



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2023

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie microbienne.

Présenté par :
ABDOUCHE Rafik & ADDAD Ryma

Thème

**Effet du Acétamipride sur certaines bactéries de
microbiote de l'abeille domestique *Apis mellifera*
*intermissa***

Soutenu le: 04 /07 /2023

Devant le jury composé de :

| <i>Nom et Prénom</i> | <i>Grade</i> | | |
|-----------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| <i>Mme CHERIFI</i> | <i>Professeur</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Présidente</i> |
| <i>Mme CHERIFI .A</i> | <i>MCB</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Promotrice</i> |
| <i>Mme DJENADI .K</i> | <i>MCB</i> | <i>Univ. De Bouira</i> | <i>Co-promotrice</i> |
| <i>Mr BOURNINE .I</i> | <i>MCA</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Examineur</i> |

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements :

Nous remercions le bon Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.

Nous tenons à remercier nos promotrices Mme Djenadi Katia et Mme Chérifi Assia, pour avoir accepté de nous encadrer, d'avoir proposé ce sujet, pour leur soutien, leur dévouement, et surtout pour leur patience.

Nous exprimons aussi nos meilleurs sentiments de gratitude aux honorables membres de Jury qui ont accepté d'évaluer notre modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce Travail.

Enfin nos remerciements sont adressés plus particulièrement à nos familles et nos amis(es) qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.

Dédicace :

Je tiens sincèrement à dédier ce modeste travail :

A mon père, qui m'a toujours encouragé et m'a souhaité la réussite

A ma très chère maman : Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je te porte. Tu es mon exemple de la réussite pour ton soutien, tes sacrifices, tes encouragements, surtout ton amour ; Que Dieu te protège et t'accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

A mes très chères quatre frères : Nabil, Yacine, Akram et Youcef.

A toute ma famille sans oublier grands et petits.

A ma chère copine ma sœur d'une autre mère, Yasmina et toute sa famille.

Et à mes chères amies (sœurs) Chahinez, Nassima, Fahima, Ikram, Aicha, Yasmine, Théllili, Khadija, Khaoula ...

Aux autres amis qui m'ont soutenu de près ou de loin.

A la toute la promotion de Biotechnologie microbienne 2022 /2023.

Ryma

Dédicace :

Je tiens sincèrement à dédier ce modeste travail :

A mon père, qui m'a toujours encouragé et m'a souhaité la réussite

A ma très chère maman : Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je te porte. Tu es mon exemple de la réussite pour ton soutien, tes sacrifices, tes encouragements, surtout ton amour ; Que Dieu te protège et t'accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

A mon très cher frère : Anis.

A toute ma famille sans oublier grands et petits.

Aux autres amis qui m'ont soutenu de près ou de loin.

A la toute la promotion de Biotechnologie microbienne 2022 /2023.

Table de matière

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations
Introduction générale..... 1

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : Généralités sur l'abeille domestique *Apis mellifera*

I. Importance de la pollinisation..... 4
II. Description de l'abeille à miel *Apis mellifera*..... 4
 II.1 Taxonomie 4
 II.2 Morphologie de l'abeille domestique 5
 II.2.1 La tête 6
 II.2.2 Le thorax 6
 II.2.3 L'abdomen 6
 II.3 Microbiote de l'abeille..... 6
 II.3.1 Microbiote et bactérie commensale..... 6
 II.4 Organisation du microbiote intestinal..... 7
 II.5 Evolution du Microbiote au cours de la vie de l'ouvrière 8
 II.6 Fonctions du microbiote 9
 II.6.1 Le microbiote intestinal participe au système digestif 9
 II.6.2 Le microbiote participe à la défense de l'hôte 9

CHAPITRE II : Les facteurs de stress de l'abeille

III. Les conditions environnementales 12
IV. Les paramètres climatiques 12
V. Les agents biologiques 13
 V.1 Les prédateurs..... 14
 V.2 Les bactéries pathogènes (les loques)..... 14
 V.3 Les mycoses..... 14

| | | |
|------|----------------------------|----|
| V.4 | Les virus | 14 |
| V.5 | Les parasites | 14 |
| VI. | Les agents chimiques | 15 |
| VI.1 | Les Pesticides | 15 |
| VI.2 | Les Métaux lourds | 15 |

Etude expérimentale

Chapitre III : matériel et méthodes

| | | |
|-------|--|----|
| VII. | Méthodes | 22 |
| VII.1 | Standardisation des inocula bactériens : | 22 |
| VII.2 | Le pesticide (la molécule chimique) : | 22 |
| VII.3 | Méthode des puits | 23 |
| VII.4 | Méthode des spots (CMI sur milieu solide)..... | 24 |

Chapitre VI : résultats et discussion

| | | |
|-------------------------------|--|----|
| VIII. | Méthode des puits | 27 |
| VIII.1 | Les résultats de l'activité antimicrobienne..... | 27 |
| VIII.1.1 | Analyse des résultats | 28 |
| IX. | Méthode des spots | 30 |
| IX.1 | Analyse des résultats : | 30 |
| Conclusion : | | 34 |
| Références bibliographiques : | | 36 |
| Résumé..... | | 41 |
| ملخص..... | | 42 |
| Abstract | | 43 |

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques générales des molécules désignées sous le terme néonicotinoïdes..... 17

Tableau 2 : Valeurs des doses des dilutions obtenues..... 23

Tableau 3 : Les résultats de l'activité antimicrobienne pour la méthode des puits :..... 27

Tableau 4 : Les résultats de l'activité antimicrobienne pour la méthode des spots : 30

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : <i>Apis mellifera</i> dans la classification systématique (Le Conte.,2018)..... | 5 |
| Figure 2 : Vue d'ensemble interne d'une abeille ouvrière (Douglas, 2012). | 6 |
| Figure 3 : Répartition des différentes espèces bactériennes au niveau de tube digestif de l'abeille..... | 8 |
| Figure 4 : Evolution du Microbiote au cours de la vie de l'ouvrière | 9 |
| Figure 5 : Les pathogènes et ravageurs de l'abeille. | 13 |
| Figure 6: photographie de la solution mère durant l'homogénéisation..... | 22 |
| Figure 7 : Suspensions bactérienne après l'ajustement. | 24 |
| Figure 8 : Boites pétrie à la fin de la réalisation de la technique | 24 |
| Figure 9 : photographie du résultat de Bacillus de la méthode des puits. | 28 |
| Figure 10 : Quelques photographies du résultat de SARM de la méthode des puits. | 29 |
| Figure 11 : photographie du résultat de SARM de la méthode des spots. | 31 |
| Figure 12 : Résultat de <i>Enterococcus</i> de la méthode des spots..... | 31 |
| Figure 13 : Résultat de <i>Escherichia coli</i> de la méthode des spots. | 31 |

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DO : Densité optique.

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques.

LB : luria-bertani.

mm : millimètre.

ND : No déterminé.

nm :nanomètre.

SARM : Staphylococcus aureus Résistante au Methicilline.

Introduction

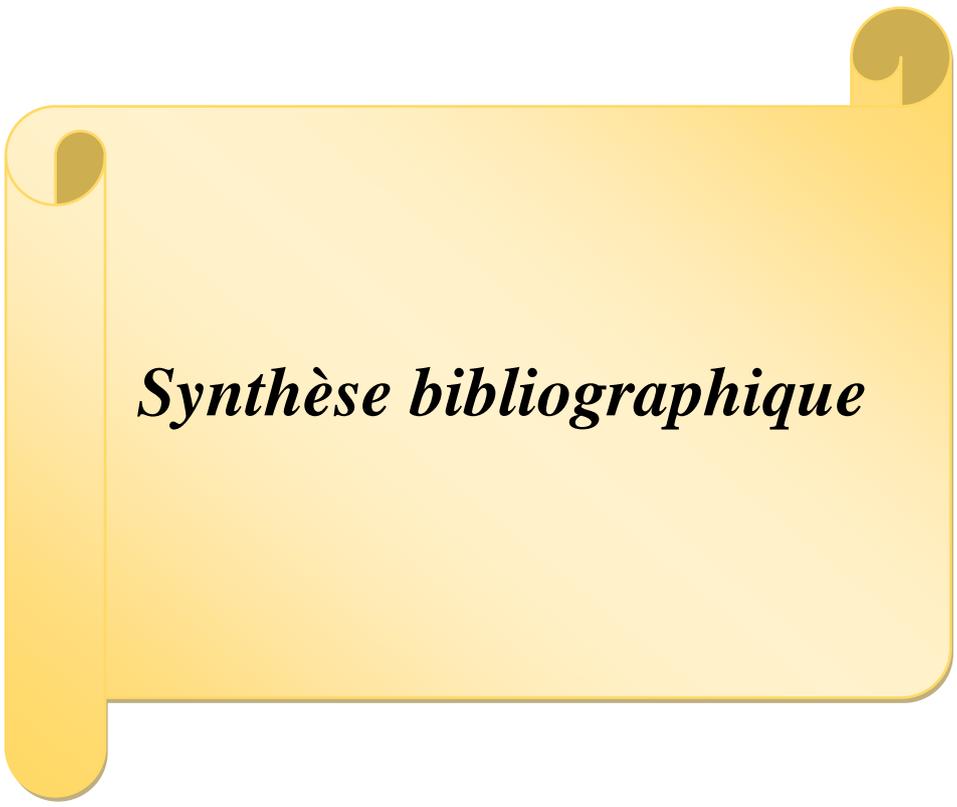
Introduction générale

La pollinisation est essentielle à la reproduction de la plupart des plantes sauvages et cultivées, parmi les insectes pollinisateurs, l'abeille domestique *Apis mellifera* est considérée comme le pollinisateur le plus efficace et le plus dominant. De ce fait, elle joue un rôle économique et écologique majeur. Elle est l'espèce la plus utilisée en apiculture pour en tirer profit de ces différents produits tels que : la cire, le pollen, la gelée royale, la propolis. Ces produits sont alors commercialisés ou utilisés en apithérapie surtout pour leurs vertus antibactériennes (Phillips et *al.*, 2015).

Les abeilles mellifères sont souvent exposées aux pesticides en tant qu'importants pollinisateurs des cultures. Plusieurs travaux ont rapporté l'incidence létale et sub-létale de ces agents toxiques sur les abeilles en provoquant des perturbations comportementales et physiologiques. Par conséquent, des données sur la toxicité des abeilles sont requises pour évaluer les risques liés à l'exposition à ces molécules chimiques sur leur comportement et leur métabolisme entre autres le microbiote intestinal. Ce dernier est simple et spécialisé abritant une diversité bactérienne qui joue un rôle majeur dans le métabolisme et la défense contre les pathogènes (Rouzé 2020).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail dont l'objectif est d'étudier l'effet de pesticide « Acétamipride » sur certaines bactéries de microbiote intestinal de l'abeille. Dans les deux premiers chapitres, nous avons présenté les caractéristiques de l'abeille, son système trophique et leur grande importance dans la pollinisation, ainsi que le rôle crucial du microbiote intestinal dans le métabolisme de l'abeille (Perry et *al.*, 2016).

Afin de mieux comprendre l'interaction entre les pesticides agricoles et quelques bactéries de microbiote de *Apis mellifera*, nous avons rapporté, dans les deux derniers chapitres, les différentes techniques de laboratoire appliquées pour étudier l'activité antimicrobienne de six bactéries commensales du microbiome ainsi que les résultats obtenus dans cette étude. Le travail est clôturé par une conclusion.



Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Généralités sur l'abeille domestique *Apis mellifera*

I. Importance de la pollinisation

La pollinisation est le transport du pollen jusqu'aux organes femelles des fleurs. C'est une pratique naturelle essentielle pour le rendement des cultures agricoles et la diversité des écosystèmes naturels. Les plantes peuvent être soit polytropes, visitées par de nombreuses espèces d'insectes, soit monotropes, dépendantes d'un type spécifique d'insecte pour la pollinisation. Les plantes monotropes sont plus vulnérables aux fluctuations ou déclin de la population de leur pollinisateur spécifique (Phillips et *al.*, 2015). Cette spécialisation parmi les pollinisateurs, qui sont essentiels pour la reproduction des plantes à fleurs et leur biodiversité, est étroitement liée à celle des plantes. Cette relation mutualiste joue un rôle clé dans l'économie et l'équilibre des écosystèmes naturels. Les pollinisateurs utilisent le nectar et le pollen des plantes pour leurs nourritures, tandis que les plantes ont besoin des pollinisateurs pour leur reproduction et fructification.

La perte de pollinisateurs et leur diminution ont des impacts négatifs sur les cultures agricoles et les écosystèmes naturels. Il est donc crucial de protéger et conserver les habitats des pollinisateurs pour assurer la durabilité de nos systèmes alimentaires et des écosystèmes naturels (Rouzé 2020).

II. Description de l'abeille à miel *Apis mellifera*

Parmi les insectes pollinisateurs, l'abeille domestique *Apis mellifera* est considérée comme le pollinisateur le plus efficace et le plus important (Rouzé 2020). De ce fait, elle joue un rôle économique et écologique majeur. Elle est l'espèce la plus utilisée en apiculture (Hung et *al.*, 2018) pour en tirer profit de ces différents produits tels que : la cire, le pollen, la gelée royale, la propolis. Ces produits sont alors commercialisés ou utilisés en apithérapie surtout pour leurs vertus antibactériennes (Perrot et *al.*, 2019).

II.1 Taxonomie

L'abeille domestique *Apis.mellifera* fait partie du règne animal, de l'embranchement des Arthropodes, du grec « arthron » l'articulation, et « podos » le pied. Cet animal invertébré présente un corps segmenté avec des appendices articulés, recouvert d'un exosquelette chitineux. L'abeille est munie de trois paires de pattes et fait ainsi partie du sous-embranchement des hexapodes. Douée d'une respiration trachéenne et composée d'un corps divisé en trois tagmes : la tête, le thorax qui porte les pattes articulées et l'abdomen. L'abeille appartient à la classe des insectes et à l'ordre des hyménoptères du grec « hymen » la membrane et « ptéron » l'aile. Ses deux paires d'ailes membraneuses sont couplées par des crochets. Les pièces buccales de type broyeur-lécheur sont caractéristiques de cet ordre. Elle

est classée dans le sous-ordre des apocrites, car un étranglement au niveau de l'abdomen est visible en conséquence de la fusion du premier segment de l'abdomen au thorax. Membre de l'infraordre des aculéates, l'abeille en évoluant a perdu la fonction de ponte, la partie terminale de son abdomen est ainsi devenue un dard. L'abeille appartient à la superfamille des apoïdes caractérisée par une longue langue favorable à une alimentation à base de nectar, miellat et pollens. Elle fait partie de la famille des apidés supérieurs, qui se caractérise par un fort degré de socialité, et à la tribu des Apini dont le seul genre encore vivant est *Apis*. Ce sont les abeilles dites mellifères, qui produisent du miel en grande quantité (Fig.01).

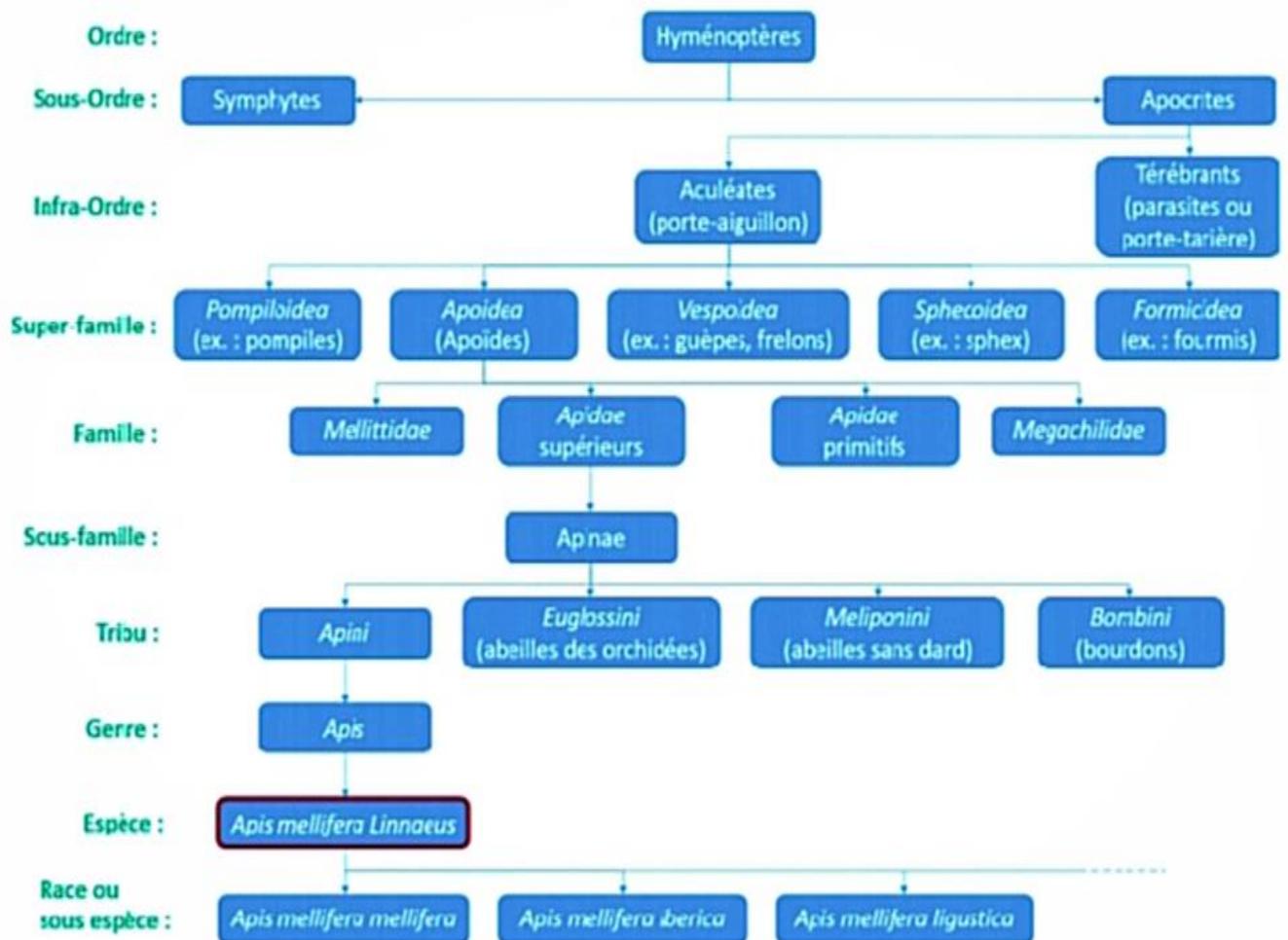


Figure 1 : *Apis mellifera* dans la classification systématique (Le Conte.,2018).

II.2 Morphologie de l'abeille domestique

Le corps de l'abeille se divise en trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen (Fig.02).

II.2.1 La tête

Elle porte une paire d'antennes, trois ocelles ou yeux simples, une paire d'yeux composés (pour une vision plus performante), des pièces buccales (mandibules, palpes labiaux et langue), un cerveau et de multiples glandes.

II.2.2 Le thorax

Il est divisé en trois segments, portant chacun une paire de pattes. Sur le deuxième et le troisième segment, on distingue une paire d'ailes (Ravazzi, 2007). Il est perforé de trois paires d'orifices respiratoires appelés stigmates.

II.2.3 L'abdomen

Il est divisé en sept segments. L'abdomen renferme, le système digestif avec le jabot (poche extensible pour le stockage des liquides et de la nourriture, d'une capacité de 40 μ L), le système reproducteur, la majorité du système respiratoire et circulatoire, plusieurs glandes impliquées dans les sécrétions de phéromones, ainsi que l'appareil vulnérant.

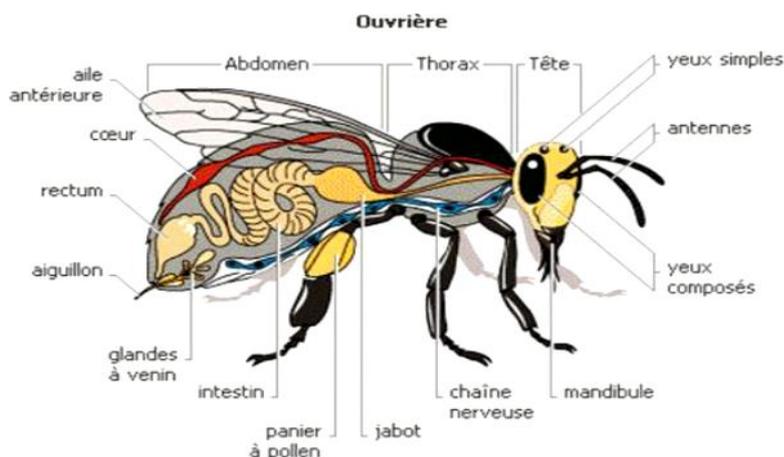


Figure 2 : Vue d'ensemble interne d'une abeille ouvrière (Douglas, 2012).

II.3 Microbiote de l'abeille

II.3.1 Microbiote et bactérie commensale

Le microbiote est l'ensemble de l'abeille (écosystème) et ses communautés microbiennes symbiotiques qui constituent un holobionte (c'est à-dire un supra-organisme comprenant l'animal et les microorganismes qu'il héberge (Gordon et al., 2013). Le microbiote intestinal des abeilles est un système complexe et essentiel qui joue un rôle crucial dans divers aspects de la santé et du développement des abeilles. Il est responsable de la digestion des nutriments, de la protection contre les pathogènes, de la régulation de la croissance et de développement des abeilles.

Le microbiote intestinal des abeilles est encore un domaine de recherche récent et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement son fonctionnement et son impact sur les populations d'abeilles (Guo et *al.*, 2015 ; Kwong & Moran, 2016 ; Kakumanu et *al.*, 2016). Cependant, des études récentes ont montré la présence d'une communauté microbienne riche dans le microbiote de l'abeille (McMenamin et Flenniken, 2018). Sa composante cellulaire est fondée sur une quantification des copies d'ADNr 16S, est estimée entre 10⁸ et 10⁹ bactéries (Martinson et, 2012).

II.4 Organisation du microbiote intestinal

Le tube digestif de l'abeille est constitué de :

- **Intestin antérieur** : De l'œsophage au proventricule.
- **Intestin moyen** : est représenté par le ventricule, sans cæcum gastrique y débouchant comme chez certains autres insectes. Il y a donc synonymie entre ventricule et intestin moyen chez l'abeille.
- **Intestin postérieur** : Entre le ventricule et l'iléon débouchent les tubes de Malpighi (appareil excréteur) de l'iléon à l'anus.

Le microbiote de l'abeille *A. mellifera* est principalement composé de bactéries qui sont particulièrement très abondant dans l'intestin postérieur (Fig.04).

Tous les individus de la colonie comprennent cinq groupes d'espèces parfois mal définis (Moran et *al.*, 2012 ; Crotti et *al.*, 2013 ; Kwong & Moran 2016). Et chez l'ouvrière, on trouve :

- **Dans l'iléon** : Bactéries lactiques Firm4 et Firm5 appartenant au genre Firmicutes ; *Snodgrassella alvi*, une protéobactérie bêta également endémique aux abeilles. D'autres types sont également présents y compris la gamma protéobactérie spécifique de l'abeille, *Gilliamella apicola*,
- **Dans le rectum on trouve** : Le genre *Bifidobacterium* appartient aux Actinomycètes et il est phylogénétiquement apparenté à l'espèce astéroïde *Bifidobacterium*.
- **Dans le pylore on trouve** : Trois groupes d'*Alpha Proteobacteria* et de gamma *Proteobacteria* : *Bartonella*, *Commensalibacter* et *Bombera* (Bonilla-Rosso et *al.*, 2019). A une échelle plus fine, ce microbiome cacherait une diversité encore plus grande. Par exemple, une grande diversité intraspécifique de *Gilliamella apicola* et *Frischella perrara* (Kwong et *al.*, 2014).

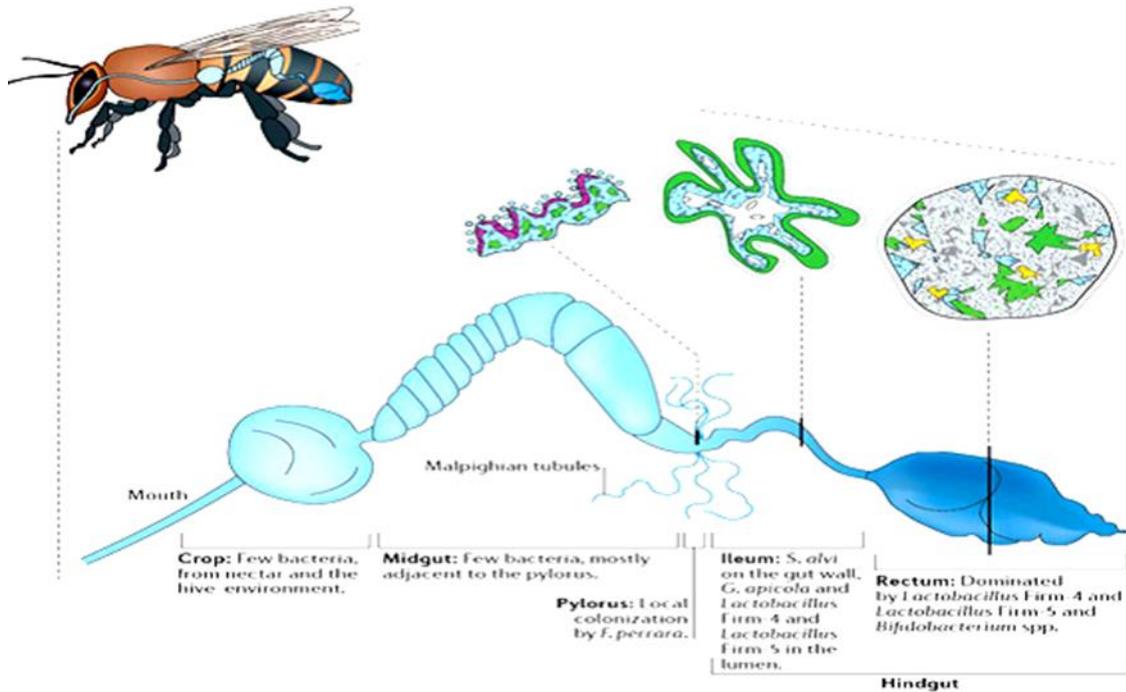


Figure 3 : Répartition des différentes espèces bactériennes au niveau de tube digestif de l'abeille (Kwong & Moran ,2016).

Le microbiote fondamental ou microbiote "core" de l'abeille, est présent chez tous les individus de la colonie. Cependant, le microbiote des mâles et des reines d'abeilles se distingue de celui des ouvrières par des différences en termes d'abondance et de composition, et certains groupes majeurs de micro-organismes peuvent être absents (Kapheimet *al*, 2015 ; Taryp et *al*, 2015). Ces différences seraient liées à leur physiologie, leur activité et leur régime alimentaire.

II.5 Evolution du Microbiote au cours de la vie de l'ouvrière

Les abeilles adultes émergentes portent peu ou pas de bactéries et acquerraient principalement leur microbiote par contact avec leur matières fécales. Le Microbiote de l'adulte serait installé au bout de 4 à 6 jours (Kwong et Moran ,2016). Le premier développement du microbiote est observé dès le stade larvaire. Il se transmet principalement par le transfert de nourriture par les nourrices. Aux stades post-alvéolaire et nymphal, le microbiote décline et son abondance est fortement réduite (Powell et *al.*, 2014). Après l'émergence des adultes, l'abeille acquiert sa microflore centrale. On pense que les principales voies de transmission sont la trohalaxie, le contact avec la matrice de la colonie et le contact avec les fèces (infection fécale-orale). Par conséquent, un microbiote stable serait établi après environ 6 jours (Fig.05).

Le développement du microbiote dépend fortement de l'environnement auquel l'insecte est exposé. Cependant, cet environnement se développe et s'étend à mesure que les abeilles vieillissent. Par conséquent, des déviations peuvent se produire en fonction du stade de développement de l'insecte, mais aussi du paysage (ressources) et des conditions climatiques (Jones et *al.*, 2018 ; Ellegaard et Engel, 2019). Par conséquent, chaque abeille a sa propre phylogénie (Moran et *al.*, 2012 ; Ellegaard et Engel, 2019).

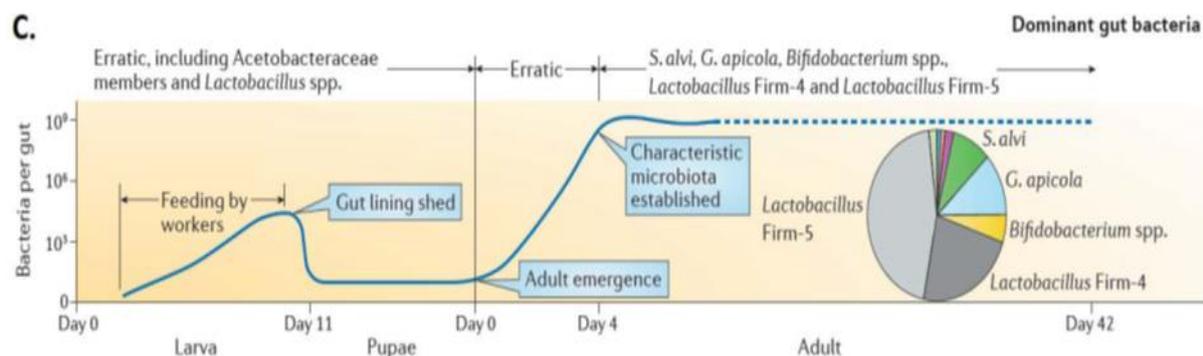


Figure 4 : Evolution du Microbiote au cours de la vie de l'ouvrière (Kwong et Moran, 2016).

II.6 Fonctions du microbiote

L'intestin des abeilles est un écosystème où les micro-organismes ont des relations étroites et mutualistes entre eux et avec l'hôte. Le microbiote intestinal joue un rôle important dans le fonctionnement de l'intestin et peut avoir une influence sur la performance des colonies et l'activité des abeilles (Khan et *al.*, 2020).

II.6.1 Le microbiote intestinal participe au système digestif

Les bactéries présentes dans l'intestin des abeilles jouent un rôle crucial dans la digestion en produisant des enzymes nécessaires à la dégradation de polymères complexes, tels que les polysaccharides du pollen, qui ne peuvent pas être assimilés directement par l'insecte. Les bactéries produisent également des composés assimilables par l'abeille, en particulier des produits de fermentation (Engel et *al.*, 2012). Certaines vitamines sont également synthétisées par le microbiote, apportant des nutriments essentiels à l'abeille.

II.6.2 Le microbiote participe à la défense de l'hôte

Le microbiote intestinal des abeilles agit comme une barrière biologique contre les agents pathogènes en excluant ces derniers par une colonisation efficace de l'épithélium, notamment par la formation de biofilms protecteurs. Il joue également un rôle de modulateur immunologique en stimulant la réponse immunitaire de l'hôte (Crotti et *al.*, 2013). Un

microbiote intestinal stable et sain est important pour la bonne santé des abeilles et de leurs colonies. Les changements dans la composition et la diversité du microbiote peuvent indiquer du stress. La dysbiose, un déséquilibre de l'écosystème bactérien, peut perturber la digestion et la fonction immunitaire, conduisant au développement d'organismes opportunistes. (Vásquez et *al.*, 2012 ; Yoshiyama et *al.*, 2013).

Enfin, le microbiote participe à la modulation du pH intestinal et peut promouvoir la croissance de bactéries protectrices.

Chapitre II :
**Facteurs de stress chez l'abeille
domestique**

Les abeilles sont exposées à une variété de facteurs de stress et les scientifiques tentent depuis longtemps d'identifier les facteurs associés à la disparition des colonies d'abeilles. Certains agents pathogènes et parasites, comme *Varroa*, ou certaines classes de pesticides, comme les néonicotinoïdes, sont considérés comme des facteurs de risque majeurs pour les abeilles mellifères (Neumann et Carreck, 2010 ; Van Esch et *al.*, 2020).

III. Les conditions environnementales

Grâce à l'activité humaine, l'introduction de nouvelles techniques de culture, notamment de gros engins agricoles difficilement manœuvrables, a modifié le milieu apicole et la biodiversité végétale, entraînant des modifications des terres agricoles qui conduisent à une simplification des paysages. Ce paysage qui est une source importante de fleurs sur lesquelles les abeilles butinent le nectar qu'elles transforment en miel et le pollen qui est un aliment protéique de la colonie. L'urbanisation croissante et la prévalence de l'agriculture intensive ont entraîné, également, la disparition de nombreuses zones de biodiversité. En effet, les zones de culture ont été optimisées grâce à la consolidation des parcelles et à l'expansion des monocultures pour accueillir une production plus compétitive et mondialisée (Dudley et Alexander, 2017).

En conséquence, les abeilles doivent faire face à une diminution de la densité et de la diversité des fleurs, en particulier après la floraison des plantes (Holzschuh et *al.*, 2007), et à une diminution concomitante de la quantité et de la qualité des ressources disponibles. Malheureusement, la restauration des paysages pour préserver ou restaurer la diversité et l'abondance des pollinisateurs reste moins efficace que la préservation de l'environnement d'origine (Montoya-Pfeiffer et *al.*, 2018).

Enfin, il a récemment été suggéré que la pollution électromagnétique ELF produite par les installations électriques pourrait être une source majeure de perturbation pour les abeilles (Shepherd et *al.*, 2019).

IV. Les paramètres climatiques

Les paramètres climatiques affectent directement et indirectement les populations d'insectes. Le changement climatique perturbe particulièrement la température et les précipitations qui affectent directement l'activité et le comportement des abeilles (Le Conte et Navajas, 2008 ; Flores et *al.*, 2019 ; Soroye et *al.*, 2020). Ces dernières peuvent être exposées à des conditions extrêmes lors de sécheresses prolongées ou de précipitations exceptionnellement abondantes. Enfin, le changement climatique peut conduire à l'émergence

d'espèces exotiques pouvant constituer un danger pour les abeilles (Le Conte et Navajas, 2008 ; Hellmann et *al.*, 2008)

V. Les agents biologiques

Les abeilles sont confrontées à de nombreux agents pathogènes et prédateurs. Plusieurs espèces exotiques ont émergé au cours des dernières décennies, dont les parasites *Nosema ceranae*, *Varroa destructor*, et le prédateur *Vespa bertina* (Fig.6).

Les facteurs contribuant à ces épidémies sont fortement associés à l'activité humaine, aux caractéristiques des agents infectieux (résistance aux antibiotiques), développement de pathogènes, en particulier évolution rapide des virus à ARN (Brosi et *al.*, 2017 ; Navaja, 2008).



Figure 5 : Les pathogènes et ravageurs de l'abeille.

a. Acarien *Varroa destructor* présent sur le thorax d'une butineuse (flèche). **b.** Deux cellules flagellées de trypanosomes *Lotmaria passim* au microscope électronique à balayage. **c.** Infestation d'un cadre de ruche par des larves de petit coléoptère *Aethina tumida*. **d.** Abeille atteinte par le virus des ailes déformées (DWV) et parasitée par deux femelles *V. destructor* (flèches). **e.** "Test de l'allumette". **f.** Larve d'abeille infectée par le champignon *Ascospaera apis* **g.** *Acarapis woodi* parasitant la trachée d'une abeille. **h.** Larve de mouche parasitoïde *Apocephalus borealis* émergeant du thorax d'une abeille parasitée (Schwarz et *al.*, 2015. Brosi et *al.*, 2017).

V.1 Les prédateurs

De multiples animaux peuvent s'intéresser au contenu de la ruche, surtout en hiver (Bacher, 2008) :

- Des rongeurs, comme les souris,
- Le petit coléoptère des ruches *Aethina tumida*, originaire d'Afrique sub-saharienne, est devenu invasif en Europe, aux Etats-Unis et en Australie où il a induit des ravages dans les colonies (Ellis et Hepburn, 2006 ; Neumann et Ellis, 2008). Le parasite se nourrit de pollen, de miel et de couvain. Il transmettrait la loque américaine et le SBV (Schafer et al., 2009, Eyer et al., 2009).
- Parmi les insectes, outre la fausse teigne, il y a aussi le sphinx tête-de mort, un gros papillon nocturne ;
- Certains oiseaux, comme le pivert.

V.2 Les bactéries pathogènes (les loques)

La loque américaine et la loque européenne sont provoquées respectivement par les bactéries Firmicutes Gram positif *Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius*. Les bactéries se développent dans l'intestin moyen des larves à la suite de leur ingestion (Bacher, 2008).

V.3 Les mycoses

Les mycoses sont des champignons qui se développent dans des conditions qui leur sont favorables : plateau mal aéré et emplacement des ruches humide. Les larves infectées par ces champignons deviennent dures et présentent un aspect des momies (Bacher, 2008).

V.4 Les virus

De nouveaux outils de détection microscopiques et moléculaires (séquençage nouvelle génération) ont permis de découvrir de nombreux virus (McMenamin & Flenniken, 2018). La plupart sont des virus à ARN simple brin positifs (+ssRNA) et à ADN (ssDNA et dsDNA) (Schoonvaere et al., 2018).

V.5 Les parasites

Le principal parasite dangereux de l'abeille domestique est le *Varroa destructor*. Ce parasite a envahi les ruches et causé l'affaiblissement et la disparition de nombreuses colonies. Le varroa se nourrit de tissu adipeux ainsi que de l'hémolymphe des abeilles qu'il parasite perturbant ainsi leur métabolisme tel que la diminution de la production de protéine entrant

dans la fabrication de la gelée royale destinée aux jeunes larves. Dans les cas de forte infestation, les nymphes sont atrophiées, les abeilles sans ailes ou aux ailes déformées, peu à peu tout la colonie s'en trouve gravement amoindrie. Le contrôle du varroa dans une approche écologique n'est toutefois pas simple, il demande une bonne connaissance du cycle de ce parasite (Bacher, 2008).

VI. Les agents chimiques

A. mellifera est un bioindicateur de pollution (Celli et Maccagnani, 2003). Les abeilles nous informent à la fois de la toxicité des contaminants en surveillant la mortalité ou des marqueurs de stress et de la distribution des contaminants en détectant les résidus dans la matrice de la ruche (Lambert et *al.*, 2012). Les xénobiotiques affectant les abeilles sont principalement associés à la pollution anthropique. Les pesticides sont les polluants auxquels les apiculteurs sont les plus exposés.

VI.1 Les Métaux lourds

Les abeilles sont également des indicateurs des charges de métaux lourds qui s'accumulent dans leur corps (Rashed et *al.*, 2009). Certains métaux (cadmium, plomb) sont produits par les activités humaines (combustion, effluents miniers, pesticides, déchets industriels, déchets municipaux), tandis que d'autres (chrome, nickel) sont plus sensibles à l'environnement géochimique. Les activités urbaines et industrielles exposent également les abeilles aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Lambert et *al.*, 2012). Encore une fois, les abeilles sont exposées lorsqu'elles butinent la végétation accumulée, collectent de l'eau contaminée ou entrent en contact avec de l'air contaminé. Les métaux lourds et les HAP sont alors détectés dans la matrice de la colonie.

Enfin, les substances destinées au traitement des maladies (antibiotiques, acide oxalique) sont introduites par les apiculteurs directement dans la ruche. Les plus répandus sont les acaricides utilisés pour lutter contre *V. destructor* (Mullin et *al.*, 2010 ; Chauzat et *al.*, 2011 ; Lambert et *al.*, 2012).

VI.2 Les Pesticides

Les pesticides restent le plus grand risque pour l'environnement. Insecticides, acaricides, herbicides et fongicides sont des familles distinctes de plantes médicinales largement utilisées en agriculture depuis les années 1950. Les plus courants en termes de quantité sont les herbicides et les fongicides. En particulier, les cultures génétiquement modifiées qui tolèrent

les herbicides, en particulier le glyphosate, ont entraîné une augmentation des taux d'application (Perry et *al.*, 2016).

D'autre part, Les pesticides, plus particulièrement les insecticides, sont les polluants auxquels les abeilles sont les plus exposées. Ces insecticides peuvent contaminer les abeilles par contact, notamment lorsqu'ils sont pulvérisés dans les champs, ou par ingestion de ressources contaminées (pollen, nectar, eau) recueillies lors du butinage. Les insecticides sont détectés non seulement dans le pollen collecté, mais également dans les produits de la ruche à savoir : la cire, la propolis, le miel et les abeilles elles-mêmes.

VI.2.1 Néonicotinoïdes

Néonicotinoïdes, ce sont des pesticides à action insecticide. Ils sont apparentés à la nicotine, dont l'activité insecticide est connue depuis 1690 et était utilisée en infusion ou à l'état sec (feuilles de tabac) contre les ravageurs. Néonicotinoïde, imidaclopride. Les néonicotinoïdes sont des agonistes sélectifs neurotoxiques des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine du système nerveux central des insectes. Lorsque les néonicotinoïdes se lient à leurs récepteurs, ils bloquent la neurotransmission pendant plusieurs minutes, provoquant la paralysie puis la mort des insectes. Ils sont principalement utilisés sous forme de feuille ou d'enrobage sur les semences de tournesol, de coton, de maïs et de betterave. Ils agissent de manière systémique et contaminent toutes les parties de la plante. Pendant les événements de ruissellement, ils se trouvent à des concentrations très élevées et peuvent tuer les insectes instantanément. Ce phénomène biologique s'observe à l'aube par l'apparition de gouttelettes contenant du suc cellulaire sur les bords des feuilles des plantes (à ne pas confondre avec la rosée provoquée par la condensation de l'eau atmosphérique).

Cinq molécules ont été commercialisées pour l'utilisation apiculture (tableau1). L'imidaclopride, le clothianide, le thiaméthoxame, le tiaclopride et l'acétamipride qui est la molécule le plus utilisée et disponible en Algérie. Ces molécules sont si stables dans le temps qu'elles persistent et s'accumulent dans le sol. Ainsi, malgré son interdiction, on en trouve encore des traces aujourd'hui. Ses effets ont été observés principalement chez les insectes pollinisateurs (abeilles domestiques). Depuis 1996, les néonicotinoïdes sont devenus l'une des plantes médicinales les plus décriées par les apiculteurs. L'exposition des pollinisateurs se produit principalement pendant la recherche de nourriture. Des études ont montré que les abeilles préfèrent les solutions sucrées contenant des néonicotinoïdes aux solutions simples de saccharose, cette envie de pesticides est probablement due aux actions pharmacologiques de

ces composés au niveau du système nerveux centrale (SNC). Par conséquent, les abeilles ne peuvent pas détecter les néonicotinoïdes et ne peuvent donc pas contrôler leur exposition aux néonicotinoïdes dans leur alimentation. Le traitement des plantes à fleurs est donc un risque pour les collectionneurs et doit être strictement contrôlé (Mannequin. L 2022).

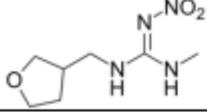
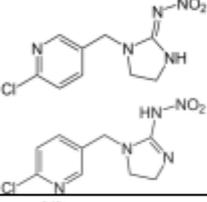
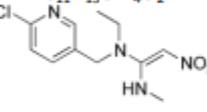
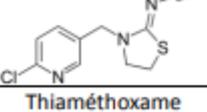
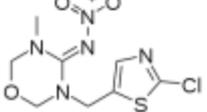
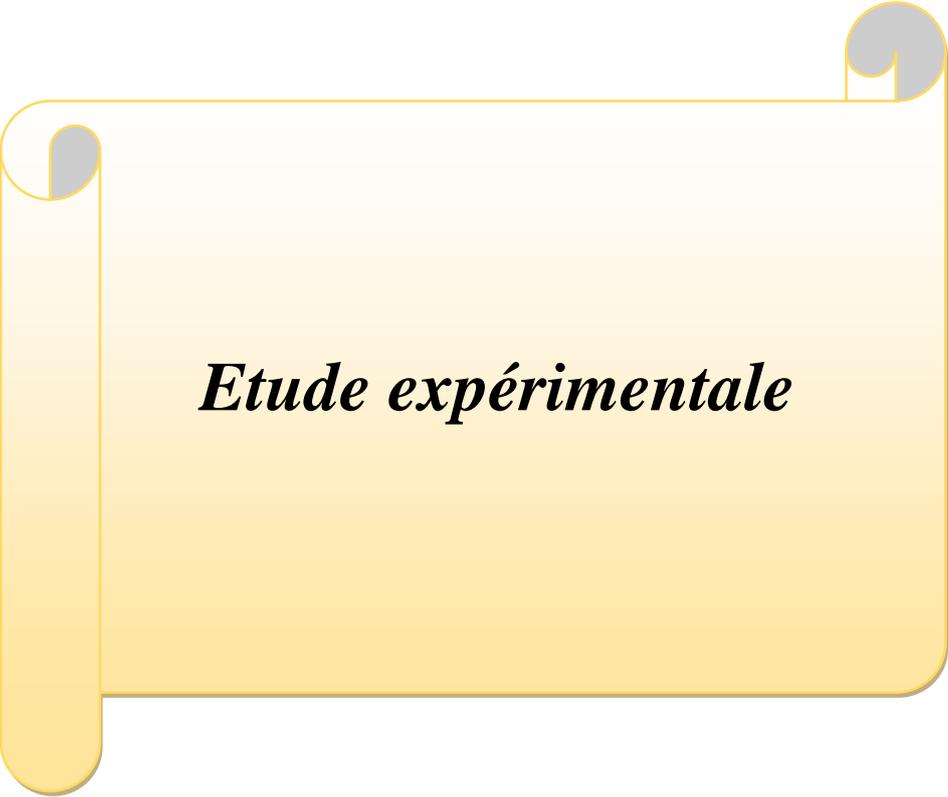
| Substances chimiques | N°CAS | N°EINECS | Synonymes | Formes physiques |
|---|---|--|---|--------------------------|
| <p>Dinotéfurane C₇H₁₄N₄O₃</p>  | 165252-70-0 | Non référencée (SANDRE : non référencé) | Dinotéfuran 2-méthyl-1-nitro-3-(tétrahydrofuran-3-ylméthyl)guanidine | Solide blanc |
| <p>Imidaclopride (2 isomères) C₉H₁₀ClN₅O₂</p>  | 105827-78-9 138261-41-3 | Non référencée (SANDRE : 1877) | Imidacloprid 1-(6-chloro-3-pyridylméthyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylidèneamine | Solide incolore ou beige |
| <p>Nitenpyrame C₁₁H₁₅ClN₄O₂</p>  | 150824-47-8 | Non référencée (SANDRE : non référencé) | Nitenpyram (E)-N-[(6-chloropyridin-3-yl)méthyl]-N-éthyl-N'-méthyl-2-nitroéthène-1,1-diamine | Solide jaune clair |
| <p>Thiaclopride C₁₀H₉ClN₄S</p>  | 111988-49-9 | Non référencée (SANDRE : 5671) | Thiacloprid (Z)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidene cyanamide | Solide |
| <p>Thiaméthoxame C₈H₁₀ClN₅O₃S</p>  | 153719-23-4 | 428-650-4 (SANDRE : 6390) | Thiamethoxam (EZ)-3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine | Solide |
| Substances néonicotinoïdes | Métabolite(s) associé(s) | | | |
| <p>Acétamipride C₁₀H₁₁ClN₄</p> | <p>Méthylamine (6-chloro-3-pyridyl) methanol N-carbamoyl-N'-[(6-chloro-3-pyridyl)méthyl]-N-methylacetamide N-[(6-chloro-3-pyridyl)méthyl]-N-methylacetamide N'-[(6-chloro-3-pyridyl)méthyl]-N-cyanoacetamide N-[(6-chloro-3-pyridyl)méthyl]-acetamide métabolite IS-1-1 : N2-cyano-N1-methylacétamide N-cyanoacétamide 6-chloronicotinique acide N-méthyl (6-chloro-3-pyridyl)méthylamine N2-cyano-N1-méthyl-N1-[(2-aza-3-oxobicyclo-[2,2,0]hex-5-en-6-yl)-acetamide N-(6-chloropyridin-3-ylmethyl)-N-méthyl-acetamide</p> | | | |

Tableau 1 : Caractéristiques générales des Cinq molécules désignées sous le terme « néonicotinoïdes ».



Etude expérimentale

Chapitre III :

Matériel et méthodes

VII. Matériel

VII.1. Les souches bactériennes

Six souches bactériennes, trois bactérie à Gram négative : *Escherichia coli* «ATCC 25922 » , *Pseudomonas aeruginosa* « ATCC 27853 », *Acinetobacter baumannii* «ATCC 610 », et trois bactéries à Gram positive : *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* « ATCC 6633 », *Staphylococcus aureus* (SARM) « ATCC 43300 », sont des souches références de laboratoire de recherche « université de Bejaïa » et elles sont les mêmes souches qui ont été isolées par notre collègue (BENLEKHAL Manel) à partir du microbiote intestinal de l'abeille domestique (*A. mellifera intermissa*) à l'institut Pasteur d'Alger.

VII.2. Le pesticide (la molécule chimique) :

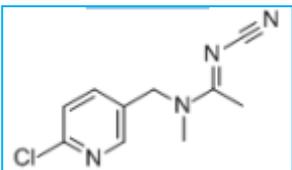
| Substances chimiques | N°CAS | N°EINECS | Synonymes | Formes physiques |
|---|----------------------------|-----------------------------------|--|------------------|
| <p>Acétamipride C₁₀H₁₁ClN₄</p>  | 135410-20-7 160430-64-8 | Non référencée (SANDRE : 5579) | Acetamiprid (E)-N-[(6-Chloro-3-pyridinyl) méthyl] - N'-cyano-N-méthyléthanimidamid | Solide bleu |



Figure 6: Le pesticide Acétamipride utilisé.

VII.3. Le milieu de culture gélosé LB « luria-bertani »

La préparation du milieu est faite d'après le protocole de (Guennadi et al., 2007).

VIII. Méthodes

VIII.1 Standardisation des inocula bactériens :

Tous les protocoles suivis durant la manipulation sont réalisés d'après notre Co-promotrice Mm. Djenadi.

- Dans les conditions de la stérilisation, les suspensions bactériennes de chaque type des souches bactériennes sont préparées en remplissant chaque tube à essai par un volume de 5ml de l'eau physiologique stérile ;
- À l'aide d'une anse de platine une colonie pure est prélevée de chaque souche et mise en suspension, puis bien mixée par le vortex ;
- Par la suite, un ajustement des suspensions bactériens purs est réalisé pour chaque souche à l'aide de spectrophotomètre jusqu'à l'obtention de la même opacité mac Ferland 0,2 Abs.

VIII.2 Le pesticide (la molécule chimique) :

➤ Préparation de la solution mère :

A l'aide d'une balance électrique, on a pesé une quantité de 0,77mg de la poudre du pesticide est pesée et mélangée à un litre d'eau distillée stérile, jusqu'à l'homogénéisation de la solution (Fig.08).

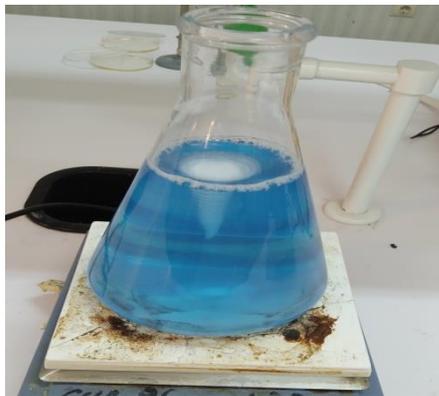


Figure 7:photographie de la solution mère durant l'homogénéisation.

➤ Préparation des dilutions :

- Une cascade des dilutions (de 1 jusqu'à 1/12) est réalisée ;
- La suspension mère (pesticide) est diluée successivement dans une solution physiologique stérile (eau physiologique).
- La dilution décimale en cascade est effectuée en transférant une prise d'essai de 1mL de suspension à diluer dans un tube à Eppendorf contenant 0,5mL de l'eau physiologique.

- Le nombre de dilutions nécessaires est choisi en fonction de la concentration attendue en molécule chimique dans la suspension et pour notre travail, nous avons fait jusqu'à 12 tubes, les valeurs des doses obtenues sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 2 : Valeurs des doses des dilutions obtenues.

| Dose (ng/ml *10⁻³) : | |
|--|--------------|
| D1 | 770 |
| D2 | 385 |
| D3 | 192,5 |
| D4 | 96 |
| D5 | 48 |
| D6 | 24 |
| D7 | 12 |
| D8 | 6 |
| D9 | 3 |
| D10 | 1,5 |
| D11 | 0,75 |
| D12 | 0,37 |

VIII.3 Méthode des puits

➤ **Écoulement des boîtes :**

Dans les conditions de la stérilisation nous avons rempli la moitié des boîtes de Pétri stérile, par le milieu de culture « LB », et nous avons laissé les boîtes pour quelques minutes dans le but de solidification.

➤ **Préparation des suspensions bactérienne :**

Avec des cultures pures et jeunes de 18 à 24 heures, nous avons préparé des suspensions bactériennes (Séparément) en prélevant quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et en les dissociant dans 5ml d'eau physiologique, nous avons agité énergiquement pour bien mélanger. (Fig.10).

L'absorbance mesuré par spectrophotométrie de chaque suspension doit être comprise 0,2 DO à la longueur d'onde de 625 nm,



Figure 8 : Suspensions bactérienne après l'ajustement.

➤ **Ensemencement des souches :**

À l'aide de l'écouvillon nous avons ensemencé des stries séché de la suspension (3 fois de répétition).

➤ **Confection des puits (trous) sur la gélose :**

Par l'utilisation de la pipette pasteur, nous avons réalisé des puits sur la gélose.

➤ **Déposition de l'extrait active (pesticide) dans les puits :**

Par l'utilisation de la micropipette nous avons déposé un volume de 50µl de chaque dose par chaque souche dans chaque puits.

➤ **Incubation :**

Après l'étiquetage, nous avons mis à l'incubateur à 37°C pendant 24h.

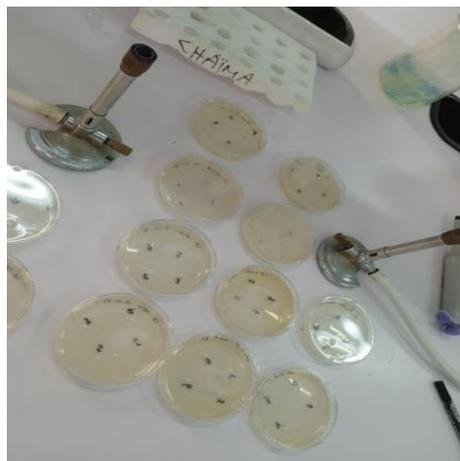


Figure 9 : Boites pétrie à la fin de la réalisation de la technique (photo originale).

VIII.4 Méthode des spots (CMI sur milieu solide)

➤ **Préparation des boîtes :**

Pour un volume de gélose de 20ml, nous avons ajouté un volume de solution de pesticide 0,77mg/ml. Ce volume correspond pour la première boîte de la première dose.

Les volumes suivants sont déterminés par la loi suivante : $C_i V_i = C_f V_f$, par exemple pour :

$$C_f = 0,385\text{mg/ml}, V_f = 20\text{ml}, C_i = 0,77 \text{ mg/ml}.$$

$$\text{Donc : } V_i = C_f V_f / C_i = 20 * 0,385 / 0,77 = 10\text{ml}$$

Le volume 10ml de la solution de pesticide donc est ajouté dans le volume de 20ml de la gélose « LB », bien mélangée puis versée dans la boîte de la deuxième dose et ainsi de suite jusqu'à la douzième dilution.

➤ **Préparation des suspensions bactériennes :**

La préparation de la suspension bactérienne de la méthode des spots est identique avec la méthode des puits.

➤ **Réalisation des spots :**

Une fois que la gélose est solidifiée à l'aide de la micropipette nous avons déposé un volume de 20µl de chaque suspension.



➤ **Incubation :**

Après l'étiquetage nous avons mis à l'incubateur à 37°C pendant 24h.

Chapitre IV :

Résultats et discussion

L'interaction de notre solution pesticide avec les souches bactériennes testées est évaluée suivant la méthode de diffusion sur gélose par un dépôt d'extrait dans un puits et la méthode des spots. Une fois que le pesticide est diffusé dans la gélosé, il va inhiber la croissance des cellules bactériennes au tour de la zone de diffusion créant ainsi un halo circulaire claire, c'est la zone d'inhibition. Cette dernière sera estimée en millimètre. On peut considérer qu'un extrait est actif lorsqu'il entraine une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm.

IX. Méthode des puits

Suivant la méthode des puits, la diffusion des 50µl de différentes doses de la solution de pesticide, dans des puits sur gélose de Luria-bertani, nous a permet de visualiser des zones d'inhibitions avec les souches testées soit à Gram positive ou à Gram négative à savoir : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (SARM).

IX.1 Les résultats de l'activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne sont rapportés dans le tableau suivant :

Diamètre (mm) des zones d'inhibition des douze doses (ng/ml *10⁻³) du pesticide

Tableau 3 : Les résultats de l'activité antimicrobienne pour la méthode des puits :

| Dose Souche | D1 770 | D2 385 | D3 192,5 | D4 96 | D5 48 | D6 24 | D7 12 | D8 6 | D9 3 | D10 1,5 | D11 0,75 | D12 0,37 |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-------------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|------------|-------------|-------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | ND | ND | 14 | 15 | 18 | 16 | 18 | 16 | 35 | 40 | 20 | 13 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (SARM) | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 28 | 14 | 14 | 16 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ND | ND | 13 | ND | 9 | 14 | 11 | 25 | 13 | ND | 15 | ND |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | ND | ND | ND | 10 | 12 | 20 | 15 | 30 | 25 | 27 | ND | 14 |
| <i>Escherichia coli</i> | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

ND : Non déterminé

Les résultats obtenus (tableau 1) indiquent que la solution de pesticide a un effet sur l'activité des souches bactériennes testées : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (SARM), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ; avec des zones d'inhibitions qui varient de 10 à 40 mm pour la majorité des souches sauf *Enterococcus faecalis* et

Escherichia coli qui n'ont pas des zones d'inhibitions observée ce qui ne suggère aucun effet de pesticide sur ces deux bactéries.

IX.1.1 Analyse des résultats

IX.1.1.1 *Bacillus subtilis* et *Acinetobacter baumannii* :



Figure 10 : photographie du résultat de *Bacillus* de la méthode des puits.

- Les dilutions D_1 - D_3 : aucune inhibition observée
- A partir de la dilution D_4 nous constatons un grossissement de la zone d'inhibition, grâce à la réduction de la taille des molécules pesticides qui a permis sa diffusion dans la bactérie.
- Pour la dilution D_{12} : la concentration est très basse qui a conduit à l'inefficacité de la molécule.

IX.1.1.2 *Staphylococcus aureus* (SARM) :

Une modification de la cible du pesticide entraîne une perte d'activité de celui-ci, une résistance acquise ; la bactérie possède une nouvelle PLP (qui a une très peu d'affinité).

- De la dilution D_1 - D_7 : pas d'inhibition à cause de la grande taille des molécules de pesticide qui ne peuvent pas passer la membrane bactérienne.
- La dilution D_8 : Apparition d'une zone d'inhibition de 28 mm qui signifie le passage des molécules pesticides à l'intérieur de la bactérie et l'arrêt de la croissance bactérienne.
- Pour les doses D_9 - D_{12} : pas d'inhibition de la croissance bactérienne à cause de la concentration basse de pesticide.

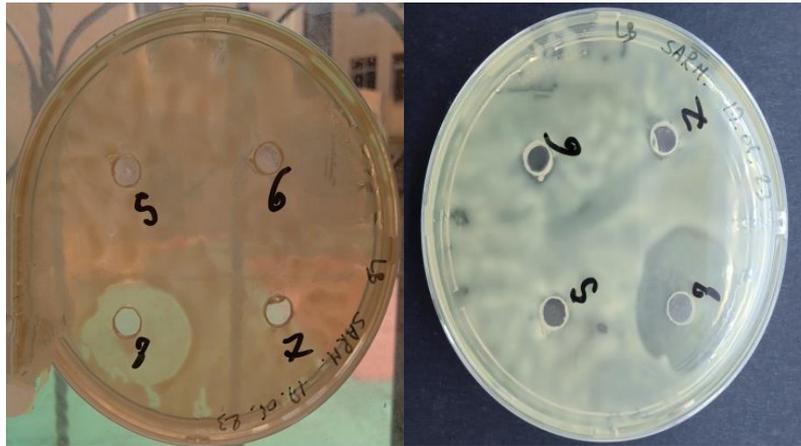


Figure 11 : Quelques photographies du résultat de SARM de la méthode des puits.

IX.1.1.3 *Enterococcus faecalis*

L'imperméabilité bactérienne est impliquée dans la résistance naturelle. Les molécules chimiques ne peuvent pas entrer dans les porines membranaires de ces bactéries. L'imperméabilité est également impliquée dans la résistance acquise des bactéries (par la perte de la porine de la membrane externe).

Pour *Enterococcus* aucune zone d'inhibition observée dans toutes les doses ce qui indique la résistance totale de ces souches envers le pesticide.

IX.1.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

- D1-D7 : pas d'inhibition à cause de l'imperméabilité membranaire qui a arrêté la diffusion de pesticide dans la bactérie.
- D8 : zone d'inhibition de 25 mm qui signifie l'effet antibactérien de pesticide dans cette dose ou les molécules chimiques peuvent traverser la membrane des bactéries.
- D9-D12 : la basse concentration de pesticide est insuffisante pour stopper la croissance bactérienne.

IX.1.1.5 *Escherichia coli*

Pour *E. coli* aucune zone d'inhibition observée dans toutes les doses, ce qui indique la résistance totale de ces souches envers le pesticide ou bien il est possible que la bactérie puisse dégrader la molécule chimique du pesticide.

X. Méthode des spots

Nous avons également obtenu les résultats de la CMI sur le milieu solide suivant la méthode des spots. Les résultats relatifs à l'évaluation des CMI sur milieu solide des doses de la solution de pesticide sur les souches de bactéries sont présentées dans le tableau 2 :

Tableau 4 : Les résultats de l'activité antimicrobienne pour la méthode des spots :

| Dose Souche | D1 770 | D2 385 | D3 192,5 | D4 96 | D5 48 | D6 24 | D7 12 | D8 6 | D9 3 | D10 1,5 | D11 0,75 | D12 0,37 |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-------------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|------------|-------------|-------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | + | ++ | +++ | +++ | + | + | - | +++ | + | + | +++ | +++ |
| <i>Staphylococcus aureus (SARM)</i> | - | + | +++ | +++ | - | - | - | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ |
| <i>Enterococcus</i> | + | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - | ++ | ++ | - | - | +++ | +++ |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | - | - | + | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | - | - | +++ | +++ |
| <i>Escherichia coli</i> | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

+ : présence des colonies, - : absence des colonies, ++ : présence de deux essais de colonies, +++ : présence de trois essais de colonies.

X.1 Analyse des résultats :

D'après les résultats obtenus de la méthode des spots, nous remarquons que la CMI varie selon la souche bactérienne. La perméabilité de la paroi bactérienne à la molécule de pesticide « Acétamipride » diffère d'une dose à une autre. La plus faible CMI est enregistrée avec *Pseudomonas aeruginosa*. **CMI = 0.03901 *10⁻³ng/ml.**

Bacillus subtilis et *SARM* ont la même CMI (**CMI = 0,3125 *10⁻³ng/ml**). Grâce à des enzymes inhibitrices, la *Bacillus* continue sa croissance d'une façon normale, et la modification des cibles de pesticide (PLP) a permis à *SARM* de continuer sa croissance d'une façon normale. Par contre chez *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*, avec les 12 dilutions de la solution du pesticide, n'expriment aucun effet sur les souches bactériennes.



Figure 12 : photographie du résultat de SARM de la méthode des spots.



Figure 13 : Résultat de *Enterococcus* de la méthode des spots.

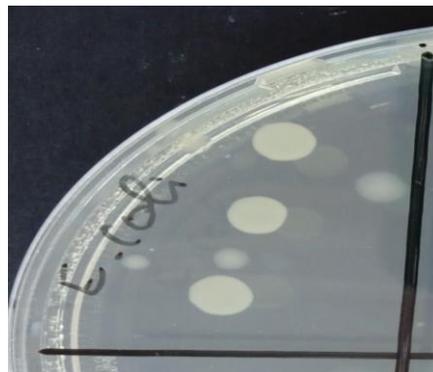


Figure 14 : Résultat de *Escherichia coli* de la méthode des spots.

Les résultats obtenus dans notre travail sur la toxicité de l'Acetamipride sur la croissance des bactéries de microbiote intestinale d'abeille, sont similaires à ceux obtenus par Sellami (2003). Ce dernier a étudié l'effet de 17 pesticides sur 122 souches bactériennes appartenant au genre des *Rhizobia*. Il a constaté que les faibles doses des disques/pesticides (solution de pesticides sur des disques de papier filtre) n'ont pas inhibé la croissance des souches testées.

Par contre, les concentrations élevées de pesticide causent des zones d'inhibition de 10 à 15 mm contrairement à notre résultats, l'effet de l'acétamipride commence de la huitième dilution (**6 ng/ml *10⁻³**) est la dose efficace presque chez toutes les souches bactérienne testées avec des zones d'inhibition varies entre 10 à 40mm ; tous les résultats de Sellami (2003) sont obtenus par rapport du mécanisme d'action des souches testées et la molécule chimique du pesticide utilisé, qui confirme la spécificité de pesticide qui diffère d'une bactérie d'une autre et d'une dose vers l'autre.

Conclusion

Conclusion :

La connaissance de l'effet et le degré de toxicité des pesticides sur les bactéries de microbiote intestinales de l'abeille domestique *Apis mellifera* a une grande importance, à cause de son rôle crucial et son multi-fonctionnement dans l'organisme. Les prélèvements des bactéries ont été dans différents endroits de l'intestin pour atteindre le maximum des espèces bactériennes car chaque souche occupe une partie de l'intestin.

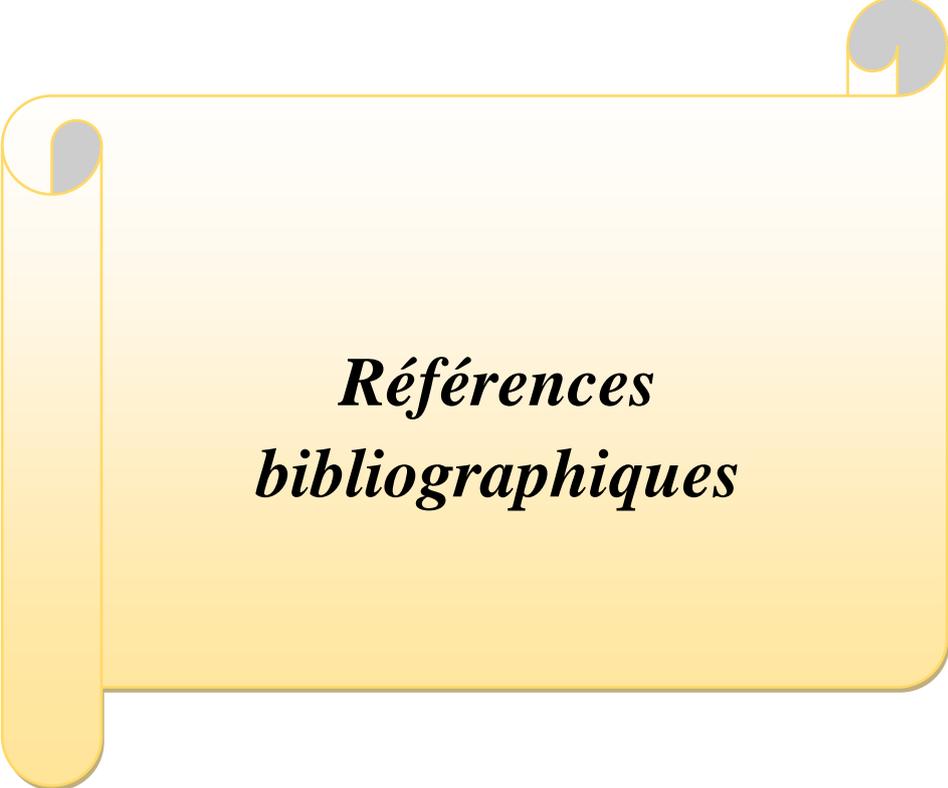
Après des recherches basées sur plusieurs testes sur l'effet de pesticide *Acétamipride* sur quelques bactéries du microbiote d'abeille et après la réalisation des méthodes qui permettent de déterminer le pouvoir inhibitrices de ces molécules chimiques envers les bactéries intestinales (méthodes spots et puits) nous sommes arrivés à des résultats qui indique la nocivité d'utilisation abusif de ces molécules.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur six souches bactériennes trois bactérie à Gram négative : *Escherichia coli* «ATCC 25922 », *Pseudomonas aeruginosa* « ATCC 27853 », *Acinetobacter baumannii* «ATCC 610 », et trois bactéries à Gram positive : *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* « ATCC 6633 », *Staphylococcus aureus* (SARM) « ATCC 43300 », selon les deux méthodes (méthodes spots et puits), les souches étudiées présentent une sensibilité vis-à-vis des différentes concentrations de la solution de pesticide utilisé, qui a été confirmé par l'observation des zones d'inhibition varie de 10 à 40 mm pour la majorité des souches sauf *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* qui n'ont pas des zones d'inhibitions observée ce qui ne suggère aucun effet par le pesticide sur ces deux bactérie.

Nos résultats et ceux obtenus par d'autres chercheurs montrent qu'il est impératif de trouver des alternatives qui sont moins toxiques ou trouver d'autres moyens de lutte biologique contre les ravageurs des cultures tel que la *Bacillus thuringiensis*, *Microalgue*, *Agrobacterium radiobacter*...etc.

L'utilisation abusive des pesticides chimiques n'est pas seulement une source de pollution des eaux, de sol et de l'atmosphère mais également un danger sur la survie de toute une biodiversité animale et plus particulièrement les pollinisateurs dont l'abeille fait partie.

Ces pesticides perturbent le comportement et le métabolisme des abeilles ce qui entraine leur mortalité et menace l'équilibre des divers écosystèmes.



***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques :

B

- Berenbaum MR, Johnson RM, 2015. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 10, 51–58.
- Brosi BJ, Delaplane KS, Boots M, de Roode JC, 2017. Ecological and evolutionary approaches to managing honeybee disease. *Nature Ecology & Evolution* 1, 1250–1262.
- Broderick NA, Welchman DP, Lemaitre B (2009) Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. In *Insect infection and immunity: evolution, ecology, and mechanisms*; Rolff J, Reynolds S (Eds). Oxford University Press: New York, USA. pp. 13-33.
- Brutscher LM, Daughenbaugh KF, Flenniken ML, 2015. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 10, 71–82.

C

- Carvalho SM, Belzunces LP, Carvalho GA, Brunet J-L, Badiou-Beneteau A, 2013. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 2117–2124.
- Celli G, Maccagnani B, 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* 56,137–139.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM et al., 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology* 15, 615–636.

D

- Dermauw W, Van Leeuwen T, 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 45, 89–110.
- Douglas A (2012) Alimentary canal, digestion and absorption. In R. Chapman, *The insects: structure and function*, 5th ed.; R., Simpson, S., Douglas, A., Eds; Cambridge University Press, New York, USA. pp. 46-80.
- Dudley N, Alexander S, 2017. Agriculture and biodiversity: a review. *Biodiversity* 18, 45–49.

E

- Eisenhardt D, Kühn C, Leboulle G (2006) The PKA-CREB system encoded by the honeybee genome. *Insect Mol Biol.* 15(5):551-61.
- Engel P, Martinson VG, Moran NA, 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 11002–11007.

F

- Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions* 34, 1252–1255.

G

- Gong Y, Diao Q, 2017. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26, 1–12.
- Gordon J, Knowlton N, Relman DA, Rohwer F, Youle M, 2013. Superorganisms and Holobionts: Looking for a term for the functional entity formed by a macrobe and its associated symbiotic microbes and viruses? The term is “holobiont.” *Microbe Magazine* 8, 152–153.
- Guennadi sezonov, Danèle joseleau-Petit, and Richard D’Ari 2007. *Escherichia coli* Physiology in luria-bertani borth, *journal of Bacteriology*.
- Guo J, Wu J, Chen Y et al., 2015. Characterization of gut bacteria at different developmental stages of Asian honey bees, *Apis cerana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 127, 110–114.

H

- Holzschuh A, Steffan-Dewenter I, Kleijn D, Tscharntke T, 2006. Diversity of flower-visiting bees in cereal fields: effects of farming system, landscape composition and regional context: Pollinator diversity in organic farming. *Journal of Applied Ecology* 44, 41–49.

I

- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM, 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23, 371–378.

J

- Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD, 2013. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*) (NE Raine, Ed.).

K

- Kakumanu ML, Reeves AM, Anderson TD, Rodrigues RR, Williams MA, 2016. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Frontiers in Microbiology* 7, 1255
- Kapheim KM, Rao VD, Yeoman CJ et al., 2015. Caste-Specific Differences in Hindgut Microbial Communities of Honey Bees (*Apis mellifera*) (EG Zoetendal, Ed.). *PLOS ONE* 10, e0123911.
- Khan KA, Al-Ghamdi AA, Ghramh HA et al., 2020. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. *Microbial Pathogenesis* 138, 103793.
- K. L. J. Hung, J. M. Kingston, M. Albrecht, D. A. Holway, J. R. Kohn, 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 285.
- Kwong WK, Moran NA, 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology* 14, 374–384.

L

- Lambert O, Piroux M, Puyo S et al., 2013. Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France (N Desneux, Ed.). *PLoS One* 8, e67007.
- Le Conte Y. Mieux connaître l'abeille. In : Clément H. Le traité « Rustica » de l'apiculture. 5 e édition. Paris : « Rustica » éditions ; 2018, p.11-51.

M

- Martin SJ, Hardy J, Villalobos E, Martín-Hernández R, Nikaido S, Higes M, 2013. Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically: DWV and *Nosema* interactions. *Environmental Microbiology Reports* 5, 506–510.
- Mannequin Laury, le 28 Février 2022, Les abeilles : une espèce menacée, important indispensable à l'humanité 125-126.
- McMenamin AJ, Flenniken ML, 2018. Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Current Opinion in Insect Science* 26, 120–129.

- Montoya-Pfeiffer PM, Rodrigues RR, Metzger JP, da Silva CI, Santos Baquero O, Alves dos Santos I, 2018. Are the assemblages of tree pollination modes being recovered by tropical forest restoration? (G Overbeck, Ed.). *Applied Vegetation Science* 21, 156–163.

N

- Neumann P, Ellis JD, 2008. The small hive beetle (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae): distribution, biology and control of an invasive species. *Journal of Apicultural Research* 47, 181–183.

P

- Paris L, Roussel M, Pereira B, Delbac F, Diogon M (2017) Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil. *Microb Biotechnol.* 10(6):1702-1717.
- Perrot T, Gaba S, Roncoroni M, Gautier J-L, Saintilan A, Bretagnolle V, 2019. Experimental quantification of insect pollination on sunflower yield, reconciling plant and field scale estimates. *Basic and Applied Ecology* 34, 75–84.
- Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA, 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques* 50, 98–115.

R

- Rashed MN, El-Haty MTA, Mohamed SM, 2009. Bee honey as environmental indicator for pollution with heavy metals. *Toxicological & Environmental Chemistry* 91, 389–403.

S

- Sellami Moeze, 2003. Effet de pesticide sur la croissance bactérienne des *Rhizobia*. *Genie agroalimentaire* 28, 29.
- Schoonvaere K, Smaghe G, Francis F, de Graaf DC, 2018. Study of the Metatranscriptome of Eight Social and Solitary Wild Bee Species Reveals Novel Viruses and Bee Parasites. *Frontiers Microbiology* 9, 177.
- Shepherd S, Lima MAP, Oliveira EE, Sharkh SM, Jackson CW, Newland PL, 2018. Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields impair the Cognitive and Motor Abilities of Honey Bees. *Scientific Reports* 8, 7932.

- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP, 2004b. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science* 60, 291–296

T

- Tarpy DR, Mattila HR, Newton ILG, 2015. Development of the Honey Bee Gut Microbiome throughout the Queen-Rearing Process (PD Schloss, Ed.). *Applied and Environmental Microbiology* 81, 3182–3191.

V

- Van Der Valk H, Koomen I, Nocelli RCF et al., 2012. Aspects determining the risk of pesticides to wild bees: risk profiles for focal crops on three continents. *Julius-Kühn-Archiv* 437, 142–158.
- Vásquez A, Forsgren E, Fries I et al., 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees (N Ahmed, Ed.). *PLoS One* 7, e33188.

Y

- Yoshiyama M, Wu M, Sugimura Y, Takaya N, Kimoto-Nira H, Suzuki C, 2013. Inhibition of *Paenibacillus* larvae by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, 62–67.

Z

- Zhang X, He SY, Evans JD, Pettis JS, Yin GF, Chen YP, 2012. New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* 109, 156–159.

Résumé

Les données scientifiques actuelles suggèrent un déclin de la diversité et de l'abondance des insectes, y compris les abeilles domestiques *Apis mellifera*. Ces dernières sont confrontées à de fortes pertes de colonies dans plusieurs régions du monde telles que l'Algérie. De nombreuses études suggèrent que l'origine du déclin des colonies d'abeilles est les pesticides comme étant les principaux contributeurs à ce déclin. La co-exposition des abeilles à de multiples pesticides et leur effet sur le microbiote constituent un phénomène courant. Cependant, les recherches sur les effets de pesticides n'ont pas fait l'objet d'un intense développement. Ainsi, les travaux conduits dans le cadre de cette thèse ont été focalisés sur la détermination de la toxicité de pesticides, appliqués à des niveaux d'exposition environnementaux. Le choix s'est porté sur l'étude des interactions entre un insecticide néonicotinoïde l'Acétamipride De plus, en introduisant diverses techniques et méthodes telles que la méthode du puits et la méthode des spots, nous pouvons déterminer l'étendue de l'impact des pesticides sur certaines bactéries du microbiote intestinal, qui est à la base de cette étude.

Mots clés :

Abeille, pesticides, insecticides, activité antimicrobienne, microbiote, *Apis mellifera*, bactérie commensale.

ملخص

تشير البيانات العلمية الحالية إلى انخفاض تنوع ووفرة الحشرات، بما في ذلك نحل العسل *Apis mellifera*. تواجه الأخيرة خسائر فادحة في المستعمرات في عدة مناطق من العالم مثل الجزائر. تشير العديد من الدراسات إلى أن أصل تدهور مستعمرات النحل متعدد الأسباب ويحدد مبيدات الآفات ومسببات الأمراض كمساهمين رئيسيين في هذا الانخفاض. يعد التعرض المشترك للنحل لمبيدات الآفات المتعددة والإصابة بمسببات الأمراض المتعددة ظاهرة شائعة. ومع ذلك، لم يتم تطوير الأبحاث حول تأثيرات مخالط مبيدات الآفات على نطاق واسع. وبالتالي، فإن العمل الذي تم تنفيذه كجزء من هذه الأطروحة ركز على تحديد سمية مبيدات الآفات، المطبقة على مستويات التعرض البيئي، في وجود العامل الممرض. وقع الاختيار على دراسة التفاعلات بين المبيدات الحشرية النيونيكوتينويدية. وعلاوة على ذلك، من خلال إدخال تقنيات وطرق مختلفة مثل طريقة البئر وطريقة النقطة، يمكننا تحديد مدى تأثير المبيدات الحشرية على الكائنات الحية الدقيقة المعوية، وهي أساس هذه الدراسة.

الكلمات المفتاحية:

النحل، المبيدات الحشرية، مبيدات الآفات، نشاطات مضادات المكروبات، ميكروبيوتا، البكتريا المتعايشة، *Apis mellifera*

Abstract

Current scientific data suggests a decline in the diversity and abundance of insects, including the honey bees *Apis mellifera*. The latter are facing heavy colony losses in several regions of the world such as Algeria. Many studies suggest that the origin of bee colony decline is multi-causal and identify pesticides as major contributors to this decline. Co-exposure of bees to pesticides and its effect to the microbiota. However, research on the effects of pesticide has not been extensively developed. Thus, the work carried out as part of this thesis focused on determining the toxicity of mixtures of pesticides, applied at environmental exposure levels, in the presence of a pathogen. The choice fell on the study of the interactions between a neonicotinoid insecticide. Moreover, by introducing various techniques and methods such as the well method and the point method, we can determine the extent of the impact of pesticides on the intestinal microbiota, which is the basis of this study.

Keywords :

bee, pesticides, insecticides, antimicrobial activity, microbiota, comensal bacteria, *Apis mellifera*