

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH-ALGER-

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة-الحراش-الجزائر-



Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Option : Biologie et Ecologie en Zoologie Agro-Sylvo-Pastoral

Thème

Principales maladies et ennemis de l'abeille domestique *Apis mellifera* L.,

1758 en Algérie.

Présentée par : CHAHBAR Mohamed

Jury :

M. DOUMANDJI S. (Professeur)

M^{me} DOUMANDJI-MITICHE B. (Professeur)

M. GAOUAR S.B.S. (MCA)

M^{me} ADIDOU-CHAHBAR (MCA)

M. BERKANI M.L. (Professeur)

Président (E.N.S.A)

Directrice de thèse (E.N.S.A)

Co-Directeur de thèse (Univ. Tlemcen)

Examinatrice (U.M.B. Boumerdes)

Examineur (E.N.S.A)

Soutenue le 19 juin 2017

Remerciement

Je souhaite remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu partager d'inoubliables moments pendant les années de ma thèse...

Je tiens tout d'abord à remercier très profondément ma directrice de thèse, Me. DOUMANDJI-MITICHE B., Professeur au département de Zoologie agricole et forestière à l'E.N.S.A. d'El-Harrach. Je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de votre équipe scientifique et de m'avoir accompagnée pendant ces années vers la découverte de ce qu'est la recherche en apiculture. Merci d'avoir partagé avec moi votre passion pour la recherche. Je vous adresse mes vifs remerciements pour votre confiance, qu'il me soit permis de vous exprimer mon profond respect et ma gratitude.

Je suis particulièrement heureux d'avoir eu comme co-directeur de thèse M. GAOUAR S.BS. Maître de conférence à l'université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Je vous remercie infiniment d'avoir partagé avec moi vos idées et surtout votre esprit critique essentiel pour progresser dans la recherche. Je vous remercie pour m'avoir appris un peu de la génétique des populations et pour avoir été toujours bien disposé à corriger mes manuscrits. Je vais garder précieusement votre exemple de sérieux au travail mais aussi votre exemple de bonne humeur.

Mes vifs remerciements et mon profond respect vont également à M. DOUMANDJI S., Professeur au département de Zoologie agricole et forestière à l'E.N.S.A. d'El-Harrach, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury de cette thèse.

Je tenais à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de lire et de commenter cette thèse :

Me. CHAHBAR-ADIDOU Nora Maître de conférence à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes.

M. BERKANI Mohamed Laid Maître de conférence au département de Zootechnie à l'E.N.S.A. d'El-Harrach.

Je tiens à remercier M. le Directeur général de l'institut national de la médecine vétérinaire pour m'avoir accueilli au sein de son unité INMV d'El-Harrach (Alger).

Je remercie plus particulièrement Me. la Directrice de laboratoire central de l'institut national de la médecine vétérinaire Me. HAFSI Leila, qui m'a accueilli dans son laboratoire pour approfondir mes connaissances dans le domaine des pathologies de l'abeille et pour m'avoir permis de réaliser un stage sur ce domaine.

Je tiens également à remercier M. Benani, Docteur vétérinaire à INMV d'El-Harrach pour leur aide et leur orientation.

Mes remerciements aussi à l'équipe du Laboratoire :

Me. SATOUR Djamila chef service histopathologie et parasitologie, pour leur aide et leur simplicité. M. DEKHILI Aly, Docteur vétérinaire à INMV d'El-Harrach, il m'a beaucoup aidé, j'ai bénéficié de son expérience. Me. LESNAMI Samia chef service Bactériologie médical, j'ai convaincu une bonne initiation en microbiologie.

Un grand merci également à Me. CHAHBAR-ADIDOU Nora, Maître de conférence à l'université de Boumerdes, pour m'avoir incluse dans son travail, pour ses conseils sur les manip et son aide très précieuse. Merci pour toute son aide au labo, pour leur collaboration indispensable et pour son agréable compagnie.

Je remercie très profondément mon ami TEFIEL Hakim, Maître assistant à l'université de Guélizène. Merci pour avoir aimé comme moi les manip que l'on a fait et avoir surveillé tous les petits détails. Merci pour ton implication et engagement. Il s'est investi avec son esprit dans les expériences de labo et de terrain.

Merci beaucoup pour les bons moments passés ensemble, pour les discussions très enrichissantes.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon ami Dr. CHEBLI Abderrahmane, Maître assistant au département de Zoologie agricole et forestière à l'E.N.S.A. d'El-Harrach, pour son aide précieuse, ses encouragements et ses conseils. Merci pour tout ce qu'on a passé ensemble.

Je remercie également M. JANOUNE Abd El Rahman de l'université HASSAN II du Maroc pour la formation en génétique quantitative et pour les analyses statistiques. Je le remercie pour m'avoir initiée en analyses statistiques par SAS.

Sans oublier M. Mansouri Djamel chargé de cours au département de Génie rurale à l'ENSA d'El-Harrach et M. Benzahra Abd El Madjid Professeur au département de Zoologie agricole et forestière à l'E.N.S.A. d'El-Harrach, pour les analyses statistiques.

Je tiens à remercier également l'ensemble des apiculteurs. Je les remercie pour leur aide précieuse dans l'obtention des échantillons et leurs gentillesse :

M. BELALA Tayeb et M. BELALA Maamar, je les remercie pour m'avoir initiée en apiculture ;

Les Frères DIFALLAH de la région de Boufarik ;

Les apiculteurs de la région de Tlemcen : Abd Ellah, Amin Smahi, Fath Ellah et Suheil ;

Un grand merci plus particulièrement à M. GUERBA Ilyes, de la région d'Alger.

Sommaire :

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre 1 : Matériels et méthode.....16

1.1. Prévalence de la nosérose, *Nosema* sp.16

1.1.1. Echantillonnage.....16

1.1.2. Détection de la nosérose.....17

1.1.3. Quantification du nombre de spores de *Nosema*.....18

1.1.4. Classification de l'infection par la nosérose.....18

1.1.5. Analyses statistiques19

1.2. Prévalence de la loque américaine *Paenibacillus larvae*19

1.2.1. Echantillonnage.....19

1.2.2. Identification de la loque américaine20

1.2.2.1. Préparation de milieu de culture.....20

1.2.2.2. Préparation des échantillons21

1.2.2.3. Ensemencement et incubation21

1.2.2.4. Test de confirmation de *P. larvae*21

1.2.2.4.1. Examen macroscopique21

1.2.2.4.2. Examen microscopique.....23

1.2.2.4.3. Tests de confirmation biochimique de *P. larvae*24

1.2.2.4.3.1. Caractères bactériologiques de *P. larvae*24

1.2.2.4.3.2. Test de catalase.....24

1.2.2.4.3.3. Hydrolyse de la caséine	24
1.2.2.4.3.4. Test d'oxydase.....	25
1.2.2.4.3.5. Type respiratoire	26
1.2.2.4.3.6. Etude de l'activité hémolytique.....	27
1.2.2.4.3.7. Galeries biochimiques	28
1.2.2.4.3.7.1. Préparation de la galerie	29
1.2.2.4.3.7.2. Préparation de l'inoculum	29
1.2.2.4.3.7.3. Inoculation de la galerie	29
1.2.3. Analyses statistiques	30
1.3. Etude de la sensibilité des deux races d'abeilles <i>A. m. intermissa</i> et <i>A. m. sahariensis</i> pour la nosérose	31
1.3.1. Protocole expérimental.....	31
1.3.1.1. Emploi des cages de contention.....	31
1.3.1.2. Type de nourrissage.....	32
1.3.1.3. Obtention des abeilles.....	32
1.3.1.4. Obtention de spores de <i>Nosema</i> sp.....	34
1.3.1.5. Concentration de la suspension de spores	34
1.3.1.6. Inoculation des spores de <i>Nosema</i> sp.	34
1.3.1.7. Mesure de la mortalité des abeilles et quantification du niveau de spores de <i>Nosema</i> sp.....	35
1.3.2. Analyses statistiques	36
1.4. Etude préliminaire sur les mycoses affectant l'abeille domestique <i>A. mellifera intermissa</i>	37
1.4.1. Echantillonnage.....	37
1.4.2. Isolement des champignons	38

1.4.3. Purification.....	38
1.4.4. Méthode d'identification.....	39
1.4.4.1. Examen macroscopique.....	39
1.4.4.2. Examen microscopique.....	39
1.4.4.2.1. Technique du drapeau ou du ruban adhésif	39
1.4.4.2.2. Préparation microscopique.....	40
1.4.5. Caractérisation morphométrique de différentes formes de champignon <i>Ascosphe</i> <i>apis</i>	40
1.4.6. Etude de la croissance mycélienne de champignon <i>Ascosphe</i> <i>apis</i>	41
Chapitre 2 : Résultats et discussions	
2.1. Prévalence de <i>Nosema sp.</i>.....	42
2.1.1. Échantillons analysés	42
2.1.2. Distribution de la nosérose	46
2.1.3. Comptage de nombre de spores et niveaux d'infection	46
2.1.4. Nosérose et le phénomène d'effondrement des colonies (CCD).....	49
2.1.5. Comparaison des niveaux des infections entre les régions et les ruches	50
2.1.6. Analyse des échantillons <i>Nosema</i> -négatifs par ACP	51
2.1.7. Corrélation négative entre les taux d'infection et le nombre moyen de spores	54
2.2. Prévalence de la loque américaine <i>Paenibacillus larvae</i>	56
2.2.1. Etude des caractères macroscopiques	56
2.2.2. Etude des caractères microscopiques	57
2.2.3. Tests biochimiques.....	58
2.2.3.1. Etude de type respiratoire	59
2.2.3.2. Etude de l'activité hémolytique.....	59
2.2.3.3. Galeries biochimiques	60

2.2.4. Prévalence de <i>P. larvae</i> dans les régions d'étude	65
2.2.5. Etude de corrélation entre le nombre de ruchers par région et le taux d'infection par la loque américaine.....	69
2.2.6. Structure et répartition de la maladie	70
2.2.7. La loque américaine et le phénomène d'effondrement des colonies d'abeilles CCD.	75
2.2.8. Sélection des colonies résistantes contre la loque américaine	77
2.3. Etude de la sensibilité des deux races d'abeille <i>Apis mellifera intermissa</i> et <i>Apis mellifera sahariensis</i> pour la nosérose	79
2.3.1. Comparaison entre la mortalité des témoins et la mortalité après l'inoculation des spores de <i>Nosema</i>	79
2.3.2. Relation entre mortalité corrigée et le nombre de spores de <i>Nosema</i> produites	82
2.3.2.1. Chez <i>A. m. intermissa</i>	82
2.3.2.2. Chez <i>A. m. sahariensis</i>	83
2.3.3. Nombre de spores produites par jour post-infection	84
2.3.4. Relation entre le développement de la nosérose et la mortalité	85
2.3.5. Influence des jours post-infection sur la mortalité	86
2.3.6. Sensibilité de la race tellienne pour la nosérose.....	87
2.3.7. Sensibilité de la race saharienne pour la nosérose.....	89
2.3.8. Influence de la couleur de cuticule sur la résistance aux maladies	90
2.3.9. Etude de corrélation entre le nombre de spores de <i>Nosema</i> et la mortalité chez l'abeille saharienne <i>A. m. sahariensis</i>	92
2.3.10. Effets des conditions de laboratoires sur la mortalité des abeilles infectées.....	94
2.4. Etude préliminaire des mycoses affectant l'abeille domestique tellienne <i>Apis mellifera intermissa</i>.....	95
2.4.1. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques des différentes souches isolées	95

2.4.1.1. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques d' <i>Aspergillus niger</i>	95
2.4.1.1.1. Etude macroscopique d' <i>Aspergillus niger</i>	95
2.4.1.1.2. Etude microscopique d' <i>Aspergillus niger</i>	95
2.4.1.2. Aspect macroscopique et microscopique de genre <i>Penicillium</i>	97
2.4.1.3. Etude des caractères macroscopiques et microscopique d' <i>Ascospaera apis</i>	97
2.4.1.3.1. Aspect macroscopique d' <i>Ascospaera apis</i>	97
2.4.1.3.2. Aspect microscopique d' <i>Ascospaera apis</i>	98
2.4.2. Relation entre symptômes d'infections fongiques et souches fongiques isolées	100
2.4.3. Prévalence des signes cliniques de l'infection fongique dans les régions d'étude	104
2.4.4. Souches fongiques affectants l'abeille domestique <i>A. mellifera</i>	105
2.4.5. Etude de l'ascosphérose <i>Ascospaera apis</i>	106
2.4.5.1. Distribution spatiale de l'ascosphérose	106
2.4.5.2. Etude de différentes formes de champignon <i>Ascospaera apis</i>	107
2.4.5.3. Etapes de formation des spores d' <i>Ascospaera apis</i>	108
2.4.5.4. Croissance mycélienne de champignon <i>Ascospaera apis</i>	109
2.4.5.5. Prévalence de l'ascosphérose dans les régions d'étude.....	111
2.4.5.6. Perspectives de méthodes de lutte contre l'ascosphérose.....	112
2.4.5.7. Effets de l'environnement sur l'infection par l'ascosphérose	113
Conclusion générale et perspectives	116
Références bibliographiques	121
Annexes	158
Résumé	186

La liste des figures

Figure 1- La carte d'Algérie avec la localisation des régions d'étude de la nosémosse	17
Figure 2- Les spores de <i>Nosema</i> sous microscope optique ; Longueur de bar : 10 μ m (Photographie Fries <i>et al.</i> , 1996).....	18
Figure 3- La carte d'Algérie avec la localisation géographique des régions d'étude de la prévalence de la loque américaine <i>P. larvae</i>	20
Figure 4- Caractérisations morphologiques des colonies de différentes souches de <i>Paenibacillus larvae</i> ensemencées sur différents milieux de culture : Photographie Alippi (1992) cité par OIE (2014).....	22
Figure 5- Gélose au lait (Originale).....	25
Figure 6- Coloration des disques d'oxydase après leur frottement avec les bactéries (Originale)	26
Figure 7- les différents types respiratoires des bactéries (www.microbes-edu.org).....	27
Figure 8- Aspect de l'hémolyse partielle et totale par les bactéries sur milieu GSF (la gélose au sang frais). (iws2.collin.edu).....	28
Figure 9- Le kit de diagnostic API 20 E (Originale)	28
Figure 10- Dispositif expérimental, schéma d'une cage Pain et des tubes nourrisseurs (Labrosse, 2003).....	32
Figure 11- Les deux races d'abeilles domestiques existantes en Algérie ; à gauche, l'abeille tellienne <i>A. m. intermissa</i> ; à droite, l'abeille saharienne <i>A. m. sahariensis</i> (Originale)	33
Figure 12- Cages de contention de type Pain placées dans une étuve lors de l'essai (Originale)	33
Figure 13- Inoculation individuelle de sirop contenant une dose de spores dans une abeille domestique (Originale).....	35
Figure 14- La carte d'Algérie avec la localisation des régions d'étude des mycoses affectant l'abeille domestique <i>Apis mellifera intermissa</i>	38
Figure 15- Pourcentage des colonies infectées par <i>Nosema</i> sp. dans les régions d'étude (Algérie) durant le mois de Juin 2013 (n = 164).....	44
Figure 16- Distribution des sites d'échantillonnage d'abeille en Algérie, et les emplacements approximatifs des 10 régions énumérés dans le tableau 1.....	45
Figure 17- Dégâts causés par l'infestation de psylle d'eucalyptus et l'abondance de miellats sur les feuilles (Originale).....	46

Figure 18- Nombre de spores de <i>Nosema</i> sp. par abeille pour 164 colonies d'abeilles collectées en Juin 2013. Les données ont été calibrées avec le nombre de spores à partir des données microscopiques.....	47
Figure 19- Nombres moyens de spores de <i>Nosema</i> par ruche et par région.....	47
Figure 20- Projection de la variable sur le plan factoriel (1×2) en utilisant ACP dans Statistica 6.....	52
Figure 21- Aspect macroscopique des colonies de <i>Paenibacillus larvae</i> sur le milieu MYPGP. A : de couleur beige ; B et C : de couleur blanchâtre (Originale).....	56
Figure 22- Examen microscopique des bactéries isolées après coloration de Gram, grossissement X400 (a : résultats suspects pour <i>P. larvae</i> ; b : résultats négatifs pour <i>P. larvae</i>).....	58
Figure 23- Test de l'hydrolyse de la caséine. A : milieu de culture gélose au lait ; B et C : résultats positifs pour l'hydrolyse de la caséine (Originale).	58
Figure 24- Etude de type respiratoire des souches isolées de <i>P. larvae</i>	59
Figure 25- hémolyse totale par <i>P. larvae</i> isolée sur la GSF. A : milieu de culture gélose au sang frais (GSF). B et C : hémolyse totale par <i>P. larvae</i> isolée sur la GSF (Originale). .	60
Figure 26- Résultats de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs (lecture 1)	61
Figure 27- Résultats de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs (lecture 2)	62
Figure 28- Résultat de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs (lecture 3)	63
Figure 29- Les signes cliniques de la loque américaine <i>P. larvae</i> observés sur terrain (Originale)	66
Figure 30- La prévalence de la loque américaine dans les régions d'étude.....	67
Figure 31- la corrélation négative entre le nombre de ruchers par région et l'infection par la loque américaine.....	69
Figure 32- La différence significative entre le nombre de ruchers échantillonnés par région (test de Kruskal, p=0,009).....	70
Figure 33- La variabilité au niveau des taux d'infection par la loque américaine dans les régions d'étude	71
Figure 34- classification ascendante hiérarchique (CAH) par dissimilitude des régions en fonction de l'infection par la loque américaine.....	74

Figure 35- Graphes comparatifs des cumuls de taux de mortalités notés pour les deux races d'abeille, traitées par une dose de 100.000 spores de <i>Nosema</i> sp. par abeille et autres témoins non traitées.....	80
Figure 36- Cumul de taux de mortalité noté pour <i>A. m. intermissa</i> en relation avec le nombre moyen de spores par abeille marqué après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de <i>Nosema</i> sp. par abeille.....	82
Figure 37- Cumul de taux de mortalité noté pour <i>A. m. sahariensis</i> en relation avec le nombre moyen de spores par abeille marqué après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de <i>Nosema</i> sp.....	83
Figure 38- Graphe comparatif entre les taux de mortalité et le développement de nombre de spores après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de <i>Nosema</i> sp. pour <i>A. m. sahariensis</i> et <i>A. m. intermissa</i>	85
Figure 39- La caractérisation génétique au niveau des populations d' <i>A. mellifera</i> étudiées pour chaque taxon (Fontbonne <i>et al.</i> , 2013).....	88
Figure 40- Absence de corrélation significative entre le nombre de spores de <i>Nosema</i> et les taux de mortalité corrigée chez l'abeille saharienne <i>A. m. sahariensis</i>	92
Figure 41- Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus niger</i> (Originale).....	96
Figure 42- Aspect microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> (Gr X 400). A : Vésicule ; B : Métule ; C : Phialide ; D : Conodie ; E : Conidiophore (Originale).....	96
Figure 43- Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de genre <i>Penicillium</i> (Originale).....	97
Figure 44- Aspect macroscopique d' <i>Ascospaera apis</i> ; A : Les colonies d' <i>Ascospaera apis</i> sont blanches ; B : aspect macroscopique d' <i>Ascospaera apis</i> après la formation des kystes (Originale).	98
Figure 45- Aspect microscopique d' <i>Ascospaera apis</i> (Gr X 400) (Originale).....	99
Figure 46- signes cliniques des infections fongiques (Originale).....	102
Figure 47- Multilocus phylogénétique étendu et indépendant entre <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> (Photographie Kocsubé : Kocsubé <i>et al.</i> , 2016).....	103
Figure 48- pourcentage de colonies échantillonnées présentant des signes cliniques des infections fongiques	105
Figure 49- Aspect microscopique des kystes d' <i>Ascospaera apis</i> (Gr X 400) (Originale)....	107
Figure 50- Aspect microscopique des balles de spores d' <i>Ascospaera apis</i> (Gr X 400) (Originale).	107

Figure 51- Aspect microscopique de mycélium d' <i>Ascosphaera apis</i> , (Gr X 400) (Originale).	108
Figure 52- Les étapes de formation des spores d' <i>Ascosphaera apis</i> (Originale)	108
Figure 53- Les histogrammes qui représentent la croissance mycélienne par apport à la température pour les trois isolats d' <i>A. apis</i>	109
Figure 54- Les étapes de croissance mycélienne dans une température optimale (25°C à 30°C), mésusée chaque 24 heures (Originale).....	111
Figure 55- Prévalence de l'ascosphérose dans les régions d'étude	112

Liste des tableaux

Tableau 1- La localisation des stations d'étude, le nombre de spores de <i>Nosema</i> observée dans les ruchers et le pourcentage des colonies infectées dans les stations	43
Tableau 2- Pourcentage total de variance en utilisant l'axe 1,2 (ACP dans Statistica 6)	51
Tableau 3- Classification et groupement des régions pas significativement différentes	52
Tableau 4- Caractéristiques biochimiques et morphologiques des différentes souches <i>de P. larvae</i> (De Graaf <i>et al.</i> , 2006)	57
Tableau 5- Résultats de la galerie biochimique (lecture 1).....	60
Tableau 6- Résultats de la galerie biochimique (lecture 2).....	61
Tableau 7- Résultats de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs (lecture 3)	62
Tableau 8- Caractéristiques biochimiques des différentes souches <i>de P. larvae</i> (De Graaf <i>et al.</i> , 2006)	64
Tableau 9- Prévalences de la loque américaine dans les régions d'étude.....	66
Tableau 10- Résultats d'évaluation de la répartition de la loque américaine par l'utilisation de la procédure GENMOD du SAS 9.....	68
Tableau 11- Critères d'évaluation de qualité de l'ajustement du modèle statistique.....	68
Tableau 12- Les groupes homogènes par l'utilisation de test post-hoc effectué sur les ruchers échantillonnés.....	70
Tableau 13- Les groupes homogènes par l'utilisation de test post-hoc de Regwk effectué sur les taux d'infection par la loque américaine dans les régions d'étude.....	71
Tableau 14- Les signes cliniques des infections fongiques en relation avec les souches fongiques isolées	101

Liste des abréviations

ABPV : acute bee paralysis virus ou virus de la paralysie aiguë de l'abeille

ACP : L'analyse en composantes principales

AMPs : antimicrobial peptides

BQCV : Black queen cell virus

CBPV : Chronic Bee Paralysis Virus ou le virus de la paralysie chronique

CCD : Colony Collapse Disorder (le phénomène d'effondrement des colonies d'abeille)

DWV : virus des ailes déformées

GLM : Modèle Linéaire Généralisé

IAPV : Israeli Acute Paralysis Virus ou Virus israélien de la paralysie aiguë

KBV : Kashmir bee virus

OIE : Office International des Épizooties

Pll : *Paenibacillus larvae larvae*

Plp : *Paenibacillus larvae pulvifaciens*

ROS, reactive oxygen species

SAS : SAS Institute (1982) SAS User's Guide: Statistics. Cary, NC, USA

SBPV : virus de la paralysie lente

SBV : sacbrood virus ou le virus du couvain sacciforme

VdV1 : Varroa destructor virus

Introduction

Introduction générale

La pollinisation étant le transport du pollen sur le stigmate, dont la surface, papilleuse et visqueuse, le retient, est purement importante pour l'amélioration de la production de nombreuses cultures et fruits, et également indispensable pour la reproduction sexuée des plantes sauvages. Ce phénomène est assuré par plusieurs animaux et insectes, tels que les oiseaux et les chauves-souris. Dans ce sens, les spécialistes préfèrent parler d'animaux dits « animaux pollinisateurs », lesquels contribuent avantageusement à la pollinisation. Parmi les animaux jouant un rôle primordial en matière de la pollinisation, on trouve que les spécialistes ont pu tirer au clair l'utilité des insectes pollinisateurs (Reynaldi *et al.*, 2015), et en particulier les abeilles domestiques *Apis mellifera* (Morse et Calderon, 2000 ; Jaffé *et al.*, 2010 ; Muñoz *et al.*, 2014 ; Breeze *et al.*, 2014). Néanmoins, une sorte de désintéressement est constaté ces dernières années vis-à-vis de cette pollinisation animale, laquelle a été remplacée par d'autres moyens étant artificiels ; ce qui explique que l'on donne une importance accrue à la pollinisation artificielle. Le déclin des pollinisateurs a été enregistré et prouvé dans tous les pays avec de grandes conséquences étant considérées comme importantes dans de nombreux domaines agricoles. La valeur économique totale de la pollinisation dans le monde entier est estimée à 153 billion € en 2005 (Gallai *et al.*, 2009). Cette évaluation démontre clairement l'importance économique des pollinisateurs. Même en prenant tous ces faits en compte, il est quasiment impossible d'accorder une valeur monétaire réelle et justifiée au service de pollinisation. Par ailleurs, même s'il existe des plantes non-entomophiles n'ayant pas besoin, bien évidemment, d'intermédiaire pour assurer la pollinisation, de nombreuses études ont démontré que certaines plantes étant naturellement non-entomophiles profitent avantageusement des pollinisateurs, lesquels donneront la possibilité de produire des fruits plus gros, plus symétriques et plus sucrés (Surgi, 2008). Ce qui explique que l'on ne peut se passer du rôle que peut jouer les pollinisateurs et notamment les abeilles domestiques qui offrent la possibilité d'améliorer et de développer et la qualité et la quantité des produits agricoles.

L'abeille domestique (*Apis mellifera*) est considérée parmi les plus importants animaux dans l'opération de la pollinisation (Morse et Calderon, 2000). Selon plusieurs chercheurs (Jaffé *et al.*, 2010 ; Muñoz *et al.*, 2014), cet insecte est le principal pollinisateur des plantes et des cultures dans le domaine de l'agriculture sans pour autant oublier tous les domaines ayant une

relation directe avec les écosystèmes. Outre la pollinisation, l'abeille présente en effet un intérêt économique indéniable ; il s'agit bien évidemment des produits de la ruche, du miel, du pollen, de la gelée royale, de la cire, de la propolis et du venin. De plus, les abeilles sont d'excellents indicateurs biologiques (Sabatini, 2005) parce qu'elles signalent la présence d'une dégradation chimique au niveau de l'environnement dans lequel elles vivent. Cette signalisation est indiquée par le biais de deux signaux ; le degré de mortalité élevé et les résidus qu'on peut retrouver sur le corps des abeilles ou dans les produits de la ruche (les substances phytosanitaires utilisées en agriculture, les antiparasitaires et les agents polluants comme les métaux lourds et les radionuclides). Par ailleurs, de nombreuses caractéristiques éthologiques et morphologiques font de l'abeille un bon indicateur écologique. Son corps est en grande partie recouvert de poils qui capturent substances qu'elle rencontre en vol. Elle est hautement sensible à la plupart des antiparasitaires qui peuvent être présents en cas d'épandage inapproprié dans l'environnement (Sabatini, 2005).

Les spécialistes, en ce qui concerne cet insecte pollinisateur, l'abeille, distinguent au minimum 26 sous-espèces d'*A. mellifera* (Ruttner *et al.*, 1978). Ces sous-espèces sont regroupées au niveau de cinq branches évolutives (A (African), C (Carnica), M (Mellifera), O (Oriental) et Y (Yemenetica). Plusieurs études ont fait l'objet de caractérisation des sous-espèces d'*A. mellifera*, qui se basent sur leurs différences morphologiques et génétiques (Ruttner, 1988 ; Miguel *et al.*, 2007, 2011). Dans certaines régions, par le mélange de plusieurs races, on a pu former d'autres sous-espèces appartenant à l'une ou à plusieurs branches évolutives.

Les populations d'abeilles d'Algérie sont actuellement considérées comme des membres de deux sous-espèces, à savoir d'*A. m. intermissa* et d'*A. m. sahariensis*, lesquelles ont fait l'objet de différents travaux de caractérisation biométrique (Koudjil, 1990; Loucif, 1993; Barour *et al.*, 2005; Berkani *et al.*, 2005, Achou , 2007 ; Berkani, 2008 ; Chahbar, 2013), et caractérisation par l'utilisation de marqueurs moléculaires (Garnery *et al.*, 1993 ; Franck *et al.*, 2001; Achou, 2007; Loucif-Ayad *et al.*, 2009 ; Chahbar *et al.*, 2013 ; Loucif-Ayad *et al.*, 2014 ; Haddad *et al.*, 2015b).

L'abeille tellienne *A. m. intermissa* indique une position limitée par les races de l'Afrique tropicale et celles de l'Europe (Peyvel, 1994). Cette abeille est très agressive, nerveuse et caractérisée par une tendance élevée à essaimer par plusieurs cellules royales (Clément *et al.*,

2002). *A. m. intermissa* dispose d'une performance défensive importante, elle utilise abondamment la propolis (Ruttner, 1988). En comparant son génome avec ceux d'autres sous espèces, le potentiel d'adaptation d'*A. m. intermissa* est évolué pour des hautes températures et pour la résistance contre les infestations de parasite *Varroa destructor* (Haddad *et al.*, 2015b). Quant à l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*, elle est caractérisée par sa petite taille, de couleur jaune, peu agressive, et elle possède une résistance remarquable aux conditions difficiles de chaleur et de sécheresse du milieu (Baldensperger, 1924). En Algérie, cette race d'abeille se retrouve dans tout le territoire Sud-Ouest ; précisément, elle niche dans les monts des Ksours jusqu'à Ain El Sefra, Morgrar, Sfissifa Béchar, Djebel Antar, Djebel Bouarid, Djebel Grouz, Daria l'Hamar et Beni Ounif (Haccour, 1960).

Cependant, l'abeille domestique est menacée par plusieurs maladies, notamment par les maladies virales (Loucif-Ayad *et al.*, 2013 ; Lucia *et al.*, 2014 ; Adjlane *et al.*, 2015 ; Park *et al.*, 2016), les maladies parasitaires (Muli *et al.*, 2014 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2015 ; Bahreini et Currie, 2015 ; Cameron *et al.*, 2016), les maladies fongiques (Aronstein et Murray, 2010 ; Reynaldi *et al.*, 2015 ; Hemmerlé, 2015) et les maladies bactériennes notamment la loque américaine *Paenibacillus larvae* (Wilson *et al.*, 2015) et la loque européenne *Melissococcus plutonius* (Daisuke Takamatsu *et al.*, 2014). Par ailleurs, elle est aussi menacée par une maladie neurologique (Chaimanee *et al.*, 2016) ; il s'agit d'une maladie qui est due en effet à la consommation du néonicotinoïdes. Les insecticides néonicotinoïdes incluent l'imidaclopride, le thiaclopride, le dinotéfurane, le thiaméthoxame, le nitenpyram, la clothianidine et l'acétamipride. Le thiaméthoxame étant un pesticide utilisé pour l'enrobage des semences. Henry *et al.* (2012), en utilisant le marquage des butineuses, ont montré que des abeilles ayant consommé du thiaméthoxame à dose sub létale étaient victimes de désorientations, et les a empêchées de regagner leur ruche. C'est ce qui compromet donc l'avenir de la colonie. Ainsi, la dégradation de l'écosystème par la diminution de la flore mellifère est considérée comme un autre facteur menaçant cette abeille (Adjlane *et al.* 2012a).

Depuis plusieurs années, l'augmentation des affaiblissements et des mortalités des colonies d'abeilles à travers le monde a mobilisé de nombreux scientifiques qui s'accordent aujourd'hui à considérer que le risque d'apparition de ces affections est conditionné par plusieurs facteurs. Des équipes de recherche sur le phénomène d'effondrement des colonies d'abeille « Colony Collapse Disorder » (CCD) ont été lancés pour recueillir des données sur

les mortalités des abeilles, pour quantifier ce phénomène et essayer d'identifier les causes (Le Conte *et al.*, 2010; Soroker *et al.*, 2011 ; Fernández *et al.*, 2012 ; Dussaubat *et al.*, 2013 ; Muñoz *et al.*, 2014 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2015).

Actuellement, les pertes des colonies dans le monde sont considérables. L'Europe a été l'un des premiers continents à s'inquiéter des surmortalités d'abeilles (Neumann et Carreck, 2010 ; Nguyen *et al.*, 2010 ; van der Zee *et al.*, 2013, 2014 ; Pirk *et al.*, 2014). Les taux de mortalités les plus élevés ont été observés pendant la période hivernale (Lee *et al.*, 2015). Dans différents pays, les apiculteurs ont des pertes hivernales considérables. En 2008-2009, les taux de perte varient entre 6,3 et 21,7 % pour l'Autriche, Belgique, Danemark, Allemagne, Irlande, Italie, Hollande, Norvège, Pologne, Suède, Suisse et Royaume-Uni (van der Zee *et al.*, 2012). L'année suivante 2009–2010, les pertes étaient fortes de 8 à 37,8 % pour toutes les régions interrogées (Van der Zee *et al.*, 2012). Il est primordial aux chercheurs de faire cette comparaison avec plus de discernement car ces pertes n'ont pas de période de perte d'hiver standard. Aux Etats-Unis, la période de la perte hivernale s'étale sur 6 mois, de 1 avril au 1 octobre selon un questionnaire adressé aux apiculteurs (Lee *et al.*, 2015). En Algérie, ce facteur n'est pas encore mis en cause. Des pertes hivernales élevées, entre 20 % et 50 %, ont été rapportées dans certains pays du monde, comme l'Italie (Mutinelli *et al.*, 2010), Danemark (Vejsnæs *et al.*, 2010), l'Autriche et l'Italie (Tyrol de sud) (Brodschneider *et al.*, 2010), l'Ecosse (Gray *et al.*, 2010), Angleterre (Aston, 2010), Israël (Soroker *et al.*, 2010), Suisse (Charrière et Neumann, 2010) et en Sud Afrique (Pirk *et al.*, 2014). En revanche, les taux de pertes hivernales étaient acceptables dans d'autres pays, qui ont été déclarées à 10 % en Bulgarie (Topolska *et al.*, 2010) et Norvège (Dahle, 2010). Des faibles taux de pertes hivernales étaient signalés, moins de 5 % en Chine et divers autres pays (Van der Zee *et al.*, 2012). Mais les pertes hivernales seules ne fournissent pas une image complète des pertes annuelles (Steinhauer *et al.*, 2014). En effet, les pertes qui se produisent peuvent ne pas avoir lieu en hiver. En 2012–2013, dans certaines régions tempérées, la perte hivernale est de 30,6 %, avec 25,3 % pour les pertes estivales et 45,2 % concernant la perte totale annuelle (Steinhauer *et al.*, 2014). Si les pertes n'ont pas été évaluées au cours de l'année complète, les pertes hivernales avaient largement sous-estimé la mortalité annuelle totale. Cependant, les pertes estivales sont faibles, moins de 5 %, pour certaines régions (Dahle 2010 ; Gray *et al.*, 2010 ; Peterson *et al.*, 2010 ; van der Zee, 2010), ou plus élevées et variées selon la région et

l'année (Gray et al. 2010; Mutinelli *et al.* 2010). Une forte perte hivernale de 44,8 % est estimée aux Etats unies (Lee *et al.*, 2015).

En Algérie, la mortalité chez l'abeille tellienne qui se trouve au nord est plus élevée que la mortalité chez la même race lorsqu'elle se trouve au sud et *A. m. sahariensis*, qui ne se trouve qu'au sud de l'Algérie (Adjlane *et al.*, 2015). Mais, selon les mêmes auteurs (Adjlane *et al.*, 2015), cette mortalité est faible, relativement aux autres pays du monde. Ces différences de mortalités ont fait l'objet d'estimer un seuil de perte hivernale acceptable. Récemment, un seuil de perte hivernale de 19 % a été considéré acceptable (Lee *et al.*, 2015). Cette perte de 19 % était la perte la plus élevée, elle est déclarée acceptable à travers toutes les enquêtes passées. Elle est similaire à une perte acceptable de 17,6 % déclarée en 2008-2009 (VanEngelsdorp *et al.*, 2010). La fourchette de pertes acceptables précédentes signalées entre 2009-2010 et 2012-2013 variaient de 13,2 % à 14,6 % (VanEngelsdorp *et al.*, 2011, 2012; Spleen *et al.*, 2013; Steinhauer *et al.*, 2014). Ce niveau de perte acceptable plus élevé pourrait être dû, d'une part à l'influence de la focalisation des médias, des pays développés, sur les pertes élevées des colonies d'abeilles, et d'autre part, aux apiculteurs dont ils deviennent plus habitués à des pertes plus élevées (Lee *et al.*, 2015).

À titre de comparaison, la perte hivernale moyenne acceptable de colonies était de 10 % en Suisse et en Allemagne (Charrière et Neumann, 2010), de 12 % en Danemark (Vejsnæs *et al.*, 2010). Cependant, elle était plus élevée aux Etats Unies (Steinhauer *et al.*, 2014). Ce qui peut indiquer l'importance de la préparation des colonies pour l'hiver. Une corrélation positive était trouvée entre les pertes des colonies et les données météorologiques (Lee *et al.*, 2015). Cela devrait faire l'objet d'une enquête approfondie sur cet aspect en Algérie. Les niveaux de participation des différents facteurs aux pertes de colonies variaient considérablement d'un état à l'autre, ce qui pourrait entraîner un biais dans les calculs de perte au niveau de l'état. Les chercheurs ont vu ce haut niveau de variation entre les régions de certains pays (van der Zee *et al.*, 2012). Les causes les plus fréquentes de perte de colonies signalées par les apiculteurs étaient dues à plusieurs facteurs que l'on a sélectionnés selon le degré de gravité. Comme cause principale, il est cité l'incapacité de la reine, *V. destructor*, la famine, la faiblesse de colonies en automne, les pesticides, les mauvaises conditions hivernales et le CCD (VanEngelsdorp *et al.*, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012 ; Spleen *et al.*, 2013; Steinhauer *et al.*,

2014). Une autre étude suggère que certains apiculteurs ont choisi les mauvaises conditions hivernales, la famine et la faiblesse des colonies (Lee *et al.*, 2015).

En Algérie, pour certaines régions septentrionales, les pertes sont éventuellement affectées par d'autres facteurs liés aux facteurs géographiques ou climatiques, à la présence des agents pathogènes ou à l'utilisation de produits agrochimiques (Adjlane *et al.*, 2012a ; Chahbar, 2013; Chahbar *et al.*, 2014). Mais, les causes principales des pertes de colonies d'abeille en Algérie restent mal connues. Ainsi, les travaux de recherche réalisés sur les pathologies apicoles qui ont fait l'objet d'évaluer leur part dans les affaiblissements des colonies sont insuffisants. Nous citons les études d'Adjlane *et al.* (2012b) et d'Adjlane (2012) en relation avec la nosérose, de Achou et Soltani (1997), d'Aoudia et Ayad (1998), d'Achou (2007), de Berkani et Berkani (2009), d'Adjlane (2010), de Belaid et Doumandji (2010), de Loucif Ayad *et al.* (2010), et d'Adjlane et Doumandji (2011) traitant de la varroas. Sans oublier le travail de Chahbar *et al.* (2014) qui porte sur les intoxications par des pesticides, et celui d'Adjlane *et al.* (2015) sur les virus.

Aux États-Unis, en 2012–2013, les apiculteurs qui ont signalé le symptôme de CCD, mortalité des abeilles dans leurs ruchers, ont perdu beaucoup plus de colonies par rapport aux apiculteurs qui n'ont pas signalé la perte de colonies avec le symptôme (Steinhauer *et al.*, 2014). Cependant, en 2013-2014, les apiculteurs qui ont signalé le symptôme du CCD n'avaient pas de pertes plus élevées (Lee *et al.*, 2015). Les apiculteurs sélectionnant le CCD avaient des pertes plus élevées par rapport aux apiculteurs qui ne sélectionnaient pas le CCD comme cause des pertes de colonies (Lee *et al.*, 2015). Cela pourrait être dû à la confusion de la définition de CCD, qui a peut-être été causée en partie par l'attention des médias. En Europe, les apiculteurs qui ont signalé la perte de colonies sans présence d'abeilles mortes ont perdu plus de colonies que les apiculteurs qui n'ont pas signalé le symptôme (Van Der Zee *et al.*, 2014).

Les causes de ce phénomène ne sont pas encore bien déterminées. Certains chercheurs suggèrent que le CCD est causé par la nosérose (Higes *et al.*, 2006 ; Fries, 2010). Certains chercheurs soupçonnent les virus (Hamiduzzaman *et al.*, 2015 ; Ryabov *et al.*, 2014). D'autres suggèrent que le CCD a une relation directe avec d'autres facteurs.

Dans la nature, la fréquence des insectes infectés par le groupe des parasites intracellulaires obligatoires appartenant à la classe de Microsporidia est élevée. Le genre *Nosema* est composé de plus de 150 espèces, infectant habituellement des hôtes invertébrés dont au moins 12 ordres d'insectes. *Nosema* sp. se trouve dans des hyménoptères causant certaines maladies courantes (Higes *et al.*, 2007 ; Renata *et al.*, 2015 ; Julie *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016). L'une des deux espèces de microsporidia du genre *Nosema* provoque la nosérose (Traver et Fell, 2011).

Nosema apis et *Nosema ceranae*, récemment déclassés des protozoaires et classés dans les champignons (Adl *et al.*, 2005), sont des parasites de l'abeille européenne *Apis mellifera* et de l'abeille asiatique *Apis ceranae* respectivement (Zander, 1909 ; Fries *et al.*, 1996 ; Fries, 2010). La nosérose causée par ces parasites est répandue dans le monde entier ; elle est actuellement le facteur majeur des pertes économiques étant considérables en apiculture (Fries, 2010).

Cependant, les deux espèces *N. ceranae* et *N. apis* ont été détectées dans quatre continents (Asie, le nord et le sud d'Amérique, Europe et l'Afrique du nord) (Klee *et al.*, 2007; Geoffrey *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009a ; Yoshiyama and Kimura, 2011; Fernández *et al.*, 2012 ; Chupia *et al.*, 2016). *N. ceranae* est hautement pathogène lorsque expérimentalement inoculée dans l'abeille européenne *A. mellifera* (Higes *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2015), avec l'association de la réduction en production de miel et l'augmentation de la mortalité hivernale (Higes *et al.*, 2006).

Aucune spore de *Nosema* n'a été détectée dans les tissus céphaliques ou autres tissus corporels, à l'exception des tissus de l'intestin moyen (Fries *et al.*, 1996 ; Fries, 2010 ; Traver et Fell, 2011 ; Fries *et al.*, 2013 ; OIE, 2013). L'ADN de *Nosema* a été détecté dans des tubes de Malpighi mais les tubes ne pouvaient pas être séparés de tractus alimentaire sans libération de spores de l'intestin moyen. L'ADN de *Nosema* n'a pas été détecté dans l'hémolymphe échantillonnée à partir de la capsule de la tête ou de l'abdomen des abeilles infectées (Huang et Solter, 2013). Des signaux d'ADN ont également été observés dans les tissus céphaliques (Chen *et al.*, 2009 ; Copley et Jabaji, 2012 ; Gisder *et al.*, 2010), Mais ni les formes végétatives ni les spores mûres n'ont été observées dans les frottis et les taches de tissu céphalique (Gisder *et al.*, 2010).

Dans cette étude, nous décrivons la première distribution spatiale de la nosérose infectant l'abeille domestique (*Apis mellifera intermissa*) en Algérie. Nous cherchons à détecter la relation entre cette maladie et l'effondrement des colonies d'abeilles CCD tout en insistant sur la sensibilité pour la nosérose étant étudiée chez les deux races d'abeille existantes en Algérie, à savoir *A. m. intermissa* et *A. m. sahariensis* en utilisant l'inoculation des spores de *Nosema* sp. fraîchement isolées dans des abeilles en cages, et ce pour évaluer leurs effets sur la mortalité et la charge en spores des abeilles domestiques.

Parmi ces facteurs menaçant la survie de l'abeille domestique en Algérie, la loque américaine *Paenibacillus larvae* est une maladie dévastatrice des colonies à un taux assez important, empêchant le développement de l'apiculture (Adjlane *et al.*, 2012a). Cette maladie est causée par une bactérie *Paenibacillus larvae* en forme de bâtonnet, de gram-positif (De Graaf *et al.*, 2013). Déclarée par OIE (Office internationale des épizooties) comme maladie contagieuse à déclaration obligatoire (OIE, 2014). Il s'agit d'une maladie cosmopolite (Genersch, 2010; Antúnez *et al.*, 2011; De Guzman *et al.*, 2011 ; Adjlane *et al.*, 2012a ; Haddad *et al.*, 2015a ; Wilson *et al.*, 2015) mais que l'on retrouve surtout dans les pays tempérés et ou subtropicaux (Gregorc et Bowen, 1998).

En 1993, la loque américaine a été classée en deux espèces, *Paenibacillus larvae* et *Paenibacillus pulvifaciens* (Ash *et al.*, 1993). En 1996, Une étude basée sur les différences phénotypiques, génotypiques et pathogénicités a reclassé l'agent causal de la maladie en deux sous-espèces *P. larvae larvae* et *P. larvae pulvifaciens* (Heyndrickx *et al.*, 1996). En 2006, les résultats des travaux menés en Allemagne, Suède et Finlande ont confirmé que les deux taxons appartiennent à une seule espèce de *P. larvae* (Genersch *et al.*, 2006).

Dans la présente étude, la prévalence et la distribution de la loque américaine affectant l'abeille locale *Apis mellifera intermissa* à travers le territoire national ont été étudiées, tout en sachant que certaines colonies infectées par *P. larvae* restent fortes sans aucun signe clinique de la maladie (Hansen et Brodsgaard, 1999). L'objectif de cette partie d'étude est d'analyser la fréquence de la répartition de la maladie en Algérie en utilisant un modèle linéaire généralisé (GLM) du logiciel SAS.

Aussi, des questions tragiques peuvent être posées, quel est l'impact des infections fongiques sur la santé des abeilles domestiques ? Existe-il une relation directe entre ces infections et le CCD ?

L'ascosphérose étant une maladie de l'abeille et également une forme de mycose due à un champignon hétérothallique à reproduction sexuée *Ascospaera apis* (Jensen *et al.*, 2013 ; OIE, 2014 ; Hemmerlé, 2015). Il s'agit d'une maladie contagieuse (spores résistantes et protégées) dont la distribution est mondiale (Puerta *et al.*, 1999 ; Fernandez et Coineau , 2007). L'ascosphérose atteint le couvain non operculé. Elle n'est dangereuse que lorsque la colonie est affaiblie par d'autres facteurs, notamment lors de carences alimentaires (Flores *et al.*, 2005). Elle provoque rarement la mortalité des colonies d'abeilles domestiques ; seuls quelques cas ont été rapportés (Roussy, 1962). *A. apis* est, néanmoins, responsable de l'affaiblissement de la colonie, en provoquant des pertes de larves, se traduisant par une diminution de la population de butineuses, de la production de miel et de pollen. Dans les conditions naturelles, les spores sont présentes dans le miel et le pollen stockés dans la ruche. La contamination s'effectue mécaniquement par l'intermédiaire des ouvrières, notamment lors du partage de nourriture et des périodes de soins. Les spores de champignon, ingérées par les larves de trois à quatre jours, germent dans l'intestin et produisent un mycélium qui grandit jusqu'à transpercer son hôte (Fluri *et al.*, 1998 ; Fernandez et Coineau, 2007).

L'aspergillose est une maladie causée par *Aspergillus* sp. Différentes espèces du genre *Aspergillus* peuvent être responsables de cette maladie (Jensen *et al.*, 2013 ; OIE, 2014 ; Pornpukdeewattana *et al.*, 2017). Les espèces les plus communément identifiées sont *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*. Cette maladie, peu contagieuse, est répandue en Europe et en Amérique. L'aspergillose touche aussi bien les abeilles adultes que les larves (OIE, 2014). Les mauvaises conditions climatiques (trop humides ou trop froides), les carences alimentaires et l'excès de pollen transporté dans les hausses hâtivement sont les principaux facteurs favorables au développement de l'aspergillose. A l'instar d'autres agents pathogènes (loques, ascosphérose), les spores d'aspergillose sont complètement libres et exogènes. Les mouvements d'air dans la ruche peuvent donc détacher des conidiophores et les transporter dans toutes les parties de la ruche. La dispersion des spores s'effectue également via les abeilles ; la transmission de l'agent pathogène aux larves s'effectue, par contact direct, durant des soins qu'elles leur prodiguent (Fernandez et Coineau, 2007). Une dispersion de

spores à l'extérieur de la ruche est possible lors de l'élimination des larves mortes et du nettoyage des cellules. La contamination naturelle se fait par voie digestive. Les spores d'*Aspergillus* sp. absorbées avec la nourriture germent dans l'intestin et les filaments mycéliens se répandent dans tout le corps de l'abeille ou de la larve (Borchert, 1970).

Nous avons étudié les corrélations entre certains signes cliniques des infections fongiques et la présence des agents fongiques responsables de l'apparition de ces symptômes sur terrain. Aussi, les caractères microscopiques, macroscopiques et biologiques de ces champignons étaient détaillés. Particulièrement, une recherche approfondie était menée pour étudier la prévalence, les différents stades de développement et l'adaptation thermique d'*Ascospheera apis*.

De plus, de nombreux virus ont été identifiés dans des colonies (Loucif-Ayad *et al.*, 2013 ; Adjlane *et al.*, 2015 ; Amakpe *et al.*, 2015 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2015). On en dénombre aujourd'hui entre 15 et 20 dont la particularité est d'être pour la majorité des virus à ARN (Picorna-Like virus, dicistrovidae virus) (Vidal-Naquet, 2012). Certains sont anecdotiques, d'autres sont très souvent présents dans les colonies, sans maladie associée (Tentcheva *et al.*, 2004 ; De Miranda, 2012). Ils manifestent leur pouvoir pathogène dans des colonies affaiblies (De Miranda *et al.*, 2010 ; Neumann et Carreck, 2010 ; De Miranda, 2012) et peuvent aboutir à des mortalités aiguës. Cependant, de nombreuses colonies continuent à paraître saines, même quand plusieurs virus sont simultanément présents (Bailey, 1981 ; Ball et Allen, 1988 ; Bailey et Ball, 1991 ; Evans, 2001 ; Chen *et al.*, 2004 ; Tentcheva *et al.*, 2004). Ces infections virales inapparentes pourraient être présentes dans les colonies sur plusieurs générations causant peu ou pas de signes visibles. Dans certaines circonstances, encore mal connues, ces infections virales pourraient être activées et conduire à des infections aiguës, souvent fatales à l'individu et entraînant des affaiblissements de colonies (Ribière *et al.*, 2008). Les virus les plus fréquents étant le virus DWV, BQCV, CBPV, KBV, SBV, VdV1 (Lambert *et al.*, 2011 ; Adjlane *et al.*, 2015). Tentcheva *et al.* (2004) signalent une coïnfection virale dans tous les ruchers où ont été recherchés, les virus les plus fréquents sont DWV, SBV, ABPV, KBV, CBPV et BQCV. Le virus DWV et SBV ont été détectés dans plus de 80 % des ruchers étudiés (Tentcheva *et al.*, 2004). Par ailleurs le virus DWV était systématiquement présent sur les varroas prélevés dans chaque rucher. Il est actuellement reconnu que la dissémination de *V. destructor* a eu, entre autres, pour résultat, de modifier la

prévalence des virus d'abeilles et leur impact sur la santé des colonies (Locke *et al.*, 2014 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2015). L'étude du Martin *et al.* (2012) de la prévalence du DWV dans les ruchers hawaïens suite à la contamination de l'île par *V. destructor* confirme ce lien puisque le portage viral est passé de 10 % à 100 % des ruchers, avec concomitamment une augmentation drastique de la charge virale par colonie. Certains virus de l'abeille sont donc fortement associés à *V. destructor* quant à leur impact sur la santé des colonies. C'est le cas de l'ABPV, du KBV, du virus de la paralysie lente (SBPV) et du virus des ailes déformées (DWV) (Ryabov *et al.*, 2014 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2015). Ces virus sont reconnus, pour certains, et supposés, pour d'autres, comme participant aux affaiblissements des colonies. Ils sont transmis par l'acarion (Ball, 1983 ; Wieggers, 1986 ; Ongus *et al.*, 2004). La question qui se pose, est ce qu'ils se multiplient ou non dans ce vecteur. Parmi ces virus, le DWV entraîne des déformations des ailes et du corps des abeilles émergentes (naissantes) qui, pendant longtemps, ont été attribuées à *V. destructor* seul (Akranakul et Burgett, 1975 ; Koch et Ritter, 1991). Il s'est avéré que ces déformations sont dues à l'infection virale, mais sont étroitement liées à l'infestation par le parasite (Yang et Cox-Foster, 2005). Le DWV est transmis par l'acarion et se multiplie dans cet hôte (Ball, 1989 ; Bowen-Walker *et al.*, 1999 ; Yue et Genersch, 2005 ; Ryabov *et al.*, 2014). La présence d'abeilles déformées est considérée comme un symptôme de varroase. Parmi les virus de l'abeille, seuls deux entraînent des symptômes et de la mortalité caractéristiques, sans association nécessaire avec d'autres agents pathogènes. Ces deux virus sont le virus du couvain sacciforme (SBV) et le virus de la paralysie chronique (Chronic Bee Paralysis Virus) (CBPV). Le virus du couvain sacciforme (SBV) entraîne une mortalité de larves, décrites comme formant un sac, en raison de l'accumulation de fluide entre le tégument et le corps. En Angleterre, plus de 80 % des larves malades en l'absence de bactéries furent déterminées comme infectées par le SBV et plus de 30 % des colonies apparemment saines contenant quelques larves tuées par le virus (Bailey, 1967). En Australie, le SBV a été rapporté comme étant le plus commun des virus d'abeille, mais causant occasionnellement des pertes sévères de couvain (Dall, 1985). Le virus de la paralysie chronique (CBPV) entraîne une maladie contagieuse et infectieuse des abeilles adultes, connue sous les noms de paralysie chronique et maladie noire. C'est la seule maladie virale d'abeilles adultes provoquant des symptômes visibles sur les pas de vols et devant les ruches (Bailey et Ball, 1991 ; Ball et Bailey, 1997 ; Ball, 1999). Le syndrome de cette maladie a été décrit en Angleterre comme entraînant principalement des tremblements anormaux des ailes et du corps des abeilles infectées. Ces abeilles incapables de voler, rampent souvent sur

le sol et sur les tiges des plantes, parfois en masse de milliers d'individus. Les abeilles malades meurent dans les jours suivant le début des symptômes. La population des colonies sévèrement infectées s'effondre subitement, particulièrement durant le huitième mois de l'année, laissant la reine avec quelques ouvrières et du couvain mal entretenu. Parfois, les abeilles infectées peuvent encore voler mais sont dépilées et apparaissent noires et luisantes ; elles sont rejetées par les abeilles saines de la colonie. En quelques jours, elles ne peuvent plus voler, sont atteintes de tremblement et meurent, qui correspond à celui connu en France sous le nom de « maladie noire » (Ball, 1999). Cette maladie entraîne principalement des affaiblissements de colonies et des baisses de production (Ball et Bailey, 1997), mais elle peut aller jusqu'à des pertes de cheptel importantes (Kulinčević et Rothenbühler, 1975 ; Bailey et Ball, 1991 ; Ball et Bailey, 1997 ; Ribière *et al.*, 2008). En Algérie, six virus ont été détectés avec différentes prévalences. CBPV était le virus le plus prévalent, suivi par BQCV, DWV, IAPV, ABPV et SBV (Loucif-Ayad *et al.*, 2013 ; Adjlane *et al.*, 2015).

D'autres ennemis naturels, parasitaires et prédateurs, sont considérés comme facteurs qui menacent la survie de l'abeille domestique. Nous citons parmi eux *Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Vespa velutina*, *Vespula germanica*, *Aethina tumida*, *Galleria mellonella* et *Achroea grisella*.

La varroase *Varroa destructor* est une maladie inscrite sur la liste de l'OIE (OIE, 2014). Découverte au début du XX^{ème} siècle, en Indonésie, sur l'abeille *Apis cerana*, l'acarien *Varroa jacobsoni* Oudemans s'est rapidement développé sur son nouvel hôte, *Apis mellifera*. Il a été renommé par la suite *Varroa destructor* (Anderson et Trueman, 2000). Le cycle de développement de cet ectoparasite se déroule essentiellement dans le couvain et dure environ huit jours. Les femelles adultes envahissent les cellules de couvain quelques heures avant l'operculation (Beetsma *et al.*, 1999). Environ 60 heures après l'operculation, la femelle acarien pond son premier œuf qui donnera naissance à un mâle, les œufs suivants donneront naissance à des femelles. Ainsi la durée d'operculation du couvain d'ouvrière d'*A. mellifera* permet en général la production de trois femelles du parasite matures et celle du couvain mâle la production de cinq femelles matures (Martin, 1998). Le parasite se nourrit de l'hémolymphe des nymphes et des adultes. L'infestation par *V. destructor* est extrêmement dommageable aux colonies d'abeilles domestiques (Bailey et Ball, 1991). Les principaux effets délétères sont causés par les femelles reproductrices qui, en se nourrissant de

l'hémolymphe des larves, des nymphes et des ouvrières, les affaiblissent, ce qui se répercute sur la colonie toute entière (Kanbar et Engels, 2003). Cet acarien est également vecteur d'autres agents pathogènes, notamment viraux (Yue et Genersch, 2005 ; Ryabov *et al.*, 2014 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2015).

L'acariose des trachées causée par *Acarapis woodi*, est une maladie inscrite sur la liste de l'OIE (OIE, 2014). L'acariose est une maladie de l'abeille adulte. L'acarien envahit une partie du système respiratoire (notamment, la première paire de trachées). Il perce la paroi des trachées d'*A. mellifera* pour se nourrir de son hémolymphe, entravant parfois sévèrement la respiration de l'hôte. Alors que tous les stades de développement (cycle de développement d'environ quatorze jours) d'*A. woodi* se déroulent à l'intérieur des voies respiratoires, les femelles reproductrices quittent la trachée pour parasiter une nouvelle abeille adulte (Morgenthaler, 1933). *A. woodi* ne survivant que quelques heures à l'extérieur des trachées, une transmission par contact direct entre les abeilles adultes semble nécessaire (Pettis *et al.*, 2007). Tout confinement prolongé des individus de la colonie, notamment, lors de conditions climatiques défavorables, est propice à la transmission des agents pathogènes, notamment le virus de la paralysie aiguë de l'abeille (ABPV) (Shimanuki *et al.*, 1994). Actuellement, ce fléau n'est pas détecté en Algérie. Nous avons étudié la prévalence de l'acariose dans plusieurs ruchers appartenant à 10 régions réparties dans le nord d'Algérie. Aucune trace de l'acariose *A. woodi* n'a été trouvée dans le système trachéen des abeilles prélevées (Annexe 1).

Le frelon asiatique *Vespa velutina* a été décrit, pour la première fois, en 1836, par Lepeletier, à partir de spécimens prélevés dans l'île de Java (Indonésie). Cet hyménoptère est largement répandu dans le sud-est asiatique. En Asie continentale, cette espèce se développe sous des climats comparables à ceux du sud de l'Europe. *V. velutina* est présent, probablement depuis 2004, dans le sud-ouest de la France (Haxaire, 2006). En Inde, *V. velutina* est signalé comme un redoutable prédateur des ruchers. *V. velutina* prélève des butineuses. Il attend en vol stationnaire, devant et autour de la ruche. Lorsqu'une abeille arrive, il fonce sur elle, l'attrape entre ses pattes et la neutralise. Il l'emporte alors jusqu'à son nid. Après avoir décimé une à une toutes les gardiennes de la colonie, les ouvrières de *V. velutina* s'enfoncent dans la ruche pour y prélever le couvain dont elles nourrissent leurs propres larves. En termes de dégâts observés, lorsque huit frelons sont présents autour d'une ruche, ils provoquent, par

enlèvement des abeilles, un arrêt de la ponte, un arrêt de l'activité de la colonie et un dépérissement de celle-ci (Haxaire, 2006 ; Haxaire *et al.*, 2006 ; Villemand *et al.*, 2006). En Algérie, jusqu'à ce jour, aucune trace de la présence de ce redoutable prédateur *V. velutina* n'a été trouvée. En revanche, nous avons prospecté plusieurs nids de la guêpe germanique *Vespula germanica* (Annexe 2).

Le petit coléoptère de la ruche *Aethina tumida*, est inscrit sur la liste de l'OIE (OIE, 2014), liste des maladies à déclaration obligatoire en Europe, originaire des régions tropicales et subtropicales, situées au sud du Sahara. *Aethina tumida* a été identifié et décrit pour la première fois en 1867. Depuis 1940, il est décrit comme un parasite de la ruche. Ce coléoptère a été découvert pour la première fois dans un rucher commercial, en Floride (Etats-Unis), en 1998 (Thomas, 1998). Au cours des dix dernières années, *A. tumida* est considérée comme une espèce invasive, s'est répandue rapidement en Amérique du Nord, en Egypte et en Australie (Neumann et Elzen, 2004). Dans la ruche, le coléoptère pond ses œufs dans les fissures du bois ou au fond des alvéoles. Les larves d'*A. tumida* provoquent les dommages les plus importants. Pour s'alimenter des œufs et des larves d'abeilles, elles creusent des galeries au travers des rayons, détruisant les cellules de couvain et de miel. Le miel stocké s'écoule des cellules endommagées, colle les rayons, il est contaminé par les excréments des larves du prédateur et est fermenté. Les rayons détruits finissent par s'effondrer. Le degré de destruction infligé par le coléoptère dans une colonie est fonction du nombre de larves d'*A. tumida* écloses. Si l'infestation est importante, la colonie d'abeilles domestiques a de grands risques de dépérir totalement (Hauser, 2003).

La grande fausse-teigne (*Galleria mellonella*) et petite fausse-teigne (*Achroea grisella*) ou couvain tubulaire ou couvain chauve, étant deux espèces de lépidoptères appartenant à la famille des pyralidae infestent, à l'état larvaire, les cires et provoquent des dégâts importants. Les fausses-teignes infestent les cires construites, maintenues en réserve pour un usage apicole futur, mais également les rayons des colonies insuffisamment peuplées et ne pouvant se défendre. La présence des fausses teignes s'observe, généralement, lorsque les ruches sont laissées sans surveillance et/ou lorsque la grappe d'abeilles est insuffisamment développée pour couvrir les cadres de la ruche. Outre la destruction des cadres, *G. mellonella* et *A. grisella* seraient capables de transmettre les agents pathogènes de maladies graves, notamment la loque américaine (Borchert, 1966 ; Ryba *et al.*, 2009).

Nous avons trouvé utile de diviser ce travail en deux chapitres dont le premier est considéré comme une étape ayant pour objectif de dresser un portrait de l'étendue du matériel et méthodes d'étude. Quant au second chapitre, il est consacré aux résultats de cette recherche, et aux discussions de ceux-ci. C'est un chapitre portant sur la prévalence de *Nosema* sp., la prévalence de la loque américaine *Paenibacillus larvae*, la sensibilité des deux races d'abeilles *A. m. intermissa* et *A. m. sahariensis* pour la nosémose et l'étude préliminaire sur les mycoses affectant l'abeille domestique *A. mellifera intermissa*. Enfin, une conclusion générale et perspectives seront exposés.

Chapitre I

Matériels et méthodes

I : Matériel et méthodes

Ce chapitre traite la méthode d'étude de la prévalence de la nosérose, *Nosema* sp., de l'étude de la prévalence de la loque américaine *Paenibacillus larvae*, de l'étude de la sensibilité des deux races d'abeilles pour la nosérose et des mycoses affectant l'abeille tellienne *Apis mellifera intermissa*. Dans chaque étude, les sites des différents échantillonnages sont exposés. Ainsi, toutes les explications utiles sur la méthodologie adoptée pour l'étude sont données. L'analyse statistique choisie pour exploiter les résultats est développée.

1.1. Prévalence de la nosérose, *Nosema* sp.

1.1.1. Echantillonnage

En juin 2013, 24 stations sont choisies. Elles étaient situées dans 10 régions en Algérie : Alger, Tipaza, Médéa, Béjaia, Sétif, Batna, Khenchela, Tissemsilt, Sidi-Belabbes et Tlemcen. Dans chaque station, 100 abeilles vivantes sont systématiquement prélevées aléatoirement à l'intérieur des colonies, et placées immédiatement dans l'éthanol absolu (100 %). Tous les symptômes ou anomalies observés à l'intérieur ou autour des ruches sont relevés. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'au moment de l'étude. La localisation des régions d'étude est illustrée dans la figure 1.

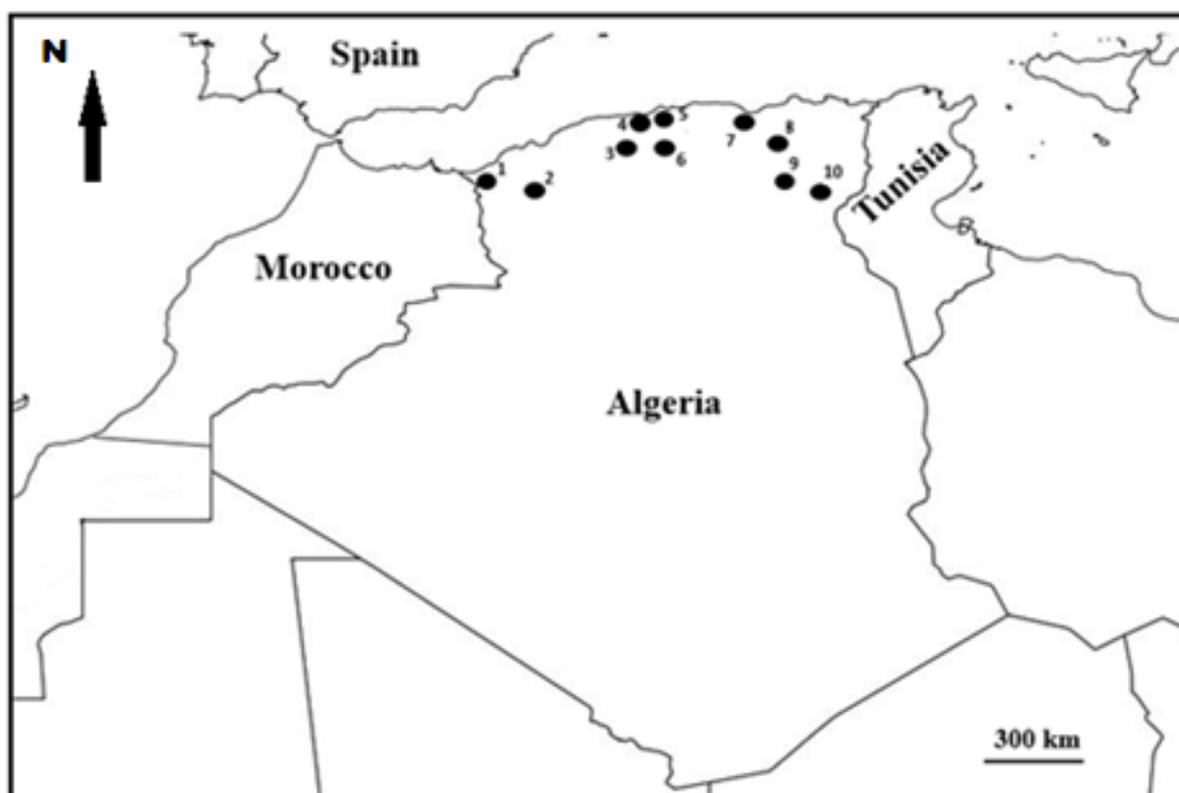


Fig. 1- La carte d'Algérie avec la localisation des régions d'étude de la nosérose.

1 : Tlemcen ; 2 : Sidi-Belabbes ; 3 : Tissemsilt ; 4 : Tipaza ; 5 : Alger ; 6 : Médéa ; 7 : Béjaia ; 8 : Sétif ; 9 : Batna ; 10 : Khenchela.

1.1.2. Détection de la nosérose

Au laboratoire, les spores de *Nosema* sp. sont recherchées et comptées séparément suivant le protocole proposé par l'Office International des Épizooties (Fries *et al.*, 2013 ; OIE, 2013). Au total, 164 recherches des spores sont effectuées. Les abdomens de 10 abeilles sont broyés dans 2 ml d'eau distillée. La suspension est filtrée à travers du papier Whatman N°4 (Webster *et al.* 2004 ; Higes *et al.* 2007) dans un entonnoir mis dans un tube gradué à centrifuger. Le tube et le filtre sont rincés avec 8 ml d'eau distillée. Le contenu des tubes est égalisé avec de l'eau à 10 ml. La suspension est ensuite centrifugée à 800 g pendant 6 min. Le surnageant est éliminée et le culot est remis en suspension avec 10 ml d'eau distillée. Un volume d'échantillon de 15 μ l est pris et déposé sous la lamelle d'un hémocytomètre (cellule de Malassez). Après quelques minutes les spores se déposent au fond de la chambre et le comptage peut être effectué sous microscope optique avec grossissement X 400. Les spores

de *Nosema* apparaissent transparentes avec un contour sombre très distinct (Fig. 2), mesurant entre 5 et 7 μm de longueur et 3 à 4 μm de largeur.

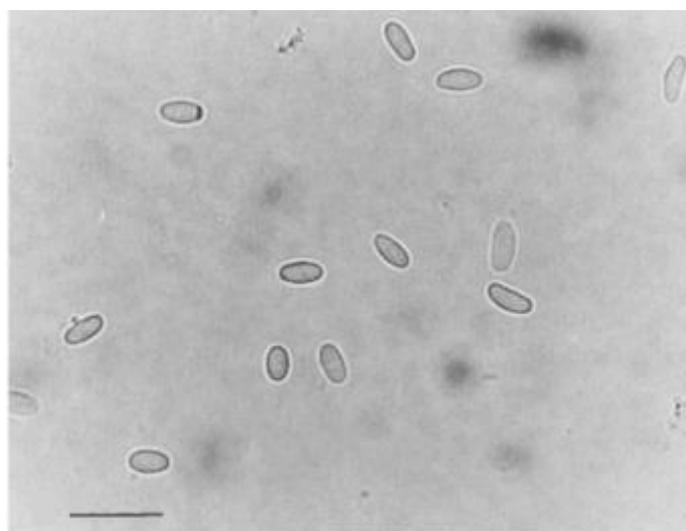


Fig. 2- Les spores de *Nosema* sous microscope optique ; Longueur de bar : 10 μm
(Photographie Fries *et al.*, 1996)

1.1.3. Quantification du nombre de spores de *Nosema*

La quantification du nombre de spores est obtenue en utilisant la cellule de Malassez (longueur 0,25 x largeur 0,20 x profondeur 0,20 en mm). Elle possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles. Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage (annexe 3). Le comptage se fait sur 5 cadres, ce qui dans la cellule de Malassez représentent un volume de 0,05 mm^3 qui doit être divisé pour le volume de dilution de l'échantillon (10 ml) pour obtenir le nombre de spores final (OIE, 2013).

1.1.4. Classification de l'infection par la nosémose

L'échelle de classification de l'infection utilisée pour déterminer le degré de l'infestation des colonies d'abeilles par la nosémose en fonction du nombre de spores (Soerensen, 2009) est la suivante :

- 1 : Très forte infection (plus de 5 millions de spores par abeille) ;
- 2 : Forte infection (>2 à 5 millions de spores par abeille) ;
- 3 : Faible infection (0,5 à 2 millions de spores par abeille) ;

4 : Très faible infection (moins de 0,5 million de spores par abeille) ;

5 : Absence de l'infection (0 spore par abeille) ;

1.1.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées en utilisant XLSTAT 7.5.2. Pour comparer les niveaux des infections entre les régions et entre les ruches, le test de multiples comparaisons était choisi. Nous avons employé l'analyse de Newman-Keuls (SNK) pour différencier les groupes homogènes. La signification $\chi = 0.05$ dans ANOVA était choisie. Les abeilles sont placées dans des groupes dont elles sont échantillonnées à partir de différentes régions. Ces groupes ont permis la comparaison entre les régions. Les abeilles prélevées de différentes ruches sont comparées de la même façon.

Pour étudier la corrélation entre les taux des infections et le nombre moyen de spores, la comparaison de deux échantillons appariés (Le test de Wilcoxon est centré, réduit et testé par rapport à la loi normale ; le test bilatéral dans XL STAT 7.5.2.) était utilisée avec la signification $\chi = 0.05$.

Pour analyser les échantillons Nosema-négative, les données des niveaux des infections sont analysées par ACP (Analyse des composants principaux) dans Statistica 6, qui est utilisée pour modéliser la proportion de la population infectée, basée sur la ruche, la région et le niveau d'infection comme des facteurs.

1.2. Prévalence de la loque américaine *Paenibacillus larvae*

1.2.1. Echantillonnage

l'échantillonnage est effectué dans 11 régions du territoire national à savoir Alger, Batna, Bouira, Boumerdes, Khenchela, Médéa, Sétif, Sidi belabbes, Tipaza, Tissemsilt et Tlemcen (Fig. 3), réparties entre 24 stations (24 ruchers). En totalité, les prélèvements sont effectués sur 105 colonies choisies aléatoirement dans les stations d'étude. Pour chaque colonie, 100 abeilles vivantes sont prélevées et mises immédiatement dans l'éthanol absolu (100 %) à -20°C pour les conserver, afin de faire des analyses au laboratoire.

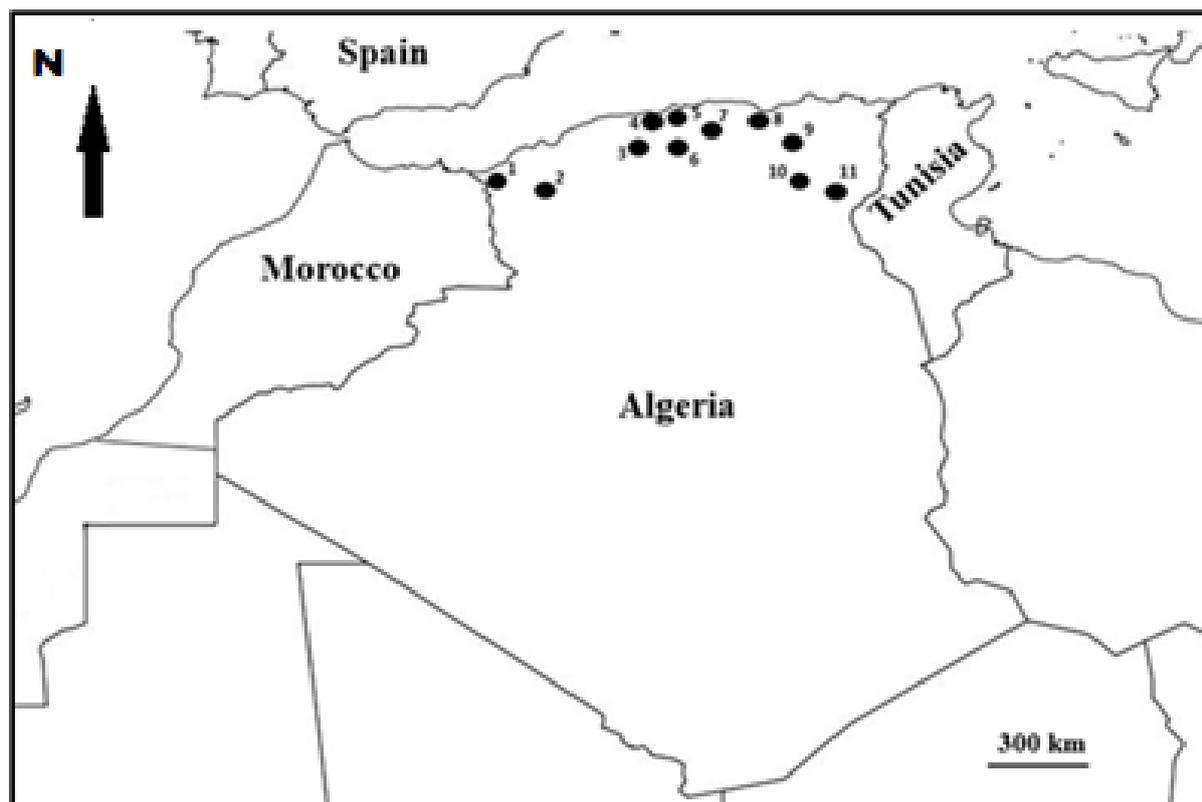


Fig. 3- La carte d'Algérie avec la localisation géographique des régions d'étude de la prévalence de la loque américaine *P. larvae*

1 : Tlemcen ; 2 : Sidi-Belabbes ; 3 : Tissemsilt ; 4 : Tipaza ; 5 : Alger ; 6 : Médéa ; 7 : Boumerdes ; 8 : Bouira ; 9 Sétif ; 10 : Batna ; 11 : Khenchela.

1.2.2. Identification de la loque américaine

Le diagnostic de la loque américaine est basé sur l'identification de l'agent pathogène (OIE., 2014). La bactérie *Paenibacillus larvae*, peut être identifiée par l'utilisation de la méthode biologie moléculaire (De Graaf *et al.*, 2013) ou par des tests biochimiques (OIE, 2014).

1.2.2.1. Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture sélectif MYPGP est utilisé pour la mise en évidence de *Paenibacillus larvae* (Dingmann et Stahly, 1983). Il est composé de 10 g de Bouillon Mueller-Hinton (Oxoid CM0405), 15 g d'extrait de levure, 3 g de phosphate de potassium (K₂PO₄), 2 g de glucose, 1 g de pyruvate de sodium (C₃H₃NO₃) et de 20 g d'agar.

Tous les ingrédients mentionnés sont versés dans un flacon de 1000 ml, ensuite compléter le flacon jusqu'à 1000 ml par l'eau distillée. Le milieu est stérilisé après homogénéisation à 120°C pendant 1 heure. La gélose préparée est coulée dans les boîtes de Pétri pour l'isolement de la bactérie.

1.2.2.2. Préparation des échantillons

Le diagnostic de certitude nécessite la culture et l'identification de la bactérie (De Graaf *et al.*, 2013 ; OIE, 2014). Une partie du prélèvement est mise en suspension dans de l'eau stérile puis chauffée à 80°C durant 20 minutes pour éliminer toutes les bactéries non sporulées (Lindström et Fries, 2005) (annexe 4). Car *P. larvae* est une bactérie génératrice de spores, son isolement dans les échantillons biologiques est typiquement précédé par une étape de traitement thermique pour tuer tous les micro-organismes végétatifs. Cette étape réduit de manière significative le risque que les colonies de *P. larvae* soient masquées par des concurrents (OIE, 2014).

1.2.2.3. Ensemencement et incubation

Le prélèvement est ensuite ensemencé sur une gélose MYPGP (Dingman et Stahly, 1983). Ce milieu donne de meilleurs résultats surtout s'ils sont incubés en présence de 5% de CO₂. Après 2 à 4 jours d'incubation à 35-37°C, les colonies suspectes (petites colonies grisâtres, d'aspect butyreux et à contour régulier) sont identifiées (OIE, 2014 ; De Graaf *et al.*, 2013).

1.2.2.4. Test de confirmation de *P. larvae*

Pour identifier la bactérie *P. larvae*, des tests macroscopiques, microbiologiques, physiologiques et autres tests biochimiques étaient utilisés.

1.2.2.4.1. Examen macroscopique

La morphologie des colonies de *P. larvae* (Fig. 4) ensemencées sur une gélose MYPGP se diffère d'une souche à une autre (De Graaf *et al.*, 2006 ; OIE, 2014 ; De Graaf *et al.*, 2013).

Selon De Graaf *et al.* (2006) et OIE (2014), Sur la gélose PLA, les colonies de *P. larvae* sont petites, de couleur vert pâle ou jaune (la même couleur que le milieu), avec une surface

rugueuse légèrement opaque ; le centre est parfois surélevé. Sur la gélose MYPGP, les colonies sont petites, régulières, en général rugueuses, plates ou surélevées, blanchâtres ou beiges. OIE (2014) a signalé que les colonies de *P. larvae* sont petites, régulières, luisantes, butyreuses et grisâtres, sur la gélose au sang de Colombie (CSA). Pour cette étude, nous avons utilisé la gélose MYPGP, pour l'isolement de la bactérie.

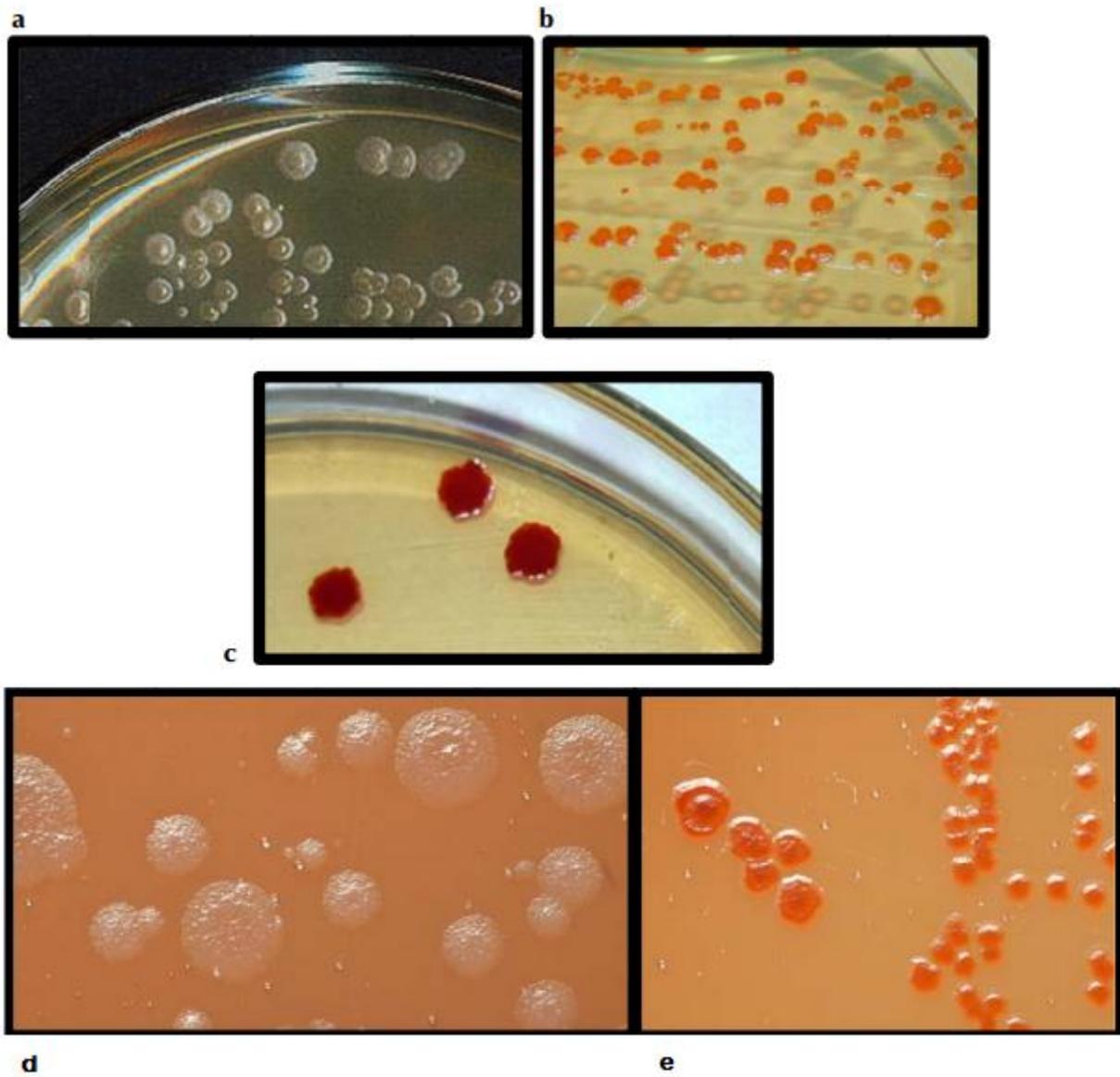


Fig. 4- Caractérisations morphologiques des colonies de différentes souches de *Paenibacillus larvae* ensemencées sur différents milieux de culture : Photographie Alippi (1992) cité par OIE (2014)

Apparence de colonie de *Paenibacillus larvae* cultivée sur la gélose MYPGP : (a) la souche ATCC 9545^T, (b) la souche PL SAG m290 et (c) la souche NRRL B-14154.

Apparence de colonie de *Paenibacillus larvae* cultivée sur la gélose au sang de Colombie (CSA agar) : (d) la souche ATCC 9545^T et (e) la souche PL SAG m290. Photographie Alippi (1992) cité par OIE (2014).

1.2.2.4.2. Examen microscopique

Les souches de *Paenibacillus larvae* sont constituées de bacilles aéro-anaérobies, droits ou légèrement incurvés, aux extrémités arrondies, de 1,5 à 6 µm de longueur sur 0,5 µm de diamètre. Ils se présentent de manière isolée ou groupés en chaînes, parfois mobiles, présentant une spore ovoïde, centrale ou sub-terminale pouvant déformer la cellule bactérienne (De Graaf *et al.*, 2006). La sporulation ne s'accompagne pas de la formation d'un cristal parasporal (OIE, 2014).

L'examen microscopique après une coloration des spores permet la mise en évidence de nombreuses spores qui ne peuvent pas être différenciées des spores des autres espèces des genres *Paenibacillus* ou *Bacillus* (OIE, 2014). La coloration de Gram est une coloration différentielle. Elle permet de classer les bactéries en deux groupes sur base de la perméabilité de leur paroi à l'Alcool (ou à l'Alcool/Acétone). Cette perméabilité dépend de la composition de la paroi bactérienne (épaisseur de la paroi liée à sa richesse en peptidoglycanes) et n'est pas absolue. D'où la difficulté technique d'une bonne coloration de Gram. Cette technique garde toute sa pertinence, même dans un laboratoire plus sophistiqué en raison de sa rapidité et de l'orientation diagnostique qu'elle donne (Gillet *et al.*, 2009).

La coloration de Gram consiste à soumettre un frottis bactérien sec et fixé à l'action d'un colorant primaire violet (violet de gentiane dans le cas de la coloration de Gram classique), puis à un mordantage au Lugol (solution iodo-iodurée). A ce stade le cytoplasme de toutes les bactéries est coloré en violet.

L'étape suivante, la plus délicate, est la différenciation à l'alcool. Elle consiste à soumettre les bactéries ayant subi la coloration primaire violette à l'action contrôlée de l'éthanol. Certaines bactéries dont la paroi est imperméable à l'alcool dans des conditions opératoires de la coloration restent colorées en violet, elles sont Gram positif. D'autres, dont la paroi est perméable à l'alcool dans les mêmes conditions, sont des Gram négatif. A l'issue de l'étape de différenciation, les bactéries Gram positif sont colorées en violet, les bactéries Gram négatif sont incolores. La dernière étape est la coloration secondaire dite coloration de contraste qui

consiste à soumettre le frottis à un colorant rose (la fuchsine pour le Gram classique). La coloration terminée, observer la préparation avec l'objectif x 100 à immersion (Gillet *et al.*, 2009).

1.2.2.4.3. Tests de confirmation biochimique de *P. larvae*

Pour confirmer la présence de *P. larvae* dans les échantillons, nous avons utilisé plusieurs tests de confirmation biochimique. Les caractères bactériologiques, le test de catalase, l'hydrolyse de la caséine, le test d'oxydase, le type respiratoire, l'activité hémolytique et les galeries biochimiques API 20 E sont utilisés dans cette partie.

1.2.2.4.3.1. Caractères bactériologiques de *P. larvae*

La bactérie *P. larvae* présente des caractères positifs pour l'hydrolyse de la caséine et de la gélatine, l'acidification (sans gaz) de la N-acétylglucosamine, du glucose et du tréhalose. Elle présente des caractères négatifs pour la catalase (la catalase peut être, tardivement, faiblement positive), phénylalanine désaminase, ONPG (Api 20E), uréase (Api 20E), indole, aussi pour l'acidification de l'amidon, de l'arabinose, du maltose, du saccharose et du xylose. Autres tests sont variables pour cette bactérie notamment la capacité de la réduction des nitrates, VP, de l'hydrolyse de l'amidon, de l'acidification du mannitol et de la salicine.

1.2.2.4.3.2. Test de catalase

Une goutte d'eau oxygénée à 3 % est placée sur une culture en croissance active sur le milieu de culture (MYPGP). La plupart des bactéries aérobies décomposent le peroxyde en eau et en oxygène, produisant une mousse effervescente, mais *P. larvae* est presque toujours négatif pour cette réaction, ou légèrement positif (mais avec retard) (Haynes, 1972). La décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase se traduit par un dégagement gazeux abondant sous la forme de bulles. L'absence de bulles constitue une réponse négative.

1.2.2.4.3.3. Hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine n'est pas recherchée couramment (intérêt pour le genre *Bacillus*). La caséine est un mélange complexe de protéines du lait. Une

protéine est constituée d'assemblages des acides aminés et de Phosphoprotéine, étant très largement représentée dans le lait des mammifères (vache 30 g/l, femme 9 g/l).

L'hydrolyse de la caséine est vérifiée sur gélose au lait (Fig. 5) et thiamine (par litre, gélose 20 g, extrait de levure 10 g, stérilisée à 121°C pendant 15 minutes). A 70 ml de milieu refroidi, ajouter 30 ml de lait écrémé et 1,5 ml d'une solution de thiamine à 0,1% stérilisée par filtration. Les boîtes de Pétri sontensemencées et examinées après 5 jours d'incubation à 36°C ±1°C. Une réaction positive est indiquée par l'éclaircissement du milieu sous et autour de la zone de croissance de la colonie. *Paenibacillus larvae* induit une réaction positive.



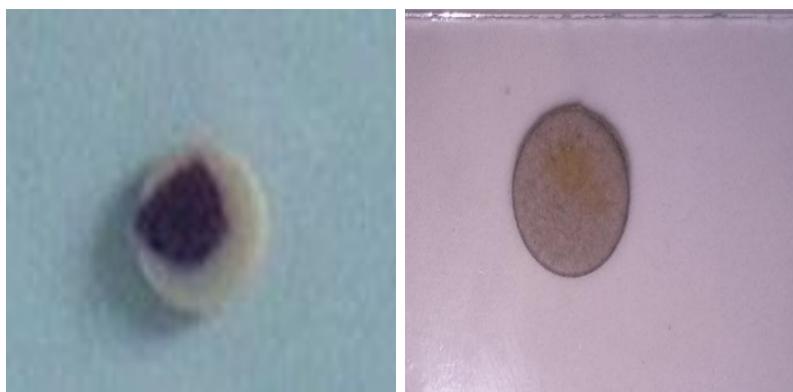
Fig. 5- Gélose au lait (Originale)

1.2.2.4.3.4. Test d'oxydase

La recherche de l'oxydase est une technique d'identification concernant les bactéries à Gram négatif, les bactéries possédant l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N-diméthyle-paraphénylene diamine, ce qui donne des produits violacés.

A l'aide d'une pince stérile, placer un disque d'oxydase sur une lame stérile. Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester. Puis, prélever la colonie choisie à l'aide d'un bâtonnet ou d'une anse (ne pas utiliser d'anse de métal, à l'exception du platine, cela peut provoquer des réactions faussement positives). Ensuite, frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes. L'absence de coloration ou coloration au-delà de 30 secondes constitue une réponse

négative. Une réaction positive se traduit par une coloration bleu foncé à violet apparaissant dans un délai de 30 secondes (Fig. 6).



A : Oxydase positive

B : Oxydase négative

Fig. 6- Coloration des disques d'oxydase après leur frottement avec les bactéries (Originale)

1.2.2.4.3.5. Type respiratoire

L'étude du type respiratoire d'un micro-organisme permet de définir ses rapports avec l'oxygène. Certaines bactéries nécessitent O_2 , d'autres exigent l'absence d' O_2 . Un milieu de culture spécifique de type gélose viande-foie (gélose VF) a été utilisé, dont les caractéristiques sont les suivantes : Elle contient du glucose qui agit comme réducteur et permet la diminution du potentiel d'oxydo-réduction. Elle ne contient pas de nitrates qui pourraient permettre le développement en anaérobiose de bactéries aérobies strictes ayant un nitrate réductase. Elle présente un gradient de pression partielle en oxygène.

Régénérer la gélose VF par ébullition au bain-marie bouillant pendant environ 30 minutes. Nous pratiquons deux types d'ensemencement. Lorsque le milieu est encore liquide, vers $45^\circ C$, l'ensemencement se fait à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée introduite jusqu'au fond du tube et on remonte en spirale, puis refroidir à l'eau courante. Quand le milieu est solidifié nous ensemencions par la technique de la pique centrale. En introduisant la pipette jusqu'au fond et en remontant directement de façon droite.

Pour éviter l'empêchement de la formation du gradient d' O_2 , il n'est pas recommandé le vissage de bouchon à fond. Ensuite, le tube est placé dans l'étuve (à $37^\circ C$) pendant 24 heures pour faire la lecture comme indiqué dans la figure 7.

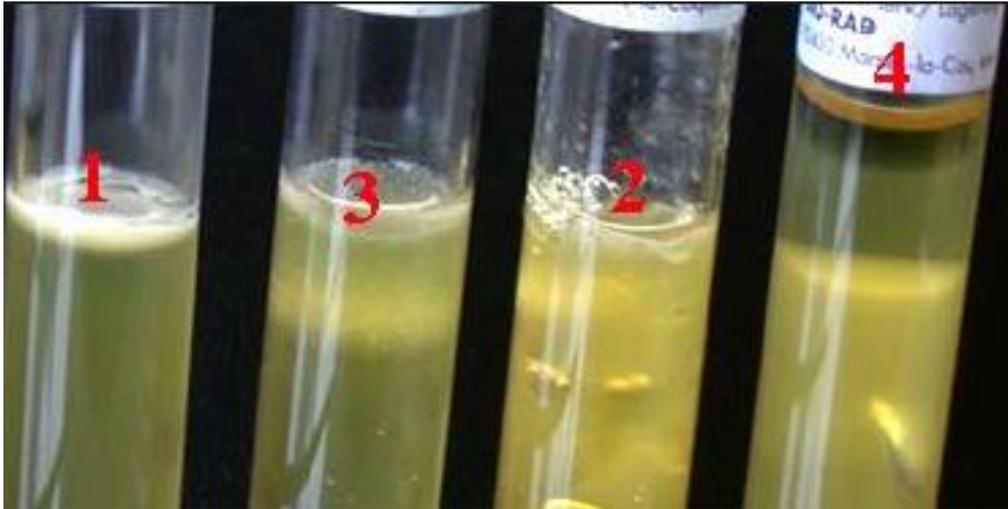


Fig. 7- les différents types respiratoires des bactéries (Denis *et al.*, 2007)

- 1 : colonies en haut du tube représentent des bactéries aérobies strictes.
- 2 : colonies dans tout le tube représentent des bactéries aéro-anaérobies.
- 3 : colonies légèrement sous la surface du tube représentent des bactéries micro-aérophiles.
- 4 : colonies en bas du tube représentent des bactéries anaérobies strictes.

1.2.2.4.3.6. Etude de l'activité hémolytique

L'hémolyse est la destruction des globules rouges par les bactéries et libérant l'hémoglobine, le milieu utilisé pour l'étude de l'activité hémolytique est la gélose au sang frais qui est un milieu de culture et d'isolement de bactéries exigeantes (sans besoin de facteurs particuliers).

La préparation de ce milieu se fait à partir d'une gélose base sang à laquelle nous ajoutons du sang frais (pour un flacon de 250 ml de gélose base sang nous ajoutons 12,5 ml du sang frais). Liquefier la base au bain-Marie bouillant. Puis, attendre son refroidissement à 45°C (milieu en surfusion) et ajouter stérilement le volume du sang frais (le sang ne doit pas être sorti au dernier moment du réfrigérateur, sinon il y aura prise en masse du milieu au moment de l'addition du sang). Homogénéiser en faisant rouler le tube entre les mains, en évitant la formation de bulles puis couler en boîte de Pétri en évitant la formation de bulles. La lecture se fait selon l'aspect de l'hémolyse (fig. 8).

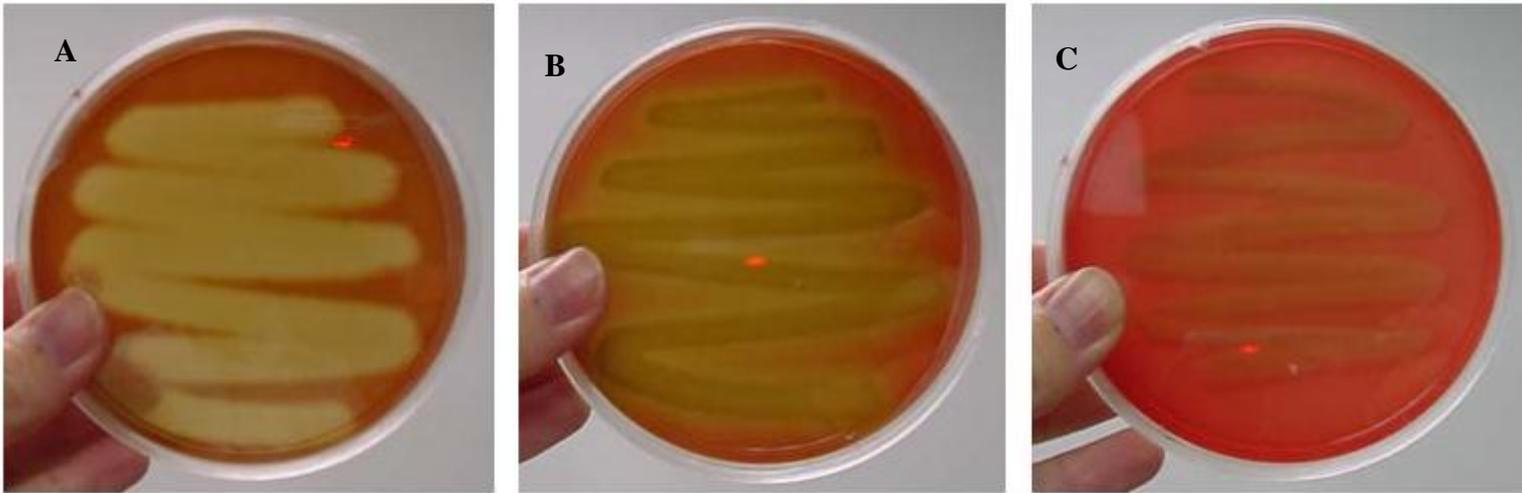


Fig. 8- Aspect de l'hémolyse partielle et totale par les bactéries sur milieu GSF (la gélose au sang frais). (Cain *et al.*, 2015)

A : Colonies entourées d'un halo clair : bêta-hémolyse (hémolyse totale) ; B : Colonies entourées d'un halo verdâtre : alpha-hémolyse (hémolyse partielle) ; C : activité hémolytique négative : gamma-hémolyse.

1.2.2.4.3.7. Galeries biochimiques

Le kit de diagnostic API 20 E a été utilisé pour une caractérisation biochimique de *P. larvae*. La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés (Fig. 9). Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. 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 d'un tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.



Fig. 9- Le kit de diagnostic API 20 E (Originale)

ONPG : Détermination de la présence de l'enzyme β -galactosidase. ADH : Transformation de l'arginine (acide aminé) par l'arginine déshydrogénase. LDC : Transformation de la lysine (acide aminé) par la lysine décarboxylase. ODC : Transformation de l'ornithine (acide aminé) par l'ornithine décarboxylase. CIT : Utilisation du citrate comme seule source de carbone. H₂S : Production du sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir du thiosulfate (S²O³). URE : Libération d'ammoniac à partir de l'urée grâce à l'uréase. TDA : Formation de l'acide indole pyruvique à partir du tryptophane (acide aminé) grâce à tryptophane désaminase. IND : Formation d'indole à partir du tryptophane (acide aminé). VP : Formation d'acétoïne à partir du pyruvate de sodium. GEL : Liquéfaction de la gélatine (protéine).

Production de l'acide en conditions aérobies à partir d'un hydrate de carbone (tester la capacité pour la fermentation des sucres) :

GLU (glucose) ; MAN (mannitol) ; INO (inositol) ; SOR (sorbitol) ; RHA (rhamnose) ; SAC (saccharose) ; MEL (méllobiose) ; AMY (amygdaline) ; ARA (L+arabinose).

1.2.2.4.3.7.1. Préparation de la galerie

Il faut réunir le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation. Puis, répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Eviter d'utiliser d'eau avec additifs ou dérivés susceptibles de libérer des gaz comme le CO₂. Il est préférable d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte (ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation). Enfin, sortir la galerie de son emballage et la placer dans la boîte d'incubation.

1.2.2.4.3.7.2. Préparation de l'inoculum

A l'aide d'une anse de platine, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile. Puis bien agiter à l'aide d'un vortex. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).

1.2.2.4.3.7.3. Inoculation de la galerie

Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette. Poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant afin d'éviter la formation de

bulles au fond des tubes. Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir le tube et la cupule. Quant aux autres tests, les tubes uniquement doivent être remplis (et non pas les cupules). Concernant les tests ADH, LDC, ODC, H2S et URE, la création d'une anaérobiose est obligatoire en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Par la suite, refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

1.2.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont exécutées en utilisant SAS. 9. Sur 105 observations (colonies), la procédure GENMOD du SAS a été utilisée, qui permet de spécifier la distribution binomiale du variable. Les facteurs fixes sont les régions et les ruchers à l'intérieure des régions, ruchers (régions). Le facteur variable choisi pour cette analyse est la présence de la maladie. Autrement dit, nous voulons connaître les effets des différentes régions et des différents ruchers à l'intérieure des régions sur la fréquence et la distribution de la maladie à travers le territoire national. La signification est choisie pour une valeur de $p = 0,05$.

La procédure GENMOD du SAS a été utilisée pour ajuster le modèle linéaire généralisé (GLM) en spécifiant les instructions générales suivantes dans l'éditeur du package SAS :

```
proc genmod data=datalogue;
class REGIONS    RUCHERS    ;
model PRS = REGIONS    RUCHERS (REGIONS) / dist = BINOMIAL
type1 type3 ;
RUN;
```

Il est à noter que la distribution binomiale est spécifiée avec l'option 'distribution' (dist=binomial), dans la déclaration du modèle, les options statistiques type 1 et type 3 sont utilisés.

1.3. Sensibilité des deux races d'abeilles *A. m. intermissa* et *A. m. sahariensis* pour la nosérose

Une étude préliminaire menée pendant le mois d'août 2015, nous a permis de tester la résistance des deux races d'abeilles contre la nosérose. L'expérience a compris l'inoculation d'une dose de spores de *Nosema* sp. 100 000 spores /abeille (Malone *et al.*, 1998 ; Malone *et al.*, 2001 ; Higes *et al.*, 2007 ; Higes *et al.*, 2008a ; Fries *et al.*, 2013), et un groupe témoin. Trois répétitions pour chaque modalité sont réalisées à partir d'une colonie d'abeille domestique du rucher expérimental de département de zoologie agricole et forestière ENSA d'El-Harrach. Chaque répétition avait 20 abeilles placées dans une cage type « Pain » (12 x 11 x 8 cm). Les abeilles de chaque cage sont nourries avec du candie (sucrose et miel) et ont reçu de l'eau. Elles sont entretenues jusqu'au 4^{ème} jour.

1.3.1. Protocole expérimental

Le protocole comprenait les étapes suivantes : l'isolement des spores de *Nosema* sp. à partir des abeilles infectées. Ensuite, l'inoculation individuelle d'une dose de spores dans des abeilles. Enfin, mesure quotidienne de la mortalité des abeilles et quantification du niveau de spores de *Nosema* sp.

1.3.1.1. Emploi des cages de contention

Les cages de contention de type Pain (12 x 11 x 8 cm) sont en bois, fermées sur deux côtés par des plaques fines de plexiglas amovibles et percées d'orifices permettant l'aération. Le dessus de la cage est constitué d'une plaque en bois fixe, percée de deux orifices (fig. 10). Ces derniers permettent le passage de deux tubes à essai de 5 ml servant d'abreuvoir et de nourrisseur (Labrosse, 2003 ; Chahbar, 2013).

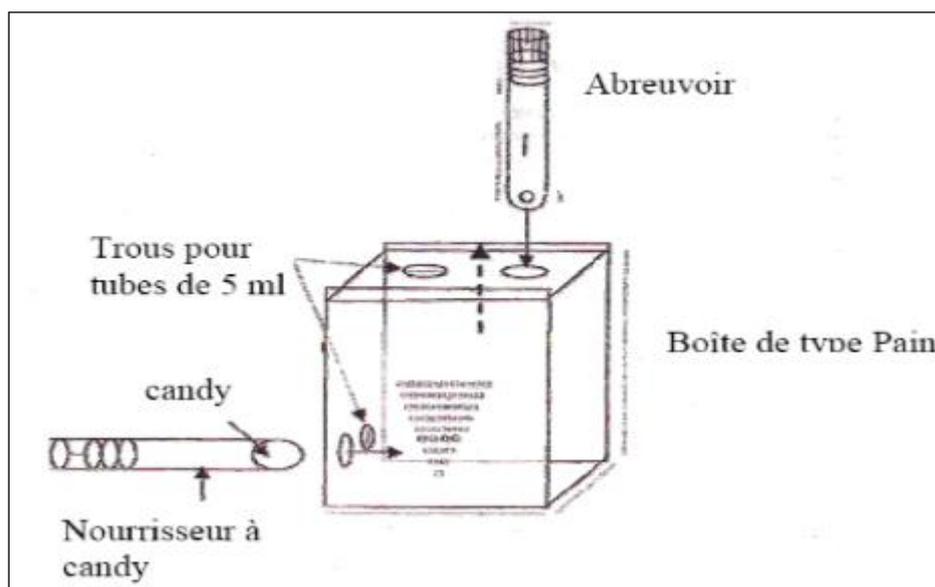


Fig. 10- Dispositif expérimental, schéma d'une cage Pain et des tubes nourrisseurs (Labrosse, 2003)

1.3.1.2. Type de nourrissage

L'alimentation peut influencer la longévité de l'abeille (Schmidt *et al.*, 1987), la réponse immunitaire contre l'infection par la nosérose (Alaux *et al.*, 2010b) et le développement des spores de *Nosema*. De ce fait, il est primordial de considérer attentivement l'aliment à fournir pour les abeilles en expérimentation. Les chercheurs doivent maintenir l'abeille à tester dans des conditions optimales. Selon Barker et Lehner (1978), l'abeille est capable de survivre pour une longue période par une solution de saccharose 50 %.

1.3.1.3. Obtention des abeilles

En suivant la méthode de Williams *et al.* (2012), Human *et al.* (2013) et Williams *et al.* (2013), des abeilles sont prélevées la veille de l'essai à l'intérieur des cadres de couvain à partir des colonies d'abeilles domestiques *A. m. intermissa* et *A. m. sahariensis* (fig. 11) et placées dans des groupes après une soumission à une anesthésie par dioxyde de carbone (CO₂). Chaque groupe de 20 abeilles est mis dans une cage type pain (Fig. 12). Ces groupes d'abeilles sont placés à l'obscurité dans une enceinte climatisée à 25 ± 2 °C et à une humidité relative comprise entre 50 et 70 %. Des abeilles supplémentaires sont à prévoir pour remplacer les individus morts ou présentant des comportements anormaux.

L'absence de spores chez les abeilles est vérifiée sur un échantillon prélevé de chaque cadre et analysé selon le protocole de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE, 2014) et Fries *et al.* (2013).

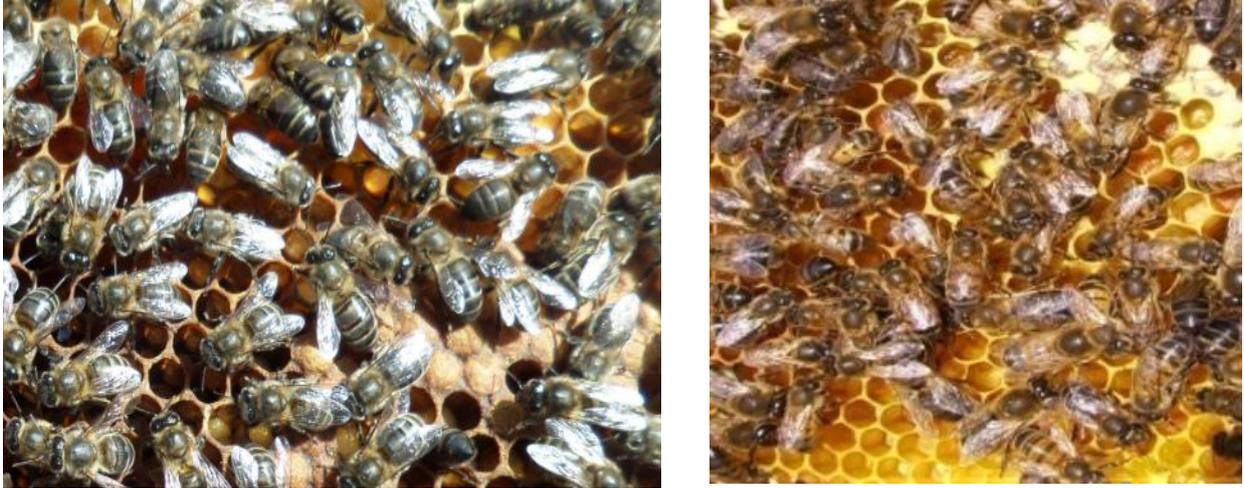


Fig. 11- Les deux races d'abeilles domestiques existantes en Algérie ; à gauche, l'abeille tellienne *A. m. intermissa* ; à droite, l'abeille saharienne *A. m. sahariensis* (Originale)



Fig. 12- Cages de contention de type Pain placées dans une étuve lors de l'essai (Originale)

1.3.1.4. Obtention de spores de *Nosema* sp.

Les spores de *Nosema* sp. sont fraîchement isolées à partir d'une colonie infectée. L'extraction des spores est réalisée selon le protocole de Malone *et al.* (1998) et l'OIE (2014). Une solution de 50.000.000 spores/ml est obtenue et à partir de laquelle les doses de spores sont préparées. Cette solution de spores est préparée le jour même de l'inoculation.

1.3.1.5. Concentration de la suspension de spores

La dilution de la suspension purifiée de spores en une concentration finale choisie (50.000.000 spores/ml) peut être performée en utilisant la formule proposée par Fries *et al.* (2013) :

$$C_1V_1 = C_2V_2 ;$$

Dont : C_1 : la concentration initiale ; V_1 : le volume initial ; C_2 : La concentration finale ; V_2 : le volume final ;

1.3.1.6. Inoculation des spores de *Nosema* sp.

Plusieurs travaux de recherche sont menés pour l'inoculation individuelle de la suspension de spores dans l'abeille domestique afin d'assurer l'exposition de cette abeille à une dose de spores connue (Higes *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007; Maistrello *et al.*, 2008; Forsgren et Fries, 2010). Pour connaître les effets précis d'une dose de spores de *Nosema* sp., les abeilles doivent être nourries individuellement par une suspension qui contient un nombre déterminé de spores (Fries *et al.* 2013).

Les abeilles sont collectées et laissées jeûner pendant 2 heures, puis elles sont nourries individuellement avec 2 μ l de sirop contenant une concentration de spores définie (100 000 spores). Le dosage est fait à l'aide d'une micropipette pendant que l'abeille était maintenue délicatement avec une pince par le thorax (fig. 13) en suivant la méthode utilisée par Fries *et al.* (1992) et Higes *et al.* (2007).

Cet essai comprend les témoins à l'aide d'une solution de saccharose. 2 μ l de sirop sont inoculés individuellement dans les abeilles. Les témoins permettent d'estimer la mortalité naturelle et de vérifier la qualité des abeilles utilisées dans l'essai.

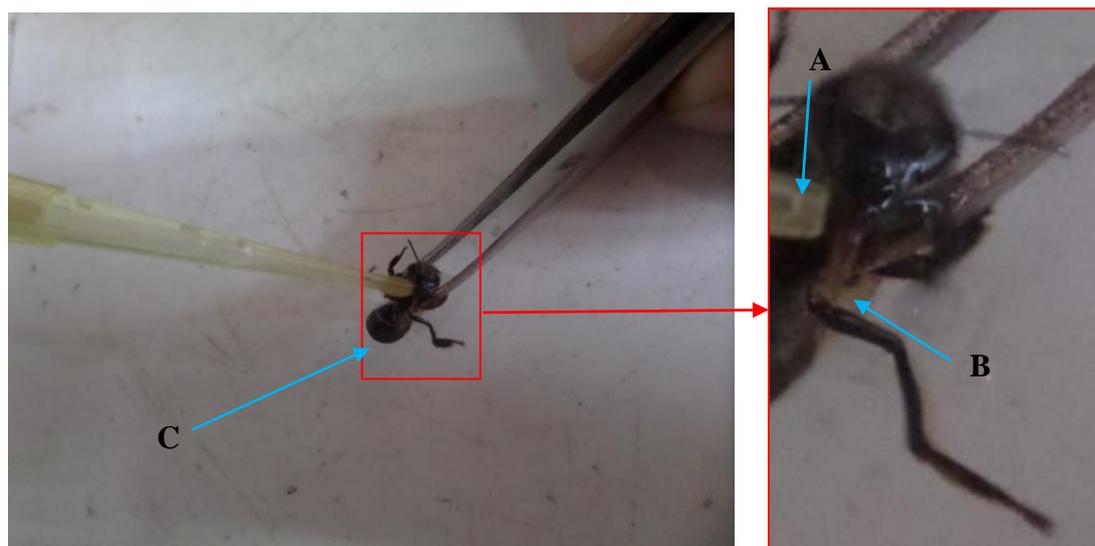


Fig. 13- Inoculation individuelle de sirop contenant une dose de spores dans une abeille domestique (Originale).

A : Micropipette contenant une dose de spores de *Nosema* ; B : La langue de l'abeille ; C : Abeille maintenue par une pince (Originale).

1.3.1.7. Mesure de la mortalité des abeilles et quantification du niveau de spores de *Nosema* sp.

Pendant l'expérimentation les abeilles mortes sont dénombrées quotidiennement. La quantité de spores, obtenue après l'inoculation, est estimée individuellement à partir des abdomens (Malone et Giaccon, 1996 ; Fries *et al.*, 2013 ; OIE, 2013) jusqu'au 4^{ième} jour de vie des abeilles.

Les mortalités sont exprimées en pourcentage par rapport à la population initiale après les avoir corrigées préalablement selon la formule d'ABBOT (1925) :

$$M = \left(\frac{P - T}{S} \right) \times 100$$

M : Mortalité corrigée exprimée en pourcentage de la population initiale ;

P : Pourcentage de morts dans la population traitée ;

T : Pourcentage de morts dans la population témoin ;

S : Pourcentage de survivants dans la population témoin ;

1.3.2. Analyses statistiques

Pour étudier la sensibilité des deux races d'abeilles pour la nosérose, la procédure GLM a été utilisée avec la sélection du model ANOVA Means LSMeans du SAS 9. En effet, les expressions suivantes sont utilisées dans l'éditeur du SAS 9 :

```
data sensibilité ;
  input Traitement répétition jour mortalité ;
  datalines ;
ods select Model ANOVA Means LSMeans ;
proc glm data = sensibilité ;
  class Traitement répétition jour;
  model mortalité = Traitement répétition jour ;
  means Traitement ;
  lsmeans Traitement ;
run ;
ods select all ;
```

La relation entre le nombre de spores de *Nosema* et la mortalité chez l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*, était étudiée en utilisant la procédure REGRESSION du SAS 9. La formule suivante était copiée dans l'éditeur du SAS 9 :

```
data corrélation ;
  input MortalitéCorrigée Nombredespores ;
  datalines ;
proc reg data=corrélation ;
  model MortalitéCorrigée = Nombredespores ;
  plot MortalitéCorrigée * Nombredespores / cframe=ligr ;
run ;
```

1.4. Etude préliminaire sur les mycoses affectant l'abeille domestique *A. mellifera intermissa*

Notre travail est effectué au laboratoire de biotechnologie microbienne, Faculté des Sciences de l'université de Boumerdès. Il porte sur l'isolement et l'identification des mycoses qui attaquent l'abeille domestique locale *Apis mellifera intermissa* ainsi que la détermination de leur prévalence dans quelques régions algériennes. En plus, une étude approfondie est menée sur *Ascospheera apis*, champignon affectant cette abeille domestique.

1.4.1. Echantillonnage

Les prélèvements sont effectués sur des larves, des abeilles adultes, de la cire battue à l'intérieur des colonies et sur des larves momifiées devant les entrées des ruches. Six ruchers sont choisis situés dans quatre régions à savoir Alger, Blida, Boumerdes et Msila. L'échantillonnage était sélectif, basé sur des signes cliniques des maladies fongiques. Toutes les colonies échantillonnées, en totalité 36 colonies, ont présenté des symptômes cliniques d'infection par les mycoses. Les anomalies observées à l'intérieur ou autour des ruches sont relevées. Dans chaque ruche, les échantillons (larves, cire battue et abeilles) présentant des anomalies et des signes d'infection par les champignons sont prélevés, mis dans des boîtes de Pétri et placés immédiatement à -20°C pour les conserver, afin de les analyser ultérieurement au laboratoire. La localisation des régions d'étude est illustrée dans la figure 14.



Fig. 14- La carte d'Algérie avec la localisation des régions d'étude des mycoses affectant l'abeille domestique *Apis mellifera intermissa*

1.4.2. Isolement des champignons

Une partie de chaque prélèvement infecté (cire battue, larve et abeille) est déposée stérilement et individuellement dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA/Sabouraud après un rinçage par l'hypochlorite de sodium à 10 % pendant 10 min. Après un lavage dans deux bains successifs par l'eau distillée, il faut incuber la boîte à 28°C pendant 5 jours.

1.4.3. Purification

La purification a pour but l'obtention de colonies fongiques pures, spécifiques, afin d'identifier les champignons en cause. A l'aide de l'extrémité inférieure d'une pipette Pasteur stérile, nous coupons des disques mycéliens puis les transférer dans un nouveau milieu PDA, tout en prenant soin de mettre le mycélium en contact avec le milieu PDA. Il faut ensuite, incuber les boîtes de Pétri contenant les colonies fongiques à 28°C pendant 5 jours. L'opération doit être reprise jusqu'à l'obtention des colonies pures.

1.4.4. Méthode d'identification

Les souches fongiques mises en causes sont identifiées en utilisant des examens et des observations macroscopiques et microscopiques.

1.4.4.1. Examen macroscopique

Il faut observer attentivement dans un endroit bien éclairé l'aspect du champignon, en vérifiant l'homogénéité des colonies (l'obtention des colonies identiques). L'examen macroscopique est basé sur les caractères suivants :

- La consistance de la colonie : glabre, duveteuse, poudreuse, plâtreuse, soyeuse, laineuse ou floconneuse ;
- La surface : plane, en dôme, plissé ou cérébriforme ;
- La présence de rayons : fins ou larges, courts ou longs s'en forçant dans la gélose ;
- La couleur de recto-verso de la boîte de Pétri qui contient la souche fongique isolée ;
- La présence d'un pigment diffusible dans la gélose.

1.4.4.2. Examen microscopique

Les observations sous microscope concernent la morphologie des spores, leur taille et surtout la façon dont elles sont rattachées aux filaments (isolées en chaînes ramifiées, présence de produits phialides, ...etc). Cet examen peut se faire par un montage entre lame et lamelle avec l'ajout d'une goutte de bleu de méthylène ou d'une goutte d'eau distillée stérile.

1.4.4.2.1. Technique du drapeau ou du ruban adhésif

Un morceau de ruban adhésif transparent d'environ 3 cm est appliqué délicatement sur la colonie à l'aide d'une pince. Pour assurer une bonne adhésion on passe le pouce sur le ruban adhésif de manière à obtenir l'empreinte de la colonie. Le ruban est ensuite placé sur une lame en verre qui sera utilisée pour une observation microscopique. Cette technique permet aux spores et au mycélium d'adhérer à la surface du ruban adhésif, ce qui nous permet de les identifier directement au microscope optique. Dans le cas d'une lecture directe au microscope, les spores de morphologie caractéristique peuvent être identifiées sans

équivoque (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Stachybotrys*...), alors que les spores de faibles diamètres et présentant des ornements sommaires ne peuvent être différenciées (*Penicillium*, *Aspergillus*).

1.4.4.2. Préparation microscopique

La préparation est effectuée en prélevant une fraction de mycélium avec une aiguille stérile à l'extrémité de la colonie (car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif). Cet inoculum est déposé sur une lame contenant une petite goutte d'eau, ensuite il faut remuer délicatement pour avoir une préparation homogène. L'ensemble est recouvert d'une lamelle tout en évitant la formation des bulles d'air. Ensuite, observer rapidement au microscope optique au grossissement GX 100 puis GX 400.

1.4.5. Caractérisation morphométrique de différentes formes de champignon *Ascosphaera apis*

Les différentes formes de champignon *A. apis* sont caractérisées par l'utilisation de l'oculaire micrométrique. L'exactitude du diagnostic de multiple microorganismes repose sur la précision des techniques d'examen et sur la morphologie (Thienpont *et al.*, 1995). Cette partie a pour but de décrire les caractéristiques des différentes formes de résistance et de croissance d'*A. apis*.

De ce fait, nous avons réalisé des mensurations sur les formes de résistance, notamment les diamètres des kystes et des spores en suivant la méthode décrite par (Thienpont *et al.*, 1995) et en utilisant un oculaire micrométrique. Les hyphes représentant la forme de croissance d'*A. apis* sont mesurés de la même façon.

Pour faire les mesures, il faut remplacer l'oculaire normal par l'oculaire micrométrique. Puis, nous déplaçons la platine de telle sorte que le bord de l'objet à mesurer coïncide avec la ligne zéro de l'oculaire micrométrique. Il faut compter ensuite le nombre de subdivisions recouvertes par cet objet et y évaluer éventuellement la longueur dépassant la dernière subdivision. Il faut multiplier ensuite le nombre de subdivision par l'index micrométrique (Thienpont *et al.*, 1995).

L'index micrométrique : L'oculaire micrométrique est un oculaire spécial sur lequel est gravée une échelle graduée. Pour un étalement de microscope avec l'objectif (X10), chaque

subdivision de l'oculaire micrométrique correspond pour cet objectif à 15 μm . Avec l'objectif (X40), chaque subdivision de l'oculaire micrométrique correspond à 3,75 μm . Pour l'objectif (X100), chaque subdivision correspond à 1,5 μm (Thienpont *et al.*, 1995).

1.4.6. Etude de la croissance mycélienne de champignon *Ascosphaera apis*

Cette partie porte sur l'identification des facteurs optimaux pour la croissance mycélienne de champignon *A. apis* à savoir la température et la durée de germination. La souche d'*A. apis* a été isolée à partir des larves momifiées issues des infections par l'ascosphérose. La croissance mycélienne était estimée quotidiennement jusqu'au 8^{ième} jour d'incubation à différentes températures (10, 15, 20, 25, 30 et 35°C).

Chapitre II

Résultats et discussions

II- Résultats et discussions

Les résultats d'étude de la prévalence de *Nosema* sp., de la prévalence de la loque américaine *Paenibacillus larvae*, de l'étude de la sensibilité des deux races d'abeilles *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis* et de l'étude des mycoses affectant l'abeille *A. m. intermissa* sont exploités et discutés dans ce chapitre.

2.1. Prévalence de *Nosema* sp.

Cette étude fournit la première description spatiale de la présence de *Nosema* sp. en Algérie, En effet, nous avons déterminé la présence de *Nosema* sp. dans les différents prélèvements effectués.

2.1.1. Échantillons analysés

Les prélèvements des abeilles sont effectués dans 164 colonies, situées dans 24 stations en Algérie. Les intestins de l'abeille domestique *Apis mellifera intermissa* sont examinés sous microscope optique avec grossissement GX 400 pour détecter la présence de *Nosema* sp. Les résultats de l'analyse de 164 recherches de *Nosema* sp., sont mentionnés dans le tableau 1 et la figure 15. La localisation des régions d'étude est illustrée dans la carte d'Algérie afin de visualiser la distribution de la nosérose (fig. 16). Parmi les 164 colonies surveillées, *Nosema* est détectée dans 108 (65,85 %) colonies réparties dans 10 régions à savoir Alger, Médéa, Tipaza, Béjaia, Sétif, Batna, Khenchela, Tissemsilt, Sidi-Belabbes et Tlemcen.

Tableau 1- La localisation des stations d'étude, le nombre de spores de *Nosema* observée dans les ruchers et le pourcentage des colonies infectées dans les stations

Stations	N°échantillon	Detecté	Non detecté	Maximum($\times 10^5$) spores/abeille	Minimum($\times 10^5$) spores/abeille	% colonies infectés	% colonies saines
Alger 1	5	5	0	104	28	100	0
Alger 2	7	5	2	70	6	71,43	28,57
Alger 3	10	0	10	0	0	0	100
Tipaza 1	5	5	0	78	18	100	0
Tipaza 2	5	1	4	2	2	20	80
Médéa	2	1	1	36	36	50	50
Bejaia	5	3	2	20	14	60	40
Khenchela 1	6	3	3	6	2	50	50
Khenchela 2	3	1	2	2	2	33,33	66,67
Khenchela 3	5	2	3	44	2	40	60
Batna 1	10	9	1	40	2	90	10
Batna 2	8	7	1	10	2	87,5	12,5
Batna 3	4	2	2	4	4	50	50
Sétif 1	9	6	3	532	2	66,67	33,33
Sétif 2	8	8	0	124	2	100	0
Sétif 3	9	6	3	168	2	66,67	33,33
Tissemsilt 1	5	2	3	6	4	40	60
Tissemsilt 2	5	2	3	6	6	40	60
Tlemcen 1	10	9	1	12	2	90	10
Tlemcen 2	9	7	2	6	2	77,78	22,22
Tlemcen 3	10	7	3	4	2	70	30
Sidi-Belabbes 1	10	6	4	6	2	60	40
Sidi-Belabbes 2	7	5	2	14	2	71,43	28,57
Sidi-Belabbes 3	7	6	1	56	2	85,71	14,29
Total stations=24	164	108	56	532	2	65,85	34,15

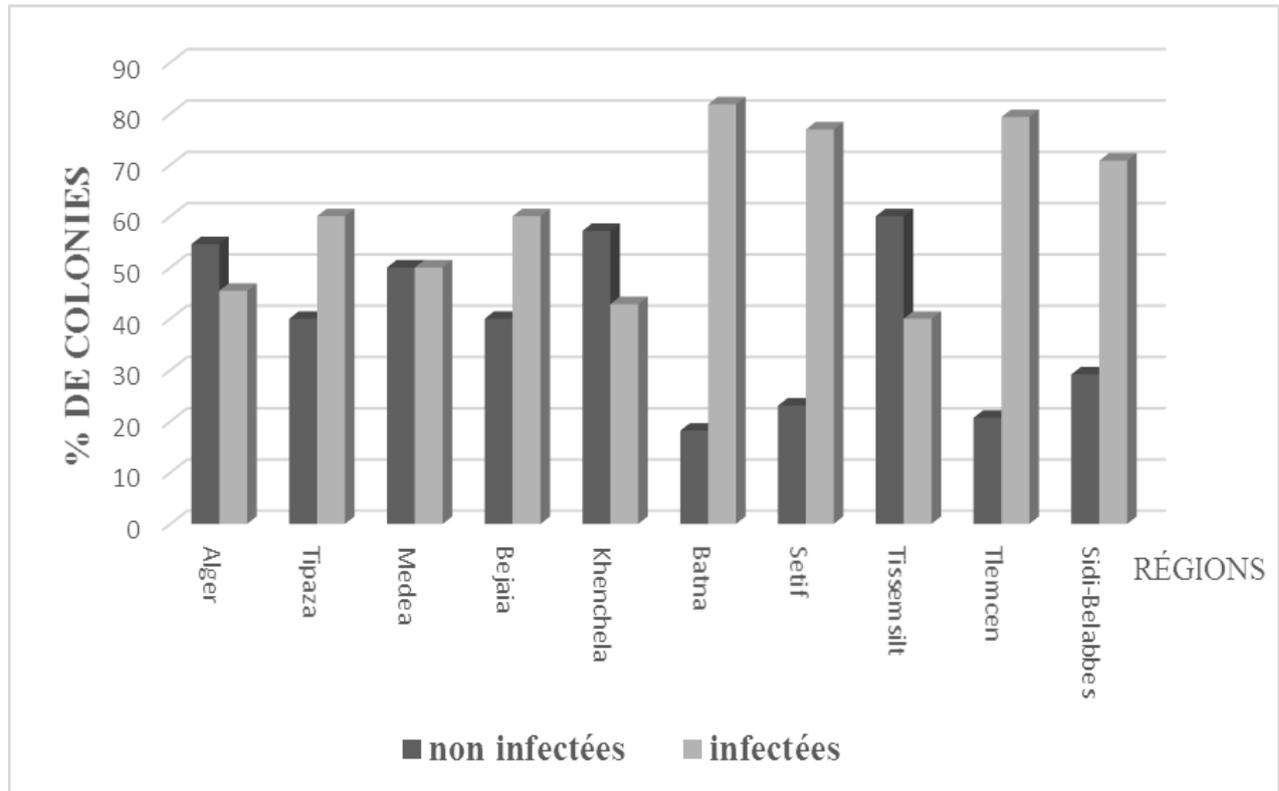


Fig. 15- Pourcentage des colonies infectées par *Nosema* sp. dans les régions d'étude (Algérie) durant le mois de Juin 2013 (n = 164).

Les abeilles de toutes les stations d'étude sont porteuses des spores de *Nosema* pendant la période d'échantillonnage, à l'exception d'une seule station située à Alger dont la nosérose n'a pas été détectée. Ces résultats sont obtenus à partir des analyses des abeilles prélevées en juin 2013. Nous avons constaté que 65.85 % de ruches en Algérie étaient atteintes par la Nosérose. Ces dernières années, une plus grande incidence des infections de Microsporidia a été rapportée en Algérie (fig. 15). Les infections par la nosérose sont encore présentes dans les populations d'abeille en Algérie (Adjlan *et al.*, 2012b). Des espèces de *Nosema* peuvent être accidentellement présentes dans un secteur par les importations des reines (Muñoz *et al.*, 2014). Mais en Algérie, les signes d'introduction de cette abeille n'ont pas été détectés (Chahbar *et al.*, 2013). Certaines conditions environnementales peuvent maintenir le développement de la nosérose dans une région. En Algérie, depuis 2011, l'eucalyptus était atteint par l'infestation de psylle de l'eucalyptus. L'infestation de ce suceur a comme conséquence, l'apparition des galles au niveau des feuilles, enrroulement des feuilles et l'abondance de miellat favorisant l'installation de fumagine qui attire les fourmis (fig. 17). Selon Bruneau (2006), le développement de la nosérose et certains virus est favorisé par le

miellat riche en sucres peu digestibles par l'abeille (le mélézitose et le raffinose) et riche en sels minéraux.

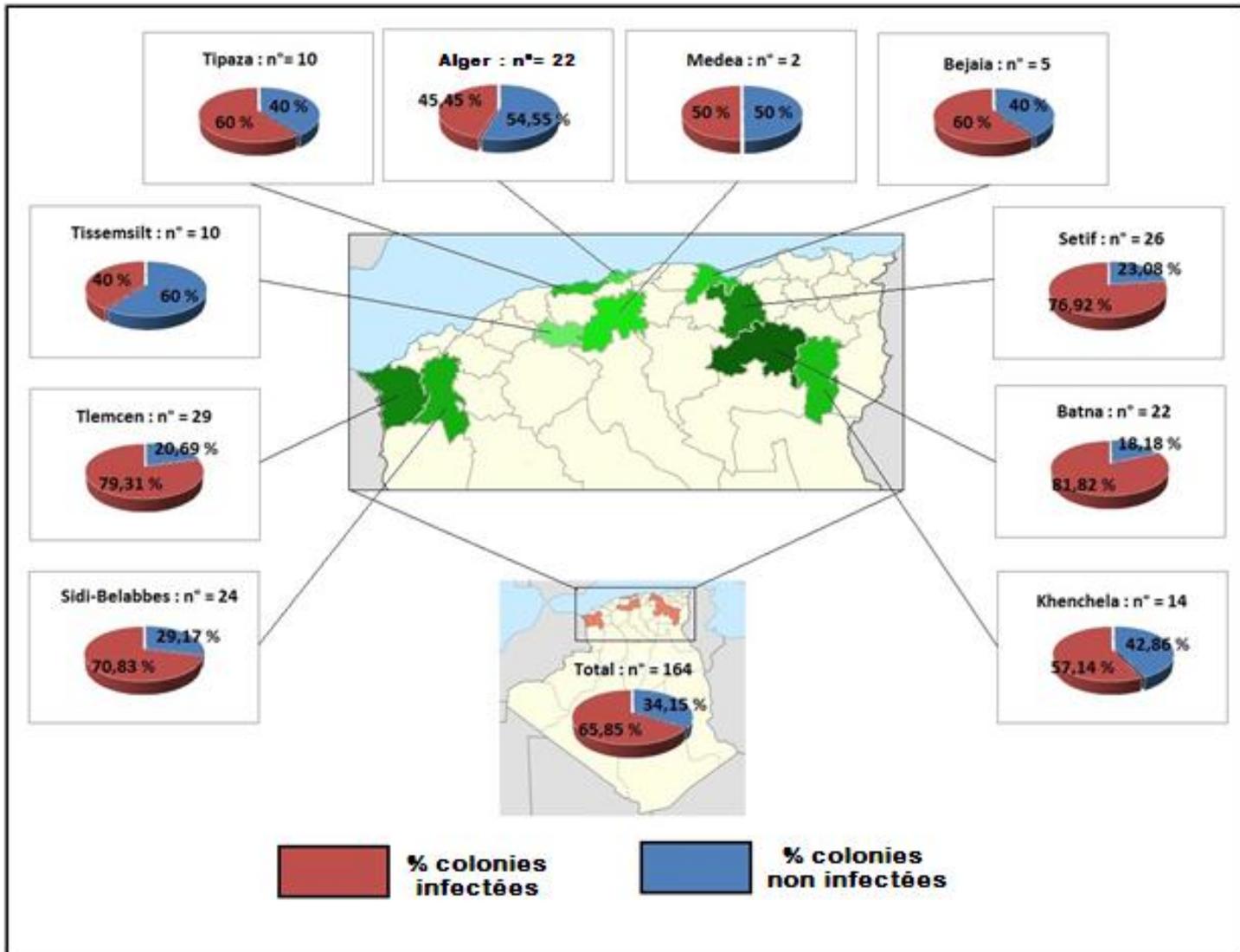


Fig. 16- Distribution des sites d'échantillonnage d'abeille en Algérie, et les emplacements approximatifs des 10 régions énumérés dans le tableau 1.

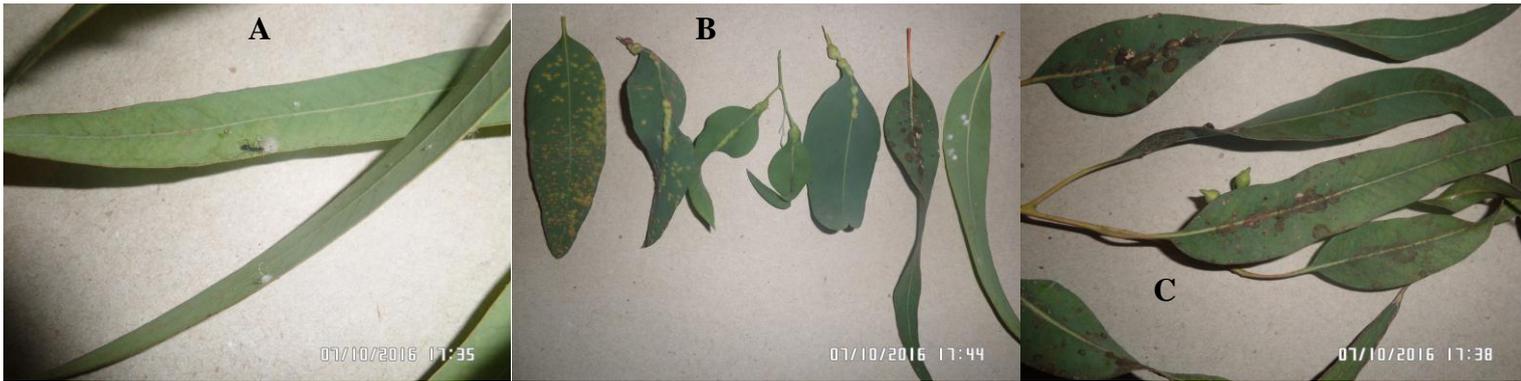


Fig. 17- Dégâts causés par l'infestation de psylle d'eucalyptus et l'abondance de miellats sur les feuilles. A : Fourmi attirée par les sucres issus des résidus de psylle ; B : l'apparition des galles sur les feuilles ; C : l'installation de fumagine sur le miellat sécrété par le psylle et enroulement des feuilles (Originale).

2.1.2. Distribution de la nosémose

La figure 16 représente une carte de la distribution d'espèce de *Nosema* en Algérie, faite à partir de l'analyse de 164 échantillons provenant de différentes régions du territoire Algérien. Concernant la distribution de microsporidia (*Nosema* sp.), sa présence est remarquable dans l'ensemble des régions d'étude en Algérie, car toutes les régions sont positives pour *Nosema*. Fernández *et al.* (2012) ont trouvé dans leur recherche que la nosémose était présente à 100 % dans les endroits étudiés en Espagne, indiquant que ce parasite était répandu dans tout le pays. Les espèces de *Nosema* coexistent avec *A. mellifera* en Europe depuis plus d'une décennie (Klee *et al.*, 2007), au moins du milieu des années 90 aux USA (Chen *et al.*, 2008). En Uruguay les infections avec des espèces de *Nosema* antident 1990 (Invernizzia *et al.*, 2009b). Un manque d'échantillons historiques le rend impossible de conclure pour combien de temps les espèces de *Nosema* ont parasité *A. mellifera* (Paxton, 2010).

2.1.3. Comptage de nombre de spores et niveaux d'infection

Le nombre de spores par abeille dans chaque colonie a été compté comme décrit précédemment (Cantwell, 1970 ; OIE, 2013). Ce nombre oscillait entre un minimum de 200.000 et un maximum de 53.200.000 spores par abeille (Fig. 18 et Fig. 19). La variation en nombre de spores entre les colonies est large en juin 2013.

Sur 108 colonies porteuses de spores de *Nosema*, 25,93 % (28 colonies) de colonies présentent une forte infection dont 19 colonies (67,86 %) sont caractérisées par une très forte infection. En revanche, 74,07 % (80 colonies) ont une faible ou très faible infection par la nosémosse.

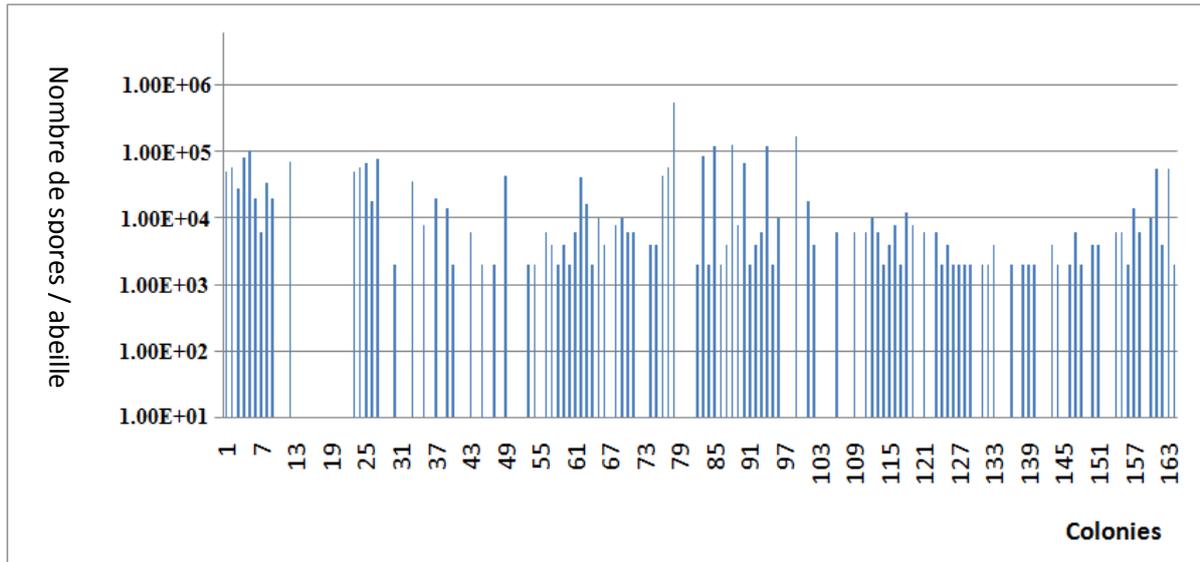


Fig. 18- Nombre de spores de *Nosema* sp. par abeille pour 164 colonies d'abeilles collectées en Juin 2013. Les données ont été calibrées avec le nombre de spores à partir des données microscopiques.

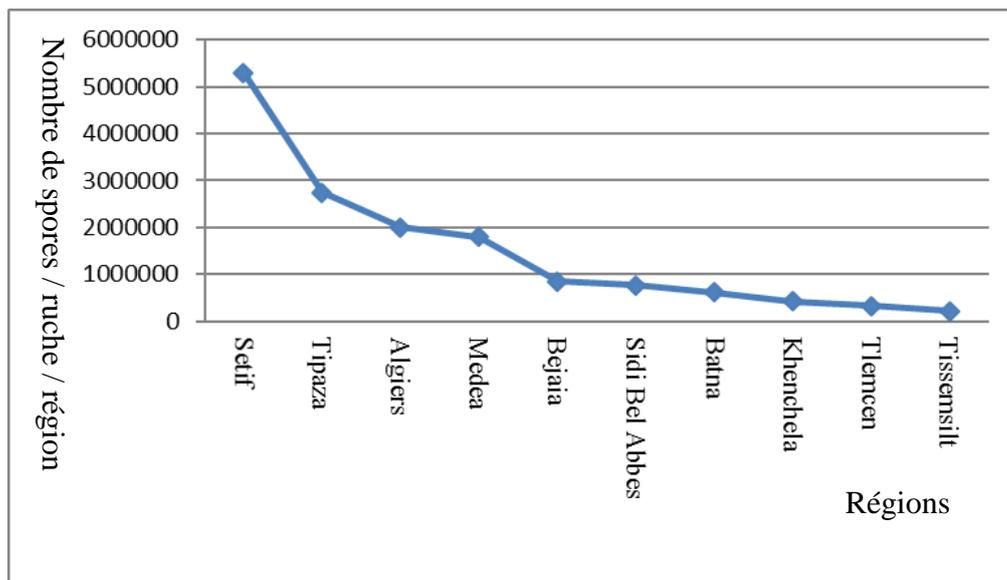


Fig. 19- Nombres moyens de spores de *Nosema* par ruche et par région

Dans cette étude, un hémocytomètre traditionnel a été utilisé pour quantifier le nombre de spores de *Nosema*. La manière la plus facile de compter les spores de *Nosema* est d'employer

un hémocytomètre traditionnel comme décrit par Human *et al.*, (2013) et Cantwell (1970). Dans notre étude, nous avons compté le nombre moyen de spores par abeille dans un échantillon mis en commun pour l'évaluation de l'infection par *Nosema* dans une colonie comme décrit par (Soerensen, 2009 ; OIE, 2013). Cependant, quelques études suggèrent que le degré d'infection doit être estimé par la proportion d'abeilles infectées dans la colonie (L'Arrivee, 1963 ; Doull, 1965 ; Higes *et al.*, 2008a ; Botías *et al.*, 2012). Fries *et al.* (1984), ont trouvé une bonne corrélation entre la proportion d'abeilles infectées et le nombre moyen de spores dans un échantillon d'abeilles mis en commun. Mais cette corrélation n'était pas présente dans tous les cas (Higes *et al.*, 2009b). Traver *et al.* (2012) ont constaté qu'il n'y avait aucune différence significative dans les niveaux d'infection entre les abeilles prélevées de différents endroits dans la ruche. L'évaluation de la proportion d'abeilles infectées dans une ruche est beaucoup plus laborieuse que le comptage du nombre de spores dans un échantillon mis en commun. Le prélèvement mis en commun demeurera probablement un outil important pour mesurer des infections dans les colonies (Fries *et al.*, 2013).

Parmi les colonies infectées (108 colonies), plus de 74 % des colonies ont des faibles ou très faibles infections par la nosérose, ce qui peut justifier l'absence des symptômes aigus de la nosérose dans la majorité des colonies visitées. Cantwell (1970) a annoncé que l'intestin des abeilles fortement infestées par *Nosema* sp. peut contenir jusqu'à 180 millions de spores.

Cette faible infection a été notée pour des abeilles prises en été (juin 2013). Juin est caractérisé par une réduction de l'activité des abeilles en Algérie (Haderbache *et al.*, 2013). Les niveaux les plus élevés de *N. ceranae* ont été vus pendant le ressort (le printemps), juste avant et pendant les écoulements maximum de nectar (Traver *et al.*, 2012). Selon Fernandez et Coineau (2007), la nosérose est plus fréquente au printemps et à la fin de l'hiver tandis que l'activité des abeilles est intensifiée pendant ces périodes, et est moins fréquente au début de l'été. Martin-Hernandez *et al.* (2007) ont détecté les spores de *N. ceranae* durant toute l'année, et il n'y a ni saisonnalité ni cycle annuel d'infections. Cependant, cette étude précédente a été basée sur le comptage traditionnel des spores. Contrairement à l'étude de Traver *et al.* (2012), où ils ont employé le comptage des spores par qPCR ; ils ont noté une saisonnalité d'infection en utilisant des données de qPCR. Il soutient un précédent, constatant que les niveaux font une pointe la fin du printemps et le début de l'été (Traver et Fell, 2011).

2.1.4. Nosémosse et le phénomène d'effondrement des colonies (CCD)

Les infections de la nosémosse peuvent être présentes dans des colonies d'abeille domestique sans causer l'effondrement ou la dépopulation des colonies. Certains auteurs (Martin-Hernandez *et al.*, 2007 ; Higes *et al.*, 2007, 2008a, 2009b), ont noté que *N. ceranae* cause l'effondrement d'une colonie après 18 mois d'infection quand cette colonie est laissée sans contrôle. Ces auteurs n'ont pas tenu compte des degrés d'infection des colonies par la nosémosse. Nos résultats d'étude menée en l'Algérie ont prouvé que la même ruche parasitée par *Nosema* sp. est restée vivante sans s'effondrer selon le questionnaire qui a été fait 19 mois après l'échantillonnage.

Les données obtenues dans la présente étude sont complémentaires et conformées aux résultats rapportés par Invernizza *et al.* (2009b), dont les ruches ont été surveillées pendant des décennies et ils ont noté qu'il n'y a pas de corrélation entre l'arrivée des *N. ceranae* dans les ruches et les pertes des ruches (CCD). Des données fiables suggèrent fortement que ce parasite puisse être présent dans des colonies d'abeille pendant des périodes prolongées sans causer des symptômes ou des pertes de colonies (Paxton, 2010). La même situation a été montrée en Allemagne (Siede *et al.*, 2008), et dans les populations d'abeille en Espagne (Fernández *et al.*, 2012), car les ruches surveillées n'ont donné aucun effet dévastateur tel que décrit par Higes *et al.* (2009b).

En ce qui concerne les ruches échantillonnées dans cette étude, la majorité des colonies prélevées est demeurée vivante, avec une production normale, selon les réponses des apiculteurs, la raison principale de la mort des colonies était l'infestation de *Varroa destructor*. L'étude de Bahreini et Currie (2015) a montré que les taux de mortalités causés par la varroase diffèrent en fonction de différents génotypes d'abeilles. Donc la forte infestation de *V. destructor* déclarée par les apiculteurs peut être conséquente d'une faible infection de l'abeille domestique en Algérie par la nosémosse. Selon Bahreini et Currie (2015), une corrélation négative a été trouvée entre la nosémosse et la varroase, et l'infection par *Nosema* sp. limite l'infestation de *Varroa destructor*.

En plus, il est nécessaire de tenir compte des taux d'infection des colonies par la nosémosse. Dans cette étude 65.85 % des ruches portaient la maladie sans causer le CCD, qui peut être expliqué par les niveaux de l'infection, dont 74,07 % des ruches ont une faible ou très faible

infection par la nosérose. La destruction des colonies par cette maladie peut prendre place quand le niveau d'infection sera fort.

Quant au questionnaire posé aux apiculteurs, plus de 90 % des apiculteurs ont des problèmes avec l'ectoparasite *Varroa destructor*. Les infestations par ces acariens associées généralement avec l'infection par des virus étant considérées comme la cause majeure des pertes des colonies dans le monde entier (Dahle, 2010 ; Guzman-Novoa *et al.*, 2010 ; Le Conte *et al.*, 2010).

L'exposition au parasite *Varroa*, ou aux virus et aux autres microorganismes portés par des acariens, est connue par l'affection des traits d'immunité chez les abeilles (Gregory *et al.*, 2005 ; Yang et Cox-Stimulent, 2007). Les infections par le virus des ailes déformées (DWV) en combinaison avec *Varroa destructor* jouent un rôle important dans l'effondrement des colonies d'abeille. Ceci est confirmé par des observations sur terrain et soutenu par une approche modulante (Martin, 2001). Les interactions entre différents facteurs contribuent à l'augmentation des pertes de colonies d'abeille (Retschnig *et al.*, 2014).

2.1.5. Comparaison des niveaux des infections entre les régions et les ruches

Aucune relation significative n'a été trouvée entre la force des colonies et les niveaux d'infection par *Nosema ceranae*. (Traver *et al.*, 2012), celui-ci indiquent que des colonies faibles peuvent être fortement atteintes par *N. ceranae*, comme le même niveau d'infection peut toucher les colonies fortes (Traver et Fell, 2011). Nos résultats sont en accord avec ceux des auteurs précités. Malgré les diverses techniques qui ont été employées par les apiculteurs (selon le questionnaire) et la différence dans la force des colonies prélevées (observations sur terrain), nous n'avons trouvé aucune différence significative entre les niveaux des infections parmi les colonies (F de Fischer = 1.534 ; ddl = 162 ; $p = 0,579$). De ce fait, nous pouvons suggérer que les colonies étudiées ont les mêmes niveaux d'infections. Contrairement à l'étude de Bourgeois *et al.* (2010), ces chercheurs ont trouvé une différence dans les infections des colonies par la nosérose. Ils ont déclaré que la nature aléatoire de l'échantillonnage peut également contribuer à la variation observée entre les colonies, car les abeilles les plus âgées sont les plus exposées à *Nosema sp.* et les abeilles prélevées peuvent avoir différentes étapes de l'infection. Le rapport entre la forme végétative et le nombre de spore changera avec l'étape de l'infection (Bourgeois *et al.*, 2010).

Dans notre étude, nous n'avons trouvé aucune différence significative (F de Fischer = 2.495 ; $ddl = 162$; $p = 0,011$) dans les niveaux des infections par *Nosema* sp. entre les abeilles prélevées de différentes régions. Les mêmes résultats ont été indiqués aux Etats-Unis (Traver *et al.*, 2012), il n'était également aucune différence significative dans les niveaux des infections par *N. ceranae* entre des abeilles prélevées de différentes régions. L'étude des populations locales d'abeille domestique a prouvé que des populations algériennes de *A. mellifera* sont caractérisées par la variabilité élevée en termes de nombre d'allèles (Chahbar *et al.*, 2013; Loucif-Ayad *et al.*, 2014).

2.1.6. Analyse des échantillons *Nosema*-négatifs par ACP

Des échantillons *Nosema*-négatifs ont été analysés par ACP dans Statistica 6. Les régions et les ruches ne conditionnent ni la présence ni l'absence de l'infection et n'ont pas des effets directs sur les niveaux des infections par la nosérose (tableau 2 et figure 20). Nous avons poussé l'analyse plus loin par la comparaison des moyennes deux à deux (test de Newman-Keuls dans ANOVA). Le groupement a montré que les deux régions Tipaza et Sétif ont une forte infection par la nosérose, et le reste des régions n'indiquons pas une différence entre les infections (tableau 3), qui peuvent être expliquées par la détection de deux espèces différentes de *Nosema*. Selon Chahbar *et al.* (2013), les populations de *A. m. intermissa* sont caractérisées par une faible différenciation. De même, les localités de la côte et des hauts plateaux n'ont montré aucune différence significative malgré la distance géographique entre elles (Chahbar *et al.* 2013).

Tableau 2- Pourcentage total de variance en utilisant l'axe 1,2 (ACP dans Statistica 6)

Valeurs	Valeur propre	% Variance totale	Cumul de Valeur propre	Cumul %
1	2,037688	50,94219	2,037688	50,94219
2	1,473866	36,84665	3,511554	87,7888
3	0,459102	11,47755	3,970656	99,2664
4	0,029344	0,73361	4,000000	100,0000

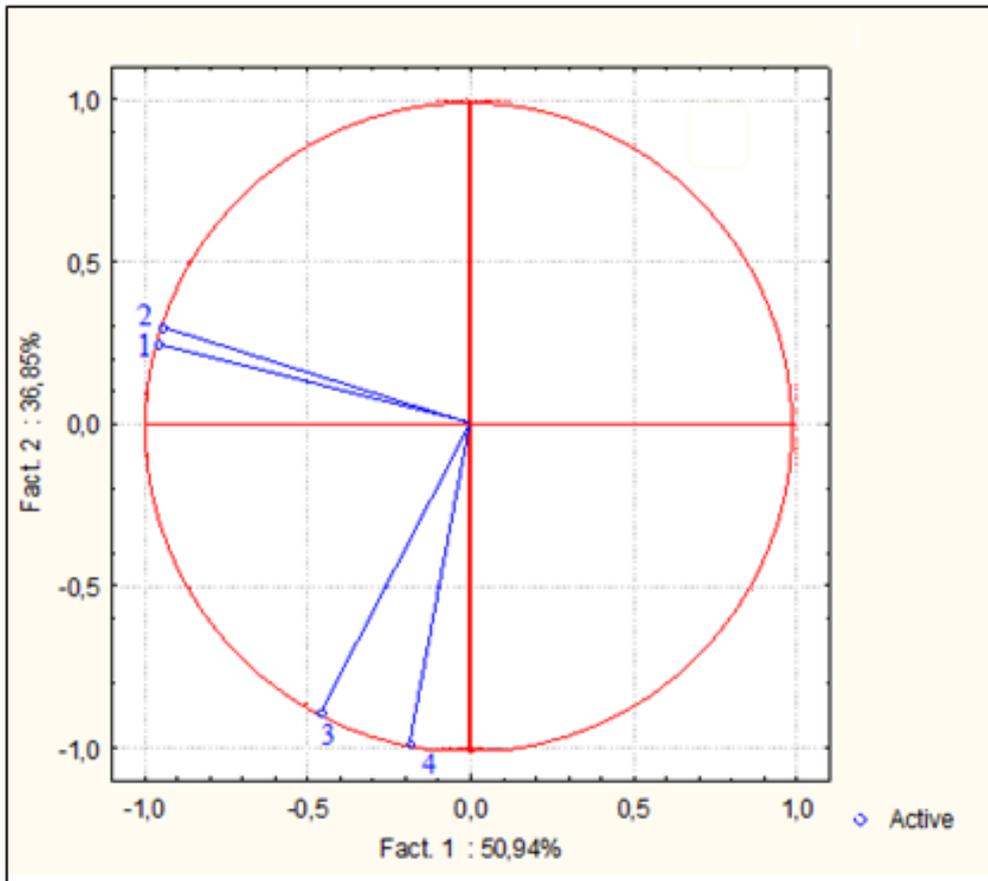


Fig. 20- Projection de la variable sur le plan factoriel (1×2) en utilisant ACP dans Statistica 6.

Dans la région de Sétif, le nombre de spores par abeille atteignant 53200000 spores, est considéré en tant que valeur maximum. Bourgeois *et al.* (2010) ont noté que sur 104 colonies analysées, le nombre de spores de *Nosema apis* n'excède pas 1 million de spores par abeille et il peut atteindre pour *Nosema ceranae* plus de 100 millions de spores par abeille. Les résultats de microscopie peuvent être améliorés par une analyse génétique. La prédominance des *N. ceranae* semble être beaucoup plus élevée en Espagne comparée à *N. apis* (Fernández *et al.*, 2012).

Tableau 3- Classification et groupement des régions pas significativement différentes

Régions	Moyenne	groupes	
Sétif	5292307,69	A	
Tipaza	2740000,00	A	B
Alger	2000000,00	B	

Médéa	1800000,00	B
Bejaia	840000,00	B
Sidi-Belabbes	766666,67	B
Batna	618181,82	B
Khenchela	414285,71	B
Tlemcen	324137,93	B
Tissemsilt	220000,00	B

Martin-Hernandez *et al.* (2009) ont constaté que les abeilles atteintes par *N. apis* présentent une proportion égale pour le stade mature et immature, et l'infection par *N. ceranae* a une proportion plus élevée chez le stade immature. Le comptage de nombre de spores par l'utilisation du microscope ne reflète pas exactement le niveau de l'infection, car la forme végétative (stade immature) est invisible sous microscope optique. La forme végétative des espèces de *Nosema* a été détectée dans l'épithélium d'intestin des abeilles par l'utilisation des outils moléculaires (Higes *et al.*, 2007, 2009a, b). Le rapport entre les cellules végétatives et le niveau des spores peut changer tout au long d'une infection microsporidienne. L'infection expérimentale avec *Nosema* sp. a démontré que les spores matures sont évidentes à partir du 3^{ème} jour post-infection. Les spores et les formes végétatives de *Nosema* peuvent être détectées en utilisant des méthodes moléculaires. Cependant, seules les spores peuvent être détectées en utilisant des méthodes visuelles (Fries *et al.*, 2013). Aux étapes postérieures de l'infection expérimentale avec *Nosema ceranae*, il est démontré que des spores mûres soient produites dans une proportion beaucoup plus élevée comparées aux cellules végétatives. Dans les échantillons utilisés pour le développement de cette analyse, les abeilles ont été prélevées à divers âges (Bourgeois *et al.*, 2010). Dans ce contexte, nous pouvons supposer que l'espèce la plus fréquente du *Nosema* en Algérie est *Nosema apis*. Mais ces résultats peuvent être améliorés par analyse moléculaire. L'étude de Yoshiyama et Kimura (2011) a montré que sur 112 colonies examinées dans différents départements au Japon, des *N. ceranae* ont été détectées dans cinq colonies (4,5 %). Contrairement à (Higes *et al.*, 2009a), qui ont noté que seulement *N. ceranae* a été détectée en Afrique du Nord. En outre, Traver *et al.* (2012) ont constaté que *N. apis* n'a été détectée qu'en janvier dans deux ruches (les deux à la fois dans la

partie intérieure et extérieure de la grappe d'hiver) ; avec des niveaux très faibles et dans la même région. Traver et Fell (2011) ont noté que *N. apis* a été trouvée dans 2,7 % de colonies.

Nous pouvons dire que quelques conditions environnementales empêchent le développement de la maladie ou empêchent l'expression de son potentiel génétique en Algérie. Le climat est considéré comme le facteur le plus important qui peut expliquer les différences dans la distribution et l'impact des espèces de *Nosema* (Fries, 2010). Dans les conditions défavorables, le résultat de la relation entre parasite et hôte a comme conséquence une manifestation de la maladie et une colonie endommagée (Fries, 2010 ; Puerta *et al.*, 2001 ; Higes *et al.*, 2008b). En outre, les abeilles sont adaptées et le parasite ne produit pas assez de spores, il y a une résistance de l'abeille (en Algérie) contre la nosérose vu que 100 % des apiculteurs ne pratiquent pas le traitement contre la nosérose selon les réponses des apiculteurs. Les infections des insectes peuvent être réduites par les défenses de l'hôte (Lemaitre et Hoffmann, 2007). Des réponses génétiques des abeilles se développent contre le varroa et les pesticides (Gregorc *et al.*, 2012). Les résultats de Chaimanee *et al.* (2012) démontrent que les infections de *Nosema* sp. peuvent être tout à fait différentes entre les camps expérimentaux (les cages de contention utilisées pour les infections expérimentales). Ces différences peuvent être dues à la variation génétique de la capacité des abeilles de se défendre contre l'infection de *Nosema*. Le parasite intestinal de l'abeille *Nosema ceranae* est le responsable des pertes de colonies dans quelques régions, tandis que dans d'autres régions, sa présence ne cause aucune mortalité directe. C'est le cas de l'Espagne et la France, respectivement (Dussaubat *et al.*, 2013), et il n'y a aucun fond génétique spécifique des deux *N. ceranae* isolée de l'Espagne ou de France.

2.1.7. Corrélation négative entre les taux d'infection et le nombre moyen de spores

Par l'utilisation de l'essai de Wilcoxon centré, réduit et testé par rapport à la loi normale (la comparaison de deux échantillons appariés), une corrélation négative a été trouvée entre les taux des infections et le nombre moyen de spores par abeille et par région. Les 10 régions étudiées n'ont pas eu les mêmes conditions climatiques, et cela n'a pas une influence directe sur le nombre de spores produites, ceci peut être expliqué par l'espèce de *Nosema*. Le nombre de spores dans le cas de l'infection par *N. Apis* n'excède pas 1 million de spore par abeille (Bourgeois *et al.*, 2010), ce nombre n'est pas conditionné par des facteurs externes, notamment la transmission de la maladie et les colonies infectées au voisinage.

Nous supposons également une adaptation de cette abeille qui empêche le développement de la maladie, ce qui reste à prouver par des infections expérimentales avec *Nosema*. Selon Botias *et al.* (2012), une connaissance des interactions entre *A. mellifera* et *N. ceranae* peut aider à identifier les coadaptations interspécifiques possibles qui ont pu être acquises par des décennies de parasitisme.

2.2. Prévalence de la loque américaine *Paenibacillus larvae*

Les résultats de différents caractères macroscopiques, microscopiques, et biochimiques de *Paenibacillus larvae* sont détaillés et commentés dans cette partie. De même, les résultats d'étude de la prévalence de la loque américaine *Paenibacillus larvae* en Algérie sont présentés et discutés.

2.2.1. Etude des caractères macroscopiques

Les colonies de *Paenibacillus larvae* apparaissent sur le milieu MYPGP, sous forme de petites colonies arrondies concaves de forme plates ou surélevées, de couleur beige (fig. 21 A) ou blanchâtre (fig. 21B et fig. 21C). De Graaf *et al.* (2006) et OIE (2014) ont donné les mêmes caractéristiques macroscopiques pour *P. larvae* ensemencée sur le milieu MYPGP. La morphologie des colonies de toutes les souches de *P. larvae* sont décrites par De Graaf *et al.* (2006). Les tests microbiologiques de base sont effectués avec 14 souches de *P. larvae* (tableau 4). Toutes les colonies (sauf R 20833t2) étaient de couleur beige, de taille variable (diamètre varie entre 0,8 et 2,0 mm) (De Graaf *et al.*, 2006).



Fig. 21- Aspect macroscopique des colonies de *Paenibacillus larvae* sur le milieu MYPGP. A : de couleur beige ; B et C : de couleur blanchâtre (Originale)

Tableau 4- Caractéristiques biochimiques et morphologiques des différentes souches *de P. larvae* (De Graaf *et al.*, 2006)Basic microbiological tests of *Paenibacillus larvae* reference strains and field strains

Strains studied	LMG 9820 ^T	LMG 14425	LMG 15974 ^T	LMG 14427	R 20828	R 20829	R 20830	R 20831	R 20832	R 20833 t1	R 20833 t2	R 20834	R 20835	R 20836	R 20837
Subspecies	<i>Pll</i>	<i>Pll</i>	<i>Plp</i>	<i>Plp</i>											
iC9-based PCR	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Cell size</i>															
Width ^a	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Min. length	1.5	3.0	3.0	3.0	2.0	3.0	4.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Max. length	5.0	>20.0	>13.0	13.0	>20.0	>15.0	>20.0	>20.0	>20.0	20.0	20.0	>15.0	>20.0	>20.0	>20.0
<i>Appearance</i> ^b															
Short chains	y	n	n	n	y	n	y	y	y	y	y	y	y	y	y
Motile	n	n	n	y	n	n	n	n	n	n	n	n	y	y	n
<i>Colony</i>															
Diameter ^c	ND	0.8	1.5	1.5	0.9	0.9-1.2	0.7-0.9	1.0-1.5	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.4	1.5
Flat/raised	F	F	Ra	Ra	F	F	F	Ra	Ra	Ra	Ra	F	F	F	Ra
Smooth/rough	S	Ro	Ro	Ro				Ro	Ro						Ro
Translucent										T					
Colour	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	W	B	B	B	B
Growth inhib. ^d	-	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
Low ^e t growth	-	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-

Abbreviations: LMG, BCCM/LMG Bacteria Collection, Laboratorium voor Microbiologie Gent, Universiteit Gent, Belgium; R, LMG Research Collection; *Pll*, *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*; *Plp*, *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens*; ND, not done; F, flat; Ra, raised; S, smooth; Ro, rough; T, translucent; B, beige; W, white.

All vegetative cells were rods that appeared single or in pairs. No spores were formed after 1 day. All colonies were circular and undulate.

^a In μm .

^b y, yes; n, no.

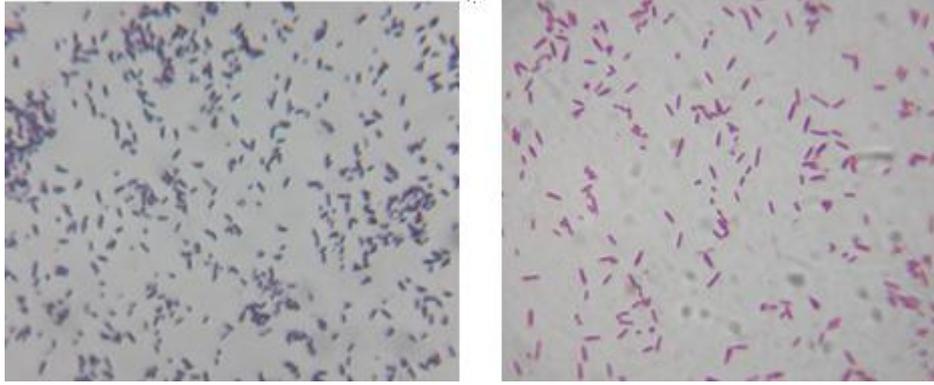
^c In mm.

^d Growth inhibiting activity against LMG 9820^T.

2.2.2. Etude des caractères microscopiques

Les résultats d'observation à l'état frais, sous microscope optique au grossissement X100, montrent que les bactéries semblent mobiles, se déplacent dans tous les sens, donc elles possèdent une ciliature péritriche.

Après l'utilisation de la coloration de Gram, les résultats positifs sont traduits par une coloration violette (fig. 22a) et les résultats négatifs sont traduits par une coloration rose (fig. 22b). Après l'étude macroscopique, microscopique et coloration de Gram, les seuls bacilles à Gram positif ont subi une série de différents tests pour confirmer que ces souches sont *Paenibacillus larvae*.



a : Bactéries Gram positif

b : Bactéries Gram négatif

Fig. 22- Examen microscopique des bactéries isolées après coloration de Gram, grossissement X400 (a : résultats suspects pour *P. larvae* ; b : résultats négatifs pour *P. larvae*)

2.2.3. Tests biochimiques

Dans les ruches considérées positives à la loque américaine, les bactéries possèdent des enzymes responsables de l'hydrolyse de la caséine et de la gélatine. Les bactéries présentes ont donné un résultat positif, traduit par un éclaircissement du milieu sous et autour de la zone de croissance bactérienne (fig. 23). Les mêmes résultats sont trouvés par Allipi (1991) et confirmés par Adjlane en 2012.

Ainsi les colonies bactériennes, isolées de ces ruches, ne possèdent pas d'enzyme d'oxydase. Mais le test catalase était positif. Haynes (1972) a noté que la réaction de la bactérie de la loque américaine est presque toujours négative, ou légèrement positive.

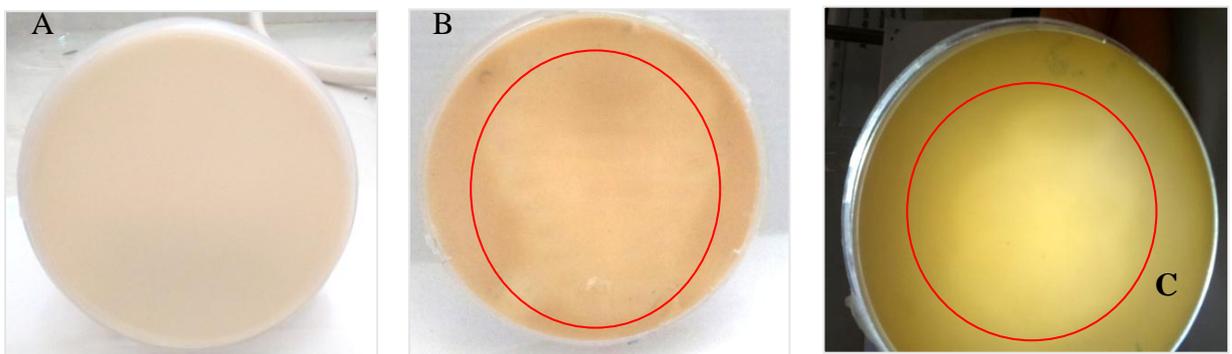


Fig. 23- Test de l'hydrolyse de la caséine. A : milieu de culture gélose au lait ; B et C : résultats positifs pour l'hydrolyse de la caséine (Originale).

2.2.3.1. Etude de type respiratoire

Dans la gélose viande foie (GVF), nous avons trouvé que les bactéries isolées sont distribuées dans tout le tube du fond jusqu'à la surface (fig. 24). Ces résultats présentés ci-dessous nous permettent de classer les bactéries isolées dans la classe des bactéries aéro-anaérobie facultative. Les mêmes résultats sont obtenus par Gordon *et al.* (1973).



Fig. 24- Etude de type respiratoire des souches isolées de *P. larvae*

2.2.3.2. Etude de l'activité hémolytique

Sur la gélose au sang frais (GSF), nous avons remarqué un résultat positif exprimé par une zone claire autour des colonies isolées. Le halo clair autour des colonies indique une hémolyse totale (bêta-hémolyse) des globules rouge par les bactéries (fig. 25).

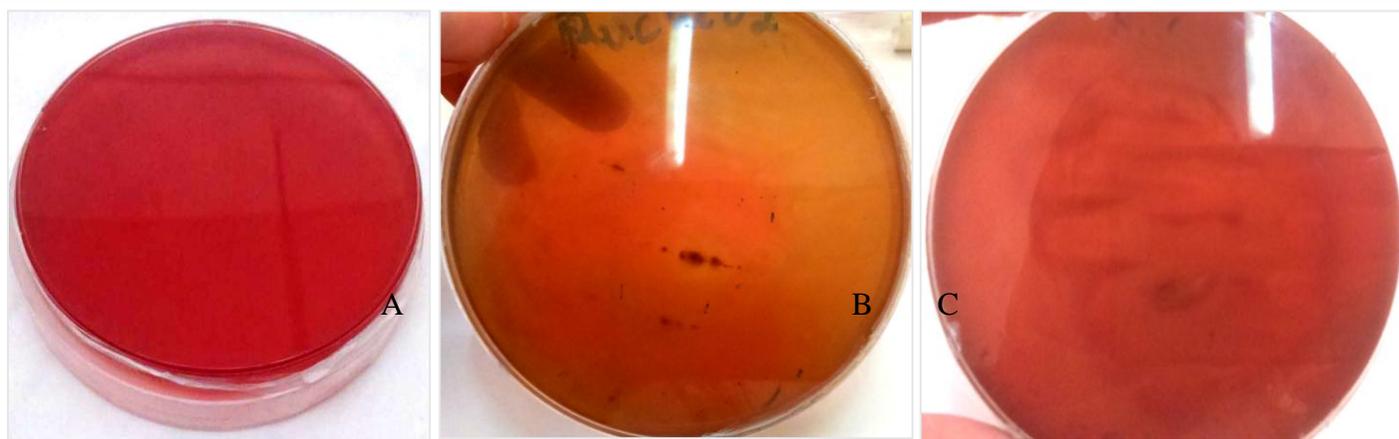


Fig. 25- hémolyse totale par *P. larvae* isolée sur la GSF. A : milieu de culture gélose au sang frais (GSF). B et C : hémolyse totale par *P. larvae* isolée sur la GSF (Originale).

2.2.3.3. Galeries biochimiques

Les résultats des galeries biochimiques sont organisés dans les tableaux ci-dessous (tableau 5, 6 et 7) et illustrés dans les figures 26, 27 et 28. Trois lectures différentes des galeries biochimiques sont observées sur l'ensemble des colonies testées.

Tableau 5- Résultats de la galerie biochimique (lecture 1)

Microtube	Résultat	Interprétation	Microtube	Résultat	Interprétation
ONPG	Positif +	La bactérie possède la β -galactosidase car elle a hydrolysé l'orthonitrophényl-galactoside	GEL	Positif +	La bactérie possède la gélatinase car elle a hydrolysé la gélatine en libérant un pigment noir qui se diffuse dans tout le microtube.
ADH	Négatif -	La bactérie n'as pas hydrolysé l'arginine donc elle ne possède pas d'arginine dihydrolase.	GLU	- Glu positif + - Nitrate négatif	La bactérie a la capacité de fermenter le glucose (subst carboné) en nitrate , mais elle est incapable de dégrader le nitrate en nitrite.
LDC	Négatif -	La bactérie ne possède pas la lysine décarboxylase car elle n'a pas hydrolysé la lysine.	MAN	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter le manitol
ODC	Négatif -	La bactérie n'a pas hydrolysé l'ornithine alors, elle ne possède pas l'ornithine décarboxylase.	INO	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermener l'insitol
CIT	Positif +	La bactérie a utilisé le citrate comme seule source de carbon.	SOR	Négatif -	La bactérie n'a pas la capacité de fermenter le sorbitol
H2S	Négatif -	La bactérie n'a pas la capacité de produire l'H2S	RHA	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter le rhamnose

URE	Positif +	La bactérie possède l'uréase puisqu'elle a hydrolysé l'urée en ammoniaque.	SAC	Négatif -	La bactérie n'a pas la capacité de fermenter le saccharose
TDA	Négatif -	La bactérie a la capacité de désaminer le tryptophane en acide indole pyruvique grâce à l'enzyme tryptophane désaminase.	MEL	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter le mélobiose
IND	Négatif -	La bactérie n'a pas produit l'indole à partir du tryptophane donc elle possède pas de tryptophanase.	AMY	Négatif -	La bactérie n'a pas la capacité de fermenter l'amylgdaline
VP	Positif +	La bactérie a produit l'acétoine (3-hydroxybutanone) à partir du pyruvate de sodium.	ARA	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter l'arabinose



Fig. 26- Résultats de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs (lecture 1)

Tableau 6- Résultats de la galerie biochimique (lecture 2)

Microtube	Résultat	Interprétation	Microtube	Résultat	Interprétation
ONPG	Négatif -	La bactérie ne possède pas la β -galactosidase car elle n'a pas hydrolysé l'orthonitrophényl-galactoside	GEL	Positif +	La bactérie possède la gélatinase car elle a hydrolysé la gélatine en libérant un pigment noir qui se diffuse dans tout le microtube.
ADH	Négatif -	La bactérie n'as pas hydrolysé l'arginine donc elle ne possède pas d'arginine dihydrolase.	GLU	- Glu positif + - Nitrate négatif	La bactérie a la capacité de fermenter le glucose (substait carboné) en nitrate, mais elle est incapable de dégrader le nitrate en nitrite.
LDC	Positif +	La bactérie poassède la lysine décarboxylase car elle a hydrolysé la lysine.	MAN	Positif +	La bactérie est capable de fermenter le manitol
ODC	Positif +	La bactérie a hydrolysé l'ornithine alors, elle possède d'ornithine décarboxylase.	INO	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermener l'insitol
CIT	Positif +	La bactérie a utilisé le citrate comme seule source de carbon.	SOR	Positif +	La bactérie est capable de fermenter le sorbitol
H2S	Négatif -	La bactérie n'a pas la capacité de produire l'H2S	RHA	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter le rhamnose

URE	Positif +	La bactérie possède l'uréase puisqu'elle a hydrolysé l'urée en ammoniac.	SAC	Positif +	La bactérie a la capacité de fermenter le saccharose
TDA	Négatif -	La bactérie a la capacité de désaminer le tryptophane en acide indole pyruvique grâce à l'enzyme tryptophane désaminase.	MEL	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter le mélobiose
IND	Négatif -	La bactérie n'a pas produit l'indole à partir du tryptophane donc elle possède pas de tryptophanase.	AMY	Positif +	La bactérie a la capacité de fermenter l'amygdaline
VP	Positif +	La bactérie a produit l'acétoïne (3-hydroxybutanone) à partir du pyruvate de sodium.	ARA	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter l'arabinose



Fig. 27- Résultats de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs (lecture 2)

Tableau7- Résultats de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs (lecture 3)

Microtube	Résultat	Interprétation	Microtube	Résultat	Interprétation
ONPG	Négatif -	La bactérie ne possède pas la β -galactosidase car elle n'a pas hydrolysé l'orthonitrophényl-galactoside	GEL	Positif +	La bactérie possède la gélatinase car elle a hydrolysé la gélatine en libérant un pigment noir qui se diffuse dans tout le microtube.
ADH	Négatif -	La bactérie n'as pas hydrolysé l'arginine donc elle ne possède pas d'arginine dihydrolase.	GLU	- Glu positif + - Nitrate négatif	La bactérie a la capacité de fermenter le glucose (substat carboné) en nitrate , mais elle est incapable de dégrader le nitrate en nitrite.
LDC	Négatif -	La bactérie ne poassède pas la lysine décarboxylase car elle n'a pas hydrolysé la lysine.	MAN	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter le manitol
ODC	Négatif -	La bactérie n'a pas hydrolysé l'ornithine alors, elle ne possède pas l'ornithine décarboxylase.	INO	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermener l'insitol
CIT	Négatif -	La bactérie n'a pas utilisé le citrate comme source de carbon.	SOR	Négatif -	La bactérie n'a pas la capacité de fermenter le sorbitol
H2S	Positif +	La bactérie a la capacité de produire l'H2S	RHA	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter le rhamnose

URE	Négatif -	La bactérie ne possède pas l'uréase puisqu'elle n'a pas hydrolysé l'urée en ammoniac.	SAC	Négatif -	La bactérie n'a pas la capacité de fermenter le saccharose.
TDA	Négatif -	La bactérie a la capacité de désaminer le tryptophane en acide indole pyruvique grâce à l'enzyme tryptophane désaminase.	MEL	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter le mélobiose
IND	Négatif -	La bactérie n'a pas produit l'indole à partir du tryptophane donc elle possède pas de tryptophanase.	AMY	Négatif -	La bactérie n'a pas la capacité de fermenter l'amygdaline
VP	Négatif -	La bactérie n'a pas produit l'acétoine (3-hydroxybutanone) à partir du pyruvate de sodium.	ARA	Négatif -	La bactérie n'est pas capable de fermenter l'arabinose



Fig. 28- Résultat de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs (lecture 3)

Nos résultats de tests par des galeries biochimiques (API 20 E), dans la majorité des échantillons analysés, étaient négatifs pour les sucres avec l'exception de glucose. Le même résultat était obtenu par Graaf *et al* (2006), en inoculant la galerie API 50 CHB par *Paenibacillus larvae*. Cette différence des caractéristiques bactériologiques est justifiée par la détection de plusieurs souches de *P. larvae* en Algérie. Selon De Graaf *et al.* (2006), les différentes souches de *P. larvae* n'ont pas les mêmes caractéristiques morphologiques et biochimiques (tableau 4 page 58 ; tableau 8).

Les caractéristiques biochimiques de 15 souches de *P. larvae* sont testées pour l'acidification des carbohydate (glucides) (tableau 8). Les résultats les plus invariants sont obtenus quand une suspension bactérienne dense est chargée sur la galerie biochimique et lu après 48 h.

Tableau 8- Caractéristiques biochimiques des différentes souches de *P. larvae* (De Graaf *et al.*, 2006)

Biochemical profile of *Paenibacillus larvae* reference strains and field strains

Strains studied	LMG 9820 ^T	LMG 14425	LMG 15974 ^T	LMG 14427	R 20828	R 20829	R 20830	R 20831	R 20832	R 20833 t1	R 20833 t2	R 20834	R 20835	R 20836	R 20837
Subspecies	<i>Pll</i>	<i>Pll</i>	<i>Plp</i>	<i>Plp</i>											
iC9-based PCR	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+ ^a	±	+	±	±	±	±	+	+	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	±	+	+	+	±	+	+	±	+	+	+	+	+	±
Galactose	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	-	-	±	-	±	-	±	±	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	±	+	±	±	±	+	±	±	+	+	+	+	+	+
Mannitol	±	-	+	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
α-Methyl-D-glucoside	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicine	+	±	±	±	-	±	-	±	±	±	±	±	±	+	-
Maltose	-	-	-	±	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	±
D-Tagatose	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
5-Keto-D-gluconate	-	±	±	-	-	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-

All strains were negative for erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-xylose, L-xylose, adonitol, β-methyl-xyloside, L-sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, sorbitol, α-methyl-D-mannoside, amygdaline, arbutine, esculine, cellobiose, lactose, melibiose, saccharose, inuline, melézitose, D-raffinose, amidon, glycogène, xylitol, β-gentiobiose, D-turanose, D-lyxose D-fucose, L-fucose, D-arabitol, D-arabitol, gluconate, and 2-keto-D-gluconate.

All strains were positive for N-acetylglucosamine.

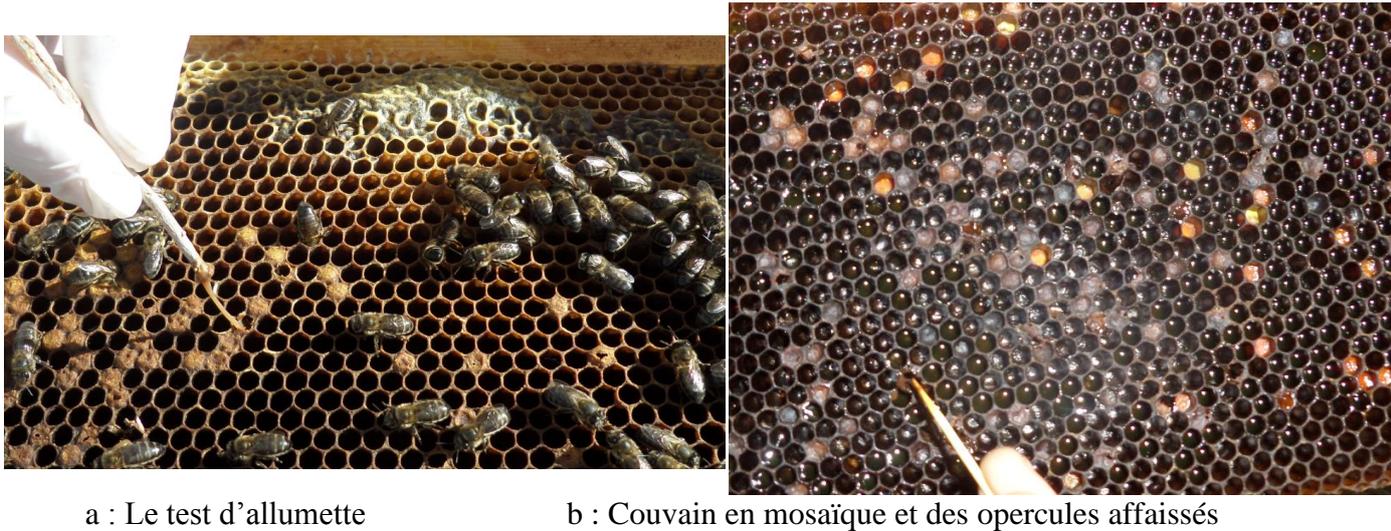
^a +, positive; ±, ambiguous; -, negative.

D'après le tableau 8 (De Graaf *et al.*, 2006), Toutes les souches testées sont négatives pour érythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-xylose, L-xylose, adonitol, méthyl-xyloside, L-sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, sorbitol, méthyl-D-mannoside, amygdaline, arbutine, esculine, cellobiose, lactose, mélibiose, saccharose, inuline, mélézitose, D-raffinose, amidon, glycogène, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gluconate et le 2-keto-D-gluconate. Toutes les souches sont positives pour N-acétylglucosamine. Les résultats des autres sucres se différencient considérablement entre les souches. Sur la base du profil des souches de référence (*Pll* et *Plp*, *Paenibacillus larvae larvae* et *Paenibacillus larvae pulvifaciens* respectivement), il n'y avait pas de réaction caractéristique pour une des sous-espèces, avec l'exception de méthyl-D-glucoside qui a donné le même résultat négatif pour les deux références *Pll*, mais ici les deux références *Plp* testées sont ambiguës. En plus, toutes les souches qui sont négatives pour IC9-PCR ont été testées positives pour le mannitol (De Graaf *et al.*, 2001, 2006), mais le résultat des souches de référence n'a pas été équivoque. Selon (De Graaf *et al.*, 2006), la différenciation entre les sous-espèces de *P. larvae* sur la base de l'acidification des sucres est beaucoup plus difficile et aucun motif différentiel clair n'a pu être trouvé. En outre, plusieurs groupes de recherche ont constaté que l'acidification de mannitol (Gordon *et al.*, 1973 ; Dobbelaere *et al.*, 2001) et salicine (Carpana *et al.*, 1995) ont des propriétés assez variables de *P. larvae*.

Selon le Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres (OIE, 2014), la méthode à appliquer pour le diagnostic de la loque américaine *P. larvae* dépend de la présence de signes cliniques. Dans un état avancé de la maladie, les rayons de couvain affectés par la loque américaine sont caractérisés par la consistance gluante des restes larvaires, qui peuvent être tirés comme fils avec un dispositif mince. Si, en plus d'un échantillon traité thermiquement des larves, avec une morphologie caractéristique des colonies, contenant Gram positif, catalase négative, la conclusion sera : la loque américaine positive. Lorsque les signes cliniques sont absents, l'identification de l'agent pathogène exige une identification plus profonde des colonies suspectes (OIE, 2014). Toutefois, en raison de la relation très étroite entre les sous-espèces de *P. larvae* (Gordon *et al.*, 1973 ; Carpana *et al.*, 1995 ; Dobbelaere *et al.*, 2001) la plupart des techniques moléculaires ne permettent pas une discrimination claire entre les deux sous-espèces de *P. larvae* (Pll et Plp) (De Graaf *et al.*, 2006).

2.2.4. Prévalence de *P. larvae* dans les régions d'étude

Sur 105 colonies d'abeilles, 34 sont porteuses de la loque américaine (32,38 %). La loque américaine est une maladie infectieuse, causée par des spores bactériennes *Paenibacillus larvae* qui est répandue dans le monde entier (Lindström *et al.*, 2008 ; Ryba *et al.*, 2009 ; Schäfer *et al.*, 2014 ; Khilnani et Wing, 2015). Cette fréquence (32,38 %) a été estimée sur la base d'un prélèvement des abeilles adultes échantillonnées aléatoirement à l'intérieur des colonies, sans tenir compte des signes cliniques de la maladie (Fig. 29). D'après Hansen et Brodsgaard (1999), certaines colonies infectées par la loque américaine sont restées fortes et elles n'ont jamais développé les symptômes cliniques de la maladie, à savoir la masse filante dans les cellules hexagonales plafonnées qui peut être observée sur terrain par le test d'allumette (Fig. 29a), l'aspect d'un couvain en mosaïque et des opercules affaissés (Fig. 29b). Ceci peut faire l'objet d'un travail de recherche sur la génomique de l'abeille dans le but d'identifier des gènes de résistance pour la maladie.



a : Le test d'allumette

b : Couvain en mosaïque et des opercules affaissés

Fig. 29- Les signes cliniques de la loque américaine *P. larvae* observés sur terrain (Originale)

D'après le tableau 9 et la figure 30, toutes les régions d'études (11 régions) sont infectées par la loque américaine avec des niveaux d'infection différents. Les régions de Boumerdes et Tipaza sont caractérisées par des fréquences très élevées de la maladie 88,89 % et 83,33 % respectivement. Elles sont suivies par, Tlemcen, Médéa et Alger avec des fréquences relativement élevées 46,67 %, 33,33 % et 33,33 %, respectivement. Enfin, les autres régions sont caractérisées par des faibles taux d'infections qui ne dépassent pas les 20 %. Cette différence de fréquence dans la répartition de la maladie peut être due à différentes causes, notamment la gestion des exploitations apicoles. Certains apiculteurs ne prennent pas sérieusement en charge le côté sanitaire de leurs exploitations favorisant l'installation de la maladie. Selon les statistiques du ministère de l'agriculture et de développement rural (MADR, 2015), les régions de Boumerdes, Tipaza, Tlemcen, Médéa et Alger sont caractérisées par les productions apicoles les plus élevées. Ces régions sont aussi caractérisées par une fréquence de transhumance élevée, facteur important dans la propagation de la maladie selon Fernandez et Coineau (2007).

Tableau 9- Prévalences de la loque américaine dans les régions d'étude

Régions	N° de ruchers échantillonnés	N° de ruches échantillonnées	Prévalence %
Batna	2	9	11,11
Bouira	1	10	20,00

Médéa	1	3	33,33
Khenchela	3	23	8,33
Tissemsilt	2	6	16,67
Alger	3	6	33,33
Sidi-Belabbes	2	15	20,00
Tlemcen	3	15	46,67
Sétif	3	14	21,43
Tipaza	3	6	83,33
Boumerdes	1	9	88,89
Total	24	105	32,38

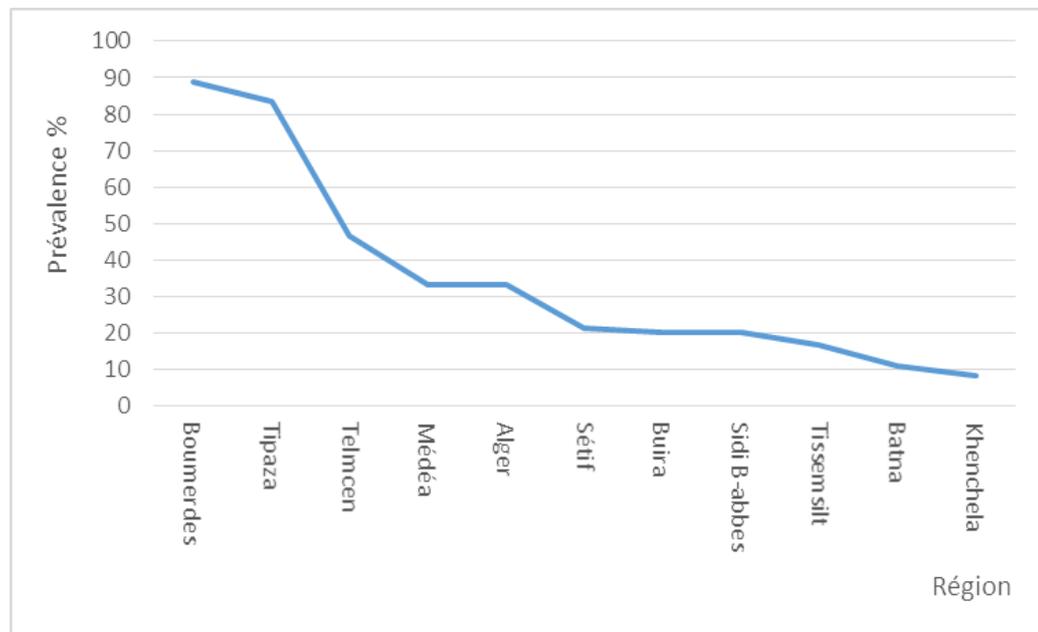


Fig. 30- La prévalence de la loque américaine dans les régions d'étude

Dans cette étude, l'évaluation de la répartition de la maladie basée sur le modèle linéaire généralisé avec des réponses variables suivi d'une distribution binomiale, ajusté par la procédure GENMOD du logiciel SAS (annexe 5), indique une signification statistique pour le facteur région d'étude ($p < 0,05$) (Tableau 10). D'après le tableau 10, il y a des différences significatives dans la fréquence de la maladie entre les régions d'étude ($\text{Khi } 2 = 30,23$; $\text{DF} = 10$; $P = 0.0008$), mais pas parmi les différents ruchers à l'intérieur des régions ($\text{Khi } 2 = 20,25$; $\text{DF} = 13$; $P = 0.0891$).

Tableau 10- Résultats d'évaluation de la répartition de la loque américaine par l'utilisation de la procédure GENMOD du SAS 9.

Source	Déviante	DDL	Khi 2	Pr > Khi 2
Intercepte	132,2386			
Régions	102,0088	10	30,23	0,0008
Ruchers (régions)	81,7557	13	20,25	0,0891

Donc, la région a un effet sur la fréquence d'apparition de la maladie, par contre il n'y a pas de différence significative d'apparition de la maladie entre les ruchers de la même région. Les résultats sont semblables à ceux de l'analyse de la variance en utilisant la procédure GLM du logiciel SAS.

Parmi les régions d'études, Batna (Khi 2 = 314,14 ; DDL = 1 ; P < 0,0001), Bouira (Khi 2 = 6,86 ; DDL = 1 ; P = 0,0088), Khenchela (Khi 2 = 286,94 ; DDL = 1 ; P < 0,0001), Sidi-Belabbes (Khi 2 = 470,41 ; DDL = 1 ; P < 0,0001), Tlemcen (Khi 2 = 5,06 ; DDL = 1 ; P = 0,0245) et Tipaza (Khi 2 = 173,51 ; DDL = 1 ; P < 0,0001) sont caractérisées par des différences significatives entre les fréquences d'apparition de la maladie. Concernant le reste des régions, il n'y a pas de différence significative entre les fréquences d'apparition de la maladie parmi ces régions.

Le Tableau 11 résume la qualité d'ajustement du modèle spécifié. Ces données sont utiles afin d'examiner l'efficacité de ce modèle, qui prend en considération, les régions et les ruchers à l'intérieur des régions comme facteurs fixes. La déviance moyenne (D= 81.7557) divisé sur le nombre de degré de liberté (DDL= 81) est égale à (1.0093) (tableau 11). Myers *et al.* (2002), suggèrent que la dispersion ne risque pas d'être un problème (plus ou moins), tant que le rapport est proche de 1,0. De façon similaire, une déviance qui est approximativement égal à ses degrés de liberté, représente une indication possible d'un bon modèle. Par conséquent, le modèle spécifié est donc préformé de manière adéquate.

Tableau 11- Critères d'évaluation de qualité de l'ajustement du modèle statistique

Critère	DDL	Valeur	Valeur/DDL
Déviante	81	81.7557	1.0093
Scaled Deviance	81	81.7557	1.0093

Pearson Chi-Square	81	74.0000	0.9136
Scaled Pearson X2	81	74.0000	0.9136
Log Likelihood		-40.8778	

2.2.5. Etude de corrélation entre le nombre de ruchers par région et le taux d'infection par la loque américaine

La concordance du nombre de ruchers dans chaque région par le niveau de la maladie est corrélée négativement ($R^2=0,29$) (fig. 31).

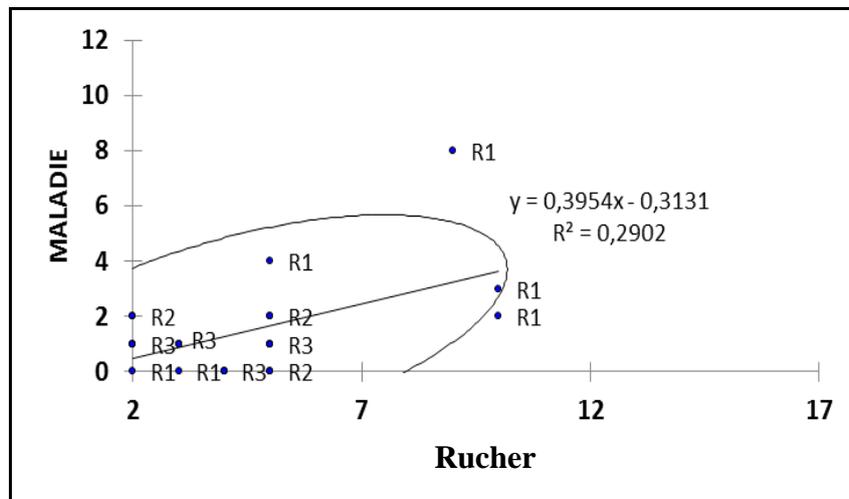


Fig. 31- la corrélation négative entre le nombre de ruchers par région et l'infection par la loque américaine

D'un autre côté pour vérifier si la répartition du nombre de ruchers utilisés dans l'expérience est statistiquement correcte, nous avons utilisé le test statistique de Kruskal. Il est à noter que ces ruchers utilisés sont de l'ordre de 1, 2 ou 3 au sein de la même région.

Les résultats de ce dernier test (fig. 32) montre qu'il existe une différence significative (test de Kruskal, $p=0,009$) de la répartition et prévalence de la maladie concernant le nombre de ruchers échantillonnés par région lors de l'étude. L'échantillonnage est effectué dans un seul rucher dans la plus part des régions d'étude.

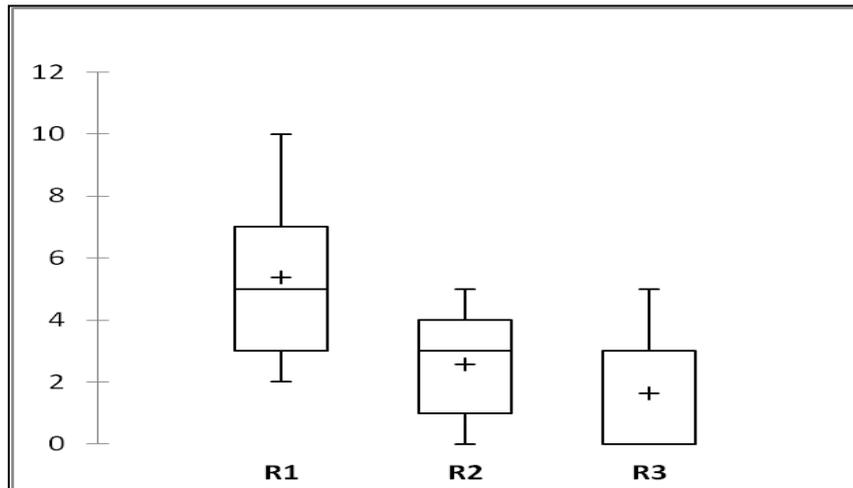


Fig. 32- La différence significative entre le nombre de ruchers échantillonnés par région (test de Kruskal, $p=0,009$)

Effectivement le test post-hoc (tableau 12) révèle 2 groupes homogènes. Le groupe B ayant le rang le plus élevé est représenté par les régions dont un seul rucher est utilisé dans l'étude. Le groupe A au rang le plus faible, représente les régions où trois ruchers sont échantillonnés. Le groupe AB est intermédiaire entre les deux et est représenté par les régions dont deux ruchers sont pris en compte lors de l'échantillonnage.

Tableau 12- Les groupes homogènes par l'utilisation de test post-hoc effectué sur les ruchers échantillonnés

Ruchers	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes
R3	11	129,000	11,727	A
R2	11	170,000	15,455	A B
R1	11	262,000	23,818	B

Cette différence du nombre de ruchers visités et échantillonnés ne nous permet pas de comparer la présence ou l'absence de la maladie entre les ruchers échantillonnés dans chacune des régions d'étude comme indiqué précédemment par le test de Kruskal. Ce qui nous oblige donc à considérer un seul bloc de ruchers par région.

2.2.6. Structure et répartition de la maladie

Selon la figure 33, la variabilité au niveau des taux d'infection par région est importante au niveau de SBA (Sidi-Belabbes) et Tlemcen. On remarque aussi qu'il existe une différence significative du niveau d'infection entre les régions ($\text{Khi } 2 = 30,23$; $\text{DF} = 10$; $P =$

0.0008), résultat de la procédure GENMOD du logiciel SAS 9. Le rapport des ruches infectées aux ruches non infectées est équilibré à Boumerdes, la proportion des ruches infectées est beaucoup plus élevée comparée aux ruches non infectées par la loque américaine. Contrairement, dans la région de Médéa, ce rapport est équilibré mais en faveur des ruches non infectées.

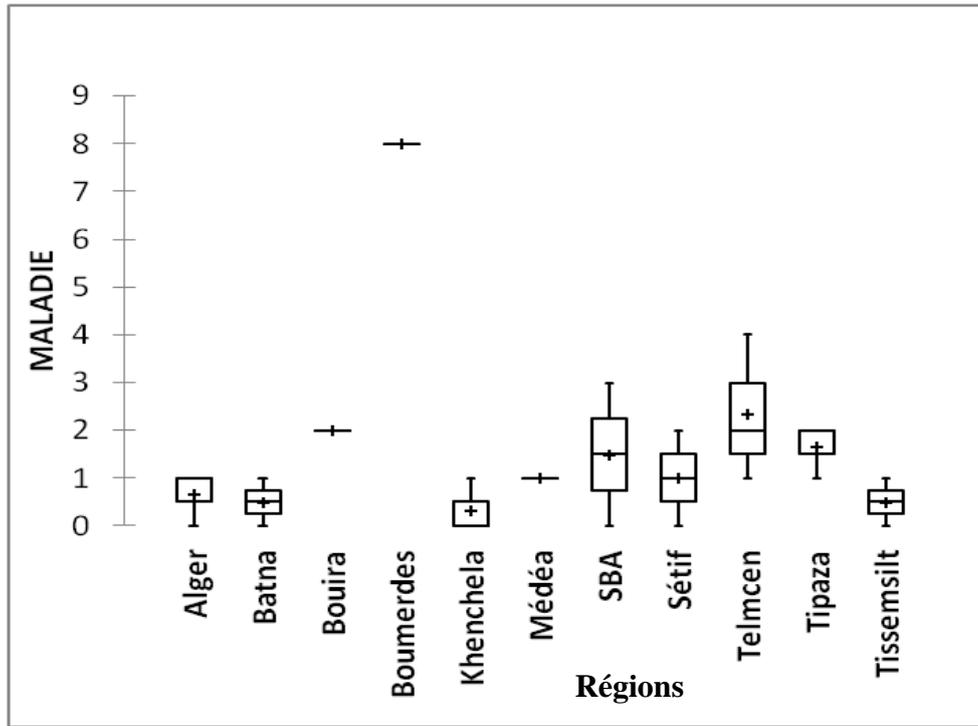


Fig. 33- La variabilité au niveau des taux d’infection par la loque américaine dans les régions d’étude

Le test post-hoc de Regwk montre que la région de Boumerdes a un taux d’infection particulier par rapport au reste des régions étudiées (tableau 13).

Tableau 13- Les groupes homogènes par l’utilisation de test post-hoc de Regwk effectué sur les taux d’infection par la loque américaine dans les régions d’étude.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
Boumerdes	8,000	A
Tlemcen	2,333	B
Bouira	2,000	B

Tipaza	1,667	B
SBA (Sidi-Belabbes)	1,500	B
Sétif	1,000	B
Médéa	1,000	B
Alger	0,667	B
Batna	0,500	B
Tissemsilt	0,500	B
Khenchela	0,333	B

Donc finalement le niveau d'infection est identique dans toutes les régions excepté la région de Boumerdes.

La technicité des apiculteurs peut être considérée comme étant l'une des causes d'installation de la maladie ainsi que sa fréquence dans différentes régions. Les apiculteurs ne se basent que sur l'essaimage artificiel pour agrandir leurs ruchers (selon le questionnaire). Cette technologie de reproduction a un impact sur la sensibilité des ruches à certains agents pathogènes (Tarpy, 2003 ; Meixner *et al.*, 2010), ainsi que sur la transmission des maladies (Genersch, 2010). La maladie peut se transmettre par alternatif entre deux modes de transmission, une transmission verticale entre l'un des parents de la première génération vers la descendance (la deuxième génération). Ce mode de transmission de la maladie est considéré comme étant le moins virulent avec peu d'impact sur les conditions physiques de l'hôte (Genersch, 2010). La transmission horizontale de la maladie peut s'effectuer entre les individus de la même colonie et entre les individus des colonies différentes. Ce dernier mode est le plus dangereux (Fries et Camazine, 2001).

La proximité géographique des ressources est importante pour la diffusion de la maladie. Plus l'environnement est riche plus la distance de butinage est courte, en moyenne 2 Km. Lorsque les ressources sont moins abondantes, 50% des butineuses peuvent aller à plus de 6 Km et 10 % à plus de 9 Km favorisant ainsi une plus importante diffusion de la maladie.

Le changement climatique et son ampleur prévue pourraient entraîner un décalage temporel entre le développement des ressources florales et celui des colonies. Cela pourrait modifier

leurs interactions avec des conséquences sur la qualité des apports alimentaires et donc la vitalité et la résistance des colonies aux maladies (Potts *et al.*, 2010).

la présence des sous espèces (Heyndrickx *et al.*, 1996) et des souches (De Graaf *et al.*, 2006 ; De Graaf *et al.*, 2013 ; OIE, 2014) de *P. larvae* dont le degré de pathogénicité diffère peut expliquer la différence de développement de la maladie d'une région à une autre (Heyndrickx *et al.*, 1996).

Par ces résultats, nous avons voulu identifier les régions similaires en considérant le nombre de ruches, le nombre de ruchers visités dans chaque région, le nombre de fois où la maladie a été observée et l'intensité de son apparition. Nous avons utilisé une classification ascendante hiérarchique (CAH) par dissimilation, en utilisant la méthode de Ward. Il ressort du test CAH que les régions sont subdivisées en 4 classes selon les critères susmentionnés (fig. 34).

1^{ère} classe : Boumerdes

2^{ème} classe : Bouira et Sidi-Belabbes (SBA)

3^{ème} classe : Médéa, Tissemsilt, Alger et Tipaza

4^{ème} classe : Tlemcen, Khenchela, Batna et Sétif

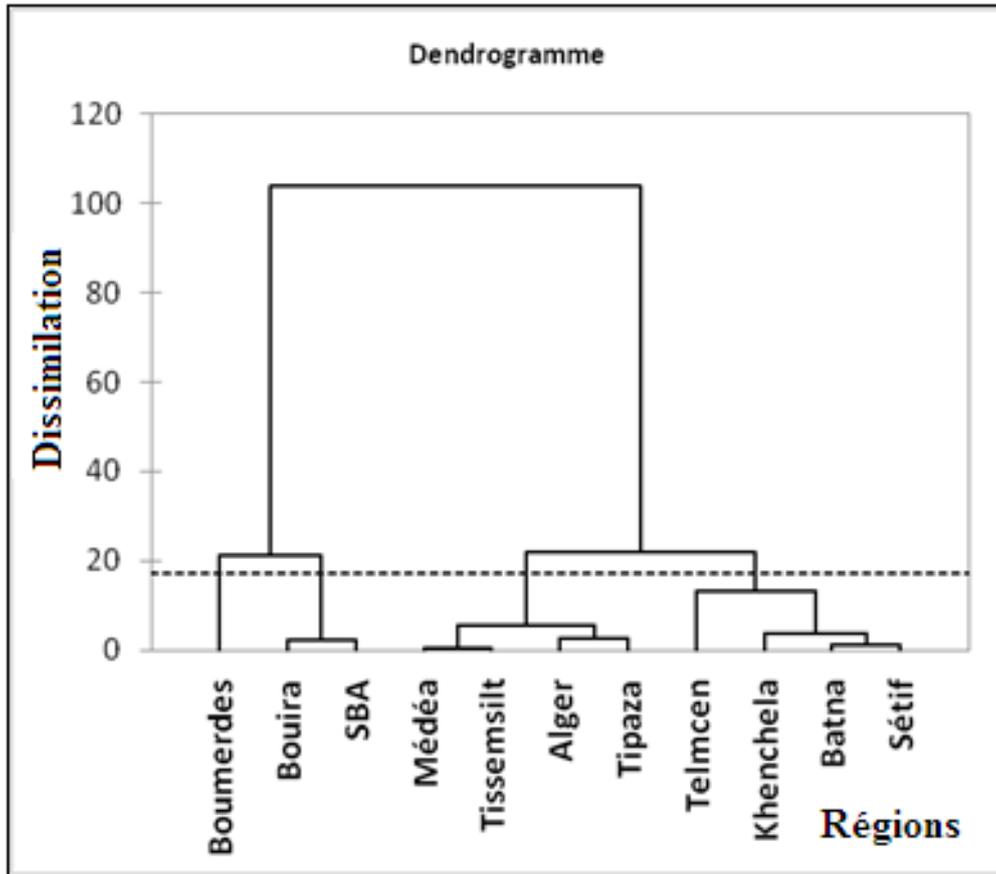


Fig. 34- classification ascendante hiérarchique (CAH) par dissimilitude des régions en fonction de l'infection par la loque américaine

En général, les études épidémiologiques enquêtent sur la distribution spatiale et temporelle (Spatio-temporelle) des maladies infectieuses et la tentative de déterminer la source de l'infection, de révéler la relation entre les différents foyers, et d'identifier les facteurs influençant l'épidémie (Genersch, 2010). Les facteurs liés à l'environnement des colonies peuvent favoriser les affections digestives et le développement des agents pathogènes. A titre d'exemple, les miellats sont riches en sucres peu digestibles par l'abeille comme le mélézitose et le raffinose. En plus, ils sont riches en sels minéraux favorisant ainsi le développement de la nosérose et certains virus (Bruneau, 2006). Il existe une grande variété de qualité nutritionnelle au sein des végétaux butinés par les abeilles. Alaux *et al.* (2010b) ont montré le lien entre alimentation protéique et immunité. Une ration pollinique d'origine polyflorale entraîne une augmentation de l'activité de la glucose-oxydase (marqueur d'immunité sociale) supérieure à celle d'une ration de pollen d'origine monoflorale.

En outre l'étude qui a porté sur la tolérance et la résistance à *Varroa destructor*, (en dépistant les alvéoles parasitées) a montré que certaines colonies d'abeilles parviennent à diminuer les populations de varroa de 30 %, sans aucun traitement (Locke *et al.*, 2012).

2.2.7. La loque américaine et le phénomène d'effondrement des colonies d'abeilles CCD

Plusieurs termes sont couramment utilisés pour désigner et pour caractériser le « dépérissement des abeilles » dans les revues apicoles ou les comptes rendus de conférences sur l'apiculture. Les scientifiques et les apiculteurs parlent de : trouble, dépeuplement, dépopulation, affaiblissement et surmortalité. Higes *et al.* (2006) ont nommé ce dépérissement par « le phénomène d'effondrement des colonies d'abeilles ou CCD ». Depuis plusieurs années, des phénomènes de mortalités anormales et d'affaiblissement de colonies d'abeilles domestiques, de disparitions de butineuses sont très souvent signalés dans le monde entier (Higes *et al.*, 2006 ; Lefebvre et Bruneau 2003, 2005 ; Simoens, 2005). Parmi les causes les plus importantes, en particulier, un couvain ouvert infecté par *Paenibacillus larvae*, l'agent étiologique de la loque américaine, potentiellement, une maladie mortelle pour la colonie (Genersch, 2010).

La loque américaine est l'une des maladies de l'abeille domestique *A. mellifera* listées dans l'organisation internationale des épizooties (OIE, 2014), et est parmi les maladies contagieuses à déclaration obligatoire. Genersch *et al.*, (2005) ont considéré la loque américaine comme la maladie la plus dangereuse chez l'abeille européenne *A. mellifera*. Cette maladie a infecté l'abeille domestique depuis plus de cent ans (De Graaf *et al.*, 2013), elle est connue comme maladie du couvain. Les jeunes larves sont contaminées en ingérant de la nourriture infectée par l'agent pathogène de la loque américaine *P. larvae*. La bactérie se multiplie rapidement dans l'intestin de la larve empêchant l'ingestion ultérieure de nourriture. Les larves malades vont mourir de l'infection lorsque la sporulation se produit. Elles pourraient ensuite transmettre les spores tout au long de la ruche. La plupart des larves infestées meurent avant l'operculation. Elles perdent leur couleur blanc clair, prennent une teinte mate jaunâtre à brune et s'affaissent dans la cellule (Fernandez et Coineau, 2007). Les larves malades sont éliminées de la colonie par les nettoyeuses qui peuvent de cette manière s'infecter et transmettre l'agent pathogène aux autres larves. Ryba *et al.* (2009) ont détecté la loque américaine dans les débris de la fausse teigne, facteur qui peut favoriser la transmission

de la maladie. Selon de récentes études (Adjlane *et al.*, 2014 ; Haddad *et al.*, 2015a), les abeilles adultes sont elles-mêmes porteuses de *P. larvae*. La bactérie peut donc aussi être transmise aux autres colonies et ruchers voisins par le pillage ou la dérive des abeilles, ce qui favorise la propagation de la maladie et l'élargissement de la zone d'infection. Des analyses ont montré que lorsque quelques colonies présentent, dans un rucher, des symptômes cliniques, les autres colonies sont le plus souvent porteuses de l'agent pathogène. Or, on trouve cet agent non seulement sur les abeilles, mais aussi dans leurs intestins (De Graaf *et al.*, 2006).

Cette maladie peut tuer la colonie (Genersch, 2010) après la formation de spores. Des mortalités se répandent à des colonies infectées par la loque américaine montrant une faible résistance soit physiologique ou comportementale (Bastos *et al.*, 2008 ; Adjlane et Haddad, 2014). Toutefois, si certaines abeilles possèdent des mécanismes inhérents à la résistance, des niveaux élevés de spores (environ 3000 spores de *P. larvae* par adulte) (Gende *et al.*, 2011) peuvent produire les infections cliniques qui conduisent inévitablement à la disparition des colonies. La loque américaine est considérée comme la plus grave maladie apicole aujourd'hui et a une distribution cosmopolite (Spleen *et al.*, 2013; Steinhauer *et al.*, 2014 ; Van Der Zee *et al.*, 2014 ; Haddad *et al.*, 2015a ; Lee *et al.*, 2015). En outre, il est difficile pour les apiculteurs de contrôler cette maladie, parce que l'agent pathogène produit des spores stables à l'environnement, qui sont virulentes, résistantes à la chaleur, à la dessiccation et aux désinfectants chimiques (Williams, 2000 ; Thompson et Maus, 2007). Ainsi, elle peut détruire la colonie d'abeille infectée en quelques mois ou années (Hansen et Brodsgaard, 1999).

En Algérie, Le pourcentage de perte des colonies d'abeille domestique est faible (Adjlane *et al.*, 2015), durant l'hiver, en comparant avec d'autres pays du monde (Van Der Zee *et al.*, 2012 ; VanEngelsdorp *et al.*, 2012 ; Spleen *et al.*, 2013; Steinhauer *et al.*, 2014 ; Van Der Zee *et al.*, 2014 ; Lee *et al.*, 2015). Ainsi, le phénomène d'effondrement des colonies d'abeille, a déjà été rapporté en 1935 par Root et Root pour qualifier des cas de nosérose. D'après Chahbar *et al.* (2016), la nosérose n'est pas considérée comme une maladie qui cause l'effondrement des colonies d'abeille en Algérie. D'après Haubruge *et al.* (2006), l'importante variation intraspécifique au point de vue la longévité d'*Apis mellifera* est considérée comme étant un facteur de risque lié au dépérissement de l'abeille domestique. Les reines, les faux-bourçons et les ouvrières se développent respectivement en 16, 24 et 21 jours (Winston, 1987). Tandis que les reines vivent pendant plusieurs années, les ouvrières ont une

espérance de vie située d'une part entre 15 et 70 jours pour les abeilles d'été et, d'autre part, entre 170 à 243 jours pour celles d'hiver (Fluri, 1994). Quant aux mâles, ils dépassent rarement une durée de vie de 60 jours (Page et Peng, 2001). Les nouveaux insecticides systémiques, l'imidaclopride, fipronil (Haubruge *et al.*, 2006) et Tiamethoxam (Chahbar *et al.*, 2013), sont considérés comme étant des causes majeures du dépérissement de l'abeille domestique. Le dépérissement des abeilles domestiques stigmatise un malaise profond au niveau du monde apicole confronté à un environnement de plus en plus anthropisé (Haubruge *et al.*, 2006). Le pollen peut même être toxique pour l'abeille domestique. Soit naturellement chez certaines espèces végétales comme *Anomone nemorosa* (Renonculaceae), *Ranunculus auricomus* (Renonculaceae), *Tilia platyphyllos* (Malvaceae), *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae), *Dimorphandra mollis* (Caesalpinaceae) (Maurizio, 1968 ; Pimentel de Carvalho et Message, 2004 ; Cintra *et al.*, 2005). Soit par la présence, sur les grains, de champignons produisant des mycotoxines comme *Aspergillus flavus* (Gonzalez *et al.*, 2005) ou par la présence de transgènes exprimant des protéines insecticides provenant de plantes génétiquement modifiées (Picar-Nizou *et al.*, 1997 ; Brodsgaard *et al.*, 2003).

2.2.8. La sélection des colonies résistantes contre la loque américaine

Il ressort de notre travail la possibilité d'obtenir à partir des abeilles qui ont le mieux répondu à la loque américaine, par une réponse immunitaire sociale, un noyau de sélection basée sur le comportement hygiénique des abeilles au niveau de la même colonie. Le comportement hygiénique est une réponse collective à la présence de couvain malade ou parasité. Les ouvrières détectent par olfaction les individus touchés dans le couvain operculé et les éliminent de la colonie, enrayant le développement de l'affection. Le paramètre à prendre en considération pour évaluer le comportement hygiénique est le temps utilisé par les colonies pour détecter, déboucher et supprimer un couvain mort. Il faut que ce couvain mort soit coupé à partir d'un cadre à l'intérieur du couvain, congelé à -20°C pendant 24h, et placé dans le couvain d'une colonie d'essai (Spivak et Reuter, 1998). Les colonies d'abeilles sélectionnées sur cette base ont montré une résistance contre la loque américaine (Spivak et Reuter, 2001). Ce caractère de comportement hygiénique est lié à une sensibilité particulière à des composés volatils associés à l'infection de l'alvéole ; l'acétate de phényl et l'ascosphérose par exemple (Swanson *et al.*, 2009).

En Algérie, certains auteurs (Chahbar *et al.*, 2013; Loucif-Ayad *et al.*, 2014) ont signalé une forte variabilité en termes de nombre d'allèles entre les populations d'abeilles locales *A. mellifera*. La comparaison entre le génome de la sous-espèce d'abeille *A. m. intermissa* prélevée à partir de différents pays a donné un aperçu de l'évolution des adaptations à haute température et la résistance à l'infestation à l'agent de la varroase (Haddad *et al.*, 2015). D'après (Ruttner, 1988), *Apis mellifera intermissa* a montré un comportement défensif. En plus, *Apis mellifera intermissa* a un niveau plus élevé de comportement hygiénique par rapport à plusieurs autres sous-espèces (Kefuss, 1995) et elle est caractérisée par une bonne capacité de nettoyage (Adjlane et Haddad, 2014). La diversité génétique au sein de la colonie, liée à la polyandrie, améliore sa résistance, son homéostasie, sa thermorégulation et sa bonne santé globale. L'accouplement multiple diminue les probabilités que l'ensemble des descendants d'une même reine reçoit le même gène de sensibilité à certains agents pathogènes (Tapy, 2003 ; Meixner *et al.*, 2010). La répartition des tâches chez les ouvrières est liée essentiellement au polythéisme d'âge. Ce comportement permet de limiter les contacts entre fossoyeuses, nettoyeuses et nourricières. Il est démontré que l'expression varie au cours de la vie des ouvrières. Ces propriétés permettent d'optimiser la réponse immunitaire à l'échelle de la colonie (Evans et Spivak., 2010). Ces caractères de résistance aux maladies sont majoritairement déterminés génétiquement mais les pratiques apicoles actuelles sont déterminantes pour la préservation de leur efficacité. La mise en place de bonnes pratiques apicoles reste l'enjeu primordial pour la prévention contre les maladies des abeilles (Fernandez et Coineau, 2007).

2.3. Etude de la sensibilité des deux races d'abeille *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis* pour la nosérose

Cette partie porte sur l'étude de la sensibilité des deux races d'abeille domestique existantes en Algérie, *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*, pour la nosérose. Les résultats d'inoculation d'une dose de 100.000 spores par abeille pour chacune des deux races d'abeille sont exposés, comparés et discutés.

2.3.1. Comparaison entre la mortalité des témoins et la mortalité après l'inoculation des spores de *Nosema*

Concernant l'abeille domestique telienne *A. m. intermissa*, les taux des mortalités corrigées après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores par abeille et les taux des mortalités corrigées chez les individus non traités (témoins) sont similaires, avec une petite différence après 48 heures. Après 24 heures d'inoculation, le taux de mortalité corrigée pour les abeilles traitées est élevée en comparant avec la mortalité des témoins (fig. 35). Dussaubat *et al.* (2013) ont noté que le taux de mortalité pour les abeilles, *A. m. iberiensis* issue de l'Espagne, traitées (inoculées par une dose de 40.000 spores par abeille) était inférieur par rapport au taux de mortalité des témoins (non traitées) avant le 12^{ème} jour post-infection. Contrairement aux abeilles *A. m. iberiensis* issues d'Avignon de France, dont la mortalité chez les individus traités était supérieure en les comparant avec la mortalité des témoins (Dussaubat *et al.*, 2013).

Contrairement pour l'abeille domestique saharienne *A. m. sahariensis*, les taux des mortalités corrigées chez les individus traités par une dose de 100.000 spores par abeille sont élevés par rapport aux taux de mortalités chez les individus témoins non traités. Elle varie entre 0 % et 0,13 % chez les individus témoins, alors qu'elle est entre 5 % et 11,54 % pour les individus traités, après 24 et 96 heures respectivement (fig. 35).

Des résultats similaires sont obtenus par Chaimanee *et al.* (2013) pour *A. mellifera*, dont les taux de mortalité de *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata* et *A. florea*, après 6 jours d'inoculation, étaient environ 5-15%, 20-65%, 20-55 % et 20-70%, respectivement.

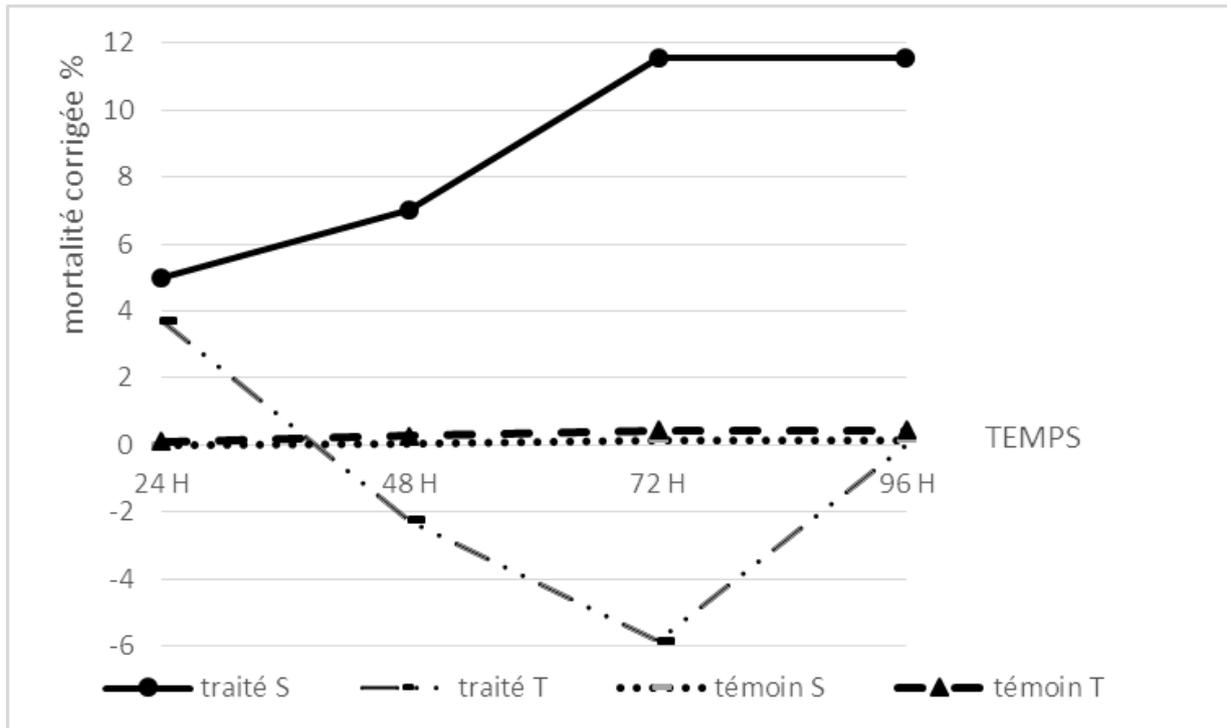


Fig. 35- Graphes comparatifs des cumuls de taux de mortalités notés pour les deux races d'abeille, traitées par une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. par abeille et autres témoins non traitées.

traité S : taux de mortalité corrigée notés pour *A. m. sahariensis* (saharienne) inoculée par 100.000 spores par abeille. traité T : taux de mortalité corrigée notés pour *A. m. intermissa* (tellienne) inoculée par 100.000 spores par abeille. témoin S : taux de mortalité notés pour *A. m. sahariensis* (saharienne) non traitée. témoin T : taux de mortalité notés pour *A. m. intermissa* (tellienne) non traitée.

D'après (Gregorc *et al.*, 2012), des réponses immunitaires se développent chez les abeilles lorsqu'elles sont infectées par certains parasites. Cependant, les insectes ont une variété de moyens pour lutter contre les effets des agents pathogènes et de parasites. Défenses comportementales (Adjlane et Haddad, 2014), physiologiques et immunitaires sont des mécanismes communs impliqués dans l'élimination des agents pathogènes (Evans et Spivak, 2010).

Le système immunitaire des abeilles est activé lors de l'exposition à des blessures ou à des pathogènes. Evans *et al.* (2006) ont proposé que l'abeille, comme d'autres insectes, possède quatre voies moléculaires majeures interconnectées entre elles qui peuvent s'activer face à

l'exposition à un parasite : Toll, Imd, Jak / STAT et Jnk. En général, ces voies consistent à (i) des protéines qui reconnaissent des signaux des parasites envahisseurs, (ii) des protéines qui modulent et amplifient le signal de reconnaissance, et (iii) des protéines ou métabolites qui sont impliqués directement dans l'inhibition du parasite. Ces voies moléculaires sont à la base des réponses immunitaires de type cellulaire et humorale (James et Xu, 2012). L'immunité humorale commence avec la reconnaissance d'un antigène tel qu'un parasite, ce qui déclenche la synthèse des différentes protéines antimicrobiennes (AMPs, antimicrobial peptides). Une réponse immunitaire localisée peut avoir lieu dans l'intestin des insectes par la production d'AMPs ou également par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species), molécules très réactives ayant une action antimicrobienne. La production de ROS (H_2O_2 , O^{2-} , ou OH^{-1} entre d'autres molécules) a lieu dans les cellules par différentes voies comme par exemple la respiration cellulaire. Ces molécules assez réactives peuvent aussi endommager les cellules, c'est pourquoi l'organisme possède des mécanismes antioxydant (Cadet *et al.*, 2005). La production de ROS dans l'intestin est extrêmement rapide ce qui lui confère une fonction de première barrière contre l'invasion microbienne. Au contraire, pour la plupart des insectes les AMPs ne sont pas efficaces dans le contrôle des champignons entomopathogènes. L'immunité cellulaire implique la reconnaissance du pathogène suivie par la phagocytose (virus et bactéries), la nodulation (champignons et quelques bactéries) et l'encapsulation (parasites multicellulaires). La phagocytose est accompagnée par la production de mélanine et la mélanisation de nodules ou capsules. La voie de mélanisation est activée par les hémocytes et déclenche la cascade de phénoloxydase (enzyme terminal du processus de mélanisation); la mélanisation peut induire également la production de ROS (James et Xu, 2012).

Il a été observé au niveau moléculaire (Antúnez *et al.*, 2009) et biochimique (Alaux *et al.*, 2010b) que l'infection par *N. ceranae* n'active pas la voie de mélanisation, et inhibe l'expression des gènes d'AMPs (hymenoptaecin et abaecin) (Antúnez *et al.*, 2009 ; Chaimanee *et al.*, 2012), au contraire de *N. apis* (Antúnez *et al.*, 2009). En revanche, d'autres études ont montré l'activation du système immunitaire par la surexpression des gènes des voies moléculaires Toll, IMD et Jak / STAT chez des abeilles sélectionnées pendant longtemps pour leur tolérance à *N. apis* (Huang *et al.*, 2012).

2.3.2. Relation entre mortalité corrigée et le nombre de spores de *Nosema* produites

2.3.2.1. Chez *A. m. intermissa*

Le graphe ci-dessous (fig. 36) fait ressortir une mortalité maximale de 3,70 % notée après le 1^{er} jour post-infection chez l'abeille domestique tellienne *A. m. intermissa*. Le nombre de spores par abeille est élevé de $6,3 \times 10^6$ le premier jour jusqu'au $12,3 \times 10^6$ le 4^{ème} jour post-infection. Ces valeurs correspondent à une très forte infection selon l'échelle de classification de Soerensen (2009). Malgré cette forte infection par la nosérose, après une infection artificielle, les taux de mortalités observés chez cette race d'abeille *A. m. intermissa* sont très faibles (maximum 3,70 %).

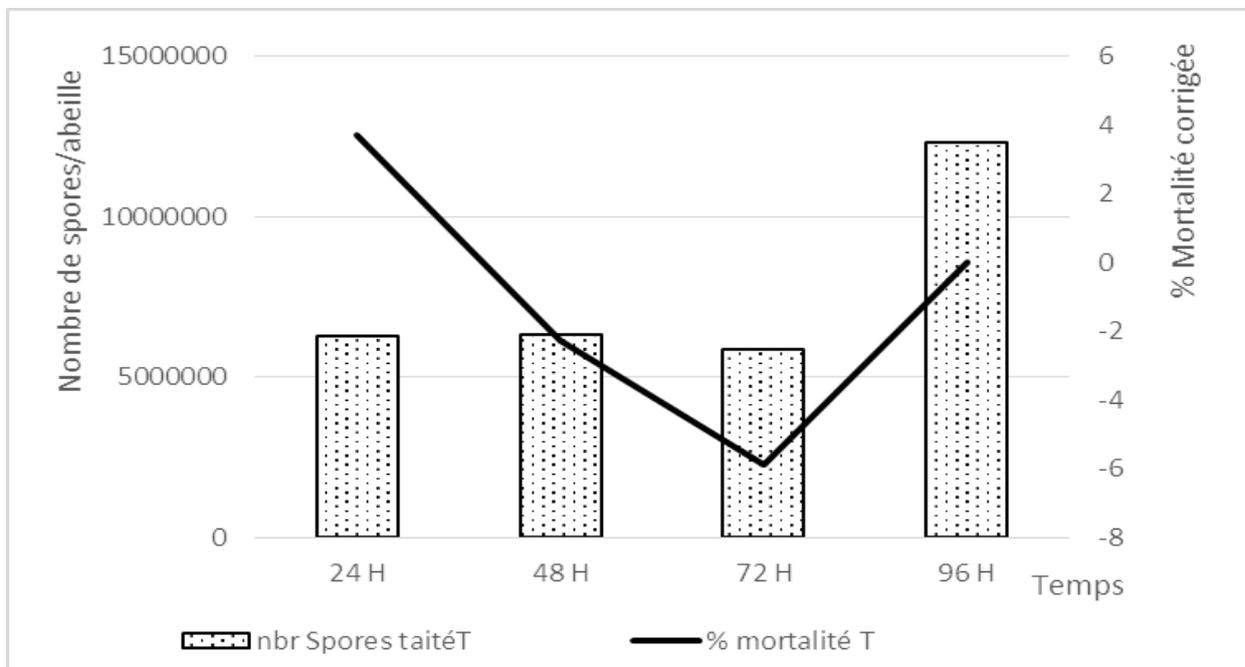


Fig. 36- Cumul de taux de mortalité noté pour *A. m. intermissa* en relation avec le nombre moyen de spores par abeille marqué après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. par abeille.

Nbr spores traité T : Nombre moyen de spores noté pour *A. m. intermissa* inoculée par une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. ; % mortalité T : Taux de mortalité corrigée notés pour *A. m. intermissa* après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores *Nosema* sp.

2.3.2.2. Chez *A. m. sahariensis*

D'après la figure 37, après le 3^{ième} et le 4^{ième} jours post-infection, un taux de mortalité de 11,54 % est trouvé chez l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*. Nous avons marqué une phase stationnaire à partir du 3^{ième} jour post-infection. Alors que 5 % à 7,02 % de taux de mortalité sont trouvés pour le premier et le 2^{ième} jour post-infection, respectivement.

Ainsi le nombre de spores par abeille était élevé de 4×10^5 pendant le premier jour jusqu'à atteindre plus de $3,6 \times 10^6$ spores par abeille le 3^{ième} jour. Selon l'échelle de classification de l'infection par la nosérose proposée par Soerensen (2009), qui est basée sur le nombre de spores par abeille, un nombre de 4×10^5 spores par abeille correspond à une très faible infection. En revanche, $3,6 \times 10^6$ spores par abeille est considéré comme une forte infection.

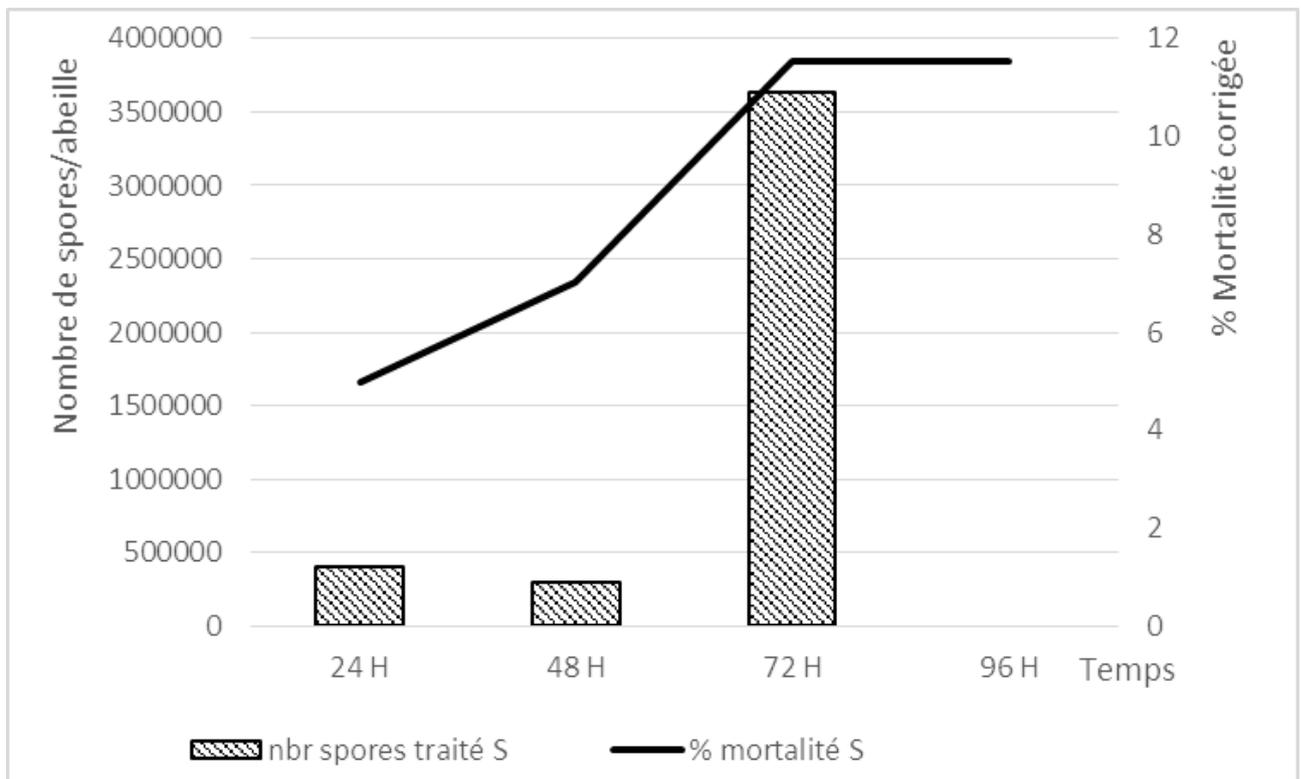


Fig. 37- Cumul de taux de mortalité noté pour *A. m. sahariensis* en relation avec le nombre moyen de spores par abeille marqué après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp.

Nbr spores traité S : Nombre moyen de spores noté pour *A. m. sahariensis* inoculée par une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. ; % mortalité S : Taux de mortalité corrigée notés pour *A. m. sahariensis* après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp.

2.3.3. Nombre de spores produites par jour post-infection

Dans cette étude, le nombre de spores par abeille était élevé de $6,3 \times 10^6$ le premier jour jusqu'au $12,3 \times 10^6$ le 4^{ième} jour post-infection chez *A. m. intermissa*. De même il a été élevé atteignant 4×10^5 pendant le premier jour jusqu'à plus de $3,6 \times 10^6$ spores par abeille le 3^{ième} jour post-infection chez *A. m. sahariensis*. Donc l'évolution en nombre de spores par abeille est importante à partir de 3^{ième} et 4^{ième} jour post-infection, pour *A. m. sahariensis* et *A. m. intermissa* respectivement. Les spores matures sont évidentes à partir du 3^{ième} jour post-infection (Fries *et al.*, 2013), en se basant sur une étude de l'infection artificielle des spores de *Nosema*. Selon (Fries *et al.*, 2013), seules les spores peuvent être détectées en utilisant des méthodes visuelles. Et Les formes végétatives de *Nosema* ainsi que les spores peuvent être détectées en utilisant des méthodes moléculaires (OIE, 2013).

Les résultats de Huang et Solter (2013) ont montré, après 10 jours post-infection, que le nombre de spores par abeille et par jour était, approximativement de 40×10^6 et 80×10^6 spores, pour *N. apis* et *N. ceranae* respectivement. L'accumulation de spores dans l'intestin a connu une tendance plus élevée pour *N. ceranae* que *N. apis* après 12 jours post-infection, avec une différence, globalement, significative (Huang et Solter, 2013). Cet estimation correspond aux observations des infections de l'intestin (Higes *et al.*, 2007).

Selon Chaimanee *et al.* (2013), après 6 jours post-infection, le nombre de spores par abeille après l'inoculation de 100.000 spores était $1,03 \times 10^5$ spores pour *A. mellifera* (prélevée de Canada), $5,72 \times 10^5$ spores/abeille pour *A. mellifera* (prélevée de Thaïlande), $6,44 \times 10^5$ spores/abeille pour *A. dorsata* (prélevée de Thaïlande), $2,53 \times 10^5$ spores/abeille pour *A. cerana* (prélevée de Thaïlande). Aucune spore n'a été détectée pour *A. cerana* et *A. florea* inoculées par *N. ceranae* isolée de Canada.

Concernant l'abeille tellienne *A. m. intermissa*, nous avons observé (fig. 36) que le nombre de spores atteint son maximum le 4^{ième} jour post-infection ($12,3 \times 10^6$ spores). Antúñez *et al.* (2009) ont montré que *N. ceranae* a supprimé l'expression des gènes de peptides antimicrobiens pendant le 7^{ième} jour post-infection. Cependant, l'infection par *N. ceranae* n'a pas affecté l'expression des gènes au 4^{ième} jour post-infection en le comparant avec l'infection par *N. apis*. Egalement, Chahbar *et al.* (2016) suggèrent que l'infection naturelle d'*A. m. intermissa* en Algérie est causée par *N. apis*, dans la majorité des colonies étudiées. Cette étude est menée par l'isolement de *Nosema* sp. à partir des colonies infectées de l'Algérie. En

plus les spores de *N. ceranae* semblent mûrir tardivement dans le processus d'infection que les spores de *N. apis* (Huang et Solter, 2013).

2.3.4. Relation entre le développement de la nosérose et la mortalité

Le développement en nombre de spores chez l'abeille tellienne *A. m. intermissa* est beaucoup plus élevé par rapport à l'abeille saharienne *A. m. sahariensis* (fig. 38). La différence dans les taux de mortalités entre les deux races d'abeille domestique existantes en Algérie, *A. m. intermissa* et *A. m. sahariensis*, ne peut pas s'expliquer pas la différence de sensibilité vis-à-vis la nosérose. Vu que, une différence hautement significative a été trouvée entre la mortalité naturelle des deux races d'abeille (DDL = 1 ; Valeur de F = 20,32 ; p = 0,0003) par l'utilisation de la procédure GLM en utilisant la sélection de Model ANOVA Means LSMeans (test student) du SAS.9 (annexe 6). Les moyennes corrigées de mortalités sont $30,83 \pm 20,54$ et $7,92 \pm 9,40$ pour *A. m. intermissa* et *A. m. sahariensis*, respectivement (annexe 7). Donc les taux de mortalités naturelles chez *A. m. intermissa* sont très élevés par rapport à *A. m. sahariensis*.

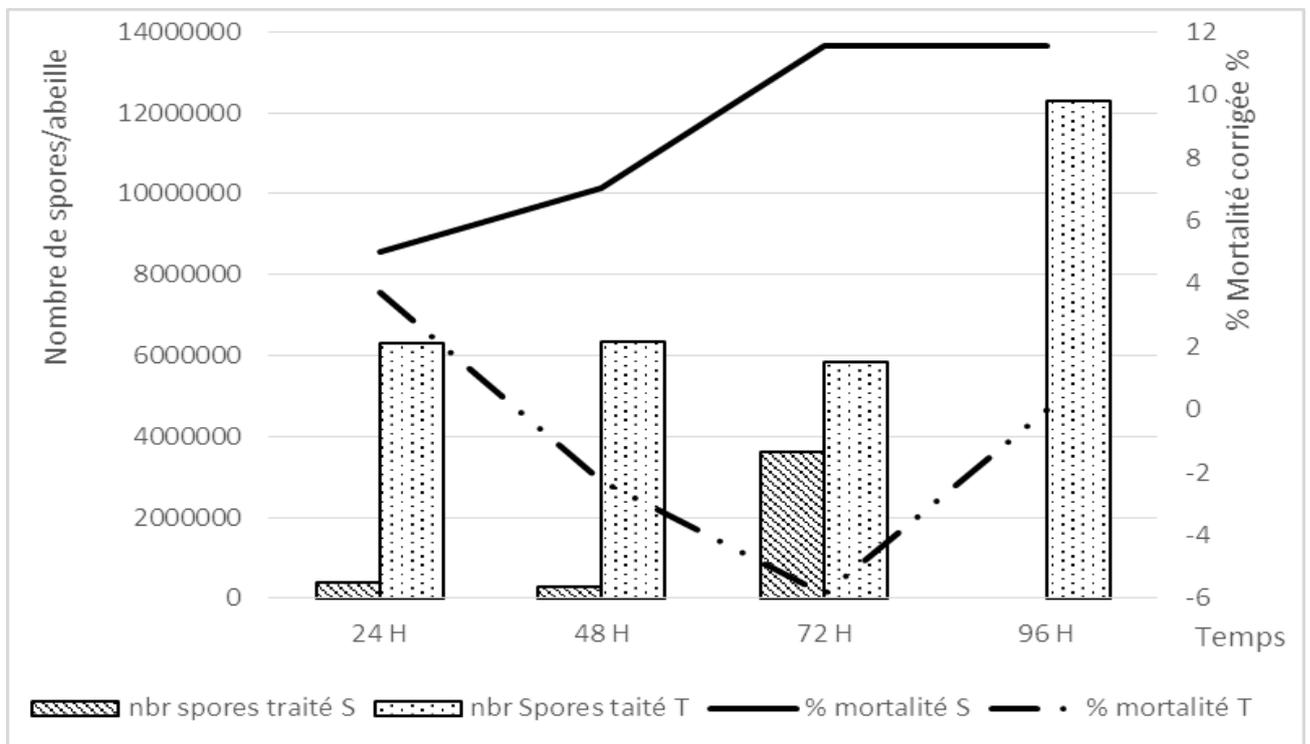


Fig. 38- Graphe comparatif entre les taux de mortalité et le développement de nombre de spores après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. pour *A. m. sahariensis* et *A. m. intermissa*.

Nbr spores traité S : Nombre moyen de spores noté pour *A. m. sahariensis* inoculée par une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. Nbr spores traité T : Nombre moyen de spores noté pour *A. m. intermissa* inoculée par une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. % mortalité S : Taux de mortalité notés pour *A. m. sahariensis* après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. % mortalité T : Taux de mortalité moyenne notés pour *A. m. intermissa* après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp.

Les niveaux de transcription des peptides antimicrobiens, abaecin, apidaecin et hymenoptaecin, sont déterminés après 6 jours post-infection avec deux isolats de *N. ceranae*. À travers les traitements (les doses inoculées), l'expression des trois peptides antimicrobiens dans *A. cerana*, *A. dorsata* et *A. florea* était clairement supérieure à celle d'*A. mellifera*, dans le groupe des témoins et le groupe des abeilles infectées par *N. ceranae* (Chaimanee *et al.*, 2013).

2.3.5. Influence des jours post-infection sur la mortalité

Une mortalité maximale de 3,70 % et 11,54 % était marquée, après le 1^{er} jour post-infection pour *A. m. intermissa* (fig. 36) et le 3^{ème} jour post-infection pour *A. m. sahariensis* (fig. 37). La différence de mortalité est hautement significative entre les jours post-infection pour les deux races, tellienne *A. m. intermissa* (DDL = 3 ; valeur de F = 5,86 ; p = 0,0061) (annexe 8) et saharienne *A. m. sahariensis* (DDL = 3 ; Valeur de F = 10,12 ; p = 0,0005) (annexe 9).

La mortalité causée par l'infection artificielle, par les spores de *Nosema*, a commencé après le 8^{ème} jour post-infection (Retschnig *et al.*, 2014), avec un faible taux de mortalité (moins de 5 %), pour arriver à 20 % le 14^{ème} jour post-infection. En France, une infection expérimentale a donné une mortalité de 10 % et 50 % après 10 et 20 jours post-infection, respectivement (Alaux *et al.*, 2010a ; Vidau *et al.*, 2011). Mais en Espagne, une très forte mortalité (100 %) a été observée, après une courte durée, 8 jours post-infection (Higes *et al.*, 2007). La virulence de *Nosema ceranae* étudiée dans différentes espèces d'abeilles (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata* et *A. florea*) a montré que tous les individus (inoculés, et témoins) des espèces d'abeilles asiatiques, *A. cerana*, *A. dorsata* et *A. florea*, sont mortes dans les 9 jours post-infection sans aucun symptôme de la maladie (Chaimanee *et al.*, 2013). Ceci est en accord avec le phénomène naturel de la prévalence de l'infection par *N. ceranae* qui a été trouvé par Chaimanee *et al.* (2010), avec un taux d'infection plus élevé chez la population d'*A. mellifera*

que chez les trois autres races d'abeille. Contrairement à Huang et Solter (2013), qui ont signalé que *N. ceranae* n'a pas causé de mortalité pour *A. mellifera* qu'après le 9^{ième} jour post-inoculation. D'après certains chercheurs (Rinderer et Sylvester, 1978 ; Bailey et Ball, 1991 ; Malone *et al.*, 1995 ; Higes *et al.*, 2007 ; Paxton *et al.*, 2007), après l'infection initiale, des millions de spores peuvent se reproduire après quelques jours post-infection au niveau des cellules épithéliales, ce qui provoque une mortalité pour l'abeille.

Il est possible que l'induction différentielle des enzymes de désintoxication selon le niveau de métabolite toxique (Suchail *et al.*, 2000) puisse expliquer cette différence de mortalité, ou bien l'immunité des abeilles utilisées dans les expérimentations est différente. Une variation dans les réponses individuelles des larves et des abeilles adultes contre les parasites est observée dans les colonies d'*A. mellifera* (Decanini *et al.*, 2007 ; Wilson-Rich *et al.*, 2009 ; Fontbonne *et al.*, 2013). Elle peut être due à une différente localité de désintoxication et de ressources de la résistance aux maladies (Alaux *et al.*, 2010b ; Pettis *et al.*, 2012). Parce que les enzymes de réduction et les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle vital dans la désintoxication de l'hôte et l'immunité (James et Xu, 2012).

2.3.6. Sensibilité de la race tellienne pour la nosérose

Sur 12 observations, la mortalité chez l'abeille tellienne est de $6,17 \pm 4,11$ pour les individus traités par une dose de 100.000 spores par abeille. Presque le même résultat ($6,08 \pm 3,65$) a été trouvé pour les individus témoins non traités (annexe 8).

Pour la comparaison des moyennes (test de student) entre la mortalité naturelle (témoin) et la mortalité après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. par abeille, la procédure GLM (modèle linéaire généralisé) du SAS.9, avec la sélection du model ANOVA (ods select Model ANOVA Means LSMeans), a été utilisée. Chez l'abeille tellienne *A. m. intermissa*, il n'y avait pas de différence significative entre la mortalité naturelle (les témoins) et la mortalité après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores par abeille (DDL = 1 ; p = 0,9468). De même entre les répétitions (DDL = 2 ; Valeur de F = 1,00 ; p = 0,3872). Mais la différence est hautement significative entre les jours post-infection (DDL = 3 ; valeur de F = 5,86 ; p = 0,0061).

Les mêmes résultats sont notés par certains auteurs, en utilisant des races hybrides améliorées (Buckfast) (Vidau *et al.*, 2011), *A. mellifera* hybrid *ligustica* X *mellifera*

(Alaux *et al.*, 2010a), *A. mellifera* (Forsgren et Fries, 2010). Aussi, *A. florea* a été jugée moins sensible à l'infection par *Nosema* (Chaimanee *et al.*, 2013), dont seulement une des trois cages d'*A. florea* a été infectée et le nombre de spores observées était plus faible ($5,6 \times 10^3$ spores / abeille) que celui d'*A. mellifera*, *A. dorsata* et *A. cerana*.

L'origine génétique des abeilles peut être la clé pour justifier la différence de mortalité causée par l'infection artificielle par la nosérose. L'origine génétique des populations d'abeille domestique a été étudiée récemment par Fontbonne *et al.* (2013), dont ils ont détecté 4 taxons pour les sous-espèces de *A. mellifera* proviennent de 14 pays du monde (fig. 39).

Reference populations for the microsatellite databank used to characterize at individual and population levels the two *A. mellifera* colonies studied for each taxon.

Populations	Number of colonies sampled	Subspecies	Evolutionary branch
Armenia	17	Caucasica	O
Georgia	26	Caucasica	O
Turkey	109	Anatoliaca	O
France	150	Mellifera	M
Belgium	30	Mellifera	M
Portugal	24	Iberica	M
Italie	30	Ligustica	C
Croatia	50	Carnica	C
Slovenia	91	Carnica	C
Greece 1	96	Cecropia	C
Greece 2	55	Macedonica	C
Algeria	154	Intermissa	A
Morocco	38	Major	A
Guinea	22	Adansoni	A

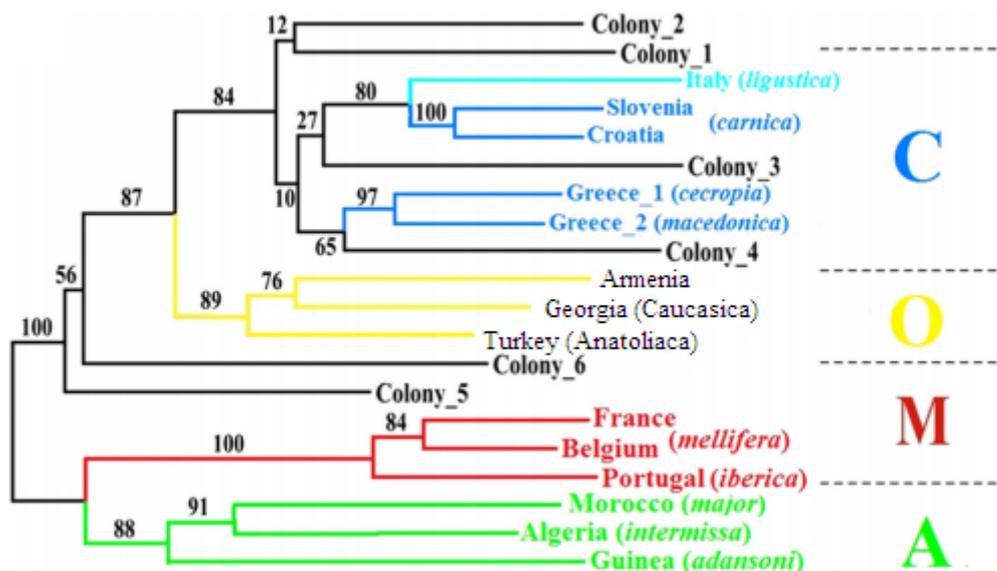


Fig. 39- La caractérisation génétique au niveau des populations d'*A. mellifera* étudiées pour chaque taxon (Fontbonne *et al.*, 2013)

Ces auteurs (Fontbonne *et al.*, 2013) ont montré que les deux abeilles, *A. m. mellifera* et *A. m. ligustica*, réagissent de la même manière à l'infection par *N. apis* dans un même habitat, mais leurs colonies ont montré des sensibilités différentes pour l'infection par *N. apis*, confirmant l'existence d'une variation génétique dans la susceptibilité à travers les colonies quelles que soient les sous-espèces. Également, d'autres études montrent la variation génétique dans la susceptibilité pour l'ascosphérose, la loque américaine et la nosérose non pas au niveau des sous-espèces, mais entre les colonies de la même race d'*A. m. mellifera*, *A. m. carnica* et *A. m. ligustica* situées dans un même habitat (Palmer et Oldroyd, 2003 ; Evans, 2004 ; Jensen *et al.*, 2009; Invernizza *et al.*, 2009a; Vojvodic *et al.*, 2011 ; Chaimanee *et al.*, 2012). En Algérie, une variabilité génétique élevée a été trouvée pour les populations de l'abeille domestique *A. m. intermissa* (Chahbar *et al.*, 2013 ; Loucif-Ayad *et al.*, 2014).

Réellement, la sélection des abeilles caractérisées par un faible taux d'infection par la nosérose (Dussaubat *et al.*, 2013), est le fruit d'une année de sélection achevée en Danemark (Huang *et al.*, 2012). Dans le même contexte, Chahbar *et al.* (2016) ont déclaré que la nosérose ne cause pas le CCD (phénomène d'effondrement des colonies d'abeilles) pour *A. m. intermissa* en Algérie. Cela peut s'expliquer par la résistance et/ou une tolérance de l'abeille tellienne *A. m. intermissa* pour la nosérose. Les mécanismes de défense des abeilles aux pathogènes, comme en général chez les animaux, comprennent deux stratégies principales : la résistance et la tolérance (Svensson et Råberg, 2010 ; Baucom et De Roode, 2011). La résistance s'exprime par la construction de barrières qui empêchent l'infection ou par l'activation de réponses de défense lorsque l'infection a eu lieu, alors que la tolérance vise à compenser le coût énergétique ou le dommage tissulaire provoqués par le pathogène ou par l'activation de la réponse immune de l'hôte (Evans et Spivak, 2010). Chez les insectes, les barrières sont la cuticule et les cellules épithéliales qui dans de nombreux cas évitent l'adhérence et l'entrée des microbes dans le corps. L'invasion par les microorganismes peut être également inhibée par des changements physiologiques de pH ou d'autres conditions chimiques de l'intestin de l'insecte (Evans et Spivak, 2010).

2.3.7. Sensibilité de la race saharienne pour la nosérose

Chez l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*, nous avons trouvé, sur 12 observations, que le taux de mortalité est de $1,58 \pm 1,88$ % pour les individus non traités et de $3,17 \pm 1,85$ % pour les individus traités (annexe 9).

Pour la comparaison des moyennes entre les abeilles inoculées par une dose de 100.000 spores par abeille et les abeilles témoins, nous avons utilisé le même test (test Student) du SAS.9 utilisé auparavant pour l'abeille tellienne.

Chez l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*, la différence est hautement significative entre la mortalité naturelle (les témoins) et la mortalité après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores par abeille (DDL = 1 ; Valeur de F = 10,35 ; p = 0,0051) et entre les jours post-infection (DDL = 3 ; Valeur de F = 10,12 ; p = 0,0005), mais non pas entre les répétitions (DDL = 2 ; Valeur de F = 2,67 ; p = 0,0984). En plus, la moyenne corrigée de mortalité est de 1,68 % et 3,17 % pour les individus témoins et les individus traités, respectivement.

Une infection artificielle chez la sous-espèce *A. m. iberiensis* a montré que cette race est sensible à la nosérose (Dussaubat *et al.*, 2013). Des résultats similaires ont été déclarés par Fries *et al.* (1996) pour *A. ceranae*, par Higes *et al.* (2007) pour *A. m. iberiensis* et par Suwannapong *et al.* (2010) pour *A. florea*. Chaimanee *et al.* (2013) ont trouvé que la virulence de *N. ceranae* dans des cages expérimentales de *A. dorsata* et *A. cerana* était similaire à celle trouvée dans *A. mellifera*. Mais, il faut tenir compte de l'âge des abeilles testées. Selon (Malone *et al.*, 1996), l'âge des abeilles pendant l'infection peut influencer le développement de l'infection. En plus, Dussaubat *et al.* (2013) ont noté que le taux de mortalité est plus élevé pour les abeilles âgées de 5 jours que pour les abeilles les plus jeunes (Alaux *et al.*, 2010a).

Ainsi la sensibilité de certaines races d'abeille pour cette maladie peut être héréditaire. Les résultats des caractérisations génétiques, accompagnées avec des observations des lésions anatomopathologiques au niveau des cellules épithéliales de l'intestin des abeilles, sont différents entre les abeilles infectées par la nosérose et les abeilles saines (Dussaubat *et al.*, 2013). Ces lésions sont des conséquences d'une germination et multiplication des spores de *Nosema* dans les cellules épithéliales. Les lésions identiques ont été observées par Garcia-Palencia *et al.* (2010) pour *A. m. iberiensis*, infectée naturellement.

2.3.8. Influence de la couleur de cuticule sur la résistance aux maladies

D'après cette étude, nous avons trouvé que la race d'abeille locale tellienne *A. m. intermissa* est résistante en comparant avec la saharienne *A. m. sahariensis*. Il est à noter que la race tellienne est caractérisée par une cuticule de couleur noir, contrairement à la race saharienne, elle est de couleur jaune. La couleur du pelage (robe) chez les animaux joue non

seulement un rôle esthétique, mais a également un impact substantiel sur de nombreux facteurs indispensables à la survie. Chez les animaux sauvages, elle facilite le camouflage contre les prédateurs. Certains des gènes, identifiés, de contrôle de la couleur du pelage présentent un effet pléiotrope (Jung *et al.*, 2006 ; Kaplan *et al.*, 2008), affectant également le comportement et les troubles, Souvent de caractère léthal (Kaelin et Barsh, 2013). La couleur du pelage est déterminée au cours de la croissance embryonnaire (Charon et Lipka, 2015). Les mélanines (eumélanine et Phéomélanine) sont synthétisées et stockées dans des mélanosomes, qui sont de grands organites de mélanocytes. Les mélanocytes sont présents non seulement dans la peau, mais aussi dans les oreilles, les yeux, le cerveau, le cœur et le tissu adipeux (Bellone, 2010). Les cellules précurseur des mélanocytes (mélanoblastes), provenant de la crête neurale, migrent dans la peau, dans les follicules, dans les yeux et dans d'autres organes. Si une telle migration est perturbée, certaines zones cutanées n'ont pas de mélanocytes et leur couleur est blanche (Ferreirados Santos Videra et Magina, 2013).

Le gène KIT a été largement étudié, chez les animaux, pour son rôle dans l'état sanitaire des animaux domestiques alors que ses mutations peuvent avoir des effets létaux (Haase *et al.*, 2007, 2009 ; Holl *et al.*, 2010). Le gène KIT Joue un rôle très important dans le contrôle de la différenciation, de la prolifération et de la survie des mélanocytes et des mastocytes, et participe également dans la gamétogenèse, l'hématopoïèse et la différenciation des lymphocytes T (Johansson *et al.*, 2005 ; Haase *et al.*, 2009 ; Fontanesi *et al.*, 2010). L'allèle dominant du gène KIT Code une protéine transmembranaire défectueuse, incapable de transmettre le signal, ce qui perturbe la migration des mélanocytes. L'absence de mélanocytes dans la peau peut se traduire par une couleur blanche (Mau *et al.*, 2004; Holl *et al.*, 2010; Thiruvankadan *et al.*, 2008). Les chiens à taches blanches étendues présentent un risque accru de surdité par rapport aux colorés (Kaelin and Barsh, 2013).

Un aspect important de l'effet pléiotrope des gènes de couleur de pelage est le fait que les animaux affectés par des maladies qui sont conditionnées par des variants de tels gènes, peuvent être des modèles de maladies apicoles qui augmentent la capacité de développer un traitement approprié et faciliter la compréhension du contexte génétique d'une maladie.

2.3.9. Etude de corrélation entre le nombre de spores de *Nosema* et la mortalité chez l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*

D'après la figure 40, il n'y a pas de corrélation significative entre la production en nombre de spores de *Nosema* et la mortalité corrigée chez l'abeille saharienne *A. m. sahariensis* (DDL = 1 ; valeur de F = 0,19 ; P = 0,6716), en utilisant la procédure REGRESSION du SAS 9.

Mortalité corrigée (MC) = $6,18E^7$ X nombre de spores + 7,92.

Le coefficient de régression égale à $6,18E^7$ n'est pas acceptable car $P > 0,05$ (DDL = 1 ; valeur de F = 0,19 ; P = 0,6716) et le coefficient de détermination (R^2) égale à 0,14 ($R^2 = 14\%$). Donc le modèle n'est pas bon, on considère le modèle bon lorsque $R^2 > 50\%$. Selon Dussaubat *et al.* (2013), après 12 jours post-infection, le nombre de spores par abeille peut atteindre 9×10^6 , et des taux de mortalité considérables peuvent commencer.

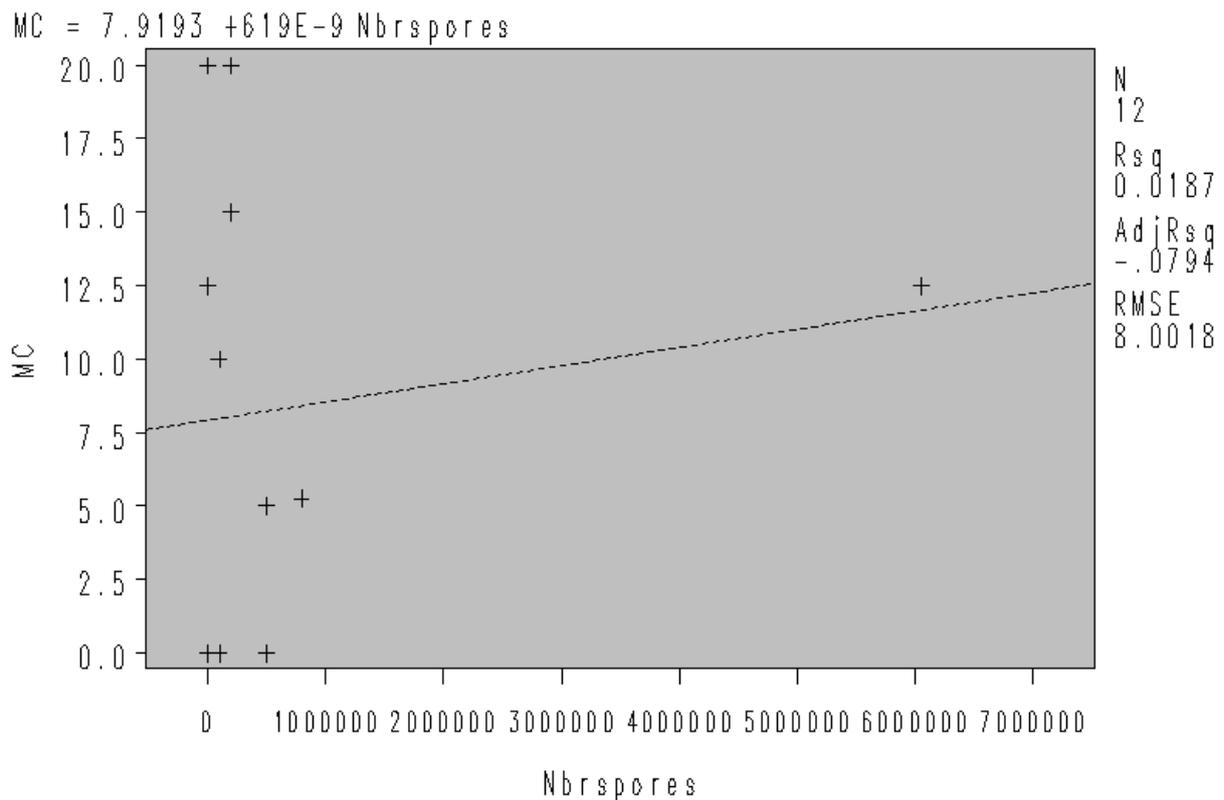


Fig. 40- Absence de corrélation significative entre le nombre de spores de *Nosema* et les taux de mortalité corrigée chez l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*

L'absence de corrélation significative, trouvée par ce test, peut s'expliquer par la virulence de l'espèce de *Nosema* inoculée lors de l'expérimentation. Selon (Fries et Camazine, 2001), la

virulence d'un parasite peut être définie comme le degré auquel l'infection fait diminuer la reproduction et la survie de son hôte. Dans le cas de *N. ceranae*, des études montrent des degrés opposés de virulence chez l'abeille (Carreck, 2012).

Dans le même sens, Chaimanee *et al.* (2013) ont trouvé que *N. ceranae* isolée d'abeille de Thaïlande était plus virulente que *N. ceranae* isolée d'abeille du Canada. Cette différence peut être due à l'évolution de meilleures réponses de *Nosema* aux défenses d'abeilles hôtes ou bien le contraire, l'évolution de système immunitaire de l'abeille contre la nosérose (Werner *et al.*, 2000). Chahbar *et al.* (2016) suggèrent que l'abeille a développé une résistance contre la nosérose, vu que 100 % des apiculteurs en Algérie ne pratiquent aucun traitement contre cette maladie.

Contrairement à Huang et Solter (2013), qui ont trouvé que le nombre de spores, quantifiées dans l'intestin pour les individus morts, est de l'ordre de 5-37 millions ; Alors que les abeilles survivantes, après 14 jours post-infection, ont produit 1-3 millions de spores. Mais le taux de mortalité suggère que les abeilles avec des niveaux d'infection extrêmement élevés n'ont pas survécu (Huang et Solter, 2013). Chaimanee *et al.* (2012) ont noté que les taux des infections élevés ont été observés chez les abeilles inoculées par une dose de 10^5 et 10^6 spores/ μ l. Une autre étude signale qu'une dose de 10^4 spores est considérée comme critique pour infecter 100 % des abeilles (Forsgren and Fries, 2010).

Ces différences ont été observées dans des conditions de laboratoire (Higes *et al.*, 2007 ; Martín-Hernández *et al.*, 2009 ; Alaux *et al.*, 2010a ; Forsgren et Fries, 2010 ; Suwannapong *et al.*, 2010 ; Vidau *et al.*, 2011) tout comme dans des conditions naturelles (Higes *et al.*, 2008a ; VanEngelsdorp *et al.*, 2009 ; Chauzat *et al.*, 2010 ; Borneck *et al.*, 2010 ; Gisder *et al.*, 2010). D'une part la préférence de *N. ceranae* pour les conditions climatiques de certaines régions pourrait expliquer la diversité des résultats (Fenoy *et al.*, 2009 ; Martín-Hernández *et al.*, 2009), d'autre part, des facteurs génétiques du parasite et de l'hôte pourraient aussi être à la base de ces différences (Williams *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2009 ; Genersch, 2010 ; Huang *et al.*, 2012 ; Fontbonne *et al.*, 2013). Des interactions avec d'autres facteurs pourraient également conduire à des différences de mortalité, par exemple, l'interaction de *N. ceranae* avec des pesticides présents dans l'environnement (Alaux *et al.*, 2010a ; Pettis *et al.*, 2012) ou l'interaction entre *N. ceranae* et le paysage qui apporte aux abeilles un régime moins riche en

ressources mellifères qui peut rendre les abeilles plus susceptibles au parasite (Porrini *et al.*, 2011).

2.3.10. Effets des conditions de laboratoires sur la mortalité des abeilles infectées

Dans des conditions de laboratoires, les différents protocoles utilisés rendent difficile l'interprétation des résultats sur la mortalité des abeilles infectées avec *Nosema sp.* Trois facteurs pourraient jouer sur la mortalité, la dose inoculée, l'âge des abeilles utilisées dans l'expérimentation et l'alimentation fournie (Woyciechowski et Moron, 2009 ; Alaux *et al.*, 2010b ; Forsgren et Fries, 2010). La dose de spores pour l'infection dans le cas de Martín-Hernández *et al.* (2011) cause des différences de mortalité. Egalement, Forsgren et Fries (2010) ont observé que des doses plus faibles que 10 000 spores par abeille n'affectent pas la totalité des abeilles (à 14 jours après l'infection). Au contraire Porrini *et al.* (2011) n'ont pas observé d'effet dose. L'âge des abeilles (Malone *et al.*, 1996 ; Woyciechowski et Moron, 2009) et l'alimentation (Alaux *et al.*, 2010b) sont deux facteurs qui peuvent rendre les abeilles plus au moins susceptibles à l'infection. Dans le même sens, Porrini *et al.* (2011) ont démontré que la réponse à l'infection dépend de l'état nutritionnel et physiologique de l'hôte, qui dépend à la fois non pas de la quantité mais de la qualité des nutriments. Contrairement à l'étude de Fontbonne *et al.* (2013), qui a confirmé que les taxons d'*A. mellifera* situés dans un même habitat et expérimentés dans les mêmes conditions environnementales ne diffèrent pas dans leur réponse à une infection par un pathogène. Ainsi, il n'y a pas de différence significative entre la consommation de sirop parmi les individus traités et les témoins (Fontbonne *et al.*, 2013).

2.4. Etude préliminaire des mycoses affectant l'abeille domestique tellienne *Apis mellifera intermissa*

Les résultats obtenus de différentes souches fongiques isolées à partir des abeilles, des larves et de la cire battue par les ouvrières sont discutés. Puis les différentes formes de champignon *Ascospaera apis* et sa croissance mycélienne sont développées. Enfin la prévalence de l'ascosphérose *Ascospaera apis* dans les régions d'étude était étudiée.

2.4.1. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques des différentes souches isolées

Trois souches fongiques sont identifiées à savoir *Ascospaera apis*, *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp. Nous avons détaillé les caractères macroscopiques et microscopiques de ces trois souches isolées.

2.4.1.1. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques d'*Aspergillus niger*

Les caractères macroscopiques et microscopiques de champignon *Aspergillus niger* sont détaillés et discutés dans cette partie.

2.4.1.1.1. Etude macroscopique d'*Aspergillus niger*

Après la purification d'*Aspergillus niger* sur un milieu spécifique dans des boîtes de Pétri, les colonies apparaissent sous formes granuleuses, de couleur blanche puis jaune. Ensuite elles deviennent noirâtres avec une pigmentation jaune pâle au verso de la boîte de Pétri (Fig. 41). Les sclérotés sont parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé (fig. 41). Selon Alonso *et al.* (1993) et Palacio *et al.* (2007), le développement de pigment jaune-brun, l'exsudat, la laine huileuse et l'effondrement du mycélium sont des indicateurs du vieillissement.

2.4.1.1.2. Etude microscopique d'*Aspergillus niger*

L'étude microscopique nous a révélé que les têtes conidiennes sont bisériées, radiées et disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles. Les phialides (7-10 x 3-3,5 µm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses,

parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5-5 μm de diamètre. Aussi elles sont brunes, échinulées à très verruqueuses (Fig. 42).

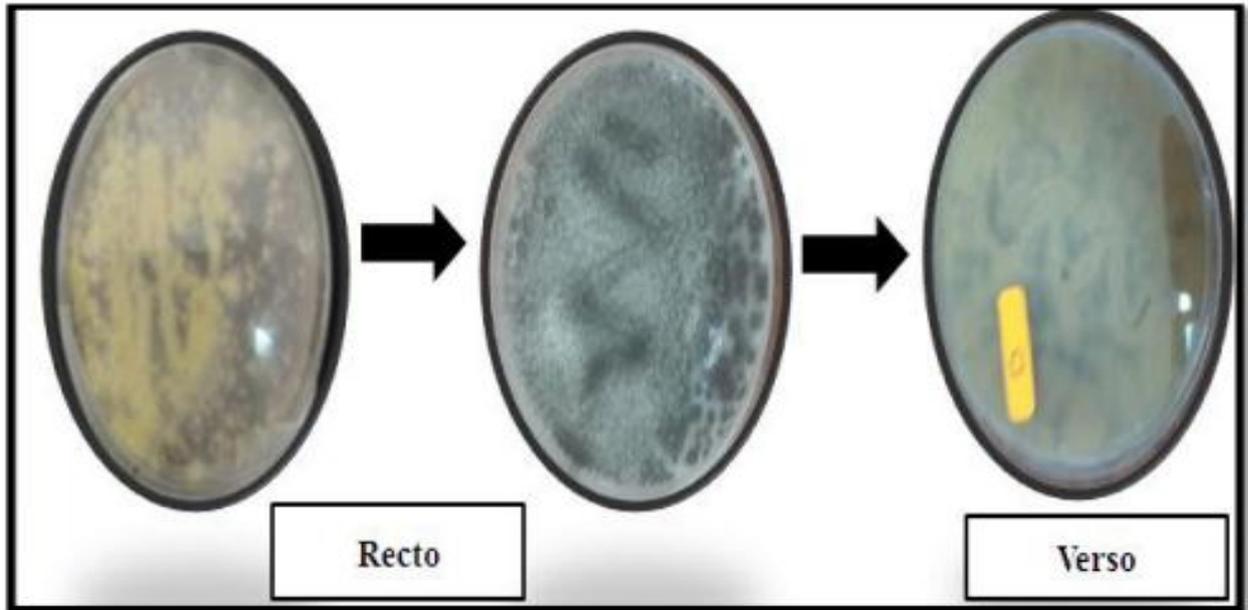


Fig. 41- Aspect macroscopique d'*Aspergillus niger* (Originale).

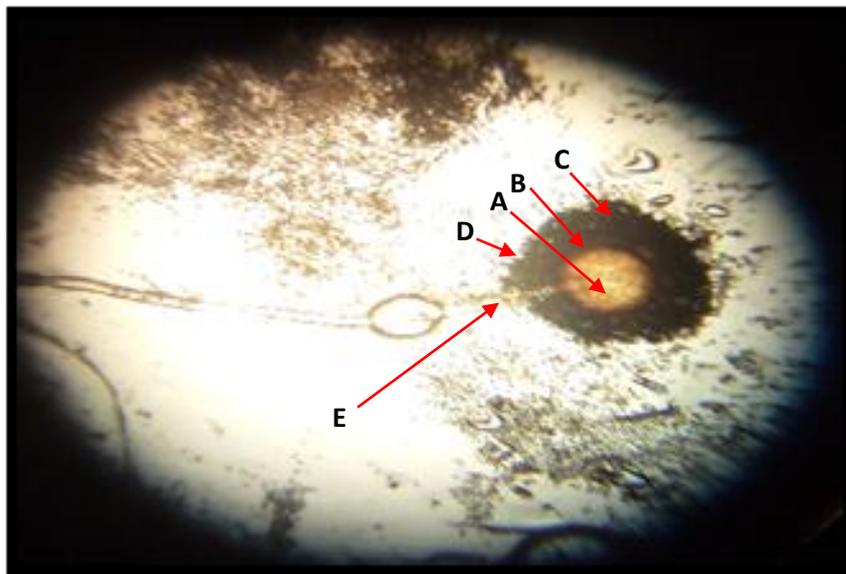


Fig. 42- Aspect microscopique d'*Aspergillus niger* (Gr X 400). A : Vésicule ; B : Métule ; C : Phialide ; D : Conodie ; E : Conidiophore (Originale)

2.4.1.2. Aspect macroscopique et microscopique de genre *Penicillium*

Les colonies sont duveteuses de couleur blanchâtre au début, ensuite elles deviennent bleu vert (fig. 43A). Concernant l'aspect microscopique, le mycélium est de type cloisonné portant de nombreux conidiophores isolés et ramifiés. Ces conidiophores se terminent par un pénicille. Le pénicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiospores (fig. 43B).

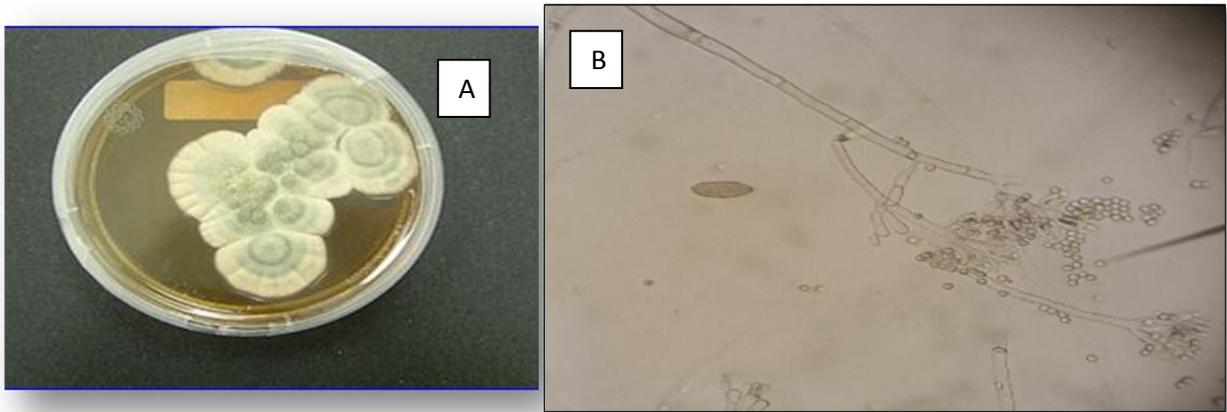


Fig. 43- Aspect macroscopique (A) et microscopique (B, Gr x 400) de genre *Penicillium*
(Originale)

2.4.1.3. Etude des caractères macroscopiques et microscopique d'*Ascospaera apis*

Cette partie d'étude porte sur les caractères macroscopiques et microscopiques d'*Ascospaera apis*. Les résultats obtenus sont développés et commentés.

2.4.1.3.1. Aspect macroscopique d'*Ascospaera apis*

Les colonies sont blanches et dense, leurs diamètres varient entre 5cm et 8 cm. Après 8 jours de germination, le mycélium était blanc et aérien (fig. 44A). Elles deviendront noires lors de la formation des kystes (fig. 44B).

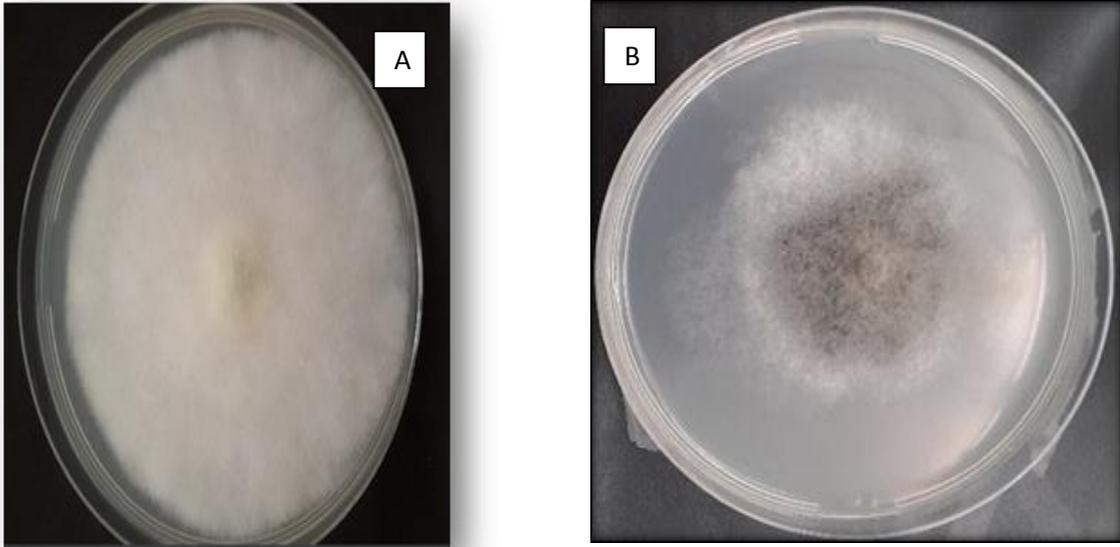


Fig. 44- Aspect macroscopique d'*Ascospaera apis* ; A : Les colonies d'*Ascospaera apis* sont blanches ; B : aspect macroscopique d'*Ascospaera apis* après la formation des kystes (Originale).

2.4.1.3.2. Aspect microscopique d'*Ascospaera apis*

Les hyphes sont cloisonnés, leurs diamètres oscillèrent entre 2,5 μm et 8 μm , présentant des ramifications dichotomiques prononcées. Pour sa reproduction sexuée, *A. apis* nécessite deux genres de mycéliums. Ces mycéliums sont morphologiquement semblables et physiologiquement différents, possédant des polarités opposées, l'une de signe positif « + » et l'autre de signe négatif « - ». C'est ce qu'on appelle un champignon hétérothallique avec deux types sexuels, positif « + » et négatif « - » (Hemmerlé, 2015). Quand les deux souches sont cultivées à proximité la formation de fructifications se produit. Les fructifications sont des kystes de spores sphériques (Sporocytes ou ascoma) présentant un diamètre varie entre 47 μm et 140 μm . L'ascoma contient de nombreuses balles de spores (Asques), son diamètre varie entre 9 μm et 19 μm , produisant des spores hyalines (ascospores) dont leurs dimensions sont à l'ordre de 2.7 – 3.5 μm x 1.4 – 1.8 μm , longueur maximale et largeur maximale respectivement (fig. 45). Des résultats similaires sont trouvés par Reynaldi *et al.* (2015), dont les kystes de spores (sporocystes) et les spores présentent des diamètres moyens de 60 μm et 10 μm , respectivement. Selon Hemmerlé (2015), les sporocystes, les corps de fructification, sont des globules de 80 μm de diamètre en moyenne, ils sont de couleur vert foncé, brun foncé ou noirs. Le diamètre des asques mesure grosso

modo entre 10 et 20 μm . Les ascospores ressemblent à des grains de riz plus ou moins incurvés, qui mesurent environ 3 μm en longueur (Hemmerlé, 2015).

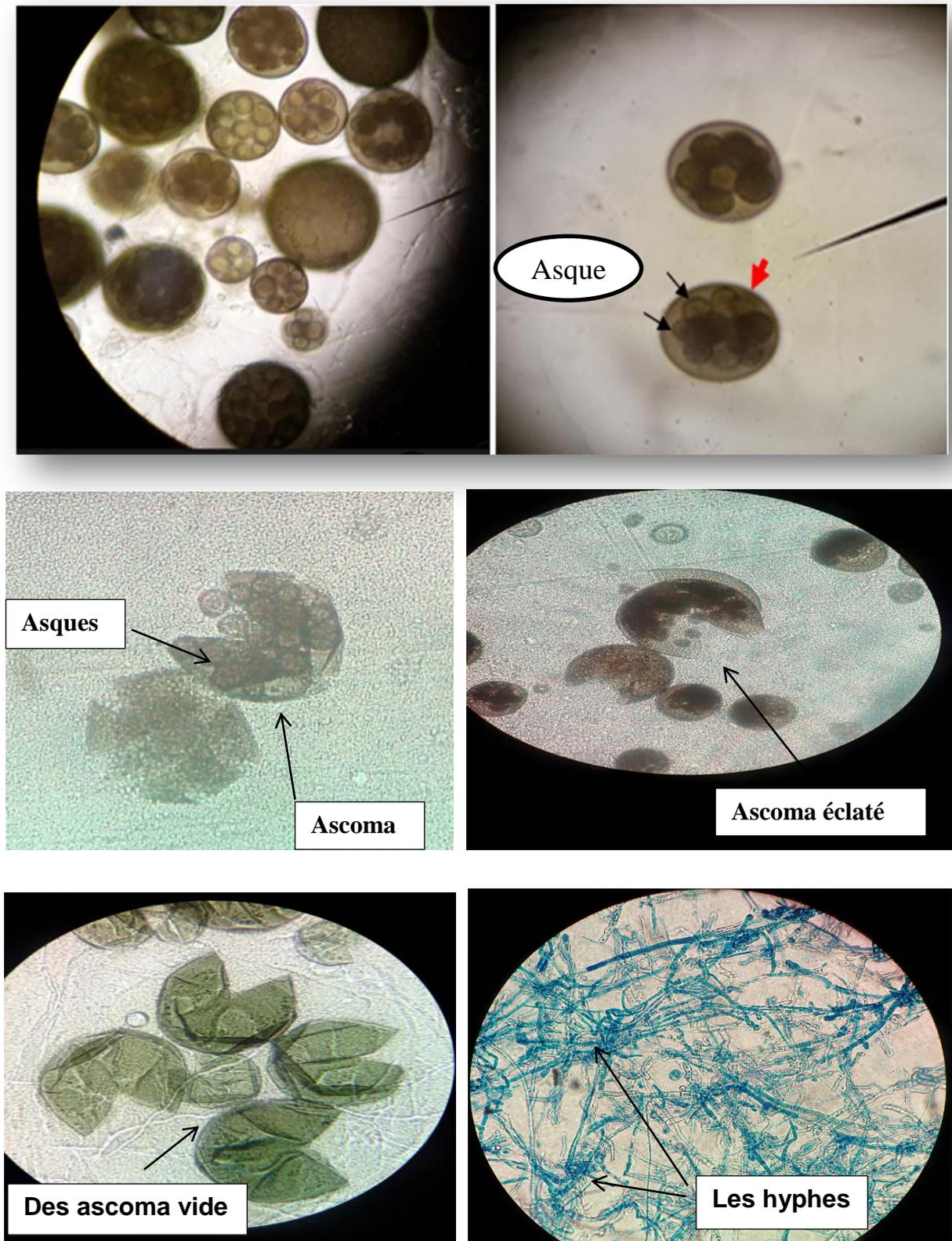


Fig. 45- Aspect microscopique d'*Ascospaera apis* (Gr X 400)

(Originale)

2.4.2. Relation entre symptômes d'infections fongiques et souches fongiques isolées

D'après le tableau 14, *Peinicillum* sp. est détectée dans la cire battue présentant des signes cliniques des infections fongiques (100 %), et dans les abeilles adultes mortes issues des colonies détruites (100 %). Mais cette souche fongique n'a pas été trouvée dans des abeilles vivantes ni dans des larves. Donc, d'après ces résultats, cette souche *Peinicillum* sp ne peut pas être considérée comme une espèce infectant l'abeille domestique en Algérie, mais plutôt elle s'installe après le déclin de la colonie d'abeille ou bien sur la cire battue quittée par les ouvrières (Annexe 10). Contrairement à *Ascospaera apis* et *Aspergillus niger*, Ces deux souches sont isolées à partir des larves, des abeilles vivantes échantillonnées à l'intérieure des colonies et des larves momifiées devant les entrées des ruches (tableau 14).

Toutes les larves momifiées (100 %) sont porteuses de l'ascosphérose *Ascospaera apis* sans aucune exception. Ces larves momifiées sont douteuses pour *Aspergillus niger* (40 %). Ainsi, les larves de couvain désoperculé (ou opercules déchirés) par les nettoyeuses (fig. 46) sont douteuses pour l'ascosphérose *Ascospaera apis* (66,66 %). Quand ces larves (désoperculé par les nettoyeuses) présentent une couleur noirâtre, l'ascosphérose est détectée à 100 %. Mais l'aspergillose *Aspergillus niger* n'a pas été détecté dans des larves de couvain désoperculé.

Des résultats similaires sont obtenus par Fluri *et al.* (1998), ces auteurs ont étudié les signes typiques de certaines maladies apicoles. L'ascosphérose se traduit par l'un des symptômes qui se suivent (Fluri *et al.*, 1998).

- Les larves momifiées sur le fond de la ruche ou tôt le matin devant le trou d'envol, il s'agit des larves d'abeilles mortes et desséchées, recouvertes d'un mycélium blanchâtre, rarement gris noir ;
- Larves isolées recouvertes d'un mycélium formant un feutrage blanc ;
- Larves ou prépupes mortes envahies de champignons à l'aspect cotonneux et de couleur blanche ;
- Les momies se dessèchent et prennent l'apparence de morceaux de craie ou de calcaire.

Selon Fluri *et al.*, (1998) et Fernandez et Coineau (2007), les momies présentent une couleur blanchâtre, celle du mycélium du champignon. D'autres momies sont gris noirâtre, en raison de la présence d'une grande quantité de corps fructifère.

La présence des opercules déchirés est un symptôme assez typique pour l'ascosphérose (Fluri *et al.*, 1998) (Fig. 46). Nos résultats sont contradictoires avec ceux notés par (Spivak et Gilliam, 1993, 1998 ; Invernizzi, 2001 ; Flores *et al.*, 2005). Ces auteurs ont signalé que l'ascosphérose se présente par des larves momifiées d'une couleur noir ou blanche. L'aspergillose se manifeste de façon identique à celle de l'ascosphérose à la différence que les larves momifiées collent fortement aux parois des cellules et ne peuvent être évacuées par les abeilles (Fluri *et al.*, 1998).

Dans cette étude, *A. apis* a été détectée chez des abeilles adultes dans la station de Ouled-Fayet à Alger. Il n'est jamais rapporté qu'une abeille adulte, ou tout autre insecte adulte d'ailleurs, est infecté par *Ascospaera apis* (Hemmerlé, 2015). Pourtant, une récente publication révèle la présence d'ascospores et de la forme végétative (mycélium) du champignon chez des bourdons adultes élevés en captivité (Maxfield-Taylor *et al.*, 2015).

Tableau 14- Les signes cliniques des infections fongiques en relation avec les souches fongiques isolées

Localité	Nombre total de colonies	Nombre et pourcentage de colonies échantillonnées présentant des signes cliniques	Partie échantillonnée	Signes cliniques	Colonies infectées par <i>Ascospaera apis</i>	Colonies infectées par <i>aspergillus niger</i>	Nombre de colonies infectées par <i>Peinicillum</i> sp.
Alger (Bouchaoui)	11	8 colonies / 72,72 %	Cire battue	Jaunâtre et verdâtre issue de l'infection par les mycoses sur la cire battue	/	/	8 colonies / 100 %
Alger (Ouled-fayet)	42	7 colonies / 16,66 %	Abeilles adultes et larves momifiées	Larves momifiées devant l'entrée de la ruche + couvain désoperculé par les nettoyeuses	7 colonies / 100 %	/	/
Blida (Boufarik)	48	3 colonies / 6,25 %	Larves	Larves momifiées devant l'entrée de la ruche	3 colonies / 100 %	/	/

2.4.3. Prévalence des signes cliniques de l'infection fongique dans les régions d'étude

Le rucher situé dans la station de Bouchaoui (Alger) représente le taux des signes cliniques des infections fongiques le plus élevé (72,72 %) (fig. 48). Cette valeur relativement élevée peut être justifiée par l'environnement d'installation du rucher. Le rucher de cette station (Bouchaoui-Alger) est localisé entre deux lignes de brise vent (annexe 12), un milieu mal ensoleillé, qui peut être considéré comme étant un facteur favorisant la création d'un microclimat caractérisé par un taux d'humidité relative élevé (Flores *et al.*, 1996). Cet endroit favorise le développement des mycoses (champignons) qui se traduit par l'apparition des symptômes d'anomalie. Mais la souche fongique dominante dans cette station était *Peinicillum* sp. (72,72 %) (Tableau 14). Le rucher situé dans la station de Bousaada (Msila) représente un taux de 40 %. Les taux les plus faibles sont notés pour les stations de Larbaa (Blida), d'Ouled-fayet (Alger), de Khemis-khachena (Boumerdes) et de Boufarik (Blida), avec des taux respectivement de 25,92 %, 16,66 %, 8,33 % et 6,25 % (Tableau 14).

La seule espèce présente dans les stations d'Ouled-fayet (Alger), Boufarik (Blida) et Bousaada (Msila) était *Ascospaera apis*. Les deux agents pathogènes, *Ascospaera apis* et *Aspergillus niger* sont détectés dans la station de Khemis-khachena (Boumerdes). Alors que, dans la station de Larbaa (Blida), les trois espèces, *Ascospaera apis*, *Aspergillus niger* et *Peinicillum* sp., étaient présentes dans les différents prélèvements de la ruches (tableau 14 et fig. 48).

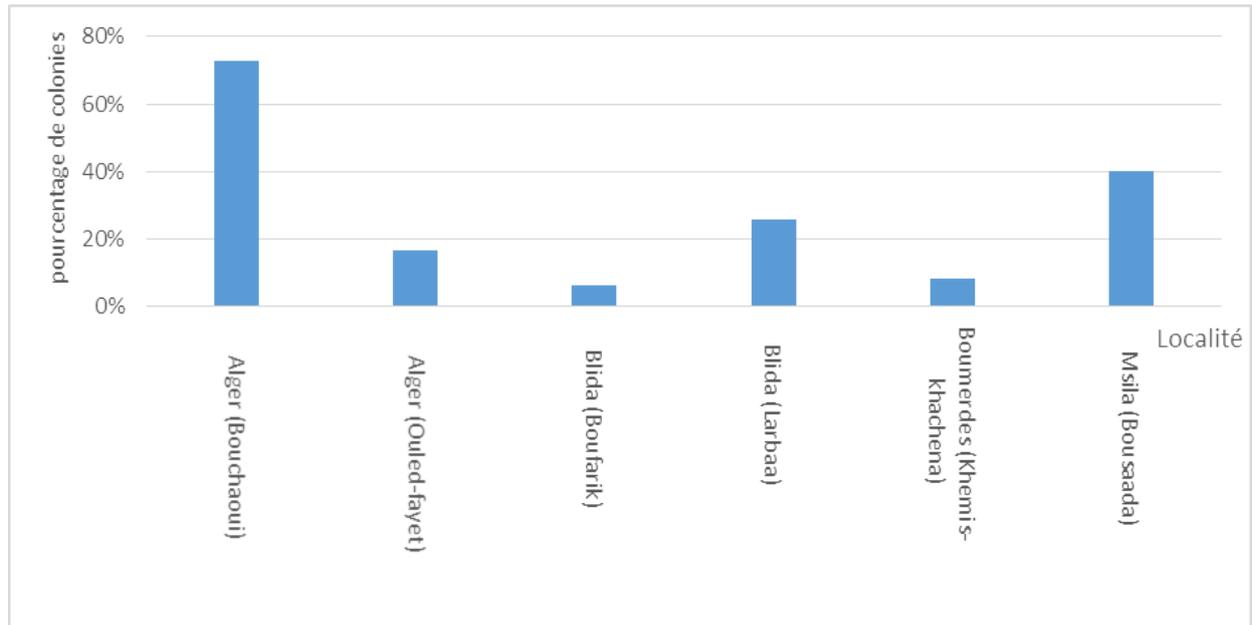


Fig. 48- pourcentage de colonies échantillonnées présentant des signes cliniques des infections fongiques

2.4.4. Souches fongiques affectant l'abeille domestique *A. mellifera*

D'après cette étude, en basant sur la relation entre les symptômes d'infection fongique et les souches fongiques isolées (tableau 14), nous pouvons conclure que seulement les deux souches fongiques *Ascospaera apis* et *Aspergillus niger*, parmi les trois souches détectées, peuvent être considérées comme étant des espèces infectants l'abeille domestique *A. mellifera*. Selon Jensen *et al.* (2013), l'ascosphérose et l'aspergillose (ou couvain pétrifié) sont deux maladies fongiques associées au couvain d'abeilles. L'ascosphérose est causée par *Ascospaera apis* (Aronstein et Murray, 2010), et est une maladie généralisée qui peut entraîner une réduction sévère des abeilles naissantes et donc la productivité globale des colonies. L'aspergillose est causée par *Aspergillus* sp. qui est rarement observée (Jensen *et al.*, 2013).

Ainsi, la présence des mycoses microscopiques peut causer des contaminations mycotoxines (Kocube *et al.*, 2013), représentant un risque parfois fatal pour la santé des animaux et de l'homme (Rocha *et al.*, 2004 ; Sheikh-Ali *et al.*, 2014 ; Prakash *et al.*, 2015 ; Bozik *et al.*, 2016 ; Otoni *et al.*, 2016 ; Nidhina *et al.*, 2017). Cette infection fongique peut se présenter dans les colonies après la récolte de pollens et/ou la collecte de nectars par les butineuses à partir des plants infectés. Plusieurs espèces fongiques peuvent contaminer les végétaux, en

particulier du genre *Aspergillus* (Medina et Magan, 2011 ; Pitt *et al.*, 2013), qui sont caractérisées par une très forte production de mycotoxines (Bennett et Klich, 2003 ; Sheikh-Ali *et al.*, 2014). Ainsi, *Aspergillus niger* est détectée également dans le sol (Song *et al.*, 2016), un autre facteur favorisant la propagation de la maladie. En parallèle, certains plants sont résistants contre *Aspergillus* sp. (Manoza *et al.*, 2017).

2.4.5. Etude de l'ascosphérose *Ascosphaera apis*

2.4.5.1. Distribution spatiale de l'ascosphérose

D'après le tableau 14, *A apis* est détectée dans toutes les régions d'étude, à savoir Alger, Blida, Boumerdes et M'sila. Mais en Algérie, aucune étude n'est menée pour étudier la prévalence des maladies fongiques affectant *A. mellifera*. Selon une étude basée sur les symptômes rapportés par les apiculteurs lors d'une enquête menée en 2011 par Adjlane *et al.* (2012a), aucun des symptômes typiques de l'ascosphérose n'était déclaré en Algérie. *A. apis*, le champignon responsable de l'ascosphérose, est réputé parasiter uniquement les larves de l'abeille européenne *Apis mellifera*, de l'abeille asiatique *Apis cerana* (Jensen *et al.*, 2013), d'une abeille charpentière *Xylocopa californica* et les larves de l'abeille charpentière *Xylocopa augusti* (Reynaldi *et al.*, 2015). L'ascosphérose est distribué dans le monde entier (Simone-Finstrom et Spivak, 2013 ; Jensen *et al.*, 2013 ; Wilson *et al.*, 2015). En Argentine, la maladie a été détectée pour la première fois en 1978 par Rossi et Carranza (1980). Au début, les symptômes sont observés principalement au printemps et les colonies ont pu guérir sans aucun traitement dès que l'été progressait (Albo *et al.*, 1994). Depuis 1988, L'incidence de l'ascosphérose a augmenté et il est noté plus fréquemment dans les ruchers (Flores *et al.*, 1999 ; Aronstein et Murray, 2010 ; Simone-Finstrom et Spivak, 2013 ; Wilson *et al.*, 2015 ; Hemmerlé, 2015). La maladie ne conduit pas, normalement, à des pertes de colonies, mais elle affaiblit les colonies et entraîne une diminution de la production de miel (Palacio *et al.*, 2007). Les efforts visant à contrôler cette maladie avec des produits chimiques n'ont pas été couronnés de succès et parfois les traitements ont des effets secondaires négatifs sur le couvain, les abeilles adultes et le miel (Gilliam et Vandenberg, 1990 ; Flores *et al.*, 2001). L'inspection périodique des colonies et la désinfection des équipements de la ruche, Comme il est recommandé pour le contrôle de la loque américaine, permettent la détection précoce de la maladie et l'élimination des spores d'*A. apis* (Palacio *et al.*, 2007).

2.4.5.2. Etude de différentes formes de champignon *Ascosphaera apis*

Cette souche fongique est caractérisée par deux formes distinctes, la forme de résistance et la forme végétative. La forme de résistance d'*Ascosphaera apis* est les kystes des spores sphériques, mesurant entre 47 μm et 140 μm de diamètre (fig. 49). Ces kystes contiennent de nombreuses balles des spores, mesurant entre 15 μm et 32 μm , composés par des spores hyalines (fig. 50). *Ascosphaera apis* est un champignon filamenteux. Les hyphes (la forme végétative) sont cloisonnés, 2,5-8 μm de diamètre, avec des ramifications dichotomiques prononcées (fig. 51).



Fig. 49- Aspect microscopique des kystes d'*Ascosphaera apis* (Gr X 400) (Originale).



Fig. 50- Aspect microscopique des balles de spores d'*Ascosphaera apis* (Gr X 400) (Originale).

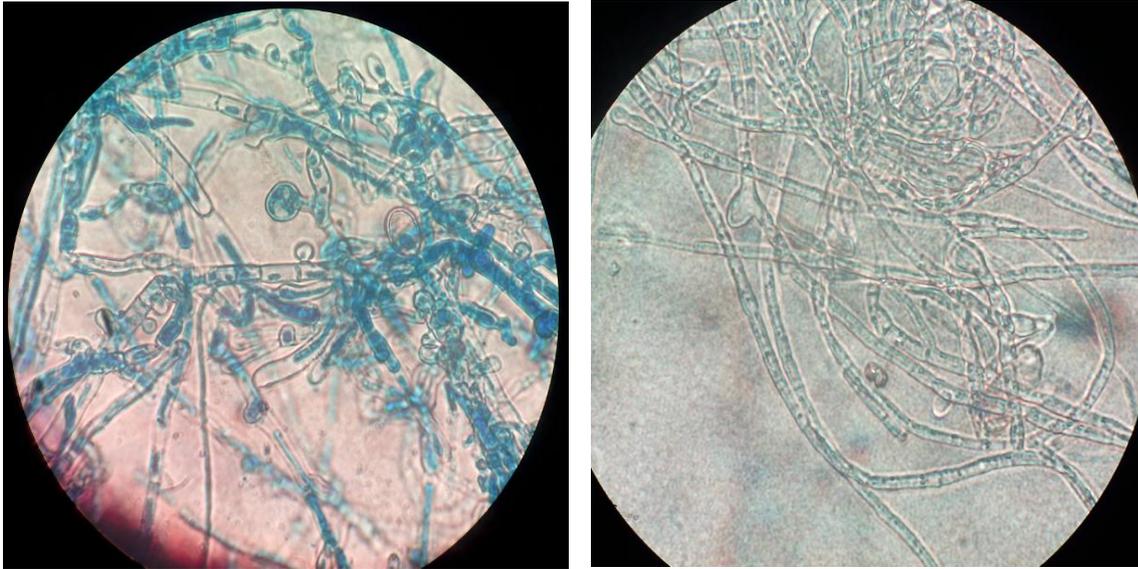


Fig. 51- Aspect microscopique de mycélium d'*Ascosphaera apis*, (Gr X 400) (Originale).

2.4.5.3. Etapes de formation des spores d'*Ascosphaera apis*

Après la fécondation entre un hyphe femelle et un hyphe mâle, nous assistons à la formation d'un primordium d'ascogone (A). Le nutriocyte commence à se gonfler (B). Ceci constitue un hyphe ascogonale primaire qui occupe tout le volume interne du nutriocyte dilaté (C), l'ensemble correspondant à l'ascoma (D). Ensuite de jeunes asques se constituent à l'intérieur de l'ascoma (E) qui ont ensuite éclaté pour libérer les spores (F) (Fig. 52).

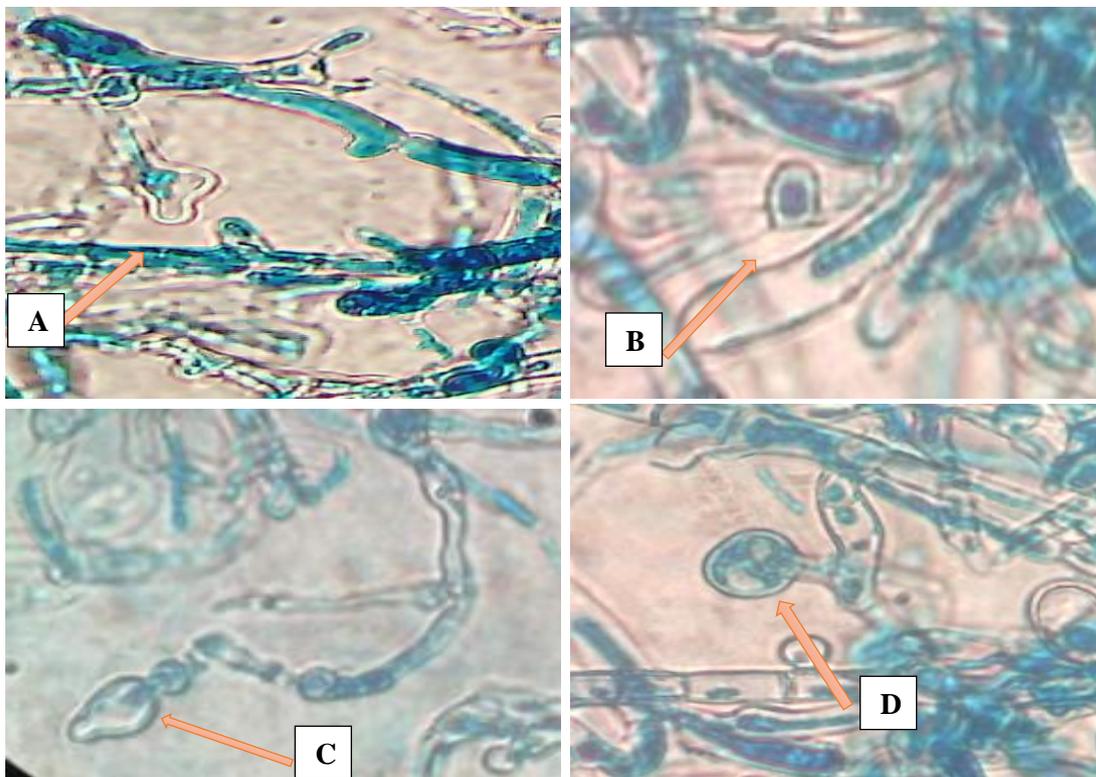


Fig. 52- Les étapes de formation des spores d'*Ascosphaera apis* (Originale)

La production de kystes de spores a été enregistrée après 15 jours poste-infection (Palacio *et al.*, 2007). Après cette formation (spores), des larves momifiées de couleur noir ont été observées (Palacio *et al.*, 2007).

2.4.5.4. Croissance mycélienne de champignon *Ascosphaera apis*

L'étude de la croissance mycélienne est menée à partir de trois isolats d'*A. apis*, isolés dans la région de Msila. Cette étude révèle que la durée de germination de champignon est entre 5 et 8 jours dont la température optimale est de 20°C à 30°C (fig. 53). La figure 53 résume les résultats de la croissance mycélienne obtenue pour les trois isolats.

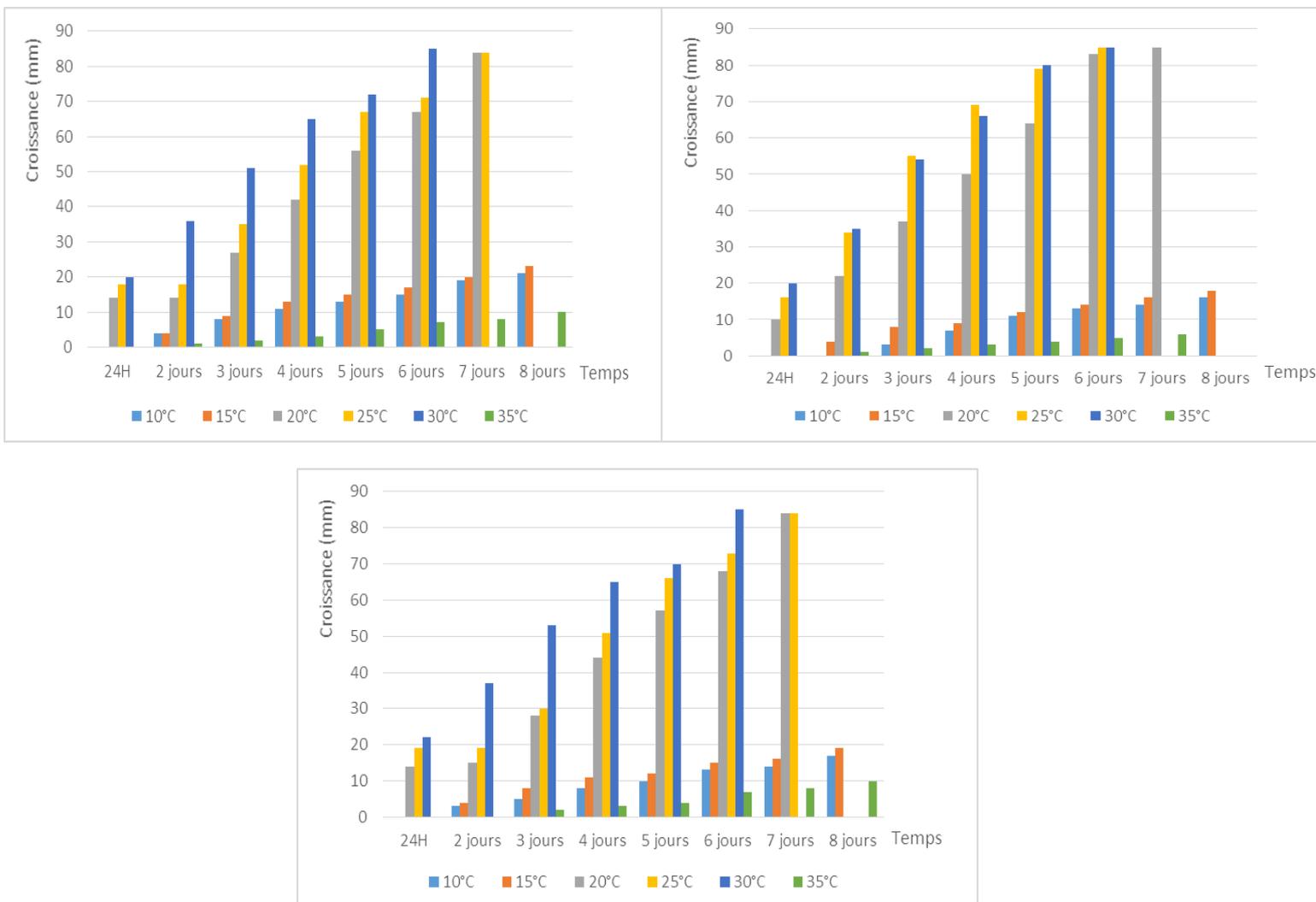


Fig. 53- Les histogrammes qui représentent la croissance mycélienne par rapport à la température pour les trois isolats d'*A. apis*

La croissance mycélienne, après 8 jours de germination, aux températures 10°C, 15°C et 35°C est faible (inférieur à 20 mm). Pour les températures 20°C, 25°C et 30°C, la croissance mycélienne est maximale (atteindre jusqu'à 84 mm) après environ 6 jours de germination (fig. 54). De ce fait, la croissance mycélienne optimale pour le champignon *Ascospaera apis* est située dans l'intervalle de température de 20°C à 30°C. Les caractéristiques des champignons consistaient en des caractéristiques coloniales telles que la taille, l'aspect superficiel, la texture et la couleur des colonies. De plus, le mycélium végétatif exposé à la microscopie, y compris la présence ou l'absence de parois croisées, le diamètre mycélien et les types structuraux de la reproduction sexuée et asexuée (Pornpukdeewattana *et al.*, 2017). Selon Aronstein et Holloway (2013), sur une culture spécifique, le champignon *A. apis* peut se développer dans des conditions de températures différentes, oscillèrent entre 25°C et 35°C avec une température optimale varie entre 30°C et 33°C. D'après une autre étude, les cultures d'*A. apis* destinées pour l'inoculation, dans l'abeille domestique, sont incubées dans des conditions sombres et aérobies à 30°C ± 2°C pendant 15 jours. Elles sont Stockées à 19 ± 4°C jusqu'à leurs utilisations (Palacio *et al.*, 2007). La croissance et la présence des contaminants issues des propagations sont enregistrées après 5 jours poste-infection des cultures (Palacio *et al.*, 2007). Les signes de l'infection par les colonies d'*A. apis* apparaissent après 30 jours post-infection (Ruffinengo *et al.*, 2000). Les colonies d'*A. apis* cultivées sur le riz intégral (ou brun) n'ont pas présenté de signes de vieillissement après 60 jours d'incubation (Ruffinengo *et al.*, 2000)

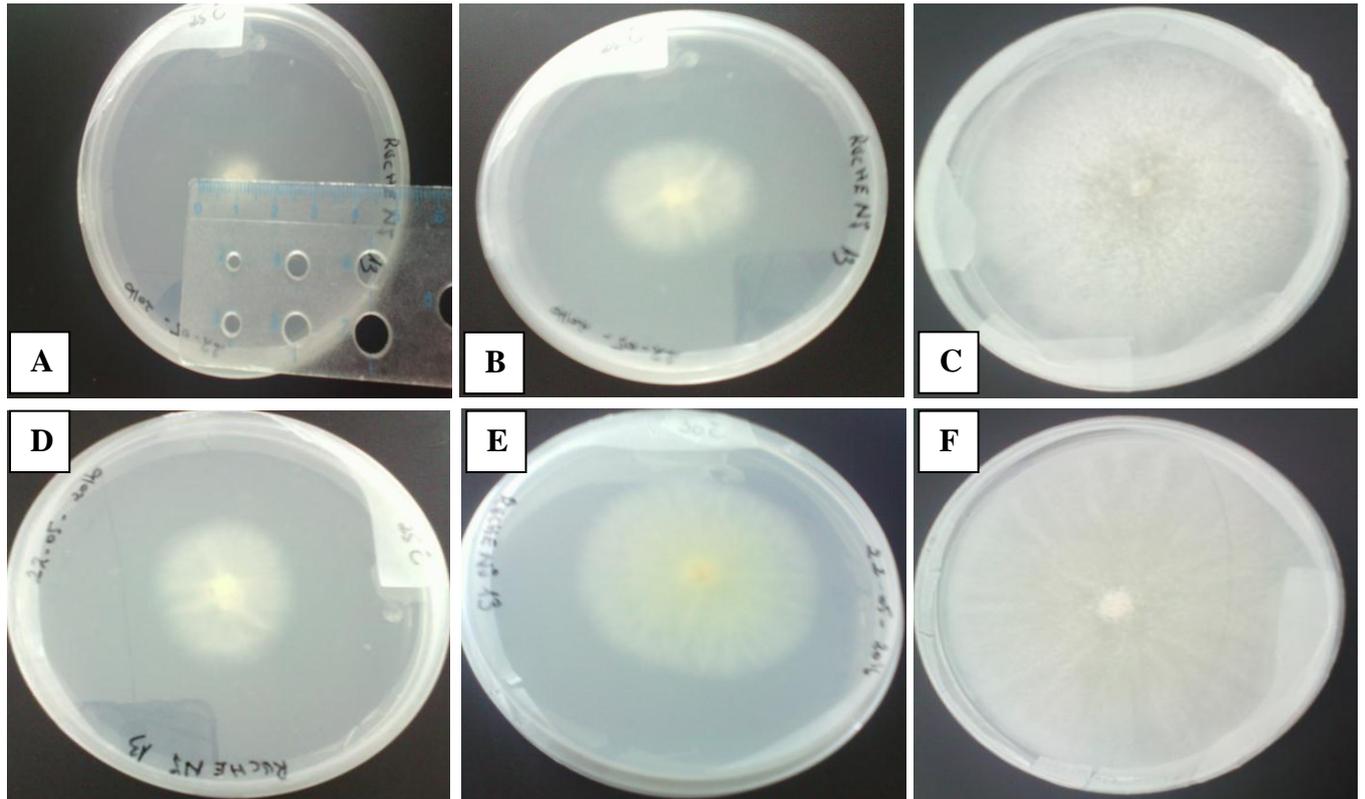


Fig. 54- Les étapes de croissance mycélienne dans une température optimale (25°C à 30°C), mésusée chaque 24 heures. A, B et C : la croissance mycélienne d'*A. apis* dans une température de 25°C ; D, E et F : la croissance mycélienne d'*A. apis* dans une température de 30°C (Originale)

2.4.5.5. Prévalence de l'ascosphérose dans les régions d'étude

La prévalence de l'infection des colonies par l'ascosphérose est étudiée en basant sur des signes cliniques, et est confirmée, ultérieurement, au laboratoire. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 55. D'après cette figure (fig. 55), le rucher le plus infecté par l'ascosphérose est situé dans la région de Msila (Bousaada) 30 %, suivi par le rucher situé à Alger (Ouled-fayet) 16,66 %, puis les ruchers de Blida (Larbaa) et Blida (Boufarik) avec des taux, respectivement, de 11,11 % et 6,25 %. L'ascosphérose n'est pas détectée dans le rucher d'Alger (Bouchaoui) 0 %. Selon les déclarations de l'apiculteur responsable du rucher de Msila (Bousaada) 30 %, ce rucher s'est déplacé de la région d'Alger (Transhumance). Donc en réalité, cette étude a été menée dans la région septentrionale d'Algérie à savoir Alger, Blida et Boumerdes. La différence de température peut être compensée par les ouvrières à l'intérieure des colonies. La germination des spores d'*A. apis* est indépendante de la température dans l'intervalle de 15°C à 40°C, avec une température optimale de 31-35°C (Liang *et al.*, 2000). L'abeille *A. mellifera* contrôle la température du couvain 33-36°C avec

une température de $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pour la zone centrale du couvain pendant la nymphose (Liang *et al.*, 2000). Les changements de température induits par l'environnement au sein de la ruche sont compensés par les ouvrières, en produisant individuellement de chaleur endothermique (Groh *et al.*, 2004). En outre, Liang *et al.* (2000) ont montré que la température optimale pour la croissance de *A. apis* est de 30°C , de sorte que le champignon est hautement spécialisé agent pathogène à vivre dans les larves d'abeilles.

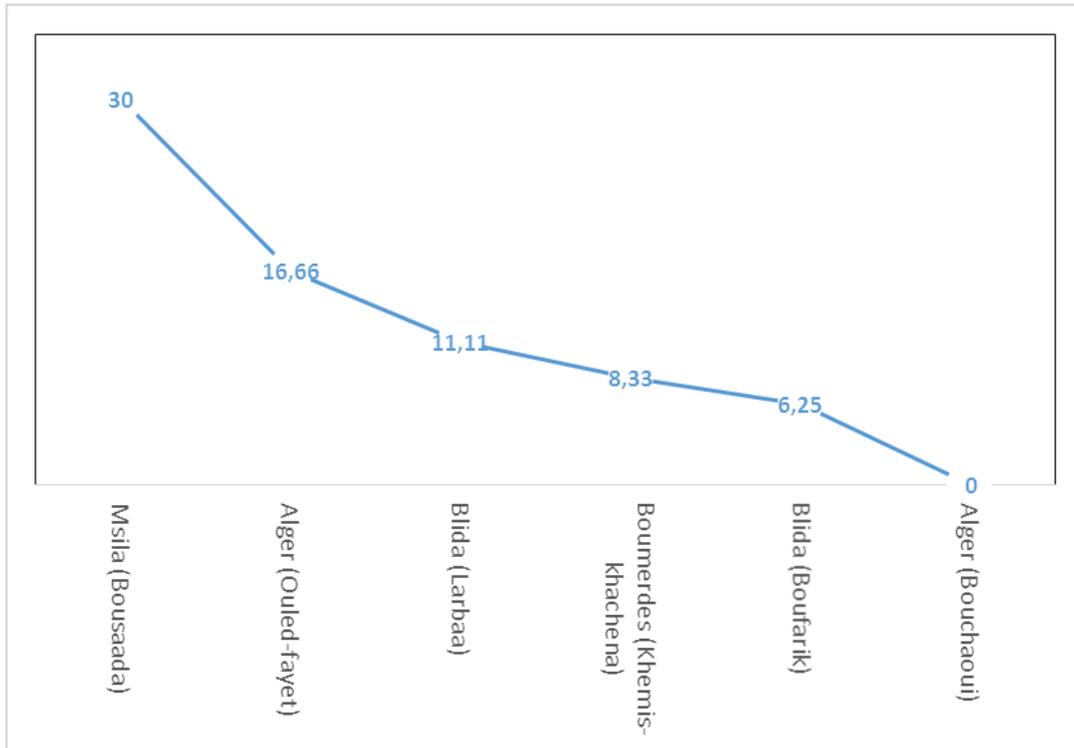


Fig. 55- Prévalence de l'ascosphérose dans les régions d'étude

2.4.5.6. Perspectives de méthodes de lutte contre l'ascosphérose

D'après cette étude, en basant sur l'étude de la croissance mycélienne de champignon *A. apis*, une transhumance vers des régions chaudes peut minimiser (ou limiter) les infections par l'ascosphérose *A. apis*. Une méthode de lutte recommandée pour lutter contre cet agent pathogène. En plus, d'autres produits naturels peuvent être utilisés avec succès, comme vapeur de vinaigre de riz, inhibant la germination des spore fongique (Pornpukdeewattana *et al.*, 2017). En revanche, les traitements contre l'ascosphérose ne sont pas recommandés par des antibiotiques. Ces traitements ont des effets secondaires négatifs sur le couvain, les abeilles adultes et le miel (Gilliam and Vandenberg, 1990 ; Flores *et al.*, 2001 ; Juan-Borras *et al.*, 2015). En plus, les produits utilisés pour lutter contre *A. apis* seront restés

dans le miel. Dont, Le miel est un produit naturel très considéré en raison de ses propriétés nutritionnelles et des applications thérapeutiques appréciées (Juan-Borras *et al.*, 2016). Cependant, actuellement, des alertes alimentaires causées par la détection d'antibiotiques, des pesticides ou des métaux lourds dans le miel, ont mis en péril son image saine (Juan-Borras *et al.*, 2015). Hormis les antibiotiques, les résidus des pesticides dans le miel sont à l'origine des pollutions environnementales, causées par la contamination de l'eau, de pollen et de nectar (García-Chao *et al.*, 2010; Rodriguez-Lopez *et al.*, 2014), et des pratiques des vétérinaires (Totti *et al.*, 2006 ; Calatayud-Vernich *et al.*, 2016). Ainsi, les abeilles entrent en contact avec les pesticides parce que les pratiques vétérinaires les exposent à des pesticides tels que les acaricides, nécessaires pour lutter contre les parasites des abeilles comme *Varroa destructor* (Gregorc et Poklucar, 2003 ; Li *et al.*, 2015), et les fongicides utilisés pour contrôler *Ascosphaera apis* (Juan-Borras *et al.*, 2016). Une autre méthode reste à confirmer, elle est basée sur l'utilisation naturelle des résines végétales, par les abeilles, sous forme de propolis. Faire une transhumance dans des régions caractérisées par abondance des plants résineux, portant des résines qui ont des effets très élevés contre les maladies apicoles, telles que la loque américaine et l'ascosphérose. Cependant, le principal mécanisme de résistance à cette maladie est le comportement hygiénique des abeilles adultes (Palacio *et al.*, 2007 ; Aronstein et Holloway, 2013 ; Adjlane et Haddad, 2014). L'inoculation des colonies *Apis mellifera* par des spores d'*A. apis*, l'agent causal de l'ascosphérose, est la bonne méthode pour tester l'efficacité du comportement hygiénique (Palacio *et al.*, 2007).

2.4.5.7. Effets de l'environnement sur l'infection par l'ascosphérose

Les effets de l'infection par l'ascosphérose ne sont pas bien connus en Algérie. Les taux des symptômes de l'infection par l'ascosphérose observés dans les ruchers étudiés ne sont pas pareils. La génétique des abeilles joue parfois un rôle clé dans la résistance contre les maladies, et notamment contre l'ascosphérose. La variation génétique chez les abeilles algériennes mise en évidence grâce à des marqueurs microsatellites est élevée (Chahbar, 2013). Aussi, les populations algériennes de *A. mellifera* sont caractérisées par la variabilité élevée en termes de nombre d'allèles (Chahbar *et al.*, 2013; Loucif-Ayad *et al.*, 2014). De même, différentes souches d'*A. apis* ont montré des différences importantes dans la virulence de l'hôte (Aronstein et Holloway, 2013). Vojvodic *et al.* (2011) Ont constaté des variations génétiques significatives entre les souches d'*A. Apis* collectées en Europe et aux États-Unis, qui sont deux biotopes différents. Il est important de noter que ces variations

génétiques sont bien corrélées à la résistance des abeilles à l'infection fongique. Les larves d'abeilles mises au défi chez *A. apis* répondent de manière dépendante de l'âge. Des larves très jeunes, 1 à 2 jours (6 mg, poids vif), cessent de se nourrir peu de temps après avoir consommé l'inoculum des spores, ce qui ne gagne pas beaucoup de poids après l'inoculation (Aronstein et Holloway, 2013).

Ainsi, le biotope de rucher peut conditionner l'infection par l'ascosphérose. Les résines protègent également les colonies d'abeilles mellifères du pathogène fongique *A. apis* (Simone-Finstrom et Spivak, 2013), et les Colonies répondent au défi de l'ascosphérose *A. apis* en augmentant la résine butinée (Simone-Finstrom et Spivak, 2013). Les effets des résines contre les infections bactériennes, tels que *Paenibacillus larvae* dans les colonies entières ne sont pas claires (Antúnez *et al.*, 2008). Toutes les races d'abeilles collectent les résines végétales de leur environnement et les déposent dans leurs ruches sous forme de propolis, bien que certaines colonies déposent, relativement, peu par rapport aux autres (Seely et Morse, 1976 ; Crane, 1990 ; Simone-Finstrom et Spivak, 2010). Qui peut justifier la différence de l'infection qui a été notée, auparavant, au cours de cette étude. Dans le même contexte, n'ont seulement les colonies d'abeilles ne récoltent pas des quantités similaires de résines, mais aussi les plants existants dans un biotope ne portent pas des quantités et qualités de résines pareilles. Les échantillons de propolis étaient chimiquement distincts entre différentes régions et inhibaient différemment la croissance de *P. larvae* et de *A. apis* (Wilson *et al.*, 2015). Les abeilles produisent de la propolis à partir d'une grande variété de résines en fonction de la diversité des plantes résineuses disponibles dans un environnement particulier (Crane, 1990). Comme les autres abeilles (sauvage), les abeilles mellifères font des choix parmi les plantes résineuses qui se produisent dans le même environnement en récoltant la résine de certaines plantes, mais pas d'autres (Leonhardt et Blüthgen, 2009; Wilson *et al.*, 2013). Les résines végétales sont généralement des mélanges complexes de composés phénoliques et isoprénoïdes qui fonctionnent dans la défense des plantes contre les agents pathogènes et les parasites (Langenheim, 2003), Bien que la composition de résine et l'activité antimicrobienne puissent être très variables entre les plantes dans différentes régions ou même parmi les espèces du même genre (Lindenfelser, 1967; Bastos *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2013). La diversité fonctionnelle des résines végétales est relativement inconnue, mais la diversité des résines disponibles pour produire de la propolis peut avoir d'importants avantages pour la santé des abeilles (Wilson *et al.*, 2015).

La propolis avec une activité antimicrobienne plus élevée peut être produite si plusieurs sources de résine sont disponibles, où une résine peut compenser un manque de fonction dans une autre résine -Appelé «équilibre fonctionnel»- (Drescher *et al.*, 2014). La redondance fonctionnelle et l'équilibre fonctionnel ont été démontrés pour la collecte de résine dans les abeilles sauvages (Drescher *et al.*, 2014), Il devient donc très important de tester l'activité de la propolis contre les pathogènes multiples en considérant le rôle fonctionnel de la propolis dans la santé des abeilles (Wilson *et al.*, 2015). Son mécanisme d'affection n'est pas encore reconnu pour les 31 divers organismes parasitent les colonies d'abeilles (y compris les bactéries, les champignons, les protozoaires, les acariens et d'autres insectes) (Evans et Schwarz, 2011). Des preuves suggèrent qu'il existe des relations fonctionnelles spécifiques entre la collection de résine et la résistance aux infections fongiques et bactériennes chez les fourmis du bois (Chapuist *et al.*, 2007) et l'infection bactérienne et fongique pour l'abeille *A. mellifera* (Antunez *et al.*, 2008 ; Simone-Finstrom et Spivak, 2013), Mais nous ne savons pas comment les agents pathogènes sont exposés aux composés actifs de résines au niveau des colonies. Puisque les résines ne sont pas connues pour être consommées par les fourmis ou les abeilles. Les composés de résine pourraient interagir avec les agents pathogènes par contact direct, Contact avec des composés de résine adhérant à des cuticules d'insectes, ou par volatilisation (Wilson *et al.*, 2015). Les deux agents pathogènes *P. larvae* et *A. apis* infectants l'abeille par l'ingestion de spores (Aronstein et Murray, 2010 ; Genersch, 2010) et la Propolis peut empêcher la croissance des spores (Wilson *et al.*, 2015). Plus de recherches sont nécessaires pour déterminer le mécanisme de l'inhibition de la propolis contre ces agents pathogènes.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Cette approche choisie nous a permis d'étudier l'impact des principales maladies bactériennes et fongiques sur la santé de l'abeille domestique en Algérie. Elle nous a permis d'apercevoir le cosmopolitisme de la nosérose *Nosema* sp. en Algérie, la prévalence de la loque américaine *Paenibacillus larvae*, la sensibilité de l'abeille saharienne *Apis mellifera sahariensis* pour la nosérose, la résistance de l'abeille tellienne *Apis mellifera intermissa* contre la nosérose et l'impact des infections fongiques sur l'affaiblissement des colonies d'abeilles.

D'abord, nous avons constaté un cosmopolitisme de la nosérose *Nosema* sp. en Algérie. Ces données ont contribué à la première observation de la performance et la distribution spatiale de cette maladie. Elle est présente dans toutes les régions prospectées du territoire national. Nous avons trouvé que les niveaux des infections des colonies par la nosérose sont estimés faibles ou très faibles pour la majorité des échantillons examinés. Ainsi, les régions et les ruches ne conditionnent ni la présence ni l'absence de l'infection, et elles n'ont pas un effet direct sur les niveaux des infections par *Nosema*. Aussi, nous suggérons que la plupart des colonies, dans notre pays, sont infectées par *Nosema apis*. D'après cette étude, la nosérose ne cause pas le CCD en Algérie. De ce fait, il est primordial de rechercher d'autres facteurs qui menacent réellement la survie de l'abeille locale. Par ailleurs, les traitements contre la nosérose ne sont pas recommandés en Algérie. Cela est bénéfique pour les apiculteurs et l'abeille elle-même. En produisant du miel de meilleure qualité sans résidu des produits chimiques. Dans le même ordre d'idées, il est fondamental d'utiliser des bonnes pratiques apicoles. La technicité d'élevage sert non seulement pour le maintien des niveaux des infections par *Nosema* et par d'autres agents pathogènes, mais également pour la préservation et la conservation de notre abeille locale. Cette étude doit être complétée par l'utilisation des outils moléculaires afin d'obtenir d'autres informations.

Ensuite, notre travail nous a permis de mettre en évidence la prévalence de la loque américaine. Une fréquence de 32,38 % des colonies étudiées sont atteintes par la loque américaine *Paenibacillus larvae*. Les abeilles examinées sont échantillonnées aléatoirement sans tenir compte des signes cliniques de la maladie. Nous avons remarqué que certaines colonies infectées par la loque américaine sont restées fortes et elles n'ont pas développé les symptômes de la maladie. Etant donné que les abeilles peuvent être porteuses des bactéries de

la loque américaine *P. larvae* avant l'apparition des symptômes cliniques, il faudrait toujours un diagnostic précoce de la loque américaine pour éviter la propagation de la maladie. De même, nous avons pu détecter plusieurs souches de la bactérie *P. larvae* en se basant sur les caractéristiques biochimiques et morphologiques. En se basant sur le modèle linéaire généralisé, l'évaluation de la répartition de la loque américaine montre l'existence d'un effet direct des conditions environnementales (des régions) sur les taux des infections des colonies par cette maladie. En revanche, il n'y a pas de différence significative d'apparition de la maladie entre les ruchers de la même région.

Il ressort aussi de notre travail la possibilité d'obtenir à partir des abeilles qui ont le mieux répondu à la loque américaine, par une réponse immunitaire sociale, un noyau de sélection basée sur le comportement hygiénique des abeilles. La vérification d'un tel mécanisme lors de l'infection par la loque américaine mais également dans le cas d'autres maladies, permettrait d'orienter les pratiques apicoles vers le renforcement de la colonie afin de contrebalancer le coût de ces comportements d'immunité sociale. De ce fait, la mise en place de bonnes pratiques apicoles reste l'enjeu primordial pour la prévention contre les maladies des abeilles. Par exemple, nous avons discerné nettement la particularité d'infection bactérienne de la région de Boumerdes parmi les autres régions étudiées. Cette nuance entre les régions nous a permis de suggérer que certaines pratiques apicoles, notamment la transhumance, contribueraient à la transmission horizontale de la loque américaine entre les colonies ; ce qui favoriserait le développement de la virulence de cette maladie.

D'après l'étude de la relation entre les symptômes d'infection fongique et les souches fongiques isolées à partir des colonies d'abeilles, nous pouvons conclure que seulement les deux souches fongiques *Ascospaera apis* et *Aspergillus niger*, parmi les trois souches détectées, peuvent être considérées comme étant des espèces infectants l'abeille domestique *A. m. intermissa*. Ensuite, les signes cliniques typiques pour chacune de ces deux souches fongiques, à savoir *Ascospaera apis* et *Aspergillus niger*, ont été étudiés. Cette partie d'étude révèle que toutes les larves momifiées devant les entrées des ruches et les larves de couvain désoperculé (ou opercules déchirés) par les nettoyeuses présentant une couleur noirâtre sont porteuses de l'ascosphérose *Ascospaera apis* (100 %). Par contre, l'aspergillose *Aspergillus niger* n'a pas de symptômes typiques. L'étude de la prévalence de l'ascosphérose *A. apis* montre que cette maladie est omniprésente, elle a été détectée dans toutes les régions prospectées.

La poursuite de la croissance mycélienne chez l'ascosphérose a été menée à partir de trois isolats d'*A. apis*, isolés dans la région de Msila. Cette étude prouve que la durée de germination du champignon est entre 5 et 8 jours avec des températures comprises entre 20°C et 30°C. D'après cette étude, nous pouvons proposer une méthode de lutte contre cet agent pathogène, il s'agit d'une transhumance vers des régions chaudes. Cette technique peut minimiser (ou limiter) les infections par l'ascosphérose.

Enfin, la sensibilité des deux races d'abeille *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis* pour la nosérose a été étudiée. L'inoculation des abeilles par une dose de 100.000 spores de *Nosema* par abeille met en évidence une variabilité importante de la sensibilité des deux races d'abeilles domestiques existantes en Algérie. Les résultats de cette étude montrent que la race tellienne *A. m. intermissa* est plus résistante contre la nosérose que la race saharienne *A. m. sahariensis*. Pour tester cette sensibilité, la comparaison des moyennes (test de student) entre la mortalité naturelle (témoin) et la mortalité après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores de *Nosema* sp. par abeille a été utilisée. Les résultats obtenus chez l'abeille tellienne *A. m. intermissa* montrent qu'il n'y avait pas de différence significative entre la mortalité naturelle (les témoins) et la mortalité après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores par abeille (DDL = 1 ; p = 0,9468). Chez l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*, la différence est hautement significative entre la mortalité naturelle (les témoins) et la mortalité après l'inoculation d'une dose de 100.000 spores par abeille (DDL = 1 ; Valeur de F = 10,35 ; p = 0,0051).

Chez la race tellienne, le nombre de spores par abeille est élevé de $6,3 \times 10^6$ le premier jour jusqu'au $12,3 \times 10^6$ le 4^{ème} jour post-infection. Malgré cette forte infection par la nosérose, après une infection artificielle, les taux de mortalités observés chez cette race d'abeille *A. m. intermissa* sont très faibles (maximum 3,70 %). Chez la race saharienne, le nombre de spores par abeille était élevé de 4×10^5 (très faible infection) pendant le premier jour jusqu'à atteindre plus de $3,6 \times 10^6$ spores par abeille le 3^{ème} jour (une forte infection). Les taux de mortalité sont élevés de 5 % le premier jour post-infection jusqu'au 11,54 % après le 3^{ème} et le 4^{ème} jour post-infection. Donc, le développement en nombre de spores chez l'abeille tellienne *A. m. intermissa* est beaucoup plus élevé par rapport à l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*.

Perspectives

Les échantillons des colonies d'abeilles doivent être prélevés selon les bonnes pratiques de laboratoire. Un historique détaillé doit accompagner chaque échantillon afin d'assurer une bonne traçabilité. La nature et l'historique des échantillons lors de l'analyse des données doivent être en accord avec les fiches de prélèvement. De même, le nombre d'échantillons doit être suffisant pour chaque condition. Un minimum de 20 échantillons nous semble nécessaire.

Les effets des maladies chez l'abeille domestique peuvent être influencés par les interactions entre divers facteurs présents dans l'environnement. Ainsi, l'étude des interactions devient pertinente, car dans des conditions naturelles, les abeilles sont exposées aux diverses menaces. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux effets des interactions entre les différents facteurs de risques, en l'occurrence pathogène-pathogène, pathogène-environnement et pathogène-pesticides.

Jusqu'à présent des études basées sur les effets de *Nosema* chez l'abeille domestique et sur l'identification de l'espèce de *Nosema* présente en Algérie par l'utilisation des outils moléculaires ont été conduites. Ce travail actuellement en cours, permettra de mieux comprendre la relation existant entre l'abeille et *Nosema* sp.

Dans le futur, l'étude de l'adaptation des écotypes d'abeilles à leurs environnements d'origine pourrait donner des clés sur les facteurs qui contribuent à maintenir le système abeille – environnement en équilibre.

La connaissance des mécanismes qui sont à la base du système de défense de l'abeille est actuellement très limitée. Cette carence est particulièrement évidente lorsque nous voulons expliquer les effets des maladies sur la survie et les comportements des abeilles.

Le rôle des apiculteurs est considéré comme principal dans le sauvetage et la conservation de l'abeille domestique, en particulier, il est primordial de conserver l'abeille saharienne dans son biotope naturel.

Les enquêtes qui se font sur terrain qui sont bien structurées, et basée sur une recherche précise, sont primordiales.

Après les enquêtes, la connaissance de notre cheptel apicole (les races, les maladies menaçant la survie de l'abeille), en suite la sélection se fait à partir des colonies qu'on souhaiterait à multiplier (exemple : résistantes contre les maladies).

Après la sélection il vient la préservation par des programmes nationaux. Pour cela, il faut voir les intérêts des apiculteurs qui sont surtout d'ordre économique, en les encourageant par des primes et des soutiens.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1 - Abbot W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18 : 265 - 267.
- 2 - Achou M., 2007. *Caractérisation morphométrique, biochimique et moléculaire des populations d'abeilles domestiques de l'Est algérien - Effets physiopathologiques de son parasite majeur Varroa destructor*. Thèse Doctorat sci. natu., Univ. Annaba, 212 p.
- 3 - Achou M. et Soltani N., 1997. Impact de *Varroa jacobsoni* Oudmans sur la morphométrie et la composition biochimique de l'hémolymphe chez l'abeille, *Apis mellifera intermissa* L. *Parasitica*, 53 (4) : 127 - 134.
- 4 - Adjlane N., 2010. Association of oxalic and lactic acid for *Varroa* control in Algeria. *First Word Conference on Organic beekeeping*, 27 - 29 août 2010, Sunny Beach , p. 52.
- 5 - Adjlane N., 2012 - *Etude des principales maladies bactériennes et virales de l'abeille locale Apis mellifera intermissa dans la région médio-septentrionale de l'Algérie*. Thèse Doctorat Ecole nati. sup. agro .El-Harrach., 131p.
- 6 - Adjlane N. et Doumandji S., 2011. La varroase : biologie, diagnostic et traitement; situation actuelle de la varroase en Algérie. *Pratique vétérinaire*, 9 : 8 - 11.
- 7 - Adjlane N. and Haddad N., 2014. The first data on hygienic behavior of *Apis mellifera intermissa* in Algeria. *J. Biol. Earth Sci.*, 4 (1): 1–5.
- 8 - Adjlane N., Doumandji S. et Haddad N., 2012a. Situation de l'apiculture en Algérie : facteurs menaçant la survie des colonies d'abeilles locales *Apis mellifera intermissa*. *Cah. Agric.*, 21(4) : 235 - 241.
- 8 - Adjlane N., Doumandji S. et Haddad N., 2012b. la prévalence de la nosérose dans les colonies d'abeilles *Apis mellifera intermissa* dans la région médio-septentrionale de l'Algérie. *Lebanese Science Journal*, 13(1) : 65 - 72.
- 9 - Adjlane N., Haddad N. and Kechih S., 2014. Comparative study between techniques for the diagnosis of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honeybee colony. *J. Anim. Vet. Adv.*, 13: 970-973.

- 10 - Adjlane N., Dainat B., Gauthier L. and Dietemann V., 2015. Atypical viral and parasitic pattern in Algerian honey bee subspecies *Apis mellifera intermissa* and *A. m. sahariensis*. *Apidologie*, pp : 1-11
- 11 - Adl S.M., Simpson A.G., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R. *et al.*, 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 399-451.
- 12 - Akratanakul P. and Burgett M., 1975. *Varroa jacobsoni*: A prospective pest of honeybees in many parts of the world. *Bee World*, 56: 119-121.
- 13 - Alaux C., Brunet J.L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L.P. and Le Conte Y., 2010a. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Enviro. Microbiol.*, 12 : 774 -782.
- 14 - Alaux C., Ducloz F., Crauser D. and Le Conte Y., 2010b. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.*, 6 : 562-565.
- 15 - Albo G., Carranza M., Larroque G., Leveratto D. and Marsal G., 1994. Ensayos preliminares para el control integrado de ascosferosis o cría yesificada en la Argentina. *Proc IV Congreso Iberoamericano de Apicultura*, May 12-15. Rio Cuarto, Argentina, pp: 105-108.
- 16 - Allipi A.M., 1991. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*, in Argentina. *J. Apic. Res.*, 30: 75 – 80.
- 17 - Alonso J.M., Puerta Puerta F., Hermoso De Mendoza Salcedo J., Rey Pérez J., Gil Anaya M.C., Hermoso De Mendoza Salcedo M., 1993. La ascosferosis de la abeja melífera en España. Estudio micológico de 47 brotes de la enfermedad. *Revista Iberoamericana de Micología*, 10: 39-46. [In Spanish].
- 18 - Amakpe F., De Smet L., Brunain M., Ravoet J., Jacobs F.J., Reybroeck W., Sinsin B. and de Graaf D.C., 2015. Discovery of Lake Sinai virus and an unusual strain of acute bee paralysis virus in West African apiaries. *Apidologie*. doi:10.1007/s13592-015-0372-z
- 19 - Anderson D.L. and Trueman J.W., 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari : Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24 (3): 165-189.

- 20 - Antúnez K., Anido M., Arredondo D., Evans J.D. and Zunino P., 2011. *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. *Veterinary Microbiology*, 147 (1–2) : 83–89.
- 21 - Antúnez K., Harriet J., Gende L., Maggi M., Eguaras M. and Zunino P., 2008. Efficacy of natural propolis extract in the control of American foulbrood. *Vet. Microbiol.*, 131: 324–331.
- 22 - Antúnez K., Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P. and Higes M., 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.*, 11 : 2284- 2290.
- 23 - Aoudia N. et Ayad R., 1998. *Efficacité thérapeutique de quelques plantes à propriétés acaricides vis-à-vis de la varroase : Varroa jacobsoni*. Mémoire Ingénieur, Inst. nati. agro. El-Harrach, 83 p.
- 24 - Aronstein K.A. and Murray K.D., 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invert. Pathol.*, 103 : 20–29.
- 25 - Aronstein K. and Holloway B., 2013. *Honey bee fungal pathogen, Ascospaera apis; current understanding of host-pathogen interactions and host mechanisms of resistance. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Ed. A. Méndez-Vilas, USDA, USA, pp : 402-410.
- 26 - Ash C., Priest F.G. and Collins M.D., 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64 : 253–260.
- 27 - Aston D., 2010. Honey bee winter loss survey for England, 2007–8. *J. Apic. Res.*, 49 (1): 111–112.
- 28 - Bahreini R. and Currie W.R., 2015. The influence of *Nosema* (Microspora: Nosematidae) infection on honey bee (Hymenoptera: Apidae) defense against *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 132 : 57–65. doi:10.1016/j.jip.2015.07.019.
- 29 - Bailey L., 1967. The incidence of virus diseases in the honey bee. *Annals of Applied Biology*, (60): 43-48.

- 30 - Bailey L., 1981. *Honey bee pathology*. Academic Press, London and New York.
- 31 - Bailey L. and Ball B.V., 1991. *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London
- 32 - Baldensperger P. J., 1924. North African bees. *Bee World*, 5: 175 - 176.
- 33 - Ball B.V., 1983. The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees. Meeting of the EC Experts' Group. *Wageningen*, Pays-Bas. Pp: 21-23
- 34 - Ball B.V., 1989. *Present status of varroatosis in Europe and progress in the Varroa mite control*. In: *Varroa jacobsoni as a virus vector*, Cavalloro, R. Editor, Udine, Italy. pp: 241-244.
- 35 - Ball B.V., 1999. *Paralysis*. In: *Bee disease diagnosis*, Colin M.E., Ball B.V., Kilani M. Editors, Options Méditerranéennes : Serie B. Etudes et Recherche, n°25. Pp: 81-89.
- 36 - Ball B.V. and Allen M.F., 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Annals of Applied Biology*, 113 (2): 237-244.
- 37 - Ball B.V. and Bailey L., 1997. *Viruses*. In: *Honey bee pests, predators, & diseases*, Morse R. A., Flottum K. Editors, A.I. Root Company, Medina. Pp: 11-32.
- 38 - Barour C., Tahar A., Radloff S.E. and Hepburn H.R., 2005. Multivariate analysis of honeybees, *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) of the northeastern and southern region of Algeria. *African Entomology*, 13 (1): 17 - 23.
- 39 - Barker R.J. and Lehner Y., 1978. Laboratory comparison of high fructose corn syrup, grape syrup, honey, and sucrose syrup as maintenance food for caged honey bees. *Apidologie*, 9(2): 111-116. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19780203>
- 40 - Bastos E.M.A.F., Simone M., Jorge D.M., Soares A.E.S. and Spivak M., 2008. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *J. Invert. Pathol.*, 97: 273–281.
- 41 - Baucom R.S. and De Roode J.C., 2011. Ecological immunology and tolerance in plants and animals. *Funct. Ecol.*, 25: 18–28.
- 42 - Beetsma J., Boot W.J. and Calis J., 1999. Invasion behaviour of *Varroa jacobsoni* Oud. : From bees into brood cells. *Apidologie*, 30 (2-3): 125-140.

- 43 - Belaid 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.
- 44 - Bellone R.R., 2010. Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses. *Anim. Genet.*, 41 (suppl. 2): 100–110.
- 45 - Bennett J.W. and Klich M., 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 497–516. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>.
- 46 - Berkani M.L., 2008 - *Etude des paramètres de développement de l'apiculture algérienne*. Thèse Doctorat, Inst. nati. agro., El Harrach, 227 p.
- 47 - Berkani M.L. and Berkani Z., 2009. Composition of chemical of acaricide activity of essential oils resulting from plants against *Varroa destructor* in the Algerian center. 41th. *Congress Apimondia, 15-20 September 2009, Union nati. apicult .France (U.n.a.f.) Montpellier*, p. 161.
- 48 - Berkani M.L., Ghalem. Z. et Benyoucef M.T., 2005. Contribution à l'étude de l'homogénéité de la race locale, *Apis mellifera intermissa* dans les différentes régions du Nord de l'Algérie. *Ann. Inst. nati. agro. El Harrach*, 26 (1–2) : 15 – 32.
- 49 - Borchert A., 1966. *Die Krankheiten und Schädlinge der Honigbiene*. Hirzel Verlag Editor, Leipzig.
- 50 - Borchert A., 1970. *Les maladies et parasites des abeilles*. Vigot Frères Editeurs, Paris, 486p.
- 51 - Borneck R., Viry A., Martin-Hernández R. and Higes M., 2010. Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *J. Apicult. Res.*, 49 : 334-336.
- 52 - Botias C., Martin-Hernandez R., Dias J., Garcia-Palencia P., Malabuena M., Juarranz A., *et al.*, 2012. The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ. Microbiol.*, 14(4):845-859.
- 53 - Bourgeois A.L., Rinderer T.E., Beaman L., Danka R.G., 2010. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee, *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 53–58.

- 54 - Bowen-Walker P.L., Martin S.J. and Gunn A., 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73 (1): 101-106.
- 55 - Bozik M., Císarová M., Tancinová D., Kourimská L., Hleba L. and Kloucek P., 2016. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. *Ind. Crops Prod.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.044>
- 56 - Breeze T.D., Vaissière B.E., Bommarco R., Petanidou T., Seraphides N., *et al.*, 2014. Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply–demand mismatches across Europe. *PLoS ONE* 9 (1), e82996. doi:10.1371/journal.pone.0082996.
- 57 - Brodschneider R., Moosbeckhofer R. and Crailsheim K., 2010. Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *J. Apic. Res.*, 49 (1): 23–30.
- 58 - Bruneau E., 2006. Nutrition et malnutrition des abeilles. Biodiversité des plantes, une clé pour l'alimentation et la survie de l'abeille. *Abeille et agriculture*. Académie d'agriculture de France. Séance du 14 juin 2006. Pp :1-10.
- 59 - Cadet J., Douki T., Gasparutto D. and Ravanat J.L., 2005. *Réactions d'oxydation et cibles biologiques : acides nucléiques*. In : *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*. Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., Tec & Doc, EM inter, Lavoissier, Paris, Pp : 169-243.
- 60 - Cain D., Hanks H., Weis M., Bottoms C. and Lawson J., 2015. *Microbiology Laboratory Manual B2420*. Collin County Community College District, McKinney, TX.
- 61 - Calatayud-Vernich P., Calatayud F., Simo E., Morales Suarez-Varela M., and Pico Y., 2016. Influence of pesticide use in fruit orchards during blooming on honeybee mortality in 4 experimental apiaries. *Science of the Total Environment*, 41 : 33-41.
- 62 - Cameron J.J., Uppala S.S., Lucas H.M. and Sagili R.R., 2016. Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 87: 12-19.
- 63 - Cantwell G.E., 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal*, 110(6): 222-223.

- 64 - Carpana E., Marocchi L. and Gelmini L., 1995. Evaluation of the API 50CHB system for identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie*, 26 : 11–16.
- 65 - Carreck N., 2012. Where are we now with *Nosema ceranae*? *Bee World.*, 89: 62-63.
- 66 - Chahbar N., 2013. *Evaluation de la toxicité d'un produit phytopharmaceutique sur les abeilles domestiques locales (Apis mellifera intermissa et Apis mellifera sahariensis) et diversité génétique*. Thèse Doctorat en Sciences Agronomiques, ENSA, El-Harrach, Alger, Algérie. 223p.
- 67 - Chahbar N., Chahbar M. and Doumandji S., 2014. Evaluation of acute toxicity of thiamethoxam in Algerian honeybee *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis*. *International Journal of Zoology and Research*, 4 (3) : 29-40.
- 68 - Chahbar M., Tefiel H., Adidou-Chahbar N., Doumandji-Mitiche B. and Gaouar S.B.S., 2016. First spatial distribution of nosemosis (*Nosema* sp.) infected local bee, *Apis mellifera intermissa* in Algeria. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(2): 357-363.
- 69 - Chahbar N., Munoz I., Dall'Olio R., De la Rúa P., Serrano J. and Doumandj S., 2013. Population structure of North African honey bees is influenced by both biological and anthropogenic factors. *Journal of Insect Conservation*, 17 : 385–392. DOI : 10.1007/s10841-012-9520-1.
- 70 - Chaimanee V., Warrit N. and Chantawannakul P., 2010. Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *J. Invertebr. Pathol.*, 105: 207–210.
- 71 - Chaimanee V., Chantawannakula P., Chen Y., Evans J.D. and Pettis J.S., 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*, *Journal of Insect Physiology*, 58 : 1090–1095.
- 72 - Chaimanee V., Evans J.D., Chen Y., Jackson C. and Pettis J.S., 2016. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology*, 89:1-8. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.03.004.

- 73 - Chaimanee V., Pettis J.S., Chen Y., Evans J.D., Khongphinitbunjong K. and Chantawannakul P., 2013. Susceptibility of four different honey bee species to *Nosema ceranae*, *Veterinary Parasitology*, 193: 260–265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.004>.
- 74 - Chapuist M. *et al.*, 2007. Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. *Proc. R. Soc. London B* 247, pp: 1017–2013.
- 75 - Charon K.M. and Lipka K.R., 2015. The effect of a coat colour-associated genes polymorphism on animal health – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 15 (1) : 3–17. DOI: 10.2478/aoas-2014-0066.
- 76 - Charrière J.-D. and Neumann P., 2010. Surveys to estimate colony losses in Switzerland. *J. Apic. Res.*, 49(1) : 132–133.
- 77 - Chauzat M. P., Carpentier P., Madec F., Bougeard S., Cougoule N., Drajnudel P., Clément M.C., Aubert M. and Faucon J. P., 2010. The role of infectious agents and parasites in the health of honey bee colonies in France. *J. Apicult. Res.*, 49: 31-39.
- 78 - Chen Y., Evans J.D., Smith I.B. and Pettis J.S., 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97: 186–188.
- 79 - Chen Y., Zhao Y., Hammond J., Hsu H.T., Evans J. and Feldlaufer M., 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87 (2-3): 84-93.
- 80 - Chen Y., Evans J.D., Murphy C., Gutell R., Zuker M., Gundensen-Rindal D. and Pettis J.S., 2009. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 56: 142-147.
- 81 - Chupia V., Pikulkaew S., Krutmuang P., Mekchay S., Patchanee P., 2016. .Molecular epidemiology and geographical distribution of *Nosema ceranae* in honeybees, Northern Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(1): 27-31.

- 82 - Cintra P., Malaspina O., Bueno O.C., Petacci F., Fernandes J.B., Vieira P.C. and da Silva M.F.G.F., 2005. Oral toxicity of chemical substances found in *Dimorphandra mollis* (Caesalpinaceae) against honeybees (*Apis mellifera*). *Sociobiology*, 45 : 141-149.
- 83 - Clément H., Bruneau E., Barbançon J.M., Bonnaffé P., Domérogue R., Fert G., Le Conte Y., Ratia J., Reeb C. et Vaissière B., 2002. *Le traité Rustica de l'apiculture*. Traité Rustica, Paris, 528p.
- 84 - Copley T.R. and Jabaji S.H., 2012. Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *J. Appl. Microbiol.*, 112: 15–24.
- 85 - Crane E., 1990. *Bees and Beekeeping: Science, Practice, and World Resources*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- 86 - Dahle B., 2010. The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *J. Apic. Res.*, 49: 124–125.
- 87 - Dall D.J., 1985. Unapparent infection of honey bee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia. *Journal of physiology*, 106 (3): 461-468.
- 88 - De Graaf D.C., Vandekerchove D., Dobbelaere W., Peeters J.E. and Jacobs F.J., 2001. Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie*, 32: 587–599.
- 89 - De Graaf D.C., Alippi A.M., Brown M., Evans J.D., Feldlaufer M., Gregorc A., Hornitzky M., Pernal S.F., Schuch D.M.T., Titěra D., Tomkies V. and Ritter W., 2006. Under the microscope. Diagnosis of American foulbrood disease in honeybees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43: 583–590.
- 90 - De Graaf D.C., Alippi A.M., Antúnez K., Aronstein K.A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D.W., Evans J.D., Foster L.J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K.D., Nguyen B.K., Poppinga L., Spivak M., vanEngelsdorp D., Wilkins S. and Genersch E., 2013. Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1), 27p. DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.11

- 91 - De Guzman Z.M., Cervancia C.R., Dimasuay K.G.B., Tolentino M.M., Abrera G.B., Cobar M.L.C., Fajardo Jr. A.C., Sabino N.G., Manila-Fajardo A.C. and Feliciano C.P., 2011. Radiation inactivation of *Paenibacillus larvae* and sterilization of American Foul Brood (AFB) infected hives using Co-60 gamma rays. *Applied Radiation and Isotopes*, 69 (10) : 1374–1379.
- 92 - De Miranda J., 2012. Virus in bees, what do they do and what can we do about it? Bee World- March 2012 EFSA panel on plant protection products and their residues (PPR); scientific opinion on the science behind the development of a risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal*, 10 (5), 275p.
- 93 - De Miranda J., Cordoni G. and Budge G., 2010. The acute bee paralysis virus – Kashmir bee virus – Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of invertebral pathology*, 103: 30-47.
- 94 - Decanini L.I., Collins A.M. and Evans J.D., 2007. Variation and heritability in immune gene expression by diseased honeybees. *J. Hered.*, 98 : 195–201.
- 95 - Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E et Quentin R., 2007. *Bactériologie médicale – Techniques usuelles*. Ed. Masson, 573 p.
- 96 - Dingmann D.W. and Stahly D.P., 1983. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 (4):860–869.
- 97 - Dobbelaere W., De Graaf D.C., Peeters J.E. and Jacobs F.J., 2001. Comparison of two commercial kits for biochemical characterization of *Paenibacillus larvae larvae* in the diagnosis of AFB. *J. Apicult. Res.*, 40: 37–40.
- 98 - Doull K.M., 1965. The effects of time of day and method of sampling on the determination of *Nosema* disease in bee hives. *Journal of Invertebrate Pathology*, 7(1): 1-4.
- [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(65\)90143-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(65)90143-6)
- 99 - Drescher N. *et al.*, 2014. Diversity matters: how bees benefit from different resin sources. *Oecologia*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-014-3070-z>.
- 100 - Dussaubat C., Sagastume S., Gomez-Moracho T., Botias C., Garcia-Palencia P., Martin-Hernandez R., Le Conte Y. and Higes M., 2013. Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Veterinary Microbiology*, 162 : 670–678.

- 101 - Evans J.D., 2001, Genetic evidence for co-infection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78 (4): 189-193.
- 102 - Evans J.D., 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85: 105–111.
- 103 - Evans J.D. and Spivak M., 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 103: 62-72.
- 104 - Evans J.D. and Schwarz R.S., 2011. Bees brought to their knees: microbes effective honey bee health. *Trends Microbiol.*, 19 (12) : 614–620.
- 105 - Evans J.D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z. and Hultmark D., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15: 645- 656.
- 106 - Fenoy S., Rueda C., Higes M., Martín-Hernández R. and Del Aguila C., 2009. Highlevel resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 : 6886-6889.
- 107 - Fernandez N. et Coineau Y., 2007. *Maladies, parasites et autres ennemis de l'abeille mellifère*. Ed. Atlantica. 498p.
- 108 - Fernández J.M., Puerta F., Cousinou M., DiosPalomares R., Campano F. and Redondo L., 2012. Asymptomatic presence of *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries. *J. Invertebr. Pathol.*, 111 : 106-110.
- 109 - Ferreirados Santos Viderra I. and Magina S., 2013. Mechanisms regulating melanogenesis. *An. Bras. Dermatol.*, 88 : 76–83.
- 110 - Fluri P., 1994. Réflexions des chercheurs en apiculture sur la régulation de la durée de vie des ouvrières. *Journal suisse d'Apiculture*, 91 : 19-27.
- 111 - Fluri P., Herrmann M., Imdorf A., Buhlmann G. et Charrière J.D., 1998. Santé et maladies des abeilles : connaissances de base. *Centre Suisse de Recherches Apicoles*, Station de recherches laitières, Liebefeld, CH-3003 Berne, Communications N°33.

- 112 - Flores J.M., Spivak M. and Gutierrez I., 2005. Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. *Veterinary Microbiology*, 108: 141–144.
- 113 - Flores J.M., Puerta F., Gutiérrez I. and Arrebola F., 2001. Estudio de la eficacia del Apimicos-B en el control y prevención de la ascosferosis en la abeja de la miel. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18: 187-190.
- 114 - Flores J.M., Palacio M.A., Puerta F., Ruiz J.A., Ruz J.M. and Ruffinengo S., 1999. Cría yesificada (Ascospferiosis) en la abeja melífera I: aspectos generales y causas predisponentes. *Gestión Apícola*, 16: 7-10.
- 115 - Flores J.M., Ruiz J.A., Ruz J.M., Puerta' F., Bustos M., Padilla F. and Campano F., 1996. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie*, 27: 185-192.
- 116 - Fontanesi L., Scotti E. and Russo V., 2010. Analysis of SNPs in the KIT gene of cattle with different coat colour patterns and perspectives to use these markers for breed traceability and authentication of beef and dairy products. *Italian J. Anim. Sci*, 9: e42. doi:10.4081/ijas.2010.e42.
- 117 - Fontbonne R., Garnery L., Vidau C., Aufauvre J., Texier C., Tchamitchian S., El Alaoui H., Brunet J., Delbac F. and Biron D.G., 2013. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 17: 188–194.
- 118 - Forsgren E. and Fries I., 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.*, 170: 212-217.
- 119 - Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B.P., Hepburn H.R., Solignac M. and Cornuet J.M., 2001. Genetic diversity of the honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86: 420 – 430.
- 120 - Fries I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.*, 103: 73–79.
- 121 - Fries I., Camazine S., 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie* : 32: 199-214.

- 122 - Fries I., Ekbohm G. and Villumstad E., 1984. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *Journal of Apicultural Research*, 23(2): 102-105.
- 123 - Fries I., Granados R. and Morse R., 1992. Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie*, 23: 61-70.
- 124 - Fries I., Feng F., Da Silva A., Slemenda S.B. and Pieniazek N.J., 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee (*Apis cerana*) (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.*, 32: 356–365.
- 125 - Fries I., Chauzat M., Chen Y., Doublet V., Genersch E., Gisder S., Higes M., McMahon D.P., Martín-Hernández R., Natsopoulou M., Paxton R.J., Tanner G., Webster T.C. and Williams G.R., 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 28p.
- 126 - Gallai N., Salles J.M., Settele J., Vaissière B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econom.* 68: 810–821
- 127 - García-Chao M., Agruna M. J., Flores J.M., Calvete G., Sakkas V., Llompart M. and Dagnac T., 2010. Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. *Analytica Chimica Acta*, 672: 107-113.
- 128 - Garcia-Palencia P., Martín-Hernandez R., Gonzalez-Porto A.V., Marín P., Meana A. and Higes M., 2010. Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.*, 49: 278–283.
- 129 - Garnery L., Solignac M., Celebrano G. and Cornuet J.M., 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49: 1016 – 1021.

- 130 - Gende L., Satta A., Ligios V., Ruiu L., Buffa F., Fernandez N., Churio S., Eguaras M., Fiori M. and Floris I., 2011. Searching for an American foulbrood early detection threshold by the determination of *Paenibacillus larvae* spore load in worker honey bees. *Bulletin of Insectology*, 64 (2): 229-233.
- 131 - Genersch E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 10–19.
- 132 - Genersch E., Ashiralieva A. and Fries I., 2005. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:7551–7555.
- 133 - Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J. and Fries I., 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *Pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56 : 501–511.
- 134 - Gillet P., Boel L. et Jacobs J., 2009. Bactériologie médicale tropicale (notes pratiques). Post-graduat en médecine tropicale et sante internationale Module 1 & Module 2, Institut de Médecine Tropicale, Nationalestraat, 155 B – 2000 Antwerpen, pp : 8-11.
- 135 - Gilliam M. and Vandenberg J.D., 1990. *Fungi. In: Honey bee pest, predators, and diseases*. Ed. Morse R.A., Nowogrodzki R., 2nd ed., Ithaca, Cornell Univ., pp: 65-90.
- 136 - Gisder S., Hedtke K., Mockel N., Frielitz M.C., Linde A. and Genersch E., 2010. Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 3032- 3038.
- 137 - Gonzalez G., Hinojo M.J., Mateo R., Medina A. and Jimenez M., 2005. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology*, 105 : 1-9.
- 138 - Gordon R.E., Haynes W.C. and Pang H.N., 1973. The Genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook*, N° 427, Washington, DC: U.S. Department of Agriculture.
- 139 - Gray A., Peterson M. and Teale A., 2010. An update on recent colony losses in Scotland from a sample survey covering 2006–2008. *J. Apic. Res.*, 49(1): 129–131.

- 140 - Gregorc A. and Bowen L.D., 1998. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with bacillus larvae, the causative agent of american foulbrood disease. *Cell Biology International*, 22 (2): 137-144.
- 141 - Gregorc A. and Poklukar J., 2003. Rotenone and acid as alternative acaricidal treatments for *Varroa destructor* in honeybee colonies. *Veterinary Parasitology*, 111 : 351-360.
- 142 - Gregorc A., Evans J.D., Scharf M. and Ellis J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*), *Journal of Insect Physiology*, 58: 1042–1049.
- 143 - Gregory P.G., Evans J.D., Rinderer T. and Guzman L., 2005. Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *Journal of Insect Science*, 5 (7).
- 144 - Gisder S., Hedtke K., Mockel N., Frielitz M.C., Linde A. and Genersch E., 2010. Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*?. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 3032- 3038.
- 145 - Groh C., Tautz J. and Rössler W., 2004. Synaptic Organization in the Adult Honey Bee Brain is Influenced by Brood-Temperature Control During Pupal Development. *PNAS*, 101 (12) : 4268-4273.
- 146 - Guzman-Novoa E., Eccles L., Calvete Y., McGowan J., Kelly P.G. and Correa A., 2010. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*.
- <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2009076>
- 147 - Haase B., Brooks S.A., Tozaki T., Burger D., Poncet P.A., Rieder S., Hasegawa T., Penedo C. and Leeb T., 2009. Seven novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Anim. Genet.*, 40: 623–629.
- 148 - Haase B., Brooks S.A., Schlumbaum A., Azor P.J., Bailey E., Alaeddine F., Meike Mevissen M., Burger D., Poncet P.A., Rieder S. and Leeb T., 2007. Allelic heterogeneity at the equine KIT Locus in dominant white (W) horses. *PLoS Genetics*, 3: 2101–2108.
- 149 - Haccour P., 1960. Recherche sur la race d'abeille saharienne au Maroc. *C.R. Soc. Sci. Nat. Phys. Extrait La Belgique Apicole*, 25 (1-2) : 13 – 18.

- 150 - Haddad N., Al-tellawi A., Adjlane N., Khoury F. and Samar Q., 2015a. Diagnosis of *Paenibacillus* larvae from Honeybees in Jordan According to Microbiological and Chemicals Techniques. *Asian J. Anim. Sci.*, 12p
- 151 - Haddad N., Loucif-Ayad W., Adjlane N., Saini D., Manchiganti R., Krishnamurthy V., AlShagoor B., Batainh A.H. and Mugasimangalam R. 2015b. Draft genome sequence of the Algerian bee *Apis mellifera intermissa*. *Genomics Data* 4 : 24–25
- 152 - Haderbache L., Bousdira M. and Mohammedi A., 2013. *Ziziphus Lotus* and *Euphorbia bupleuroides* Algerian Honeys. *World Applied Sciences Journal*, 24 (11): 1536-1543.
- 153 - Hamiduzzaman M.M., Guzman-Novoa E., Goodwin P.H., Reyes-Quintana M., Koleoglu G., Correa-Benítez A., *et al.*, 2015. Differential responses of Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) to viral replication following mechanical transmission or Varroa destructor parasitism. *Journal of Invertebrate Pathology*, 126 : 12-20.
- 154 - Hansen H. and Brodsgaard C.J., 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, 80: 5–23.
- 155 - Haubruge E., Nguyen B.K., Widart J., Thomé J.P., Fickers P. and Depauw E., 2006. Le dépérissement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera : Apidae) : faits et causes probables. *Notes fauniques de Gembloux*, 59 (1) : 3-21.
- 156 - Hauser R., 2003. *Aethina tumida* : la menace se précise. *Magazine de l'OVF*, (6) : 21-23.
- 157 - Haxaire J., 2006. Le frelon asiatique *Vespa velutina*, un nouveau prédateur de l'abeille ? *La Santé de l'Abeille*, 216: 323-328.
- 158 - Haxaire J., Bouguet J.P. and Tamisier J.P., 2006. *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (*Hym.*, *Vespidae*). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 111(2), p194.
- 159 - Haynes W.C., 1972. The catalase test, an aid in the identification of *Bacillus* larvae. *Am. Bee. J.*, 112: 130 - 131.
- 160 - Hemmerlé J., 2015. Le point sur l'ascosphérose. *Santé des abeilles, Abeille de France*, 22 (1025), 4p.

- 161 - Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S. And Decourtye A., 2012. A Common Pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *ExpressScience*, 4 p.
- 162 - Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., de Vos P., Logan N.A., Ali N. and Berkeley R.C.W., 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White, 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 270-279.
- 163 - Higes M., Martin R. and Meana A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 93–95.
- 164 - Higes M., Garcia-Palencia P., Martin-Hernandez R. and Meana A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94: 211–217.
- 165 - Higes M., Martin-Hernandez R., Botias C., Bailon E.G., Gonzalez-Porto A.V., Barrios L., Del Nozal M.J., Bernal J.L., Jimenez J.J., Palencia P.G. and Meana A., 2008a. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10: 2659–2669.
- 166 - Higes M., Martin-Hernandez R., Garrido B., Palencia P. and Meana A., 2008b. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97: 76–78.
- 167 - Higes M., Martín-Hernandez R., Botias C. and Meana A., 2009a. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *Journal of Apicultural Research*, 48: 217–219.
- 168 - Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., González-Porto A.V., García-Palencia P., Meana A., Nozal M.J.D., Mayo R. and Bernal J.L., 2009b. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, 1: 110–113.

169 - Holl H., Brooks S. and Bailey E., 2010. De novo mutation of KIT discovered as a result of a nonhereditary white coat color pattern. *Anim. Genet.*, 41 (suppl. 2): 196–198.

170 - Houbraken J., De Vries R.P. and Samson R.A., 2014. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology*, 86: 199–249.

171 - Houbraken J., Wang L., Lee H.B. and Frisvad J.C., 2016. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia. Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36: 299-314.

172 - Huang W.F. and Solter L.F., 2013. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *J Invertebr Pathol.*, 113(1):35-41.

173 - Huang Q., Kryger P., Le Conte Y. and Moritz R., 2012. Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J. Invertebr. Pathol.*, 109 : 297-302.

174 - Huang W.F., Solter L.F., Aronstein K. and Huang Z., 2015. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124 : 107–113.

175 - Hubka V., Nováková A., Kolarík A., *et al.*, 2014. Revision of *Aspergillus* section Flavipedes: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. *Mycologia*, 107:169-208.

176 - Human H., Brodschneider R., Dietemann V., Dively G., Ellis J., Forsgren E., Fries I., Hatjina F., Hu F.L., Jaffé R., Köhler A., Pirk C.W.W., Rose R., Strauss U., Tanner G., Van Der Steen J.J.M., Vejsnæs F., Williams G.R. and Zheng H.Q., 2013. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(4).

<http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>

177 - Invernizzia C., 2001. Resistencia a la enfermedad de cría yesificada por colonias de *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higiénico (Hymenoptera: Apidae). *Iberingia, Ser Zoología*, 9 : 109-114. [In Spanish].

- 178 - Invernizzia C., Peñagaricano F. and Tomasco I.H., 2009a. Intracolony genetic variability in honeybee larval resistance to the chalkbrood and American foulbrood parasites. *Insect Soc.*, 56: 233–240.
- 179 - Invernizzia C., Abuda C., Tomasco I., Harriet J., Ramallos G., Campáb J., Katz H., Gardiol G. and Mendozac Y., 2009b. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.*, 101: 150–153.
- 180 - Jaffé R., Dietemann V., Allsopp M.H., Costa C., Crewe R.M., Dall’Olio R., De La Rúa P., El-Niweiri M.A.A., Fries I., Kezic N., Meusel M.S., Paxton R.J., Shaibi T., Stolle E., Moritz R.F.A., 2010. Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. *Conserv. Biol.* 24: 583–593.
- 181 - James R.R. and Xu J., 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Inv. Pathol.*, 109: 175–182.
- 182 - Jensen A.B., Pedersen B.V. and Eilenberg J., 2009. Differential susceptibility across honey bee colonies in larval chalkbrood resistance. *Apidologie*, 40 : 524–534.
- 183 - Jensen A.B., Aronstein K., Flores J.M., Vojvodic S., Palacio M.A. and Spivak M., 2013. Standard methods for fungal brood disease research. *J Apicult Res*, 51 (1). <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.13>.
- 184 - Johansson A., Pielberg G., Andersson L. and Edfors-Lilja I., 2005. Polymorphism at the porcine dominant white/KIT locus influence coat color and peripheral blood cell measures. *Anim. Genet.*, 36: 288–296.
- 185 - Juan-Borras M., Domenech E. and Escriche I., 2016. Mixture-risk-assessment of pesticide residues in retail polyfloral honey. *Food Control*, 67 : 127-134.
- 186 - Juan-Borras M., Periche A., Domenech E. and Escriche I., 2015. Routine quality control in honey packaging companies as a key to guarantee consumer safety. The case of the presence of sulfonamides analyzed with LC-MS-MS. *Food Control*, 50 : 243-249.

- 187 - Julie V.H. and Nicholas J.M., 2016. Pathogenicity, prevalence and intensity of a microsporidian infection by *Nosema fumiferanae postvittana* in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana*, in California. *Journal of Invertebrate Pathology*, 134: 27-34.
- 188 - Jung J., Bohn G., Allroth A., Boztug K., Brandes G., Sandrock I., Schäffer A.A., Rathinam C., Köllner I., Beger C., Schilke R., Welte K., Grimbacher B. and Klein Ch., 2006. Identification of a homozygous deletion in the *AP3B1* gene causing Hermansky-Pudlak syndrome, type 2. *Blood*, 108: 362–369.
- 189 - Kaelin Ch.B. and Barsh G.S., 2013. Genetics of pigmentation in dogs and cats. *Annu. Rev. Biosci.*, 1: 125–156.
- 190 - Kanbar G. and Engels W., 2003. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honeybee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology Research*, 90 (5): 349-354.
- 191 - Kaplan J., De Domenico I. and Ward D.M., 2008. Chediak-Higashi syndrome. *Curr. Opin. Hematol.*, 15: 22–29.
- 192 - Khilnani J.C. and Wing H.J., 2015. Protocols to test the activity of antimicrobial peptides against the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Microbiological Methods*, 117: 54–56.
- 193 - Klee J., Besana A.M., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D.Q., Chinh T.X., Puerta F., Ruz J.M., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries I. and Paxton R.J., 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.*, 96 : 1–10
- 194 - Koch W. and Ritter W., 1991. Experimental examinations concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with *Varroa jacobsoni*. *Zentralbl. Veterinärmed*, 38 (5): 337-344.
- 195 - Kocsubé S., Perrone G., Magistà D., Houbraken J., Varga J., Szigeti G., Hubka V., Hong S.B., Frisvad J.C. and Samson R.A., 2016. *Aspergillus* is monophyletic: evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology*, doi: 10.1016/j.simyco.2016.11.006.

- 196 - Kocube S., Varga J., Sigeti D., Baranji N., Suri K., Tot B., Toldi E., Bartok T. and Mesterhazi A., 2013. *Aspergillus* species as mycotoxin producers in agricultural products in central Europe. *Zb. Matice Srp. za Prir. Nauk.*, pp : 13–25, <http://dx.doi.org/10.2298/ZMSPN1324013K>.
- 197 - Koudjil M., 1990. *Etude de la race locale Apis mellifica intermissa et essai d'élevage de reines dans la région de Chlef*. Thèse Magister, Inst. nati. agro., El Harrach, 288 p.
- 198 - Kulinčević J.M. and Rothenbuhler W.C., 1975. Selection for resistance and susceptibility to hairless-black syndrome in the honeybee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 25 (3): 289-295.
- 199 - L'arrivee J.C.M., 1963. Comparison of composite versus individual bee sampling for *Nosema apis* Zander. *Journal of Insect Pathology*, 5(4): 349-355.
- 200 - Labrosse M., 2003. *Etude de la toxicité subchronique du Fipronil et de ses métabolites chez l'abeille Apis mellifera*, Mémoire, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, France. <http://prodinra.inra.fr/record/71991>
- 201 - Lambert O., Piroux M., Caseteuble R., L'Hostis M., Bastian S. Delbac F. and Pouliquen H., 2011. Analyses toxicologiques dans le cadre de l'étude abeille sentinelle de l'environnement : premières exploitations des résultats. Ed. Jean-Marie Barbançon et Monique L'Hostis, *Journée scientifique Apicole*, Nantes, 11 février 2011, P100.
- 202 - Langenheim J., 2003. *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, Ethnobotany*. Timber Press, Portland, OR.
- 203 - Le Conte Y., Ellis M. and Ritter W., 2010. *Varroa* mites and honey bee health : can *Varroa* explain part of the colony losses?. *Apidologie*, 41 : 353-363.
- 204 - Lee K.V., Steinhauer N., Rennich K., Wilson M.E., Tarpay D.R., Caron D.M., Rose R., Delaplane K.S., Baylis K., Lengerich E.J., Pettis J., Skinner J.A., Wilkes J.T., Sagili R. And Vanengelsdorp N., 2015. A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46: 292–305.
- DOI: 10.1007/s13592-015-0356-z

- 205 - Lefebvre M. et Bruneau E., 2003. Suivi sanitaire d'urgence de ruchers présentant des symptômes de dépérissement. *Rapport final. Projet FF 02/15 (414)*, Fonds budgétaire des Matières premières, Bruxelles, 16 p.
- 206 - Lefebvre M. et Bruneau E., 2005. Etat des lieux du phénomène de dépérissement des ruchers en Région wallonne. *Rapport final. Convention DGNRE/CARI*, Namur, 50 p.
- 207 - Lemaitre B. and Hoffmann J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25: 697–743.
- 208 - Leonhardt S. and Blüthgen N., 2009. A sticky affair: resin collection by Bornean stingless bees. *Biotropica*, 41 (6): 730–736.
- 209 - Li Y., Kelley R.A., Anderson T.D. and Lydy M.J., 2015. Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of select pesticides in honey bees, pollen, and wax by gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 140: 81-87.
- 210 - Liang Q., Chen D. and Wang J., 2000. Effects of Temperature, Relative Humidity and pH on Germination of Chalkbrood Fungus, *Ascosphaera apis* Spore. *The journal of applied ecology*, 11(6) : 869-872.
- 211 - Lindenfelser L.A., 1967. Antimicrobial activity of propolis. *Am. Bee J.*, 107 (3): 90–92; 107 (4): 130–131. *Lindström*
- 212 - Lindström A. and Fries I., 2005. Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Apicult. Res.*, 44 (2): 82- 86.
- 213 - Lindström A., Korpela S. and Fries I., 2008. The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Invertebr. Pathol.*, 99: 82–86.
- 214 - Locke B., Forsgren E. and de Miranda J.R., 2014. Increased tolerance and resistance to virus infections: A possible factor in the survival of *Varroa destructor*-resistant honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 9 (6), e99998. doi:10.1371/journal.pone.0099998.

215 - Locke B., Le Conte Y., Crauser D. and Fries I., 2012. Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct European honey bee populations. *Ecology and Evolution*, 2(6):1144–1150.

doi:10.1002/ece3.248

216 - Loucif W., 1993. *Etude biométrique de populations d'abeilles dans l'est algérien*. Thèse Magister, Univ. Annaba, 150 p.

217 - Loucif-Ayad W., Aribi N., Smaghe G. and Soltani N., 2010. Comparative effectiveness of some acaricides used to control *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Algeria. *African Entomol.*, 18 (2): 259 – 266.

218 - Loucif-Ayad W., Chefrour A., Algharibeh M. and Haddad N., 2013. First detection of deformed wing virus of honeybees in Algeria. *Phytoparasitica*, 41 : 445–447.

219 - Loucif-Ayad, W., M. Achou, H. Legout, M. Alburaki, and L. Garnery. 2014. Genetic assessment of Algerian honeybee populations by microsatellite markers. *Apidologie*. DOI:10.1007/s13592-014-0331-0

220 - Loucif-Ayad W., Bouchema W.F., Chaabane S., Benchaabane M., Aribi N., Chefrour A. and Soltani N., 2009. Impact of some acaricides used against *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidea) on the physiology of *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae). *41th Congress Apimondia*, 15-20 September 2009, Montpellier, p. 164.

221 - Lucia M., Reynaldi F.J., Sguazza G.H. and Abrahamovich A.H.. 2014. First detection of deformed wing virus (DWV) in larva of large carpenter bee (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *J. Apicult. Res.*, 53 : 466–8.

222 - MADR, 2015. Ministère d'Agriculture et de Développement Rural, Département de production animale. Alger, Algérie.

223 - Maistrello L., Lodesani M., Costa C., Leonardi F., Marani G., Caldon M., Mutinelli F. and Granato A., 2008. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honey bees. *Apidologie* 39(4): 436-445.

<http://dx.doi.org/10.1051/apido:2008022>

- 224 - Malone L. and Giaccon H., 1996. Effects of *Nosema apis* infection on inbred New Zealand honey bees (*A. mellifera ligustica* L). *Apidologie*, 27: 479-486.
- 225 - Malone L. and Gatehouse H., 1998. Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*A. mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 169-174.
- 226 - Malone L., Giaccon H. and Newton M., 1995. Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. *Apidologie*, 26 (6) : 495-502.
- 227 - Malone L.A., Giaccon H.A. and Newton M.R., 1996. Effects of *Nosema apis* Zander on inbred New Zealand honey bees (*Apis mellifera ligustica* L). *Apidologie*, 27: 479-486.
- 228 - Malone L., Gatehouse H. and Tregidga E., 2001. Effects of time, temperature, and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a parasite of honeybee, *A. mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 258-268.
- 229 - Malone L.A., Burgess E.P.J., Christeller J.T. and Gatehouse H.S., 1998. In vivo responses of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato. *J. Insect Physiol.*, 44: 141–147.
- 230 - Manoja F. S., Mushongi A. A., Harvey J., Wainaina J., Wanjuki I., Ngeno R., Darnell R., Gnonlonfin B.G.J. and Massomo S.M.S., 2017. Potential of using host plant resistance, nitrogen and phosphorus fertilizers for reduction of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin accumulation in maize in Tanzania. *Crop Protection*, 93: 98-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.021>.
- 231 - Martin S.J., 1998. A population model of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecological Modelling*, 109 (3): 267-281.
- 232 - Martin S.J., 2001. The role of *Varroa* and viral patho-gens in the collapse of honey bee colonies: a mod- eling approach, *J. Appl. Ecol.*, 38: 1082–1093.
- 233 - Martin S.J., Highfield A.C., Brettell L., Villalobos E.M., Budge G.E., Powel M., Nikaido S. and Schroeder D.C., 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, p336.

- 234 - Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A.M., Garrido-Bailón E. and Higes M., 2007. The outcome of the colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00270-00207.
- 235 - Martín-Hernández R., Botías C., Barrios L., Martínez-Salvador A., Meana A., Mayack C. and Higes M., 2011. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.*, 109: 605-612.
- 236 - Martín-Hernández R., Meana A., García-Palencia P., Marín P., Botías C., Garrido-Bailón E., Barrios L. and Higes M., 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 2554-2557.
- 237 - Mau C., Poncet P.A., Bucher B., Stranzinger G. and Rieder S., 2004. Genetic mapping of dominant white (W), a homozygous lethal condition in the horse (*Equus caballus*). *J. Anim. Breed. Genet.*, 121: 374–383.
- 238 - Maurizio A., 1968. *Les plantes toxiques. In Traité de Biologie de l'Abeille.* Tome 4. Chauvin R. (ed.), Masson & Cie, Paris, pp : 279-284.
- 239 - Maxfield-Taylor S., Mujic A., Rao S., 2015. First detection of the larval chalkbrood disease pathogen *Ascospaera apis* in adult bumble bees. *PLoS ONE*, 10(4).
- 240 - Medina A. and Magan N., 2011. An Overview of Oat Contamination with Mycotoxins: Strategies for Their Control. *Nova Science Publishers Inc.*, pp: 97–124.
- 241 - Meixner M.D., Costa C., Kryger P., Hatjina F., Bouga M., Ivanova E. and Buchler R., 2010. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of apicultural research*, 49 (1): 85-92.
- 242 - Miguel I., Iriondo M., Garnery L., Sheppard W. and Estonba A., 2007. Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera*: role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial re-colonization routes in the western Europe. *Apidologie*, 38: 141 - 155.
- 243 - Miguel I., Baylac M., Iriondo M., Manzano C., Garnery L. and Estonba A., 2011. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*, 42: 150 – 161. doi:10.1051/apido/2010048

- 244 - Morgenthaler O., 1933. *Acarapis woodi* in queens. *Bee World*, vol.14, 81p.
- 245 - Morse R.A. and Calderon N.W., 2000. The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Cult.*, 128: 1–15.
- 246 - Muli E., Patch H., Frazier M., Frazier J., Torto, B., *et al.*, 2014. Evaluation of the distribution and impacts of parasites, pathogens, and pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) populations in East Africa. *PLoS ONE* 9(4). e94459. doi:10.1371/journal.pone.0094459
- 247 - Muñoz R., Cepero A., Pinto M.A., Martín-Hernández R., Higes M. and De la Rúa P., 2014. Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. *Infection, Genetics and Evolution* 23: 161–168.
- 248 - Mutinelli F., Costa C., Lodesani M., Baggio A., Medrzycki P., *et al.*, 2010. Honey bee colony losses in Italy. *J. Apic. Res.*, 49(1): 119–120.
- 249 - Myers R.H., Montgomery D.C. and Vining G.G., 2002. *Generalized linear models, with applications in engineering and the sciences*. John Wiley and Sons Press, New York, 342p.
- 250 - Neumann P. and Elzen P.J., 2004. The biology of the small hive beetle (*Aethina tumida*, *Coleoptera: Nitidulidae*): gaps in our knowledge of an invasive species. *Apidologie*, 35 (3) : 229-247.
- 251 - Neumann P. and Carreck N.L., 2010. Honey bee colony losses. *Journal of apicultural research*, 49 (1): 1-6.
- 252 - Nguyen B.K., Mignon J., Laget D., De Graaf D.C., Jacobs F.J., *et al.*, 2010. Honey bee colony losses in Belgium during the 2008–9 winter. *J. Apic. Res.*, 49(4): 337–339.
- 253 - Nidhina N., Bhavya M.L., Bhaskar N., Muthukumar S.P. and Murthy P.S., 2017. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in rumen liquor and its implications. *Food Control*, 71: 26-31.
- <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.051>.
- 254 - OIE., 2013. *Chapter 2.2.4 Nosemosis of honey bees*. In: (OIE.) Office international des épizooties, Manual of standards for diagnostic test and vaccines 2014. volume 1, Paris, France, 6. <http://www.oie.int>

255 - OIE., 2014. *Chapter 2.2.2. American foulbrood of honey bees*. In: (OIE.) Office international des épizooties, Manual of standards for diagnostic test and vaccines 2014. Paris, France, 15p.

<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>

256 - Ongus J.R., Peters D., Bonmatin J.M., Bengsch E., Vlak J.M. and Van Oers M.M., 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, 85 (12): 3747-3755.

257 - Otoni C.G., Espitia P.J.P., Avena-Bustillos R.J. and McHugh T.H., 2016. Trends in antimicrobial food packaging systems: emitting sachets and absorbent pads. *Food Res. Int.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.018>.

258 - Page R.E. and Peng C.Y., 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36 : 695-711.

259 - Palacio M.A., Peña N., Clemente G., Ruffinengo S. and Escande A., 2007. Short communication. Viability and pathogenicity of *Ascosphaera apis* preserved in integral rice cultures. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5(4): 481-486

260 - Palmer K.A. and Oldroyd B.P., 2003. Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. *Naturwissenschaften*, 90 : 265–268.

261 - Park C., Kang H.S., Jeong J., Kang I., Choi K., Yoo M.S., Kim Y.H., Kang S.W., Lim H.Y., Yoon B.S. and Chae C., 2016. In-situ Hybridization for the Detection of Sacbrood Virus in Infected Larvae of the Honey Bee (*Apis cerana*). *Journal of Comparative Pathology*, 154(2-3):258-62.

262 - Paxton R.J., 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)?. *J. Apic. Res.*, 49: 80–84.

263 - Paxton R.J., Klee J., Korpela S. and Fries I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38(6): 558-565. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2007037>

- 264 - Peterson M., Gray A. and Teale A., 2010. Colony losses in Scotland in 2004–2006 from a sample survey. *J. Apic. Res.*, 48(2): 145–146.
- 265 - Pettis J., Vanengelsdorp D. and Cox-Foster D., 2007. Colony collapse disorder working group pathogen subgroup progress report. *American Bee Journal*, 147 (7): 595-597.
- 266 - Pettis J., vanEngelsdorp D., Johnson J. and Dively G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99 : 153–158.
- 267 - Peyvel Ch., 1994. L'espèce *Apis mellifera* : les grandes races géographiques. *Bull. Tech. Apic.* 21 : 129–138.
- 268 - Pimentel de Carvalho A.C. and Message D., 2004. A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* which causes sacbrood-like symptoms. *Apidologie*, 35 : 89-90.
- 269 - Pirk C.W.W., Human H., Crewe R.M. and VanEngelsdorp D., 2014. A survey of managed honey bee colony losses in the Republic of South Africa—2009 to 2011. *J. Apic. Res.*, 53(1): 35–42.
- 270 - Pitt J.I. and Taylor J.W., 2014. *Aspergillus*, its sexual states, and the new International Code of Nomenclature. 659. *Mycologia*, 106: 1051-1052.
- 271 - Pitt J.I., Taniwaki M.H. and Cole M.B., 2013. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control*, 32: 205–215.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.023>.
- 272 - Pornpukdeewattana S., Kerdpiboon S., Jindaprasert A., Pandee P., Teerarak M. and Krusong W., 2017. Upland rice vinegar vapor inhibits spore germination, hyphal growth and aflatoxin formation in *Aspergillus flavus* on maize grains. *Food Control*, 71: 88-93.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.030>
- 273 - Porrini M.P., Sarlo E.G., Medici S.K., Garrido P.M., Porrini D.P., Damiani N. and Eguaras M.J., 2011. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *J. Apicult. Res.*, 50: 35-41.

- 274 - Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O. and Kunin W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and evolution*, 25 (6).
- 275 - Prakash B., Kedia A., Mishra P.K. and Dubey N.K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – potentials and challenges. *Food Control*, 47: 381–391. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>.
- 276 - Puerta F., Flores J.M., Ruiz J.A., Ruiz J.M. and Campano F., 1999. Fungal diseases of honeybee *In* : Bee Disease Diagnosis, Colin, M.E., Ball, B.V., Kilani, M. (eds). Options Méditerranéennes, Séries B : Etudes et Recherches. N°25. CIHEAM Publications, Zaragoza, pp: 61-69.
- 277 - Puerta F., Flores J.M., Ruiz J.A., Ruiz J.M. and Campano F., 2001. Enfermedades de las abejas. Prevención, diagnóstico y tratamiento. (Eds.), COAG – Andalucía. *Consejería de Agricultura y Pesca*. Junta de Andalucía
- 278 - Renata A.S., Julia R. F., Leellen F.S. and Italo D.Jr., 2015. Impacts of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) on the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 129: 7-12.
- 279 - Retschnig G., Neumann P. and Williams G.R., 2014. Thiacloprid–*Nosema ceranae* interactions in honey bees: Host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *Journal of Invertebrate Pathology*, 118 : 18–19
- 280 - Reynaldi F.J., Lucia M. and Genchi Garcia M.L., 2015. *Ascospaera apis*, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees (*Xylocopa augusti*): First report in South America. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32 (4) : 261–264.
- 281 - Ribière M., Ball B. and Aubert M., 2008. *Natural history and geographical distribution of honey bee viruses*. *In* : Virology and the Honey bee. Aubert M. , Ball B. , Fries I. , Moritz R., Milani N. and Bernardinelli I., Editors. European Commission.
- 282 - Rinderer T.E. and Sylvester H.A., 1978. Variation in response to *Nosema apis*, longevity, and hoarding behavior in a free-mating population of the honey bee. *Ann Entomol Soc Am*, 71:372-374.

- 283 - Rocha A.D., De Oliveira A.B., De Souza Filho J.D., Lombardi J.A. and Braga F.C., 2004. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytother. Res.*, 18: 463–467. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1452>.
- 284 - Rodriguez-Lopez D., Ahumada D.A., Díaz A.C. and Guerrero J.A., 2014. Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*, 37: 33-40.
- 285 - Root A.I. and Root E.R., 1935. *The ABC and XYZ bee culture, a cyclopedia of everything pertaining to the care of the honeybee: bees, hives, honey, selling honey, implements, etc. Facts gleaned from the experience of thousands of beekeepers, and afterward verified by the authors*. Ed. Root A.I. and Root E.R., The A.I. Root Company, 815 p.
- 286 - Rossi C.O. and Carranza M.R., 1980. Momificación de larvas de abeja (*Apis mellifera* L.) provocada por *Ascospaera apis*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 56 : 11-15.
- 287 - Roussy L., 1962. Nouvelles contributions à l'étude du *Pericystis apis*. *Gazette Apicole*, 63: 101-105.
- 288 - Ruffinengo S., Pena N.I., Clemente G., Palacio M.A. and Escande A., 2000. Suitability of culture media for the production of ascospores and maintenance of *Ascospaera apis*. *J. Apicult. Res.*, 39: 143–148.
- 289 - Ruttner F., 1988, Biogeography and Taxonomy of Honey Bees. *Springer*, Berlin.
- 290 - Ruttner R., Tassencourt L. and Louveaux J., 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 9 (4): 363 - 381.
- 291 - Ryabov E.V., Wood G.R., Fannon J.M., Moore J.D., Bull J.C., Chandler D., *et al.*, 2014. A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or In Vitro, transmission. *PLoS Pathog.*, 10(6). e1004230. doi:10.1371/journal.ppat.1004230
- 292 - Ryba S., Titera D., Haklova M. and Stopka P., 2009. A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. *Veterinary Microbiology*, 139 : 193–196.

- 293 - Sabatini A.G., 2005. L'abeille bio-indicateur : L'abeille, sentinelle de l'environnement. *Biodiversité, Abeilles et vie*, (18) :12-16.
- 294 - Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J., *et al.*, 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78: 141–173.
- 295 - Schäfer M.O., Genersch E., Fünfhaus A., Poppinga L., Formella N., Bettin B. and Karger A., 2014. Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, 170 (3–4): 291–297.
- 296 - Schmidt J.O., Thoenes S.C. and Levin M.D., 1987. Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *Annals of the Entomological Society of America*, 80(2): 176-183.
- 297 - Seely T.D. and Morse R.A., 1976. The nest of the honey bee *Apis mellifera* L. *Insect Soc.*, 23: 495–512.
- 298 - Sheikh-Ali S.I., Ahmad A., Mohd-Setapar S.-H., Zakaria Z.A., Abdul-Talib N., Khamis A.K. and Hoque M.E., 2014. The potential hazards of *Aspergillus* sp. in foods and feeds, and the role of biological treatment: a review. *J. Microbiol.*, 52: 807–818.
- <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-014-4294-7>.
- 299 - Shimanuki H., Calderone N.W. and Knox D.A., 1994. Parasitic mite syndrome: the symptoms. *American Bee Journal*, 134 (12): 827-828.
- 300 - Siede R., Berg S. and Meixner M., 2008. *Effects of symptomless infections with Nosema sp. on honey bee colonies*. In: OIE – Symposium Diagnosis and Control of Bee Diseases, August 26–28. Freiburg, Germany
- 301 - Simoens C., 2005. Qualité nutritive du pollen de tournesol. *Compte-Rendu du 2ème Colloque technique apicole*, Lyon. BASF Agro (ed.), Ecully, France, p. 45-56.
- 302 - Simone-Finstrom M. and Spivak M., 2010. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41: 295–311.

- 303 - Simone-Finstrom M. and Spivak M., 2013. Increased resin collection after parasite challenge: a case of self-medication in honey bees? *PLoS One*, 7 (3). e34601. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034601>.
- 304 - Soerensen P.E., 2009. Breeding *Nosema*-free colonies in Denmark. *Proceedings APImondia 41st Congress*, Montpellier, France, p. 132.
- 305 - Song W., Liang J., Wen T., Wang X., Hu J., Hayat T., Alsaedi A. and Wang X., 2016. Accumulation of Co (II) and Eu (III) by the mycelia of *Aspergillus niger* isolated from radionuclide-contaminated soils. *Chemical Engineering Journal*, 304: 186–193.
- 306 - Soroker V., Hetzroni A., Yakobson B., David D., David A., *et al.*, 2010. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie*, 42: 192–199.
- 307 - Soroker V., Hetzroni A., Yakobson B., David D., David A., Voet H., Slabezki Y., Efrat H., Levski S., Kamer Y., Klinberg E., Zioni N., Inbar S. and Chejanovsky N., 2011. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie*, 42 : 192–199.
- 308 - Spivak M., Gilliam M., 1993. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *J Apicult Res*, 32: 147-157.
- 309 - Spivak M., Gilliam M., 1998. Hygienic behaviour of honeybees and its application for control of brood diseases and varroa. Part 1: Hygienic behaviour and resistance to American Foulbrood. *Bee World*, 79: 124-134.
- 310 - Spivak M. and Reuter G., 1998. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, 32 (6) :555-565.
- 311 - Spleen A.M., Lengerich E.J., Rennich K., Caron D., Rose R., *et al.*, 2013. A national survey of managed honey bee 2011–12 winter colony losses in the United States : results from the Bee Informed Partnership. *J. Apic. Res.*, 52(2): 44–53.
- 312 - Spürgin A., 2008. *Guide de l'abeille*. Paris, Delachaux et Niestlé, 126 p.

- 313 - Steinhauer N.A., Rennich K., Wilson M.E., Caron D.M., Lengerich E.J., *et al.*, 2014. A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership 2012–2013. *J. Apic. Res.*, 53(1): 1–18.
- 314 - Suchail S., Guez D. and Belzunces L.P., 2000. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19 : 1901–1905.
- 315 - Suwannapong G., Maksong S., Seanbualuang P. and Benbow M.E., 2010. Experimental infection of red dwarf honeybee, *Apis florea*, with *Nosema ceranae*. *J. Asia Pacific Entomol.*, 13: 361-364.
- 316 - Svensson E.I., Råberg L., 2010. Resistance and tolerance in animal enemy–victim coevolution. *Trends Ecol. Evol.* 25 : 267–274.
- 317 - Takamatsu D., Morinishi K., Arai R., Sakamoto A., Okura M. and Osaki M., 2014. Typing of *Melissococcus plutonius* isolated from European and Japanese honeybees suggests spread of sequence types across borders and between different *Apis* species. *Veterinary Microbiology*, 171: 221–226.
- <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.036>
- 318 - Tarpy D.R., 2003. Genetic diversity within honey bee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proceedings of the royal society of london B270*, pp : 99-103.
- 319 - Taylor J.W., Göker M., Pitt J.I., 2016. Choosing one name for pleomorphic fungi: The example of *Aspergillus versus Eurotium, Neosartorya* and *Emericella*. *Taxon*, 65: 593-601.
- 320 - Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E. and Bergoin M., 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera L.* and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and environmental microbiology*, 70 (12) :7185-7191.
- 321 - Thienpont D., Rochette F. et Vanparisjs O., 1995. *Le diagnostic des verminoses par examen corpologique*. Janssen research foundation, Beerse, Belgique.
- 322 - Thiruvankadan A.K., Kandasamy N. and Panneerselvam S., 2008. Coat color inheritance in horses. *Livestock. Sci.*, 117: 109–129. - Thomas M.C., 1998. Pest alert: small hive beetle. *American Bee Journal*, 138 (8), p565.

- 323 - Thompson H.M. and Maus C., 2007. The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. *Pest Manag Sci.*, 63 (11): 1058-61.
- 324 - Topolska G., Gajda A., Pohorecka K., Bober A., Kasprzak S., *et al.*, 2010. Winter colony losses in Poland. *J. Apic. Res.*, 49 (1): 126–128.
- 325 - Totti S., Fernandez M., Ghini S., Pico Y., Fini F., Manes J., *et al.*, 2006. Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honey bees by liquid chromatography-mass spectrometry detection. *Talanta*, 69: 724-729.
- 326 - Traver B.E. and Fell R.D., 2011. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107: 43–49.
- 327 - Traver B.E., Williams M.R. and Fell R.D., 2012. Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109: 187–193.
- 328 - VanEngelsdorp D., Underwood R., Caron D. and Hayes J., 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *Am. Bee J.*, 147: 599–603.
- 329 - VanEngelsdorp D., Hayes J., Underwood R.M. and Pettis J., 2008. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS One* . doi:10.1371/journal.pone.0004071
- 330 - VanEngelsdorp D., Hayes J., Underwood R. and Pettis J., 2010. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *J. Apic. Res.*, 49(1): 7–14.
- 331 - VanEngelsdorp D., Hayes J., Underwood R.M., Caron D. and Pettis J.S., 2011. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2009 to spring 2010. *J. Apic. Res.*, 50(1): 1–10.
- 332 - VanEngelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpy D.R. and Pettis J.S., 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*, 4, e6481.

- 333 - VanEngelsdorp D., Caron D., Hayes J., Underwood R., Henson M., *et al.*, 2012. A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *J. Apic. Res.*, 51(1): 115–124.
- 334 - Van Der Zee R., 2010. Colony losses in the Netherlands. *J. Apic. Res.*, 49(1): 121–123.
- 335 - Van Der Zee R., Pisa L., Andonov S., Brodschneider R., Charriere J.D., *et al.*, 2012. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 1009–10. *J. Apic. Res.*, 51(1) : 100–114.
- 336 - Van Der Zee R., Gray A., Holzmann C., Pisa L., Brodschneider R., *et al.*, 2013. Standard survey methods for estimating colony losses and explanatory risk factors in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.*, 52(4): 1–36.
- 337 - Van Der Zee R., Brodschneider R., Brusbardis V., Charrre J.-D., Chlebo R., *et al.*, 2014. Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012–2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. *J. Apic. Res.*, 53 (1): 19–34.
- 338 - Vejsnæs F., Nielsen S.L. and Kryger P., 2010. Factors involved in the recent increase in colony losses in Denmark. *J. Apic. Res.*, 49(1): 109–110.
- 339 - Vidal-Naquet N., 2012. Les maladies de l'abeille domestique d'élevage, *Apis mellifera* L. *Bulletin ed l'académie vétérinaire de France*, Tome 165, N°4.
- 340 - Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Vignes B., Brunet J.L., Texier C., Biron D., Blot N., Alaoui E., Belzunces L. and Delbac F., 2011 Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One*, 6, e21550.
- 341 - Villemand C., Haxaire J. et Straito J.C., 2006. La découverte du frelon asiatique *Vespa velutina*, en France. *Insectes* 143 (4) : 3-7.
- 342 - Vojvodic S., Jensen A.B., Markussen B., Eilenberg J. and Boomsma J.J., 2011. Genetic Variation in Virulence among Chalkbrood Strains Infecting Honeybees. *PLoS One*, 6 : e25035.

- 343 - Wang Q., Gan X., Zang R., Chai Y., Yuan Y. and Yuan R., 2016. An amplified electrochemical proximity immunoassay for the total protein of *Nosema bombycis* based on the catalytic activity of Fe₃O₄NPs towards methylene blue. *Biosensors and Bioelectronics*, 81: 382-387.
- 344 - Webster T., Pomper K., Hunt G., Thacker E. and Jones S. 2004. *Nosema apis* infection in worker and queen *A. mellifera*. *Apidologie*, 35: 49-54.
- 345 - Werner T., Liu G., Kang D., Ekengren S., Steiner H. and Hultmark D., 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 13772–13777.
- 346 - Wieggers F.P., 1986. *Transmission of honeybee viruses by Varroa jacobsoni Oud. European research on varroa control*, Udine, Italy. Cavalloro, R. Editions, Commission of the European Communities, Joint Research Centre, Ispra, Luxembourg.
- 347 - Williams D.L., 2000. A veterinary approach to the European honey bee (*Apis mellifera*). *Vet J.*, 160 (1) : 61-73.
- 348 - Williams G.R., Dietemann V., Ellis J.D. and Neumann P., 2012. Standard methodologies for *Apis mellifera* research”. An update on the COLOSS network and the “BEEBOOK: *Journal of Apicultural Research*, 51(2): 151-153.
<http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.2.01>
- 349 - Williams G.R., Shafer A.B., Rogers R.E., Shutler D. and Stewart, D.T., 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *J. Invertebr. Pathol.*, 97: 189-192.
- 350 - Williams G.R., Alaux C., Costa C., Csáki T., Doublet V., Eisenhardt D., Fries I., Kuhn R., McMahon D.P., Medrzycki P., Murray T.E., Natsopoulou M.E., Neumann P., Oliver R., Paxton R.J., Pernal S.F., Shutler D., Tanner G., Van Der Steen J.J.M., Brodschneider R., 2013. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1).
<http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>

- 351 - Wilson M.B., Spivak M., Hegeman A.D., Rendahl A. and Cohen J.D., 2013. Metabolomics reveals the origins of antimicrobial plant resins collected by honey bees. *PLoS One*, 8 (10). e77512. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077512>.
- 352 - Wilson M.B., Brinkman D., Spivak M., Gardner G. and Cohen J.D., 2015. Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124 : 44–50.
- 353 - Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N.H. and Starks P.T., 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Ann. Rev. Entomol.*, 54: 405–423.
- 354 - Winston M.L., 1987. *The Biology of the Honey Bee*. University Press, Cambridge.
- 355 - Woyciechowski M. and Moron D., 2009. Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). *Insect. Soc.*, 56: 193-201.
- 356 - Yang X. and Cox-Foster D., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, 102 (21): 7470-7475.
- 357 - Yang X. and Cox-Foster D.L., 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology*, 134: 405–412.
- 358 - Yoshiyama M. and Kimura K., 2011. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 263–267.
- 359 - Yue C. and Genersch E., 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 86 (12): 3419-3424.
- 360 - Zander E., 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung*, 31: 196–204.

Annexes

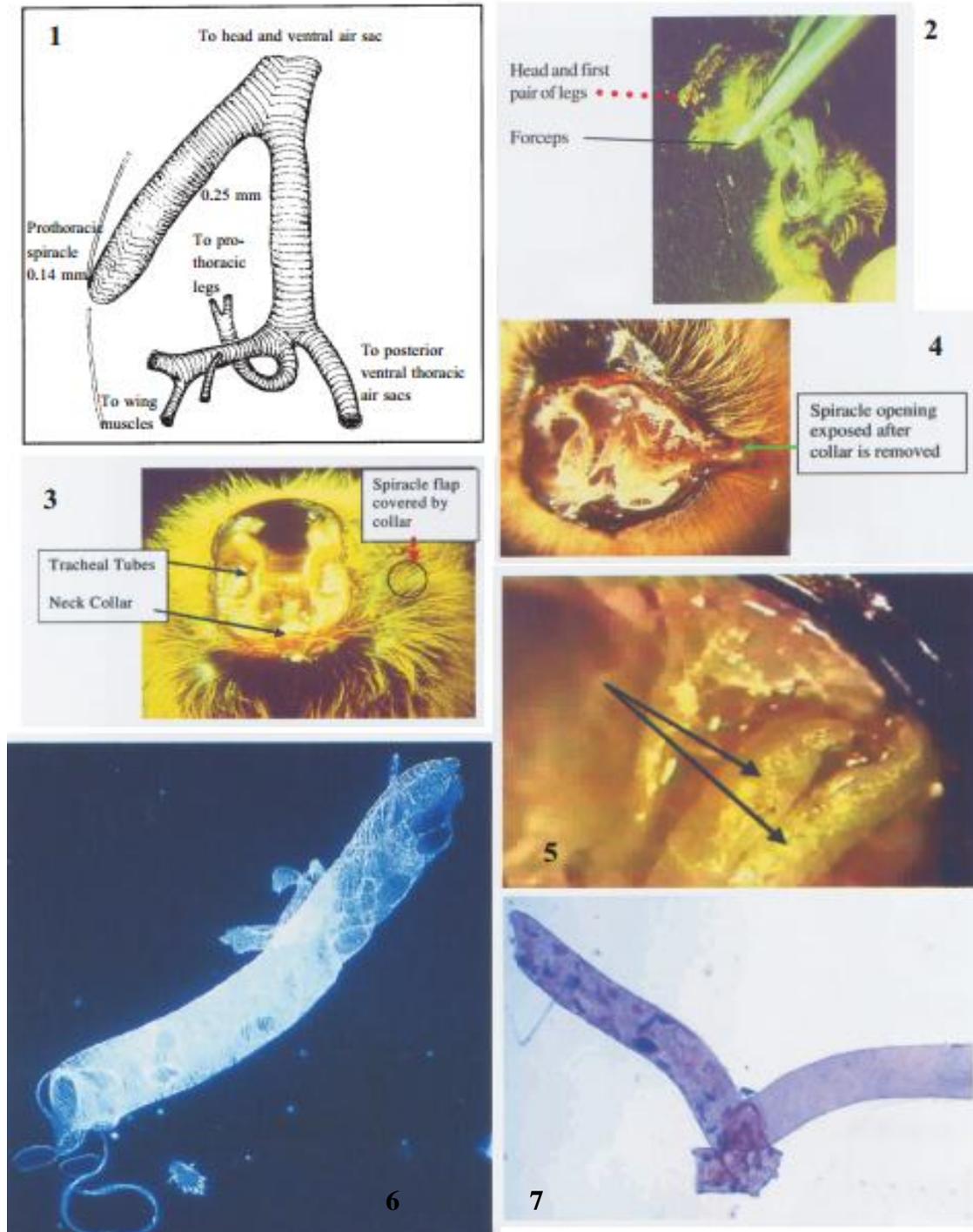
Annexe 1

Fig. 1 : Trachée prothoracique d'une abeille (dessin D. Sammataro). **Fig. 2** : Première étape : Tenir l'abeille par le thorax et utiliser des pinces fines pour retirer l'abdomen, la tête et la première paire de pattes (photographie L. Royce). **Fig. 3** : Deuxième étape : le col cervical doit être tiré librement pour observer les tubes situés en dessous. Les tubes trachéaux et le col sont clairement visibles. Tous les tubes sont dépourvus d'acariens dans cette photo (photographie L. Royce). **Fig. 4** : Troisième étape : La trachée prothoracique est visible. Tous

les tubes sont dépourvus d'acariens dans cette photo (photographie L. Royce). **Fig. 5** : Quatrième étape : en augmentant le grossissement des tubes, on peut voir plus clairement la présence d'acariens. Les ombres et les débris dans les tubes trachéaux sont des acariens trachéaux (flèches) (photographie D. Sammataro). **Fig. 6** : Micrographie en champ sombre d'un tube trachéal plein d'acariens et d'oeufs (photographie D. Sammataro). **Fig. 7** : Les tubes trachéaux colorés par bleu de méthylène illustrent l'aspect d'un tronc trachéal. A gauche : tronc trachéal infesté par l'acarien. A droite : tronc trachéal non infesté (photographie D. Sammataro).



Fig8. Système trachéen sain chez l'abeille tellienne *Apis mellifera intermissa* (originale)

Annexe 2

Fig 1. Nid de guêpe germanique *Vespula germanica* observé dans la région de Larbaa (Blida) (originale)

Annexe 3

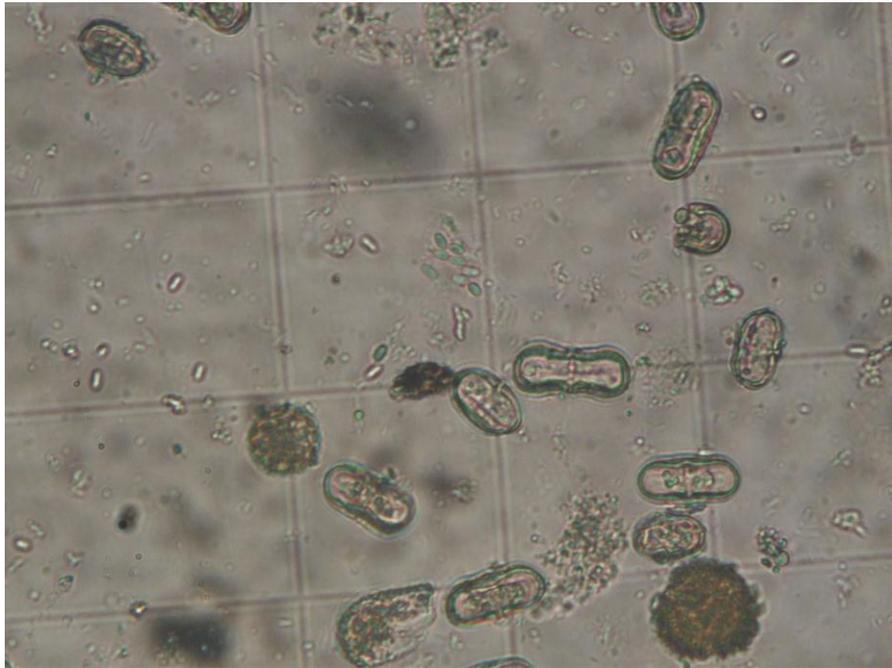


Fig. 1 : Les spores de *Nosema* observées sous microscope dans la cellule de Malassez (Grossissement X 400) (originale)

Annexe 4

- Préparation des échantillons pour la détection de *Paenibacillus larvae*

La méthode de Lindstrom et Fries (2005) est utilisée dans la détection de la bactérie *Paenibacillus larvae*. Ecraser soigneusement à l'aide d'un mortier les intestins d'abeilles, après filtration, placer l'échantillon dans un tube à essai et ajouter 20 ml de l'eau physiologique. Le mélange obtenu est centrifugé pendant 10 minutes. Le culot est récupéré et mélanger avec 12 ml de NaCl stérile (13 g/litre). L'échantillon est incubé pendant 10 minutes à 85 °C. Ensuite 10 µl de la suspension est inoculée sur les plaques MYPGP-agar. La lecture des résultats s'effectuera après avoir incubé ce dernier échantillon pendant 7 jours à 36°C, avec 5 % de CO₂. Sur la gélose MYPGP, les colonies de la bactérie *Paenibacillus larvae* sont petites, régulières, en général rugueuses, plates, blanchâtres ou beiges.

Annexe 5

- Résultats de la procédure GENMOD

Le Système SAS

00:00 Tuesday, March 15, 1994 1

The GENMOD Procedure

Informations sur le modèle

Data Set	WORK.INSURE
Distribution	Binomial
Link Function	Logit
Dependent Variable	PRS
Observations Used	105

Informations sur les niveaux de classe

Classe	Niveaux	Valeurs
REGIONS	11	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
RUCHERS	3	1 2 3

Profil de réponse

Valeur ordonnée	PRS	Fréquence totale
1	0	71
2	1	34

PROC GENMOD is modeling the probability that PRS='0'. One way to change this to model the probability that PRS='1' is to specify the DESCENDING option in the PROC statement.

Criteria For Assessing Goodness Of Fit

Critère	DDL	Valeur	Value/DF
Deviance	81	81.7557	1.0093
Scaled Deviance	81	81.7557	1.0093
Pearson Chi-Square	81	74.0000	0.9136
Scaled Pearson X2	81	74.0000	0.9136
Log Likelihood		-40.8778	

Analysis Of Parameter Estimates

Paramètre		DDL	Estimation	Erreur type	Wald 95% Confidence Limits		Chi 2	Pr > Chi 2
REGIONS	10	1	-23.2859	1.7678	-26.7506	-19.8211	173.51	<.0001
REGIONS	11	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	1	-23.9790	0.0000	-23.9790	-23.9790	.	.
RUCHERS(REGIONS)	2	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	4	-0.0000	144053.7	-282340	282340.0	0.00	1.0000
RUCHERS(REGIONS)	2	4	-24.6722	0.0000	-24.6722	-24.6722	.	.
RUCHERS(REGIONS)	3	4	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	5	24.6722	185972.5	-364475	364524.0	0.00	0.9999
RUCHERS(REGIONS)	2	5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	6	0.0000	2.0000	-3.9199	3.9199	0.00	1.0000
RUCHERS(REGIONS)	2	6	25.3653	227768.9	-446393	446444.1	0.00	0.9999
RUCHERS(REGIONS)	3	6	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	7	-24.5180	0.0000	-24.5180	-24.5180	.	.
RUCHERS(REGIONS)	2	7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	8	-0.9808	1.4434	-3.8098	1.8481	0.46	0.4968
RUCHERS(REGIONS)	2	8	-2.7726	1.5811	-5.8716	0.3264	3.07	0.0795
RUCHERS(REGIONS)	3	8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	9	0.9808	1.4434	-1.8481	3.8098	0.46	0.4968
RUCHERS(REGIONS)	2	9	24.9599	161056.9	-315641	315690.7	0.00	0.9999
RUCHERS(REGIONS)	3	9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	10	25.3653	0.0000	25.3653	25.3653	.	.
RUCHERS(REGIONS)	2	10	0.0000	227769.1	-446419	446419.3	0.00	1.0000
RUCHERS(REGIONS)	3	10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
RUCHERS(REGIONS)	1	11	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale		0	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000	.	.

e: The scale parameter was held fixed.

LR Statistics For Type I Analysis

Source	Deviance	DDL	Chi 2	Pr > Chi 2
Intercept	132.2386			
REGIONS	102.0088	10	30.23	0.0008
RUCHERS(REGIONS)	81.7557	13	20.25	0.0891

Annexe 6

Le Système SAS

00:00 Tuesday, March 15

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalite

Source	DDL	Type I SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
races	1	3151.041667	3151.041667	20.32	0.0003
repetition	2	700.000000	350.000000	2.26	0.1351
jour	3	2278.125000	759.375000	4.90	0.0124

Source	DDL	Type III SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
races	1	3151.041667	3151.041667	20.32	0.0003
repetition	2	700.000000	350.000000	2.26	0.1351
jour	3	2278.125000	759.375000	4.90	0.0124

Annexe 7

Le Système SAS

00:00 Tuesday, March 15

The GLM Procedure

Niveau de races	Nb	-----mortalite-----	
		Moyenne	Écart-type
1	12	30.8333333	20.5419010
2	12	7.9166667	9.4046249

Annexe 8

Le Système SAS

00:00 Tuesday, March

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalite

Source	DDL	Type I SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Treatment	1	0.0416667	0.0416667	0.00	0.9468
repetition	2	18.2500000	9.1250000	1.00	0.3872
jour	3	159.7916667	53.2638889	5.86	0.0061

Source	DDL	Type III SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Treatment	1	0.0416667	0.0416667	0.00	0.9468
repetition	2	18.2500000	9.1250000	1.00	0.3872
jour	3	159.7916667	53.2638889	5.86	0.0061

Le Système SAS

The GLM Procedure

Niveau de Treatment	Nb	-----mortalite-----	
		Moyenne	Écart-type
1	12	6.16666667	4.10838020
2	12	6.08333333	3.65459445

The GLM Procedure
Least Squares Means

Treatment	mortalite LSMEAN
1	6.16666667
2	6.08333333

Annexe 9

Le Système SAS

00:00 Tuesday, 1

The GLM Procedure

ndent Variable: mortalite

Source	DDL	Type I SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Treatment	1	15.04166667	15.04166667	10.35	0.0051
repetition	2	7.75000000	3.87500000	2.67	0.0984
jour	3	44.12500000	14.70833333	10.12	0.0005

Source	DDL	Type III SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Treatment	1	15.04166667	15.04166667	10.35	0.0051
repetition	2	7.75000000	3.87500000	2.67	0.0984
jour	3	44.12500000	14.70833333	10.12	0.0005

Le Système SAS

The GLM Procedure

Niveau de Treatment	Nb	-----mortalite----- Moyenne	Écart-type
1	12	1.58333333	1.88092498
2	12	3.16666667	1.85047087

The GLM Procedure
Least Squares Means

Treatment	mortalite LSMEAN
1	1.58333333
2	3.16666667

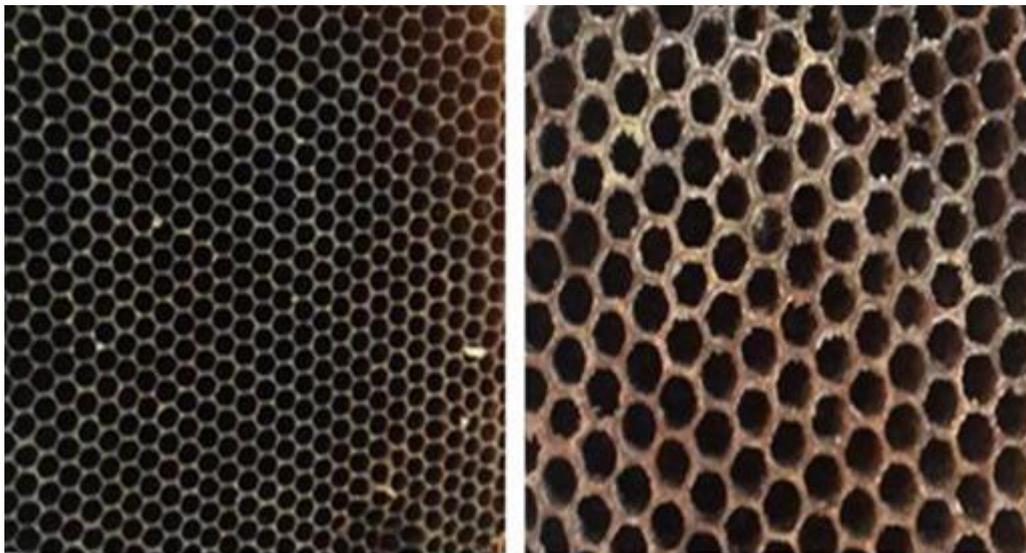
Annexe 10

Fig. 1: La cire battue quittée par les ouvrières, prélevée à l'intérieur des ruches (originale)

Annexe 11

Fig. 1 : Des abeilles mortes à l'intérieur des colonies, les têtes enfoncées dans les alvéoles (originale)

Annexe 12

Fig. 1 : Le rucher situé dans la station de Bouchaoui (Alger) (Originale)

EVALUATION OF ACUTE TOXICITY OF THIAMETHOXAM IN ALGERIAN HONEYBEE *APIS MELLIFERA INTERMISSA* AND *APIS MELLIFERA SAHARIENSIS*

NORA CHAHBAR¹, MOHAMED CHAHBAR² & SALAHEDDINE DOUMANDJI³

¹Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara, Boumerdes, Algérie

^{2,3}Département de Zoologie Agricole et Forestière, Ecole Nationale Supérieure Agronomique

El-Harrach, Alger, Algérie

ABSTRACT

Thiamethoxam [3-(2-chlorine-1, 3-thiazole-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro) amine], a systemic insecticide of the group of neonicotinoids with a large spectrum of action at low concentrations. It is used in the control of sucking insects and some chewing species, because of its excellent absorption and translocation in plants. The acute toxicity of contact and oral applications on two *Apis mellifera* subspecies, *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis* was investigated. In all toxicological studies, each dose included three cages of 20 individuals and each study was replicated three times. The dose–mortality relation revealed directly proportional relationship between the administered dose of thiamethoxam and mortality observed. The mortality is reached maximum at 24 hours after treatment with doses above 50 ng / bee after oral application. Response kinetics showed classic kinetics. The higher the dose of thiamethoxam and faster is high mortality appears. After oral intoxication, the LD50 values of thiamethoxam at 24h were about 12,3 ng/bee for *A. m. intermissa* and 13.3 ng/bee for *A. m. sahariensis*. After contact application, the LD50 values at 24 h were approximately 26 ng/bee for *A. m. intermissa* and 43.3 ng/bee for *A. m. sahariensis*.

KEYWORDS: Thiamethoxam, *Apis mellifera intermissa*, *Apis mellifera sahariensis*, Honeybees, Lethal Dose, Acute Toxicity

INTRODUCTION

The place of bees in the environment has many aspects; agronomic, economic, ecological and scientific. It plays an important economic role as a carrier of beekeeping (honey, royal jelly, pollen, propolis and wax) and agriculture by providing a quantitative and qualitative increase crop (Vaissiere 2002; Haubruge *et al.*, 2006; Breeze *et al.*, 2011). With its complex social behavior, the honeybee is one of the best scientific models to study the learning functions, memory and orientation, particularly in the activity of chiseling. In addition, an ecological point of view, this is a useful insect bio- indicator of high environmental sensitivity because it is in contact with pollutants from various sources (Kevan, 1999). Bees can get in contact with pesticides when foraging in treated crops. Of weakening phenomena apiaries with a decrease in activity without the observation of pathogens (Faucon & Colin, 1983). In Algeria, for ten years, beekeepers observed serious disturbances in their colonies and highlight the responsibility of some insecticides used in crop protection. Indeed, many beekeepers indicate a weakening or even a total depopulation of the hive.

This may be due to alterations in the nervous system of bees, especially since 90% of the insecticides used in agricultural and forest areas have neurotoxic properties. Thiamethoxam is the first representative of the second generation neonicotinoid and belongs to the subclass of thianicotinyls (Maienfisch *et al.*, 1999). It has exceptional systemic features

and a strong preventive effect against the transmission of the virus. Thiamethoxam show long-lasting residual activity (Maienfisch *et al.*, 2001).

The objective of this study was to evaluate of the acute effects of thiamethoxam to honeybee workers. Its intrinsic toxicity was studied by determining the laboratory-based median lethal dose (LD) after oral and contact applications in local honeybees *Apis mellifera intermissa* Buttel-Reepen, 1906 and *Apis mellifera sahariensis* Baldensperger, 1924. Mortality kinetics were also studied using different thiamethoxam doses. The acute toxicity of insecticides allows the determination of a sublethal level. This sublethal level is important to study the chronic toxicity of insecticides and their adverse sublethal effects than can induce a deleterious impact on honeybee populations.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Thiamethoxam is marketed under the brand Actara for foliar and soil and Cruiser seed treatment (Maienfisch *et al.*, 2001). It is 99.7% purity and was obtained from the office Syngenta Algeria. For each subspecies, bee workers (*A. m. intermissa* and *A. m. Sahariensis*) were captured from honey and pollen combs in a same healthy queen-right colony for all bio assays; all drones were discarded. Immediately before treatment, bees were anesthetized with carbon dioxide and kept in cages (10, 5 X 7, 5 X11, 5 cm) in a temperature-controlled chamber at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ with $60 \pm 10\%$ relative humidity. Bees were fed with candy and water ad libitum (EPPO, 1992).

Experimental Conditions

In each experiment, three cages of 20 bees were used for each dose of treatment. Experiments were replicated at least three times; control mortality was less than 15% in all experiments (EPPO, 1993).

Modes of Treatment

Oral Application: The honeybees were deprived of food for 2h before administration of thiamethoxam. Thiamethoxam solutions were prepared in a 1% acetone solution and then diluted 10-fold in the 50% (w/v) feeding sucrose solution. The final concentration of acetone solution in the sucrose solutions of control and assay tests was 0.1% (v/v). The dosing solutions were prepared fresh for each test. Each bee received 10 μl of 50% sucrose solution (vehicle) containing graded doses of thiamethoxam or the dosing vehicle alone (control). After consuming this solution, bees were fed with candy and water ad libitum. Mortality was recorded at 24, 48 and 72 h.

Contact Application: One microliter of insecticide solution in 100% acetone solution (vehicle) was applied with a microsyringe on the dorsal thorax. After the application, all bees were fed with candy and water ad libitum. Control bees received 1 μl of the vehicle. Bee mortality was recorded 24, 48 and 72 h after topical application.

Data Analysis

Mortality data were corrected according to Abbott (1925). The LD50 values are obtained by probit transformation of mortality rates. One-way analysis of variance was used to evaluate differences between groups.

RESULTS

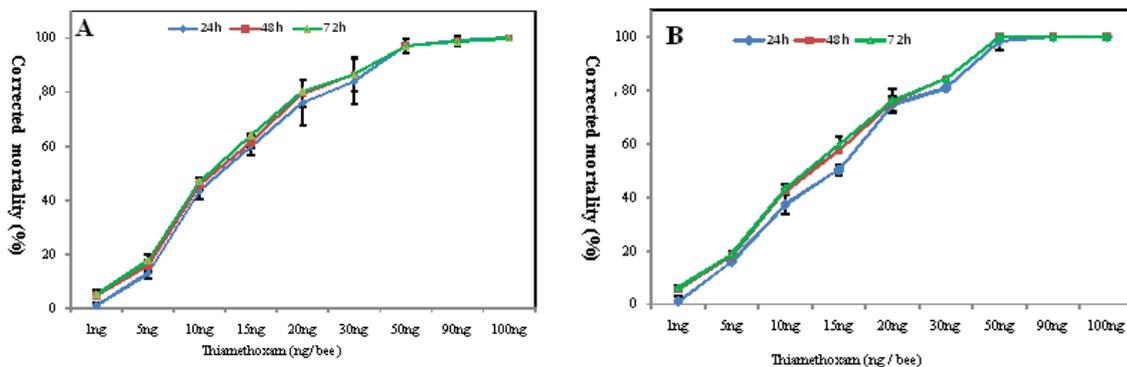
Observation of Symptoms Induced by Thiamethoxam

The toxicity of thiamethoxam to bee workers was investigated with different application modes. In all

toxicological studies, each dose included three cages of 20 individuals and each study was replicated three times. Both *A. m. intermissa* and *A. m. sahariensis* exhibited neurotoxic symptoms such as trembling, tumbling, and lack of coordination within 24 h of thiamethoxam exposure. We also noted the appearance of the first cases of mortality, already 15 minutes after ingestion of high doses of toxic by both honeybees subspecies.

Oral Toxicity

The results of acute oral toxicity in *A. m. intermissa* and *A. m. sahariensis* are shown in Figure 1 A and B. The character increases for the two both subspecies according to the administered dose. Indeed, there is a directly proportional relationship between the administered dose of thiamethoxam and mortality observed. The mortality is reached maximum at 24 hours after treatment with doses above 50 ng / bee mortality maximum is reached after 48 hours (Figure 1). For doses between 15 and 20 ng / bee, reported mortality rates exceed 50% for the two races of bees. But 100% mortality are achieved with a dose of 100 ng / bee for *A. m. intermissa* after 24 hours and with a dose of 50 ng / bee for *A. m. sahariensis* after 48 hours of treatment. Doses of 5 and 10 ng / bee generate mortality in the population of *A. m. intermissa* development experience 13% and 43% after 24 hours. Similarly to *A. m. sahariensis* at doses of 5 and 10 ng / bee mortality rates are generated by 16% and 37 % after 24 hours (Figure 1B). Small variations in terms of mortality between repetitions are observed as evidenced by the low standard deviations. Indeed, it should be noted that for some experiments the maximum mortality is reached after 24 hours of treatment. Thus the dose - mortality curves are superimposed relationship. The results of ANOVA analysis ($p < 0.0001$) show that the treatment effect is highly significant in terms of the sensitivity for thiamethoxam *A. m. intermissa* and *A. m. sahariensis*.



A: *Apis mellifera intermissa*; **B:** *Apis mellifera sahariensis*. Bee Mortality Observed 24, 48 h and 72 h after Oral Application of Different Thiamethoxam Doses. Data Represented the Means ± SD of Three Experiments Performed in Triplicate. The Absence of Error Bars Corresponds to SD = 0

Figure 1: Dose Response Relation Resulting from Oral Exposure to Thiamethoxam

Kinetics of Mortality

The kinetics of mortality are shown in Figure 2 A and B. The aspect of this is classic kinetics. The higher the dose of thiamethoxam and faster is high mortality appears. For *A. m. intermissa*, the maximum mortality is reached 24 hours after ingestion of thiamethoxam to between 30 and 100 ng / bee (Figure 2A). For *A. m. sahariensis*, 100% mortality are achieved after 24 hours at doses of 90 and 100 ng / bee for when doses between 20 and 50 ng / bee mortality maximum occurs 48 hours after ingestion of thiamethoxam (Figure 2B).

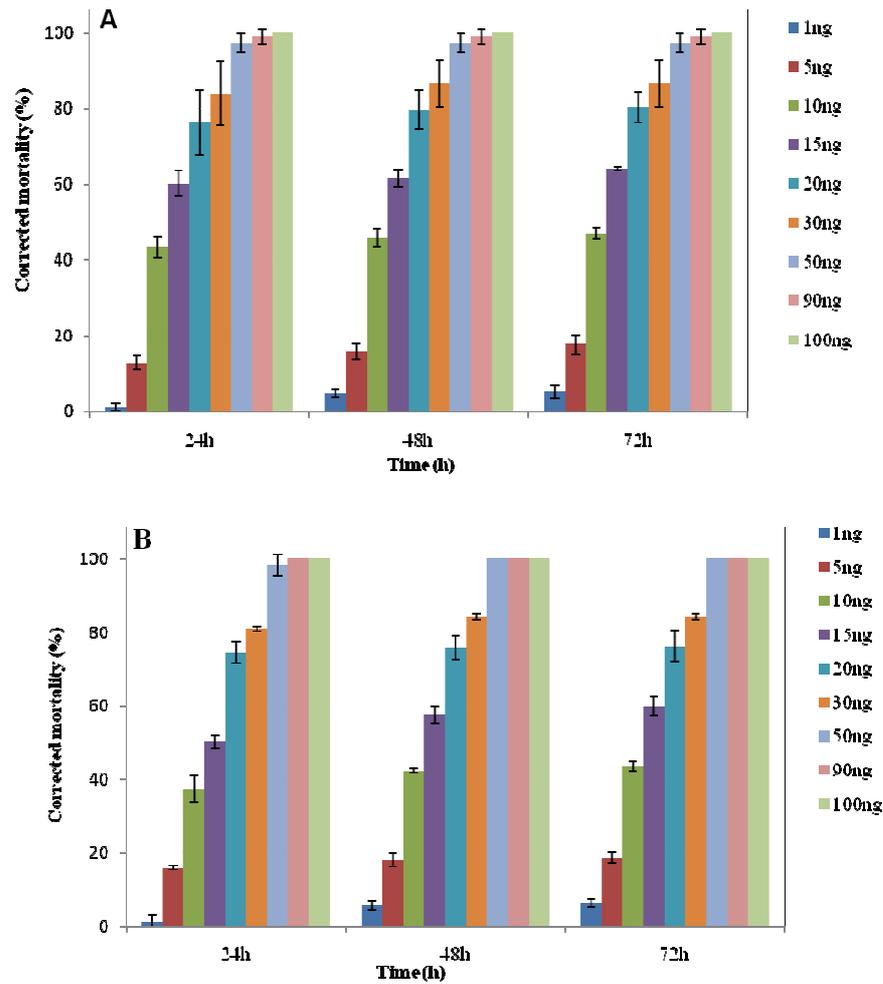


Figure 2: Mortality Kinetics after Oral Application of Thiamethoxam

A : *Apis mellifera intermissa*; **B :** *Apis mellifera sahariensis*. Bee mortality was monitored after ingestion of thiamethoxam at the doses of 1ng, 5ng, 10ng, 15ng, 20ng, 30ng, 50ng, 90ng and 100 ng/abeilles. Data represented the means \pm SD of three experiments performed in triplicate. The absence of error bars corresponds to SD = 0.

Contact Toxicity

The results of acute toxicity by topical application are presented in Figure 3A and B. Mortality increases according to the dose used for the both subspecies. In fact, mortality is not delayed and the maximum mortality is reached 24 hours after topical application of thiamethoxam. This phenomenon is much more pronounced for *A. m. intermissa*, 100% mortality after 24 h (Figure 3A). By cons for *A. m. sahariensis*, 100% mortality are generated with a higher dose of 200 ng / bee and after a longer duration (48 hours) (Figure 3B). But for a higher dose, 250 ng / bee 100% mortality occur after 24 hours. A low dose of 10 ng / bee produces low mortality after 24 hours Tellian bee (7.4%) and the Saharan bee (11%). The mortality of *A. m. sahariensis* increases reaching 11.9% at 48 and 72 hours. For *A. m. intermissa*, mortality rates observed at doses of 50 and 100 ng / bee are very high reaching 81 and 96% respectively, while for *A. m. sahariensis*, these same doses generate lower mortality rate is 48% and 77%. The results of ANOVA analysis ($p < 0.0001$) showed a highly significant treatment effect as regards the sensitivity to thiamethoxam for both honeybees subspecies to different observation times.

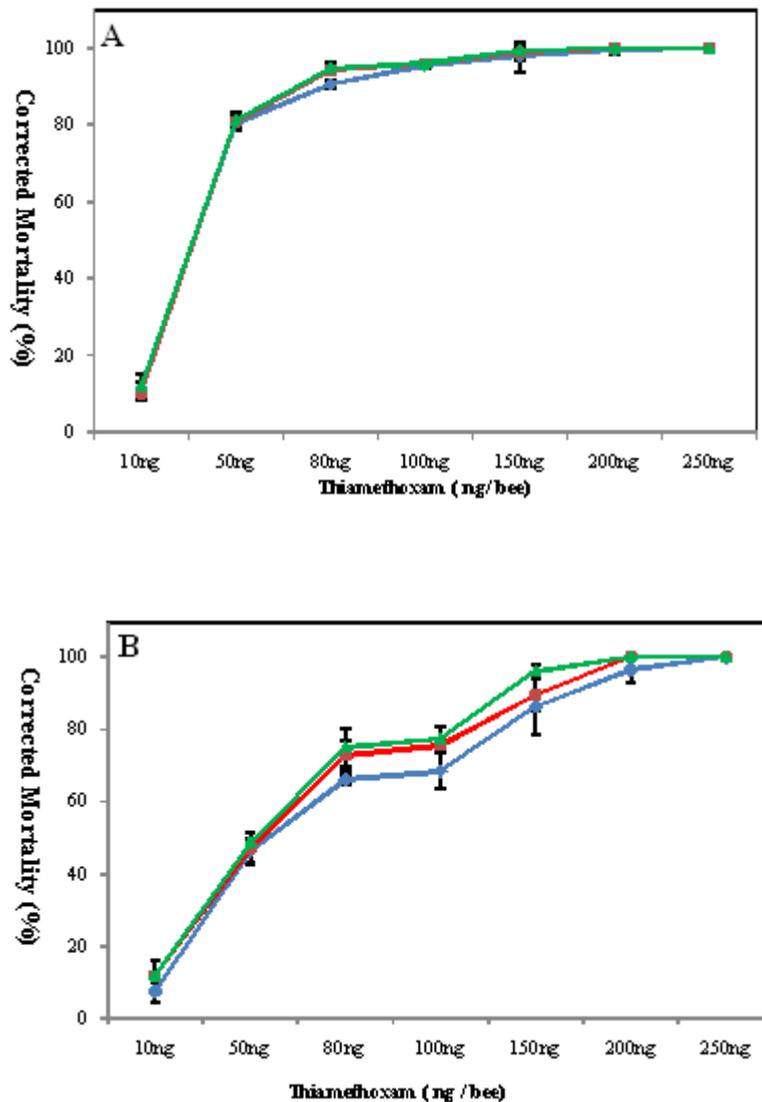


Figure 3: Dose Response Relation Resulting from Contact Exposure to Thiamethoxam

A : *Apis mellifera intermissa*; **B :** *Apis mellifera sahariensis*. Bee mortality observed 24, 48 h and 72 h after oral application of different thiamethoxam doses. Data represented the means \pm SD of three experiments performed in triplicate. The absence of error bars corresponds to SD = 0

Kinetics of Mortality

The results of the kinetics of mortality are shown in Figure 4 A and B. The aspect of this is classic kinetics. The higher the dose of thiamethoxam increases, mortality rises. In *A. m. intermissa* maximum mortality is reached 24 hours after topical application to thiamethoxam (Figure 4A), whereas for *A. m. sahariensis* maximum mortality is reached after 48 hours (Figure 4B). It is noteworthy that 100% mortality are reached for both subspecies after 48 hours when they are subjected to high doses.

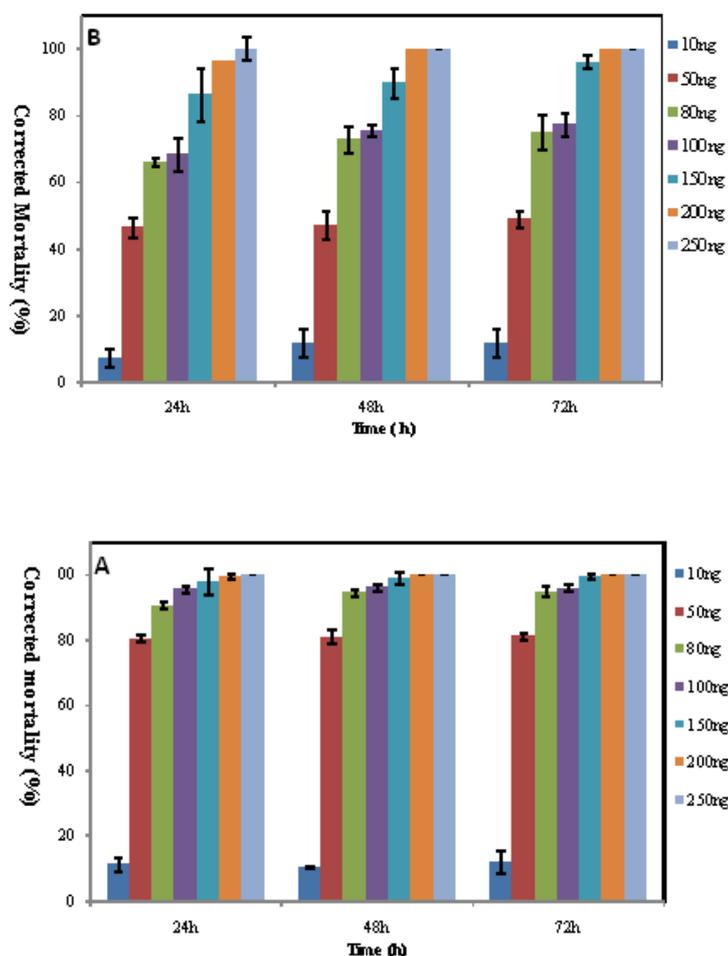


Figure 4: Mortality Kinetics after Oral Application of Thiamethoxam

A: *Apis mellifera intermissa*; **B:** *Apis mellifera sahariensis*. Bee mortality was monitored after ingestion of thiamethoxam at the doses of 10ng, 50ng, 80ng, 100ng, 150ng, 200ng and 250ng /bee. Data represented the means \pm SD of three experiments performed in triplicate. The absence of error bars corresponds to SD = 0.

LD50 Values of Thiamethoxam

The LD50 values of thiamethoxam in honeybee species obtained with contact and oral tests are summarized in Table 1. LD50 values obtained for thiamethoxam honeybees are low. Indeed, for *A. m. intermissa*, average values LD50 at 24 hours are respectively about 12,3 and 26 ng / bee for oral and contact applications (Table 1). For *A. m. sahariensis*, average values LD50 at 24 hours are respectively about 13,3 and 43,3 ng / bee for oral and contact applications. The LD50 values are identical for both honeybee subspecies after oral administration at 48 and 72 hours. For *A. m. sahariensis*, the LD50 values after contact application are high compared to those obtained with *A. m. intermissa*. The ANOVA analysis ($p < 0.0001$) showed a significant difference in sensitivity between the thiamethoxam for both honeybee subspecies after topical application.

Tableau 1 - LD 50 values of thiamethoxam in *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*. The LD50 values were obtained from the experiments carried out with different thiamethoxam doses either after oral or contact

application. The LD50 values were determined from regression lines obtained by Probit transformations of the percentages of mortality corrected, and changes in logarithm of doses. Values in brackets represented 95% confidence limits.

Table 1

	LD50 (ng/abeille)			
	<i>A. m. Intermissa</i>		<i>A. m. Sahariensis</i>	
	Oral	Contact	Oral	Contact
24h	12,29 [10,22 – 14,36]	26,01 [22,01 – 30,01]	13,34 [11,26-15,40]	44,33 [40,33 – 48,33]
48h	11,12 [9,05 – 13,19]	25,39 [21,53 – 29,52]	11,76 [9,68 – 13,82]	39,51 [35,51 – 43,51]
72h	10,64 [8,37 – 12,51]	24,33 [20,33 – 28,33]	10,82 [8,75 – 12,89]	36,84 [32,84 – 40,84]

DISCUSSIONS

Symptoms induced by thiamethoxam

Oral toxicities and contact quickly induce symptoms of neurotoxicity such as disorderly movements, tremors and convulsions, and apathetic behavior. The same symptoms are induced by imidacloprid in *Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera caucasica* (Suchail, 2001; Suchail *et al.*, 2003). Neonicotinoid insecticides act as nerve agents and affect the mobility of bees inducing symptoms such as tremors, uncoordinated movements and hyperactivity (Lambin *et al.*, 2000; Nauen *et al.*, 2001; Suchail *et al.*, 2000, 2003; Medrzycki *et al.*, 2003; Colin *et al.*, 2004). These symptoms are easily observed at high levels of exposure, whereas the effect of a lower dose is difficult to discern.

Oral and contact toxicity

Thiamethoxam is more toxic orally than by topical application, which is different from the action of most insecticides used. Similar findings are reported by Suchail *et al.* (2000) with imidacloprid. By against, other insecticides on bee exhibit greater toxicity after topical application after ingestion. Topical application of a synthetic pyrethroid, deltamethrin, toxicity generates 16 times higher than that observed after ingestion (Smart and Stevenson, 1982). Similarly, the toxicity of organophosphates such as chlorpyrifos, contact appears to be higher than oral (Mishra and Verma, 1982) four times. Rafalimanana (2003) observed after the use of chlorpyrifos, deltamethrin and lambda cyhalothrin in the laboratory that the honeybee is more sensitive to these insecticides by topical application as collective ingestion. Gilbret and Wilkinson (1975) cited by Rafalimanana (2003) reported that the ingested product spends in detoxification organs or gut and Malpighian tubules before being distributed throughout the body. As against the product applied to the thorax through the cuticle through waxy canaliculi and distribution is carried out directly in the body, especially in the more lipophilic areas. Generally, neonicotinoids are more toxic orally by contact mode. The difference between oral and contact toxicity may be due to the low hydrophobicity of neonicotinoids producing low penetration through the insect cuticle (Decourtye and Devillers, 2010). It is to note that the maximum mortality is reached after 24 hours of treatment, the dose-mortality curves are superimposed relationship. This feature of the toxicity of thiamethoxam suggests the involvement of metabolic phenomena. Indeed, the metabolism of thiamethoxam is widely studied in *Rhizobacterium Ensifer adhaerens*, mice, insects and plants such as cotton, spinach and tomato. In these organisms, thiamethoxam initially undergoes processing by one of three ways: either to demethylation desmethyl thiamethoxam, or the reduction of nitro to nitrosoimino (= N-NO) followed by conversion to the imino (= NH) and urea (= O) for thiamethoxam and metabolites desmethyl-thiamethoxam, or is the cleavage of oxadiazine cycle that will give clothianidin, a neonicotinoid insecticide newly marketed (Nauen *et al.*, 2003; Ford and Casida, 2006, 2008; Karmakar *et al.*, 2009. Casida, 2011; Zhou *et al.*, 2012). Nauen *et al.* (2003) reported that thiamethoxam is metabolized in the body of the insect that clothianidin is highly toxic insecticide to bees. Indeed, these authors note that the N - desmethyl - thiamethoxam is not significantly produced in the caterpillars of

Lepidoptera Heliothis virescens and *Spodoptera frugiperda* or in cotton, although it is often mentioned as a possible metabolite. These authors also conclude that thiamethoxam is likely to be a precursor of neonicotinoids for clothianidin. It is quite possible that in the present toxicity tests, cumulative mortality at 24 hours after treatment is due to clothianidin. A similarly high toxicity of imidacloprid and thiamethoxam is also observed in the bumblebee *Bombus terrestris* (Mommaerts *et al.*, 2010). When topical treatment, containing nitro - groups as neonicotinoids imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam, dinotefuran and nitenpyram are more toxic than the cyano group - containing acetamiprid and thiacloprid (Iwasa *et al.*, 2004; Laurino *et al.*, 2011). The low toxicity of neonicotinoids cyano groups can be attributed to their rapid biotransformation (Suchail *et al.*, 2004a, b; Brunet *et al.*, 2005)

Oral and contact LD50

The LD 50 values obtained confirm that thiamethoxam is more toxic by oral administration than by topical application. Iwasa *et al.* (2004) classify the toxicity of neonicotinoid insecticides depending of LD50 obtained at 24 hours after topical application. For the nitro group, the LD50 obtained are: imidacloprid (18 ng / bee) > clothianidin (22 ng / bee) > thiamethoxam (30 ng / bee) > dinotefuran (75 ng / bee) > nitenpyram (138 ng / bee) and those obtained for the cyano group are : acetamiprid (7µg/bee) > thiacloprid (15µg/bee). Suchail *et al.* (2000) note that LD50 obtained with imidclopride for oral applications and two contact are between 4 and 24 ng / bee. Decourtye and Devillers, (2010) reported that the LD50 values of imidacloprid topically does not significantly vary from one author to another, the change can be multiplied by a factor of 6. Using the same route of application, Stark *et al.* (1995) show that the three species of bees or *Apis mellifera* , *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*, are also susceptible to imidacloprid (LD50 = 0.04 mg / bee after 24 h)

Similar conclusions are drawn for thiamethoxam with an LD50 of 30 ng / bee for *A. mellifera* and 33 ng / bee for *B. terrestris* (Iwasa *et al.*, 2004; Mommaerts *et al.*, 2010.). The LD50 values obtained in this study for *A. m. sahariensis* topically are higher than those reported in the literature. By against, those mentioned for *A. m. intermissa* are lower. Moreover, the values obtained by ingestion are higher compared to those noted by several authors (Decourtye and Devillers 2010; Laurino *et al.*, 2011.). It is found that the oral LD50, show great variability in different studies with neonicotinoids (Decourtye and Devillers 2010; Laurino *et al.*, 2011.). Thus, the oral LD50 of imidacloprid can vary from 1 to 20 times. This variation is interpreted by Nauen *et al.* (2001) by the process of trophallaxis which may contribute to differences in the absorption and accumulation of an insecticide by the workers. By against, heavy can cause a reduction in the consumption of sugar water. Rafalimanana (2003) concludes that the collective intake is closer to reality in social insects and would recommend not underestimating the toxicity. Further studies on the variation of toxicity involve other factors such as the age of the bee colony and subspecies used (Suchail *et al.*, 2000, 2001; Nauen *et al.*, 2001; Guez *et al.*, 2003) and bee health with an optimal protein supply (Wehling *et al.*, 2009). Similarly, infestation by *Nosema ceranae* can make bees more susceptible (Alaux *et al.*, 2010. Vidau *et al.*, 2011;. Aufauvre *et al.*, 2012). LD50 values of neonicotinoids are weak for honeybees compared to the oldest families of insecticides such as organophosphates, pyrethroids and carbamates which have a very high toxicity (Atkins *et al.*, 1981; STARK *et al.*, 1995). Suchail *et al.* (2000) reported that the toxicity of organophosphate insecticides, such as chlorpyrifos, is four times higher contact than oral (contact LD50= act 59 ng / bee and oral= 250 ng / bee). Similarly, topical application of bifenthrin (pyrethroid) is seven times more powerful than oral application (contact LD50 = 15 ng / bee oral , LD50 = 100 ng / bee) . Whatever breeds or species of bees used, the toxicity of thiamethoxam is extremely high. Laboratory studies and field indicate that thiamethoxam is highly toxic to bees either by contact or by ingestion (Rancan *et al.*, 2006). These results confirm the potential hazard of this insecticide

should not be used in full bloom, to avoid the risk of poisoning of honeybees.

CONCLUSIONS

The toxicity of thiamethoxam insecticide commonly used in plant protection in Algeria is characterized by the rapid onset of symptoms of neurotoxicity observed in both *A. m. intermissa* and *A. m. sahariensis* mortality occurring 15 minutes after ingestion of high doses. There is a relationship between the dose directly proportional thiamethoxam administered and mortality observed, the maximum mortality was obtained after 24 hours for high doses, phenomenon much more pronounced for *A. m. intermissa*., as *A. m. sahariensis*, after topical application. Thiamethoxam is more toxic orally than topically for both subspecies. These results confirm the potential hazard of this insecticide should not be used in full bloom, to reduce the risk of poisoning of bees.

REFERENCES

1. Abbot W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18 : 265 - 267.
2. Alaux C., Brunet J.-L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L.P. & Leconte Y. (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12: 774 – 782.
3. Atkins E.L., Kellum D. & Atkins K.W. (1981). Comparative morphogenetic and toxicity studies on the effect of pesticides on honeybee brood. *J. Apic. Res.*, 25: 242 - 255.
4. Aufauvre J., Biron D.G., Vidau C., Fontbonne R., Roudel M., Diogon M., Vignes B., Belzunces L.P., Delbac F. & Blot N. (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific Reports*, 2, 326: 1 - 7.
5. Breeze T.D., Bailey A.P., Balcombe K.G. & Potts S.G. (2011). Pollination services in the UK: How important are honeybees?. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 142: 137 – 143.
6. Brunet J.L., Badiou A. and Belzunces L.P. (2005). In vivo metabolic fate of [¹⁴C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest. Manag. Sci.*, 61: 742 – 748.
7. Casida J.E. (2011). Neonicotinoid metabolism; compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms and relevance. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 2923 - 2931.
8. Colin M.E., Bonmatin J.M., Moineau I., Gaimon C., Brun S. & 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.
9. Decourtye A. & Devillers J. (2010). *Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees*, pp 85–95 in THANY S.H., *Insect nicotinic acetylcholine receptors*. Ed. Landes biosciences, New York
10. EPPO. (1992). Guideline on test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honey bees. *EPPO Bull.*, 22: 203 - 215.
11. EPPO. (1993). Decision-Making scheme for the environmental risk assessment of plant protection products. *EPPO Bull.*, 23:151-156.

12. Faucon J.P. & Colin M.E. (1983). Bizarres disparitions. *Rev. Fr. Apic.* 422. 411.
13. Ford K.A. & Casida J.E. (2006). Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem. Res. Toxicol.*, 19 (11): 1549 - 1556.
14. Ford K.A. & Casida J.E. (2008). Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. *J. Agric. Food. Chem.*, 12, 56 (21): 10168 - 10175.
15. Guez D., Belzunces L.P. & Maleszka R. (2003). Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 217–222.
16. Haubruge E., Nguyen B.K., Widart J., Thome J.P., Fickers P. et Depauw E. (2006). Le dépérissement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera : Apidae) : faits et causes probables. *Notes fauniques Gembloux*, 59 (1): 3 - 21.
17. Iwasa T., Motoyama N. & Ambrose J.T. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protect*, 23: 371 - 378.
18. Karmakar R., Bhattacharya R. & Kulshrestha G., (2009). Comparative metabolite profiling of the insecticide thiamethoxam in plant and cell suspension culture of tomato. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 6369 – 6374
19. Kevan P.G. (1999). Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 373 – 393.
20. Lambin M., Armengaud C., Raymond S. & Gauthier M. (2001). Imidacloprid-induced facilitation imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 48: 129 – 134.
21. Laurino D., Porporato M., Patetta A. & Manino A. (2011). Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bull. Insect.*, 64 (1): 107 - 113.
22. Maienfisch P., Gsell L. & Rindlisbacher A. (1999). Synthesis and insecticidal activity of CGA 293 343: a novel broad-spectrum insecticide. *Pestic. Sci.*, 55: 351 - 355.
23. Maienfisch P., Huerlimann H., Rindlisbacher A., Gsell L., Dettwiler H., Haettenschwiler J., Sieger E. & Walti M. (2001). The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Manag. Sci.*, 57: 165 – 176.
24. Medrzycki P., Montanari R., Bortolotti P., Sabatini A.G., Maini S. & Porrini C. (2003). Effects of imidacloprid administered in sublethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bull. Insectol.*, 56: 59 – 62.
25. Mishra R.C. & Verma A.K. (1982). Relative toxicity of some insecticides to *Apis cerena indica* F. workers. *Indian Bee J.*, 44: 69 – 71.
26. Mommaerts V., Reynders S., Boulet J., Besard L., Sterk G. & Smagghe G. (2010). Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behaviour. *Ecotoxicology*,

- 19: 207 – 215.
27. Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U. & Schmuck R. (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest. Manag. Sci.*, 57: 577 – 586.
 28. Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Salgado V. & Kaussmann M. (2003). Thiamethoxam is neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pest. Biochem. Physiol.*, 76: 55– 69.
 29. Rafalimanana H. J. (2003). Evaluation des effets d'insecticides sur deux types d'Hyménoptères auxiliaires des cultures, l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) et des parasitoïdes de pucerons : études de terrain à Madagascar et de laboratoire en France. Thèse Doctorat., Inst. nat. agr., Paris- Grignon, 206 p.
 30. Rancan M., Sabatini A.G., Achilli G. & Galletti G.C. (2006). Determination of Imidacloprid and metabolites by liquid chromatography with an electrochemical detector and post column photochemical reactor. *Analytica Chimica Acta*, 555: 20 – 24.
 31. Smart L.E. & Stevenson J.H. (1982). Laboratory estimation of toxicity of pyrethroid insecticides to honey bees: relevance to hazard in the field. *Bee World.*, 63: 150 – 152
 32. Stark J.D., Jepson P.C. & Mayer D.F. (1995). Limitations to use of topical toxicity data for predictions of pesticide side effects in the field. *J. Econ. Entomol.*, 88: 1081 – 1088.
 33. Suchail S. (2001). Etude pharmacocinétique et pharmacodynamique de la létalité induite par l'imidaclopride et ses métabolites chez l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.). Thèse Doctorat. Univ. Claude Bernard- Lyon 1, 166 p.
 34. Suchail S., Belzunces L. P. et Vaissiere B. E. (2003). Toxicité aigue de l'imidaclopride et de ses métabolites chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. *Abeilles et Fleurs*, 643: 27 – 30.
 35. Suchail S, Debrauwer L, & Belzunces L.P. (2004a). Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest. Manag. Sci.*, 60: 291 – 296.
 36. Suchail S., Guez D. & Belzunces L.P. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1901 – 1905.
 37. Suchail S., Guez D. & Belzunces L.P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 2482 – 2486.
 38. Suchail S., De Sousa G., Rahmani R. & Belzunces L.P. (2004b). In vivo distribution and metabolisation of C¹⁴imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest. Manag. Sci.*, 60: 1056 – 1062.
 39. Vaissiere B. (2002). Abeilles et pollinisation. *Le courrier de la Nature, Spécial Abeilles*, 196 : 24 – 27.
 40. Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Vigue S B., Brunet J-L., Texier C., Biron D.G., Blot N., Alaoui H.E., Belzunces L.P. & Delbac F. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS one*, 6: e21550.
 41. Wehling M., Von Der Ohe W., Brasse D. & Forster R. (2009). Colony losses- interactions of plant protection products and other factors. *Julius. Kuhn. Arch.*, 423: 153 – 154.

42. Zhou G.C., Wang Y., Zhais., Ge F., Liu Z.H., Dai Y.J., Yuan S. & Hou J. Y. (2012). Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, (9): 4065-4074.

First Spatial Distribution of Nosemosis (*Nosema* sp.) Infected Local Bee, *Apis mellifera intermissa* L. in Algeria

Chahbar^{1,*}, M. ; H. Tefiel² ; N. Adidou-Chahbar³ ; B. Doumandji-Mitiche¹ and S. B. S. Gaouar⁴

¹National High School of Agriculture, Dept. Agricultural and Forest Zoology, El-Harrach, Algiers, Algeria,
Chahbar_mohamed@yahoo.com

²Higher National Veterinary School, LP 161 EL Harrach, Algiers, Algeria.

³Dept. Biology, Faculty of Science, University M'hamed Bougara Boumerdes, 35000 Avenue of independence, Algeria.

⁴PPBio Nut Laboratory, University Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria.

(Received: March 27, 2016 and Accepted: May 7, 2016)

ABSTRACT

Nosema ceranae and *N. apis* are microsporidian parasitoids of the European honey bee *Apis mellifera* L. A study to estimate infection levels with *Nosema* sp. in local bees and their spatial distribution in Algeria was carried out in 2013. Bees' samples were collected from *A. mellifera intermissa* in 10 apiaries at 24 prefectures, representing different hives or areas in Algeria. Using spore counts, 65% and 85% of hives were found infected with *Nosema* sp. in Algeria. Setif and Tipaza were characterized by the highest levels of infection. Insignificant differences were found in infection levels among 164 hives and different areas. This study provides the first spatial distribution for the presence of *Nosema* sp. in Algeria.

Key words: *Apis mellifera intermissa*, *Nosema* sp., Infection level, Spatial distribution, Algeria.

INTRODUCTION

Honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) are major pollinators of plants and crops in agriculture and ecosystems. Their health is challenged by many factors (Muñoz *et al.*, 2014). Pathogens causing bacterial, fungal and viral diseases (Foley *et al.*, 2014), varroa mites (*Varroa destructor*) (Hamiduzzaman *et al.*, 2015), honeybee tracheal mites (*Acarapis woodi*), Nosemosis and pesticides are the dangers facing beekeepers (Soroker *et al.*, 2011). In nature, frequently infected insects are highly widespread by a large group of obligate intracellular parasites belonging to the class Microsporidia. The genus *Nosema* has more than 150 species, usually infecting invertebrate hosts including at least 12 orders of insects. *Nosema* spp. are found in Hymenoptera causing some common diseases (Higes *et al.*, 2007). One of the two species of microsporidia in genus *Nosema* causes the *Nosema* disease (Traver and Fell, 2011). *Nosema apis* and *N. ceranae* are parasites of the European honeybee, *A. mellifera* and Asian honeybee, *A. ceranae*, respectively. The disease has spread worldwide and is currently responsible for considerable economic losses in apiculture (Fries, 2010).

However, both *N. ceranae* and *N. apis* appear in four continents (Asia, Europe, North- and South America) (Yoshiyama and Kimura, 2011 and Fernández *et al.*, 2012). *N. ceranae* is highly pathogenic when experimentally inoculated into European honey bees (Higes *et al.*, 2007) and with association of honey reduced production and increased winter mortality.

The present study aimed to record the first spatial distribution of *Nosema* sp. and to estimate infection levels with it in European honey bees (*Apis mellifera intermissa*) in Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Sample

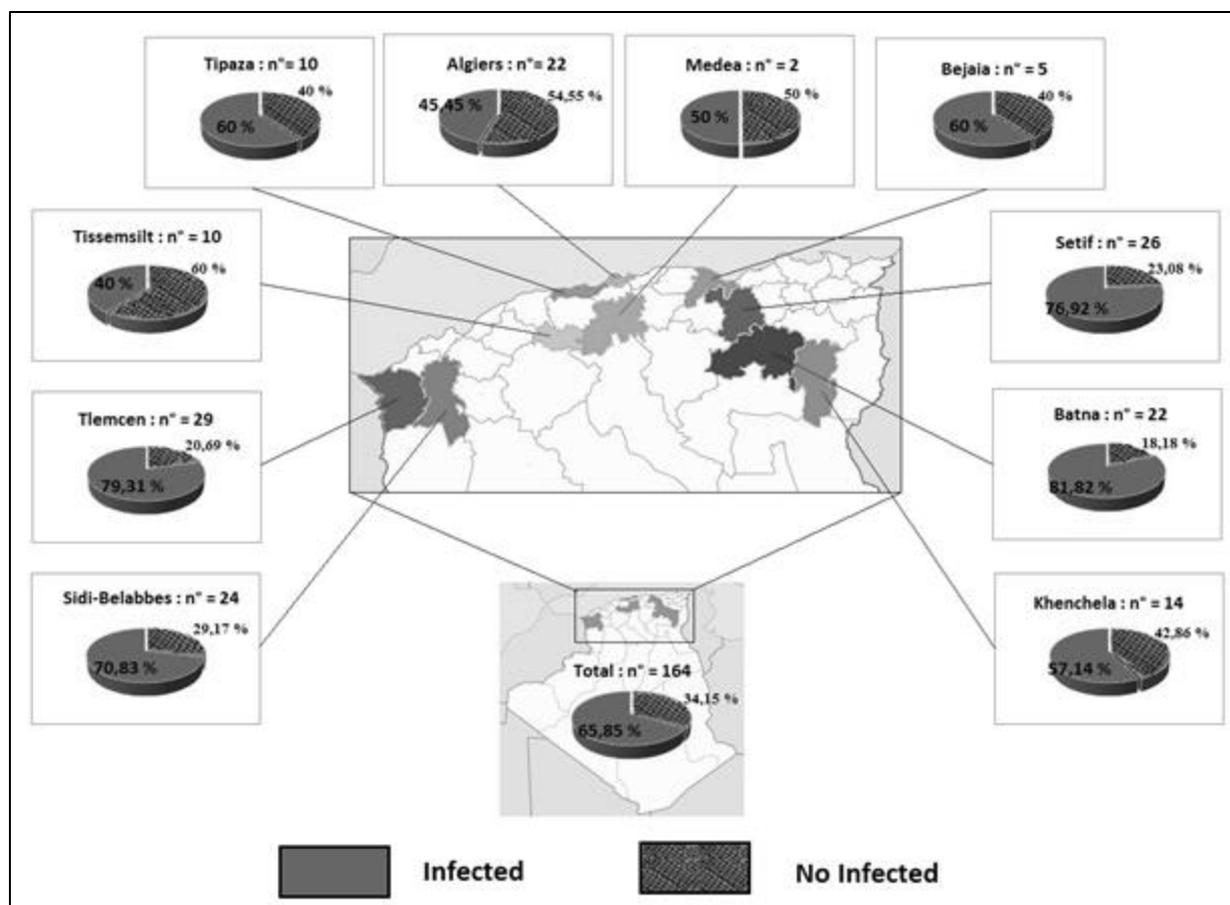
In June 2013, the 24 prefectures located at 10 areas in Algeria; Algiers, Tipaza, Medea, Bejaia, Setif, Batna, Khenchela, Tissemsilt, Sidi-Belabbes and Tlemcen were selected for sampling. In each prefecture, some hives were monitored for nosemosis. Inside the colonies, the live bees were collected and placed directly into pure ethanol (96%). Samples were placed in icebox and then stored at -20°C until processing. Sampling locations are listed in (Table 1) and (Fig. 1).

Detection

In the laboratory, spores of *Nosema* sp. were counted separately according to the protocol suggested by the International Office of Epizootics (OIE, 2013). A total of 164 searches for spores were carried out. Abdomens of 10 individuals were finely crushed in 5 ml of water. The suspension was filtered through two layers of fabric (muslin type) placed on a funnel on the top of a tube graduated to centrifuge. The contents of the tubes were equalized with water; the suspensions were then centrifuged at 800G for 6 min.. The supernatants were elutriated and the tubes were supplemented to 10 ml. A volume of 15 µl was deposited in the cell of Malassez, and observed with a photonic microscope with enlargement × 400. Spores of *Nosema* seemed to be transparent but with a very distinct dark contour, measuring between 5 and

Table (1): Locations and sample numbers of Nosemosis collected from apiaries in Algeria, 2013

Prefectures	N° samples	Detected	Not detected	Maximum $\times 10^5$ spores/bee	Minimum $\times 10^5$ spores/bee	% Infected colonies	% Healthy colonies
Algiers 1	5	5	0	104	28	100	0
Algiers 2	7	5	2	70	6	71.43	28.57
Algiers 3	10	0	10	0	0	0	100
Tipaza 1	5	5	0	78	18	100	0
Tipaza 2	5	1	4	2	2	20	80
Medea	2	1	1	36	36	50	50
Bejaia	5	3	2	20	14	60	40
Khenchela 1	6	3	3	6	2	50	50
Khenchela 2	3	1	2	2	2	33.33	66.67
Khenchela 3	5	2	3	44	2	40	60
Batna 1	10	9	1	40	2	90	10
Batna 2	8	7	1	10	2	87,5	12,5
Batna 3	4	2	2	4	4	50	50
Setif 1	9	6	3	532	2	66.67	33.33
Setif 2	8	8	0	124	2	100	0
Setif 3	9	6	3	168	2	66.67	33.33
Tissemsilt 1	5	2	3	6	4	40	60
Tissemsilt 2	5	2	3	6	6	40	60
Tlemcen 1	10	9	1	12	2	90	10
Tlemcen 2	9	7	2	6	2	77.78	22.22
Tlemcen 3	10	7	3	4	2	70	30
Sidi-Belabbes 1	10	6	4	6	2	60	40
Sidi-Belabbes 2	7	5	2	14	2	71.43	28.57
Sidi-Belabbes 3	7	6	1	56	2	85.71	14.29
Total prefectures=24	164	108	56	532	2	65.85	34.15

Fig. (1): Locations and distribution of honeybee samples that infected with *Nosema* sp. in apiaries in Algeria, 2013.

7 μm in length and 3 to 4 μm in width.

Quantification

Quantification of spores' number was calculated using the cell of Malassez. The counting was done on five frameworks that in the cell of Malassez where represented a volume of 0,05 mm^3 which was divided for the volume of dilution of the sample to obtain the final number of spores (OIE, 2013).

Classification

A scale of classification of the infection was used to determine the degree of the infection of bees' colonies by the noseose according to the number of spores (Soerensen, 2009) as follows:

- 1= Very strong infection (more than 5 million spores per bee),
- 2= Strong infection (2 to 5 million spores per bee),
- 3= Weak infection (0, 5 to 2 million spores per bee),
- 4= Very weak infection (Less to 0,5millions spores per bee), and
- 5= No infection (0 spores per bee).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using XLSTAT 7.5.2. Infection levels among the hives and areas, multiples comparisons and Newman-Keuls Analyze (SNK) for differences among groups and significance as $\chi = 0.05$ in ANOVA were analyzed. As well, the correlation between rates of infections and average numbers of spores per bee and region was determined. To analyze *Nosema*-negative samples, infection level data were analyzed by a principal component analysis (PCA in Statistica 6) which was used to model the proportion of the population that was infected based on hive, area and level of infection as factors.

RESULTS AND DISCUSSION

This study provides the first spatial description for the presence and distribution of *Nosema* sp. in Algeria.

Distribution of *Nosema*

Locations of the samples were plotted on the Algerian map to visualize the distribution of *Nosema* sp. (Fig. 1). Out of the 164 colonies surveyed, *Nosema* was detected in 108 colonies (65.85%) from 10 apiaries at the prefectures of Algiers, Medea, Tipaza, Bejaia, Setif, Batna, Khenchela, Tissemsilt, Sidi-Belabbes and Tlemcen (Table 1). All the 24 selected prefectures showed bees infection with *Nosema*, except one case in Algiers, where the nosemosis was not detected. Adjlane *et al.* (2012) reported that in the last years, nosemosis infections occurred in the Algerian honey bee populations. *Nosema* sp. can be accidentally introduced into an

area by imports of the queens (Muñoz *et al.*, 2014). But in Algeria, no signs for introducing honey bee stock have been detected (Chahbar *et al.*, 2013).

Spore counts and infection levels

The easiest way to count *Nosema* sp. spores was to use a traditional haemocytometer as described by (Cantwell, 1970 and Human *et al.*, 2013). In the present study, average numbers of spores per bee in a pooled sample for the evaluation of *Nosema* sp. infection in a colony was counted as described by (Soerensen, 2009 and OIE, 2013). A pooled sampling is probably remains an important tool for quantifying infections in colonies (Fries *et al.*, 2013). Levels of *Nosema* sp. in commercial colonies were 200.000 and 53.200.000 spores equivalents per bee, as minimum and maximum, respectively (Fig. 3). Among infected colonies (108 colonies), more than 74% of them had weak or very weak infection's level with the nosemosis, of which it could justify the absence of the acute symptoms of nosemosis in the majority of the monitored colonies. Cantwell (1970) reported that the intestine of the strongly infested bees can contain up to 180 million spores.

The recorded weak infection levels in the bees may be due to the timing of collection (June 2013), as June is characterized by a reduction in bees' activity in Algeria (Maderbache *et al.*, 2013). Highest levels of *N. ceranae* were noticed during spring, just before and during nectar flows peak (Traver *et al.*, 2012). Contrary to the observation of Martín-Hernández *et al.* (2007) *N. ceranae* was detected along the year and based on this finding it was suggested that there is no seasonality to the infection and there is no annual infection cycle.

Nosemosis and colony collapse disorder

The nosemosis infections can be present in honey bee colonies without causing depopulation or colony collapse. Some authors (Martín-Hernández *et al.*, 2007 and Higes *et al.*, 2007) suggested that *N. ceranae* causes colony collapse within 18 months of a colony becoming infected and infections left uncontrolled. These authors did not take into account the rate of infection. The results of the Algerian hives monitored showed that the same hive infected by *Nosema* sp. remained alive with normal production and without collapsing according to the beekeeper's answers made 19 months after sampling.

Data obtained in the present study are complementary and consistent with the results reported by Invernizzia *et al.* (2009), whose hives were monitored for decades and demonstrated no correlation between arrival of *N. ceranae* and its presence in the hives or hive losses due to CCD. Available data strongly suggest that this parasite can

Principales maladies et ennemis de l'abeille domestique *Apis mellifera* L., 1758 en Algérie.

Résumé :

Les abeilles domestiques sont considérées parmi les plus importants pollinisateurs. Elles offrent la possibilité d'améliorer et la qualité et la quantité des produits agricoles. En Algérie, les populations d'abeilles domestiques sont des membres de deux sous-espèces, celles d'*Apis mellifera intermissa* et d'*Apis mellifera sahariensis*, Cependant, les abeilles domestiques sont actuellement menacées. Concernant la première partie de cette étude qui porte sur la prévalence de la nosérose *Nosema* sp., chez l'abeille locale *Apis mellifera intermissa*, en juin 2013, nous avons réalisé un échantillonnage composé de 164 colonies. Les prélèvements des abeilles sont effectués dans 24 stations différentes appartenant à 10 régions d'Algérie. Au laboratoire le comptage des spores a révélé que 65,85% des colonies d'abeilles en Algérie sont infectées par *Nosema* sp. Les résultats obtenus montrent que cette espèce est omniprésente. Elle existe dans tous les échantillons analysés avec différents taux d'infection. Nous avons noté qu'il n'y a pas de différence significative dans les niveaux d'infection parmi les 164 ruches (F de Fischer =1,534 ; ddl = 162 ; p = 0,579) et parmi les régions (F de Fischer = 2,495 ; ddl = 162 ; p = 0,011) en utilisant le test ANOVA dans XLSTAT. Cette étude fournit la première description spatiale de la présence de *Nosema* sp. La deuxième partie de l'étude porte sur la prévalence de la loque américaine *Paenibacillus larvae* en Algérie. L'échantillonnage est effectué dans 11 régions du territoire national, réparties entre 24 stations. Au laboratoire, nous avons utilisé un milieu spécifique MYPGP-agar pour l'isolement de la bactérie. L'identification de *P. larvae* est basée sur des tests microbiologiques, physiologiques et biochimiques. Nous avons trouvé que cette maladie est présente dans toutes les régions prospectées avec de différents degrés d'infection. Les régions de Boumerdes et Tipaza sont caractérisées par des fréquences très élevées de la maladie 88,89 % et 83,33 % respectivement. La procédure GENMOD du logiciel SAS 9, confirment qu'il existe une différence significative du niveau d'infection entre les régions (Khi 2 = 30,23 ; DF = 10 ; P= 0.0008). L'étude de la sensibilité des deux races d'abeilles domestiques, à savoir *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*, pour la nosérose, prouve que l'abeille tellienne *A. m. intermissa* est résistante contre la nosérose. Contrairement à l'abeille saharienne *A. m. sahariensis*, étant sensible pour la nosérose. En basant sur l'inoculation d'une dose de 100.000 spores par abeille chez les deux races d'abeilles mises en cause. Une étude préliminaire est menée sur les mycoses affectant l'abeille domestique tellienne *Apis mellifera intermissa*. Les souches fongiques sont isolées à partir des larves, de la cire battue par les ouvrières et des abeilles adultes. En totalité, trois souches sont identifiées à savoir *Ascosphaera apis*, *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp. Les résultats de cette étude montrent que seulement les deux souches, *Ascosphaera apis* et *Aspergillus niger*, sont considérées comme étant des champignons affectant l'abeille domestique *A. m. intermissa*.

Mots clés : Prévalence ; *Nosema* sp. ; *Paenibacillus larvae* ; mycoses ; sensibilité ; *Apis mellifera intermissa* ; *Apis mellifera sahariensis*

Main diseases and enemies of the honeybee *Apis mellifera* L., 1758 in Algeria

Abstract :

Honey bees are considered among the most important pollinators. They offer the opportunity to improve the quality and quantity of agricultural products. In Algeria, existing honeybee populations are members of two subspecies, *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis*. However, honey bees are currently threatened. Concerning the first part of this study, which concerns the prevalence of nose-mosis *Nosema* sp., in the local bee *Apis mellifera intermissa*, in June 2013 we carried out a sampling of 164 colonies. The bees are taken from 24 different stations belonging to 10 regions of Algeria. In the laboratory, spore counting revealed that 65,85 % of bee colonies in Algeria were infected with *Nosema* sp. The results show that this species is omnipresent. It exists in all samples analyzed with different rates of infection. We noted that there were no significant differences in infection levels among 164 hives (Fischer's $F = 1,534$; $ddl = 162$; $p = 0,579$) and among regions (Fischer's $F = 2,495$; $ddl = 162$; $p = 0,011$) using the ANOVA assay in XLSTAT. This study provides the first spatial description of the presence of *Nosema* sp. in Algeria. The second part of the study focuses on the prevalence of American foulbrood *Paenibacillus larvae* in Algeria. Sampling is done in 11 regions of the country, distributed among 24 stations. In the laboratory, we used a specific medium MYPGP-agar for the isolation of the bacterium. The identification of *P. larvae* is based on microbiological, physiological and biochemical tests. We found that this disease is present in all regions surveyed with different degrees of infection. Very high frequencies of the disease 88,89 % and 83,33 % respectively characterize the regions of Boumerdes and Tipaza. Indeed, the results of the GENMOD procedure of the SAS 9 software confirm that there is a significant difference in the level of infection between the regions (Chi 2 = 30,23; $DF = 10$; $P = 0,0008$). The study of the sensitivity of the two breeds of honey bees, *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis*, for nose-mosis, proves that *A. m. intermissa* is resistant against nose-mosis. In contrary, *A. m. Sahariensis* being sensitive to nose-mosis. Based on the inoculation of a dose of 100,000 spores per bee in the two breeds of bees involved. A preliminary study is carried out on mycoses affecting the honeybee *A. m. intermissa*. The fungal strains were isolated from larvae, wax beaten by workers and adult bees. In total, three strains are identified, namely *Ascosphaera apis*, *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. The results of this study show that only the two strains, *Ascosphaera apis* and *Aspergillus niger*, are considered to be fungi affecting the honey bee *A. m. intermissa*.

Keywords: Prevalence ; *Nosema* sp. ; *Paenibacillus larvae* ; Mycoses ; sensibility ; *Apis mellifera intermissa* ; *Apis mellifera sahariensis*

أهم أمراض وأعداء نحل العسل *Apis mellifera* في الجزائر

ملخص:

يعتبر نحل العسل من أهم الملقحات، فهي توفر إمكانية تحسين وتطوير نوعية وكمية المنتجات الزراعية. في الجزائر، مجموعات نحل العسل هم أفراد السلالتين، *Apis mellifera intermissa* و *Apis mellifera sahariensis*. نحل العسل مهدد بعدة عوامل. لقد تم تسجيل حالات اتلاف عديدة لمجموعات النحل على الصعيد العالمي. لم يتم إلى حد الساعة معرفة حقيقة هذه الاتلافات، فسميت بظاهرة اتلاف سلالات النحل أو « Colony Collapse Disorder » CCD. تطرقنا من خلال هذا البحث إلى دراسة انتشار مرض النوزيما *Nosema sp.* في الجزائر. أجريت هذه الدراسة على 164 خلية منتشرة على 24 محطة، تنتمي إلى 10 مناطق مختلفة. تم أخذ عينات النحل خلال شهر جوان 2013. في المخبر، حساب عدد الأبوغ أظهر أن 65,85 بالمئة من مجموعات النحل بالجزائر مصابة بمرض النوزيما. كما سجل تواجد هذا المرض في كل العينات بنسب متفاوتة. هدفنا من البحث معرفة مدى تأثير اختلاف المناطق والخلايا على شدة الإصابة بمرض النوزيما. لاحظنا عدم وجود (F de Fischer = 1,534; ddl = 162; p = 0579); فرق كبير في شدة الإصابة بين مختلف الخلايا و بين مختلف المناطق (F de Fischer = 2,495; ddl = 162; p = 0,011). تقدم هذه الدراسة أول إظهار للتوزيع الجيوغرافي لمرض النوزيما في الجزائر. وجدنا أن منطقتي سطيف وتيبازة تتميزان بشدة إصابة عالية، وأما المناطق الأخرى لا تختلف من حيث الإصابة. أيضا نستخلص من نتائج تحليل العينات الغير مصابة أن المناطق وطبيعة الخلايا ليس لها تأثير مباشر على وجود أو غياب المرض. من خلال نتائج هذه الدراسة، يمكننا احتمال إصابة معظم الخلايا بالجزائر بنوزيما نوع "أ"، وهذه الأخيرة لا تسبب ظاهرة اتلاف النحل بالجزائر. خصص الجزء الثاني من هذه الدراسة حول انتشار مرض تعفن الحضنة الأمريكي في الجزائر. تم أخذ العينات من 105 خلية منتشرة على 24 محطة، تنتمي هذه الأخيرة إلى 11 منطقة من تراب الوطن. في المخبر، تم استعمال وسط خاص لعزل هذه البكتيريا. اعتمدنا على الخصائص الميكروبيولوجية والفيزيولوجية والبيو كيميائية لتحديد نوع البكتيريا، وجدنا أن المرض متواجد في جميع المناطق التي شملتها هذه الدراسة مع اختلاف في درجات العدوى فيما بينهم. اثبتت هذه الدراسة أن بعض الخلايا المصابة بتعفن الحضنة الأمريكي لم يظهر عليها أي أعراض للإصابة. تميزت منطقتي بومرداس وتيبازة بأعلى ترددات لهذا المرض بنسبة مئوية تقدر ب 88,89 و 83,33 على التوالي. تلي هذه المناطق المذكورة انفا، تلمسان والجزائر العاصمة والمدينة، بترددات عالية نسبيا تقدر ب 46,67 و 33,33 و 33,33 على التوالي. أما فيما يخص المناطق المتبقية، فقد كانت الترددات ضعيفة إذ لم تتجاوز 20 بالمئة. كذلك نتائج الإجراءات الإحصائية تؤكد وجود الفرق بين مختلف المناطق. دراسة مقاومة السلالتين، النلية والصحراوية، لمرض النوزيما اثبتت أن السلالة النلية مقاومة لهذا المرض على عكس السلالة الصحراوية، حيث اكدت هذه الأخيرة عدم مقاومتها لهذا المرض. تمت هذه الدراسة بناء على تطعيم جرعة 100.000 بوغ من النوزيما لكل نحلة فرادى، عند كلتا السلالتين. لم يكن هناك فرق كبير بين الوفيات عند النحل الشاهد والوفيات عند النحل المعالج بالنسبة للنحل التلي. أما فيما يخص النحل الصحراوي، تم تسجيل فرق كبير بين الوفيات الطبيعية والوفيات بعد أخذ الجرعة. أجريت دراسة أولية عن الفطريات التي تؤثر على نحل العسل. تم عزل السلالات الفطرية من اليرقات والشمع والنحل (العاملات). بالمجمل، تم عزل 3 سلالات، اثنتين فقط من بينهم يمكننا اعتبارها أعداء لنحل العسل بالجزائر. دراسة الأعراض المميزة للأمراض الفطرية اكدت أن كل اليرقات المحنطة والحضنة المفتوحة التي تظهر بلون اسود تعتبر حاملة لمرض تكلس الحضنة، أما النوع الثاني، لم يتميز بأعراض معينة. فيما يتعلق بالتوزيع الجيوغرافي لمرض تكلس الحضنة، فقد تم كشف هذا المرض في كل المناطق المدروسة، بالتحديد في الجزائر العاصمة والبلدية وبومرداس والمسيلة. وفي الأخير، دراسة النمو عند السلالة المسؤولة عن تكلس الحضنة اثبتت أن التطور الأمثل لهذه السلالة يكون بعد 5 إلى 8 أيام في درجة حرارة ما بين 20 و 30 درجة مئوية.

كلمات البحث:

انتشار المرض، النوزيما، تعفن الحضنة الأمريكي، فطريات، *Apis mellifera intermissa*; *apis mellifera sahariensis* مقاومة.