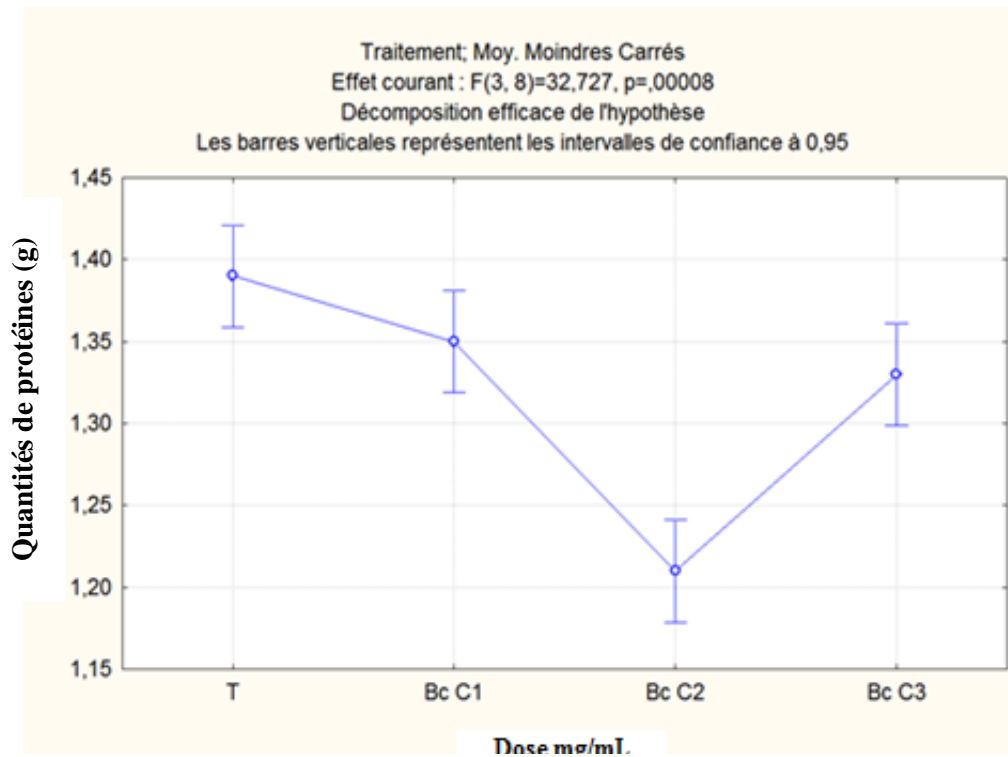


Fig. 65 - Moyenne des quantités de protéine des abeilles traitées par *B. cereus*

4.1.2.2.2. - Effet de *Bacillus cereus* sur le volume des acini

Les diamètres des acini des glandes hypopharyngiennes des abeilles domestiques traitées par la bactérie *Bacillus cereus*, avec les concentrations C1 (0,4 mg/mL) et C3 (0,22 mg/mL) sont respectivement de $(93,55 \pm 2,54 \mu\text{m} / 76,64 \pm 2,16\mu\text{m})$ et $(94,95 \pm 2,43\mu\text{m} / 67,08 \pm 2,08\mu\text{m})$. Ils présentent les valeurs les plus proches de celle du groupe témoin qui sont $(98,79 \pm 3,13 \mu\text{m} / 76,64 \pm 2,16\mu\text{m})$ (Tab.18 annexe 7 ; Fig.66). Les abeilles traitées par la C2 (0,35 mg/mL) de *Bacillus cereus* présentent la valeur la plus faible en diamètre $(76,64 \pm 2,16\mu\text{m} / 64,17 \pm 2,05\mu\text{m})$. La comparaison entre les diamètres des acini a révélé des différences très hautement significatives ($F_{7, 16} = 56,199$; $P < 0,0001$). (Fig.67 et Tab.19, Annexe 7)

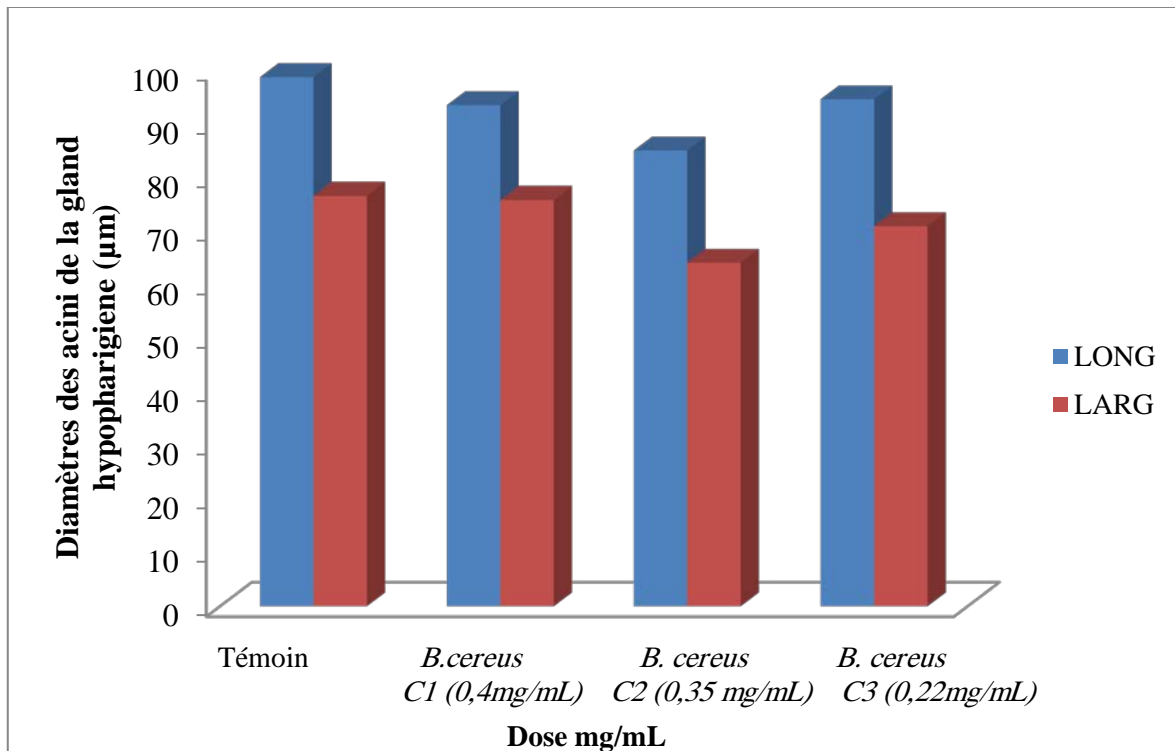


Fig. 66 - Diamètres des acini des abeilles traitées par *B. cereus*

4.1.2.3. - Effet de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27883

4.1.2.3.1. - Effet de *Pseudomonas aeruginosa* sur la quantité des protéines

La quantité de protéine la plus élevée est produite par les glandes hypopharyngiennes des abeilles domestiques traitées par la bactérie la concentration C1 (0,4 mg/ml) de *P. aeruginosa*. C1 (0,4 mg/mL), soit 1,37 mg. Elle est suivie par celle élaborée des

abeilles traitées par la C2 (0,33 mg/mL). Il s'agit de 1,33 mg de protéine. Ces quantités de protéine sont les plus proches de celle du groupe témoin qui sont 1,42g. (Tab.20 annexe 7 ; Fig.68). Les abeilles traitées par la C3 (0,22 mg/mL) de bactérie *P. aeruginosa* ont produit la quantité la plus faible en protéine 1,19 mg/10 abeilles.

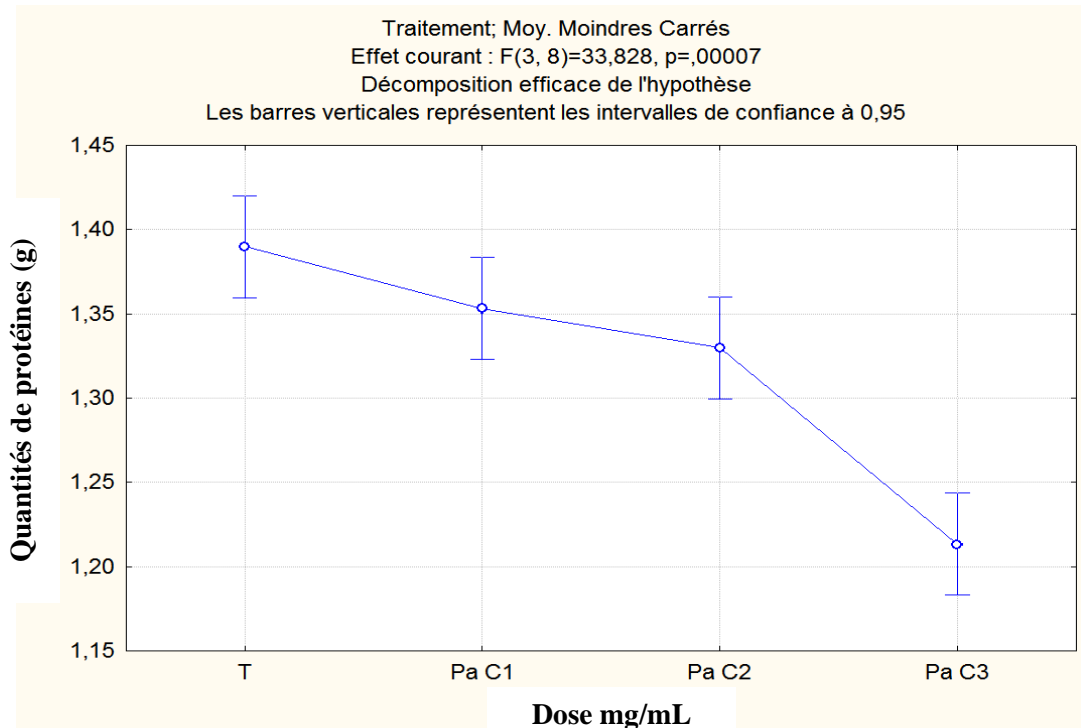


Fig. 68 - Moyenne des quantités de protéines des abeilles traitées par *P. aeruginosa*

4.1.2.3.2. - Effet de *Pseudomonas aeruginosa* sur le volume des acini

La comparaison entre les résultats des diamètres par le groupe d'abeilles témoins et les groupes d'abeilles traitées a révélé des différences très hautement significatives (ANOVA $F_{7,16} = 84,344$; $P < 0,0001$) (Tab. 21 annexe 7 ; Fig.69). Les diamètres des acini d'abeilles domestiques les plus proches des témoins sont celle enregistrées par les concentrations C1 (0,4 mg/ml) et C2 (0,33 mg/ml) de *P. aeruginosa*. Les valeurs notées sont $95,94 \pm 2,28\mu\text{m}$ / $74,84 \pm 2,04\mu\text{m}$ en C1 et $93,14 \pm 2,22\mu\text{m}$ / $68,49 \pm 2,02\mu\text{m}$ en C2. Les abeilles traitées par la C3 (0,22 mg/ml) de bactérie *P. aeruginosa* présentent la valeur la plus faible en diamètre des acini ($84,00 \pm 2,07\mu\text{m}$ / $60,75 \pm 1,95\mu\text{m}$) (Tab.22 annexe 7 ; Fig.70)

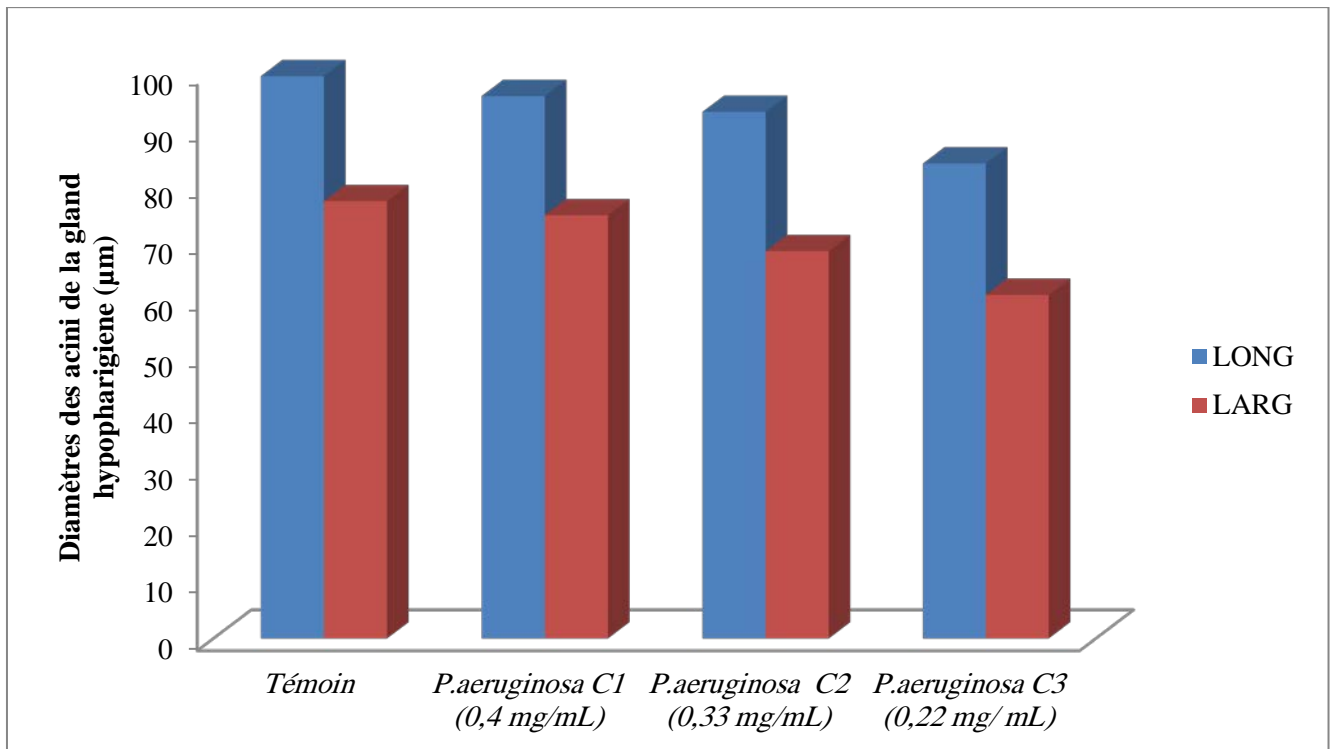


Fig. 70 - Diamètres des acini des abeilles traitées par *P. aeruginosa*

4.2. - Résultats de l'utilisation d'un biopesticide E.M-Activé

L'effet d'un biopesticide sur les quantités des protéines et des cires produites par les abeilles est réalisé en utilisant E.M-A. Efficace micro-organismes - Activé.

Ce test est effectué sur les abeilles montrant une fragilité contre les différentes souches de bactéries utilisées. Soit les abeilles issues de la C1 (0,72 mg/ml) de *B. subtilis*, de C1 (0,4 mg/ml) de *B. cereus* et *P. aeruginosa* C3 (0,22 mg/ml). L'objectif de cette partie est de trouver un traitement biologique contre l'effet pathogène de ces bactéries sur les abeilles.

4.2.1. - Effet de l'utilisation d'E.M-A. sur le poids de la cire et le nombre des lames cirière

4.2.1.1. - Effet sur le groupe traité par *B. subtilis* C1 (0,72 mg/ml)

La comparaison entre la quantité de la cire produite par le groupe d'abeilles témoins et les groupes d'abeilles traitées a révélé des différences très hautement significatives (ANOVA $F_{2,33} = 62,916$; $P < 0,0001$) (Tab.23). Les abeilles témoins ont produit entre 0,016 et 0,018 g. de cire avec une moyenne de $0,017 \pm 0,0006$ g. Alors que les abeilles traitées par

la concentration C1 (0,72 mg/ml) de *B. subtilis*, ont produit entre 0,008 et 0,0096 g de cire avec une moyenne de $0,0087 \pm 0,0005$ g.

Tableau n° 23 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite par d'abeille domestique avant (*B.subtilis* C1) et après le traitement par E.M-A.

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|--------|
| ord. origine | 0,004895 | 1 | 0,004895 | 1165,542 | 0,0001 |
| Traite ment | 0,000529 | 2 | 0,000264 | 62,916 | 0,0001 |
| Erreur | 0,000139 | 33 | 0,000004 | | |

Enfin, les quantités de cire produites par le lot d'abeilles traitées par le produit E.M-A. varient de 0,005 et 0,013 g avec une moyenne de $0,009 \pm 0,003$ g. (Tab.24 annexe 7 ; Fig.71). L'effet d'EMA est donc positif sur la production de la cire.

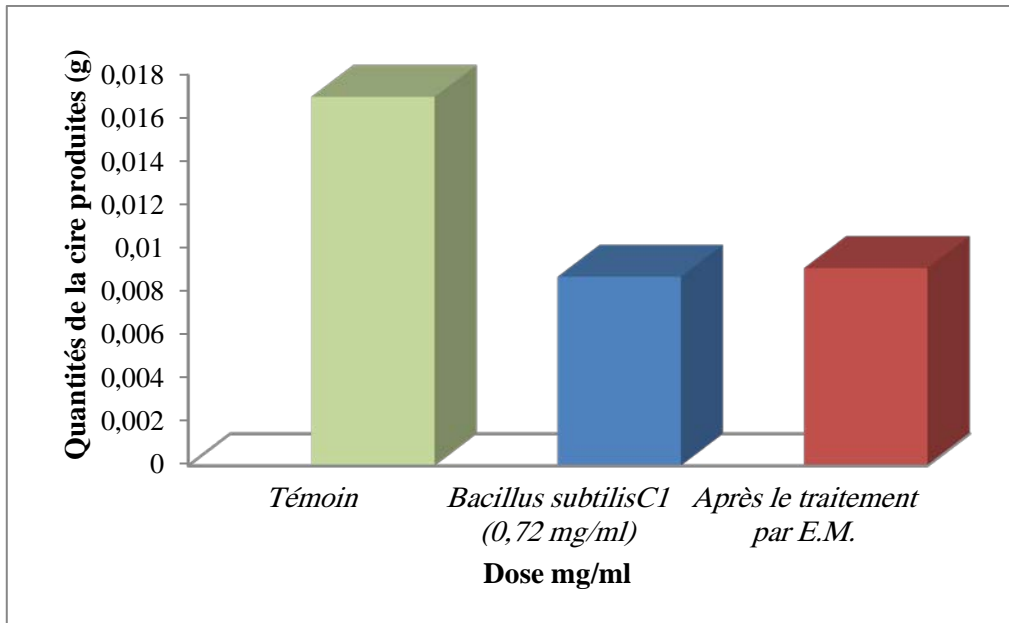


Fig. 71 - Valeurs des poids de la cire des abeilles domestique avant (*B.subtilis* C1) et après le traitement par le produit EM-Activé

4.2.1.2. - Effet sur le groupe traité par *B. cereus* C1 (0,4 mg/ml)

Nous remarquons que les quantités de la cire produite par l'abeille domestique varient de 0,0032 à 0,0042 mg avec une moyenne de $0,0038 \pm 0,0003$ g de protéines/10 abeille traitées par C1 (0,4 mg/mL) de *B. cereus*. En revanche, l'utilisation du biopesticide à base de E.M-A montre des valeurs fortes varient de 0,0163 à 0,0187g avec une moyenne de $(0,0174 \pm 0,0008\text{g}/10$ abeilles), qui sont proche de celle du lot témoin ($0,0161 \pm 0,001$) (Tab.25 annexe 7 ; Fig.72).

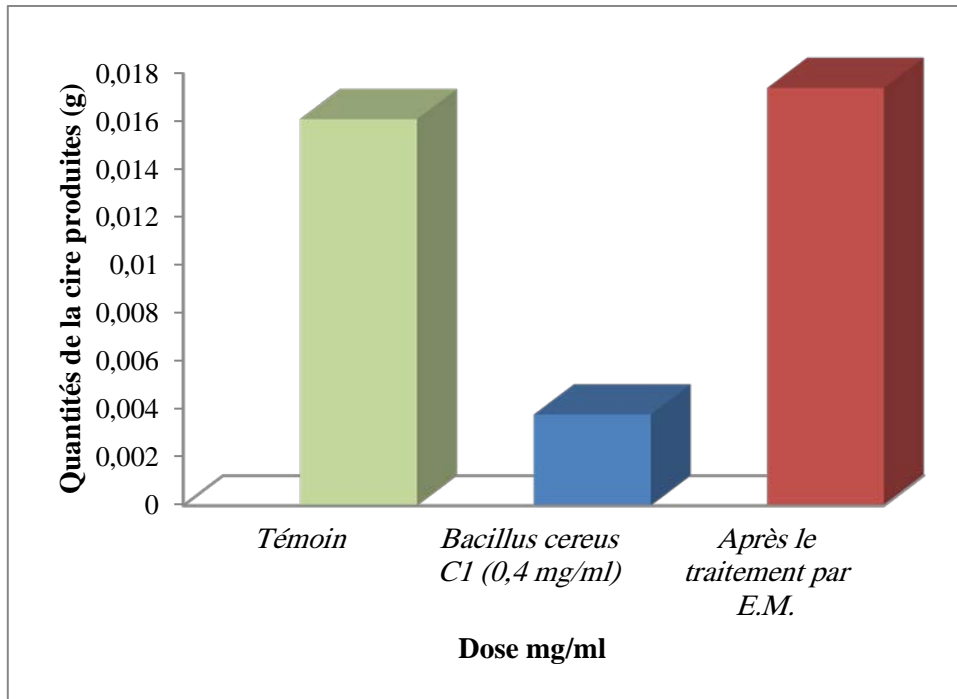


Fig. 72 - Valeurs des poids de la cire des abeilles domestiques avant (*B.cereus* C1) et après le traitement par le produit EM-Activé

La comparaison entre les quantités de la cire produites a révélé des différences très hautement significatives ($F_{2,33} = 546,09$; $P < 0,0001$) (Tab.26).

Tableau n° 26 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite par d'abeille domestique avant (" (*B.cereus* C1) et après le traitement par E.M-A.

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|--------|
| ord. origine | 0,005613 | 1 | 0,005613 | 4507,581 | 0,0001 |
| Traitement | 0,001360 | 2 | 0,000680 | 546,087 | 0,000 |
| Erreur | 0,000041 | 33 | 0,000001 | | |

4.2.1.3. - Effet sur le groupe traité par *P. aeruginosa* C3 (0,22 mg/ml)

La quantité de la cire produite par l'abeille domestique après le traitement par la concentration C3 (0,22 mg/ml) de bactérie *P. aeruginosa* est 0,004 g de cire. La quantité de la cire après le traitement par le produit E.M-A est 0,0143 g. (Tab.27 annexe 7 ; Fig.73).

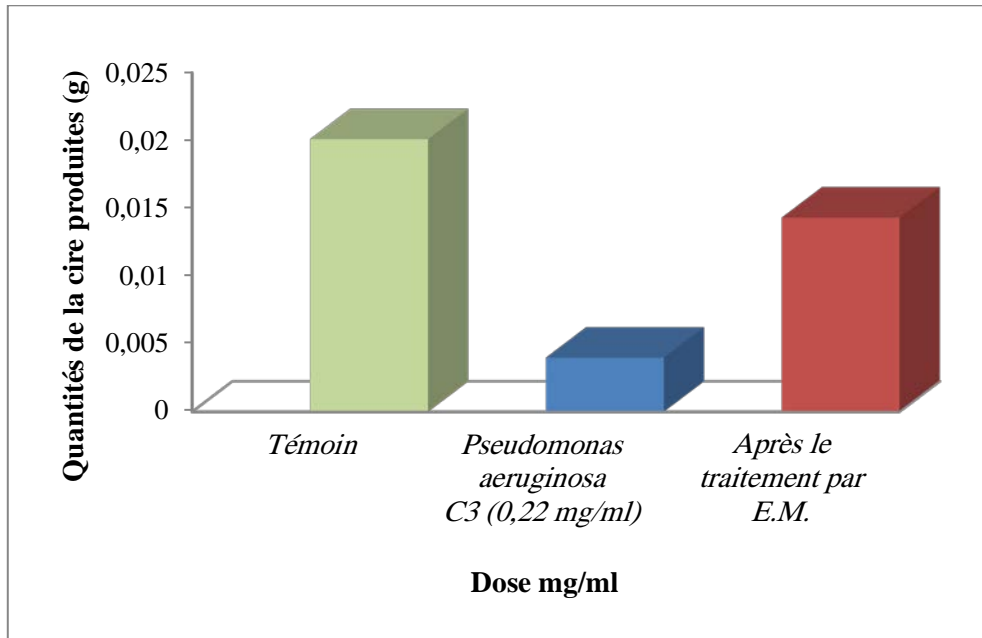


Fig. 73 - Valeurs des poids de la cire des abeilles domestique avant (*P.aeruginosa* C3) et après le traitement par le produit EM-Activé

Il y a eu une différence très hautement significative dans le poids de la cire d'abeille domestique ($F_{2,3} = 61,906$; $P < 0,0001$) (Tab.28).

Tableau n° 28 - Analyse de la variance de quantité de la cire produite par d'abeille domestique avant (*P.aeruginosa* C3) et après le traitement par E.M-A.

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|--------------|----------|----------|----------|----------|--------|
| ord. origine | 0,005920 | 1 | 0,005920 | 465,3062 | 0,0001 |
| Traitement | 0,001575 | 2 | 0,000788 | 61,9145 | 0,0001 |
| Erreur | 0,000420 | 33 | 0,000013 | | |

4.2.2. - Effet de l'utilisation d'E.M-A. sur la quantité des protéines et le volume des acini

4.2.2.1. - Effet sur le groupe traité par *B. subtilis* C1 (0,72 mg/ml)

Il est à rappeler que les résultats de la quantité de protéines contenues dans la glande G.H.P. des abeilles domestiques traitée après le traitement par le biopesticide E.M-A sont représentés dans le tableau 24 (annexe 7).

Le produit testé E.M-A agit de manière très hautement significative sur la production de la quantité de protéine ($F_{2, 6} = 173,11$; $P < 0,0001$) (Fig.74). La production de protéine de l'abeille domestique traitée par la concentration C1 (0,72 mg/ml) de *B.subtilis* est 1,21mg de protéines, alors que la production est augmentée après l'utilisation du produit (E.M-A), qui est 1,57mg de protéines/10 abeilles (Tab.29 annexe 7 ; Fig.75).

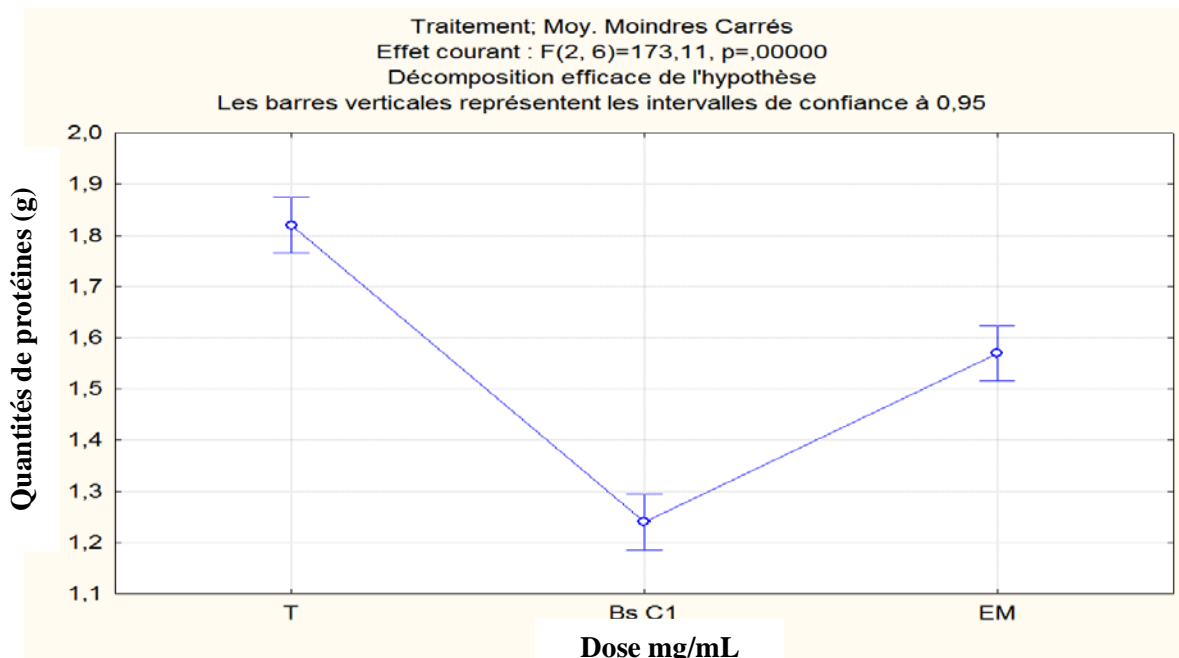


Fig. 74 - Moyenne des quantités de protéines des abeilles avant (*B. subtilis* C1) et après le traitement par le produit E.M- Activé.

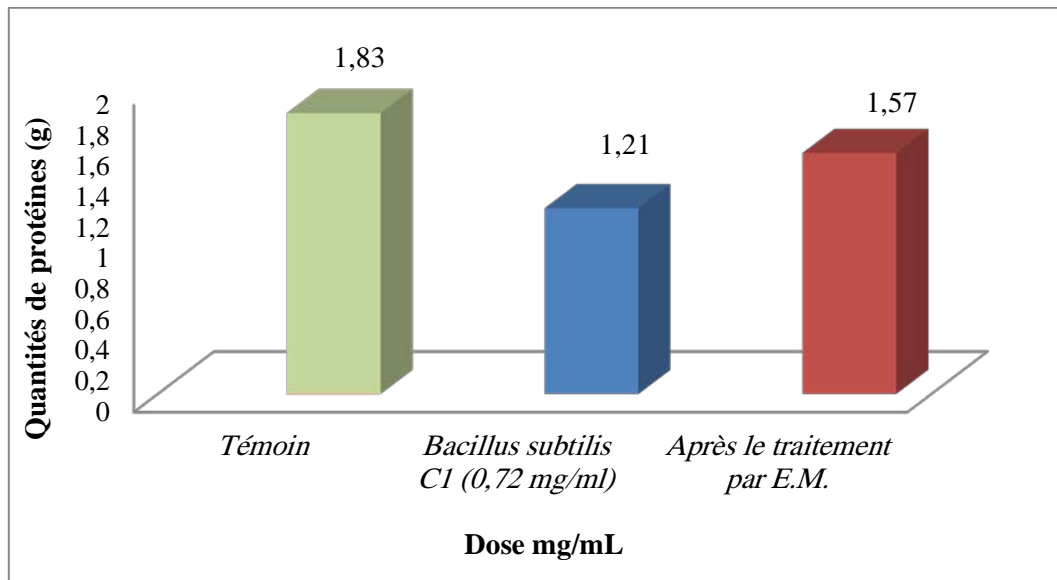


Fig. 75 - Valeurs des quantités de protéines des abeilles avant (*B.subtilis* C1) et après le traitement par le produit E.M-Activé.

Ce même constat est enregistré pour le diamètre des acini qui était ($85,75 \pm 2,22\mu\text{m}$ / $63,21 \pm 2,07\mu\text{m}$) et après le traitement par EM-Activé est devenu ($129,69 \pm 3,36\mu\text{m}$ / $106,32 \pm 2,35\mu\text{m}$) (Fig.76).

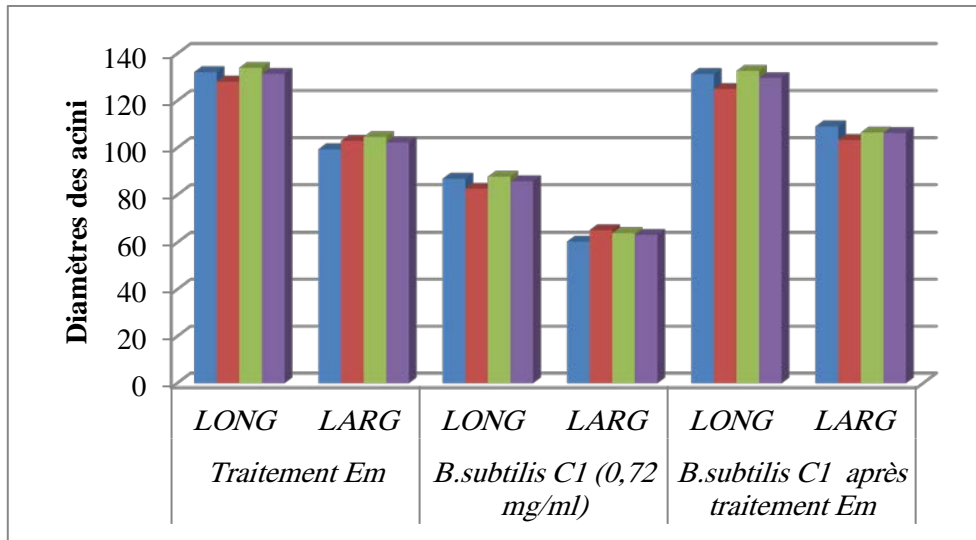


Fig. 76 - Diamètre des acini des abeilles avant (*B.subtilis* C1) et après le traitement par le produit E.M-Activé.

4.2.2.2. - Effet sur le groupe traité par *B. cereus* C2 (0,35 mg/ml)

Les résultats de la quantité des protéines contenues dans la glande hypopharyngègne de l'abeille domestique après le traitement par le produit E.M-A sont très hautement significatifs ($F_{2,6} = 327,00$; $P < 0,0001$) (Fig.77). Ces quantités de protéines sont plus fortes que celles du groupe traité par la concentration C2 (0,35mg/ml) *B.cereus*, qui sont 1,53 mg de protéines/10 abeilles. (Tab. 30 annexe 7 ; Fig. 78). En revanche les diamètres des acini de la glande G.H.P. augmentent grâce au traitement biologique par EM-Activé (Fig.79).

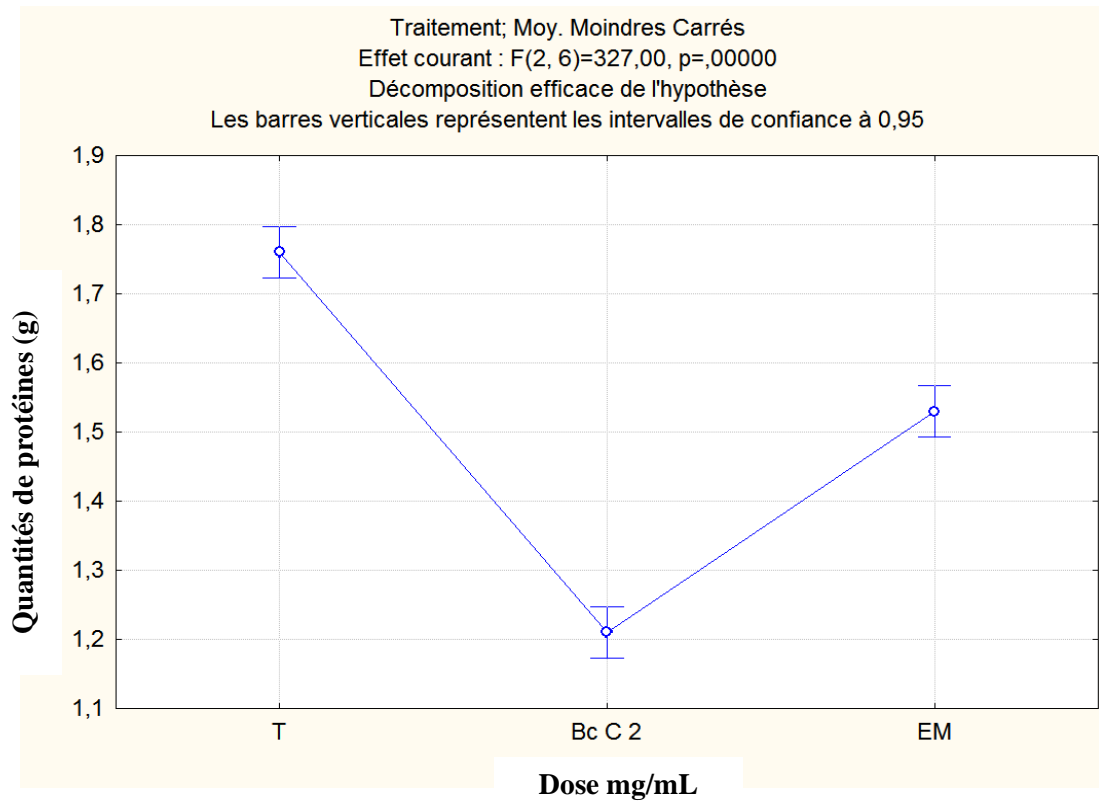


Fig. 77 - Moyenne des quantités de protéines des abeilles avant (*B. cereus* C2) et après le traitement par la bio pesticide EM-Activé.

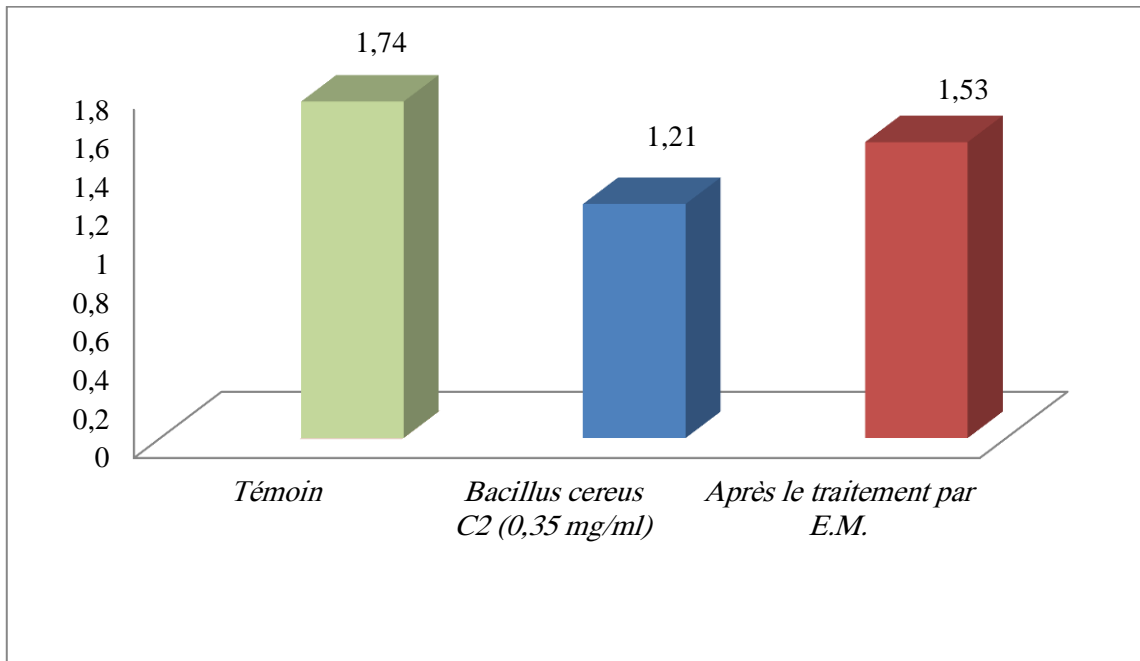


Fig. 78 - Valeurs des quantités de protéines des abeilles avant (*B.cereus* C2) et après le traitement par E.M- Activé.

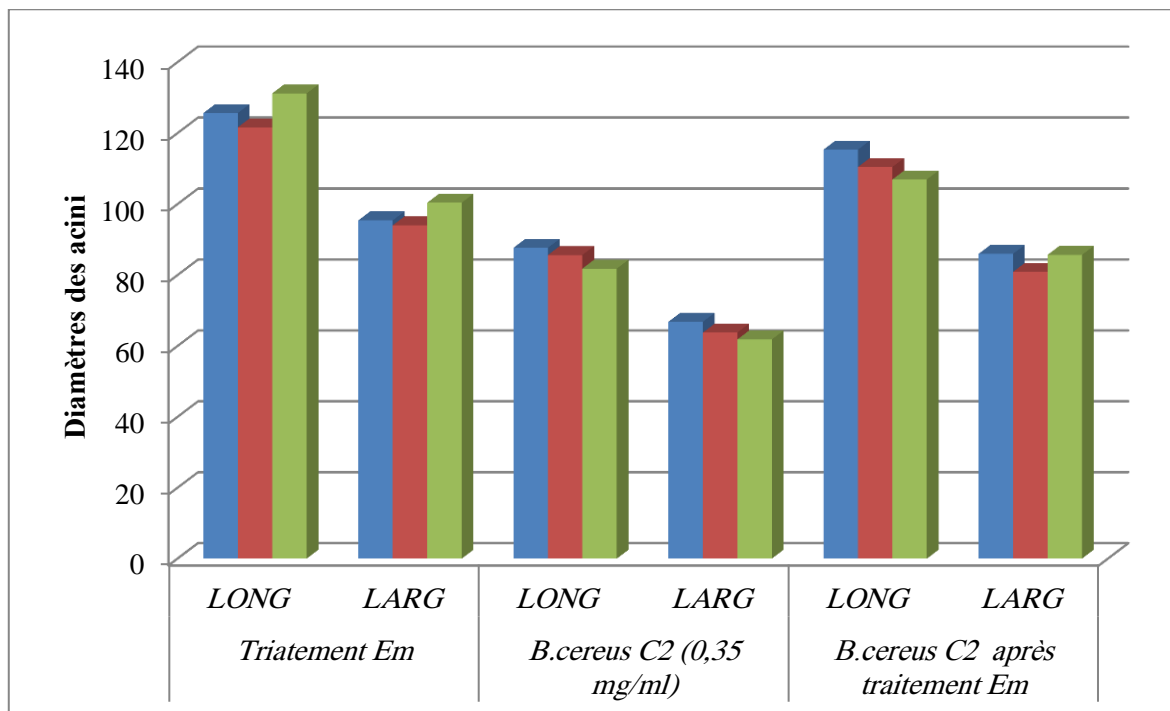


Fig. 79 - Diamètre des acini des abeilles avant (*B.cereus* C2) et après le traitement par le bio pesticide EM-Activé.

4.2.2.3. - Effet sur le groupe traité par *Pseudomonas aeruginosa* C3 (0,22 mg/ml)

Les quantités des protéines sécrétées par la glande hypopharyngène des abeilles domestiques après le traitement avec le produit E.M-A est 1,46mg de protéines/10 abeilles. Elles sont plus fortes que celles du groupe traité par la concentration C3 (0,30 mg/ml) qui est 1,46 mg de protéines/10 abeilles (Tab.31 annexe 7 ; Fig.80). Il y a une différence hautement significatives sur les résultats de la production de protéines ($F_{2, 6} = 415,56 ; P < 0.0001$) (Fig.81).

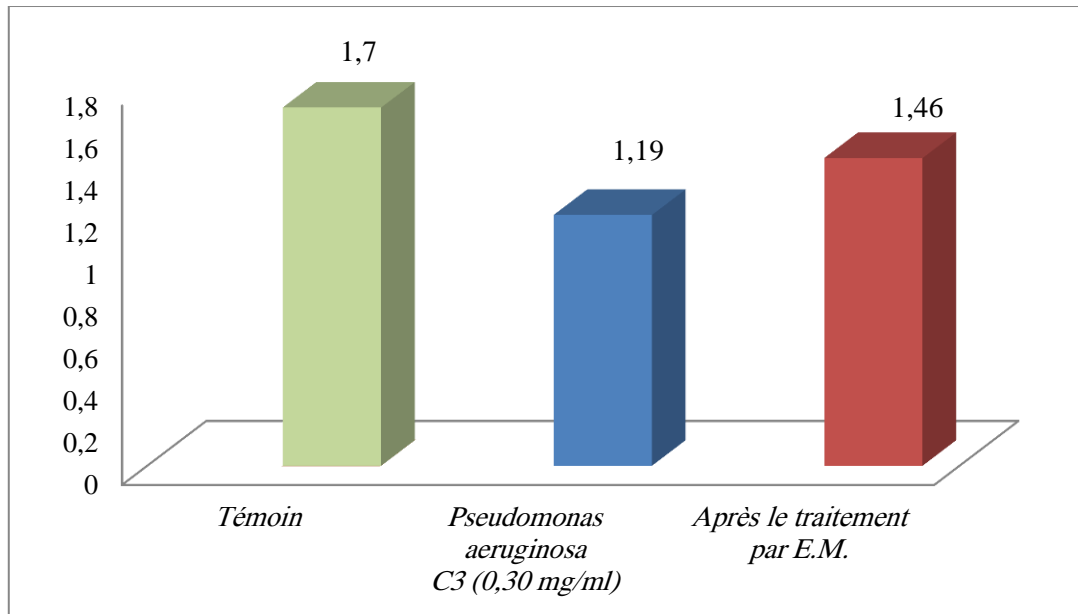


Fig. 80 - Quantités de protéines des abeilles avant (*P.aeruginosa* C3) et après le traitement par E.M-Activé

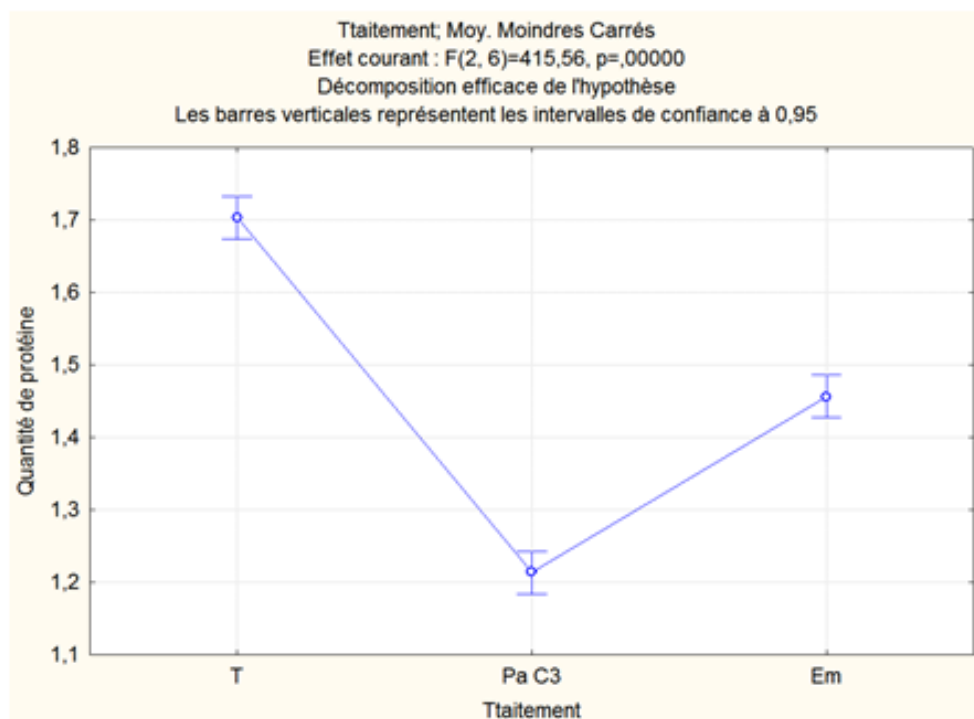


Fig. 81 - Moyenne des quantités de protéines des abeilles avant (*P.aeruginosa* C3) et après le traitement par le bio pesticide EM-Activé

Pour la taille des acini G.H.P. la même remarque a été observée au niveau du groupe traité par EM-A ou nous avons enregistré des diamètres de $(104,06 \pm 3,29\mu\text{m}/75,13 \pm 2,25\mu\text{m})$. (Fig.82).

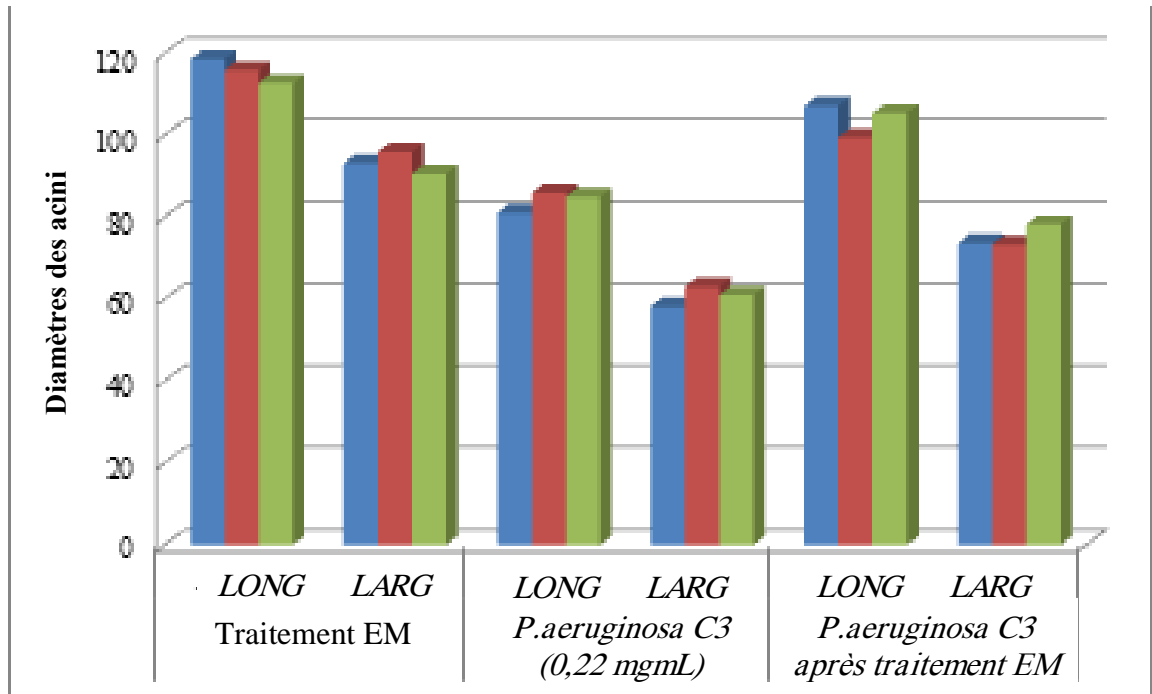


Fig. 82 - Diamètre des acini des abeilles avant (*P.aeruginosa C3*) et après le traitement par le bio pesticide EM-Activé

4.3. - Résultats de test de dénombrement des bifidobactéries et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

Notre étude est accomplie par l'isolement d'une souche des bifidobactéries et l'étude de sa sensibilité vis-à-vis les antibiotiques.

4.3.1. - Identification et dénombrement de la souche de pseudolactique isolée

L'identification de bifidobactéries isolés est faite en utilisant les tests de la galerie biochimique API 20A (logiciel API WEB), le test de catalase et celui du Gram+. Tous ces examens ont pu mettre en évidence que la souche de bifidobactérie isolée des abeilles est du genre *Bifidobacterium* (Fig. 83).



Fig. 83 - Résultats de test biochimique galerie API 20 A. (Photographie originale)

Le dénombrement des *Bifidobacterium* sp. a montré la concentration la plus élevée est notée au niveau des tubes digestifs 75×10^4 UFC /mL. L'effectif le plus faible se trouve dans les œsophages de 4×10^2 UFC /mL. (Fig.84). A l'instar de ces résultats nous pouvons déduire que l'installation de la flore probiotique commence dans le tube digestif, et ce qui est trouvé au niveau des œsophages ne peut être considéré comme des traces des *Bifidobacterium* résidus de l'élaboration des miels par l'appareil buccal.

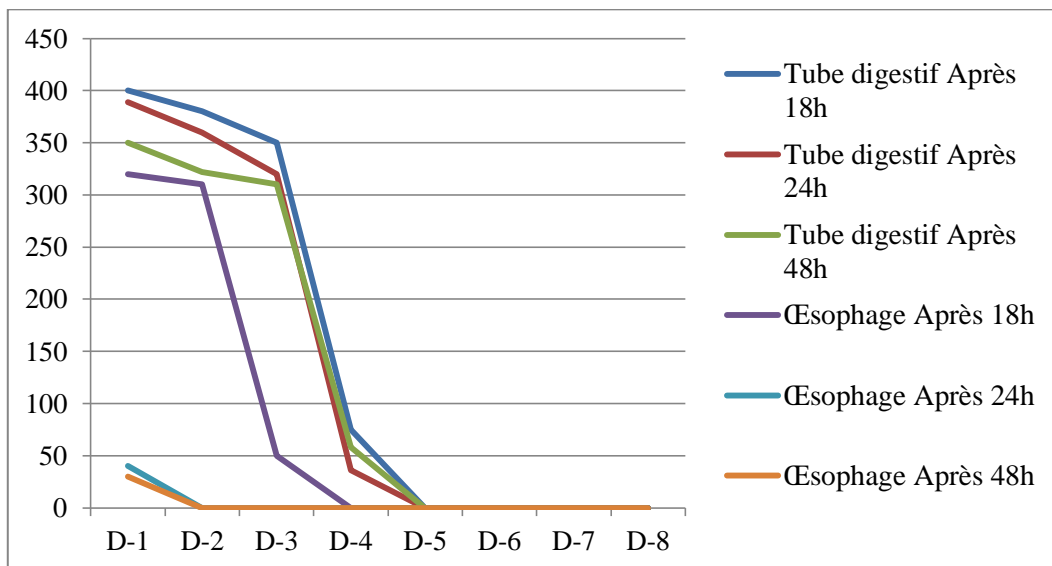


Fig. 84 - Résultats du dénombrement de la souche isolée

4.3.2. - Résultats de l'étude de la sensibilité de la souche bifide autochtone

isolée

La sensibilité de *Bifidobacterium* sp. vis-à-vis les antibiotiques est étudiée contre 13 antibiotiques (Tab.33). Ceci en suivant la méthode de diffusion sur gélose "méthode des disques". L'ensemencement de l'inoculum surface de milieu M.H gélose a pu mettre en évidence de la sensibilité des *Bifidobacterium* pour un groupe d'antibiotiques et une résistance pour un autre groupe (Tab.32).

Tableau n° 32 - Résultats de la sensibilité de bifidobactérie aux antibiotiques

| Disques Antibiotiques | Diamètre (mm) de la zone d'inhibition | Charge du disque | Action |
|--------------------------------|---------------------------------------|------------------|--------|
| Ampicilline | 16,5 | 10 µg | S |
| Pénicilline | 28,5 | 6 µg | S |
| Erythromycine | 16 | 15 µg | S |
| Vancomycine | 0 | 30 µg | R |
| Chloramphenicol | 0 | 30 µg | R |
| Tétracycline | 26 | 30 µg | S |
| anamycine | 0 | 30 µg | R |
| Cefoxitine | 0 | 30 µg | R |
| Cefalexine | 0 | 30 µg | S |
| Ciprofloxacine | 0 | 5 µg | R |
| Oxacilline OX1 | 0 | 1 µg | R |
| Streptomycine | 17 | 10 µg | S |
| Amoxicilline + Clavulanic Acid | 0 | 20 + 10 µg | R |

R : résistante ; **S** : sensible

Les antibiotiques dont les quels les bifidobactries sont sensibles sont l'ampicilline, la pénicilline, l'érythromycine, la tétracycline et la streptomycine avec une différence de diamètre. Pour le reste des antibiotiques les bifidobactéries sont résistantes (Fig.85 ; 86).

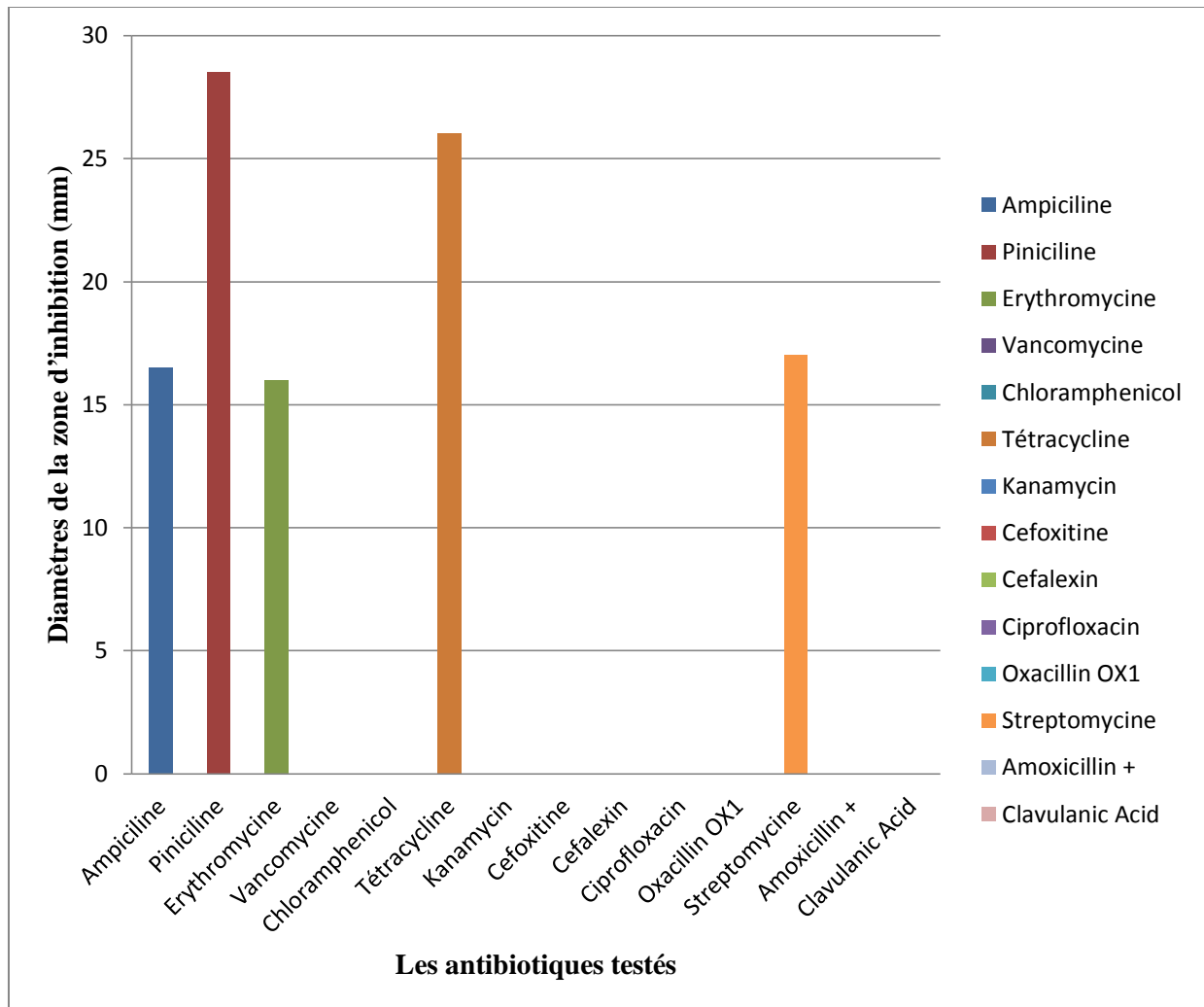


Fig.85 - Diamètres de la zone d'inhibition

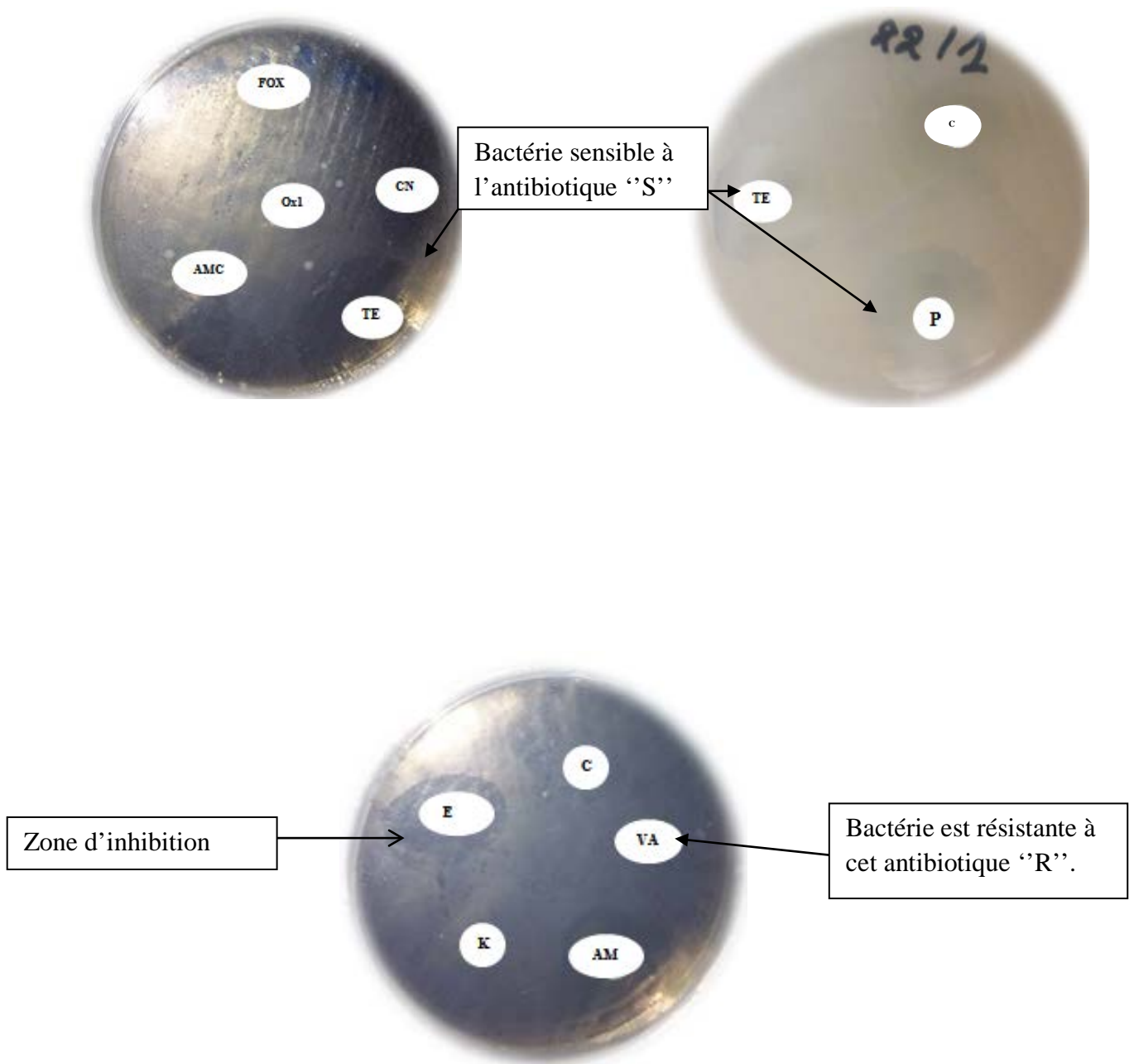


Fig. 86 - Résultat de teste aux antibiotiques

FOX: Cefoxin, **OX1:** Oxacilin, **AMC:** Amoxicilin+clavulanic , **CN:** Cefalexin, **TE:** Tétracycline, **S:** Streptomycine, **E :**Erythromycine, **P :** Piniciline, **C :** Chloramphenicol, **K:** Kanamycin, **AMP :** Ampicilne, **VA :** Vancomycine, **CIP :** Ciprofloxacine.

CHAPITRE V - Discussions

CHAPITRE V - Discussions sur l'effet de la toxicité des bactéries entomopathogène sur l'abeille domestique et l'étude des souches de Bifidobactérie aux antibiotiques

Ce chapitre est réservé aux discussions des résultats obtenus dans le cadre de la présente étude. D'abord se sont les résultats sur l'effet des trois bactéries entomopathogènes sur les glandes cirières et hypopharygiennes qui sont discutés séparément. Ensuite, les résultats de d'utilisation du produit EM-A, comme un biopesticides. Enfin, les résultats de l'étude de la sensibilité de Bifidobacteries aux antibiotiques.

5.1. - Discussions sur l'effet des *Bacillus subtilis* et *B. cereus* et des *Pseudomonas aeruginosa* sur les deux glandes retenues

5.1.1. - Discussions sur l'effet des *Bacillus* et des *Pseudomonas* sur la glande cirière

Dans l'ensemble la physiologie des insectes doit être perturbé sous l'effet des bactéries (DOUAMANDJI –MITICHE et DOUMANDJI, 1977). Ces derniers peuvent agir sur le système respiratoire, le système endocrinien, le reproducteur, le système digestif ainsi que sur la croissance des insectes (MALONE *et al.*, 2004; BABENDREIER *et al.*, 2005). Parmi les bactéries, l'effet des *Bacillus* et des *Pseudomonas* est étudié sur les Orthoptères (SONG *et al.*, 2005; OULEBSIR-MOHANDKACI, 2012; OULEBSIR-MOHANDKACI et DOUMANDJI-MITICHE 2012, OULEBSIR-MOHAND KACI *et al.*, 2015); sur les Lépidoptères (SIMS, 1995; VANDENBERG et SHIMANUKI 1990; LACOURSIÈRE *et al.*, 2004) et sur les Diptères (PADMANABHAN *et al.*, 2005). Tous ces auteurs s'accordent pour dire que les fonctions physiologiques des insectes sont gênées voire même bloquées après un contact avec les bactéries; par ingestion (BABENDREIER *et al.*, 2005) ou par inhalation (ALETRU, 2012). Dans la présente étude, l'effet des bactéries de genre *Bacillus* sur la quantité de la cire produite est minime. En effet, pour les 3 concentrations retenues pour *B. subtilis* et *B. cereus*, les valeurs de poids de la cire produite est proches des témoins. Ce qui révèle que les bactéries appartenant à ce genre n'ont pas un effet important sur la production de la cire par les abeilles. Ce résultat peut être justifié par l'effet inverse de la cire contre les bactéries car la cire d'abeille brute a montré une activité antibactérienne contre plusieurs souches bactériennes du genre *Bacillus* (GHANEM, 2011; FRATINI *et al.*, 2016). Par contre OULEBSIR - MOHAND KACI *et al.* (2016) ont signalé que l'effet de *Bacillus sphaericus* sur la production de la cire est important. En utilisant deux souches de *Bacillus sphaericus* Bsn. et Bss., ces auteurs ont noté que la quantité de la cire la plus élevée est notée en C1 = 2 x 10⁷ cfu / ml pour Bss. Alors que la quantité la plus élevée en cire est notée aux doses D1 = 2

$\times 10^7$ cfu / ml, et D2 = 10^6 cfu / ml. Dans la présente étude les plus grandes quantités en cire sont produites en C3 égale à 0,35mg pour *B. subtilis* et C2 = 0,35mg pour *B. cereus*. Il est à rappeler que les quantités de la cire produite à ces doses sont très proches à celle produite par les témoins.

Il est important de signaler que la plupart des auteurs (WILSON, 1962; JOHANSEN, 1962 ; HARAGSIM et VANKOVA, 1968; JOUNG et COTE, 2008) sont d'accord pour admettre que les préparations à base de *Bacillus* ne sont toxiques pour l'abeille qu'à des doses élevées. KRIEG et HERFES (1963) indiquent que les doses supérieures à 3×160 spores par jour et par abeille occasionnent une mortalité de 100 %. Cependant, HARAGSIM et VANKOVA (1968), signalent que *Bacillus thuringiensis* exerce un effet toxique très important sur les abeilles butineuses. Ainsi, ELSKOVA et UKLIKOV (1963) en procédant au nourrissage ininterrompu des abeilles avec un sirop contenant 1 gr.de spores/ Cm^3 , pendant neuf jours, ont pu mettre en évidence un effet toxique marqué sur les abeilles. De même, MALONE *et al.* (1999) affirment que les abeilles traitées par un biopesticide formulé à base de 1 % de *Bt.* subissent une mortalité qui peut dépasser 80% en 70 jours de traitement. Il est important de noter que les auteurs précédemment cités n'ont pas mis en évidence l'action des *Bacillus* sur l'activité des glandes notamment la glande cirière.

Pour ce qui est des *Pseudomonas*, la concentration qui a affecté le plus l'activité de la glande cirière est de celle de (0,22 mg/ml). A cette dose, le poids de la glande cirière est de P = 0,004g. Cette bactérie à gram négatif est connue par son action sur la physiologie des insectes. Elles peuvent détruire les tissus conjonctifs des abeilles induisant une perturbation des fonctions cellulaires notamment celles des glandes (SHIMANUKI et KNOX, 2000). Il est connu que l'utilisation comme traitement des bactéries du genre *Pseudomonas* n'est pas possible car elles sont responsables des maladies bactériennes ulcéraives causant une mortalité soudaine chez les différents groupes d'insectes. THOMOSON *et al.* (1992), ont signalé une baisse de l'effectif de colonies d'abeilles après un chargement d'un inoculum contenant un mélange de *Pseudomonas fluorescens* et *Erwinia herbicola*. En utilisant *P. aeruginosa*, PADOPOULOU KARABELA *et al.*, (1992) ont assisté à une septicémie associée à une diminution du pourcentage des plasmocytes suivie par une mortalité de 76,4 % après 100 h d'infection.

5.1.2. - Discussions sur l'effet des *Bacillus* et des *Pseudomonas* sur la glande hypopharyngienne

Pour ce qui est de l'effet des deux bactéries entomopathogènes contre la glande hypopharyngienne, celui-ci est étudié sur le volume des G.H.P. obtenu par les mesures des diamètres des acini d'une part et sur la quantité des protéines d'autres part. Les résultats de la présente étude, montrent que le volume le plus faible est enregistré pour la $C_1 = 0,72$ mg/ml de *B. subtilis* correspondant à 1,21 mg de protéines. A cette dose, les plus faibles dimensions des acini sont notés soit $85,75 \pm 2,22 \mu\text{m}$ pour la longueur et $63,21 \pm 2,07 \mu\text{m}$ pour la largeur. Pour *B. cereus*, la plus grande action contre les diamètres des acini et la quantité des protéines produite est notée à la concentration C_2 (0,35 mg/ml). Cette concentration a donné les plus faibles valeurs de poids de protéines 1,20mg et de volumes des acini $85,06 \pm 2,42 \mu\text{m} \times 64,17 \pm 2,05 \mu\text{m}$. MALONE *et al.* (2004) signalent que le diamètre des acini de la glande hypopharyngienne diminue de plus en plus en alimentant les abeilles nouvellement émergée par le *Bacillus thuringiensis*. Pour ces auteurs, le diamètre le plus faible est de 130 μm noté à partir du 10^{ème} jour à la dose à la dose $6,25 \times 10^{-4}$ mg/ml. Une très faible dose par rapport à celle notée dans le présent travail. Cependant, d'autres auteurs comme SIMS (1995) et ARPAIA (1996) signalent que le pollen contaminé par les toxines Bt. est loin d'influencer le développement des glandes hypopharyngiennes. En ce qui concerne la quantité des protéines, la corrélation significative entre le dosage des protéines et le volume de G.H.P. traduit par le diamètre des acini n'est pas à démontrer (STANDIFER *et al.* 1970; PERNAL et CURRIE, 2000). Les toxines sécrétées par les bacilles sont accumulés dans les tissus ce qui peut être à l'origine du blocage de la synthèse des protéines par les G.H.P. (RAMIREZ-ROMERO *et al.*, 2008).

Pour ce qui est des *Pseudomonas aeruginosa*, leur effet est remarquable sur le volume des G.H.P. que pour la quantité des protéines qu'elles produisent. En effet, après le traitement des abeilles par le *Pseudomonas aeruginosa* le diamètre des acini a diminué jusqu'à de 99,45 μm 84,00 μm de longueur et 77 μm à 60 μm de largeur à la dose $C_3 = 0,22$ mg/ml d'une part et la quantité des protéines a chuté de 1,42 mg à 1,19 mg avec la même dose. La chute du taux des protéines par les *Pseudomonas* est aussi noté chez d'autres groupes d'insectes notamment les *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae) (OULEBSIR-MOHANDKACI et DOUMANDJI - MITICHE 2012). Il est connu que les *Pseudomonas* sont des pathogènes opportunistes virulents possédant une grande capacité d'adaptation à un environnement hostile ce qui leur permettent d'infecter plusieurs groupes d'hôtes tels que les insectes (PENNACINO-SAUVAGE

et HULEN, 1990;BRICHA *et al.*, 2009). Ils ciblent les récepteurs membranaires provoquant l'inhibition de la synthèse protéines (CAVALLO *et al.*, 2000). Ainsi, l'exotoxine A, composé protéique le plus toxique produit par *P. aeruginosa*, inhibe la synthèse protéique des cellules cibles provoquant leur mort (WICK *et al.*, 1990). Chez les insectes cette action est sans doute accompagnée par une diminution des calibres des acini et de volume des G.P.H. Pour comprendre l'action de ces Bacilles sur la glande hypopharyngienne. PAIN et MAUGENET (1966) suggèrent que ces bactéries prolifèreraient dans le tube digestif de l'abeille et s'accumulent dans les différentes glandes notamment l'hypopharyngiennes ce qui leur infecte en provoquant le blocage de leur activités physiologiques.

5.2.- Discussion des résultats de l'utilisation d'un biopesticide E.M-Activé

Le traitement avec EMA des abeilles fragiles contre les différentes bactéries entomopathogènes utilisées donné des résultats positifs pour tous les paramètres étudiés. En effet, après l'utilisation des EMA nous avons assisté à une augmentation de la quantité de la cire produite, et un accroissement du volume des glandes hypopharyngienne accompagné avec le renforcement de la quantité des protéines élaborée. Ce résultat est noté pour les 3 bactéries utilisées pour le traitement. Cette action positive des EMA peut être expliquée par le fait que ce produit est composé par environ 80 espèces de microorganismes divisés en bactéries photosynthétiques, bactéries lactiques, levures, actinomycètes et champignons fermentés (HIGA, 2009). La plupart de ces microorganismes sont présentent dans l'intestin et participent aux différentes activités des abeilles (LAVI, 1960, AOSAN, 2015). L'ajout des EMA a donc favorisé ces activités importantes par *Apis mellifera*, soit la production de la cire et des protéines. Par contre, en utilisant les microorganismes efficaces - activés contre les abeilles, LUO *et al.* (2009) n'ont pas observé des changements par rapport aux diamètres des acini de la glande hypopharyngienne. Ces auteurs n'ont pas étudié l'effet des EMA contre la glande cilière.

5.3. - Discussions sur sensibilité de *Bifidobacterium* aux antibiotiques

Les tests d'identification de bifidobactéries isolés à partir des abeilles ont révélé que l'espèce qui existe est du genre *Bifidobacterium*. La présence des *Bifidobacterium* dans les tubes digestifs des abeilles est aussi montré par d'autres auteurs comme RADA *et al.* (1997). BOUTRY (1989) ajoute que la souche isolée des abeilles est B. de B. *Bifidum* souche AA2/2. Dans le présent travail nous n'avons pas pu identifier l'espèce de *Bifidobacterium* isolée. Pour

ce qui est du dénombrement, la plus élevée de *Bifidobacterium* se trouve dans les tubes digestifs 75×10^4 UFC /ml. La valeur la plus faible est notée dans les œsophages de 4×10^2 UFC /ml. Ceci peut mettre l'hypothèse que les *Bifidobacterium* s'installent dans les tubes digestifs. TISSIER (1990) a aussi mentionné la forte concentration des *Bifidobacterium* dans les tubes digestifs. RADA et PETER (2002) avaient compté 9,55 UFC / ml au niveau du rectum des abeilles.

Pour ce qui est des tests de sensibilité des *Bifidobacterium* sp. contre les antibiotiques nous avons noté une sensibilité vis-à-vis l'ampicilline, la pénicilline, l'érythromycine, la tétracycline et la streptomycine avec une différences de diamètre. Par contre, ils sont résistants à la vancomycine, la kanamycine, la cefoxitine, la cefalexine, la ciprofloxacine, l'oxacilline OX1 et l'amoxicilline + clavulanic Acid d'autre part. KOUAME –SINA (2013) et ZEIN *et al.*, (2008) a aussi signalé la sensibilité des *bifidobactirium* à l'ampicilline, la pénicilline d'une part et la résistante de cette souche aux aminosides tels que la néomycine, la kanamycine, la gentamycine et la streptomycine. Selon ZERROYKI (2011), les *bifidobactirium* sont résistants à l'ampicilline, la pénicilline, l'érythromycine, la chlorophénicole et la tétracycline et sensibles aux kanamycine, vancomycine, néomycine et strptomycine. La résistance contre les antibiotiques doit être exploiter afin d'améliorer la sélectivité des milieux de culture KOUAME –SINA (2013) ; un objectif difficile à réaliser à cause de la grande variabilité des espèces (CHARTERIS *et al.*, 1998).

Conclusion

Conclusion

L'effet des bactéries entomopathogènes sur l'état sanitaire des abeilles est réalisé en utilisant 3 souches de bactéries émanant de différentes localités soit *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27883. L'objectif de cette étude est de tester l'effet de ces 3 souches pathogènes sur la physiologie de l'abeille domestique aux conditions contrôlées, et plus spécifiquement sur l'activité des deux glandes de l'abeille ; la glande cirière et la glande hypopharyngienne. Pour réaliser cet objectif, nous avons choisi des ruches stables où l'apiculteur n'a pas utilisé auparavant la transhumance et ceci afin de diminuer le risque de contamination par les parasites et les maladies d'abeilles.

Les résultats obtenus montrent que l'effet des bactéries varie selon la souche et la concentration utilisée. En effet, des résultats de l'action de ces bactéries sur la glande cirière ont montré que l'influence des *Pseudomonas aeruginosa* et des *Bacillus cereus* sur la quantité de la cire produite est très poussée surtout en concentration C3 (0,22 mg/ml) et C1 (0,4 mg/ml) respectivement. La bactérie *Bacillus subtilis* n'a pas montré un effet remarquable sur l'activité de la glande cirière. Cet effet est aussi noté pour le nombre des lames cirières, ce nombre est réduit de 5 à 4 lames pour la concentration C3 (0,22 mg/ml) de *Pseudomonas aeruginosa* et à 2,5 lames pour la dose C1 (0,4 mg/ml) de la bactérie *Bacillus cereus*. Donc, on peut déduire que l'impact de *Bacillus cereus* sur la production de la cire est plus important que celui de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour la glande hypopharyngienne, c'est la dose C3 (0,22 mg/ml) de *Pseudomonas aeruginosa* qui a provoqué le plus grand effet sur la quantité des protéines produites. A cette doses, la quantité élaborée des protéines est la plus faible soit 1,19 mg de protéine. Ce même effet est noté pour la concentration C2 (0,35mg /ml) de *Bacillus cereus*, le poids des protéines produit à cette dose est de 1,20 mg. C'est la valeur la plus faible par rapport à celle des témoins et des autres concentrations. Ces mêmes concentrations ont affecté le plus les diamètres des acini. Il est important de signaler que ces mêmes doses ont affecté le plus le diamètre des acini. En effet, ce diamètre a diminué de $99,45 \pm 2,36 \times 77,34 \pm 2,01 \mu\text{m}$ pour le témoin jusqu'à $84,00 \pm 2,07 \times 60,75 + 1,95$ à la concentration C3 (0,22 mg/ml) de *Pseudomonas aeruginosa* et de $98,79 \pm 3,13 \times 76,64 \pm 2,16 \mu\text{m}$ pour le témoin jusqu'à $94,95 \pm 2,43 \times 67,08 \pm 2,08$ à la dose C2 (0,35 mg/ml) de *Bacillus cereus*.

Ces résultats montrent la relation cohérente entre l'état de développement de la glande hypopharyngienne entre le diamètre des acini et la quantité des protéines émise par les abeilles. Ceci donne d'avantage une image réelle de l'activité des abeilles examinées.

Ces résultats sont renforcés encore par l'utilisation du test d'Anova et de distance multiple de Duncan (D.M.R.T.). La comparaison des moyennes des quantités des cires et des protéines avec les probabilités enregistrés a donné des différences très hautement significatives pour tous les paramètres étudiés.

Ces résultats montrent l'effet très pathogène des souches des bactéries sur la population d'abeille testée. Cette pathogénie aigüe nous a imposé de penser à une solution de lutter contre ces bactéries. C'est le deuxième objectif fixé dans la présente étude. Nous avons choisi un nouveau produit biologique introduit pour la première fois sur le marché algérien, les Micro-organismes Efficaces. Il est à signaler que cette nouvelle technologie possède plusieurs gammes, parmi lesquelles nous avons testé le EM-Activé préparé à partir de de EM-1.

L'utilisation de ce produit organique comme une lutte biologique contre les abeilles touchées par les bactéries entomopathogènes a donné des résultats très positifs que ce soit sur la quantité de la cire produite que sur la quantité des protéines. Pour la quantité de la cire, les valeurs notées varient de 0,0087 g à 0,0091 g pour *Bacillus subtilis*, de 0,0038g à 0,0174 g pour *Bacillus cereus* et de 0,0040 g à 0,0143g pour *Pseudomonas aeruginosa*. Concernant, la quantité des protéines, les résultats obtenus montrent une augmentation des valeurs de 1,21mg à 1,57 mg pour *Bacillus subtilis*, de 1,21mg à 1,53mg pour *Bacillus cereus* et de 1,19 mg à 1,46 mg pour *Pseudomonas aeruginosa*. Il est très important de favoriser d'avantage l'utilisation de ce produit par les apiculteurs pour lutter contre les maladies bactériennes. Ces apiculteurs peuvent appliquer ce produit dans les ruches surtout en période d'hivernage pour avoir des spécimens résistants à ce genre de maladies et par la suite des produits de ruches sains.

En perspectives

Ces résultats sont initiaux à d'autres horizons de recherches dans un autre cadre, pour une continuation à ce travail il serait intéressant de :

- Elargir cette étude sur plusieurs autres types des glandes de l'abeille domestique ; notamment les glandes mandibulaires, et la glande à venin ;
- Etudier l'effet d'autres bactéries pathogènes ayant montré un effet pathogène sur les insectes comme *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus sphaericus*;
- Identifier le génotype de la souche isolée de bifidobactérie;
- Développer l'utilisation de la technologie E.M. sur les produits de la ruche et examiner d'autre type de maladies pathogènes aux conditions contrôlées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1 - ADJLANE N. et HADDAD N., 2015 - Les virus infectants l'abeille mellifère; pathogénies, symptômes et impacts sur la colonie d'abeille. *Revue agriculture*, 10: 4 – 10.
- 2 - ADJLANE N., HADDAD N., et DOUMANDJIS., 2012 - Situation de l'Apiculture en Algérie : facteurs menaçant la survie des colonies d'Abeilles locales *Apis mellifera intermissa*. *Cahiers d'Agricultures*, 21 (4) :235 -241.
- 3 - ADJLANE N., HADDAD N., et DOUMANDJIS., 2015 - Détection du virus des ailes déformées dans les colonies d'abeilles locales *Apis mellifera intermissa* en Algérie. *Lebanese Science Journal*, 16 (1) : 57- 68.
- 4 - ALETRU F., 2012 - *Evaluation des effets éventuels de la préparation larvicide issue du Bacillus thuringiensis israelensis sur l'abeille domestique Apis mellifera*. Ed. C.V.R.S.A., Vendée. 36p.
- 5 - ALIOUANE Y., EL HASSANI A.K., GARY V., ARMENGAUD C., LAMBIN M. et GAUTHIER M., 2009 - Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 113-122.
- 6 - ALIZEE A., 2014 - *Synthèse des connaissances sur l'apiculture réunionnaise et enjeux pour la filière*. Thèse Doc. Univ. Toulouse. France.148p.
- 7 - AMBROSE J.T., STANGHELLINI M.S. and HOPKINS D.I., 2000 - A scientific note on the threat of small hive beetles (*Aethina tumida* Murray) to bumble bee (*Bombus* spp.) colonies in the United States. *Apidologie* , 31 :455 - 456.
- 8 - A.N.S.E.S. - 2016 - *Recherche et quantification du virus de la paralysie chronique (CBPV) par RT-PCR en temps réel. Méthode d'analyse en santé animale*. Ed. A.N.S.E.S.Nice, 20 p.
- 9 - ANTUNEZ K., DASSANDRO B., PICCINI C., CORBELLA E. and ZUNINO P., 2004 - *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J. Invertebr. Pathol.*, 86: 56 - 58.
- 10 - AOSAN C., 2015 - *Pain d'abeilles naturel*. *Apithérapie*, 3:25-29.
- 11 - ARONSTEIN K.A. and MOURRAY K.D., 2010 - Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 103:20 - 29.
- 12 - ARONSTEIN K.A. and HOLLOWAY B., 2013 - Honey bee fungal pathogen, *Ascosphaera apis*; current understanding of host-pathogen interactions and host mechanisms of resistance. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. *Microbial Pathogenesis*, (13)1:402-410.

- 13 - ARPAIA S., 1996** - Ecological impact of Bt-transgenic plants: Assessing possible effects of CryIIIB toxin on honey bee colonies. *Journal of Genetics and Breeding*, 50(4): 315-319.
- 14 - ATKINS E. and KELLUM D., 1986** - Comparative morphogenetic and toxicity studies on the effects of pesticides on honeybee brood. *Journal of Apicultural Research*, 25(4): 242 - 255.
- 15 - AUFAURE J., BIRON D.G., VIDAU C., FONTBONNE R., ROUDEL M., DIOGON M., VIGUE'S B., BELZUNCES P.L., DELBAC F, and BLOT N., 2012** - Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee.
- 16 - AUPINEL P., FORTINI D., DECOURTYE A. et DEVILLERS, J., 2005** -Effets des insecticides sur le développement des glandes hypopharyngiennes chez l'abeille domestique adulte après une exposition au stade larvaire. 4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie, du 07 au 09 Novembre 2011, Château des Ravatys à Saint Lager , France.1- 4 p.
- 17 - BABENDREIER D., KALBERER N.M., ROMEIS J.,FLURI P., MULLIGAN E. and BIGLER F., 2005** - Influence of *Bt-transgenic* pollen, *Bt*-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie*, 36 (4): 585 - 594.
- 18 - BAILEY L. et WOODS R. D., 1977** - Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J. Gen. Virol.* (37): 175 - 182.
- 19 - BAKONYI T., FARKAS R., SZENDROI A., DOBOS-KOVACS M. and RUSVAI M., 2002** - Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* Weld samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie* (33): 63-74.
- 20 - BALLIS A., 2012** - *Maladies des abeilles*. Ed. Chambre d'Agriculture Régionale, d'Alsace, 14 p.
- 21 - BALLIS A., 2013** - Flash' Abeille. *Bulletin technique de la Chambre d'Agriculture de région Alsace*, 18 :1-8
- 22 - BAMFORD S., 1987** - *Studies on the infection of honey bee larvae with Ascosphaera apis*. Thèse Doc. Univ. Plymouth. United Kingdom.188 p.
- 23 - BEAUVAIS C., 2013** - Facteurs de risques d'apparition des maladies des abeilles. *Journées nationales GTV, Nantes*. Du 15 au 17 mai, 789 - 804.

- 24 - BECHER M.A., HILDENBRANDT H., HEMELRIJK C.K. and MORITZ, R.F.A.,** 2010 - Brood temperature, task division and colony survival in honeybees: a model. *Ecol. Model.*, 221:769 -776.
- 25 - BEHRENS D., FORSGREN A., FRIES I., and MORITZ R. F. A., 2007** - Infection of drone larvae (*Apis mellifera*) with American foulbrood. *Apidologie*, 38: 281-288.
- 26 - BELAÏD M. et DOUMANDJI S., 2010** - Effet du *varroa destructor* sur la morphométrie alaire et sur les composants du système immunitaire de l'abeille ouvrière *Apis mellifera intermissa*. *Lebanese Science Journal*, 11(1): 84 - 90.
- 27 - BENDJEDID H. et ACHOU M., 2014** - Etude de la diversité morphométrique de deux populations d'abeilles domestiques (*Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*) du sud Algérien. *Rev. Sci. Technol., Synthèse* 28 : 84 - 95
- 28 - BERENYI O., BAKONYI T., DERAKHSHIFAR I., KOGLBERGER H. and NOWOTNY N., 2006** - Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 2414 - 2420.
- 29 - BERTHOUD H., IMDORFA., CHARRIERE J.D., HAUETER M. et FLURI P.,** 2005- Les virus des abeilles. *Rev. Suisse des abeilles*, 126(8) :12-16
- 30 - BIRI M., 2002** - *Le grand livre des abeilles : Cours l'apiculture moderne*. Ed. De Vecchi, Paris, 228 p.
- 31 - BIRI M., 2011-** *Tout savoir sur abeille et l'apiculture*. Ed. De Vecchi, Paris, 302 p.
- 32 - BOGDANOV S., GALLMANN P., STANGACIU S., et CHERBULIEZ T., 2006** - *Produits apicoles et santé*. Ed. Centre de recherches apicoles, Suisse, 51p.
- 33 - BONMATIN J-M., GIORIO C., GIROLAMI V., GoulSon D., KREUTZWEISER D.P., 2014** - Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*: 1-33.
- 34 - BOUTRAY E., 1989** - *Exoglycosidases de Bifidobacterium bifidum, souche AA 2/2*. Thèse Doc. Univ. Lille Flandres Artois.136 p.
- 35 - BRICHA S., OUNINE K., OULKHEIR S., EL HALOUI N.E et ATTARASSIB., 2009** - Facteurs de virulence et épidémiologie lies au *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*, 2 : 7 - 14.
- 36 - BRUNEAU E., 2012** - *Des produits contaminés, un nouveau défi pour demain*. *Abeilles et C^{ie}*, 148 (3) : 1 - 4.
- 37 - BUDGE G.E., BARRETT B., JONES B., PIETRAVALLE S., MARRIS G., CHANTAWANNAKUL P., THWAITES R., HALL J., CUTHBERTSON A.G.S. and BROWN M.A., 2010** - The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies

of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. (105) 02 : 164 - 170.

38 - CAMBY Y., 2011 - Inquiétude pour les abeilles. *Revue trimestrielle de la Société royale Cercles des Naturalistes Belgique*.3 :17-26 p.

39 - CARLETTO J., GAUTHIER A., REGNAULT J., BLANCHARD P., SCHURR F., CHABERT M. B et ANSES S.A., 2010 - Détection des principaux agents pathogènes de l'abeille domestique par PCR Multiplex. *Anses* : 13-15.

40 - CAVALLO J.D., 2000 - *Pseudomonas aeruginosa et antibiotiques*. Ed. H.I.A., Saint-Mandé, 31p.

41 - CHAHBAR N., BELZUNCES P., et DOUMANDJI S., 2011 - Effet d'un insecticide utilisé en protection des végétaux : Thiamethoxam sur l'abeille saharienne *Apis mellifera sahariensis*. *Algerian journal of arid environment*. 1 (2): 11-21.

42 - CHARPENTIER G., VIDAU C., FERDY J.B., TABART J., VETILLARD A., 2013 - Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared in vitro. *Pest Management Science*, (70) 1:140-147.

43 - CHARRIERE J.D., DIETEMANN V., SCHÄFER M., DAINAT B., NEUMANN P., GALLMANN P., 2012 - *Guide de la santé de l'abeille* Ed. A. L.P., Berne, 35 p.

44 - CHARRIERE J.D., DIETEMANN V., SCHÄFER M., DAINAT B., NEUMANN P., et GALLMANN P., 2012 - *Guide de la sante de l'abeille*. Ed. A. L.P., Berne, 31p.

45 - CHAUZAT M.P and MARTIN S., 2009 - A foreigner in France: the Asian hornet, *Biologist*, 56 (2):86-91.

46 - CHAUZAT M.P., 2011- Tribune contradictoire. L'épidémiologie des maladies de l'abeille. *Revue semestrielle de droit Animalier – RSDA*, 2: 179-188.

47 - CHARTERIS W.P., KELLY P.M., MORELLI L. and COLLINS J.K., 1998 - Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food. Prot.* 61: 1636 -1643.

48 - CHAUVIN R., 1960 - Progrès récents dans la biologie de l'abeille. *Annales de l'Abeille, INRA*.3 (1) : 5-39.

49 - CHAUVIN R., 1968 - *Les produits de la ruche Traité de Biologie de l'Abeille*. T. (3). Ed. MASSON et C^{ie}. Paris. 391p.

50 - CHEN Y.P., PETTIS J.S., EVANS, J.D., KRAMER, M. and FELDLAUFER, M.F., 2004 -Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *V. destructor*. *Apidologie*, 35: 441 - 448.

51 - CHEN Y.P. et SIEDE R., 2007 - Honey bee viruses. *Adv.Virus.Res.*, 70 :33-80.

- 52 - CHINERY M., 1998 - *Insectes de France et d'Europe occidentale*. Ed. Arthaud, Paris. 307p.
- 53 - CHIRON J. et HATTENBERGERA. M., 2008 - *Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles*. Ed. Afssa.154 p.
- 54 - CHRISTENSEN M., et GILLIAM M., 1983 - Notes on the *Ascospaera* species inciting chalkbrood in honey bees. *Apidologie*, 14 (4):291-297.
- 55 - CLEMENT H., 2003 - *Le Traité Rustica de l'Apiculture*. Ed Rustica. Gragny. 528p.
- 56 - COFFEY M.F., 2007 - *Parasites of the honeybee*. Ed. Crops Research Centre, Oak Park, Carlow.77p.
- 57 - COLIN M.E., 1982 - Lavarroase. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz*,1(4) :1177-1189.
- 58 - COLIN M.E., DUCOS J., DE LAHITTE J.D., LARRIBAU E., BOUE T., 1989 - Activité des huiles essentielles de Labiées sur *Ascospaera apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie*, 20 (3) :221-228.
- 59 - COLIN M.E., BONMATIN J.M., MOINEAU L., GAIMOC C., BRUN. and VERMANDERE J.P., 2004 - A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47:387-395.
- 60 - COMO F., CARNESECCHI E., VOLANI S., VOLANI J.L., RICHARDSON J., BASSAN A., PAVAN M. and BENFENATI E., 2016 - Predicting acute contact toxicity of pesticides in honeybees (*Apis mellifera*) through a k-nearest neighbor model. *Chemo.* 166:438 - 444
- 61 - CONTE P.Y. et FAUCON J.P., 2002 - Les maladies de l'abeille domestique. *Le Courrier de la Nature*, 196 : 28 - 32.
- 62 - CORNMAN R. S., BENNETT A. K., MURRAY K. D., EVANS J. D., ELSIK C.G., ARONSTEIN K., 2012 - Transcriptome analysis of the honey bee fungal pathogen, *Ascospaera apis*: implications for host pathogenesis. *BMC Genomics*, 13 (285):1-13.
- 63 - COUTO A., MONCEAU K., BONNARD O., THIERY D. and SANDOZ J. C., 2014 - Olfactory Attraction of the Hornet *Vespa velutina* to Honeybee Colony Odors and Pheromones. *Plos One*, (9):12. 1-19.
- 64 - COX -FOSTER D.L., CONLAN S., HOLMES E. C., PALACIOSG., EVANS G. D., MORAN N.A., QUAN P.L., BRIESE T., HORNIG M., GEISER D.M., MARTINSON V., ENGELSDORP D.V., KALKSTEIN A.L., DRYSDALE A., HUI J., ZHAI J., CUI L., HUTCHISON S. K., SIMONS J.F.,EGHOLM M., PETTIS J. S. and LIPKIN W. I., 2007

- A metagenomics survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science express*, 318 (5848): 283-284.

65 - CRAILSHEIM K. and STOLBERG E., 1989 - Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hyopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 35(8): 595-602

66 - CRUZ-LANDIM C., 2009 - *Abelhas: morfologia e função de sistemas.*: Ed. UNESP, São Paulo, 416p.

67 - DA SILVA CRUZ A., DA SILVA-ZACARIN E.M.C., BUENO O.C. and MALASPINA O., 2010 - Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: morphological alterations in the midgut of *A. mellifera*. *Cell Biology and Toxicology*, 26 : 165-76.

68 - DAHLE B., WILKINS S. et CHARRIÈRE J. D., 2014 - European foulbrood (EFB) and American foulbrood (AFB) - Distribution, status and control and management strategies throughout Europe. *Conference: EURBEE, 9 au 11 September, Murcia, Spain* : 1-25.

69 - DAINAT B., IMDORF A., CHARRIERE J.D., et NEUMANN P., 2008 -Virus des abeilles : revue des connaissances actuelles. *Revue Suisse d'Apiculture*, 1(2):1 - 13.

70 - DAINAT B., EVANS J. D., CHEN Y. P., GAUTHIER L. and NEUMANN P., 2012 - Dead or Alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.*, (78) : 981-987.

71 - DARCHEN B., 2012 - Les problèmes posés pour la régulation du Frelon asiatique – *Vespa velutina* – expériences de terrain. *Journée Scientifique Apicole.07 juin, Nantes.*88-92p.

72 - DAWSON H.E., CHITTKA L. and LEADBEATER E., 2016 - Alarm substances induce associative social learning in honeybees, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour* ,122 :17-22.

73 - DE GRAAF D., VANDEKERCHOVE D., DOBBELAERE W., PEETERS J. and JACOBS F., 2001 - Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie*, 32 (6):587-599.

74 - DECHAUME-MONCHARMONT F.X., 2003 - *Butinage collectif chez l'abeille Apis mellifera* L.: étude théorique et expérimentale. Thèse Doc., Univ. Paris VI, 308p.

75 - DEGRANDI-HOFFMAN, G., CHEN, Y.P., HUANG, E., HUANG, M.H. 2010 -The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 56:1184 -1191.

76 - DEPAUW M.C., 2005 - *Le petit coléoptère des ruches.* Ed. Abeilles & C^{ie}, 26p.

- 77 - DEROOTH L., D'ALLAIRE S. et D'ALLAIRE, 1980** - La respiration et la circulation chez l'abeille. *L'abeille*, 1-2.
- 78 - DESEYN J. and BILLEN J., 2005** - Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers Hymenoptera, Apidae. *Apidologie* ,36: 49 -5.
- 79 - DI PASQUALE G., SALIGNON M., LE CONTE Y., BELZUNCES L., P., DECOURTYE A., KRETZSCHMAR A. SUCHAIL S., BRUNET J.L. and ALAUX C., 2013** - Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: DoPollen Quality and Diversity Matter?, *Plos One*, 8: 1-13.
- 80 - DI PRISCO G., PENNACCHIO F., CAPRIO E., BONCRISTIANI H.F. J.R., EVANS JD, CHENY. 2011** - *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in thehoneybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.*, 92, 151-155.
- 81 - NABTI D. ACHOU M. and SOLTANI N., 2014** - Evaluating the Effects of Pesticides Used in East-Algerian Orchards on *Apis mellifera intermissa*: Enzymatic Activity of Acetylcholinesterase. *Academic Journal of Entomology*,7 (4): 128-133, 2014.
- 82 - DOUBLET V., PAXTONA R.J., MCDONNELL M., DUBOIS E., NIDELET S., MORITZ R.F.A., ALAUX C. and LE CONTE Y., 2016** - Brain transcriptomes of honey bees (*Apis mellifera*) experimentally infected by two pathogens: Black queen cell virus and *Nosema ceranae*. *Genomics Data*, 10:79 - 82.
- 83 - DOUMANDJI-MITICHE B. et DOUMANDJI. S., 1977** -*La lutte biologique contre les déprédateurs des cultures collection cours d'agronomie*. Ed. Office de publication universitaires O.P.U., Alger ,99 p.
- 84 - DROZ B., et CHARRIERE J.D., 2015** - Résidus d'acide formique dans le miel suite au traitement des hausses contre la fausse teigne. *Revue suisse d'apiculture*, 4 :19-23.
- 85 - DURAITE A., WEISSING A., PEN I., and KELLER L., 2011-** An Evolutionary Perspective on Self- Organized Division of Labor in Social Insects. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 42:91-110.
- 86 - DUSSABAT -ARRIGADA C., 2012** - Effets de *Nosema ceranae* (Microsporidia) sur la santé de l'abeille domestique *Apis mellifera* L. Thèse, Doc. Univ. Avignon, 177p.
- 87 - EISCHEN F. A., CARDOSO-TAMEZ D., DIETZ A., and WARE G.O., 1989** - Cymiazole, a systemic acaricide that controls *Acarapis woodi* (Rennie) infesting honey bees II. An apiary test. *Apidologie*, 20 (1) :41-51.

- 88 - ELLIS J.D., EVANS J.D. and PETTIS J., 2010** - Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *J. Apic. Res.*, 49: 134 - 136.
- 89 - ELESKOVA A. V. et KULIKOV N. S., 1963** - L'influence d'entobacterin et thuricide sur les abeilles (orig. russe). *Pchelovodstvo*, 40 (3):32-33.
- 90 - ELZEN P. J., BAXTER J. R., WESTERVELT D., RANDALL C., DELAPLANEK. S., CUTTS L and WILSON W. T., 1999** - Field control and biology studies of a new pest species, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera, Nitidulidae), attacking European honey bees in the Western Hemisphere. *Apidologie*, 30(5): 361-366.
- 91 - EON N., 2011** - *De la fleur à l'abeille, de l'abeille au miel du miel à l'homme : Miel et autres produits de la ruche*. Thèse Doc. Univ. Nantes, 189 p.
- 92 - EREMEEVA N.I. and SUSHCHEV, D.V., 2005** - Structural changes in the fauna of pollinating insects in urban landscapes. *Russian Journal of Ecology*, 36: 259 - 265.
- 93 - EVANS J. D., and SPIVAK M., 2010** - Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: 62 - 72.
- 94 - F.I.B.L., 2010** - *Maitriser la varroase en apiculture biologique. Fiche technique*. Ed. Institut de recherche de l'agriculture biologique, F.I.B.L.Suisse, 4p.
- 95 - F.A.O., 2006** - *Honey bee diseases and pests: A practical guide*. Rapport de FAO, 8p.
- 96 - FAUCON P. J., et CHAUZAT M.P., 2008** - Varroase et autres maladies des abeilles : causes majeures de mortalité des colonies en France. *Bull. Acad. Vét. France*. 161(3):257-263.
- 97 - FAUCON J.P., VITU C., RUSSO P. et VIGNONI M., 1992** - Diagnostic de la paralysie aiguë : Application à l'épidémiologie des maladies virales de l'abeille en 1990. *Apidologie*. 23 (2) :139-146.
- 98 - FAYT A., 2014** - La gestion de l'essaimage. *Fiche technique* .3 :23-24.
- 99 - FLURI P., 2003** - *Directives de lutte contre les maladies des abeilles*. Ed. Liebefeld, Berne, 38p.
- 100 - FLURI P., HERMANN M., IMDORF A., BUHLMANN G. et CHARRIERE J. D., 1998** - *Santé et maladies des abeilles, connaissances de base*. Rapport du centre suisse de recherche apicole, Liebefeld, Berne, 29 p.
- 101 - FOLEY K., FAZIO G., JENSEN A.B. and HUGHES W.O.H., 2014** - The distribution of *Aspergillus spp.* opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Vet. Microbiol.* 169: 203-210.
- 102 - FORSGREN E., 2010** - European foulbrood in honey bees. *J. Invert. Pathol.*, 103: 5-9.

- 103 - FORSGREN E., BUDGE G. E., CHARRIÈRE J.D and HORNITZKY M. A. Z., 2013** - Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1):1-14.
- 104 - FRATINI F., CILIA G., TURCHI B. and FELICOLI A., 2016** - Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9:839- 43.
- 105 - FRIEDLER L., 1987** - Assessment of chronic toxicity of selected insecticides to honeybee. Assessment of chronic toxicity of selected insecticides to honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 26: 115-122.
- 106 - GARCIA - FERNANDEZ P., 1999** - *Acarapidosi or tracheal acariosi*. In COLIN M. E., BALL B.V., KILANI M., *Bee disease diagnosis*. Ed.CIHEAM Options Méditerranéennes.107-115p.
- 107 - GARNERY L., 2013** - *Rapport, Analyse de la biodiversité du cheptel français de l'abeille domestique. Études d'impacts en vue de la mise en place de conservatoires génétiques*. Ed. C.N.R.S., Versailles. 4p.
- 108 - GATEHOUSE H. S., GATEHOUSE L. N., MALONE L. A., HODGES S., TREGIDGA E. and TODD J., 2004** - Amylase activity in honey bee hypopharyngeal glands reduced by RNA interference. *Journal of Apicultural Research*, 43: 9-13.
- 109 - GENERSCH E., 2010** - American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invert. Pathol.*, 103 : 10 -19.
- 110 - GEOFFREY R. W., 2013** - *Nosema ceranae in western honey bees (Apis mellifera): biology and management*. Thèse doctorat. Univ, Halifax, Nova Scotia.117 p.
- 111 - GHANEM N., 2011** - Study on the antimicrobial activity of honey products and some Saudi Folkloric substances, *Res. J. Biotech*, 6: 38 - 43.
- 112 - GHARBI M., 2011** - *Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles - Composition Propriétés thérapeutiques Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire*. Thèse Doc. Univ.Claude-Bernard - Lyon I, 247 p.
- 113- GHOMARI F.N., KOUACHE B., AROUS A. et CHERCHALI S., 2013** - Effet de traitement par fumigation du thym (*Thymus vulgaris*) sur le *Varroa destructor* agent de la varroase des abeilles. *B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. 10: 34 - 38.
- 114 - GISDER S., MOCKEL N., LINDE A. and GENERSCH E., 2010** - A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology*, (46): 1 -10.

- 115 - GRABENSTEINER E., RITTER W., CARTER M.J., DAVISON S., PECHHACKER H., KOLODZIEJEK J., BOECKING O., DERAKHSHIFAR I., MOOSBECKHOFER R., LICEK E. and NOWOTNY N. 2001** - Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8: 93 - 104.
- 116 - GREGORC A. and ELLIS J.D., 2011** - Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Phys.* 2(99): 200 - 207.
- 117 - GUERZOU M., DOUMANDJI A., GUERZOU A., KOUDJIL M. and DOUMANDJI S., 2015** - Importance and Counting of Some Probiotic Bacteria Isolated from Honey and Honeybees *Apis mellifera* in Algeria. Case of *Bifidobacterium*. *Advances in Environmental Biology*, 9(11): 174 -180.
- 118 - GUIRAUD J.P., 2003** - *Microbiologie alimentaire; Application à l'étude des principaux groupes microbiens*. Ed. Dunod, Paris, 651 p.
- 119 - HARAGSIM O., et VANKOVA J., 1968** - Effet pathogène comparé de 12 souches de *bacillus thuringiensis* berl. sur l'abeille domestique et son couvain. *Les Annales de l'Abeille*, 11 (1) : 31-40.
- 120 - HARDY C., 2012** - *Apis mellifera*, histoire d'une espèce. *Abeilles et C^{ie}*, 146 : 13-14.
- 121 - HEE - KWEON C., YOO M.S., NOH J.H, REDDY K. E., YANG D.K., CHA S.H. and KANG S.W., 2015** - Derivation of cell-adapted Sacbrood virus (SBV) from the native Korean honeybee. *Virus Research*, 198: 15 - 21.
- 122 - HEMMERLE J., 2015** - Le point sur l'ascosphérose Abeille de France. 44^{ème} Congrès international d'apiculture APIMONDIA, 15 au 20 septembre, Séoul, 1-4
- 123 - HUPBUR H.R., 1986** - *Honeybees and Wax An Experimental Natural History*. Ed. Spronger-Verlag, Berlin Heidelberg, 197p.
- 124 - HEPBURN H.R., BERNARD R.T.F., DAVIDSON B.C., MULLER W.J. and LLOYD P., 1991** - Synthesis and secretion of bees wax in honey bees. *Apidologie*, 22: 21-36.
- 125 - HIGA T., 2009** – *E M une révolution pour sauver la planète*. Ed. International books, New Delhi., 288 p.
- 126 - HIGES M., GARCIA-PALENCIA P., MARTIN-HERNANDEZ R. and MEANA A. 2006** - Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosemaceranae* (Microsporidia), *J.Invertebr. Pathol.*, 94(3):211-7.
- 127 - HIGES M., MARTÍN-HERNANDEZ R., GARRIDO-BAILÓN E., GARCIA-PALENCIA P., and MEANA A., 2007** - Detection of infective *Nosemaceranae*

(Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees, *J. Invertebr. Pathol.* 97(1):76-78.

128 - HONGXIA A., XUN Y. and RICHOUE H., 2012 - Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *J. Invertebr. Pathol.*, 109: 160-164.

129 - HOOD W. M., 2004 - The small hive beetle, *Aethina tumida*: a review. *Bee World* 85(3): 51-59.

130 - HUNG A. C. F., and SHIMANUKI, H., 1999 - A scientific note on the partial nucleotide sequence of a U.S. strain of Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 30: 355-356.

131 - HUANG Z. Y. and OTIS G. W., 1989 - Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes sociaux*, 36 (4) : 264 - 276.

132 - HUANG A., PENG C. and SHUMINIKUI H., 2000 - Nucleotide sequence variations in Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* L. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 31 :17-23.

133 - HUANG W.F., JIANG J.H., CHEN Y.W. and WANG C.H., 2007 - A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 38 : 30 - 37.

134 - IMDORF A., RICKILI M. and FLURI P., 1996 - *Dynamique des populations d'abeilles*. Ed. Centre Suisse de Recherche Apicoles, Berne, 48p.

135 - IMDORF A., RUOFF K., et FLURI P., 2010 - Le développement des colonies chez l'abeille mellifère. Ed. A.L.P.Berne, 67p.

136 - IMDORF A., RUOFF K. and FLURI K., 2008 - Volksentwicklung bei der Honigbiene. *A.L.P., Berne*, 87p

137 - JAVON D., FEUGIER P., CHBERT P., CAILLY J., MAURICE L., GABRIEL G., CHORIER P., 2002 - *Les prédateurs de l'abeille*. Groupement de Défense Sanitaire de l'Isère. Ed. Section Apicole. France. 4p.

138 - JIN-LONG Y., RUI Y., KE-FEI S., XIANG-WEI P., TAO et ZUO-HUA L., 2012 - Rapid detection of sacbrood virus (SBV) by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Virology Journal*, 9 (47):1 - 4.

139 - JOHANSEN C. L., 1962 - Impregnated foundation for waxmoth control. *Glean. Bee Cult.* 90: 682-684.

140 - JOUNG K. B., et COTE J. H., 2008 - *Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis**. Ed.C. R.D en horticulture, Saint-Jean-sur-Richelieu, Qc.17p.

- 141 - JOYEUX H. et BOUGUET N., 2014 - *Les Abeilles et le Chirurgien NED.* Ed., Du Rocher., Paris, 130p.**
- 142 - KAIRO G, POQUET Y, HAJI H, TCHAMITCHIAN S., MARIANNE C., BONNET M., PELISSIER M., KRETZSCHMAR A., BELZUNCES L.P., and LUC BRUNET J., 2017 - Assessment of the toxic effect of pesticides on honey bee drone fertility using laboratory and semifield approaches: A case study of fipronil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9999 (9999) : 1-7.**
- 143 - KAJOBER., M.G., BUDGE G., CORDONI G., JONES B., WILKINS S., CUTHBERTSON A. G. C. and BROWN M. A., 2010 - First molecular detection of a viral pathogen in Ugandan honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*,104:153-156.**
- 144 - KANG Y., BLANCO K., DAVIS T., WANG Y. and DE GRANDI-HOFFMAN G., 2016 - Disease dynamics of honeybees with *Varroa destructor* as parasite and virus vector. *Mathematical Biosciences*, 275 :71-92**
- 145 - KHONGPHINITBUNJONG K., DE GUZMAN L.I., RINDERER T.E., TARVER M.R., FRAKE A.M., CHEN Y. and CHANTAWANNAKU P., 2016 - Responses of *Varroa*-resistant honey bees (*Apis mellifera* L.) to Deformed wing virus. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 19:921- 927**
- 146 - KIMOTO T., DUTHIE-HOLT M., et DUMOUCHEL L., 2006 -*Guide des insectes forestiers exotiques.* Ed. A. C., I.A., Canada, 120 p.**
- 147 - KIUPEL M., 2013 -*International Degree Course Industrial and Environmental Biology B.Sc., Hochschule.* Rapport. Biological Internship at Station Linné Öland, Sweden.51p.**
- 148 - KLUSER S., NEUMANN P., CHAUZAT M.P. and PETTIS S., 2010 - *Global Honey Bee Colony Disorder and Other Threats to Insect Pollinators.* Ed. UNEP Emerging Issues. Nairobi, 13p.**
- 149 - KOUAME-SINA S. M., 2013 - Contribution à la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre *bifidobacterium* isolées de la chaîne de production du lait local à Abidjan. Thèse Doc. Univ. Nangui Abrogoua, 125 p.**
- 150 - KRIEG A. and HERFS W., 1963 - Empfindlichkeit verschiedener Insektenarten gegenüber dem "Exotoxin" von *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Ztschr. Pfl.krankh*, 70: 11-21.**
- 151 - LABBE J. et LANIO G., 2014 - *Lutte contre le frelon asiatique. Compte-rendu de la réunion d'intérêt départemental.* Saint-Nolff.4p**

- 152 - LACOURSIÈRE J.O. BOISVERT J., 2004** -Le *Bacillus Thuringiensis Israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs Au Québec. Ed. Environnement Québec, 101p.
- 153 - LAIR X., 2005** - *Apis mellifera* : une espèce en danger, 2^{ème} partie : La santé des abeilles – Situation dans la Manche Prédateurs – Parasites – Maladies – Pesticides. *L'Argiope*, 48 : 37- 57.
- 154 - LAVIE P., 1960** - Les substances antibactériennes dans la colonie d'abeilles (*Apis mellifica* L.). *Les annales de l'Abeille*, INRA, 3 (2) : 103 -183.
- 155 - LE CONTE Y., 2003a** -*Les produits de la ruche in* CLEMENT H. - *Le Traité Rustica de l'Apiculture*. Ed. Rustica, Gravigny, Pp. 354 - 386.
- 156 - LE CONTE Y., 2003b** - *La vie sociale de la colonie in* CLEMENT H. - *Le Traité Rustica de l'Apiculture*. Ed Rustica. Gravigny, Pp. 54 – 83.
- 157 - LE CONTE Y. et FAUCON J. P., 2002** - Les maladies de l'abeille domestique. *Le Courrier de la Nature*, 196 : 28 - 32.
- 158 - LE CONTE Y. et NAVAJAS M., 2008** - Changements climatiques : Impact sur les populations d'abeilles et leurs maladies. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 27 (2) : 485-497
- 159 - LEMOINE G., 2010** - Faut-il favoriser l'Abeille domestique *Apis mellifera* en ville et dans les écosystèmes naturels ? *Le Héron*, 43 (4) : 248 - 256.
- 160 - LENSKY Y., CASSIER P., 1995** - The alarm pheromones of queen and worker honeybees. *Bee world*, 76:119-129.
- 161 - LEQUEUX R., BRUNEAU E., REYBROECK W., JACOBS F.,** - *Guide de bonnes pratiques apicole*. Ed. CARI. Louvain-la-Neuve, 79p.
- 162 - LI J., FENG M., ZHANG Z. and PAN Y., 2008** - Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 39 (2) :199 -214.
- 163 - LINDSTRÖM A., KORPELA S., FRIES I., 2008** - Transmission horizontale de spores de *Paenibacillus larvae* entre colonies d'abeilles *Apismellifera* par le pillage. *Apidologie* , 39 : 515-522.
- 164 - LOUVEAUX J., 1958** - Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (*Apis mellifica* L.). *les annales de l'Abeille*, 1 (3) : 113-188.
- 165 - LUO G., CHEN XI., JIN T. and QIN L., 2009** - Effect of Em reagent on the development of worker's hypopharyngeal gland. *Chinese Journal of Applied apicultur*, 3: 5-9.
- 166 - MACKOWIAK C., 2009** - *Le déclin de l'abeille domestique Apis mellifera en France*. Thèse Doc. Univ. Henri Poincare - Nancy I., 155 p.

- 167 - MAIOLINO P., IAFIGLIOLA L., RINALDI L., DE LEVA G., RESTUCCI B., and MARTANO M., 2014** - Histopathological findings of the midgut in European honey bee (*Apis mellifera* L.) naturally infected by *Nosema* spp. *Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 2:1 - 4.
- 168 - MAISONNASSE A., LENOIR J.C., BESLAY D., CRAUSER D., LE CONTE Y., 2010** - E- β -Ocimene, a Volatile Brood Pheromone Involved in Social Regulation in the Honey Bee Colony (*Apis mellifera*), 5 (10):1-7.
- 169 - MALLICK A., 2013** - Action sanitaire en production apicole : gestion de la varroose face à l'apparition de résistance aux traitements chez *varroa destructor*. Thèse Doc. Univ. Claude-Bernard - Lyon I., 164 p.
- 170 - MALONE L. A., BURGESS E.P.J., GATEHOUSE H. S., VOISEY C. R., TREGIDGA E. L. and PHILIP B. A., 1999** - Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie* , 32:57 - 68.
- 171 - MALONE L. A., TODD J. H., BURGESS E.P.J. and CHRISTELLER J.T., 2004** - Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie*, 35: 655 - 664.
- 172 - MARCHENAY P., et BERARD L., 2007** - *L'homme, l'abeille et le miel*. Ed. De Borée, Romagnant, 224 p.
- 173 - MARNEFF C., 2011** - *Les habitants de la ruche. De l'œuf à l'abeille . Fiches pédagogiques*. Ed. SRABE Bruxelles, 2 p.
- 174 - MARTIN P., 2012** - *Risques et recommandations face au syndrome d'effondrement des abeilles*. Mém. Master. Univ. Bruxelles, 105 p.
- 175 - MARTIN S.J., BALL B.V. and CARRECK N.L. 2010** - Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bees (*Apis mellifera*) colonies. *J. Apic. Res.*, 49: 72 - 79.
- 176 - MATTESON K.C.N. and LANGELLOTTO G.A., 2009** - Bumble bee abundance in New York city community gardens: implications for urban agriculture. *Cities and the Environment (CATE)*, 2(5):1-12.
- 177 - MAURIZIO A., 1968** - *La formation du miel. Les produits de la ruche*, in CHAUVIN R. *Traité de Biologie de l'Abeille*. Ed. Masson et C^{ie}. Paris, 264 - 275

- 178 - MEEUS I., JOACHIM R., MIRANDA D., DIRK C., GRAAF D., WÄCKERS F, SMAGGHE G., 2014** - Effect of oral infection with Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus on bumble bee (*Bombus terrestris*) reproductive success. *J. Invertebr. Pathol.*, 212 :64 -69.
- 179 - MÖCKEL N., GISDER S. and GENERSCH E., 2011** - Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *J. Gen. Virol.*, 92: 370-377.
- 180 - MOHANDKACI H.O., DOUMANDJI - MITICHE B., et BEHIDJ N., 2014** - Evaluation de la toxicité de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillusphaericus* à l'égard du criquet migrateur *Locusta migratoria*. *Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, 12 :100-109.
- 181 - MONCEAU K., BONNARD O. and THIERY D., 2014** - *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *J Pest Sci* , 87:1-16
- 182 - MOORE J.L. et KOSUT M., 2013** - *Buzz: Urban Beekeeping and the Power of the Bee*. Ed. *New Youk university press*, 241 p.
- 183 - NABTI D. ACHOU M. and SOLTANI N., 2014** - Evaluating the Effects of Pesticides Used in East-Algerian Orchards on *Apis mellifera intermissa*: Enzymatic Activity of Acetylcholinesterase. *Academic Journal of Entomology*,7 (4): 128-133, 2014.
- 184 - NGUYEN B. K., SAEGERMAN C., et HAUBRUGE E., 2009** - Etude sur la contamination des miels par *Paenibacillus larvae* en Région wallonne et relation avec l'expression clinique de la loque américaine dans les colonies d'abeilles domestiques. *Ann. Méd. Vét.*, (153) :219-223.
- 185 - OIE., 2008** - *Nosémose des abeilles mellifères*. Manuel terrestre de l'OIE. Ed. Organisation Mondiale de la Santé Animale, 453p.
- 186 - OIE., 2009** - *Causes de la mortalité dans les colonies d'abeilles*. Ed. Organisation Mondiale de la Santé Animale, 81p.
- 187 - OIE., 2010** - *Infestation par le petit coléoptère des ruches (Aethina tumida)*.Code sanitaire pour les animaux terrestres. Ed. Organisation Mondiale de la Santé Animale, 6 p.
- 188 - OIE., 2015** - *Infection des abeilles mellifères à paenibacillus larvae* (loque américaine). Code sanitaire pour les animaux terrestres. Ed., Organisation Mondiale de la Santé Animale 4p.
- 189 - O.S.A.V., 2015** - *Petit coléoptère de la ruche (Aethina tumida)*. Rapport de l'Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires OSAV, 2p.

- 190 - OULEBSIR-MOHANDKACI H., 2012** - *Evaluation de l'impact biologique de quelques souches locales de Bacillus sp. et Pseudomonas spp. fluorescent vis à vis du criquet migrateur Locustamigratoriacinerascens (Orthoptera: Acrididae)*. Thèse Doc. Inst. Nati. Agro., El Harrach, Alger. 187p.
- 191 - OULEBSIR-MOHANDKACI H., DOUMANDJI-MITICHE B., BEHIDJ N., 2015** - Evaluation de la toxicité de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus sphaericus* à l'égard du criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linné, 1758). *Revue « Nature & Technologie ». B-Sciences Agronomiques et Biologiques*, 2 :100 - 109.
- 192 - OULEBSIR-MOHAND KACI H., TALBI-KHEMILI S., GANA-KEBBOUCHE S. and DOUMANDJI-MITICHE B., 2016** - Antagonistic activity of two *bacillus* sp. strains isolated from an algerian soil towards the migratory locust *Locusta migratoria* (Linnaeus 1758). *Agriculture and Forestry*, 62 (1): 145-154.
- 193 - OULEBSIR-MOHANDKACI H., et DOUMANDJI-MITICHE B., 2012** - Étude de l'impact biologique de *Pseudomonas spp. fluorescentes* sur les métabolites hémolyphatiques et l'histologie du tube digestif des larves L5 du criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linné, 1758). *Lebanese Science Journal*, 13 (2) :99-115.
- 194 - PAIN J., 1966** - Note technique nouveau mode de cagettes expérimentales pour le maintien d'abeilles en captivité. *Les Annales de l'Abeille*, 9 (1): 71-76.
- 195 - PAIN J. and MAUGENET J., 1966** - Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles. *Annales de l'Abeille*, 9(3): 209-236.
- 196 - PADMANABHAN V., Prabakaran G., PAILY K. P., BALARAMAN K., 2005** - Toxicity of a mosquitocidal metabolite of *Pseudomonas fluorescens* on larvae and pupae of the house fly, *Musca domestica*, *Indian J. Med. Res.*, 121:116 -119.
- 197 - PAPADOPOULOU-KARABELA K., ILIADIS N., LIAKOS V. and BOURDZY-HATZOPOULOU E., 1992** - Experimental infection of honeybees by *Pseudomonas aeruginosa*. *Apidologie*, 23 (5):393-397.
- 198 - PATRELLE C., 2011** - *Etude de la mortalité des colonies d'abeilles*. Ed. C.U.F.E. Québec, 65p.
- 199 - PELLETIER N., 2010** - *Le déclin des populations d'abeilles au Québec : causes probables, impacts et recommandations*. Ed. C.U.F.E., Université de Sherbrooke. 66p.
- 200 - PENNACINO-SAUVAGE M., et HULEN C., 1990** - Implantation et persistance des souches mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* dans les poumons de malades atteints de mucoviscidose. *Médecine Sciences*, 6: 886 -894.

- 201 - PERNAL S. F. et CURRIE R. W., 2000** - Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31: 387-409.
- 202 - PIEK T., 1964** - Synthesis of wax in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of physiology*, 4 (10) : 563-572.
- 203 - PINTO D.A.F., DE FERNADES R., E., PODEROSO J.C.M., SANTANA W. C. and MESSAGE D., 2012** - Nutritional and Temporal Effects on Hypopharyngeal Glands of Africanized Honeybees (Hymenoptera - Apidae). *Sociobiology*, 59(2):447- 456.
- 204 - POUVREAU A., 1974** - Les ennemis des bourdons. *Apidologie*, 5 (1) :39-62.
- 205 - RADA V., MACHOV M., HUK J., MAROUNEK M. and DUSKOVA D., 1997** - Microflora in the honeybee digestive tract: counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie*, 28 (6) : 357-365.
- 206 - RADA V. and PETER J., 2002** - Enumeration of *bifidobacteria* in animal intestinal samples. *Veterinary Medicina czech*, 47(1): 1- 4.
- 207 - RAMIREZ-ROMERO R., CHAUF AUX J. and PHAM-DELÈGUEM.H., 2005** - Effectsof Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foragingactivity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36: 601-611.
- 208 - RAMIREZ-ROMERO R., DESNEUX N., DECOURTYE A., CHAFFIOL A. and PHAM-DELEGUE M.H., 2008** - Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 327-333.
- 209 - RANA R., RANA B.S., KAUSHAL N., KUMAR D., KAUNDAL P., RANA K., AZHAR KHAN M., GWANDE S.J. and SHARMA H. K., 2011** - Identification of sacbrood virus disease in honeybee, *Apis mellifera* L. by using ELISA and RT-PCR techniques. *Journal of Biotechnology*, 10: 274 - 284.
- 210 - RASOLOFOARIVAO H., 2014** - *Apis mellifera unicolor* (Latreille 1804, Hymenoptera Apidae) et *Varrroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000, Acari : Varroidae) à Madagascar : diversité en génétique, impact et comportement hygiénique. Thèse Doc. Co- tutelle, Univ. de la Réunion et Univ.Antananarivo, 143p.
- 211 - RATNIEKS F. L. W., 1992** - American foulbrood: The spread and control of an important disease of the honey bee. *Bee World*, 73:177-191.
- 212 - RAZAFINDRAZAKA A. D., 2010** - *Potentialites et contraintes de la filière apicole dans le district de manakara région Vatovavy Fitovinany*. Mém. D.E.A. Univ. Antananarivo, 75p.

- 213 - REY R., 2012** - *La disparition des abeilles (Colony Collapsus Disorder). Etat des lieux, analyse des causes et des conséquences.* Thèse Doc. Univ. Victor Segalen – Bordeaux 2. 115 p.
- 214 - RIBIERE-CHABERT M., 2013** - Synthèse sur les méthodes d'analyse des maladies et agents pathogènes de l'abeille en laboratoire. *1^{ères} journées de la recherche apicole*, 6 et 7 février 2012. *paris*.9-10 p.
- 215 - RICHARDS A.J., 2001** - Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect croppollination and yield? *Annals of Botany*, 88:165-172.
- 216 - RICKETTS T.H. and IMHOFF M., 2003** - Biodiversity, urban areas, and agriculture: locating priority ecoregions for conservation. *Ecology and Society*, 8(2) : 1-15.
- 217 - RIONDET J., ADELL G., et FAYOLLE S., 2013** - *Guide pratique de l'apiculteur d'aujourd'hui*. Ed. Ulmer, Prais, 272 p.
- 218 - RITTER W., 2014** - *Une préoccupation désormais planétaire : les maladies des abeilles*. Ed. OIE, :81p.
- 219 - ROBINET C., et ROQUES A., 2010** - Direct impacts of recent climate warming on insect populations. *Integr Zool*, 5 : 132 -142.
- 220 - ROSE R., PETTIS J., RENNICH K. et ENGELSDORP D.V., 2014** - Enquête nationale sur les maladies des abeilles aux États-Unis. *l'OIE et ses partenaires*, 2:71-74.
- 221 - ROSSANT A., 2011-** *Le miel, un compose complexe aux propriétés surprenantes.* Thèse Doc. Univ. Limoges, 132 p.
- 222 - SAGILI R. R. and PANKIW T., 2007** - Effects of protein-constrained brood food on honey bee (*Apis mellifera* L.) pollen foraging and colony growth. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61: 1471 - 1478.
- 223 - SAGILI R. R., PANKIW T. and ZHU-SALSMAN K., 2005** - Effects of soybean inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect Physiology*, 51:953-957.
- 224 - SANFORD M.T., 2008** - Insecticides and CCD, Part I. *Bee Culture*, 136 (7): 17-18.
- 225 - SANFORD M. T., DIETZ A., 1976** - The fine structure of the wax gland of the honey bee (*Apis mellifera* l.). *Apidologie*, 7 (3):197-207.
- 226 - SARWAR M., 2016** -Fungal diseases of honey bees (Hymenoptera: Apidae) that induce considerable losses to colonies and protocol for treatment. *Internati. Journal of Zoology Studies*, 1:08-13.
- 227 - SCHULZ DJ., BARRON A.B. and ROBINSON G.E., 2002** - A role for octopamine in honey bee division of labor. *Brain, Behavior and Evolution* (60) : 350-359.

- 228 - SEEHUUS S. C., NORBERG K., KREKLING T., FONDRK K. and AMDAM G. V., 2007** - Immunogold localization of vitellogenin in the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honeybee workers, *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* 7 : 1-14.
- 229 - SHAH F.A. and SHAH T.A., 1991** - *Vespa velutina*, a serious predator of honeybees in Kashmir. *Bee World*, 72(4): 161 - 164.
- 230 - SHAHROUZI R., 2009** - Causes de la mortalité dans les colonies d'abeilles. *Vie de l'OIE*, 4:1-11.
- 231 - SHEN M., CUI L., OSTIGUY N., and COX-FOSTER D., 2005** - Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *Journal of General Virology*, 86: 2281-2289.
- 232 - SHIMANUKI H. and KNOX D A., 2000** - *Diagnosis of Honey Bee Diseases*.ED. U.S.D.A. United States, 61 pp.
- 233 - SHUTLER D., HEADK., BURGHER-MACLELLAN K.L., COLWELL M.J., LEVITT A. L., OSTIGUY N., WILLIAMS G.R., 2014** - Honey Bee *Apis mellifera* Parasites in the Absence of *Nosema ceranae* Fungi and *Varroa destructor* Mites. *Plos One*, 9:1-8
- 234 - SIMON R., 2012** - *Diversité, évolution, et écologie virale des communautés aux génotypes. Analyse bioinformatique de métagénomés viraux*. Thèse Doc. Univ. Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 331p.
- 235 - SIMONEAU A., 2002** - *La loque américaine*. Ed. *Laboratoire de pathologie animale, Québec*. 14 p.
- 236 - SIMS S.R., 1995** - *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* CryIA(c) protein expressed in transgenic cotton: Effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomologist*, (20): 493-500.
- 237 - SONG L., GAO M., DAI S. and PENG K., 2005** - Activity of *Bacillus thuringiensis* against *Locusta migratoria manilensis*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 11: 592 - 594.
- 238 - SPIVAK M. and REUTER G.S., 2001** - Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*.32: 555-565.
- 239 - STANDIFER L.N., MOELLER F.E., KAUFFELD N.M., HERBERT E.W.J., and SHIMANUKI H., 1970** - Supplement feeding of honey bee colonies. *Ann. Entomol. Soc Amer.*, 70:691-693.

- 240 - SUCHAIL S., BELZUNCES L. P. et VAISSIERE B. E., 2003** - Toxicité aiguë de l'imidaclopride et de ses métabolites chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. *Abeilles et Fleurs*, 643: 27-30.
- 241 - SUWANNAPONG G., CHAIWONGWATTANAKUL S., and BENBOW E.M., 2010** - Histochemical Comparison of the Hypopharyngeal Gland in *Apis cerana* Fabricius, 1793 Workers and *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 Workers. *Psyche: A Journal of Entomology*. 2010 : 1-7.
- 242 - TAÏBI A. BENDJOUDI D., DOUMANDJI S. et GUEZOUL O., 2009** - Particularités écologiques du régime alimentaire de la Pie Grièche Méridionale *Lanius meridionalis* Linne, 1758 (Laniidae, Aves) dans deux stations en Mitidja (Alger). *Sciences & Technologie*, (9) :15-20.
- 243 - TASEI J.N., 1996** - Impact des pesticides sur les Abeilles et les autres pollinisateurs. *Courrier de l'environnement de l'INR*, 29:9-18.
- 244 - TCHOUMBOUE J., TCHOUAMO I. R., PINTA J.Y. et NJIA M.N., 2001-** Caractérisation socio-économique et techniques de l'apiculture dans les hautes terres de l'Ouest du Cameroun. *Tropicultura*,19 (3) :141-146.
- 245 - TENTCHEVA D., GAUTHIER L., ZAPPULLA N., DAINAT B., COUSSERANS F., COLIN M. F. and BERGON M., 2004** - Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7185-7191.
- 246 - THOMSON S.V., HANSEND R., FLINTK.M. and VANDENBERG J.D., 1992** - Dissemination of bacteria antagonistic to *Erwinia amylovora* by honeybees. *Plant Disease* ,76: 1052-1056.
- 247 - THOMPSON H.M., 2005** - The effects of four Insect Growth-Regulating (IGR) insecticides on honeybee (*Apis mellifera* L.) colony development, queen rearing and drone sperm production. *Ecotoxicology*, 14: 757-769.
- 248 - TIRADO R., SIMON G. et JOHNSTON P., 2013** - *Le déclin des abeilles, Analyse des facteurs qui mettent en péril les pollinisateurs et l'agriculture en Europe* «Rapport technique » . Ed. Greenpeace, Amsterdam, 14 p.
- 249 - TISSIER H ., 1990** - Recherche sur la flore intestinale des nourrissons. (Etat normal et pathologique). Thèse Doc. Méd. Uni. Paris, 251p.
- 250 -TRAVER B. E., et FELL R. D., 2011** - *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol*, 107 : 234 - 236.

- 251 - TRAVER B.E. et FELL R.D., 2012** - Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *J. Invertebr. Pathol.*, 110:408 - 410.
- 252 - TREMBLAY N., 2007** - Rapport de visite du conseiller provincialen apiculture à l'assemblée générale. *Annuelle de l'Ontario Beekeepers Association*.1-3p.
- 253 - TULLOCH A.P., 1980** - Beewax composition and analysis. *Bee world*, 61:47-62.
- 254 - VANDENBERG G.D.and SHIMANUKI H., 1990** - Isolation and characterization of *bacillus coagulans* associated with half-moon disorder of honey bees. *Apidologie*, 21: 233-241.
- 255 - VANOPPEN M., OOMS A., POTTERSG., 2001** - *Le monde des abeilles Boires et déboires d'un insecte zélé*. ED. Bio-MENS, Belgique. 15p.
- 256 - VEREECKEN N.V., DUFRENE E., A and AUBERT M., 2015** - Rapport de synthèse sur les risques liés à l'introduction de ruches de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) vis-à-vis des abeilles sauvages et de la flore. Ed. *Observatoire des Abeilles OA*, Saint-Jean-De Buèges ,17p.
- 257 - VIDAL-NAQUET N., 2012** -Les maladies de l'abeille domestique d'élevage, *Apis mellifera* L. reared honey bee *Apis mellifera* L. diseases. *Bull.académie nati. Méd.* 165 (4) :307-316p.
- 258 - VIDAU C., DIOGON M., AUFAUVRE J., FONTBONNE R., VIGUÈS B., BRUNET J. L., TEXIER T., BIRON D. G., BLOT N., EL ALAOUI H., BELZUNCES L.P., et DELBAC F., 2011** -Déclin des colonies d'abeilles et origine multifactorielle : cas de *Nosema ceranae* et des insecticides. *LSA* 245 : 417- 426.
- 259 - VILLEMANT C., BARBET-MASSIN M., PERRARD A., MULLER F., GARGOMINY O., JIGUET F. and ROME Q., 2011a** - Using niche models to predict the global invasion risk by the alien bee-hawking yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents. *Biol Conser*, 144 :2150 -2152.
- 260 - VILLEMANT C., MULLER, F., HAUBOISS., PERRARD A., DARROUZET E. and ROME Q., 2011b** - Bilan des travaux (MNHN et IRBI) sur l'invasion en France de *Vespa velutina*, le Frelon Asiatique prédateur d'abeilles. *Journée Scientifique Apicole JSA*, Arles, 11 février 2011. *Oniris - Fnosad, Nantes*, 3-12.
- 261 - VILLEMANT C., HAXAIRE J. et STREITO J.C., 2006** - Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera:Vespidae), *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 111 : 447- 450.
- 262 - WALORCZYK S. and GNUSOWSKI B., 2009** - Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-

based extraction and gaschromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1216 (37): 6522 - 653.

263 - WEBSTER T.C., POMPER K.W., HUNT G., THACKER E.M. and JONES S.C., 2004 - *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie*, 35: 49-54.

264 - WEIBULL A.C., ÖSTMAN O., and GRANQVIST A., 2003 - Species richness in agroecosystems: the effect of landscape, habitat and farm management. *Biodiversity & Conservation*, 12 : 1335-1355.

265 - WENDLING S., 2014 - Les particularités de la reproduction de *varroa destructor*, agent de la varroose de l'abeille domestique perspectives de lutte. *Bull. Acad. Vét. France*. 167 (4):309 - 315.

266 - WICK M.J., FRANK D.W., STOREY D.G. and IGLEWSKI B.H. 1990 - Structure, Function, and Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A, *Annu. Rev, Microbiol*, 44:335-63.

267 - WILSON W. T., 1962 - Observations on effects of feeding large quantities of *Bacillus thuringiensis* Berliner to honey bees. *J. Insect Pathol.*, 4 :269 - 270.

268 - WINFREE R., AGUILARR., VÁZQUEZ D.P., LEBUHN G. and AIZEN, M.A., 2009 - A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, 90: 2068-2076.

269 - WINFREE R., GRISWOLD, T. and KREMEN C., 2007 - Effect of human disturbance on bee communities in a forested ecosystem. *Conservation Biology*, 21: 213-223.

270 - WINSTON M. L., 1987 - *The Biology of the Honey Bee*. Ed. Cambridge: Harvard University press, 294 P.

271 - WU J.Y., ANELI C.M. and SHEPPARD W.S., 2011 - Sublethal effects of pesticide residues in brood clomb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLos One*, 10: 1799-1807.

272 - YANG E.C., CHUANG Y.C., CHEN Y.L. and CHANG L.H., 2008 - Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* , 101: 1743-1748.

273 - YUE C., GENERSCH E., 2005 - RT-PCR analysis of Deformed Wing Virus in honey bees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*,(86):1-6.

274 - ZEIN E.F., KARAA S., CHEMALY A., SAIDI I., DAOU-CHAHINE W., ROHBAN R. et 2008 - Septicémie à *Lactobacillus rhamnosus* chez une patiente diabétique prenant un traitement probiotique. *Ann Biol Clin*, 66 (2) : 195-8

275 - ZERROYKI M. H., 2011 - *Effet des antibiotiques commercialisés en Algérie sur croissance des Bifidobactéries.* Mém. Magistre. Univ. Es –Senia, Oran, 85p.

276 - ZIONI N., SOROKER V. and CHEJANOSCKY N., 2011 - Replication of *Varroa destructor* virus 1(VDV-1) and a *Varroa destructor* virus 1- Deformed Wing Virus recombinant (VDV-1–DWV) in the head of the honey bee. *Virology*, 417: 106 -112.

Annexes

Annexe 1

Tableau° 2 -Autres ennemis biologiques de l'abeille domestique (MACKOWIAK, 2009)

| | Nom | Agent responsable | Populations cibles | Signes cliniques | Traitement |
|--------------|------------------|---|--------------------|--|---|
| Bactéries | Loque américaine | <i>Paenibacillus larvea</i> | couvain | - larves foncées et gluantes puis filantes - écailles adhérant aux alvéoles - cadres foncés, gras - odeur de colle de poisson | Tétracycline (BRIZARD <i>et al.</i> , 1964) et (VIDAL-NAQUET, 2012) |
| | Loque européenne | <i>Melissococcus pluton</i> associé à d'autres germes | couvain | - couvain en mosaïque - odeur non caractéristique - larve aqueuse qui se transforme en lame caoutchouteuse | Avec des antibiotiques |
| | Septicémie | <i>Pseudomonas apisepctica</i> | Adulte | - abeilles qui ne volent pas, se traînent, sont chassées par leurs consœurs - tombent en morceaux quand on les touche - abdomen devient foncé les muscles gris blanchâtres | |
| Protozoaires | Nosérose | <i>Nosema spp.</i> | | - forte mortalité - abeilles faibles, ayant des difficultés à voler. | Il n'y a pas de traitement médical |

| | | | | | |
|----------|-----------------------|--------------------------|-------------------|--|--|
| | | | | <ul style="list-style-type: none"> - abeilles paralysées - nombreux changements de reine - moindre développement du couvain - traces diarrhéiques sur les ruches - effondrement de colonies | |
| Acarieus | Varroase | <i>Varroa destructor</i> | Couvain et adulte | <ul style="list-style-type: none"> - problèmes de développement du couvain - couvain diminué, en mosaïque - émergence d'abeilles mutilées - présence d'acarieus sur les larves et les adultes | <ul style="list-style-type: none"> - Thymovar®; Api Life Var®; Apiguard®, l'acide formique (COLIN,1982) - Fumigation du thym (GHOMARI <i>et al.</i>, 2013) - Médicaments AMM à base de thymol, acides formique, lactique ou oxalique (BALLIS, 2012) |
| | Acariose des trachées | <i>Acarapis woodi</i> | adultes | <ul style="list-style-type: none"> - problèmes de développement du couvain - couvain diminué, en mosaïque - émergence d'abeilles mutilées - présence d'acarieus sur les larves et les adultes | - Cymiazole (EISCHEN <i>et al.</i> ,1989) |
| | Tropilaelose | <i>Tropilaelaps spp.</i> | adultes | - abeilles qui se traînent | Acaricide (Apistan™) et acide |

| | | | | | |
|----------|---------------------------------|---|-----------------------------------|--|--|
| | | | | <ul style="list-style-type: none"> - ailes et abdomen déformés - couvain en mosaïque - alvéoles perforées - couvain mort ou malformé - tâches foncées sur les pupes - alvéoles mal nettoyées - ruches abandonnées | formique (OIE, 2008) |
| Mycoses | Couvain plâtre | <i>Ascophaera apis</i> | couvain | <ul style="list-style-type: none"> - larve duveteuse - larve morte devient dure (« momie » et blanche, puis noire) | huiles essentielles (COLIN <i>et al.</i> , 1989). |
| Insectes | Fausse teigne | <i>Galleria mellonella</i> (lépidoptère) | couvain | <ul style="list-style-type: none"> - galeries tapissées de soie dans les cadres - adultes qui ont du mal à éclore du fait des fils | huiles essentielles (COLIN <i>et al.</i> , 1989). |
| | Petite teigne ou couvain chauve | <i>Achroia grisella</i> (lépidoptère) | couvain | - opercules troués avec bords relevés (en cheminée) | |
| | Le « pou » des abeilles | <i>Braula coeca</i> (mouche aptère) | Adultes (reine +++) colonie | - opercules troués avec bords relevés (en cheminée) | Check Mite®, Beetle Swatter®, Beetle Barn® (MACKOWIAK, 2009). |
| | Le petit coléoptère de la ruche | <i>Aethina tumida</i> | | <ul style="list-style-type: none"> - fermentation du miel - odeur d'orange pourrie - miel fermenté s'écoule des alvéoles, voire de la ruche - coléoptères qui fuient la lumière | |

| | | | | | |
|--|---------------------|-----------------------|------------|---|--------------------------------|
| | Le frelon asiatique | <i>Vespa velutina</i> | butineuses | - présence de frelons devant la ruche. - diminution de développement de la Colonie | -Le Piégeage (MACKOWIAK, 2009) |
|--|---------------------|-----------------------|------------|---|--------------------------------|

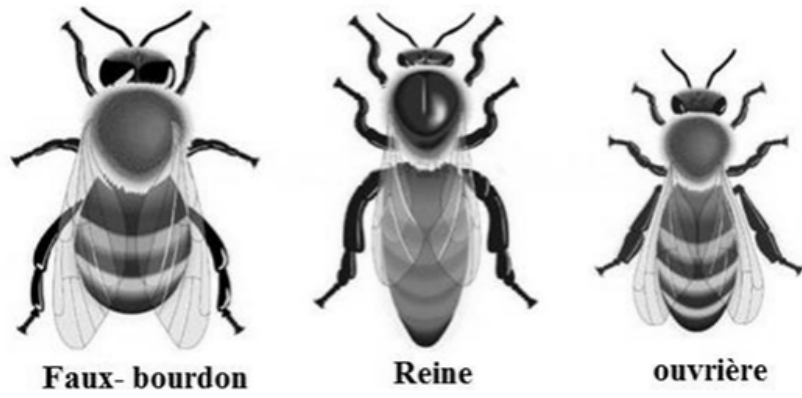


Fig. 2 - Schéma des 3 castes de l'abeille (RASOLOFOARIVAO, 2014)

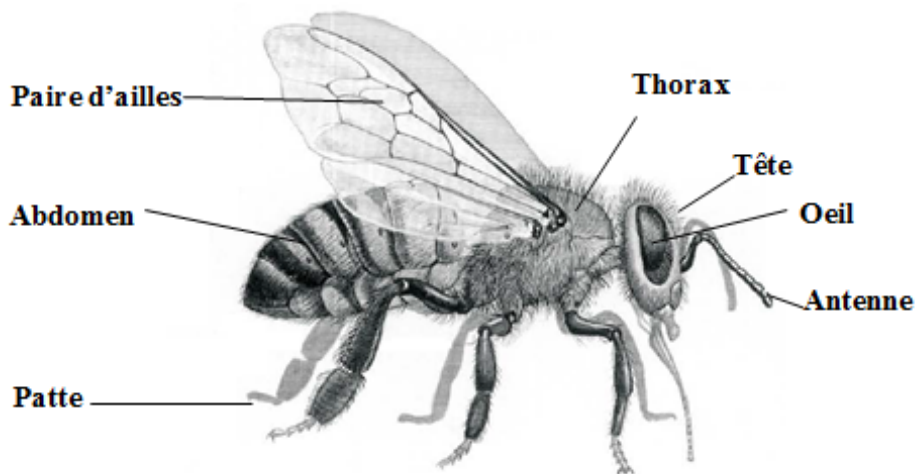


Fig.4 - Corps de l'ouvrière (LE CONT, 2003)

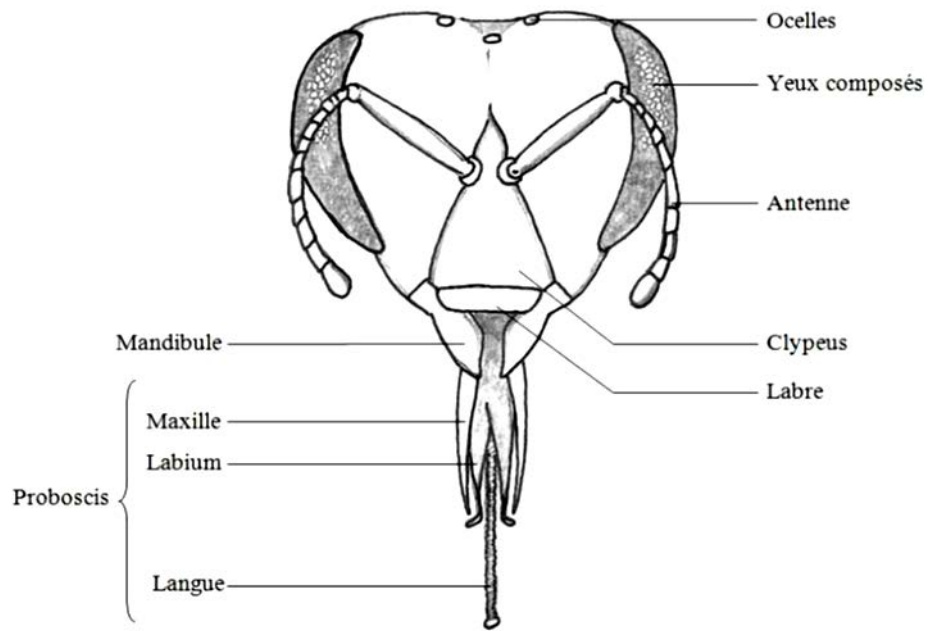


Fig. 5 - Schéma de la tête et des pièces buccales d'une abeille ouvrière (MAURIZIO, 1968)

Annexe 2

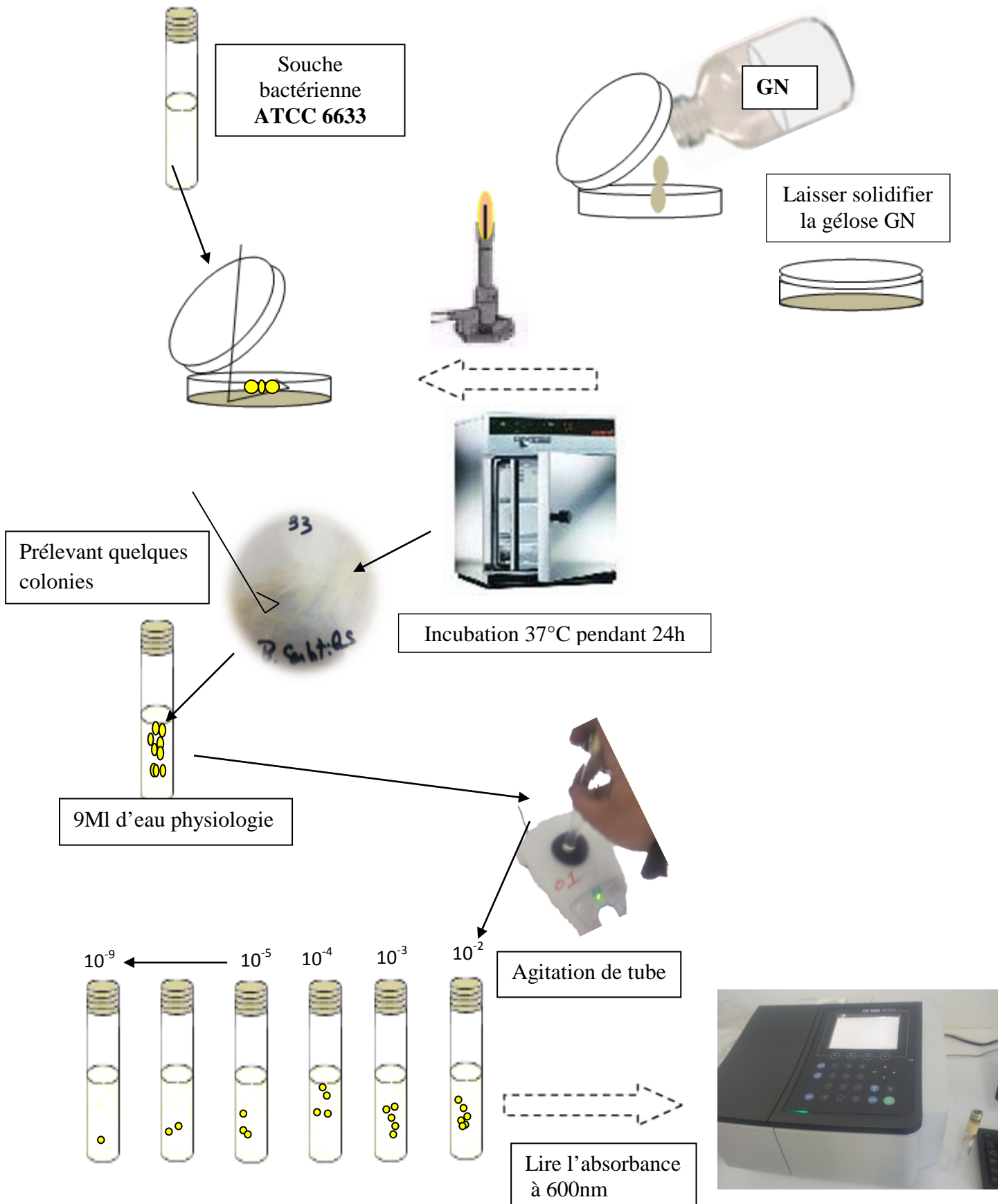
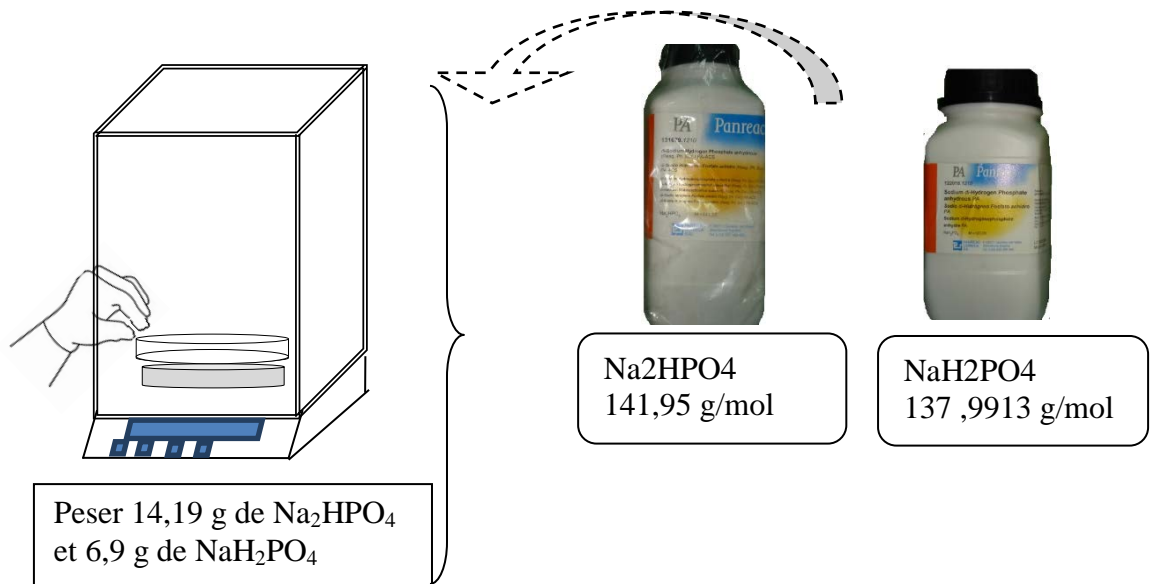


Fig. 36 - Préparation des suspensions bactériennes et détermination des concentrations (Photographie originale)

Annexe 3



- Solution (A) : dissoudre 14,19 g de Na_2HPO_4 dans 1 L d'eau distillée ;
- Solution (B) : dissoudre 6,9 g de NaH_2PO_4 dans 1L d'eau distillée ;
- Mélanger 61,5 mL de la solution (A) et 438,5 ml de la solution (B).

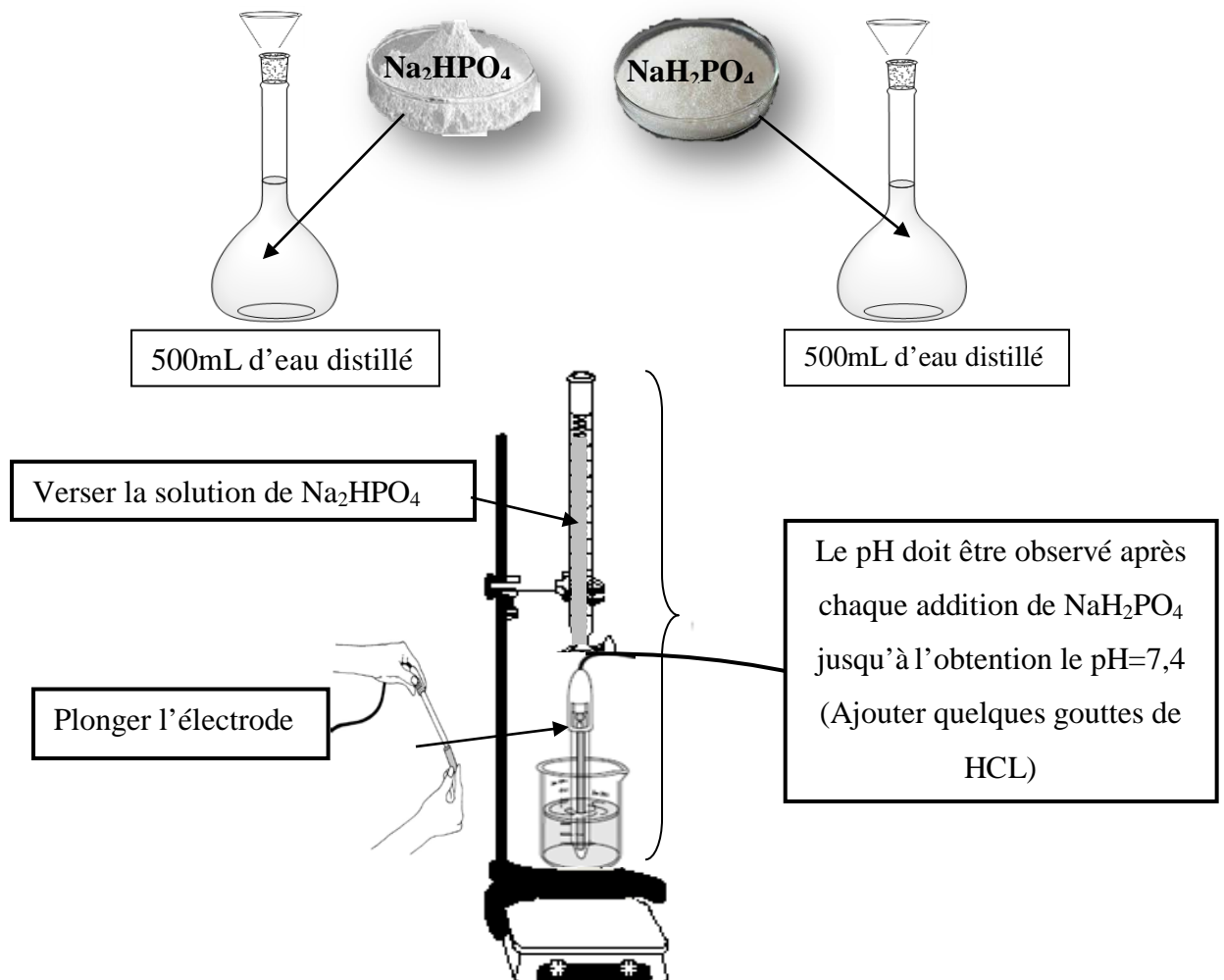


Fig. 41 - Préparation du tampon phosphate pH=7,4 (Photographie originale)

Annexe 4

✓ Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines

Tableau n° 4 - La gamme d'étalonnage des protéines

| | | | | | | |
|-------------|---|------|-----|------|------|------|
| BSA (mL) | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| DO à 595 nm | 0 | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,20 | 0,25 |

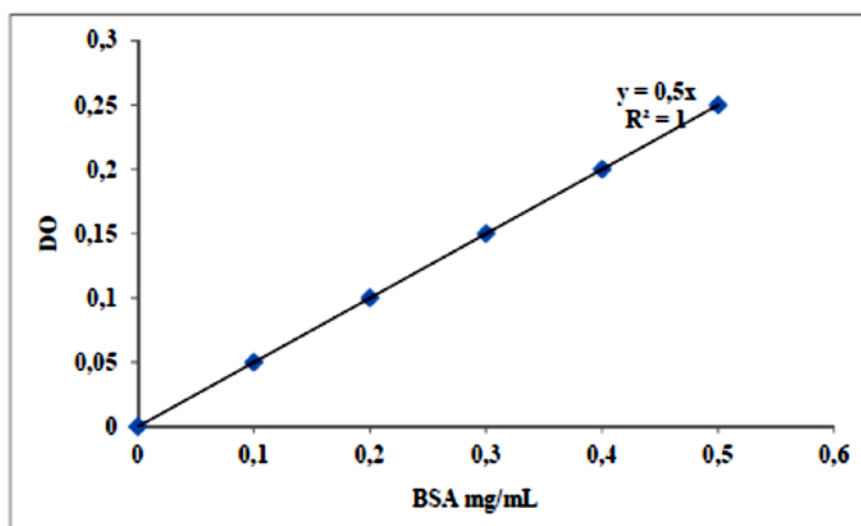


Fig.43 - Courbe étalon établi pour le B.S.A.

- Préparation des solutions utilisées

✚ Solution BSA (1 mg/mL) : (sérum albumine bovine) à 1%

Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.

✚ Réactif de Bradford :

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 mL d'éthanol (95 %). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 mL d'acide orthophosphorique (85 %) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

Annexe 5

EM.1® est un produit de base de la Technologie EM™ originalement développée par Dr. Teruo Higa de l'Université de Ryukyu sur l'île d'Okinawa - Japon. C'est un mélange de micro-organismes utiles et bénéfiques, collectés dans la nature d'une façon spécifique et naturel, mais ne sont ni modifiés ni manipulés.

EM.1® est un produit écologique utilisable en agriculture, élevage, aquaculture, environnement, etc. sans danger pour la vie humaine, l'animale et la nature.

Composition :
Bactéries lactiques (Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum,...), Levures (Saccharomyces cerevisiae,...), Bactéries de photosynthèse (Rhodospseudomonas palustris,...), mélasse, eau de source naturel.

Informations importantes
EM.1® est un liquide de couleur jaune-marron et d'odeur aigre douce, son pH de l'ordre de 3,5.
Ce contenant peut dilater ou se contracter et des flocons blancs peuvent apparaître sur la surface et certains sédiments au fond, ceci est naturel vu la composition de ce produit.
Si la couleur change fortement ou l'odeur devient putride, ou le pH devient supérieur à 4 ce produit a perdu ses caractéristiques est il suffit de vider le contenu de ce contenant sur des matières organiques.

Fabriqué en Tunisie sous licence et contrôle de EMRO Japon par :
EM.Tunisia
Route Gromhalia, par Mornag Km13
(ferme Boumah) Nabeul - Tunisie
Tel/Fax : (00216) 71 830 923 ; GSM : + 98 510 726
e-mail : info@emtunisia.com / emtunisia@yahoo.com
www.emtunisia.com

Distributeur exclusif en Algérie
EM.Algeria
Cité Djallem, M'Tarfa W Msila - Algérie
Tel : 0774622199 / 0550706702
Fax : 035566192
emalgeria28@gmail.com

Trademark of EM Technology reserved by EMRO Japan www.emro.or.jp



EM.1®
Effective Microorganisms



Stimulateur de croissance
Enracineur




Application et modes d'emplois
L'utilisation de ce produit nécessite son activation : 5% EM.1 + 5% mélasse + 90% eau et une fermentation anaérobie pendant 5 à 7 jours pour obtenir une solution utilisable 'EM.1 Activé ou EMA', c'est cette solution qu'on utilise pour les applications suivantes: (la validité de EMA est max 30 jours après activation).
• **Agriculture :** jusqu'à 600 L/ha/an avec l'eau d'irrigation divisé sur plusieurs applications. Pour plus de détails veuillez nous consulter.

A conserver bien fermé à l'abri de la lumière et au frais et à utiliser dans 3 mois après ouverture.

Une gamme plus large de produits à base de cette technologie pré à l'utilisation pour les applications ci-dessus est disponibles. Le producteur et les distributeurs ne peuvent être tenus responsables de l'utilisation individuelle de ce produit.

L'utilisation de ce produit ne nécessite pas de précautions spéciale.

1 litre 5 litres 20 litres

Fig. 45 (b) - La fiche technique du produit utilisé

Annexe 5

✚ Prolifération d'EM·A



1. Remplir l'estagnon d'eau chaude jusqu'à $\frac{1}{4}$ environ.
2. Ajouter 3 % de mélasse de canne à sucre dans l'estagnon.
3. Bien agiter l'estagnon, pour dissoudre complètement la mélasse.
4. Remplir l'estagnon d'eau, en chassant toute l'air. La température du mélange devrait être maintenant entre 35° et 38°C.
5. Ajouter 3% d'EM·1°. Agiter brièvement l'estagnon.
6. Fermer l'estagnon hermétiquement, puis laisser fermenter pendant 5 à 7 jours, à au moins 35° à 38 °C. Poser une soupape laissant échapper les gaz de fermentation, ou aérer l'estagnon tous les jours.
7. La fermentation est terminée lorsqu'il ne s'échappe plus de gaz de fermentation.
8. Surveiller le pH à l'aide du papier indicateur: il doit être inférieur à 3,7.
9. Conserver l'EM·A à l'abri de la lumière et au frais (10 à 18°C) mais pas dans le frigo.

Fig. 47- Les étapes de la préparation de EM-A

Remarque : Ne conservez pas l'EM·A dans des bouteilles en verre. Le liquide peut continuer sa fermentation pendant le stockage et briser le verre par la surpression!

Annexe 6

➤ Bouillon MRS

Pour la culture des lactobacilles, de Man, Rogosa et Sharpe ont, en 1960, développé la formulation d'un milieu susceptible de convenir aux lactobacilles des produits laitiers.

Principes

- ✓ Les diverses peptones, le glucose et les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles.
- ✓ Le tween 80, qui est constitué par un mélange d'esters oléiques, est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes.
- ✓ Le phosphate dipotassique permet de stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne.
- ✓ Le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium constituent les substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants incluant les streptocoques et les moisissures.

Préparation

Mettre en solution 55,3 g de milieu déshydraté (BK070) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- ✓ Agiter lentement jusqu'à dissolution complète, en chauffant si nécessaire.
- ✓ Répartir en tubes ou en flacons.
- ✓ Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Mode d'emploi

- ✓ Transférer 1 mL du produit à analyser et de ses dilutions décimales dans un ou plusieurs tubes de milieu.
- ✓ Incuber à 30 ou à 37°C, de 48 heures à 5 jours suivant le germe à étudier.

➤ Milieu M.R.S. (De Man, Rogosa, Sharpe)

- Préparation

Verser 62 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Répartir et stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

- **Formule**

| COMPOSITION | (grammes/litre) |
|--|------------------------|
| Peptone | 10,0 |
| Extrait de viande de boeuf | 8,0 |
| Extrait de levure | 4,0 |
| Glucose | 20,0 |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| Hydrogénophosphate de potassium | 2,0 |
| Acétate de sodium 3 H₂O | 5,0 |
| Citrate d'ammonium | 2,0 |
| Sulfate de magnésium 7 H₂O | 0,2 |
| Sulfate de manganèse 4 H₂O | 0,05 |
| pH à 25°C | 6,2 ± 0,2 |

- **Conservation**

Toutes les boites doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température ne dépassant pas 25°C.

➤ **Milieu M.H.**

La gélose Mueller-Hinton est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques et sulfamides.

- **Formule**

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

| COMPOSITION | (grammes/litre) |
|--------------------------|------------------------|
| Peptone | 17,50 |
| Extrait de viande | 2,00 |
| Amidon | 1,50 |
| Agar | 17,00 |
| pH à 25°C | 7,3 ± 0,1 |

- **Conservation**

Le milieu en flacons ou boîtes se conserve entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

➤ **Standard McFarland 0.5**

Les normes originales de McFarland mélangeaient des quantités spécifiées de chlorure de baryum et d'acide sulfurique ensemble. Le mélange des deux composés forme un précipité de sulfate de baryum, qui provoque une turbidité dans la solution. Une norme de 0,5 McFarland est préparée en mélangeant 0,05 ml de dihydrate de chlorure de baryum 1,175% ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), avec 9,95 ml d'acide sulfurique à 1% (H_2SO_4).

| Standard de McFarland No. | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|
| Barium chloride (ml) | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 |
| Sulfuric acid (ml) | 9.95 | 9.9 | 9.8 | 9.7 | 9.6 |
| Approx. cell density (1×10^8 CFU/mL) | 1.5 | 3.0 | 6.0 | 9.0 | 12.0 |
| % Transmittance* | 74.3 | 55.6 | 35.6 | 26.4 | 21.5 |
| Absorbance* | 0.08 to 0.1 | 0.257 | 0.451 | 0.582 | 0.669 |

Annexe 7

Tableau n° 5 - Quantité de la cire issue de l'abeille domestique en fonction de la dose de *Bacillus subtilis*.

| Témoin | | <i>Bacillus subtilis</i> C1 (0,72 mg/mL) | | <i>Bacillus subtilis</i> C2 (0,50 mg/mL) | | <i>Bacillus subtilis</i> C3 (0,35 mg/mL) | |
|-----------------|-----------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|
| Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) |
| 1 | 0,0154 | BS1 | 0,0090 | BS'1 | 0,0092 | BS''1 | 0,0119 |
| 2 | 0,0153 | BS2 | 0,0082 | BS'2 | 0,0095 | BS''2 | 0,0105 |
| 3 | 0,0136 | BS3 | 0,0083 | BS'3 | 0,0084 | BS''3 | 0,0108 |
| 4 | 0,0139 | BS4 | 0,0082 | BS'4 | 0,0088 | BS''4 | 0,0122 |
| 5 | 0,0157 | BS5 | 0,0093 | BS'5 | 0,0098 | BS''5 | 0,0136 |
| 6 | 0,0169 | BS6 | 0,0092 | BS'6 | 0,0105 | BS''6 | 0,0105 |
| 7 | 0,0155 | BS7 | 0,0079 | BS'7 | 0,0096 | BS''7 | 0,012 |
| 8 | 0,0148 | BS8 | 0,0090 | BS'8 | 0,0092 | BS''8 | 0,0118 |
| 9 | 0,0158 | BS9 | 0,0096 | BS'9 | 0,0098 | BS''9 | 0,0123 |
| 10 | 0,0153 | BS10 | 0,0093 | BS'10 | 0,0095 | BS''10 | 0,0119 |
| 11 | 0,0182 | BS11 | 0,0080 | BS'11 | 0,0113 | BS''11 | 0,0141 |
| 12 | 0,0154 | BS12 | 0,0091 | BS'12 | 0,0096 | BS''12 | 0,0124 |
| Moyenne | 0,0154 | Moyenne | 0,0087 | Moyenne | 0,0096 | Moyenne | 0,0120 |
| Moyenne ± SD | 0,0012 | Moyenne ± SD | 0,0005 | Moyenne ± SD | 0,0007 | Moyenne ± SD | 0,001 |

Tableau n° 7 - Nombre des lames cirières issues de l'abeille domestique en fonction de concentration de *Bacillus subtilis*.

| Témoin | | <i>Bacillus subtilis</i> C1 (0,72 mg/mL) | | <i>Bacillus subtilis</i> C2 (0,50 mg/mL) | | <i>Bacillus subtilis</i> C3 (0,35 mg/mL) | |
|---------|------------------|---|------------------|---|------------------|---|------------------|
| Cagette | Nombre des lames | Cagette | Nombre des lames | Cagette | Nombre des lames | Cagette | Nombre des lames |
| 1 | 06 | BS1 | 4,5 | BS'1 | 3,5 | BS''1 | 1,5 |
| 2 | 2,5 | BS2 | 3,5 | BS'2 | 2,5 | BS''2 | 3,5 |
| 3 | 6,5 | BS3 | 2,5 | BS'3 | 4,5 | BS''3 | 5 |
| 4 | 4,5 | BS4 | 1,5 | BS'4 | 3,5 | BS''4 | 2,5 |
| 5 | 06 | BS5 | 4,5 | BS'5 | 3,5 | BS''5 | 3,5 |
| 6 | 3,5 | BS6 | 2,5 | BS'6 | 2,5 | BS''6 | 3,5 |
| 7 | 2,5 | BS7 | 3 | BS'7 | 2 | BS''7 | 6 |
| 8 | 4,5 | BS8 | 2 | BS'8 | 4,5 | BS''8 | 4,5 |
| 9 | 5,5 | BS9 | 4 | BS'9 | 6,5 | BS''9 | 4,5 |
| 10 | 4,5 | BS10 | 2 | BS'10 | 3,5 | BS''10 | 5,5 |
| 11 | 3,5 | BS11 | 2,5 | BS'11 | 3,5 | BS''11 | 4,5 |
| 12 | 05 | BS12 | 3 | BS'12 | 2 | BS''12 | 3,5 |
| Moyenne | 4,5 | Moyenne | 2,5 | Moyenne | 3,5 | Moyenne | 4 |

Tableau n° 8 - Quantité de la cire issue de l'abeille domestique en fonction de la dose de *Bacillus cereus*

| Témoïn | | <i>Bacillus cereus</i> C1 (0,4 mg/ml) | | <i>Bacillus cereus</i> C2 (0,35 mg/ml) | | <i>Bacillus cereus</i> C3 (0,22 mg/ml) | |
|-----------------|-----------|--|-----------|---|-----------|---|-----------|
| Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) |
| 1 | 0,0152 | BC1 | 0,0040 | BC'1 | 0,012 | BC''1 | 0,0073 |
| 2 | 0,0163 | BC2 | 0,0042 | BC'2 | 0,010 | BC''2 | 0,0076 |
| 3 | 0,0140 | BC3 | 0,0035 | BC'3 | 0,011 | BC''3 | 0,0083 |
| 4 | 0,0139 | BC4 | 0,0032 | BC'4 | 0,011 | BC''4 | 0,0072 |
| 5 | 0,0157 | BC5 | 0,0039 | BC'5 | 0,015 | BC''5 | 0,0072 |
| 6 | 0,0169 | BC6 | 0,0036 | BC'6 | 0,012 | BC''6 | 0,0086 |
| 7 | 0,0155 | BC7 | 0,0038 | BC'7 | 0,013 | BC''7 | 0,0072 |
| 8 | 0,0160 | BC8 | 0,0042 | BC'8 | 0,011 | BC''8 | 0,0075 |
| 9 | 0,0158 | BC9 | 0,004 | BC'9 | 0,015 | BC''9 | 0,0079 |
| 10 | 0,0153 | BC10 | 0,0034 | BC'10 | 0,014 | BC''10 | 0,0082 |
| 11 | 0,0187 | BC11 | 0,0039 | BC'11 | 0,012 | BC''11 | 0,0072 |
| 12 | 0,0156 | BC12 | 0,0042 | BC'12 | 0,011 | BC''12 | 0,0083 |
| Moyenne | 0,0160 | Moyenne | 0,0038 | Moyenne | 0,0123 | Moyenne | 0,0077 |
| Moyenne ± SD | 0,001 | Moyenne ± SD | 0,0003 | Moyenne ± SD | 0,001 | Moyenne ± SD | 0,0005 |

Tableau n° 10 - Nombre des lames cirières issues de l'abeille domestique en fonction de la dose de *Bacillus cereus*

| Témoïn | | <i>Bacillus cereus</i> C1 (0,4 mg/mL) | | <i>Bacillus cereus</i> C2 (0,35 mg/mL) | | <i>Bacillus cereus</i> C3 (0,22 mg/mL) | |
|---------|------------------|--|------------------|---|------------------|---|------------------|
| Cagette | Nombre des lames | Cagette | Nombre des lames | Cagette | Nombre des lames | Cagette | Nombre des lames |
| 1 | 6 | BS1 | 4 | BS'1 | 4,5 | BS''1 | 2,5 |
| 2 | 3,5 | BS2 | 2 | BS'2 | 3 | BS''2 | 5,5 |
| 3 | 6,5 | BS3 | 1,5 | BS'3 | 5,5 | BS''3 | 6 |
| 4 | 4,5 | BS4 | 1,5 | BS'4 | 4 | BS''4 | 5,5 |
| 5 | 6 | BS5 | 2 | BS'5 | 1,5 | BS''5 | 1,5 |
| 6 | 3,5 | BS6 | 4 | BS'6 | 5,5 | BS''6 | 6 |
| 7 | 6,5 | BS7 | 3 | BS'7 | 3,5 | BS''7 | 4,5 |
| 8 | 4,5 | BS8 | 2,5 | BS'8 | 5 | BS''8 | 5 |
| 9 | 5,5 | BS9 | 2 | BS'9 | 3,5 | BS''9 | 4,5 |
| 10 | 4,5 | BS10 | 3 | BS'10 | 4,5 | BS''10 | 4,5 |
| 11 | 3,5 | BS11 | 2,5 | BS'11 | 3,5 | BS''11 | 2,5 |
| 12 | 5,5 | BS12 | 3 | BS'12 | 2,5 | BS''12 | 5,5 |
| Moyenne | 05 | Moyenne | 2,5 | Moyenne | 4 | Moyenne | 4,5 |

Tableau n° 12 - Poids de la cire produite par l'abeille en fonction des concentrations de *P. aeruginosa*

| Témoïn | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C1 (0,4 mg/mL) | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C2 (0,33 mg/mL) | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3 (0,22 mg/mL) | |
|-----------------|-----------|---|-----------|--|-----------|--|-----------|
| Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) |
| 1 | 0,0192 | P'1 | 0,0110 | P''1 | 0,0073 | P1 | 0,0038 |
| 2 | 0,0185 | P'2 | 0,0148 | P''2 | 0,0098 | P2 | 0,0050 |
| 3 | 0,0250 | P'3 | 0,0086 | P''3 | 0,0065 | P3 | 0,0024 |
| 4 | 0,0117 | P'4 | 0,0112 | P''4 | 0,0074 | P4 | 0,0038 |
| 5 | 0,0182 | P'5 | 0,0111 | P''5 | 0,0088 | P5 | 0,0037 |
| 6 | 0,0178 | P'6 | 0,0120 | P''6 | 0,0073 | P6 | 0,0038 |
| 7 | 0,0185 | P'7 | 0,0122 | P''7 | 0,0060 | P7 | 0,0034 |
| 8 | 0,0162 | P'8 | 0,0135 | P''8 | 0,0072 | P8 | 0,0037 |
| 9 | 0,0176 | P'9 | 0,0182 | P''9 | 0,0082 | P9 | 0,0043 |
| 10 | 0,0208 | P'10 | 0,0120 | P''10 | 0,0071 | P10 | 0,0037 |
| 11 | 0,0180 | P'11 | 0,0118 | P''11 | 0,0075 | P11 | 0,0040 |
| 12 | 0,0190 | P'12 | 0,0156 | P''12 | 0,0074 | P12 | 0,0074 |
| Moyenne | 0,019 | Moyenne | 0,0127 | Moyenne | 0,0075 | Moyenne | 0,0040 |
| Moyenne ± SD | 0,003 | Moyenne ± SD | 0,002 | Moyenne ± SD | 0,001 | Moyenne ± SD | 0,001 |

Tableau n° 13 - Nombre des lames cirières issues de l'abeille domestique en fonction des concentrations de *Pseudomonas aeruginosa*

| Témoïn | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C1 (0,4 mg/mL) | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C2 (0,33 mg/mL) | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3 (0,22 mg/mL) | |
|---------|------------------|---|------------------|--|------------------|--|------------------|
| Cagette | Nombre des lames | Cagette | Nombre des lames | Cagette | Nombre des lames | Cagette | Nombre des lames |
| 1 | 6 | BS1 | 4 | BS'1 | 4,5 | BS''1 | 2,5 |
| 2 | 3,5 | BS2 | 2 | BS'2 | 3 | BS''2 | 5,5 |
| 3 | 6,5 | BS3 | 1,5 | BS'3 | 5,5 | BS''3 | 6 |
| 4 | 4,5 | BS4 | 1,5 | BS'4 | 4 | BS''4 | 5,5 |
| 5 | 6 | BS5 | 2 | BS'5 | 1,5 | BS''5 | 1,5 |
| 6 | 3,5 | BS6 | 4 | BS'6 | 5,5 | BS''6 | 6 |
| 7 | 6,5 | BS7 | 3 | BS'7 | 3,5 | BS''7 | 4,5 |
| 8 | 4,5 | BS8 | 2,5 | BS'8 | 5 | BS''8 | 5 |
| 9 | 5,5 | BS9 | 2 | BS'9 | 3,5 | BS''9 | 4,5 |
| 10 | 4,5 | BS10 | 3 | BS'10 | 4,5 | BS''10 | 4,5 |
| 11 | 3,5 | BS11 | 2,5 | BS'11 | 3,5 | BS''11 | 2,5 |
| 12 | 5,5 | BS12 | 3 | BS'12 | 2,5 | BS''12 | 5,5 |
| Moyenne | 05 | Moyenne | 2,5 | Moyenne | 4 | Moyenne | 4,5 |

Tableau n° 14 - Quantité des protéines secrétées par d'abeille domestique traitée par *B. subtilis*

| Témoin | | <i>Bacillus subtilis</i> C1 (0,72 mg/ml) | | <i>Bacillus subtilis</i> C2 (0,50 mg/ml) | | <i>Bacillus subtilis</i> C3 (0,35 mg/ml) | |
|------------|---------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|
| Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) |
| Moyenne | 1,36 | Moyenne | 1,21 | Moyenne | 1,32 | Moyenne | 1,24 |
| Ecart-type | 0,01 | Ecart-type | 0,034 | Ecart-type | 0,03 | Ecart-type | 0,02 |

Tableau n° 15 - Diamètre des acini des glandes hyopharyngiennes traitées par *B. subtilis*

| | Les diamètres de la glande hyopharyngienne (mean \pm s.e) | | | |
|------------------------|---|---|---|---|
| | Témoin | <i>Bacillus subtilis</i> C1 (0,72 mg/mL) | <i>Bacillus subtilis</i> C2 (0,50 mg/mL) | <i>Bacillus subtilis</i> C3 (0,35 mg/mL) |
| Longueur μm | 97,29 \pm 2,37 | 85,75 \pm 2,22 | 94,43 \pm 2,31 | 88,87 \pm 2,13 |
| Largeur μm | 75,96 \pm 2,00 | 63,21 \pm 2,07 | 75,45 \pm 2,013 | 67,08 \pm 2,04 |

Tableau n° 16 - Analyse de la variance des acini d'abeille domestique en fonction des concentrations *B.subtilis*

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ord. origine | 157428,4 | 1 | 157428,4 | 22640,46 | 0,0001 |
| traitement | 3282,8 | 7 | 469,0 | 67,44 | 0,000000 |
| Erreur | 111,3 | 16 | 7,0 | | |

Tableau n° 17 - Quantité de protéines secrétées par l'abeille domestique traitée par *B. cereus*

| Témoin | | <i>Bacillus cereus</i> C1 (0,4 mg/mL) | | <i>Bacillus cereus</i> C2 (0,35 mg/mL) | | <i>Bacillus cereus</i> C3 (0,22 mg/mL) | |
|------------|---------------|--|---------------|---|---------------|---|---------------|
| Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) |
| Moyenne | 1,38 | Moyenne | 1,36 | Moyenne | 1,20 | Moyenne | 1,34 |
| Ecart-type | 0,02 | Ecart-type | 0,01 | Ecart-type | 0,03 | Ecart-type | 0,01 |

Tableau n° 18 - Diamètre des acini du glande hyopharyngien traitée par *B. cereus*

| | Les diamètres de la glande hyopharyngienne (mean ± s.e) | | | |
|----------|---|--|---|---|
| | Témoin | <i>Bacillus cereus</i> C1 (0,4 mg/mL) | <i>Bacillus cereus</i> C2 (0,35 mg/mL) | <i>Bacillus cereus</i> C3 (0,22 mg/mL) |
| Longueur | 98,79 ± 3,13 | 93,55 ± 2,54 | 85,06 ± 2,42 | 94,95 ± 2,43 |
| Largeur | 76,64 ± 2,16 | 75,90 ± 2,11 | 64,17 ± 2,05 | 67,08 ± 2,08 |

Tableau n° 19 - Analyse de la variance des acini d'abeille domestique en fonction des concentrations *B.cereus*

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ord. origine | 163863,6 | 1 | 163863,6 | 19017,78 | 0,0001 |
| traitement | 3389,6 | 7 | 484,2 | 56,20 | 0,000000 |
| Erreur | 137,9 | 16 | 8,6 | | |

Tableau n° 20 - Quantité de protéine d'abeille domestiques traitée par *Pseudomonas aeruginosa*

| Témoin | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C1 (0,4 mg/mL) | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C2 (0,33 mg/mL) | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3 (0,22 mg/mL) | |
|------------|------------------|---|------------------|--|------------------|--|------------------|
| Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) |
| Moyenne | 1,42 | Moyenne | 1,37 | Moyenne | 1,33 | Moyenne | 1,19 |
| Ecart-type | 0,02 | Ecart-type | 0,02 | Ecart-type | 0,01 | Ecart-type | 0,03 |

Tableau n° 21 - Analyse de la variance des acini d'abeille domestique traitée par *P. aeruginosa*

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ord. origine | 160389,4 | 1 | 160389,4 | 23670,73 | 0,0001 |
| traitement | 4000,5 | 7 | 571,5 | 84,34 | 0,000000 |
| Erreur | 108,4 | 16 | 6,8 | | |

Tableau n° 22 - Diamètre des acini de la glande hyopharyngienne traitée par *Pseudomonas aeruginosa*

| Les diamètres de la glande hyopharyngienne (mean \pm se) | | | | |
|--|------------------|---|--|---|
| | Témoin | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C1 (0,4 mg/mL) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C2 (0,33 mg/mL) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3 (0,22 mg/mL) |
| Longueur | 99,45 \pm 2,36 | 95,94 \pm 2,28 | 93,14 \pm 2,22 | 84,00 \pm 2,07 |
| Largeur | 77,34 \pm 2,01 | 74,84 \pm 2,04 | 68,49 \pm 2,02 | 60,75 \pm 1,95 |

Tableau n° 24 - Quantité de la cire d'abeille domestique avant (*B.subtilis* C1) et après le traitement par le produit E.M-A.

| Témoin | | <i>Bacillus subtilis</i> C1 (0,72 mg/mL) | | Après le traitement par E.M-A. | |
|------------------|-----------|---|-----------|-----------------------------------|-----------|
| Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) |
| 1 | 0,0179 | BS'1 | 0,0090 | E.M-A1 | 0,0060 |
| 2 | 0,0172 | BS'2 | 0,0082 | E.M-A2 | 0,0049 |
| 3 | 0,0166 | BS'3 | 0,0083 | E.M-A3 | 0,0126 |
| 4 | 0,0172 | BS'4 | 0,0082 | E.M-A4 | 0,0060 |
| 5 | 0,0178 | BS'5 | 0,0093 | E.M-A5 | 0,0124 |
| 6 | 0,0157 | BS'6 | 0,0092 | E.M-A6 | 0,0128 |
| 7 | 0,0172 | BS'7 | 0,0079 | E.M-A7 | 0,0123 |
| 8 | 0,0167 | BS'8 | 0,0090 | E.M-A8 | 0,0061 |
| 9 | 0,0173 | BS'9 | 0,0096 | E.M-A9 | 0,0123 |
| 10 | 0,0172 | BS'10 | 0,0093 | E.M-A10 | 0,0061 |
| 11 | 0,0166 | BS'11 | 0,0080 | E.M-A11 | 0,0122 |
| 12 | 0,0175 | BS'12 | 0,0091 | E.M-A12 | 0,0061 |
| Moyenne | 0,0170 | Moyenne | 0,0087 | Moyenne | 0,0091 |
| Moyenne \pm SD | 0,0006 | Moyenne \pm SD | 0,0005 | Moyenne \pm SD | 0,003 |

Tableau n° 25 - Quantité de la cire d'abeille domestique avant (*B.cereus* C1) et après le traitement par le produit M.E-Activé

| Témoin | | <i>Bacillus cereus</i> C1 (0,4 mg/ml) | | Après le traitement par E.M-A. | |
|----------------|------------|--|------------|-----------------------------------|------------|
| Cagette | Poids (mg) | Cagette | Poids (mg) | Cagette | Poids (mg) |
| 1 | 0,0172 | BC'1 | 0,0040 | E.M-A1 | 0,0187 |
| 2 | 0,0157 | BC'2 | 0,0042 | E.M-A2 | 0,0172 |
| 3 | 0,0173 | BC'3 | 0,0035 | E.M-A3 | 0,0179 |
| 4 | 0,0126 | BC'4 | 0,0032 | E.M-A4 | 0,0185 |
| 5 | 0,0152 | BC'5 | 0,0039 | E.M-A5 | 0,0175 |
| 6 | 0,0157 | BC'6 | 0,0036 | E.M-A6 | 0,0166 |
| 7 | 0,0176 | BC'7 | 0,0038 | E.M-A7 | 0,0169 |
| 8 | 0,0173 | BC'8 | 0,0042 | E.M-A8 | 0,0168 |
| 9 | 0,0167 | BC'9 | 0,0040 | E.M-A9 | 0,0184 |
| 10 | 0,0136 | BC'10 | 0,0034 | E.M-A10 | 0,0163 |
| 11 | 0,0168 | BC'11 | 0,0039 | E.M-A11 | 0,0167 |
| 12 | 0,0185 | BC'12 | 0,0042 | E.M-A12 | 0,0179 |
| Moyenne | 0,0161 | Moyenne | 0,0038 | Moyenne | 0,0174 |
| Moyenne ±SD | 0,001 | Moyenne ±SD | 0,0003 | Moyenne ±SD | 0,0008 |

Tableau n° 27 - Quantité de la cire d'abeilles domestiques avant (*P.aeruginosa* C3) et après le traitement par le produit E.M-Activé.

| Témoin | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3 (0,22 mg/ml) | | Après le traitement par E.M-A. | |
|----------------|-----------|--|-----------|-----------------------------------|-----------|
| Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) | Cagette | Poids (g) |
| 1 | 0,0272 | P'1 | 0,0038 | E.M-A1 | 0,0155 |
| 2 | 0,0170 | P'2 | 0,0050 | E.M-A2 | 0,0147 |
| 3 | 0,0126 | P'3 | 0,0024 | E.M-A3 | 0,0149 |
| 4 | 0,0272 | P'4 | 0,0038 | E.M-A4 | 0,0149 |
| 5 | 0,0168 | P'5 | 0,0037 | E.M-A5 | 0,0148 |
| 6 | 0,0187 | P'6 | 0,0038 | E.M-A6 | 0,0152 |
| 7 | 0,0127 | P'7 | 0,0034 | E.M-A7 | 0,0130 |
| 8 | 0,0146 | P'8 | 0,0037 | E.M-A8 | 0,0128 |
| 9 | 0,0257 | P'9 | 0,0043 | E.M-A9 | 0,0129 |
| 10 | 0,0265 | P'10 | 0,0037 | E.M-A10 | 0,0149 |
| 11 | 0,0262 | P'11 | 0,0040 | E.M-A11 | 0,0131 |
| 12 | 0,0158 | P'12 | 0,0074 | E.M-A12 | 0,0149 |
| Moyenne | 0,0201 | Moyenne | 0,0040 | Moyenne | 0,0143 |
| Moyenne ±SD | 0,006 | Moyenne ±SD | 0,001 | Moyenne ±SD | 0,001 |

Tableau n° 29 - Quantités de protéines contenues dans la glande G.H.P. des abeilles domestiques avant (*B.subtilis* C1) et après le traitement par la biopesticide E.M-A.

| Témoin | | <i>Bacillus subtilis</i> C1 (0,72 mg/mL) | | Après le traitement par E.M-A. | |
|------------|---------------|---|---------------|--------------------------------|---------------|
| Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) |
| Moyenne | 1,83 | Moyenne | 1,21 | Moyenne | 1,57 |
| Ecart-type | 0,024 | Ecart-type | 0,007 | Ecart-type | 0,035 |

Tableau n° 30 - Quantité de protéines contenues dans la glande G.H.P. d'abeilles domestiques avant (*B.cereus* C2) après le traitement par le produit E.M-A.

| Témoin | | <i>Bacillus cereus</i> C2 (0,35 mg/mL) | | Après le traitement par E.M-A | |
|------------|---------------|---|---------------|-------------------------------|---------------|
| Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) |
| Moyenne | 1,74 | Moyenne | 1,20 | Moyenne | 1,53 |
| Ecart-type | 0,028 | Ecart-type | 0,014 | Ecart-type | 0,004 |

Tableau n° 31 - Quantité de protéines contenues dans la glande G.H.P. des abeilles domestiques avant (*P.aeruginosa* C3) et après le traitement par la biopesticide E.M-A

| Témoin | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3 (0,30 mg/mL) | | Après le traitement | |
|------------|---------------|--|---------------|---------------------|---------------|
| Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) | Cagette | Quantité (mg) |
| Moyenne | 1,70 | Moyenne | 1,19 | Moyenne | 1,46 |
| Ecart-type | 0,025 | Ecart-type | 0,007 | Ecart-type | 0,022 |

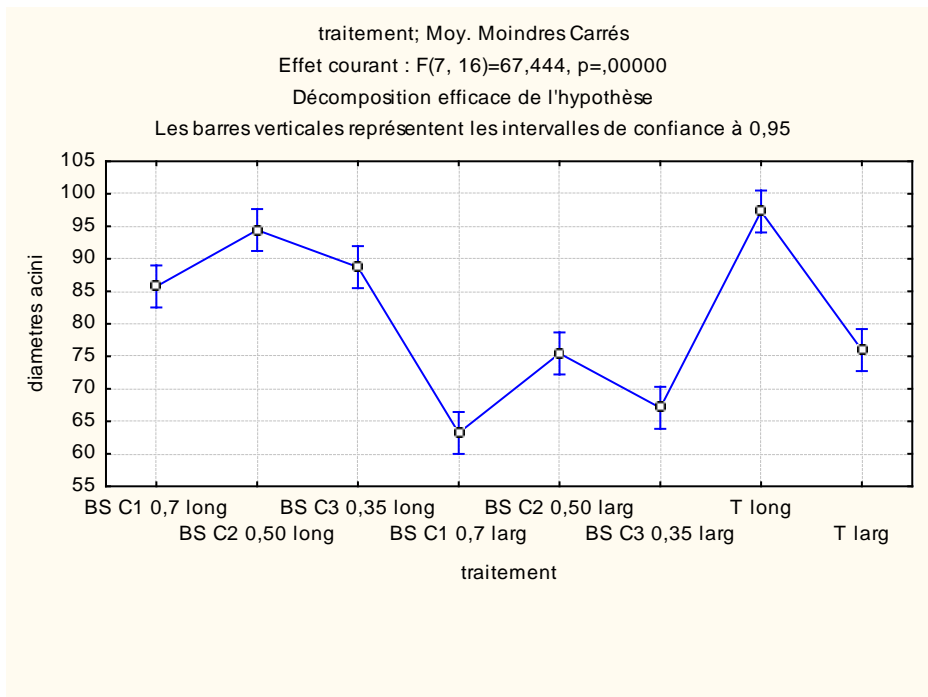


Fig. 64 - Moyenne des acini d'abeilles domestiques en fonction des doses en *Bacillus subtilis*

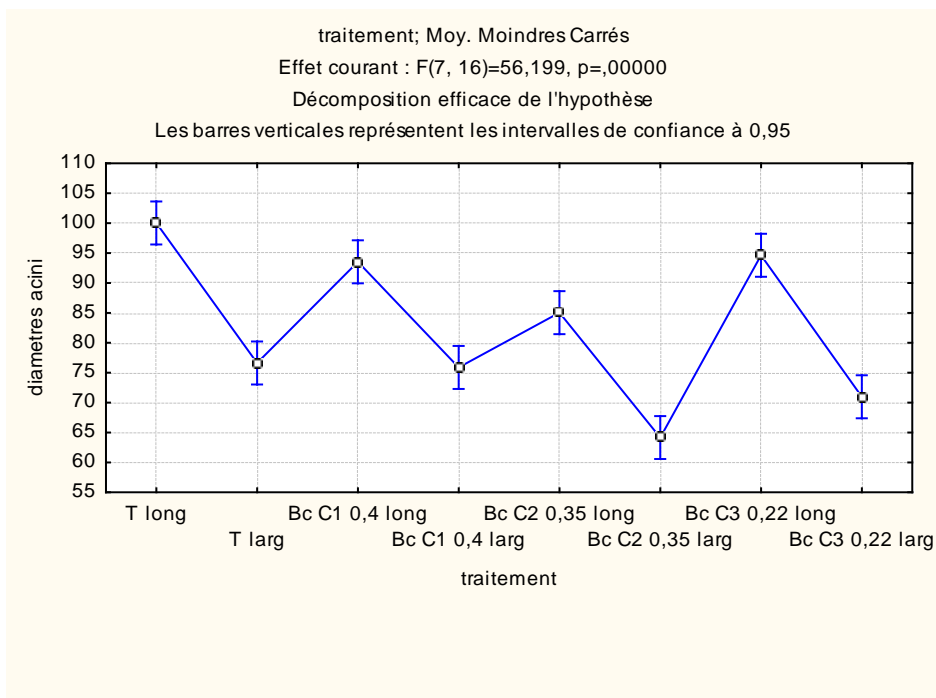


Fig. 67 - Moyenne des acini d'abeilles domestiques en fonction des doses en *Bacillus cereus*

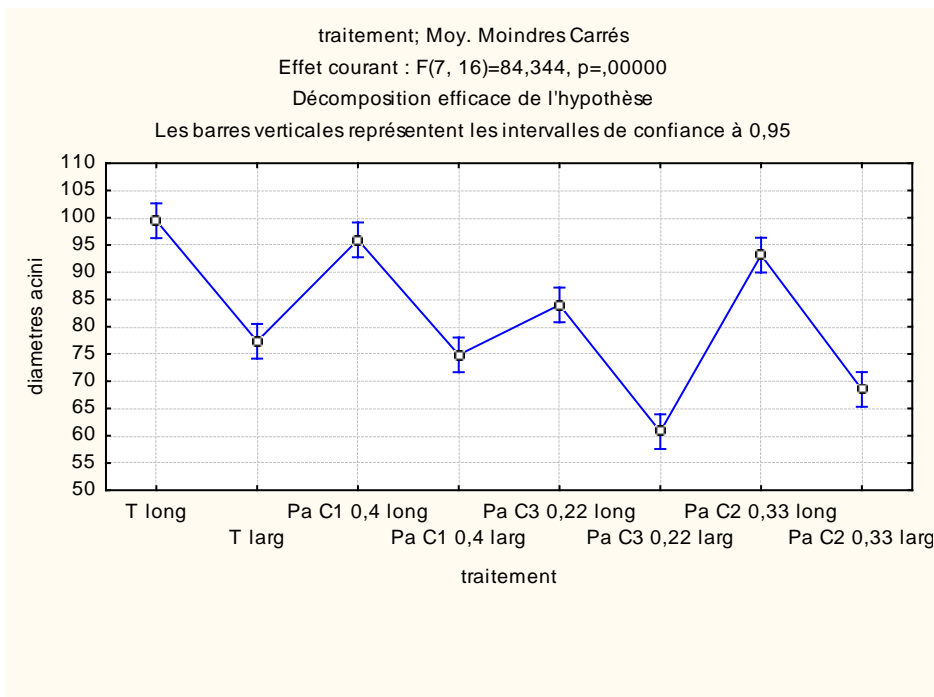


Fig. 69 - Moyenne des acini d'abeilles domestiques en fonction des concentrations en *Pseudomonas aeruginosa*

Résumé

Titre - Importance de l'action de quelques espèces de bactéries entomopathogènes sur certaines glandes de l'abeille domestique *Apis mellifera* -possibilités de traitements

Résumé

L'objectif de cette étude est de montrer l'effet de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et de *Pseudomonas aeruginosa* sur l'activité des deux glandes cirière et hypophrygienne d'*Apis mellifera*. L'effet de ces bactéries contre la quantité de cire est en relation directes avec la concentration utilisée. En effet, les concentrations de *B. subtilis* ($C_1 = 0,72$ mg/mL), *B. cereus* ($C_1 = 0,4$ mg/mL) et de *P. aeruginosa* ($C_3 = 0,22$ mg/mL). Pour les trois bactéries choisies, nous avons assisté à la plus faible quantité de cire produite par les abeilles traitées. Pour ce qui est de la quantité des protéines sécrétées par ces acini, c'est la concentration, ($C_1 = 0,72$ mg/mL) de *B. subtilis*, ($C_2 = 0,35$ mg/mL) de *B. cereus* et C_3 ($C_2 = 0,22$ mg/mL) *P. aeruginosa* qui présentent les valeurs les plus faibles en protéine soit 1,21mg, 1,20mg, et 1,19mg, respectivement. En ce qui concerne, les diamètres des acini de la glande hypophrygienne, nous avons remarqué que le plus petit diamètre est enregistré au niveau des abeilles traitées par la concentration (C_3) de *P. aeruginosa* ($84,00 \pm 2,07\mu\text{m}$ pour la longueur / $60,75 \pm 1,95\mu\text{m}$ pour la largeur).

Cette étude est poursuivie par l'essai d'un nouveau biopesticide produit à base de micro-organismes E.M-A. contre ces trois bactéries entomopathogènes. Après le traitement par le biopesticide, la quantité des protéines produite est de 1,57mg/10 abeilles, enregistrée pour les abeilles traitées en concentration ($C_3 = 0,22$ mg/mL) de *P. aeruginosa*. Ce qui révèle un effet positif de de produit contre cette bactérie.

Le test de sensibilité de *Bifidobacterium*; isolé de ces abeilles; contre quelques antibiotiques a montré que *Bifidobacterium* sp. est résistante pour quelques antibiotiques notamment la vancomycine, la tétracycline et la Kanamycine.

Mots clés : *Apis mellifera*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, E.M., *Bifidobacterium*

عنوان - أهمية تأثير بعض أنواع البكتيريا المسببة للأمراض الحشرات على بعض عدد نحلة *Apis mellifera* - إمكانية العلاج.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو إظهار تأثير باسيلس الرقيقة، باسيلس سيريس والزائفة الزنجارية على نشاط اثنين من عدد الشمعية ومنتجة البروتينات لنحلة أبيس (*Apis mellifera*). تأثير هذه البكتيريا ضد كمية الشمع المنتجة في علاقة مباشرة مع تراكيز المستخدمة في الواقع، تركيزات باسيلس الرقيقة ($C1 = 0,72$) ملغ / مل، باسيلس الشمعية ($C1 = 0,4$) ملغ / مل والزائفة الزنجارية ($C3 = 0,22$) ملغ / مل. للبكتيريا الثلاثة المختارة، رأينا أقل كمية من الشمع التي تنتجها النحل المعالجة. من حيث كمية البروتينات التي تفرزها هذه عنبيات، التركيز ($C1 = 0,72$) ملغ / مل باسيلس الرقيقة،

($C2 = 0,35$) ملغ / مل من باسيلس سيريس و ($C2 = 0,22$) $C3$ ملغ / مل من الزائفة الزنجارية التي تظهر أدنى القيم في البروتين الذي هو 21,1 mg، 1,20 mg و 1,19 mg، على التوالي. وفيما يتعلق بأقطار من عنبيات غدة البروتينات، لاحظنا أن يتم تسجيل أصغر القطر عند النحل معالجتها بواسطة تركيز ($C3$) من الزائفة الزنجارية ($84,00 \pm 2,07$) ميكرومتر للطول / 1,95 \pm 60,75 ميكرومتر إلى العرض).

وهذه الدراسة مستمرة باختبار المنتج الطبيعي وحيوي جديد يقوم على الكائنات الحية الدقيقة أ.و.م. ضد هذه البكتيريا الممرضة الثلاثة. بعد العلاج مع منتج الحيوي، كمية البروتينات المنتجة 1,57 ملغ / 10 النحل. الكمية مسجلة لتركيز المعالجة ($C3 = 0,22$) ملغ / مل من الزائفة الزنجارية. هذا يكشف له أثر إيجابي من الناتج ضد هذه البكتيريا. اختبار حساسية بيفيدوس. المعزولة من هذه النحل. ضد بعض المضادات الحيوية أظهرت أن البيفيدوس. مقاومة للبعض المضادات الحيوية بما في ذلك فانكوميسين، النتراسيكلين والكاناميسين.

كلمات المفتاح: الرقيقة، أبيس، الزائفة الزنجارية، الزائفة الزنجارية، أ.و.م.، بيفيدوس

Title - Importance of the action of some species of entomopathogenic bacteria on some glands of the honey bee *Apis mellifera* -possibilities of treatments.

Summary

The objective of this study is to show the effect of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* on the activity of the two glands wax gland and Hypopharyngeal of *Apis mellifera*. The effect of these bacteria against the amount of wax is directly related to the concentration used. In fact, the concentrations of *B. subtilis* (C1 = 0.72 mg / mL), *B. cereus* (C1 = 0.4 mg / mL) and *P. aeruginosa* (C3 = 0.22 mg / mL). For the three selected bacteria, we witnessed the lowest amount of wax produced by the treated bees. As for the amount of proteins secreted by these acini, it is the concentration of *B. subtilis* (C1 = 0.72 mg / mL), (C2 = 0.35 mg / mL) of *B. cereus* and C3 (C2 = 0.22 mg / mL) *P. aeruginosa* which have the lowest protein values of 1.21mg 1.20mg and 1,19mg respectively. As for the diameters of the acini of the hypophyseal gland, we observed that the smallest diameter is recorded in the bees treated with the concentration (C3) of *P. aeruginosa* ($84.00 \pm 2.07\mu\text{m}$ for length / $60.75 \pm 1.95\mu\text{m}$ for the width).

This study is continued by testing a new biopesticide produced from microorganisms E.M-A. Against these three entomopathogenic bacteria. After treatment with biopesticide, the amount of proteins produced was 1.57mg / 10 bees, recorded for treated bees in *P. aeruginosa* concentration (C3 = 0.22 mg / mL). This reveals a positive effect of product against this bacterium.

The sensitivity test of *Bifidobacterium*; Isolated from these bees; Against some antibiotics showed that *Bifidobacterium* sp. Is resistant to some antibiotics including vancomycin, tetracycline and Kanamycin.

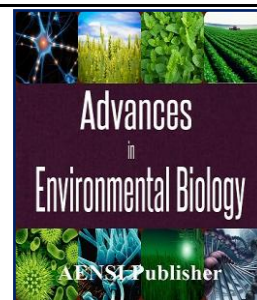
Keywords : *Apis mellifera*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, E.M., *Bifidobacterium*



AENSI Journals

Advances in Environmental Biology

ISSN-1995-0756 EISSN-1998-1066

Journal home page: <http://www.aensiweb.com/AEB/>

Importance and Counting of Some Probiotic Bacteria Isolated From Honey and Honeybees *Apis mellifera* in Algeria. Case of *Bifidobacterium*

¹Guerzou Mokhtar, ²Doumandji Amel, ³Guerzou Ahlem, ⁴Koudjil Mohamed, ¹Doumandji Salaheddine

¹Department of Agricultural and Forest Zoology, Agronomical National High School, El Harrach.

²Faculty of Agro-veterinary Sciences, University of Blida.

³Faculty of Sciences of Nature and Life, University of Djelfa.

⁴Institute of Agricultural Sciences, University of Chlef.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2015

Accepted 28 July 2015

Available online 5 August 2015

Keywords:

Apis mellifera, probiotic, bifidobacteria, isolation, counting.

ABSTRACT

This experiment was carried out to count and identify colonies of bifidobacteria isolated from digestive tracts and honeys of *Apis mellifera mellifera* (dominant subspecies of Apidae in Algeria). Identification of these bacteria is made with help of biochemical tests notably the GRAM staining, Catalase test and test of Api 20. Those tests have confirmed that it is the genus *bifidobacterium*. The higher number of colonies is noted at the level of digestive tracts 75×10^4 CFU/ml. While the weakest number that one enumerated in oesophagus of 4×10^2 CFU/ml. For honey, we noticed that bifidobacteria appear $1, 5 \times 10$ CFU/ml.

© 2015 AENSI Publisher All rights reserved.

To Cite This Article: Guerzou Mokhtar, Doumandji Amel, Guerzou Ahlem, Koudjil Mohamed, Doumandji Salaheddine, Importance and Counting of Some Probiotic Bacteria Isolated From Honey and Honeybees *Apis mellifera* in Algeria. Case of *Bifidobacterium*. *Adv. Environ. Biol.*, 9(11), 174-180, 2015

INTRODUCTION

The bifidobacteria play a fundamental role in human health [1,15]. They take part in decrease of cholesterol level [22,12], in treatment for eczema [8]. Likewise, Seki *et al.*, [25] highlighted part of *Bifidobacterium* in treatment of elderly people constipation. So, these bacteria contribute in regularising of digestive transit [13,16,7]. This same effect was demonstrated in pregnant women by Ebissawa *et al.* [6]. They also participate in production of vitamins [21,9]. In Algeria, Tabak et Bensoltane [27] revealed importance of bifidobacteria that are gastroduodenal diseases. Isolation of bifidobacteria is essentially isolate from mammals [28,10,14], from poultry in hen faeces (Scardovi and Trovatelli 1969; Trovatelli *et al.*, 1974; Scardovi, 1986) but also from insects notably *Bombus* spp. [18] and *Apis mellifera* [11,19]. They are also introduced in Agro-Food Industry [29]. In Algeria, microbiological aspect of honeys and isolation of bacteria from bee intestine have not been previously studied. This study may be considered as the first approach of its kind in this area.

MATERIAL AND METHODS

We have isolated intestines of 25 bees and separated oesophagus and digestive tracts (Figure1) which are transferred in MRS broth to incubate them at 37°C during 18 hours. This operation is made for honey harvested from the same hive in which are selected the tested bees. After incubation of 18 hours, we obtain therefore a series of three tubes of pre enriched solution with 10^{-1} dilution (Figure 2 a). Then we prepare dilutions of 10^{-1} à 10^{-9} . These dilutions are sown in depth in MRS Gelose. The colonies of bifidobacteria are obtained after incubation at 37°C during 48 hours. Counting is made after 18h, 24h and 48h (Figure 2 b). The colonies should be tested by microscope in order to define their general forms. The GRAM staining is necessary to determine at which group belong the bacteria isolated, positive Gram or negative, general characteristics which help for identification. Counting of bacteria colonies is important to know CFU by sample Milliliters. So biochemical tests are carried out to achieve the definitive identification of microorganisms isolated.

Corresponding Author: Guerzou Mokhtar, Department of Agricultural and Forest Zoology, Agronomical National High School, El Harrach.

Results:**1 - Counting of Bifidobacteria in digestive tracts, oesophagus and honeys of Apis mellifera:****Table 1:** Results of Bifidobacteria's counting in digestive tracts, oesophagus and bee honeys

| Levels | Hours | D ¹ | D ² | D ³ | D ⁴ | D ⁵ | D ⁶ | D ⁷ | D ⁸ | D ⁹ |
|-----------------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Digestive tract | After 18h | Un. | Un. | Un. | 75 | - | - | - | - | - |
| | After 24h | Un. | Un. | Un. | 36 | - | - | - | - | - |
| | After 48h | Un. | Un. | Un. | 58 | - | - | - | - | - |
| Oesophagus | After 18h | Un. | Un. | 50 | - | - | - | - | - | - |
| | After 24h | 40 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | After 48h | 30 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Honey | After 18h | 15 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | After 24h | Un. | Un. | Un. | 50 | - | - | - | - | - |
| | After 48h | Un. | Un. | Un. | Un. | Un. | 30 | - | - | - |

D ; dilution, Un : uncountable,

Installation of probiotic flora (Bifidobacteria) is noted at level of digestive tract of 75×10^4 CFU /ml, by contrast the number is less important at level of oesophagus of 4×10^2 CFU /ml. As for honey, we have noticed that bifidobacteria appear since 18 hours of $1, 5 \times 10$ CFU /ml. So their number is increasing over time (Figure 3a, 3b and 3c).

2 - Morphological characteristics and Gram staining of bifidobacteria obtained:

The cultured bacteria on MRS Gelose are of white colour. They take the form in V or Y (Figure 4). Through a microscope, we note that they take up the crystal violet used in the Gram staining test which indicate Gram-positive bacteria.

3 - Results of biochemical tests of the APi 20 E:

The API 20 E includes 20 micro-tubes containing dehydrated substrates. Tests are inoculated with bacterial suspension which replenishes the environment. These tests are: The bacterial suspension is inoculated with tests CIT, VP, GEL. The anaerobic is created with tests ADH, LDC, ODC, URE, H₂S in fulfilling their cup with paraffin oil. The incubation is set at 35-37°C during 18 to 24 h. Through this test, we have been able to identify the gender of *Bifidobacterium* but the species remains always undetermined according to software apiWEB (Figure 5).

4 - Test of Catalase:

The test consists to put bacteria in sufficient quantity in contact of hydrogen peroxide (H₂O₂). If they possess the Catalase, they degrade hydrogen peroxide in water and oxygen visible by formation of bubbles (effervescence). In the present study, we have not noticed effervescence which suggests a negative Catalase (Figure 6).

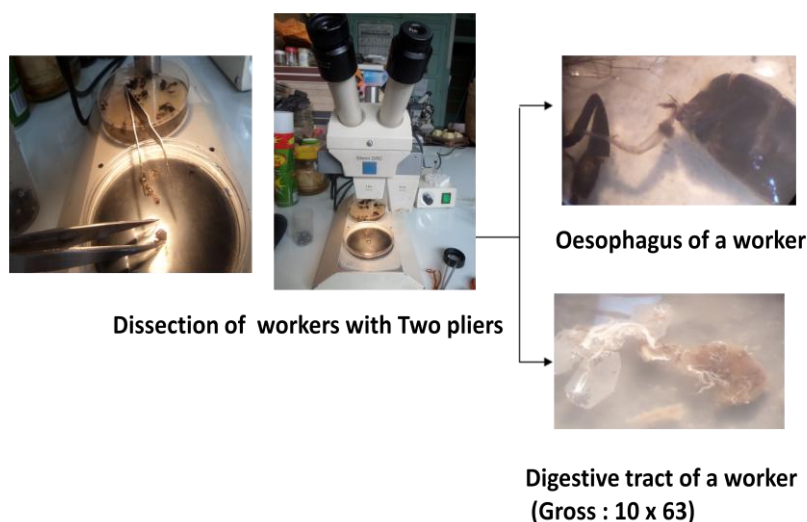


Fig. 1: Steps dissection of worker bees and isolation of the Oesophagus and the digestive tract
(Original photography)

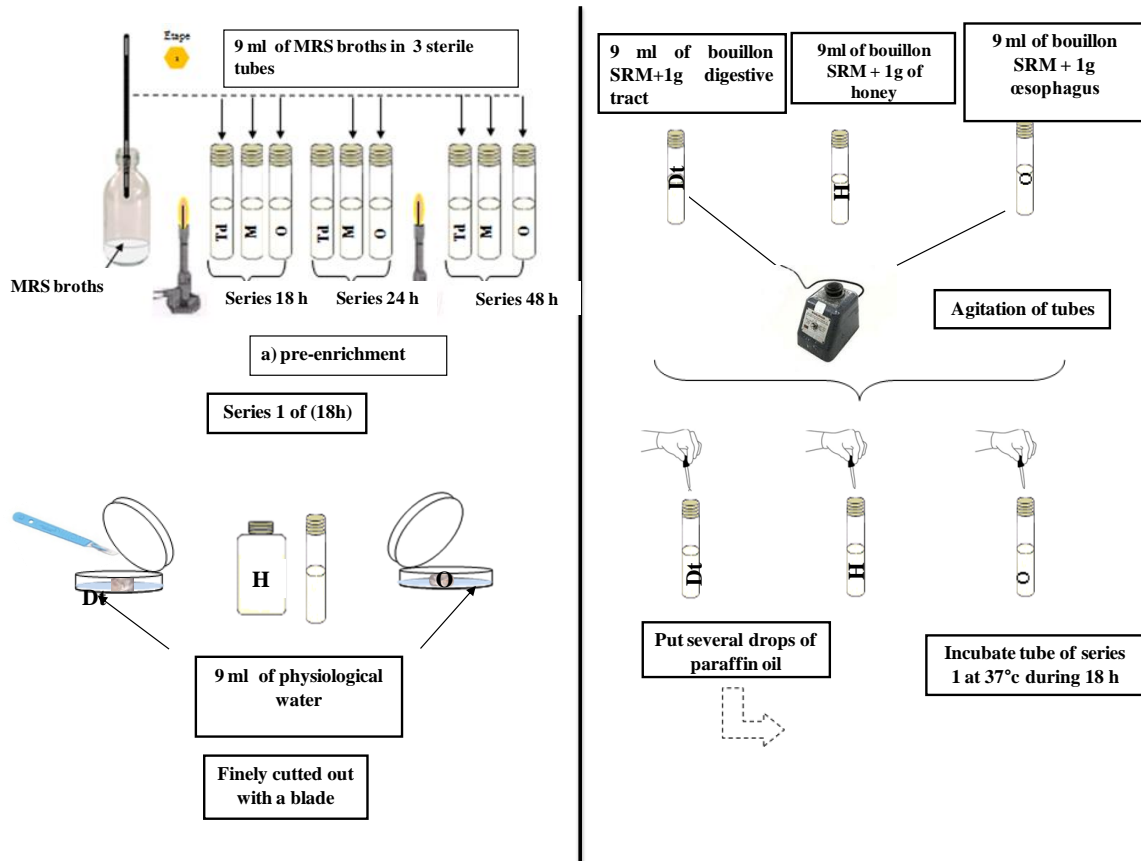


Fig. 2 a : Protocol of isolation of bifidobacteria (Original photography)

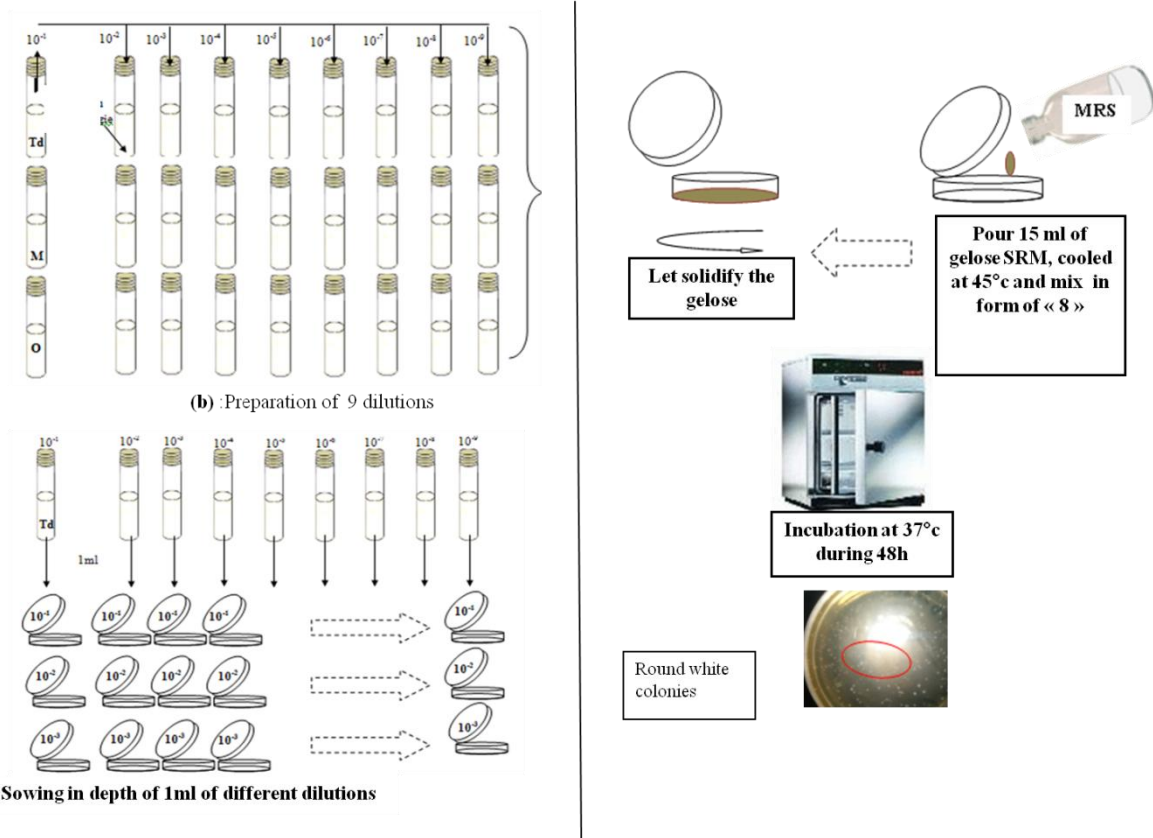


Fig. 2b : Protocol of isolation of bifidobacteria Original photography)

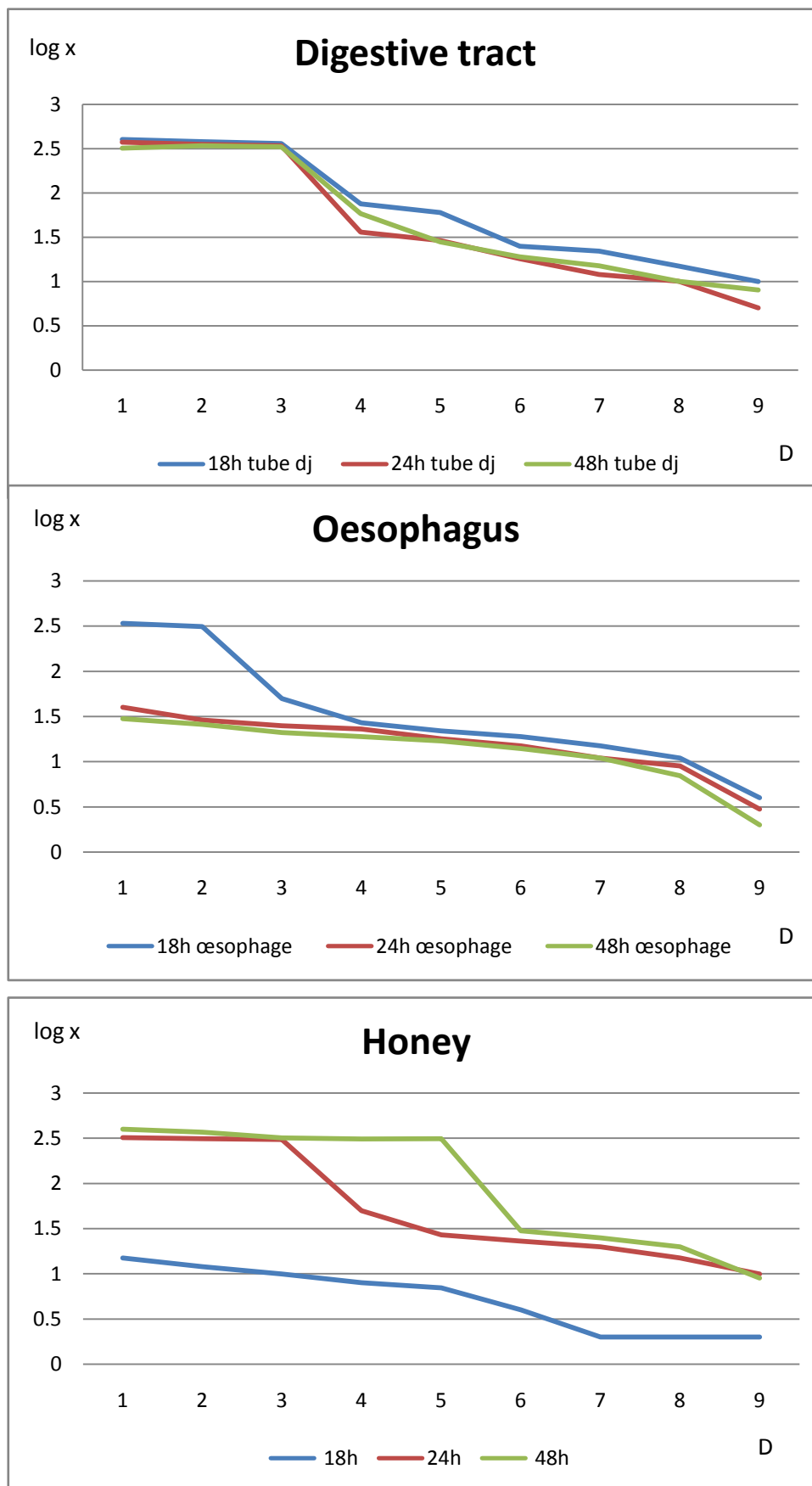


Fig. 3: Evolution of the number of Bifidobacteria in digestive tracts, oesophagus and honeys of *Apis mellifera*

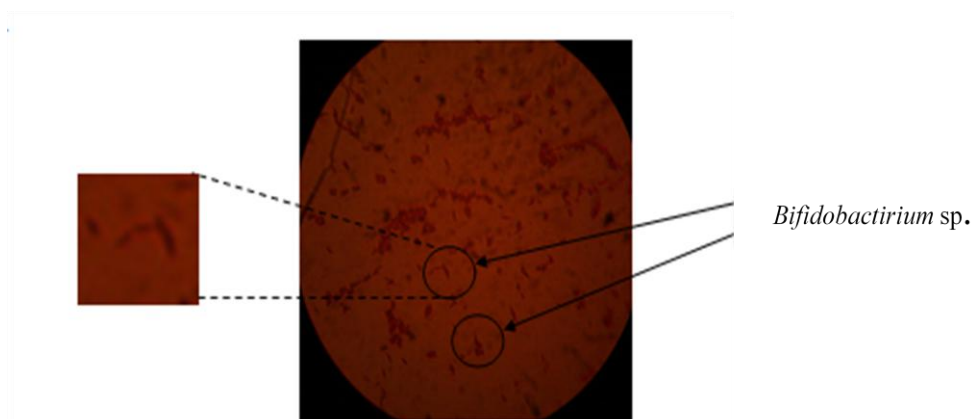


Fig. 4 : Microscopic appearance of Bifidobacteria

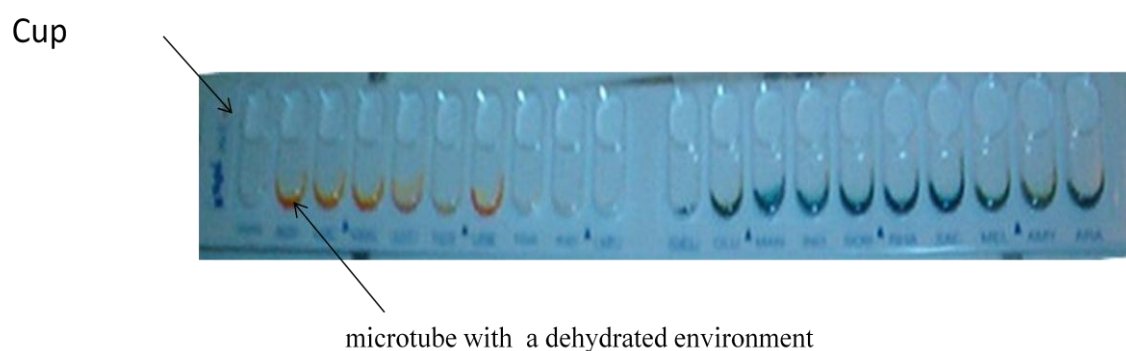


Fig. 5: Biochemical characteristic of Bifidobacteria isolated from digestive tract, oesophagus

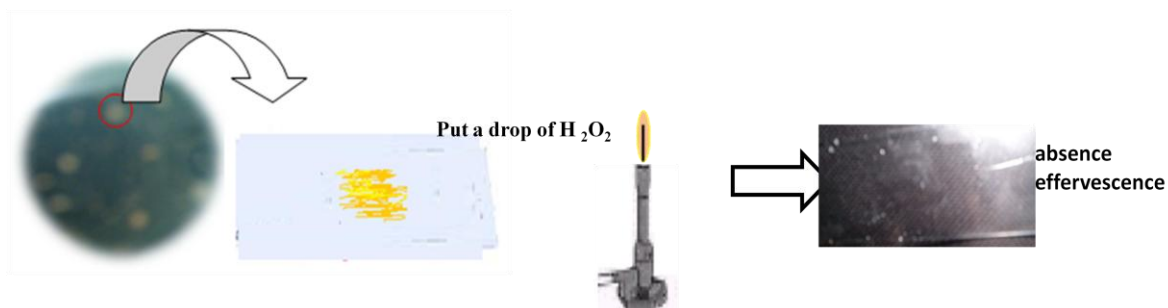


Fig. 6: Négative catalase test

Discussion:

The results of biochemical test of API 20E strip showed that strains isolated from digestive tracts, oesophagus and honeys belong all to genre of *Bifidobacterium* but species remains always undetermined according to software apiWEB version 2.0. The colonies number changes according to tested isolate. It is higher in digestive tract, weak in oesophagus and moderately to strongly noted in honey. Tissier [28] had already noted that installation of Bifidobacteria is made at level of digestive tract which suggests the big number of colonies within the present study (75×10^4 UFC/ml). Scardovi *et al.* [23] had reported that morphological differences of these microorganisms are in right relationship with cultivation environments. By using another environment TPY agar ADSA, Rada and Peter [20] had counted 9.55 CFU/ml at level of honeybees 'rectum.

The microscopic observation showed that sticks of *Bifidobacterium* isolated had two forms, either in Y or in V. That is the form described by Tissier in 1990 for the first time. So Poupard *et al* [17] gathered several forms in which it is possible to visualize bifidobacteria. Among these forms those authors reported Y and V, this polymorphism is also showed by Biavati *et al.* [2]. In turn Ebhodaghe *et al.* [5] showed that structure of *Bifidobacterium* isolated from bees is also of form Y or of V.

This microscopic observation revealed that bacilli isolated are of GRAM +. All authors confirmed that *bifidobacterium* are of GRAM + [26,19,24,2]. As for test of Catalase, the results obtained showed that bacteria did not have power to degrade the H₂O₂ which suggests a negative test. Other works had also reported a negative Catalase [4].

REFERENCES

- Ballongue, J., 1989. Evolution de la taxonomie des bifidobactéries. *Bifidobacterium* et facteurs bifidogènes. Rôle en santé humaine. ARBBA (Ed.). pp: 33-45.
- Biavati, B., B. Sgorbati and V. Scardovi, 2000. The genus *bifidobacterium* in Barlows, A., Truper, H.G., Dworkin, M. and Harder W. : The Prokaryotes- a handbook on the biology of bacteria. Springer- Verlag, New york. pp: 816-833.
- Bivati, B., M. Vescovo, S. Torriani, V. Bottazzi, 2000. Bifidobacteria, history, ecology, physiology and applications. *Annales de microbiology*, 50: 117-131.
- Boutry, E., 1989. Exoglycosidases de *Bifidobacterium bifidum* souche A/A 2/2 : I -optimisation de la production des enzymes en fermenteurs II- Purification et optimisation d'une Alpha D- neuraminidases. Thèse doctorat. Université de Lille Franders Artois.
- Ebhodaghe, S.O., S.H. Abiose and A. Adenarian, 2012. Assemblage of physicochemical characteristics viability and inhibitory effect of bifidobacteria in soymilk. *Journal of food research*, 1(2): 159-170.
- Ebissawa, E., T. Assari, S. Takeda, A. Watanabe, K. Nihei, T. Tamashita, H. Wakiguchi, S. et Watanabe, 1987. Utilisation de lait fermenté additionné de Bifidus Actif chez la femme enceinte. *Médecine et Chirurgie digestives, premier colloque Bifidobacterium longum et santé, Monte Carlo*, 16(3): 9-11.
- Gopal, P.K., J. Prasar, J. Smart and H.S. Gill, 2001. In Vitro adherence of proprieties of *Lactobacillus rahnous* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International journal of Food microbiology*, 67: 207-216.
- Isaulaurt, E., T. Arvola, Y. Sütas, E. Moilaenen and S. Slaminen, 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and experimental allergy*, 30: 1604-1610.
- Ishibashi, N., S. Shimamura, 1993. *Bifidobacteria* : Research and development in Japan. *Food technology*, 47: 126-135.
- Kaufmann, P., A. Pfefferkorn, M. Tauber and L. Meile, 1997. Identification and quantification of bifidobacterium isolated from food with genus specific 16 S.Rna-targeted probs by colony hybridization and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1286-1273.
- Lavie, P., 1960 - Les substances anti bactériennes dans la colonie d'abeilles (*Apis mellifica* L.). *Annales des Abeille*. 3(2): 103-183.
- Ooi, L.G. and M.T. Liang, 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics: a review *in Vivo* and *in Vitro* findings. *International journal of Molecular Sciences*, 11: 2499-2522.
- Manciaux, M., 1958. *Bifidobacterium bifidum* : Ses facteurs de croissance. Essais d'implantation chez le nourrisson. Thèse université de Nancy.
- Mattarelli, P., G. Brandi, M. Modesto and B. Biavati, 2002. Discrepancy between declared and recovered bifidobacteria in a human probiotic. *Annales de Microbiology*., 52 : 283-286.
- Mitsuoka, T., 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology*, 6: 263-268.
- Mitsuoka, T., 1982. Recent trends in Research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*., 1(1): 3-24.
- Poupard, J.A., I. Husain And R.F. Norris, 1973. Biology of the bifidobacteria. *Bacteriological Reviews*., 37: 136-165.
- Praet, J., I. Meeus, M. Cnockaert, M. Aerts, G. Smagghe and P. Vandamme, 2015. *Bifidobacterium commune* sp. nov. isolated from the bumble bee gut. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology*, 107(5): 1307-1313.
- Rada, V., M. Mächová, J. Huk, M. Marouneck and D. Dusková, 1997. Microflora in the honeybee digestive tract : counts, characteristics and sensibility to veterinary drugs. *Apidologie*, 28: 357-365.
- Rada, V., J. et Peter, 2002. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Veterinary Medicina.czech*, 47(1): 1-4.
- Rasic, J., Lj. 1983. The role of dairy foods containing Bifido- and acidophilus bacteria innutritional and health. *North European Dairy I*, 49(4): 80-88.
- Rasic, J.L., I.F. Vujicic, M. Skirnjar and M. Vulic, 1992. Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnology letters*, 14: 39-44.
- Scardovi, V., 1986. Genus *bifidobacterium* in Bergey's Manual of systematic Bacteriology, pp: 1418-1434.

Scardovi, V., L.D. et Trovatelli, 1969. New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. 1. Abt. Orig., 123: 64-88.

Seki, M., M. Igarashi, Y. Fukuda, S. Simamura, T. Kawashima, K. et Ogasa, 1978. The effect of *Bifidobacterium* cultured milk on the "regularity" among on aged group. Japanese society of nutrition and food science, 31(4): 379-387.

Sgobati, B., B. Bivati, and D. Palenzona, 1995. The genus *Bifidobacterium* in Wood B.J.B., Holzappel W.H.: The lactic acid bacteria, pp : 279-306.

Tabak, S., A. et Bensoltane, 2012. L'activité antagoniste des bactéries lactiques *Streptococcus Thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus* vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature et technologie*. 6: 71-79.

Tissier, H., 1900. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). G. Carre and C. Naud, Paris, France.

Tredez, M., 2008. Méta-analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. Thèse doctorat. Université Paul - Sabatier de Toulouse.

Trovatelli, L.D., F. Crocciani, M. Pedinotti and V. Scardovi, 1974. *Bifidobacterium pullorum* sp.nov. : a new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. Archives of Microbiology, 98: 187-198.