

République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة سعد دحلب البليدة (1)



Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de  
MASTER Académique en Biologie  
Option: Parasitologie

## Thème

Essais de lutte à base d'un biocide contre  
les microsporidies du genre *Nosema* chez les  
populations d'abeilles

Soutenu le : 26/06/2024

Présenté par :

BENMESSAOUD YASMINE

KRALED KEBIR YASMINE

Duvent les jurys :

	Grade:	Qualité
Mme Tail G	Professeur, USDB 1	Présidente
Mme Zerkaoui A	Maa, USDB 1	Examinatrice
Mme Kara Toumi F.Z	Professeur, USDB 1	Promotrice
Mr El mehdi B	Tech / Sup/ ITELV	Co-promoteur

----- Année universitaire 2023/2024 -----



# Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier **Allah**, notre Créateur le plus puissant, de nous avoir accordé la santé, la détermination, les forces, la volonté et le courage nécessaires pour préparer et finaliser ce mémoire. C'est grâce à Sa guidance et à Ses bénédictions que nous avons été guidés vers le chemin du savoir.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers **toutes les personnes** qui nous ont aidés dans la réalisation de ce mémoire. Nos chaleureux remerciements vont à :

◆ **Notre promotrice, Professeur KARA.TOUMI F.Z** : Pour son soutien moral, son aide précieuse, ses conseils avisés et pour avoir assuré le bon déroulement de notre travail.

◆ **Notre co-promoteur, El MEHDI B**, de l'Institut (ITELV) : Pour son assistance et son soutien au niveau du l'institut. Ainsi Nous tenons à remercier la directrice **Mme ZITOUNI G**, de nous avoir ouvrir la porte de son institut, ainsi que **tous les ouvriers** de la station.

Nous tenons également à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tout particulièrement :

◆ **Professeur TAIL. G**, pour avoir accepté de présider le jury.

◆ **Mme ZERKAOUI. A**, pour avoir eu l'honneur d'examiner notre mémoire.

Nos remerciement s'adresse aussi à **Mme BELARBI. I**, la responsable du laboratoire de PFE au département de biotechnologie , pour son aide inestimable, son soutien constant et sa patience durant toute la période de nos recherche au laboratoire

Nous tenons également à remercier **tous les enseignants** qui nous ont formés et enseignés tout au long de notre parcours scolaire.

Enfin, nous souhaitons exprimer notre reconnaissance à **toutes les personnes** qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

**Merci à tous.**



# Dédicace

**À mon très cher PAPA YUCEF, À ma très chère MAMA RACHIDA,**

Aucune dédicace ne saurait exprimer pleinement mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés. Sans vous, ce travail n'aurait pas été possible. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

**À ma très chère sœur WISSEM**

Ton soutien, ton amour inconditionnel et ta présence constante ont été des bénédictions tout au long de ma vie. Je suis reconnaissante pour les moments que nous avons partagés, pour ta force, ton soutien dans les moments difficiles, et pour ta joie et ton rire qui ont illuminé mes journées. Merci pour ta précieuse présence dans ma vie.

**À mes très chers frères YACINE, HOUSSEM et ISLEM**

Votre soutien, votre amitié et votre présence ont été des piliers solides dans ma vie. À travers les hauts et les bas, vous avez toujours été là pour moi, prêts à offrir votre aide et votre soutien inconditionnels. Que notre lien continue de grandir et de s'épanouir au fil des ans.

**À ma chère nièce CELINE**

Tu es une lumière dans notre vie, apportant joie, bonheur et émerveillement à chaque instant. Ta présence est un cadeau précieux, et ton sourire illumine nos journées. À travers cette dédicace, je veux te témoigner tout mon amour et ma fierté. Que ton chemin soit pavé de succès

**À toute ma famille BENMESSAOUD et LAIB, grands et petits, en particulier à mes grands-parents, mon beau-frère SAID, mes cousins et mes cousines.**

**À ma meilleure amie et ma binôme YASMINE,**

Travailler à tes côtés a été une expérience enrichissante et inspirante. Ta diligence, ta persévérance et ton soutien inébranlable ont contribué grandement à la réussite de ce projet. Ensemble, nous avons surmonté les défis et partagé les joies de cette aventure académique. Merci d'avoir été une partenaire exceptionnelle.

**À mes très chères copines IMANE «HABOUBA», FRIEL, NIHED, LEYNA et CHAHINEZ**

Votre amitié et votre soutien ont illuminé mes journées et enrichi ma vie d'une joyeuse complicité. À travers les rires partagés, les moments de confidences et les défis surmontés ensemble, notre lien s'est renforcé. Merci d'être des amies extraordinaires.

*YASMINE BEN MESSAOUD*



# Dédicace

*Ce modeste travail est dédié spécialement*

*À ma chère maman **ZAHIA**. À mon cher papa **RABAH** ma raison de vivre, en témoignage de ma reconnaissance pour sa patience, son amour et ses sacrifices, et son dévouement.*

*À vous, **mes parents**, je dis merci d'avoir fait de moi celui que je suis aujourd'hui. Aucune dédicace ne pourra exprimer mes respects, mes considérations et ma grande admiration pour vous. Puisse ce travail vous témoigne mon affection et mon profond amour »*

*À mes chères sœurs **NESRINE** ton soutien durant toutes mes années universitaires et scolaires, ton amour inconditionnel et ta présence constante ont été des bénédictions tout au long de ma vie et*

*À ma petite sœur **DONIA** qui est loin de nous mais toujours dans nos cœurs. Elle me manque tellement, Merci pour ta précieuse présence dans ma vie.*

*À ma princesses **DJANA LAYANE**, quand tu es entré dans notre vie, tu as apporté de la joie, je te souhaite une vie pleine de bonheur, de joie et de réussite.*

*À mon cher frère **ISMAIL** et mon beau-frère **BAHAAEDDINE** vous avez toujours été là pour moi, prêts à offrir votre aide et votre soutien.*

*À mon adorable **Grand-Mère FATMA** qui a toujours été mes côtés*

*À ma chère binôme **YASMINE**, qui j'ai passé toute mes années universitaires, tu es ma copine avant d'être mon binôme, Travailler à tes côtés a été une expérience enrichissante et inspirante, nous avons surmonté les défis et partagé les joies de cette aventure académique. Merci d'avoir été une partenaire exceptionnelle.*

*À mes chères copines **SELMA, CHAHINEZ, FELLA, IMANE, NIHED, FERIEL, AYA,***

*À ma toute famille paternelle et maternelle, Sans oublier mes enseignants et pour ceux qui m'ont donné de l'aide un jour, que Dieu vous paye pour tous vos bienfaits*

***YASMINE KRALED KEBIR***

# Résumé

Durant la période de mars à mai 2024, des sorties sur le terrain ont été réalisées afin d'évaluer les ruchers susceptibles de présenter des symptômes de la nosérose dans deux zones d'études nous avons choisi 4 ruchers à Baba Ali et 4 ruchers à Boufarik, Face à l'inefficacité des traitements chimiques actuels dans ce contexte que nous avons choisi comme objectif l'utilisation du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* comme biocide pour lutter contre *N. ceranae* dans des ruchers à Baba Ali et Boufarik.

Après identification des souches de *M. anisopliae* et *N. ceranae*, des méthodes de comptage des microsporidies ont été mises en place. Les résultats montrent une infestation plus élevée à Baba Ali (300 à 400 spores par ruche) qu'à Boufarik (50 à 60 spores par ruche), suggérant que les conditions environnementales et alimentaires influencent l'infestation et la santé des colonies.

Nos études révèlent que *Metarhizium anisopliae* réduit progressivement les spores de *N. ceranae* in vivo. À Baba Ali la charge parasitaire a diminué à 15-30 spores par ruche et à Boufarik, à 10-30 spores par ruche. Sans traitement la charge parasitaire a augmenté dans le groupe témoin de 49 à 111 spores.

Les essais in vitro confirment l'effet antagoniste de *M. anisopliae* contre *N. ceranae*. Nous avons également testé l'acide acétique comme méthode chimique de lutte bien que son efficacité soit moindre. Il pourrait toute fois jouer un rôle complémentaire dans un programme intégré de gestion des parasites.

*Metarhizium anisopliae* apparaît comme une alternative prometteuse et efficace pour lutter contre les microsporidies *Nosema ceranae*, minimisant les effets néfastes sur les abeilles. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles stratégies de lutte biologique renforçant la sécurité alimentaire et l'équilibre écologique.

**Mots clés :** *Metarhizium anisopliae*, *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*, l'acide acétique, Baba Ali et Boufarik

# Abstract

During the period from March to May 2024, field trips were carried out to assess apiaries likely to exhibit symptoms of nosérose in two study areas we chose 4 apiaries in Baba Ali and 4 apiaries in Boufarik, Faced with the inefficiency of current chemical treatments in this context that we have chosen as an objective the use of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* as biocide to fight against *N. ceranae* in apiaries in Baba Ali and Boufarik.

After identification of the strains of *M. anisopliae* and *N. ceranae*, methods for counting microsporidia were implemented. The results show a higher infestation in Baba Ali (300 to 400 spores per hive) than in Boufarik (50 to 60 spores per hive), suggesting environmental and food conditions influence infestation and colony health.

Our studies show that *Metarhizium anisopliae* progressively reduces *N. ceranae* spores in vivo. At Baba Ali the parasitic load decreased to 15-30 spores per hive and at Boufarik to 10-30 spores per hive. Without treatment, the parasite load increased in the control group from 49 to 111 spores.

In vitro assays confirm the antagonistic effect of *M. anisopliae* against *N. ceranae*. We also tested acetic acid as a chemical control method although its effectiveness is less. However, it could play a complementary role in an integrated pest management program.

*Metarhizium anisopliae* appears as a promising and effective alternative to fight against microsporidia *Nosema ceranae*, minimizing the harmful effects on bees. These results pave the way for new biological control strategies that strengthen food security and ecological balance

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*, *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*, acetic acid, Baba Ali and Boufarik

## ملخص

خلال الفترة من مارس إلى مايو 2024، تم تنفيذ رحلات ميدانية لتقييم المناحل التي من المحتمل أن تظهر عليها أعراض نوسيموز في منطقتين دراسيتين اخترنا 4مناحل في بابا علي و 4مناحل في بوفاريك، في مواجهة عدم كفاءة المعالجات الكيميائية الحالية في هذا السياق، اخترنا كهدف استخدام فطر *Metarhizium anisopliae* المسبب للأمراض الحشرية كمبيد حيوي لمحاربة *N. ceranae* في المناحل في بابا علي وبوفاري

بعد تحديد سلالات *M. anisopliae* و *N. ceranae*، تم تنفيذ طرق لحساب *microsporidia* تظهر النتائج إصابة أعلى في بابا علي (300) إلى 400 جراثيم لكل خلية (مقارنة ببوفاريك (50) إلى 60 جراثيم لكل خلية)، مما يشير إلى أن الظروف البيئية والغذائية تؤثر على الإصابة وصحة المستعمرات.

تظهر دراستنا أن *Metarhizium anisopliae* يقلل تدريجياً من جراثيم *N. ceranae* في الجسم الحي. في بابا علي انخفض الحمل الطفيلي إلى 15-30 جراثيم لكل خلية وفي بوفاريك إلى 10-30 جراثيم لكل خلية. بدون علاج، زاد الحمل الطفيلي في المجموعة الضابطة من 49 إلى 111 جراثيم.

المقاييسات في المختبر تؤكد التأثير المضاد لـ *M. anisopliae* ضد *N. ceranae*. اخترنا أيضاً حمض الخليك كطريقة لتحكم الكيميائي على الرغم من أن فعاليته أقل. ومع ذلك، يمكن أن تلعب دوراً تكميلياً في برنامج متكامل للإدارة المتكاملة لآفات.

يظهر *Metarhizium anisopliae* كبديل واعد وفعال لمحاربة *Nosema ceranae* *microsporidia*، مما يقلل من الآثار الضارة على النحل. وتمهد هذه النتائج الطريق لاستراتيجيات جديدة للمكافحة البيولوجية تعزز الأمن الغذائي والتوازن الإيكولوجي

## الكلمات المفتاحية

بابا علي وبوفاريك، حمض الخليك (الخل)، *Metarhizium anisopliae*, *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*

## Listes des tableaux

<b>Tableau I :</b> Les caractéristiques de différentes castes .....	61
<b>Tableau II :</b> Les signes cliniques asymptomatique chez les abeilles et chez la colonie .....	22
<b>Tableau III :</b> Les différents concentrations et volumes de biocide utilisés .....	40
<b>Tableau IV :</b> Evolution de la charge parasitaire de <i>Nosema ceranae</i> avant le traitement dans les deux régions d'études .....	41
<b>Tableau V :</b> Evaluation de la sensibilité de <i>N. ceranae</i> au différentes concentration de <i>M. Anisopliae</i> sous conditions contrôlées .....	42

## Listes des figures

<b>Figure n°01 :</b> Abeille domestique <i>Apis mellifera</i> .....	15
<b>Figure n°02:</b> Morphologie externe de l'abeille .....	16
<b>Figure n°03 :</b> Les castes d'une colonie d'abeille .....	17
<b>Figure n°04 :</b> Développement d' <i>Apis mellifera</i> depuis la ponte de l'œuf jusqu'à l'émergence: de la reine, de l'ouvrière et du faux-bourdon .....	18
<b>Figure n°05 :</b> Structure d'une spore de <i>N. ceranae</i> .....	19
<b>Figure n°06:</b> Le cycle de vie de <i>Nosema apis</i> .....	21
<b>Figure n°07:</b> Traces de matières fécales d'abeilles malades sur une façade de ruche .....	22
<b>Figure n°08:</b> <b>A:</b> Morphologie macroscopique et <b>B :</b> Microscopie de <i>M. anisopliae</i> .....	24
<b>Figure n°09:</b> (A) et (B) Aspect microscopique de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	25
<b>Figure n°10 :</b> Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule ..	26
<b>Figure n°11:</b> Emplacement de rucher au niveau de Baba Ali .....	29
<b>Figure n°12 :</b> La souche fongique de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	30
<b>Figure n°13:</b> Echantillonnages des abeilles .....	31
<b>Figure n°14 :</b> Le protocole de mise en culture de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	32
<b>Figure n°15 :</b> La purification de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	32
<b>Figure n°16:</b> A,B ,C,D, les principales étapes de multiplication du champignon .....	33
<b>Figure n°17:</b> <b>A:</b> Grattage du champignon <b>B:</b> Tube à essai contenant les filtrats de la souche testée .....	33
<b>Figure n°18:</b> Des flacons content les doses de traitement .....	34
<b>Figure n°19:</b> Les étapes d'analyse qualitative de <i>Nosema ceranea</i> .....	35

<b>Figure n°20:</b> Les étapes d'analyse quantitative de <i>Nosema ceranae</i> .....	35
<b>Figure n°21:</b> Application de traitement à base de champignon <i>M. anisopliae</i> in vivo.....	36
<b>Figure n°22:</b> Application de traitement à base de champignon <i>M. anisopliae</i> in vitro .....	37
<b>Figure n°23:</b> Application de traitement à base d'un produit chimique Acide acétique .....	37
<b>Figure n°24:</b> Aspect macroscopique du champignon <i>M. anisopliae</i> .....	39
<b>Figure n°25:</b> Aspect microscopique du champignon <i>M. anisopliae</i> .....	39
<b>Figure n°26:</b> Ultrastructure de microsporidies de <i>N.ceranae</i> au microscopie optique au grossissement x 400 G .....	40
<b>Figure n°27:</b> Comparaison des concentrations de <i>N.ceranae</i> dans les différentes ruches examinées dans les deux zones d'études.....	42
<b>Figure n°28: A:</b> Les spores de <i>N. ceranae</i> après le traitement <b>B:</b> Apparition de <i>M. anisopliae</i> après le traitement .....	43
<b>Figure n°29: A:</b> Aspect macroscopique <b>B:</b> Aspect microscopique de <i>Nosema ceranae</i> avant le traitement in vitro .....	44
<b>Figure n°30: A:</b> Aspect macroscopique <b>B:</b> Aspect microscopique de <i>Nosema ceranae</i> après le traitement in vitro après 7 jours .....	44
<b>Figure n°31: A:</b> Aspect macroscopique <b>B:</b> Aspect microscopique de <i>Nosema ceranae</i> après le traitement in vitro après 10 jours .....	45
<b>Figure n°32 :</b> Les résultats d'application d'Acide Acétique sur les microsporidies de <i>Nosema ceranae</i> in vitro .....	45
<b>Figure n°33 :</b> Les résultats obtenus au laboratoire pour traité <i>Nosema ceranae</i> dans le milieu PDA <b>A :</b> avant du utilisation de l'acide acétique <b>B :</b> Les résultats après du utilisation de l'acide acétique .....	46
<b>Figure n°34:</b> Matériel de récolte utilisé sur terrain .....	63
<b>Figure n°35:</b> Le matériel utilisé pour l'extraction et l'identification du parasite <i>Nosema ceranae</i> sur l'abeille <i>Apis mellifera</i> au laboratoire .....	63
<b>Figure n°36:</b> Le matériel utilisé pour la mise en culture et la préparation des doses de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	64
<b>Figure n°37:</b> Le matériel utilisé au laboratoire .....	65

# Sommaire

Résumé	
Liste des tableaux	
Listes des figures	
Introduction .....	13

## Partie théorique : Synthèse bibliographique

### I. La vie des abeilles

I.1. Généralité et définition.....	15
I.2. Systématique et Classification .....	15
I.3. Morphologie .....	16
I.4. Les différentes castes d'une colonie d'abeille .....	17
I.5. Le cycle de développement d'abeilles .....	17

### II. La Nosémosse des abeilles domestique

II.1. Historique .....	18
II-2. Caractérisation de la maladie .....	19
II.3. Description de l'agent causal .....	19
II.4. Systématique et classification .....	20
II.5. Cycle de vie .....	20
II.6. Mode de transmission.....	21
II.7. Les signes cliniques .....	21
II.8. Traitement .....	23
II.9. Prévention .....	23

### III. *Metarhizium anisopliae*

III.1. Généralités et définition .....	23
III.2. Taxonomie et classification .....	23
III.3. Identification de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	24
III.3.1. Caractère culturaux (dans milieux de culture) .....	24
III.3.2. Caractère morphologique (sous microscope) .....	24
III.4. Mode d'action .....	25
III.5. Facteurs affectant l'efficacité de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	26
III.5.1. Les facteurs liés au pathogène .....	27
III.5.2. Les facteurs liés au l'hôte .....	27
III.5.3. Les Facteurs liés à l'environnement .....	27

## Partie expérimentale : Matériel et méthode

1. Lieu et période d'étude .....	29
2. Objectif de notre travail .....	29
3. Zone d'étude .....	29
3.1. Emplacement de rucher .....	29
<b>II. Matériel et méthodes utilisés</b>	
<b>II.1. Matériel utilisé</b>	
II.1.1. Sur le terrain .....	29
II.1.2. Au laboratoire .....	30
<b>II.2. Méthodes utilisées</b>	
II.2.1. Sur terrain .....	30
II.2.2 Au laboratoire .....	31

## Partie expérimentale : Résultats et interprétation

<b>III. Résultats et interprétation</b>	
III.1. Identification du champignon <i>M. anisopliae</i> .....	39
III.2. Les principales concentrations <i>M. anisopliae</i> utilisées dans les traitements .....	39
III.3. Identification des microsporidies de <i>Nosema ceranae</i> .....	40
III.4. Évaluation de la charge parasitaire avant et après le traitement .....	40
III.4.1. In vivo avant traitement .....	40
III.4.2. Comparaison de la charge parasitaire dans les deux zones d'études .....	41
III.4.3. In vivo après traitement .....	42
III.4.2. Evaluation de l'efficacité de <i>M. anisopliae</i> sur les microsporédies de <i>N. ceranae</i> In vitro .....	44
III.4.3. Comparaison entre les résultats sur <i>Nosema ceranae</i> avant et après utilisation de l'acide acétique au bout de 7 jours d'incubation .....	46

## Partie expérimentale: Discussion générale

V. Discussion générale .....	48
Conclusion .....	53

### Références bibliographiques

### Annexes

# **Introduction**

# Introduction

L'abeille est un insecte qui constitue un élément indispensable à l'équilibre environnemental en tant que pollinisateur, Toute menace sur cet insecte a donc des conséquences lourdes non seulement pour l'apiculture, mais aussi pour l'agriculture en général. (**Adjlane et al., 2012**). Depuis plusieurs années une diminution des populations d'abeilles Domestiques (*Apis mellifera*) est signalée dans de nombreux pays.

*Nosema ceranae* est un endoparasite d'*Apis mellifera* qui se développe et se multiplie dans les cellules épithéliales de l'intestin de l'abeille, des infections naturelles de *Nosema ceranae* ont été détectées dans les trois castes de cette espèce : les reines les ouvrières et les mâles (**claudia, 2012**). La nosérose à *N. ceranae* est considérée comme une maladie émergente et aussi opportuniste pour *Apis mellifera* (**charlotte, 2019**).

Les pesticides dans leur ensemble peuvent tuer les insectes pollinisateurs ou parfois participent à la raréfaction de leurs ressources alimentaires (**Tasei, 1996**). En partant de la question de la réduction de l'usage des pesticides, nous nous sommes orienté vers la lutte biologique à l'aide des champignons entomopathogènes, qui représentent une alternative aux insecticides de synthèse. Notamment le biocide utilisé *Metarhizium anisopliae* (**Noé et al., 2018**).

L'utilisation de certains de ces champignons a donné des résultats satisfaisants contre plusieurs espèces d'insectes en particulier *M. anisopliae* qui a fait l'objet de nombreux travaux (**Hajek, & Leger, 1994**), parmi ces travaux :

- Application de *Metarhizium anisopliae* comme contrôle biologique potentiel de *Varroa destructor* en Italie (**Fernandez, 2020**)
- Efficacité des bandelettes enduites de *Metarhizium anisopliae* pour lutter contre *Varroa destructor* (Acari : Varroidae) dans les colonies d'abeilles mellifères du Texas et de Floride (**Walker et carlos, 2006**)
- Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de *Culiseta longirualta* en conditions contrôlées (**Taleb et Sahraoui 2015**).

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité des spores de *Metarhizium anisopliae* contre les microsporidies du genre *Nosema ceranae* chez les populations d'abeilles.

**Chapitre I**  
**Synthèse bibliographique**

## I. La vie des abeilles

### I.1. Généralité et définition

L'abeille européenne, *Apis mellifera* est l'insecte social le mieux étudié, en raison de sa longue association avec les humains (Stephen, 2002). C'est un insecte utile qui joue un rôle inestimable du point de vue écologique et contribue également, à travers ses produits, à l'alimentation des populations. En effet, cet insecte présente un intérêt économique très important, non seulement par rapport à ses différents produits exploités comme : le miel, le pollen, la gelée royale...etc. Mais aussi par son rôle fondamental dans la pollinisation et par conséquent la survie de différentes plantes végétales sauvages et cultivées ainsi que le maintien de la biodiversité des écosystèmes (Fekhar, 2021) (Figure n°01).



Figure n°01 : Abeille domestique *Apis mellifera* (Aquaportail, 2023)

### I.2. Systématique et Classification

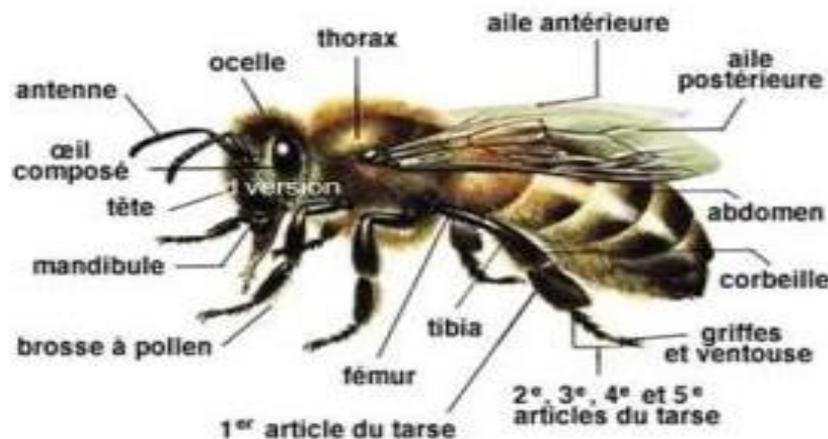
Selon (Cornet et al., 1998), et (Ravazzi, 2003) la position systématique de cette espèce est :

- ✓ Règne: Animalia
- ✓ Embranchement : Arthropoda
- ✓ Sous embranchement : Mandibulates
- ✓ Classe: Insecta
- ✓ Sous – classe : Ptérygota
- ✓ Ordre: Hymenoptera
- ✓ Sous-ordre: Apocrita
- ✓ Super-famille: Apoidea
- ✓ Famille: Apidae
- ✓ Sous-famille: Apinae
- ✓ Genre : *Apis*
- ✓ Espèce : *Apis mellifera*
- ✓ Sous espèce : *Apis mellifera ligustica* (Spinola, 1806).

### I.3. Morphologie

Le corps de l'abeille comme celui de tous les insectes ; est divisé en trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen (Figure n°02). Il est recouvert d'une membrane externe la cuticule à base de chitine qui forme l'exosquelette, cette couche gagne en souplesse pour permettre les mouvements initiés par les muscles insérés sur la surface interne de la cuticule (**Le Conte, et Navajas, 2008**).

Le corps des abeilles est souvent en forme trapue ou élancée, avec une taille qui varie dans laplupart des cas entre 5 à plus de 20 mm (**Jacob-Remacle, 1990**)



**Figure n°02:** Morphologie externe de l'abeille (**Équipe éditoriale, 2023**).

- **La tête:** La tête de l'abeille domestique est une région hautement spécialisée, siège de différentes structures sensorielles ; est de forme ovoïde chez la reine, plus ou moins triangulaire chez l'ouvrière et arrondie chez le mâle (**Biri, 2002**). Elle porte les principaux organes sensoriels (**Guezzoul, et Bouchareb, 2021**).
  - ✓ **Les yeux:** l'abeille domestique a 5 yeux : 2 yeux composés plus grands couverts de milliers de lentilles appelées ommatidies qui permettent une vision à 360 °, et 3 yeux plus petits appelés ocelles qui perçoivent la lumière dans le spectre UV les aidant à voir et à localiser le pollen (**Aquaportail, 2023**).
  - ✓ **Les antennes :** c'est avec lesquelles l'abeille sent et goutte.
  - ✓ **Les pièces buccales:** elles sont composées par une trompe qui est entouré par des mandibules, ainsi que la langue qui lui permet de récolter le nectar ou le miellat (**Adoum, 2022**)
  - ✓ **Un cerveau** d'un volume important, ainsi que les glandes hypophrygiennes, labiales et mandibulaires (**Le conte, 2006**).

- **Le thorax (partie médiane)** Situé entre la tête et l'abdomen, le thorax est constitué de trois segments communs à tous les insectes, plus une extension de premier segment abdominal (spécifique de hyménoptères). Il porte 2 paires d'ailes et 3 paires de pattes, toutes les pattes ont des récepteurs du goût sur les pointes (**Aquaportail, 2023**). Trois paires d'orifices respiratoires appelés stigmates débouchent symétriquement sur le côté du thorax (**Le conte 2006**).
- **L'abdomen (métasome):** C'est la partie la plus grosse de l'abeille, Elle est composée de sept anneaux mobiles qui peuvent s'allonger suivant le besoin (**Fresnaye, 2022**). Il contient les organes digestifs, les glandes cireuses qui sont présentes seulement chez les ouvrières, la poche à venin et la récolte de miel. En plus des organes digestifs, l'abdomen des reines et des faux-bourdon contient des organes reproducteurs (**Aquaportail, 2023**) ( Figure n°03).

#### I.4. Les différentes castes d'une colonie d'abeille

Le terme de caste est habituellement utilisé pour décrire les groupes d'individus déterminés en fonction de leur statut reproducteur (**voir Annexe I**). Chez l'abeille domestique, trois castes cohabitent sont: La reine, les ouvrières et les mâles ou les faux-bourdon. (**Adoum,2022**) (Figure n°03) .



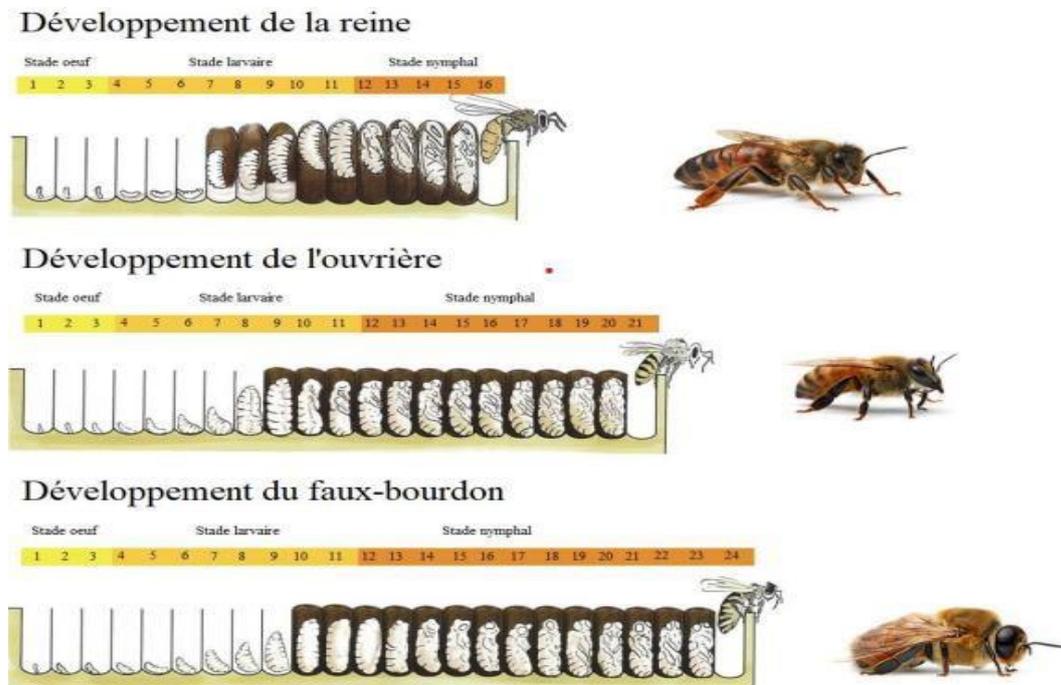
**Figure n°03 : Les castes d'une colonie d'abeille (Biri,2011)**

#### I.5. Le cycle de développement d'abeilles

Les abeilles sont dites insectes holométaboles ou à métamorphose complète. Elles sont complètement différentes à l'état larvaire et à l'état adulte (**Biri, 2011**).

Les trois types d'abeilles adultes passent par trois stades de développement avant d'émerger à l'âge adulte : œuf , larve et puppe. Même si les stades de développement soient similaires, leur durée de vie diffère. Les œufs non fécondés deviennent des faux-bourdon, tandis que les œufs fécondés deviennent des ouvrières ou des reines (**Aquaportail, 2023**). (Figure n°04)

Leur cycle de vie varient également en fonction de facteurs environnementaux comme la température (la température idéale nid pour le développement du couvain est de 35°C), l'humidité et la nutrition du couvain (**Winston, 1993**). Ainsi que les facteurs génétiques (**Le Conte, 2011**).



**Figure n°04** : Développement d' *Apis mellifera* depuis la ponte de l'œuf jusqu'à l'émergence : de la reine, de l'ouvrière et du faux-bourdon (**Winston, 1993**).

## II. La Nosémosse des abeilles domestique

### II.1. Historique

La Nosémosse ou Nosémiase est l'une des cinq maladies des abeilles réputées contagieuses par la législation française, C'est une grave maladie des abeilles adultes, connue dans le monde entier, dans certains pays, elle est considérée comme la plus redoutable (**Fleury et Bonassi, 1982**).

Pour distinguer les deux parasitoses, il a été convenu de nommer la nosémosse "historique", à *Nosema apis*, "nosémosse de type A (A pour *apis*)" (classée comme danger sanitaire de première catégorie dans la réglementation française), et d'appeler la maladie due à *Nosema ceranae* "nosémosse de type C (C pour *ceranae*)" (**Hemmerlé, 2019**)

*Nosema ceranae* est un parasite de l'abeille asiatique, a été détecté dans différentes populations géographiquement séparées d'*Apis mellifera* en Europe, en Amérique du sud et du Nord et en Asie (**Anses, 2020**). Et a été découverte en 1996. Ces parasites sous la forme de spores ovoïdes se composent de plusieurs éléments ; une enveloppe, un sporoplasme et un appareil d'extrusion (**Mauger, 2022**)

## II-2. Caractérisation de la maladie

L'agent causal est un champignon parasite microscopique appartient à l'embranchement des microsporédies du genre *Nosema* qui sont des agents pathogènes vivantes où se multiplie dans les cellules de la paroi intestinale (Charlotte, 2019).

Ces agents infectieux sont opportunistes, c'est-à-dire qu'ils profitent d'un affaiblissement de l'organisme qu'ils parasitent pour se développer. La maladie frappe le tube digestif des trois castes de la colonie. (Guezzoul, et Bouchareb, 2021).

## II.3. Description de l'agent causal

Le parasite de *Nosema* se présente sous forme de spores ovoïdes, ces dernières se composent de plusieurs éléments ; une enveloppe, un sporoplasme et un appareil d'extrusion. L'enveloppe assure une résistance au milieu extérieur notamment aux fortes températures et à la dessiccation, cependant *Nosema* spp ne semble pas bien tolérer les températures basses (Maud, 2023).

Le sporoplasme se compose d'un cytoplasme. Enfin l'appareil d'extrusion qui est l'appareil invasif contient un filament polaire et une capsule (Maud, 2023).

Les spores de *N. ceranae* sont en moyenne plus petites environ 4.7 x 2.7 µm. leur taille varie de 3.9–5.3 µm de long à 2.0–2.5 µm de large (Anses, 2020).

Les spores, éléments de conservation et de dissémination du parasite dans le milieu extérieur, possèdent une grande résistance (Fleury et Bonassi, 1982). (Figure n°05)

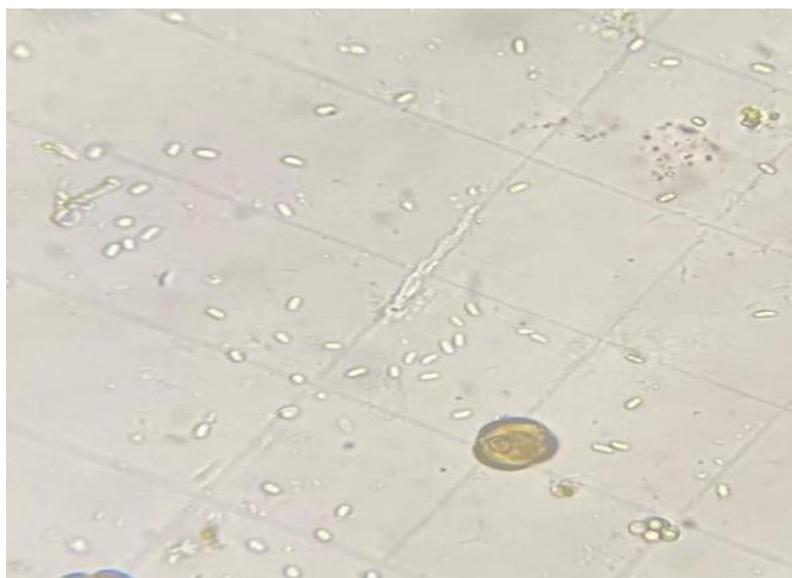


Figure n°05 : Structure d'une spore de *N. ceranae* (Originale 2024).

#### II.4. Systématique et classification

Selon (Nestor et Yves, 2007), *Nosema ceranea* appartient à :

- ✓ Règne: Fungi
- ✓ Embranchement: Microspora
- ✓ Classe: Microsporea
- ✓ Ordre: Microsporida
- ✓ Sous-ordre: Apansporoblastina
- ✓ Genre: *Nosema*
- ✓ Espèce: *Nosema ceranea*

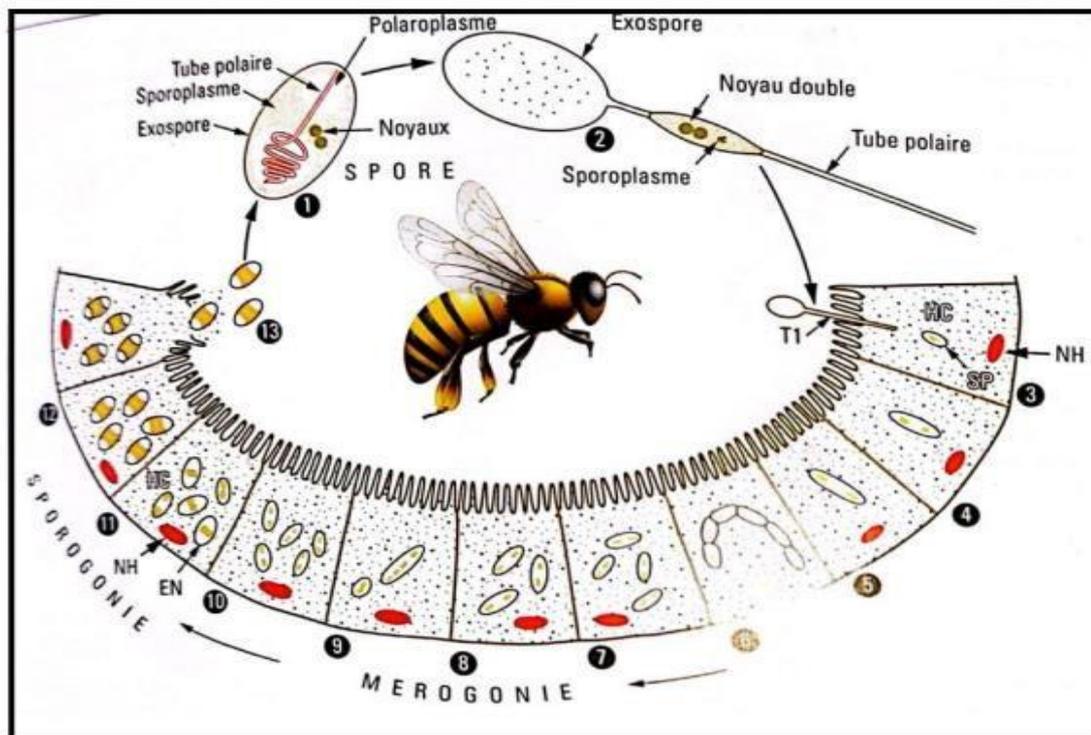
#### II.5. Cycle de vie

Le cycle évolutif de *Nosema ceranea* a été décrit pour la première de façon détaillée par Trappmann en 1920 et 1921. Son cycle de vie est complexe, elle passe par différents stades qui varient selon les conditions du milieu. Deux principales phases sont à distinguer

- **Le stade de la morphologie amiboïde:** phase végétative et reproductrice du parasite par division cellulaire dans les cellules intestinales de l'abeille
- **Le stade de la spore:** est une phase passive et résistante mais aussi de dissémination. Une fois ingérées les spores se développent dans l'intestin grâce à un filament polaire qui permet la migration du sporoplasme dans la cellule épithéliale, Le sporoplasme grossit alors pour devenir une petite cellule, nommée le méronte (Souana, 2022).

Elle élabore un système qui lui permet, une fois ingérée par l'abeille, et parvenue dans son ventricule, de s'auto-injecter dans une cellule sécrétrice de la paroi interne du tube digestif, ou elle se multiplie par une série de divisions successives. Cette cellule sécrétrice, qui participe à la digestion, est finalement envahie par un grand nombre de spores, de nouvelle génération qui sont libérées par rupture de la membrane cellulaire, propageront l'infection (Nestor et Yves, 2007).

L'agent pathogène développe des formes de résistance appelées spores, qui lui servent d'éléments de dissémination. (Nestor et Yves, 2007) (Figure n°06).



**Figure n°06:** le cycle de vie de *Nosema apis*. La spore son contenu dans une cellule épithéliale intestinal, se multiplie, et pousse finalement la cellule à éclater et à libérer les nouvelles spores dans l'intestin (Souna, 2022).

## II.6. Mode de transmission

L'infestation peut avoir lieu par ingestion d'une spore unique, il faut habituellement entre 20 et 90 spores pour que la maladie se développe. La propagation se fait par les spores dans la ruche ou entre colonies :

- ✓ Une abeille malade peut contaminer l'essaim.
- ✓ Le matériel apicole souillé par les excréments lorsque les vols de propreté sont empêchés par les mauvaises conditions climatiques.
- ✓ Le pillage.
- ✓ La transhumance.
- ✓ Les dérives.
- ✓ L'achat d'abeilles.
- ✓ Le pollen contaminé (Naturapi.com, 2021)

## II.7. Les signes cliniques

Les abeilles infestées vont avoir une destruction des cellules épithéliales de l'intestin, cette lésion va engendrer diarrhées et inflammation. Les signes cliniques de la maladie parfois observable : (Figure n°07).



**Figure (A):** Dysenterie à l'intérieur et autour de l'entrée



**Figure (B):** Traces de matières fécales façade de ruche

**Figure n°07:** Traces de matières fécales d'abeilles malades sur une façade de ruche  
(Hemmerlé.J,2019) et (apiculture.net)

**Tableau II :** Les signes cliniques peut être asymptomatique et symptomatique chez les abeilles et chez la colonie (Charlotte, 2019)

Chez les abeilles	Chez la colonie
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Une incapacité à revenir à la ruche et le décès des butineuses.</li> <li>➤ Un vieillissement précoce des nourrices et un début prématuré des fonctions de butineuses.</li> <li>➤ Une diminution de l'espérance de vie des abeilles adultes.</li> <li>➤ Abdomen gonflé</li> <li>➤ Ouvrières infectées font leur vol de repérage et amorcent leurs Fonctions de sentinelles et de butineuses plus tôt que celles en santé</li> <li>➤ Ailes disjointes</li> <li>➤ Diarrhée (traces jaunes à brunes sur ou dans la ruche);</li> <li>➤ Intestin nécrosé et blanc lors de l'autopsie (la couleur d'un intestin sain varie de jaune à brun)</li> <li>➤ Abeilles mortes ou qui rampent à l'entrée de la ruche.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Une réduction de la population d'abeilles nourrices.</li> <li>➤ Un déclin de la population d'abeilles;</li> <li>➤ Un déclin du couvain et de sa reproduction.</li> <li>➤ Un déclin de la production de miel et de son entreposage.</li> <li>➤ Une dépopulation de la ruche et un effondrement de la colonie lors d'une infection sévère.</li> <li>➤ Une diminution de l'activité de la colonie et de la ponte</li> <li>➤ Affaiblissement et mortalité des colonies à l'hiver ou au début du printemps</li> <li>➤ Présence d'infections associées à la nosébose, telles que l'amibiase</li> </ul>

## II.8. Traitement

La question du traitement de l'infection par *Nosema* est délicate étant donnée la difficulté à détecter des signes cliniques liés à la nosérose. De plus, les moyens de lutte contre *Nosema* sont relativement limités. Toutefois, l'infection des colonies d'abeilles par *Nosema* peut être contrôlée (**Guezzoul, et Bouchareb, 2021**), il y a des traitements alternatifs comme des traitements au vinaigre de cidre ou l'utilisation de produits naturels ou alternatifs (**Boucher, 2015**).

## II.9. Prévention

Parfois acide acétique est utilisé pour prévenir la nosérose en acidifiant la nourriture dans l'hiver (6 mL/litre de sirop) est populaires afin de prévenir la nosérose (**Guezzoul, et Bouchareb, 2021**)

- Eliminer les colonies atteintes les plus faibles.
- Détruire les cadres de réserves qui sont très souillés par des déjections.
- L'efficacité réelle de l'acidification de la nourriture ou de l'apport de compléments alimentaires n'a pas toujours été évaluée objectivement et ne fait pas consensus.
- Hiverner les ruches dans un lieu sec et ensoleillé
- Désinfecter soigneusement tout le matériel contaminé (**Yves, 2015**)

## III. *Metarhizium anisopliae*

### III.1. Généralités et définition

C'est le principal champignon entomopathogène eucaryotes qui provoquent des maladies chez les insectes, Cette sous espèce a été décrite pour la première fois en 1879 par Metchnikoff. . Il est également connu sous le nom de champignon vert muscardine en raison de la couleur muscardine verte des colonies sporulées produites par lui. Il était autrefois connu sous le nom d'*Entomophthora anisoplie* (**Zimmermann, 2007**). La croissance de filaments et la production de spores infectées permettre par conditions naturelles, ou conditions humides, appelées conidies qui infectent les insectes qui vivent dans le sol ou au contact. (**Talat et Sumira, 2019**). Ce champignon entomopathogène est enregistré comme agents microbiens et est utilisé comme moyen de lutte biologique contre les insectes ravageurs (**Pooja et Purabi, 2022**).

### III.2. Taxonomie et classification

Selon (**Bidochka et Small, 2005**) la classification de *Metarhizium anisopliae* basée sur des caractères morphologiques est la suivante :

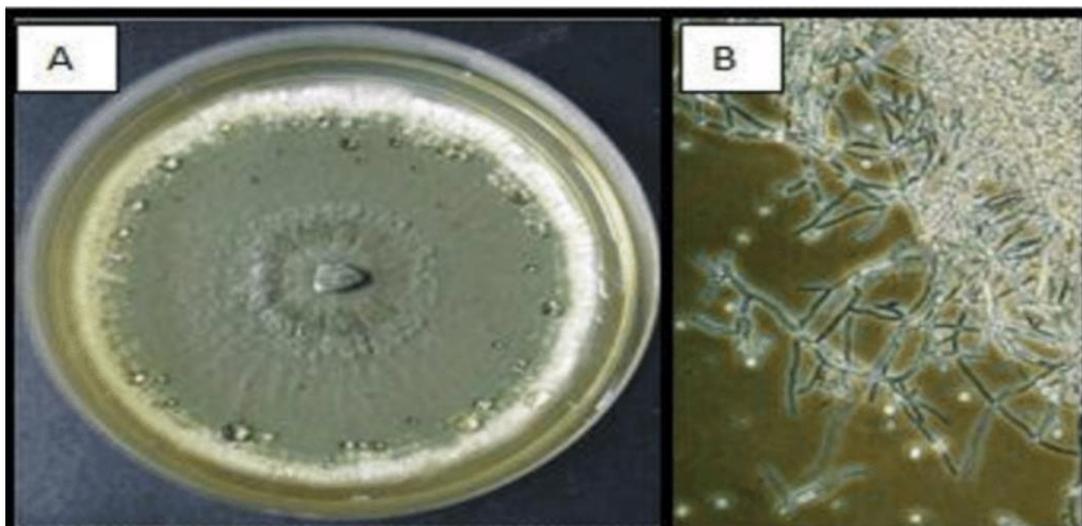
- ✓ Règne : Fungi
- ✓ Embranchement : Dikarya
- ✓ Sous-embranchement : Ascomycota
- ✓ Classe : Pezizomycotina
- ✓ Ordre : Hypocreales
- ✓ Famille : Clavicipitaceae
- ✓ Genre : *Metarhizium*
- ✓ Espèce : *Metarhizium anisopliae*

### III.3. Identification de *Metarhizium anisopliae*

#### III.3.1. Caractère culturaux (dans milieux de culture)

##### III.3.1.1. Aspect macroscopique

Après l'ensemencement sur un milieu de culture gélosé, les colonies de la souche apparaissent au bout de 7 jours d'incubation à 28°C. Les colonies sont formées d'une agrégation des chaînes conidiennes (Zimmerman et al., 2007) et sont poudreuses où Cotonneuse de couleur blanche devenues verdâtre foncée après la maturation, contournées à leur périphérie. (Amouriqet al., 1973) Au 21<sup>ème</sup> jour d'incubation, pratiquement toutes les souches apparaissent pigmentées (Figure n°08)



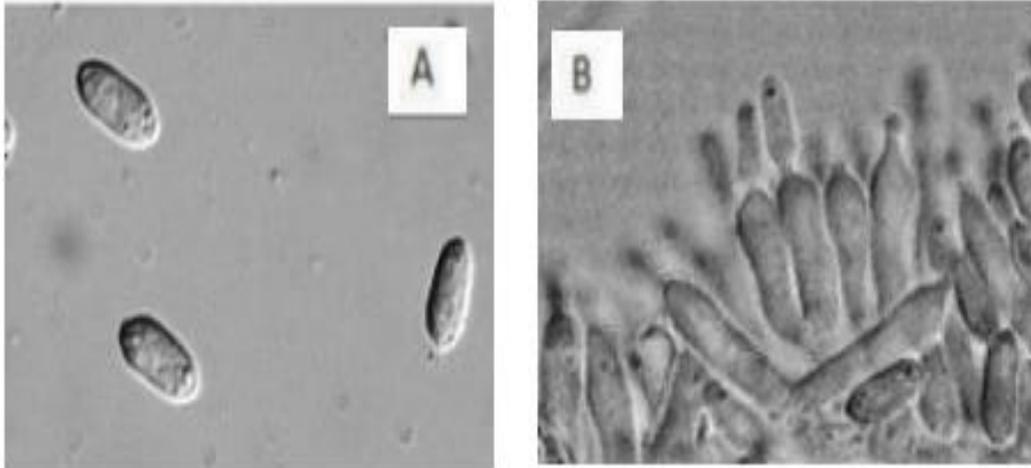
**Figure n°08:** A: Morphologie macroscopique et B : Microscopie de *Metarhizium anisopliae* (Pik-Kheng et al., 2009)

#### III.3.2. Caractère morphologique (sous microscope)

##### III.3.2.1. Aspect microscopique

La détermination de l'espèce se fait en examinant la forme des spores et des conidiophores, les conidiophores de *Metarhizium* sont relativement courts, irrégulièrement ramifiés ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse de spores, *M. anisopliae* produit des

spores vertes sont allongées avec des côtés parallèles, Elles mesurent 6  $\mu\text{m}$  de longueur pour 2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre (Greathead et al., 1994,) et par un appareil végétatif (ou mycélium) septé, autrement dit, les filaments (ou hyphes) sont cloisonnés. il est caractérisé par la présence des chaînes porteuses des phialides, des colonies de conidies cylindriques, sèches et généralement de couleur verte. (Zimmerman et al., 2007) (Figure n°09)



**Figure n°09:** (A) et (B) Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae* (Bischoff et al., 2009)

#### III.4. Mode d'action

Le mode d'action est courant, comme avec d'autres champignons entomopathogènes, où les spores infectieuses (conidie/blastospore) pénètrent par la cuticule, le stigmate ou la bouche ou l'ouverture anale et passent dans l'hémocèle de l'insecte, libérant une toxine provoquant la mort de l'insecte. *Metarhizium* produit un groupe d'enzymes responsables de la dégradation des cuticules connues sous le nom de sérine protéase de type subtilisine, métalloprotéases, trypsine, chymotrypsine, dipeptidyl peptidase, aminopeptidase et chitinase (Zimmermann, 2007).

Le mode général d'infection par *Metarhizium spp.* Comprend quatre phase dans l'ordre suivant

##### ➤ 1. Phase d'adhésion

Pour *M. anisopliae*, l'étape d'adhésion est l'étape la plus cruciale pour réussir à infecter l'hôte. Les conidies, qui sont les spores asexuées, adhèrent à l'épicuticule cireuse de leur hôte grâce à une combinaison de forces hydrophobes passives, de forces électrostatiques et de protéines interactions entre les conidies et l'épicuticule. la fixation des conidies sur la cuticule est affectée par des facteurs tels que la composition chimique de la cuticule de l'hôte, et les conditions environnementales. (Leger et al., 1989)

### ➤ 2. Phase de Germination

Après l'adhésion des conidies à la cuticule de l'hôte, la germination des conidies chez *M. anisopliae* est initiée par la présence de sources exogènes de carbone et d'azote, ces derniers étant préférentiellement utilisés et a pu être observée, au début de la germination. Après germination, les spores Gonflent et produisent des tubes germinatifs qui se différencient, en appressorium (**Kimberly et al., 2017**)

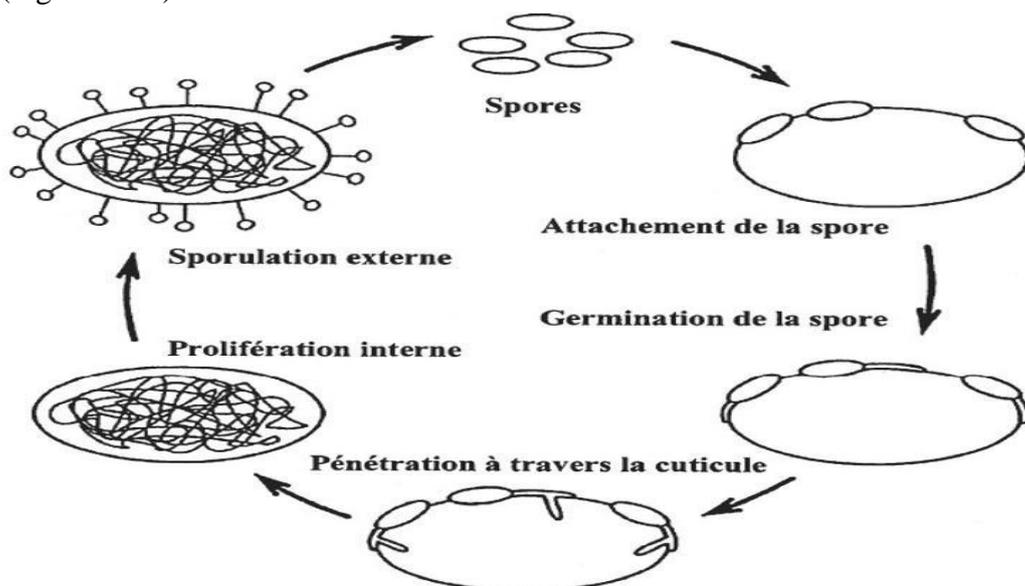
### ➤ 3. Phase de différenciation

Il ya des gènes spécifique pour régulé positivement Au cours de la germination des conidies et de la différenciation du tube germinal pour former l'appressorium et il régule l'homéostasie lipidique, la différenciation appressorium à coté de Perméabilité au glycérol dans des conditions hypoosmotiques couplée au maintien de la pression de turgescence dans Cette pression d'écoulement génère les contraintes mécaniques nécessaires à la pénétration de l'épiderme de l'hôte (**Kimberly et al., 2017**)

### ➤ 4. Phase de pénétration

La phase de pénétration se fait par la combinaison de pression mécanique et enzymatique telles que les lipases, les protéases et les chitinases, la plus importante dans la pénétration étant les protéases (**Kouassi, 2001**).

Ce champignon ne peut donc coloniser l'hôte que lorsque celui-ci parvient à déjouer les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahir l'hémolymphe (**Bidoshka et al., 1997**) (Figure n°10)



**Figure n° 10** : Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule (**Ferron et al., 1993**)

### III.5. Facteurs affectant l'efficacité de *Metarhizium anisopliae*

L'efficacité d'un champignon entomopathogène, en tant qu'agent de lutte biologique, résulte des propriétés des populations de l'hôte et du pathogène, en interaction avec les conditions.

#### III.5.1. Les facteurs liés au pathogène

- La virulence
- La spécificité de l'hôte
- Le potentiel épizootique
- La durée de conservation des spores sans hôte ou encore la capacité de survie du champignon dans le milieu (sol, biomasse microbienne du sol). (**Ferron et al., 1991**).

#### III.5.2. Les facteurs liés au l'hôte

Il est maintenant reconnu que tous les stades de développement de l'insecte, de l'oeuf jusqu'à l'adulte, peuvent être sensibles à l'infection fongique. L'épizootie fongique survient généralement à de fortes densités de la population hôte favorisant ainsi la probabilité de contact entre le pathogène et l'hôte, de même qu'entre les insectes infectés et non infectés (**Ferron et al., 1991**).

#### III.5.3. Les Facteurs liés à l'environnement

- Rayonnements solaires ont des effets importants sur la persistance des spores fongiques entomopathogènes.
- La température est un facteur important qui peut affecter le taux de germination, la croissance, la sporulation
- L'humidité environnementale est un paramètre très important pour la germination des conidies dans la nature.
- L'efficacité de *Metarhizium anisopliae* dépend du sol ; les champignons dans le sol sont protégés contre la dessiccation, le rayonnement ultraviolet et les températures extrêmes (**Boudjelida et Soltani., 2010**).

# **Chapitre II**

## **Matériel et méthodes**

**1. Lieu et période d'étude**

Notre travail a été réalisée au niveau de deux structures scientifiques:

- Le rucher de l'Institut Technique d'Élevage (ITELV) de Baba Ali.
- Le laboratoire de Projet de Fin d'Etude (PFE) du département biotechnologie de la faculté SNV Blida 1.
- Le laboratoire de l'Institut Technique d'Élevage (ITELV) de Baba Ali.

Durant une période de 6 mois allant du janvier à juin 2024.

**2. Objectif de notre travail**

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'efficacité et la virulence du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* vis-à-vis du parasite des abeilles *Noséma ceranea*.

**4. Zone d'étude**

Les abeilles sont issues de deux zones différentes qui sont : Baba Ali et Boufarik .

**4.1 Emplacement de rucher**

En apiculture, l'emplacement de rucher très important: milieu ombragé, loin de circulation, présence d'eau, les ruchers sont déposés sur un terrain plats d'accès facile, les ruchers de notre étude (Figure n° 11) sont déposés dans des vergers d'Oranges à Boufarik et à Baba Ali près des arbres d'Eucalyptus et de plantes spontanées:



**Figure n°11:** Emplacement de rucher au niveau de Baba Ali (**Originale 2024**).

**II. Matériel et méthodes utilisés****II.1. Matériel utilisés****II.1.1. Sur le terrain****II.1.1.1. Matériel non biologique**

Le matériel utilisé pour le prélèvement des échantillons d'abeilles est: La ruche, combinaison apicole et des gants pour une meilleur protection , un enfumoir, une lève cadre, **(Voir Annex II)**

### **II.1.1.2. Matériel biologique**

- L'abeille *Apis mellifera* parasité par *Nosema ceranae*.

### **II.1.2. Au laboratoire**

#### **II.1.2.1. Matériels non biologique**

- Le matériel utilisé pour l'extraction et l'identification du parasite *Nosema ceranae* sur l'abeille *Apis mellifera* : **(Voir Annex III)**;
- Le matériel utilisé pour la mise en culture et la préparation des doses de *Metarhizium anisopliae*: **(Voir Annex III)**;
- Le produit utilisé aussi dans le traitement chimique contre *Nosema ceranae* est l'acide acétique

#### **II.1.2.2. Matériels biologique**

- L'abeille *Apis mellifera*;
- Le parasite *Nosema ceranae*;
- La souche *Metarhizium anisopliae*: a été obtenue du département de lutte antiacridienne de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) d'El Harrach sous forme de poudre sèche du bio insecticide Green muscle de couleur verte (Figure n°12).



**Figure n°12** : La souche fongique de *Metarhizium anisopliae* (Originale 2024).

## **II.2. Méthodes utilisées**

### **II.2.1. Sur terrain**

#### **II.2.1.1. Evaluation de la charge parasitaire de *Nosema ceranae* sur *Apis mellifera* dans les deux régions d'études**

Durant la période de mars à mai 2024 des sorties sur terrain ont été réalisées à raison d'une sortie par mois pour les deux zones d'études dans des ruches susceptibles de présenter des symptômes de la Nosébose, pour cela nous avons suivi le protocole suivant :

- Nous avons observé les signes cliniques et leurs importances dans chaque ruche la plus infectée des deux stations
- Aussi par une boîte en plastique, nous avons prélevé de 25 à 30 abeilles de chaque station; 4 ruches de Baba Ali numérotées de (1, 2, 3 et 4), aussi 4 ruches de Boufarik numérotées (20, 21, 22, et 23)
- Puis ramenées au laboratoire pour analyse (Figure n°13).



**Figure n°13:** Echantillonnages des abeilles (Originale 2024).

## **II.2.2 Au laboratoire :**

### **II.2.2.1 Choix du milieu de culture**

Concernant le genre *Metarhizium*, le milieu de culture spécifique est le milieu PDA (Potatos Dextros Agar). C'est un milieu riche en amidon, milieu préférentiel pour ce genre d'hyphomycète.

### **II.2.2.2 Mise en culture de *Metarhizium anisoplaie* :**

La mise en culture de *Metarhizium anisoplaie* a été réalisée selon le protocole suivant:

- Placer le flacon au bain marie (Figure 14, A);
- Refroidissement du milieu (Figure 14, B);
- Écoulement le milieu dans des boîtes de Pétri stériles (remplir le  $\frac{3}{4}$  de boîte) (Figure 14, C);
- Refroidissement des boîtes jusqu'à la solidification du milieu (Figure 14, D);
- Ensemencement de champignon dans ces boîtes (Figure 14, E)
- Incubation de champignon dans une étuve à 25°C pendant 7 jours (Figure 14, F).

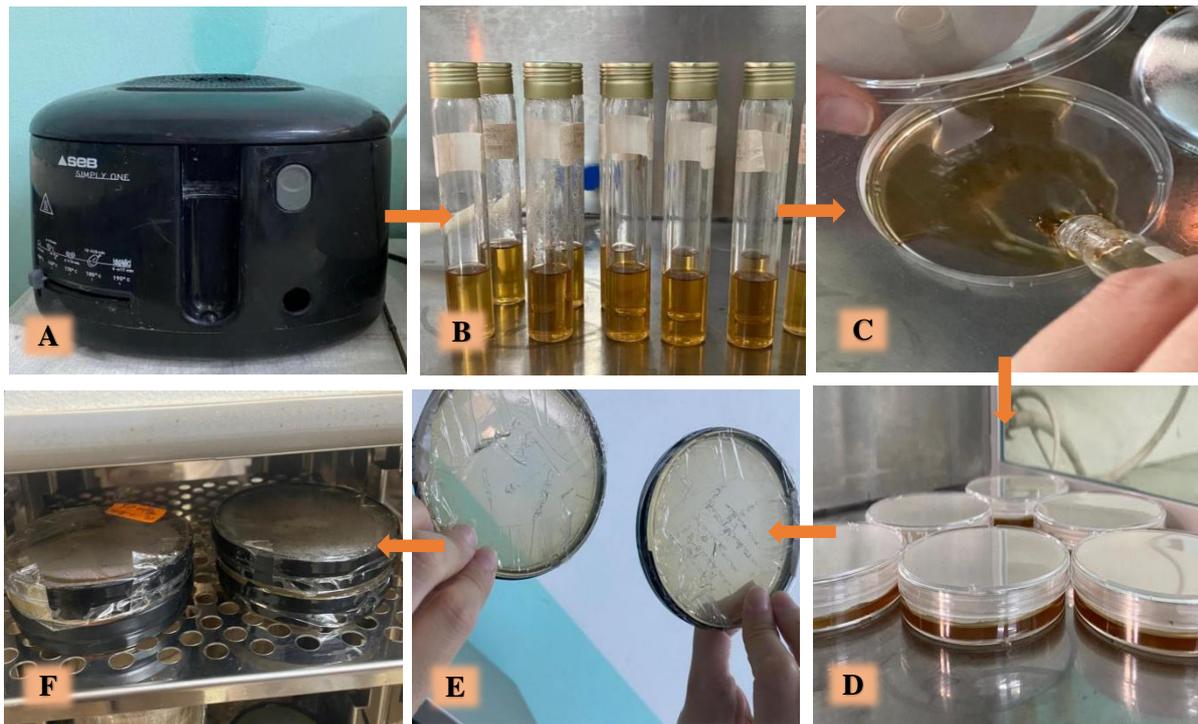


Figure n°14 : Le protocole de mise en culture de *Metarhizium anisopliae* (Originale 2024).

### 1. Identification du champignon au microscope photonique

L'identification se fait par l'observation microscopique des structures morphologiques de *Metarhizium anisopliae* entre lame et lamelle au grossissement X 40.

### 2. Purification du champignon *M. anisopliae*

Au bout de 7 jours d'incubation du champignon après son identification, le repiquage de ce dernier est effectué sur d'autres boîtes de pétri stériles contenant le même milieu de culture PDA dans le but de purifier la souche (Figure n°15).

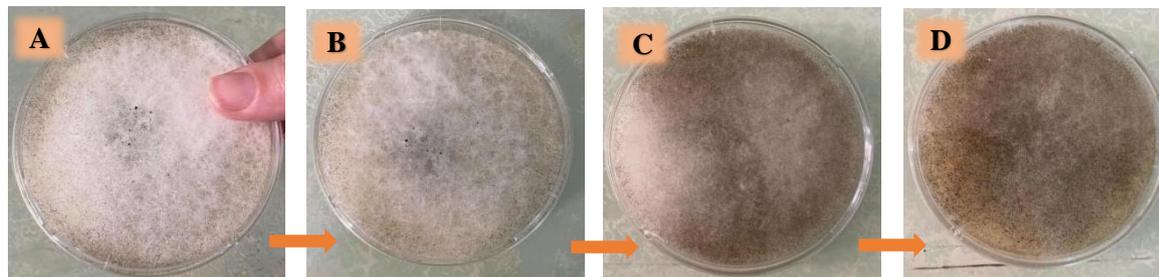


Figure n°15 : La purification de *Metarhizium anisopliae* (Originale 2024).

### 3. Multiplication du champignon *M. anisopliae*:

Après 7 jours de la multiplication de la souche, nous avons repiqué d'autres boîtes de Pétri stériles contenant le milieu PDA sous la hotte à flux laminaire, les boîtesensemencées sont

placées dans une étuve à 25°C pendant 10 à 15 jours jusqu'à ce que le champignon remplisse toute la surface des boîtes de petri (Figure n°16).

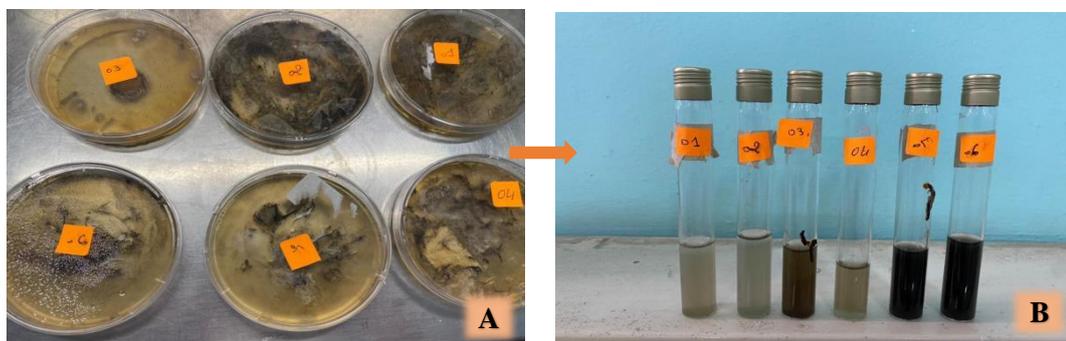


**Figure n°16:** A,B ,C,D, les principales étapes de multiplication du champignon (Originale 2024).

#### 4. Isolation et conservation du champignon *M. anisopliae*

Les étapes de l'isolation et la conservation de *Metarhizium anisopliae* sont:

- Grattage des surfaces de des boîtes à l'aide d'une pipette pasteur, la gratture obtenue est versée dans une petite fiole contenant 10 ml d'eau physiologique, puis agitation pendant 10 min à l'aide d'un vortex (Figure 17, A);
- Filtration du mélange, à l'aide d'un papier filtre, le filtrat est conservé dans des tubes à essais hermétiquement fermé à 4°C (Figure 17, B).



**Figure n°17:** A: Grattage du champignon

**B:** Tube à essai contenant les filtrats de la souche testée (Originale 2024).

#### 5. Comptage et évaluation des concentrations du champignon *M. anisopliae*

Le comptage des spores de notre solution diluée est réalisé à l'aide d'une cellule de malassez sous un microscope optique (dans la cellule malassez est composée de 100 rectangles, chacun divisé en 20 carrés cellule) sous le protocole suivant:

- Prélèvement d'une goutte de la solution mère;
- Préparations des dilutions;
- Dépôt d'une goutte de la solution au centre de la cellule malassez;
- Dépôt la lame;
- Comptage de les spore sous microscope.

Pour l'évaluation des concentrations en masse des solutions de *M anisopliae* nous avons utilisé la relation spécifique qui permet le comptage des spores propre à la cellule de mallasse est qui:

$$\text{Spores/ } \mu\text{ l} = \frac{\text{le nombre de spores comptés}}{(\text{surface} \cdot \text{mm}^2 \times \text{profondeur} \cdot \text{mm} \times \text{dilution})}$$

### 6. Préparation des dilutions et calcul des concentrations finales :

Pour les dilutions nous avons utilisée cette règle:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

- $C_1$  : la concentration en spore obtenue a partir du  $V_1$  ( $C_1$  et  $V_1$  sont connue  $V_1 = 10\text{ml}$ );
- $C_1$ : C'est la concentration calculée a partir de la C de mallassez );
- $C_2$  : La concentration voulue (à obtenir) ;
- $V_1$  : Volume initial d'eau mis dans le Tube à essai;
- $V_2$  : Volume d'eau correspondant à la concentration choisie  $C_2$ . (Figure n°18).

### Choix des doses ou concentrations

Trois concentrations ont été choisie à partir d'une série de dilution ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ )



Figure n°18: Des flacons content les doses de traitement (Originale 2024).

### II.2.2.3. Evaluation de la charge parasitaire (*Nosema ceranae*) ou concentration des microsporidies dans une population d'abeilles avant et après le traitements.

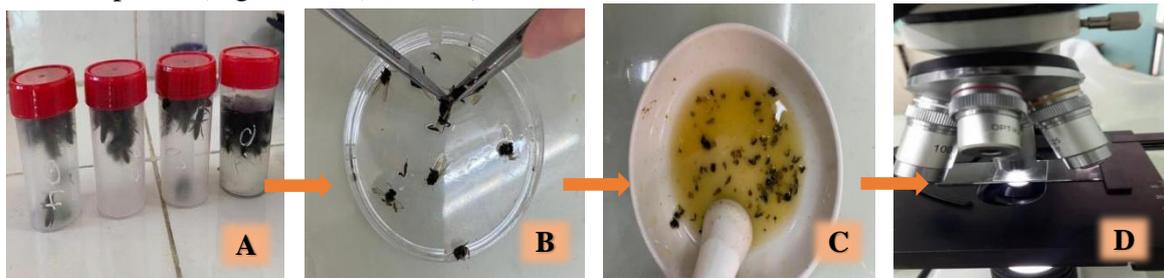
**Le principe:** L'évaluation de la charge parasitaire de *N. ceranae* est obtenue à partir d'un échantillon de broyats d'abdomens

#### II.2.2.3.1. Mise en évidence de la présence de *Nosema ceranae* :

##### A. Analyse qualitatif :

- Prélever 25 abeilles et les mettre dans un récipient de type boîte de pétri (Figure 20, A);
- A l'aide des ciseaux et de la pince souple prélever les abdomens par découpe au niveau du pétiole (Figure 19, B);

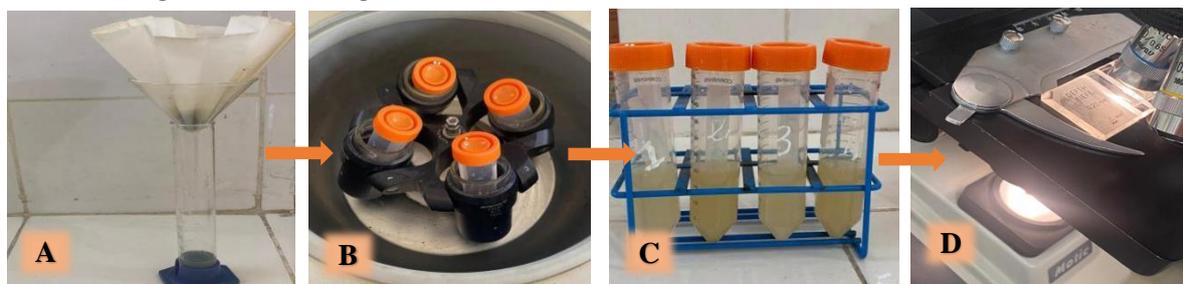
- Mettre les abdomens dans un mortier, ajouter 25ml d'eau distillée et broyer avec le pilon (bien écraser les abdomens) (Figure 19, C);
- A l'aide d'une micro-pipette, déposer 10µl de la suspension sur une lame de microscope, couvrir avec une lamelle;
- Examiner au microscope au grossissement X 40 ; (Figure 19, D);
- Dans le cas de résultat positif, passer à l'examen quantitatif pour le comptage des spores. (Figure n°19) (Anses, 2020).



**Figure n°19:** Les étapes d'analyse qualitative de *Nosema ceranea* (Originale 2024).

### B. Analyse quantitative :

- Filtrer la suspension dans le tube à centrifuguer à l'aide du filtre en toile plié (Figure 20, A).
- Centrifuger 6 minutes à 4000 tours (Figure 20, B). Et éliminer le culot (Figure 20, C).
- Le comptage des spores de *Noséma* dans la cellule de malessez au grossissement x 400 G (Figure 20, D). (Figure n°20) (Anses, 2020).



**Figure n°20:** Les étapes d'analyse quantitative de *Nosema ceranea* (Originale 2024).

## II.2.2.3.2. Application de traitement

### II.2.2.3.2.1. Essai à base de champignon *M. anisoplaie*

#### a) In vivo

Nous avons échantillonné 30 abeilles de chaque ruche, nous les avons placés dans des cages afin de réaliser les différents traitements (Figure 21, A). Dans chaque cage nous avons mélangé dans un bouchon (Figure 21, B) 5ml de sirop ( source trophique pour les abeilles) avec 3ml des doses de traitements avec les différentes concentrations (Figure 21,C) . Dans chaque deux ruches nous avons utilisé une concentration précise (Figure n°22).

- Ruche 1 et ruche 23 → Dα1
- Ruche 4 et ruche 20 → Dα2
- Ruche 2 et ruche 22 → Dα3
- Ruche 21 → Témoin

Au bout de 7 jours, nous avons observé l'activité des abeilles et compté la charge de *Nosema ceranea* chaque deux jours (après l'application de traitement) avec la cellule de malassez sous microscope optique au grossissement x 400 G.

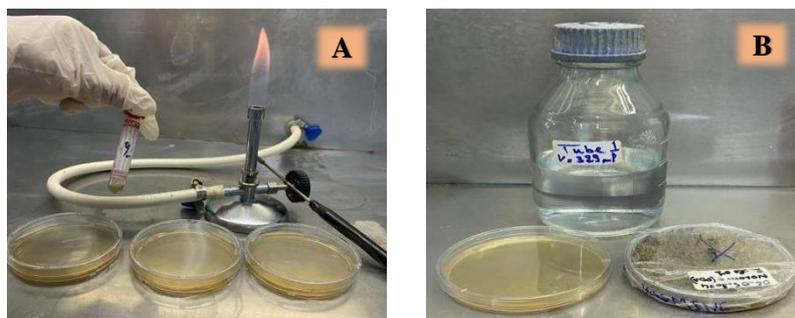


**Figure n°21:** Application de traitement à base de champignon *M. anisoplaie* in vivo  
(Originale 2024)

#### b) In vitro

L'objectif des bio essais réalisés , au laboratoire, était d'évaluer l'action du pathogène et sa virulence sur *Nosema ceranea* avant de passer sur le terrain au niveau des ruches d'abeilles ciblées. Pour cela nous avons suivie le protocole suivant (Figure n°22):

- Prendre 4 abeilles de chaque des cages, et broyer leur abdomen;
- Centrifuger et observer la présence de *Nosema ceranea* sous microscope optique;
- Ensemencement du broyat dans du milieu PDA (Figure 22, A);
- Incubation de champignon dans une étuve à 25°C pendant 7 jours;
- Après 7 jours d'incubation du champignon et apparition du *Nosema ceranea*, le repiquage de ce dernier est effectué sur d'autres boîtes de Pétri avec une dose connue de *Metaharizium anisoplaie* (Figure 22, B) .



**Figure n°22:** Application de traitement à base de champignon *M. anisoplaie* in vitro  
(Originale 2024).

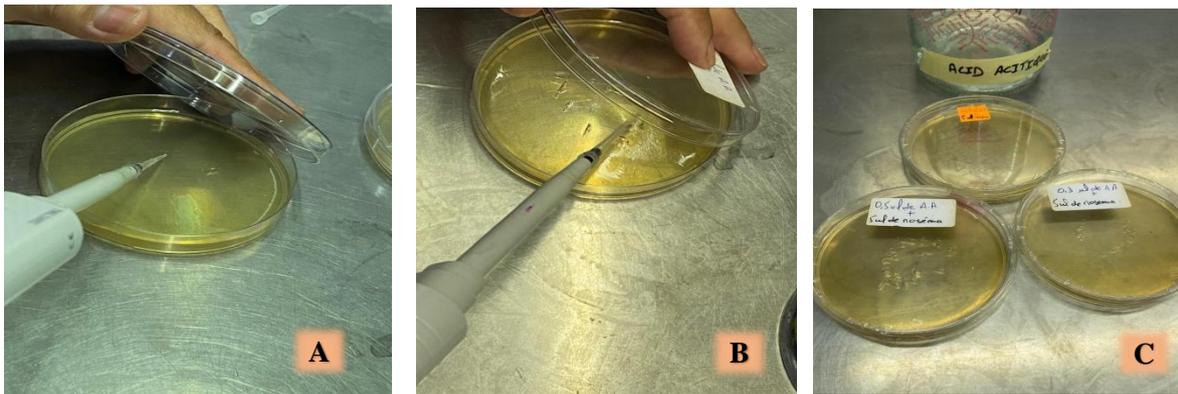
### II.2.2.3.2.2. Essai à base d'un produit chimique Acide acétique

Pour évaluer l'efficacité de l'acide acétique en tant que traitement chimique pour réduire les spores de *Nosema* dans un environnement PDF, nous avons entrepris une série de tests rigoureux. Ces tests ont été menés en utilisant différentes concentrations d'acide acétique sur des échantillons infestés par *Nosema*.

Nous avons fixé 3 doses:

- □ Dose 1 (0,3  $\mu$ l)
- □ Dose 2 (0,5  $\mu$ l)
- □ Dose 3 (0,8 $\mu$ l)

Dans trois boîtes de Pétri contenant un milieu PDA, nous avons appliqué respectivement les trois doses choisies, dans lesquelles nous avons ajouté une dose de broyat contenant des microsporédies de *N. ceranae*, nous avons incubé les boîtes dans une étuve à 25°C, puis observation au microscope photonique (Figure n°23).



**Figure n°23:** Application de traitement à base d'un produit chimique Acide acétique  
(Originale 2024).

# **Chapitre III**

## **Résultats et interprétations**

### III. Résultats et interprétation

#### III.1. Identification du champignon *M. anisopliae*

##### a. Aspect macroscopique

La maturation de *M. anisopliae* dans le milieu de culture PDA, donne un aspect cotonneux et poudreux de couleur blanche devenus verdâtre foncée (Zimmerman et al., 2007). (Figure n°24).

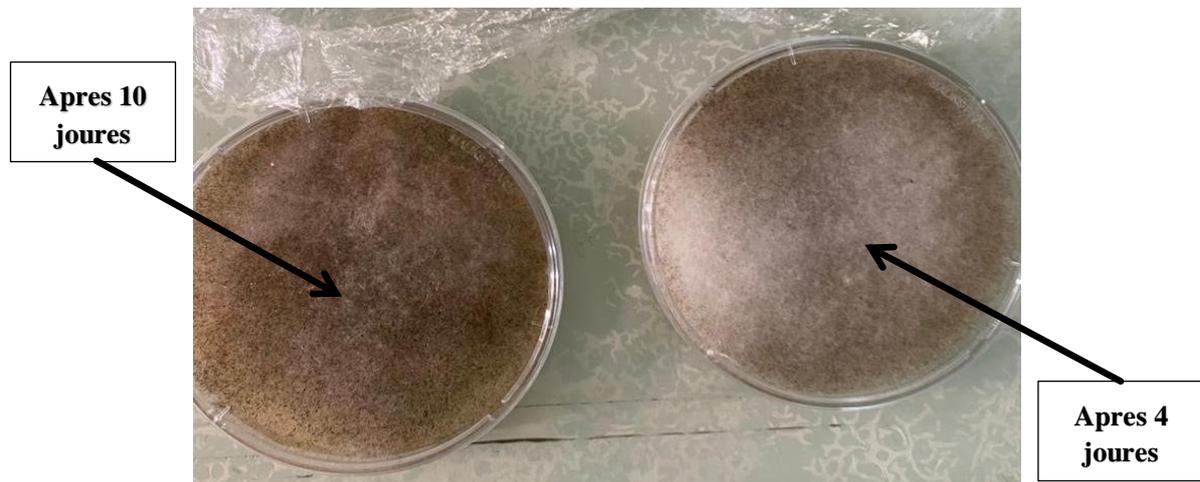


Figure n°24: Aspect macroscopique du champignon *M. anisopliae* (Originale 2024).

##### b. Aspect microscopique

L'identification microscopique de *M. anisopliae* est déterminée par la présence de spores ou des conidies de couleur verte de forme allongée et un mycélium cloisonné (septé) (Greathead et al .1994) (Figure n°25).

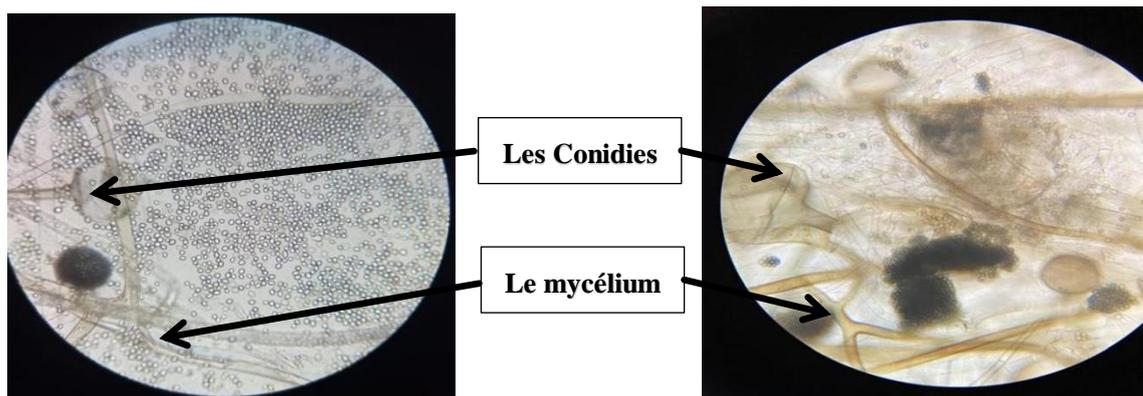


Figure n°25: Aspect microscopique du champignon *M. anisopliae* (Originale 2024).

#### III.2. Les principales concentrations *M. anisopliae* utilisées dans les traitements

Les concentrations choisies nous ont permis d'évaluer les volumes d'eau à utiliser représentées dans le tableau III :

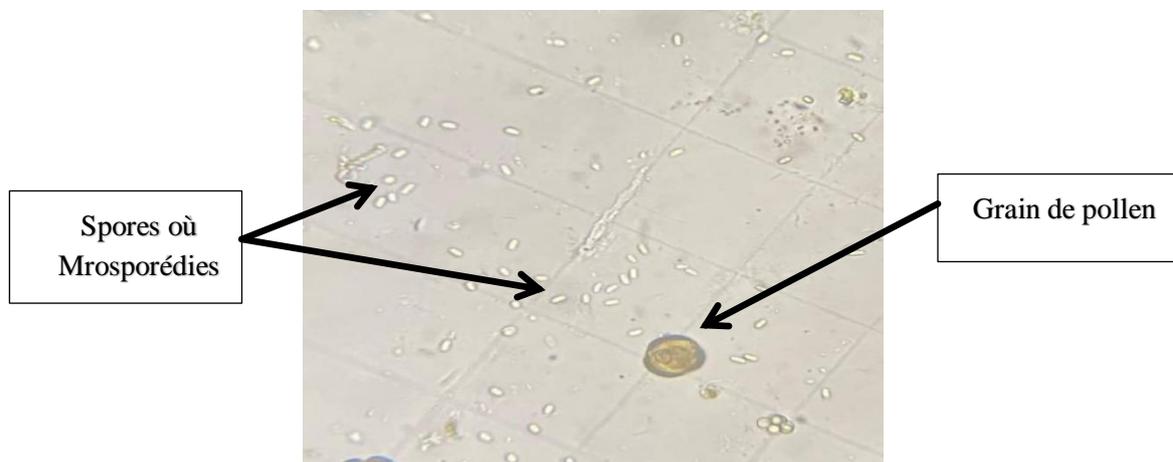
**Tableau III :** Les différents concentrations et volumes de biocide utilisés

	Tube 01	Tube 02	Tube 03
Concentration	D $\alpha$ 1	D $\alpha$ 2	D $\alpha$ 3
Volumes d'eau	329 ml	63,46 ml	316 ml

### III.3. Identification des microsporidies de *Nosema ceranae*

L'examen microscopique des broyats d'abeille a permis d'identifier les microsporidies de *N. ceranae* selon les critères morphologiques suivants

- Les spores de couleur jaune pâle, ovoïde, en forme de grain de riz entourés par une paroi épaisse (ANSES, 2020) (Figure 26).



**Figure n°26:** Ultrastructure de microsporidies de *N.ceranae* au microscopique optique au grossissement x 400 G (Originale 2024).

### III.4. Évaluation de la charge parasitaire avant et après le traitement

#### III.4.1. In vivo avant traitement

Après le comptage des spores à l'aide de la cellule de malassez, les résultats des taux d'infestation ou charge parasitaire de *N. ceranae* dans les différentes ruches sont reportés dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Evolution de la charge parasitaire de *Nosema ceranae* avant le traitement dans les deux régions d'études

Régions	Baba Ali			Boufarik			
	Périodes			Périodes			
Numéros des ruches	Mars	Avril	Mai	Numéros des ruches	Mars	Avril	Mai
	Nombre de spore				Nombre de spore		
<b>Ruche 01</b>	267	323	353	<b>Ruche 20</b>	29	40	53
<b>Ruche 02</b>	232	299	393	<b>Ruche 21</b>	24	40	49
<b>Ruche 03</b>	214	485	Mortes d'abeilles	<b>Ruche 22</b>	44	48	61
<b>Ruche 04</b>	229	263	332	<b>Ruche 23</b>	37	50	70

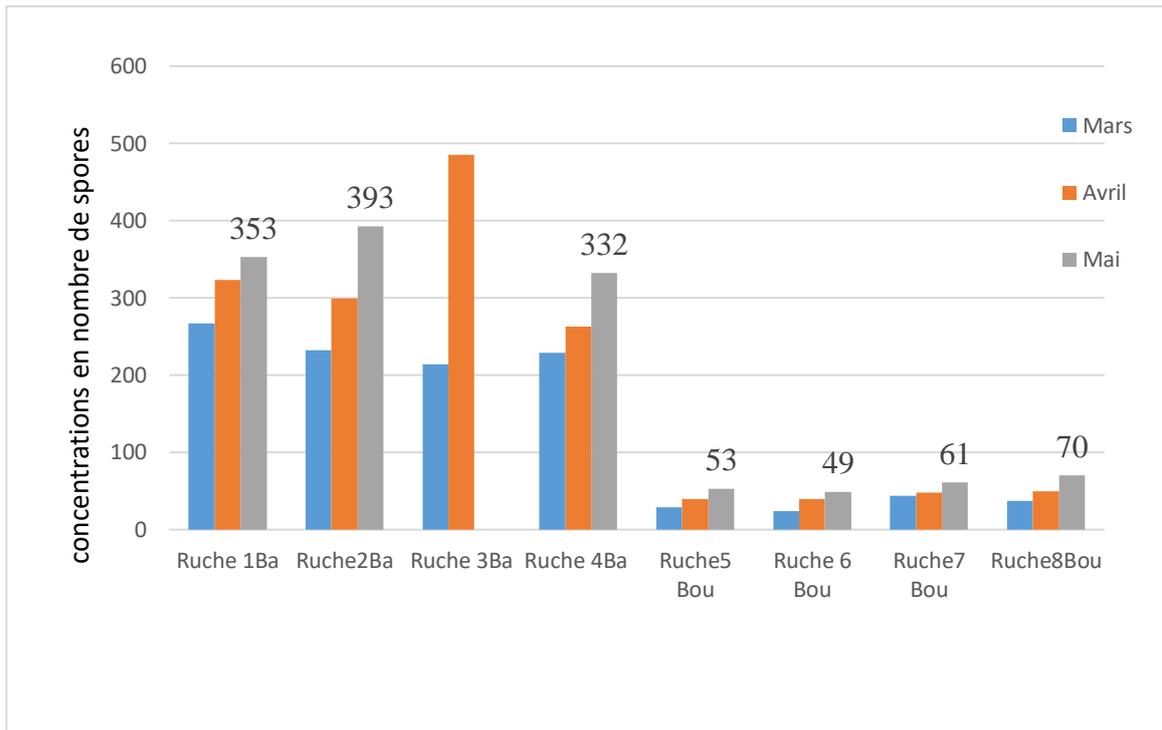
### **Interprétation:**

D'après le tableau IV nous avons remarqué que la charge parasitaires augmente régulièrement chaque mois dans les 8 ruches indiquant une croissance continue de l'infection par *Nosema ceranae*.

La forte augmentation en avril qui est de de 485 spores suivie de la mortalité des abeilles en mai suggère une mortalité élevée due à une infection sévère, probablement entraînant la mort des abeilles ceci est confirmé par les observation microscopique.

### **III.4.2.Comparaison de la charge parasitaire dans les deux zones d'études**

La figure ci-dessus représente une comparaison de la charge parasitaire dans les deux zones d'études Baba Ali et Boufarik (Figure n°27)



**Figure n°27:** Comparaison des concentrations de *N. ceranae* dans les différentes ruches examinées dans les deux zones d'études.

### **Interprétation:**

Le diagramme (Figure n°27) met en évidence une différence marquée dans la charge parasitaire entre les deux zones d'étude. Les ruches de la zone de Baba Ali sont plus affectées par *Nosema ceranae* avec des concentrations croissantes durant les 3 mois d'étude, atteignant un maximum de 393 au sein de la ruche 2 au mois de mai. En revanche, Boufarik maintient une charge relativement basse et stable dans les différentes ruches durant la période d'étude.

### **III.4.3. In vivo après traitement**

Les bios essais réalisés au laboratoire sur la *Nosema ceranae* ont donné les résultats représentés dans le tableau V.

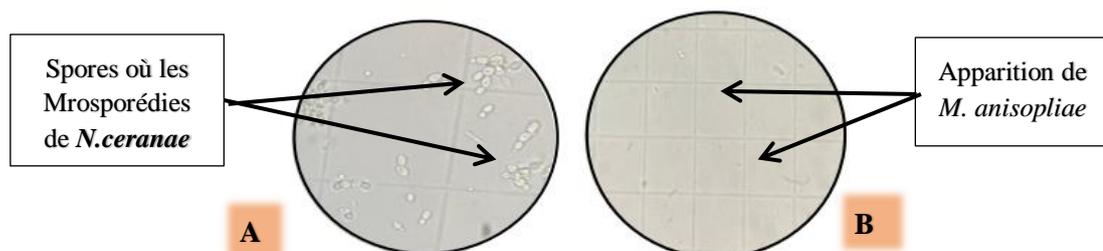
**Tableau V:** Evaluation de la sensibilité de *N. ceranae* aux différentes concentrations de *M. Anisopliae* sous conditions contrôlées

Rucher	Concentration	7 mai 2024	9 mai 2024	12 mai 2024
Ruche 01	D $\alpha$ 1 Faible dose	➤ 60 Spores	➤ 15 Spores ➤ Apparition de <i>M. anisopliae</i>	➤ Diminution de <i>N. ceranae</i> ➤ Augmentation de <i>M. anisopliae</i>

<b>Ruche 23</b>	D $\alpha$ 1 Faible dose	➤ 63 Spores	➤ 20 Spores ➤ Apparition de <i>M. anisopliae</i>	➤ Diminution de <i>N. ceranae</i> ➤ Augmentation de <i>M. anisopliae</i>
<b>Ruche 02</b>	D $\alpha$ 2 Dose moyenne	➤ 128 Spores	➤ 37 Spores	➤ 5 Spores ➤ Mort des abeilles
<b>Ruche 20</b>	D $\alpha$ 2 Dose moyenne	➤ 40 Spores	➤ 10 Spores	➤ 3 Spores ➤ Mort des abeilles
<b>Ruche 04</b>	D $\alpha$ 3 Forte dose	➤ 95 Spores	➤ 20 Spores	➤ 6 Spores ➤ Mort des abeilles
<b>Ruche 22</b>	D $\alpha$ 3 Forte dose	➤ 41 Spores	➤ 30 Spores	➤ 4 Spores ➤ Mort des abeilles
<b>Ruche 21 (Témoin)</b>	/	➤ 32 Spores	➤ 111 Spores	➤ 143 Spores ➤ Mort des abeilles

**Interprétation:**

Le tableau présente la sensibilité des microsporides de *Nosema ceranae* aux différentes concentrations de *M. anisopliae* testées au laboratoire. D'après les résultats, une diminution des spores (Figure n°28, A) a été observée juste après l'application du traitement pour les différentes concentrations utilisées. Dans les ruches 1 et 23, où une faible dose a été utilisée, le troisième jour après le traitement, nous observons l'apparition de *M. anisopliae* (Figure n°28, B) et la continuité de la diminution des spores de *N. ceranae*. En revanche, la charge parasitaire chez le témoin augmente constamment en l'absence de traitement (Figure n°28).



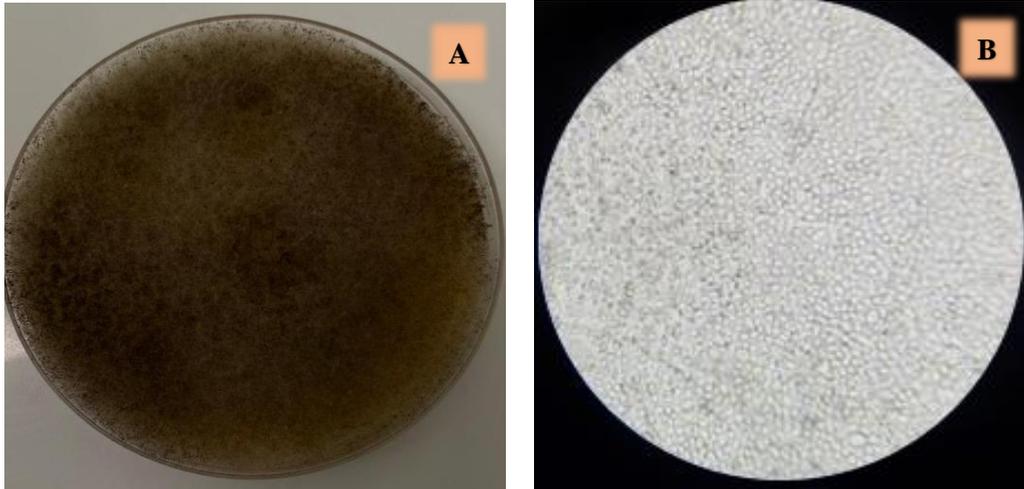
**Figure n°28: A:** Les spores de *N. ceranae* après le traitement  
**B:** Apparition de *M. anisopliae* après le traitement (Originale 2024).

### III.4.2. Evaluation de l'efficacité de *M. anisoplaie* sur les microsporédies de *N. ceranae* In vitro

#### A. Essai à base de champignon *M. anisoplaie*

Les résultats obtenus des bios essais réalisés au laboratoire après 10 jours de traitement sont notés selon les observations obtenus dans les (Figure n°29) et (Figure n°30):

##### 1. Avant le traitement



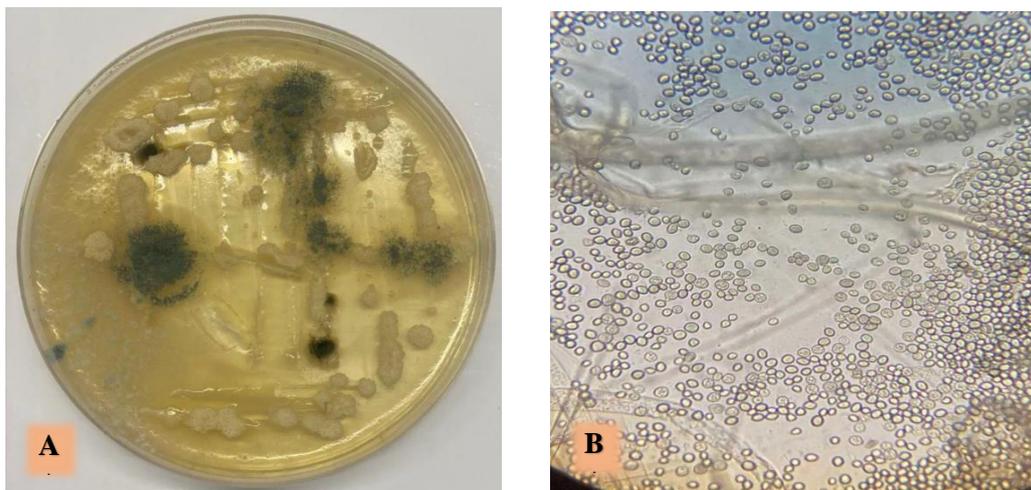
**Figure n°29:** A: Aspect macroscopique B: Aspect microscopique de *Nosema ceranae* avant le traitement in vitro (Originale 2024).

#### Interprétation:

D'après la figure (Figure n°29), nous avons observé la présence de *Nosema ceranae* entre lame et lamelle selon les critères d'identification des spores.

##### 2. Après le traitement

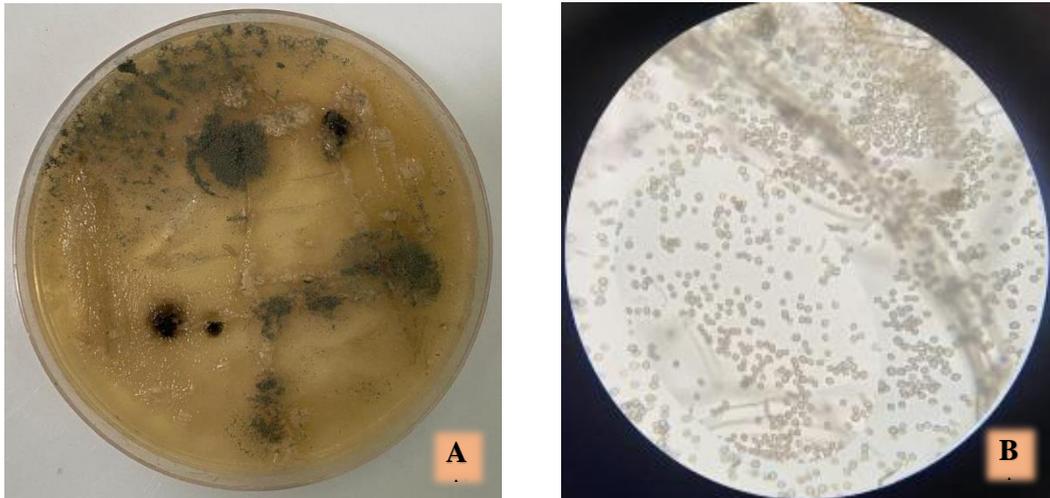
###### a) Après 7 jours :



**Figure n°30:** A: Aspect macroscopique B: Aspect microscopique de *Nosema ceranae* après le traitement in vitro après 7 jours (Originale

2024).

b) Après 10 jours :



**Figure n°31: A:** Aspect macroscopique **B:** Aspect microscopique de *Nosema ceranae* après le traitement in vitro après 10 jours (Originale 2024).

### Interprétation:

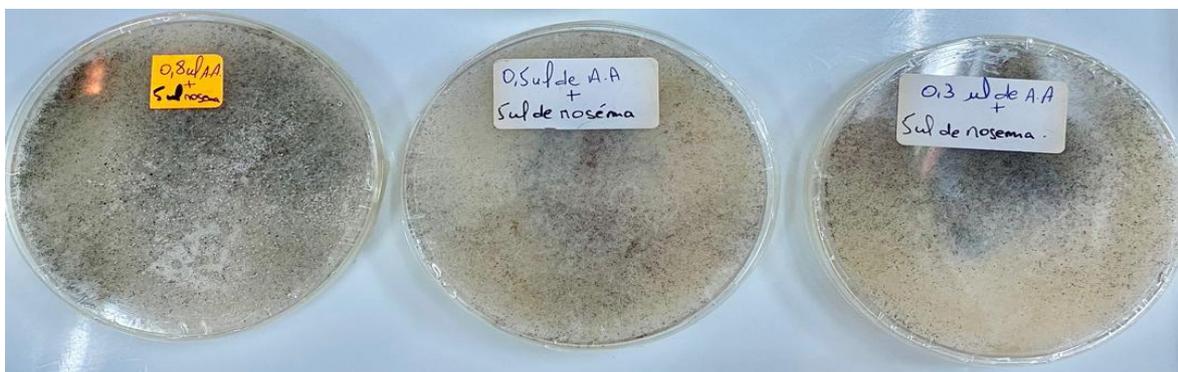
La figure (Figure n°33) montre qu'après 7 jours d'incubation suivant le traitement, nous avons observé à l'œil nu une lente multiplication de *Nosema ceranae* par rapport à *M. anisopliae* dans le milieu PDA. De plus, l'apparition des deux microorganismes a été confirmée sous microscope optique.

Après 10 jours, nous avons constaté la continuité de la multiplication de *M. anisopliae* et l'arrêt de la multiplication des spores de *Nosema*.

### **B. Essai à base d'Acide acétique :**

Les résultats obtenus après utilisation des doses suivantes de l'acide acétique: (Figure n°32).

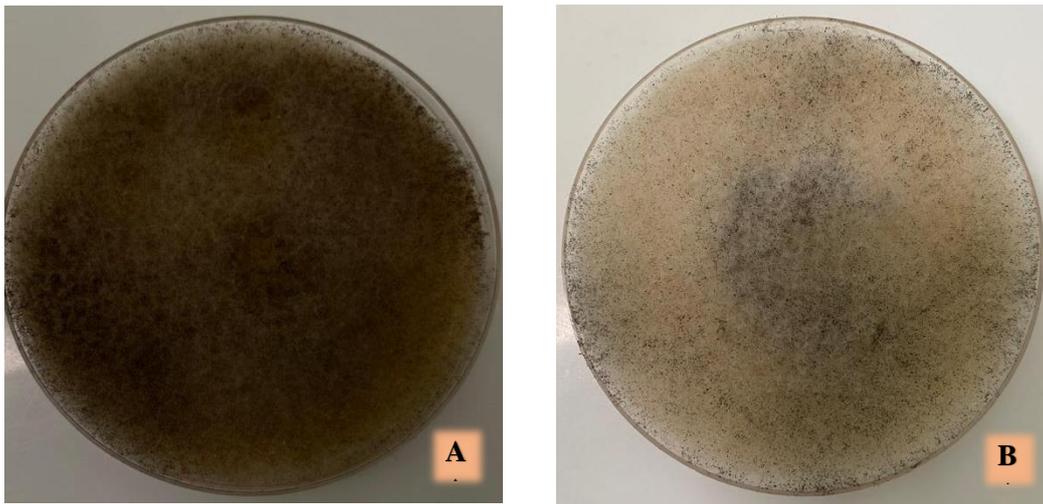
- Dose 1 (0,3 µl)
- Dose 2 (0,5 µl)
- Dose 3 (0,8 µl)



**Figure n°32 :** Les résultats d'application d'Acide Acétique sur les microsporidies de *Nosema ceranae* in vitro (Originale 2024).

### III.4.3. Comparaison entre les résultats sur *Nosema ceranae* avant et après utilisation de l'acide acétique au bout de 7 jours d'incubation :

Les résultats obtenus au laboratoire pour traité *Nosema ceranae* dans le milieu PDA par l'utilisation de Acide acétique avant (Figure 33, A) et après (Figure 33, B) le traitement sont: (Figure n°33):



**Figure n°33 :** Les résultats obtenus au laboratoire pour traité *Nosema ceranae* dans le milieu PDA **A :** avant du utilisation de l'acide acétique  
**B :** Les résultats après du utilisation de l'acide acétique (**Originale 2024**).

#### **Interprétation :**

La figure (Figure n°33) présente les résultats obtenus au laboratoire de l'application de l'acide acétique sur *Nosema ceranae* dans le milieu PDA avant et après le traitement au bout de 10 jours. Nous observons que :

- La figure (Figure 33, A) montre une croissance homogène et dense de *Nosema ceranae* sur toute la surface du milieu PDA avant d'application de l'acide acétique
- La figure (Figure 33, B) montre que même l'application de faibles concentrations de l'acide acétique peut inhiber la croissance de *Nosema ceranae*, avec une efficacité variable selon la dose appliquée.

**Chapitre V :**  
**Discussion générale**

Face à la problématique mondiale de la mortalité des abeilles ainsi que l'absence actuellement d'un traitement homologué contre cette maladie, nous avons entrepris cette recherche dans le but d'essayer de lutter contre ce ravageur en utilisant deux méthodes de lutte différentes :

- **Lutte biologique :** Par l'utilisation de *Metarhizium anisopliae*.
- **Lutte chimique :** Par l'utilisation de l'Acide acétique.

Des tests préalables ont été réalisés et qui porte sur :

#### **A. Identification du champignon *Metarhizium anisopliae*.**

L'observation au microscope photonique des cultures de *M. anisopliae* a révélé la présence de spores regroupés en chaînette, de couleur verte et de forme ovoïde avec un mycélium cloisonné. Nos observations sont similaires à ceux émis par (Zimmerman., 1993). D'après ce dernier *Metarhizium anisopliae* peut être identifié facilement par les conidies vertes et cylindriques qui sont produites en chaînes formant une couche dense et compacte de spores. La couleur verte de son mycélium et de ses spores lui a donné le nom de « **muscardine verte** ». Les spores spécialisées produites par ce champignon sont appelées conidies (Greathead et al. 1994).

#### **B. Identification des microsporidies de *Nosema ceranae*.**

L'observation au microscope optique du broyat des abeilles infestés par les microsporidies de *N. ceranae* a montré la présence des spores de forme ovoïde et une enveloppe épaisse (forme de résistance). Nos résultats sont similaires à ceux signalés par un bon nombre de chercheurs, notamment (Mauger, 2022) qui a également trouvé que *Nosema ceranae* se présente sous forme de spores ovoïdes et possède une enveloppe qui assure sa protection dans le milieu extérieur

#### **C. L'effet du parasite *Nosema ceranae* sur la population d'abeilles**

Des échantillons d'abeilles infestés par *N. ceranae* provenant de deux régions différentes Baba Ali et Boufarik ont été analysés. Les résultats obtenus ont révélé que: les abeilles de Baba Ali présentées des charges parasitaires en microsporidies de *N. ceranae* très élevée dans les colonies, par rapport à celle provenant de Boufarik. Du point de vue symptomatologique les abeilles de Baba Ali présentées des mouvements faibles, Les abeilles étaient incapables de voler, une mortalité élevée dans les ruches (63% de mortalité, la disparition de la ruche 3), une faible production de miel. Ces résultats sont confirmés par (Guezzoul et Bouchareb, 2021).

Cependant à Boufarik où la charge parasitaire était faible, nous avons observé que les abeilles étaient actives et capables de produire du miel, avec un taux de mortalité faible (15%).

Cette différence dans le degré d'infestations semble être due aux conditions favorables et défavorables telles que le climat, la température, l'humidité et également la nature de l'alimentation. Ces résultats concordes avec ceux qui obtenus par (Adjlane et al., 2011)

#### **D. Résultats des essais de lutte à base de *M. anisopliae* sur le parasite d'abeille *N. ceranae* in vivo et in vitro**

##### **➤ In vivo**

Nos études montrent que le champignon *Metarhizium anisopliae* a un effet notable sur la réduction progressive des spores de *Nosema ceranae* jour après jour sans entraîner la mort des abeilles. Les ruches traitées à faible dose (**Da1**) ont révélé une diminution significative des spores de *N. ceranae* et une colonisation de *M. anisopliae* dans l'intestin des abeilles. Le champignon a été observé dans les deux zones d'étude, à Baba Ali (ruche 01) et à Boufarik (ruche 23), que ce soit dans des conditions de «*Nosema ceranae* élevées ou réduites», démontrant ainsi son potentiel comme agent de contrôle biologique sûr et efficace. Suggérant ainsi que *M. anisopliae* peut être utilisé efficacement pour contrôler *N. ceranae* sans nuire aux abeilles.

En revanche, les doses moyennes (**Da2**) et les doses plus élevées (**Da3**) ont montré une diminution des spores de *N. ceranae* mais aussi une mortalité des abeilles, ce qui confirme que *M. anisopliae* peut coexister avec les abeilles et réduire les niveaux de *N. ceranae* à des doses appropriées. Il est important de noter que la mortalité des abeilles pourrait également être influencée par les conditions environnementales favorables ou défavorables, ce qui souligne l'importance de contrôler ces facteurs lors de l'application de *M. anisopliae*.

Les résultats sont en accord avec les travaux de (Meikle et al., 2012), qui ont démontré l'efficacité de *M. anisopliae* contre divers pathogènes des abeilles, aussi (Houssou et al., 2003) qui confirment que les entomopathogènes n'ont montré aucun effet négatif sur les abeilles domestiques, et de (Kanga et al., 2002), qui montrent que *M. anisopliae* peut s'établir sans effets néfastes à des concentrations appropriées. Cependant, contrairement à (Quintana et al., 2009), qui ont mis en garde contre les doses élevées, nos résultats soulignent l'importance du dosage pour éviter la mortalité des abeilles.

**➤ In vitro**

Après les résultats obtenus *in vivo*, nous avons testé *Metarhizium anisopliae* sur des cultures de *Nosema ceranae*. En conditions semi contrôlées, révèlent qu'après 7 et 10 jours. Les boîtes de Pétri présentées une dominance des cultures des *M.anisoplaie* contre *N.ceranae* ceci suggère qu'un effet antagoniste est observé entre les deux microorganismes entre les deux organismes.

L'observation montre que la croissance mycélienne de *Metarhizium anisopliae* été plus élevée par rapport à la croissance des microsporédies *Nosema ceranae*, qui cette dernière n'a pas réussi à se développer de manière significative dans le milieu PDA.

Bien que *Nosema ceranae* ait tenté de se développer, cependant elle n'a pas réussi à former une colonie visible, confirmant ainsi son incapacité à se développer efficacement en présence de *Metarhizium*.

Après 10 jours d'incubation, il a été confirmé que *Metarhizium anisopliae* a continué à se multiplier et à se développer, comme indiqué par la couleur verdâtre observée. Cela confirme les observations initiales de l'effet de *Metarhizium* sur la croissance dans l'essai *in vivo*.

Les résultats obtenus dans l'essai *in vitro* confirment la validité des observations initiales de l'effet antagoniste entre *Metarhizium* et *Nosema*. L'utilisation du milieu PDA comme substrat de culture fournit un environnement contrôlé qui permet de mieux étudier l'interaction entre les deux organismes dans des conditions de laboratoire.

Les résultats sont confirmés par **(Keswani et al., 2019)**, qui ont examiné les interactions antagonistes entre *Metarhizium* et les pathogènes du sol. Leur travail a montré que *Metarhizium* peut efficacement réduire la population de pathogènes en libérant des métabolites et en colonisant rapidement le substrat, des mécanismes qui semblent également être à l'œuvre dans notre étude. Aussi **(Correa-Cuadros et al., 2016)** ont indiqué que l'interaction antagoniste peut être due à la production de substances antifongiques qui inhibent la germination des conidies et l'allongement du tube germinale de certains champignons, ainsi qu'à une diminution du taux de reproduction des spores et à leurs germination. Ces facteurs influencent le comportement des micro-organismes qui les accompagnent, altérant leur croissance et leur reproduction.

Un exemple est l'étude dans laquelle la croissance d'un large éventail de champignons entomopathogènes a été inhibée par la production d'agents antimicrobiens pendant 21 jours chez l'hôte. Les résultats étaient similaires à ceux obtenus dans cette étude. Cette inhibition repose sur des mécanismes d'interaction antagonistes entre micro-organismes, tels que le parasitisme, la compétition directe et l'antibiose **(Correa-Cuadros et al., 2016)**.

En conclusion, nos résultats *in vitro* confirment les observations *in vivo* de l'effet antagoniste de *Metarhizium anisopliae* sur *Nosema ceranae*. Ces observations sont cohérentes avec les résultats d'autres études montrant l'efficacité de *Metarhizium* comme agent de lutte biologique contre divers pathogènes. Cette convergence de résultats renforce l'importance de *Metarhizium anisopliae* dans la gestion des maladies des abeilles et autres insectes nuisibles.

#### **E. Efficacité de Acide acétique sur *Nosema ceranae* *in vitro***

Les résultats obtenus au laboratoire au bout de 10 jours, ont montré une faible réduction du nombre de parasites. Ces résultats indiquent que même l'application de faibles concentrations de l'acide acétique peut inhiber la croissance de *Nosema ceranae*, avec une efficacité variable selon la dose appliquée.

Ces résultats sont semblables à ceux de (Maisons-Alfort. 2017), qui ont montré que plusieurs traitements alternatifs ont été testés, tels que l'itraconazole, les acides acétiques et benzoïques, le thymol, le resveratrol ou encore des extraits d'Artemisia, mais ces traitements n'ont montré qu'une faible réduction du nombre de parasites.

**Conclusion**

### Conclusion

Notre recherche s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité d'un biocide à base de *Metarhizium anisopliae* dans la lutte contre les microsporidies du genre *Nosema ceranae* chez les populations d'abeilles.

Les résultats de cette étude montrent que *M. anisopliae* a un effet prometteur pour la réduction des spores de *N. ceranae* dans les ruches d'abeilles sans tuer les abeilles dans certaines ruches. Cependant pour éviter la mortalité des abeilles, la dose doit être soigneusement contrôlée.

Nous pouvons confirmer que ces résultats sont cohérents avec les travaux existants sur l'utilisation des champignons entomopathogènes pour contrôler les infections et les parasites des abeilles, mais soulignant également la nécessité d'un dosage adéquat pour maximiser les bénéfices tout en minimisant les risques pour la santé des abeilles.

Il est aussi important de vérifier l'efficacité du traitement en tenant compte des conditions biotiques et abiotiques, pour améliorer notre expérimentation et obtenir de meilleurs résultats sur la sensibilité de *Nosema ceranae* au biopesticide *Metarhizium anisopliae*.

En perspective, il serait souhaitable d'approfondir les recherches sur ce parasite à savoir :

- Evaluation des paramètres biologiques favorables au développement et à la multiplication de *Nosema ceranae* in vitro dans des conditions contrôlées au laboratoire (Ph, humidité, température, effet photopériode)
- Calculer la concentration de *Nosema* dans différents milieux de culture
- Identification génétique de *Nosema ceranae*
- Évaluer l'effet de *Metarhizium anisopliae* sur une grande échelle de population d'abeilles

# Références Bibliographiques

## Références bibliographique

---

1. **Adjlane N., Doumandji S., Haddad N. (2012).** Situation de l'apiculture en Algérie: facteurs menaçant la survie des colonies d'abeilles locales *Apis mellifera intermissa*. Université M'Hamed Bougara, Département de Biologie, Avenue de l'Indépendance, Boumerdès, juillet-août 2012, pp. 235-236.
2. **Adjlane N., Doumandji S., & Haddad, N. (2011).** La prévalence de la nosérose dans les colonies d'abeilles *Apis mellifera intermissa* dans la région médio-septentrionale de l'Algérie. N°639. pp 68
3. **ADOUM M. (2022).** Activité Antifongique des huiles essentielles *d'Ammoides verticillata* sur le champignon pathogène des abeilles domestiques *Aspergillus Niger* dans la région de Tissemsilt. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme De Master académique en sciences Biologiques. Université de Tissemsilt. 29p
4. **Anonyme. (2015).** La santé de l'abeille, fiche technique FNOSAD, association France AgriMer, pp.4.
5. **ANSES. (2020).** Recherche de la nosérose : mise en évidence et quantification de *Nosema spp.* par examen microscopique.–14, rue Pierre et Marie Curie- MOA.09-Version 07. 5 -16
6. **Aquaportail.com. (2023).**  
<https://www.Aquaportail.com/dictionnaire/definition/3098/abeille>
7. **Bidochka M. J., Leger R.J.S.T. (1997).** Mecanisms of Deuteromycetes fungal infections in grasshoppersand locusts N°171.pp 215-222
8. **Bidochka M.J et Small C. (2005).** Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: F.E. Vega & M. Blackwell (Eds.) *Insect Fungal Associations*. 28-49. Oxford University Press Inc., New York
9. **Biri M. (2002).** Le grand livre des abeilles. Cour d'apiculture moderne. Ed vecchi S, 10, 184-196.
10. **Biri M. (2011).** Tout savoir sur les abeilles et l'apiculture. Edition de Vecchi, Paris, 13-105
11. **Bischoff J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A., (2009).** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*.101, 512-530
12. **Boudjelida H., SOLTANI N. (2010).** Lutte biologique avec un champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* Metch. à l'égard de *Cydia pomonella L.* Actes de la CIFE VI, Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie. Rabat. n° 47, 113-116

## Références bibliographique

---

13. **Celeste M., Ferrari F., Favaro R., Mair S., Zanutelli L., Malagnini L., Fontana P., & Angeli S. (2020).** Application of *Metarhizium anisopliae* as a potential biological control of *Varroa destructor* in Italy, Journal of Apicultural Research, Volume 59
14. **Chabasse D., Bouchara, J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B. & Penn P. (2002).** Cahier de formation n°25 : Les moisissures d'insert médical. 230. bd Raspail 75014. Paris. N 47. pp 11-15.
15. **Charlotte N. (2019).** Bulletin zoosanitaire- La nosérose de l'abeille domestique: Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ) et Dre Julie Ferland, MAPAQ. p3
16. **Christiane F., Bonassi J.M. (1982),** Options essentielles de pathologie apicole vademecum de l'apiculteur. Brizard et J. Albisetti, France. Pp 82-90
17. **Claudia D.A. (2012).** Effets de *Nosema ceranae* (Microsporidia) sur la santé de l'abeille domestique *Apis mellifera* .Thèse pour obtenir le diplôme d'État de Docteur vétérinaire. Université d'avignon , France. pp30
18. **Cornet JM., Daoudi A., Moshine EH. & Fresnaye J. (1998).** Étude biométrique de populations d'abeilles marocaines. Apidol. N°19. pp 355-66.
19. **Correa-Cuadros J. P., Sáenz-Aponte A., & Rodríguez-Bocanegra M.X. (2016).** In vitro interaction of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* with Heterorhabditis bacteriophora for the control of *Plutella xylostella*. Springer Plus. n 5. pp2
20. **Équipe éditoriale. (2023).** La vie des abeilles, projetecolo. <https://www.projetecolo.com/la-vie-des-abeilles-1082.html>
21. **Fekhar S. (2021).** Étude bibliographique de la fausse teigne de la ruche ennemie de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.). Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention de diplôme de master en science biologique. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 12p.
22. **Ferron P., Fragues J. & Riba G., (1991).** Les champignons agents de lutte contre les ravageurs. (Handbook of applied mycology). N°5. pp 55-76
23. **Fresnaye J. (2022).** Étude biométrique de quelques caractères morphologiques de l'abeille noire française (*Apis mellifica*). Les Annales de l'Abeille. 8 (4), pp.271-283.
24. **Greathead D., Kooyman C., Launois L. & Popov G., (1994).** Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Ed Cirad / Priaf, collectin acridologie operationnelle N°8, 147 p
25. **Guezoul I., Bouchareb Kh. (2021).** Les nosémoses des abeilles. Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire. Université Saad Dahleb-Blida. Pp 18

## Références bibliographique

---

26. **Hajek A.E., Leger R.J. (1994).** Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual review of entomology
27. **Hemmerlé J. (2019)** Maladies des abeilles , Des agents infectieux singuliers, n°1067. pp 32-38
28. **Houssou L., Kanga B., Jones W., James RR. (2003).** Essais sur le terrain utilisant le pathogène fongique *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) pour contrôler l'acarien ectoparasite *Varroa destructor* (Acari: Vroidae) dans les colonies d'abeilles domestiques *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). J.Écon. Entomol. N° 96. pp 1091-1099.
29. **Jacob-Remacle A. (1990).** Abeilles sauvages et pollinisation. Faculté Des Sciences Agronomiques de Gembloux. 39p
30. **Jean Noël T. (1996).** Impact des pesticides sur les abeilles et autres pollinisateurs. Laboratoire de Zoologie, Courrier de l'environnement de l'INRA, n°29, pp. 18
31. **Kanga L.H.B., James R.R., & Boucias D.G. (2002).** "Heterorhabditis bacteriophora (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)." Biological Control, 24(2), pp64-71.
32. **Keswani C., Mishra S., Sarma B.K., Singh S. P., & Singh H.B. (2019).** Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma spp.* and their effective role as biofungicidal agents. Microbiological Research. n 219. pp 74-82.
33. **Kimberly M.S.H., Seow M. (2017).** Mode d'infection du champignon *Metarhizium spp.* Et leur potentiel en tant qu'agents de lutte biologique.
34. **KOUASSI M., (2001)** Les possibilités de lutte biologique: emphase sur le champignon entomopathogène *b. bassiana*. sci. Environ., vol. 2, n°2, pp : 1 – 8
35. **Le conte Y. (2006).** Mieux connaître l'abeille. La vie sociale de la colonie. In traité rustica de l'apiculture. Editions rustica, Paris.pp.ou :12-83
36. **Le Conte Y., Navajas M. (2008).** Climate change: impact on honey bee populations and diseases, 27 : 485-510
37. **Leger, R. J. (1994).** Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual review of entomology
38. **Maisons-Alfort. (2017).** Note d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation de l'efficacité des produits biocides destinés à être utilisés pour la désinfection lors de dangers sanitaires. Anses.n°2015-SA-0178. pp15-16

## Références bibliographique

---

39. **Mauger M. (2023)**. Les ruches connectées : description des outils connectés commercialisés en France et présentation de leurs intérêts. Thèse pour obtenir le diplôme d'État de Docteur vétérinaire, présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC). pp44
40. **Meikle W.G., Holst N., Mercadier G., & Derouane F. (2012)**. "Evaluation of Fungal Pathogens as Control Agents of Honeybee Parasites." *Journal of Economic Entomology*, 105(4), 1143-1149.
41. **Naturapi.com. (2021)**. Nosébose: Symptômes, Causes et Traitements - maladies- santé de l'abeille .2021. <https://www.naturapi.com/naturapicafe/sante-de-la-ruche-tout-savoir-sur-la-nosemose/>
42. **Nestor F., Yves C. ( 2007)**. Maladies, parasites et autres ennemies de l'abeille mellifère. Ed. Atlantica.498p.
43. **Noé B., Quentin H., Corentin D., & Engel S., (2018)**. *Metarhizium anisopliae* applications en lutte microbiologique." Université de Lausanne, Département de Biologie, page 7.
44. **Noémie L. (2010)**. Lutte biologique aux ravageurs : applicabilité au québec. Thèse pour obtenir le diplôme d'État de Docteur vétérinaire. Centre universitaire de formation en environnement université de sherbrooke (Canada). Pp 9
45. **Pooja S., Purabi M., Amitava R., Vijay S.M. & Anand K.S. (2022)**. Advances in Bio-inoculant Science Biopesticides, Pp 37-71
46. **Quintana C.R., Viela, C.M., & Santiago-Alvarez C. (2009)**. "The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin against *Nosema ceranae* (Microsporidia)." *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(3). pp200-204.
47. **Ravazzi G. (2003)**. Abeilles et apiculture. Ed.Vechi, Paris. 159p
48. **Souna B. (2022)**. les principales parasitoses des abeilles. Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire. Université Saad Dahleb-Blida. 12p
49. **Stephen J.M. (2002)**. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach, 249: 897-1154
50. **Talat P, Sumira J. (2019)**. Ecophysiology of Pesticides. Interface between Pesticide Chemistry and Plant Physiology. p 265-304
51. **Taleb A., Sahraoui L., (2015)**. Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de *Culiseta longirualta* en conditions contrôlées. Mémoire de fin d'étude de master en entomologie médicale.Université Saad Dahleb-Blida.

## Références bibliographique

---

52. **Walker A., Jones., & Carlos Gracia. (2007).** Efficacy of strips coated with *Metarhizium anisopliae* for control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee colonies in Texas and Flor, Published: 04 January 2007 Volume 40, pages 249–258
53. **Winston M. L., (1993).** La biologie de l'abeille. Traduit de l'anglais par G. Lambermont. Edition Frison Roche, Paris
54. **Zimmerman G. (1993).** The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Pest. Sci., n°37, pp: 375 – 379
55. **Zimmerman G. (2007).** Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontr.Sci.Technol .17. pp :879-920.

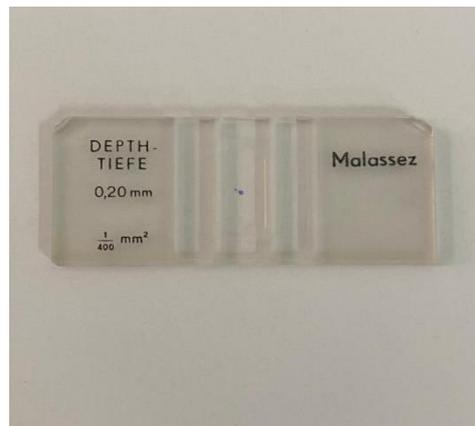
# Annexes

**Tableau I : Les caractéristiques de différentes castes (Le Conte, 2004; Biri, 2010; Winston, 1993) On trouve**

Caractéristiques de différentes castes	Reine	Faux -bourdon	Ouvrière
<b>Durée de vie</b>	Au moyen 4 ans	Quelque mois (de mars jusqu'au fin aout)	15 à 70 jrs pour les abeilles d'été, 170 jrs à 243 jrs pour lesabeilles d'hiver
<b>Fécondité</b>	Jusqu'à 2000 œufs parjour	Fécondation de reine vierge	diploïdes qui résultent d'œufs fertilisés
<b>Nombre dans la colonie</b>	Une reine fécondée	Plusieurs centaines	Plusieurs centaines
<b>Développement</b>	En 16jours, elle est nourrie à la gelée royale durant 6jours	24 jours à partir d'un œuf non fécondé	Environ 21 jours a partir d'un œuf fécondé
<b>Lien de parenté</b>	Mère de tous les individus de la colonie	Il ne possède du matériel génétique que de la reine (pas depère)	Une seule mère (reine) pèreinconnu
<b>Localisation</b>	Dans le nid à couvain elle sort de la colonie pour son vol de fécondation et l'essaimage	Dans les réserves (miel et pollen). on en aperçoit rarementloin des ruches	Dans le nid à couvain
<b>Physionomie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Plus grande que lesouvrières.</li> <li>✓ Long abdomen,</li> <li>✓ Pas de corbeille à pollen sur les pattes postérieures,</li> <li>✓ Pas de glande cirière</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Gros</li> <li>✓ Les yeux sont plus grandsforte pilosité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Petite de taille</li> <li>✓ Adaptation anatomique en relation avec leur activité</li> <li>✓ Possède un appareil cirière et corbeille à pollen sur les pattes postérieures</li> </ul>
<b>Fonction</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ La seule à pondre desœufs</li> <li>✓ Reconnaît le nombre detype de cellule mâle ou femelle à l'aide de ces pattes antérieures et pond en conséquence</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Féconder la reine</li> <li>✓ Participe à la thermorégulation de la ruche il participe à la fabrication du miel en échantent le nectar avec lesouvrières</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Nettoyage des cellules et operculation, soins à la reine et au couvain, construction des rayons, nettoyage, manipulation denourriture (magasinières), garde et butinage</li> </ul>

**A:****B:****C:****D:****E:****Figure n°34:** Matériel de récolte utilisé sur terrain

**A:** Rucher    **B:** Combinaison    **C:** Enfumoir    **D:** Lève cadre    **E:** Boîtes des échantillons

**A:****B:****C:****D:****E:****F:**

**Figure n°35:** Le matériel utilisé pour l'extraction et l'identification du parasite *Nosema ceranae* sur l'abeille *Apis mellifera* au laboratoire

**A:** Boite de dissection**B:** Mortier**C:** Papier filtre**D:** Les tubes**E:** Centrifugeuse**F:** La cellule de malessez

**A:****B:****C:****D:****E:****F:**

**Figure n°36:** Le matériel utilisé pour la mise en culture et la préparation des doses de *Metarhizium anisopliae*

**A:** Boîtes de pétri   **B:** Bec   **D:** Vortex   **E:** Matériels a stérilisé   **F:** Autoclave

**A:****B:****C:****D:****E:****Figure n°37:** Le matériel utilisé au laboratoire

**A:** Lamelle **B:** Micro-pipette **C:** Microscope photonique **D:** Hotte **E:** Étuve