
RECHERCHE DE PAENIBACILLUS LARVAE DANS DIFFERENTS COMPOSANTS DE LA RUCHE

N. ADJLANE¹, S. KECHIH², N. HADDAD³

1 - Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université M'hamed Bougara de Boumerdès. adjlanenouredine@hotmail.com

2 - Laboratoire de microbiologie, Laboratoire régional de la de médecine vétérinaire Tizi Ouzou Algérie

3 - National Center for Agriculture Research and Extension, Bee Research Unit.P.O.Box 639-Baq'a 19381.Jordan.

RESUME

Dans le secteur apicole, cinq maladies ou organismes nuisibles sont sujets à déclaration obligatoire en Algérie : la varroase, les loques (américaine et européenne), la nosérose et l'acariose des abeilles. Bien que *Paenibacilluslarvae* constitue une des plus graves affections bactériennes du couvain, peu de données sont actuellement disponibles sur les méthodes de détection de la loque américaine en Algérie. La présente étude vise à comparer entre les méthodes de recherche de cette bactérie dans les différents produits et échantillons de la ruche. Les méthodes de détection sur les abeilles et dans le miel constituent les techniques les plus efficaces pour le diagnostic de la pathologie. Nos résultats ont montré que même en absence de symptômes, 20% de la loque américaine a été détectée dans le miel, et 10% dans les abeilles et les débris de la ruche.

Mots clés : *Paenibacilluslarvae*, détection microbiologique, échantillons, cire, miel, pollen, débris, abeilles,

ABSTRACT

In the beekeeping sector, five diseases or pests are subject to mandatory reporting in Algeria varroasis, American and European foulbrood, Nosemosis and

acariosis. Although *Paenibacillus larvae* is a more serious bacterial infections of the brood , little data are currently available on methods of detection of American foulbrood in Algeria . This study aims to compare the methods of finding the bacteria in different samples and products from the hive. The detection methods on bees and honey are the most effective in the diagnosis of pathology . Our results showed that even in the absence of symptoms, 20% of American foulbrood has been detected in honey and 10% in bees and debris from the hive.

Key-word: *Paenibacillus larvae*, microbiological detection, samples, wax, honey, pollen, debris, bees.

INTRODUCTION

Les Apidés participent de manière prépondérante à la pollinisation de nombreux végétaux. La majorité d'entre eux ne pourraient pas accomplir leur cycle de développement sans l'intervention des abeilles. Ces derniers ont donc un rôle capital pour l'environnement, les agrosystèmes et le maintien de la biodiversité. Depuis plusieurs années, les populations de ces pollinisateurs connaissent un fort déclin. La disparition des pollinisateurs pose un problème important, aussi bien pour les espèces végétales qui sont dépendantes de ces insectes pour leur reproduction, que pour les espèces animales qui se nourrissent de ces mêmes végétaux. En Algérie, de nombreux cas de mortalité de colonie d'abeille ont été observés depuis 2007. La présence des agents pathogènes dans ces colonies ainsi leur état sanitaire sont les causes principales de cette létalité (Adjlane et Doumandji, 2011). La varroase, la nosérose et la loque américaine constituent les pathologies les plus dominantes dans le cheptel apicole (Adjlane et al., 2012). La loque américaine est une maladie bactérienne commune à l'abeille (*Apis mellifera* L.). Elle se rencontre sur tous les continents où l'apiculture existe; en outre elle est la maladie la plus contagieuse du couvain de l'abeille domestique. Elle fait partie des maladies capables de détruire une colonie entière.

L'agent causal de la loque américaine est la bactérie Gram positive *Paenibacilluslarvae*. Cette dernière peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée (Heyndrickx *et al.*, 1996). Les spores représentent le stade infectieux. Si le couvain absorbe des spores en se nourrissant, ils germent dans l'intestin moyen de la larve et les bâtonnets. Il s'agit de la forme végétative qui est très mobile et capable de traverser la paroi de l'intestin pour pénétrer dans la cavité abdominale. A ce niveau, les spores se multiplient rapidement et provoquent la mort de la larve (Gregorc et Bowen, 1998). En dehors des échantillons de couvain, la détection de la bactérie peut être menée dans le miel (Shimanuki et Knox, 1988), dans les échantillons de pollen (Gochnauer et Corner 1987), de la cire (Gochnauer 1981), sur les ouvrières adultes (Lindström et Fries, 2005) et les débris de ruche (Titera et Haklova 2003). Ce travail se propose de comparer entre les méthodes de détection de la bactérie *Paenibacilluslarvae* L dans les colonies d'abeilles en fonction de la nature de échantillon (miel, abeilles, Pollen, cire et débris du la ruche).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Echantillons

L'échantillonnage a été effectué sur deux ruchers :

- Un rucher contaminé par la loque américaine situé dans la région de Bougara (wilaya de Blida)
- un rucher supposé sain situé dans la région de Baba Ali (wilaya d'Alger).

Des prélèvements ont été effectués au cours de période printanière sur 10 colonies et ont engendrés :

- Des abeilles ouvrières directement des cadres.
- Du miel récolté des alvéoles.
- La cire directement des cadres.

-
- Du Pollen de l'intérieur de la colonie.
 - Les débris de la ruche du fond de la colonie.

2. Mise en évidence de *Paenibacilluslarvae*

Le milieu de culture MYPGP a été utilisé pour la mise en évidence de *Paenibacilluslarvae*(Dingmann et Stahly (1983)). Il est composé de 10 g de Bouillon Mueller-Hinton (Oxoid CM0405), 15 g d'extrait de levure, 3 g de phosphate de potassium (K_2PO_4), 2 g de glucose, 1 g de pyruvate de sodium ($C_3H_3NO_3$) et de 20 g de gélose. Le milieu est stérilisé après homogénéisation à 120°C pendant 1 heure.

2.1.Détection de *Paenibacilluslarvae* dans les abeilles

La méthode de LINDSTROM et FRIES (2005) est utilisée pour la détection de *Paenibacilluslarvae*. Elle consiste à écraser soigneusement les intestins d'abeilles et ajouter au filtrat 20 ml de l'eau physiologique. Le mélange obtenu est centrifugé pendant 10 minutes. Le culot est récupéré et mélanger avec 12 ml de Nacl stérile (13 g/litre), l'échantillon est incubé pendant 10 minutes a 85 °C et 10 µl de la suspension est inoculer sur les plaques MYPGP-agar. La lecture des résultats s'effectue après 7 jours d'incubation à 36°C et à 5 % de CO₂. Sur la gélose MYPGP, les colonies de la bactérie *Paenibacilluslarvae*sont petites, régulières, en général rugueuses, plates, blanchâtres ou beiges.

2.2 Détection dans le miel

La recherche de la bactérie dans le miel est inspirée de la méthode de De Graaf et al (2001). Dix grammes de miel ont été mélangés avec un volume équivalent de tampon phosphate salin (PBS) et centrifugé 30 minutes à 4000 g. Le culot est mis en suspension dans 250 µL de PBS stérile, chauffé à 80°C durant 15 min, passé au vortex puis et mis en culture sur un milieu MYPGP .Les boîtes de Pétrisoncubées 4 jours à 37°C.

2.3 Détection dans la cire et les débris de la ruche

L'identification de la loque sur les échantillons de cire et les débris de la ruche est basée sur la méthode de Hornitzky et Wilson (1989). Les débris et la cire (1,5 g) sont dissous dans 10 ml de toluène. La partie liquide est alors diluée dans une solution physiologique au 1/4. Après agitation vigoureuse, la suspension est immédiatementensemencée sans chauffage.

2.4 Détection dans le pollen

Pour le pollen, La méthode utilisée est celle de Gochnauer et Corner (1987). Un filtrat de pollen peut être obtenu en dispersant soigneusement 1 g de pollen dans 10 ml (volume final) d'eau distillée stérile et en filtrant à travers du papier Whatman n°1. Après agitation, la suspension est immédiatementensemencée après un chauffage à 80°C durant 10 minutes.

RESULTATS :

Dans le tableau I, on récapitule les résultats obtenus dans les différents échantillons des ruchers malades et des ruchers sains. On remarque que les taux de détections dans le rucher supposé sain sont très bas, ou nul, pour l'ensemble des échantillons en comparaison avec le rucher malade. Le taux maximal de détection dans le rucher malade est de 20% dans le miel. Il représente 28,57% du miel provenant du rucher sain et 50% de la cire qui provient du rucher malade et qui représente le plus faible taux de détection dans ce rucher. Par ailleurs, Pour le rucher malade, le taux de détection de la loque obtenu dans les échantillons des abeilles et du miel est de 80 % et de 70% de contamination respectivement. Pour les débris de la ruche, le pollen et la cire, les taux de contaminations sont respectivement 70%, 60% et 40%. En ce qui concerne le rucher considéré comme sain, un seul échantillon positif est détecté sur les abeilles et les débris de la ruche et deux sur le miel (soit 10 et 20 % de contamination). Pour les autres catégories (cire, le pollen) aucun échantillon positif n'a été détecté.

Tableau I : Taux de détection (en %) de la loque américaine dans différents produits des ruches malades avec symptômes et ruches saines.

	Ruchesmalades	Ruchessaines
Abeillesouvrières	80	10
Miel	70	20
Cire	40	0
Pollen	60	0
Débris de la ruche	70	10

Concernant l'aspect macroscopique des colonies en boîte de Pétri (fig 1) à milieux semi-sélectifs MYPGP. Nous avons observé que les bactéries *Paenibacilluslarvae*, sont présentes en petites colonies de forme plates ou surélevées, de couleur blanchâtre ou beige.

**Figure 1 : aspect macroscopique des *Paenibacilluslarvae* sur milieu MYPGP.**

DISCUSSION

D'après nos résultats obtenus pour le rucher contaminé par la loque américaine, le pourcentage de détection le plus élevé est obtenu dans les échantillons du miel et des abeilles, le diagnostic de la pathologie dans les débris de la ruche constitue aussi un bon moyen de recherche de la bactérie. La présente étude signale aussi que même en

absence de symptômes, il est possible de détecter les bactéries dans le miel ou sur les abeilles et débris de la ruche. Ceci en fait est obtenu à travers les résultats du 2^{ème} rucher ou les tests microbiologiques ont détectés deux ruches contaminées par la bactérie. Lindström *et al.* (2008) ont montré qu'une colonie peut présenter de grandes quantités de spores par abeille adulte sans présenter de signes cliniques de la loque américaine.

L'apparition de la forme clinique de la maladie dépend de plusieurs facteurs : le niveau de contamination, la virulence de la souche de *Paenibacilluslarvae* et le développement ou non d'une forme de tolérance d'abeilles atteinte par la maladie (Ritter, 2003)

Dans des colonies ne présentant pas de symptôme clinique de la maladie, des spores du pathogène peuvent être détectées dans des échantillons d'abeilles adultes (Nordström *et al.* 2002). Ainsi, les charges de spores sur les abeilles adultes permettent la quantification de la transmission de pathogènes entre colonies (Fries *et al.*, 2006). Les résultats présentés par Lindström (2007) suggèrent fortement que les échantillons des abeilles adultes des colonies individuelles sont très efficaces pour détecter cliniquement colonies malades. Ce même auteur en 2005 a noté l'importance du miel comme réservoir à spores de *Paenibacilluslarvae* à l'intérieur de la colonie. Pernal et Currie (2000) rapportent que la détection de la bactérie dans le miel est la méthode la plus efficace pour le diagnostic de la pathologie. Contrairement à Nguyen *et al* (2009) qui rapportent uniquement un taux de 20 % de détection de la loque dans les colonies avec symptômes dans les échantillons du miel.

Les résultats présentés par Fries et Nordström(2001) signalent que des échantillons d'abeilles prélevés sur les cadres du couvain sont plus sensibles que l'utilisation d'échantillons de miel recueillies de la même région. Bzdil (2007) rapporte que l'utilisation du toluène peut tuer une partie de sporulée de micro-organismes dans l'un des étages de sporulation. Il est également possible que des résidus de toluène sur les plaques de milieux de culture agar influencent négativement l'activité de germination

et de la croissance des micro-organismes. Ces effets peuvent diminuer les chances de détecter la bactérie dans les échantillons de cire.

Kiliç *et al* (2010), ont étudiés 100 échantillons de miel et de cire d'abeilles à la fois par la méthode microbiologique et la PCR, *Paenibacilluslarvae* était identifiée dans (7%) des échantillons par la méthode de culture et dans (8%) des échantillons par la méthode de PCR. Nordströmet *al* (2002), signalent que parmi 20 échantillons de miels de Suède récoltés à partir des colonies cliniquement malade, un échantillon de miel était négatif pour *Paenibacilluslarvae* et 19 étaient positifs (95%) et Parmi 162 échantillons de miels récoltés à partir des colonies saines, 11 étaient positifs pour *Paenibacilluslarvae* (6,7%).

Dans une étude conduite dans les colonies sans symptômes de loque américaine, il y avait beaucoup plus d'échantillons d'abeilles qui ont été testés positifs pour *Paenibacilluslarvae* comparés à des échantillons de miel des mêmes colonies (Fries et Nordström, 2001). Selon Lindström (2007) le nombre d'abeilles nécessaire pour une détection efficace de la loque dans une colonie doit être supérieur à 200. Cette même étude rapporte qu'il existe une forte corrélation entre le nombre d'unités formant des colonies et la proportion d'abeilles positifs.

CONCLUSION

Le test nous permet de conclure que les abeilles et le miel sont les plus favorables pour la détection de la bactérie *Paenibacilluslarvae*, Les résultats obtenus ont permis de détecter la bactérie dans les débris de la ruche. Ce résultat nous renseigne sur l'importance de nettoyage par l'apiculteur de ces colonies pour limiter la propagation de la pathologie aux autres ruches et ruchers. Il est nécessaire à l'avenir de tester d'autres milieux de culture pour pouvoir déterminer la méthode la plus fiable et la plus simple dans la détection.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Adjlane N, Doumandji S.E, et Haddad N, (2012).** *Situation de l'apiculture en Algérie : facteurs menaçant la survie des colonies d'abeilles locales Apis mellifera intermissa. CahAgric 21 : 235-241.*
- Adjlane. N, et Doumandji S.E. (2011)** *La varroase : Biologie, diagnostic et traitement ; Situation actuelle de la varroase en Algérie. Revue Pratique Vétérinaire 9 : 8-11*
- Bzdil J. (2007)** *Detection of Paenibacillus larvae Spores in the Debris and Wax of Honey Bee by the Tween 80 Method. ACTA VET. BRNO, 76: 643-648.*
- De Graaf D.C., Vandekerchove D., Dobbelaere W., Peeters J.E., et Jacobs F.J (2001).** *Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of Paenibacillus larvae spores in Belgian honey. Apidologie, 2001, 32, 587-599.*
- Dingman D. W, et .Stahly D.P. (1983).** *Medium promoting sporulation of Bacillus larvae and metabolism of medium components. Appl. Environ. Microbiol. 46, 860–869.*
- Fries I., Imdorf A., et Rosenkranz P. (2006).** *Survival of mite infested (Varroa destructor) honey bee (Apis mellifera) colonies in a Nordic climate, Apidologie. 37, 564–570.*
- Fries I. et Nordström S. (2001).** *Examination of honey and adult bees for early detection of paenibacillus larvae larvae proceedings of the 37th international apicultural congress .durban, south africa apimondia .*
- Gochnauer T.A, et Corner J. (1987).** *Detection and identification of Bacillus larvae in a commercial pollen sample. J. Apic. Res. 13, 264-267.*
- Gochnauer T. A. (1981).** *The distribution of Bacillus larvae spores in the environs of colonies infected with American foulbrood disease. Am. Bee J. 121: 332-336.*
- Gregorc A., et Bowen I.D .(1998).** *Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (Apis mellifera L.) after infection with Bacillus larvae, the causative agent of American foulbrood disease, Cell Biol. Int. 22, 137–144*

Hornitzky M.A.Z. et Wilson S.C. (1989). A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honey bees. *J. Apicult. Res.* 28, 191-195.

Kiliç A., Simsek H., et Kalender H. (2010). Detection of American Foulbrood Disease (*Paenibacillus larvae*) By the PCR and Culture *Kafkas Univ Vet Fak Derg RESEARCH ARTICLE* 16 (5): 841-845.

Lindström A., Korpela S., et Fries I. (2008). The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Invertebr. Pathol.*, DOI: 10.1016/j.jip.2008.06.010.

Lindström A. (2007). Distribution of *Paenibacillus larvae* Spores Among Adult Honey Bees (*Apis mellifera*) and the Relationship with Clinical Symptoms of American Foulbrood *Microb Ecol* 54(4) : 67-77.

Lindström A. et Fries I. (2005). Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Apicult. Res.*, 44 (2), 82-86.

Nguyen B.K. Haubruge E., et Saegerman C. (2009). Etude sur la contamination des miels par *Paenibacillus larvae* en Région wallonne et relation avec l'expression clinique de la loque américaine dans les colonies d'abeilles domestiques. Article original .219-220.

Nordström S., Forsgren E., et Fries I. (2002). Comparative diagnosis of American foulbrood using samples of adult honey bees and honey. *J. Apic. Sci.* 46, 5–12.

Pernal S.F. et Currie R.W. (2000). Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie.* 31, 387-409.

Ritter W. (2003). Early detection of American Foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta.* 38, 125-130.

Shimanuki H. et Knox D.A. (1988). Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *Am. Bee J.*, 128, 353-354.

Titera D., et Haklova M. (2003). Detection method of *Paenibacillus larvae* larvae from beehive winter debris. *Apiacta.* 38, 131–133.