

NOZEVIT +

GM202 | GM203 | GM204

Fiche technique

MAJ : 05/07/24

PRÉSENTATION

Nozevit + est la nouvelle formule du célèbre aliment complémentaire Nozevit. Il est enrichi en huiles essentielles et acide citrique. Avec sa formule 100% naturelle, il respecte les abeilles et l'environnement. Il agit sur le microbiote intestinal pour contribuer au développement harmonieux des colonies et renforce les défenses immunitaires.



AVANTAGES

Rôle bénéfique sur le microbiote intestinal des colonies :

- Les huiles essentielles améliorent la résistance des abeilles et les calment lorsque vous les visitez.
- L'acide citrique est un acide organique faible qui stabilise le pH intestinal et améliore la digestion, ce qui aide les abeilles à se rétablir plus rapidement.
- Testé comme traitement préventive et curatif contre la nosérose, il réduit significativement le nombre de spores*.
- Ingrédients naturels.
- Ne laisse pas de résidus dans le miel/la cire.

CARACTÉRISTIQUES TECHNIQUES

Composition :

Écorce de plantes, huile de menthe poivrée, eau purifiée

Constituants analytiques :

0,84% protéines, <0,1% fibres, 0,13% cendres, <0,1% graisse, 111 mg/kg calcium, 112 mg/kg sodium, 64,4 mg/kg magnésium. Additifs technologiques : acide citrique (E330)

*article paru dans dans l'American Bee Journal - mai 2009 (ci-après)

CONSEIL D'UTILISATION

Nozevit+ doit être administré 4 fois par an :

- Deux fois au printemps, lorsque les abeilles commencent à sortir,
- Deux fois en automne, avant l'hivernage.

Le dosage est de 1 ml (20 gouttes) par ruche. Il peut être administré par l'une des trois manières suivantes :

- La quantité de 1 ml doit être diluée dans une petite dose de 200 ml de sirop et placée dans le nourrisseur. Il est préférable de ne pas diluer Nozevit + dans une dose supérieure de sirop de nourrissage. Il est inutile de surdoser le produit dans une quantité supérieure de sirop (bien qu'aucun effet délétère sur la colonie ne puisse arriver).
- En galette de pollen ou de candi : ajouter 1 ml de Nozevit+ pour 500 g de galette,
- Par pulvérisation : ajouter 1 ml de Nozevit+ dans 200 ml de sirop de sucre et pulvériser les abeilles dans la ruche.

Quel que soit le mode d'utilisation, cette opération doit être renouvelée 10 jours plus tard.

Cette intervention est distincte d'une visite de nourrissage.

CONDITIONNEMENT

Nozevit+ 1000ml	GM202
Nozevit+ 500 ml	GM203
Nozevit+ 50 ml	GM204

Traitement expérimental de la nosérose par le "Nozevit". Préparation phytopharmacologique

par Ivana Tlak Gajger*, Zdravko Petrincec, Ljiljana Pinter, Zvonimir Kozarić

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Zagreb, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Croatie E-mail : ivana.tlak@vef.hr

Résumé

La maladie de Nosema est une maladie parasitaire microsporidienne de *Nosema sp.* qui touche les abeilles adultes. La maladie est répandue dans le monde entier et entraîne des pertes importantes pour l'apiculture et l'économie en général. Les réglementations européennes et croates interdisent l'utilisation d'antibiotiques dans le traitement des maladies des abeilles, en raison du développement possible d'une résistance aux agents chimiothérapeutiques utilisés, du masquage de la maladie, des rechutes possibles, ainsi que des résidus d'antibiotiques nocifs ou de leurs métabolites secondaires dans les produits apicoles. Par conséquent, la production et l'utilisation de préparations phytopharmacologiques naturelles dans le traitement de la maladie de Nosema est une nécessité. L'objectif de cette recherche était de tester l'efficacité de la préparation à base de plantes "Nozevit" en tant que mesure préventive contre l'infection artificielle par les spores de *N. apis*, ainsi que son effet curatif dans le traitement des abeilles affectées par la maladie de *Nosema*.

INTRODUCTION

La maladie de Nosema ou nosérose est une maladie parasitaire de l'abeille domestique adulte (*Apis mellifera*) causée par la microsporidie *Nosema sp.* qui, dans des conditions de vie défavorables, forme de longs foyers d'infection.

spores vivantes. La maladie est présente dans le monde entier, y compris en Croatie, et elle est à l'origine d'importantes pertes de production de miel et de pertes économiques. Les pertes se manifestent par une diminution des rendements en miel et autres produits apicoles (Anderson et Giacon, 1992), ainsi que par une mauvaise qualité et une diminution des rendements en agriculture. Les abeilles mellifères atteintes de nosérose commencent à butiner plus tôt (Fries, 1995), tandis que les changements pathologiques des cellules épithéliales de l'intestin moyen, ainsi que les troubles digestifs et métaboliques (Hassanein, 1951), provoquent la malnutrition (Muresan et al., 1975) et entraînent des morts prématurées (Morse et Nowogrodzki, 1990). La nosérose est une maladie importante qui échappe souvent à l'attention des apiculteurs. Les abeilles affectées ont tendance à mourir d'épuisement loin de la ruche et, faute de signes évidents, la maladie peut être difficile à détecter. C'est pourquoi elle est souvent appelée "le tueur silencieux" (Hornitzky, 2005).

Les colonies d'abeilles peuvent survivre à l'hiver, affaiblies par la nosérose, et peuvent être atteintes de la maladie silencieuse au printemps, ce qui conduit à une maladie chronique qui s'étend à l'ensemble de la saison de butinage. Par conséquent, le diagnostic et le contrôle de la maladie sont d'une grande importance pour l'économie et l'élevage de tout pays. La maladie affecte des colonies entières d'abeilles, ainsi que leurs membres, les faux-bourçons et les reines étant aussi vulnérables que les abeilles ouvrières (Bailey, 1972). Les reines d'abeilles atteintes meurent souvent pendant l'hiver, lorsque les conditions ne sont pas réunies pour le développement d'une nouvelle reine, ce qui conduit finalement à l'effondrement de la colonie. La maladie Nosema se développe et se propage particulièrement rapidement en hiver, lorsque les vols de nettoyage des abeilles sont empêchés par de mauvaises conditions météorologiques. Les excréments de la reine, qui défèque dans la ruche, sont un facteur important de transmission de la maladie au sein d'une colonie d'abeilles (Peroutka et Vasely, 1976 ; Sulimanović et al., 1995). C'est pourquoi la République de Croatie a adopté il y a plusieurs années une ordonnance autorisant l'élevage de reines d'abeilles destinées à la vente uniquement dans des ruchers soumis à un contrôle vétérinaire et sanitaire (Anon, 2008a).

La maladie de Nosema affecte négativement le développement du corps gras-protéique ainsi que les niveaux de protéines et d'acides gras dans l'hémolymphe de l'abeille (Bailey et Ball, 1991). Les niveaux de protéines et d'acides gras dans l'hémolymphe sont réduits, ce qui entraîne un manque de développement de la glande lactifère et une mauvaise nutrition du couvain, ce qui retarde et entrave le développement des colonies d'abeilles. Le couvain des colonies d'abeilles fortement touchées est plus sensible à d'autres maladies, en particulier la maladie de la pyrale (Sulimanović et al., 1995).

La maladie de Nosema peut être suspectée lorsqu'un grand nombre d'abeilles mortes sont trouvées sur le plateau inférieur de la ruche pendant l'hiver, ou lorsque l'affaiblissement de la colonie d'abeilles, la perte de la reine et les fèces sont des signes de la maladie.

Tableau 1. Nombre de spores (par 0,04 mm) sur 10th, 15th et 22nd jour après l'invasion artificielle initiale. Diviser le nombre de spores par 4 pour obtenir des millions de spores par abeille.

Preventive treatment of Nosema disease with Nozevit phytopharmacological preparation			
Test No. 1	10 th day after artificial infection	15 th day after artificial infection	22 nd day after artificial infection
A	0.00	0.00	0.00
B Mean	5.80	21.60	75.10
Min	3.00	13.00	59.00
Max	10.00	28.00	97.00
Lower quartile	4.00	16.00	68.00
Upper quartile	7.00	26.00	84.00
Std. Dev.	2.34	5.3	12.12
C Mean	11.90	42.80	105.90
Min	5.00	31.00	86.00
Max	17.00	60.00	132.00
Lower quartile	7.00	34.00	95.00
Upper quartile	16.00	49.00	123.00
Std. Dev.	4.48	9.6	15.96

(A = control group, B = sugar solution + spores of *Nosema apis* + „Nozevit“, C = sugar solution + spores of *Nosema apis*)

Tableau 2. Nombre de spores (par 0,04 mm) sur 15th, 20th et 25th jour après le traitement initial avec "Nozevit". Diviser le nombre de spores par 4 pour obtenir des millions de spores par abeille.

Curative treatment of Nosema disease with "Nozevit" phyto-pharmacological preparation			
Test No. 2	15 th day after treatment with "Nozevit"	20 th day after treatment with "Nozevit"	25 th day after treatment with "Nozevit"
A	0.00	0.00	0.00
B Mean	57.20	27.70	6.10
Min	41.00	16.00	3.00
Max	81.00	41.00	9.00
Lower quartile	44.00	20.00	5.00
Upper quartile	70.00	34.00	8.00
Std. Dev.	13.54	8.32	1.85
C Mean	73.00	36.70	25.50
Min	66.00	33.00	21.00
Max	83.00	42.00	32.00
Lower quartile	68.00	34.00	24.00
Upper quartile	76.00	38.00	27.00
Std. Dev.	6.05	2.75	3.17

(A = control group, B = sugar solution + "Nozevit", C = sugar solution + "Nozevit")

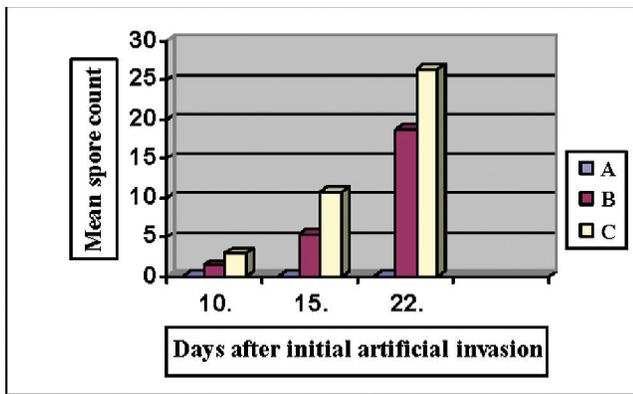


Figure 1. Nombre moyen de spores (millions de spores par abeille) les 10th, 15th et 22nd jours après l'infection artificielle initiale.

des marques sur les cadres et à l'entrée de la ruche sont observées. Toutefois, les signes observés sur des abeilles individuelles et/ou des colonies d'abeilles ne sont pas des indicateurs fiables de la présence de la maladie. La maladie de Nosema ne peut être identifiée avec certitude que sur la base d'un examen en laboratoire des pertes hivernales d'abeilles, et en particulier au moyen d'un examen microscopique des spores de *N. apis* dans le tube digestif, ainsi que par des méthodes moléculaires (RFLP - restriction fragment length polymorphism, PCR - avec des amorces spécifiques à l'espèce, PCR en temps réel - quantitative). La présence de spores pathogènes peut être identifiée avec certitude chez les abeilles d'hiver dont les fèces restent longtemps dans les intestins. La période de collecte des échantillons, tant sur les pertes hivernales que sur les abeilles vivantes, dépend du climat et des conditions météorologiques, mais elle diffère également d'une année à l'autre. Sur la base des moyennes croates, les mois de janvier et février ont été déterminés comme les périodes les plus favorables pour l'échantillonnage (Matašin et al., 2007).

Les spores pénètrent dans le tube digestif des abeilles par l'intermédiaire d'aliments et de boissons infectés ou à l'occasion d'échanges sociaux de nourriture avec d'autres abeilles. Les sources d'infection les plus courantes sont l'approvisionnement en eau insalubre, les rayons de miel marqués par les fèces d'abeilles infectées et le miel contaminé (Sulimanović et al., 1995). Les facteurs favorisant la propagation de la maladie sont les vols dans les colonies d'abeilles et les mauvaises pratiques apicoles dans le rucher, ainsi que les fluctuations soudaines de température, les mauvais pâturages, les perturbations et les déplacements fréquents des colonies d'abeilles.

Selon Laere (1977), après avoir atteint l'intestin moyen, les spores de *N. apis* germent sous l'influence de divers stimuli chimiques et leur forme végétative envahit les cellules épithéliales de l'intestin moyen où elles se multiplient. Liu (1984) a montré que des processus dégénératifs et lytiques se produisent dans les cellules envahies. Avec le temps, en raison de l'accumulation de pathogènes dans les cellules, la pression osmotique augmente et provoque l'éclatement des membranes cellulaires. Une partie des spores est expulsée des cellules épithéliales détruites de l'intestin par les excréments et une autre partie reste dans la lumière où elle prend une forme végétative et envahit les cellules épithéliales précédemment saines du milieu de l'intestin. En moyenne, cette auto-infection se produit six jours après l'infection initiale par le parasite, et la majorité des spores sont expulsées deux semaines après le début de la maladie (Bailey et Ball, 1991). Les troubles de la digestion sont le résultat de la destruction de l'intestin moyen, tandis que la membrane péritrophique endommagée augmente la sensibilité à la maladie de Nosema. La dégénérescence des cellules épithéliales empêche l'absorption des nutriments, de sorte que la nourriture ne fait que passer à travers les intestins affectés. En outre, l'absence de granules et l'accumulation de ribosomes dans les cellules infectées indiquent que l'excrétion des enzymes digestives est réduite (Liu, 1984). Par conséquent, les abeilles sont constamment affamées et prennent de plus grandes quantités de nourriture, qui s'accumule dans leur rectum sous forme de matières fécales sucrées infectées par des spores. Les signes tels que la marche excentrée, les battements d'ailes et parfois la mort massive des abeilles à l'entrée de la ruche ne sont généralement détectés que lorsqu'un grand nombre d'abeilles de la colonie sont infectées. L'abdomen de certaines abeilles peut être élargi (Somerville, 2002) et une dissection minutieuse permet d'exposer un intestin moyen dilaté aux parois minces, de couleur blanc laiteux et rempli d'excréments pâles (Shimanuki et al., 1992).

L'UE et la réglementation croate interdisent l'utilisation d'antibiotiques dans le traitement des maladies des abeilles (UE 3/01/081) en raison de

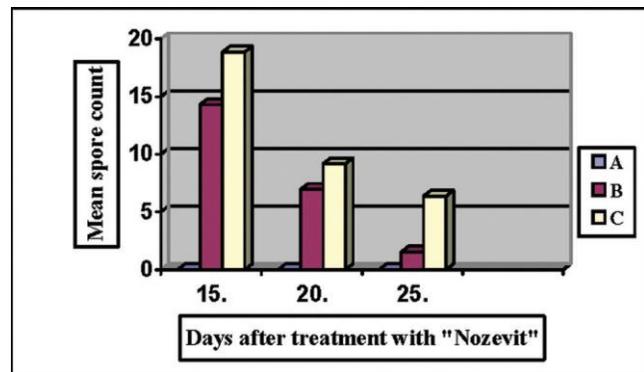


Figure 2. Nombre moyen de spores (millions de spores par abeille) à 15th, 20th et 25th jour après le traitement avec "Nozevit".

le développement potentiel d'une résistance aux produits chimiothérapeutiques utilisés, le masquage de la maladie, les rechutes possibles, ainsi que les résidus nocifs d'antibiotiques et de leurs métabolites secondaires dans les produits apicoles. C'est pourquoi il est nécessaire de produire et d'utiliser des préparations phytopharmacologiques naturelles pour traiter la maladie de Nosema. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'efficacité de la préparation phytopharmacologique "Nozevit" en tant que mesure préventive lors d'une invasion artificielle par des spores de *N. apis*, ainsi que son efficacité dans le traitement des colonies d'abeilles affectées par la maladie de Nosema. En outre, la structure de l'intestin moyen a été analysée histologiquement afin de déterminer le mécanisme d'action de la préparation testée.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Les spores de *N. apis* ont été isolées à partir de l'échantillon collectif positif des pertes hivernales, soumis à l'examen du laboratoire conformément aux dispositions en vigueur. Pour obtenir les spores, nous avons séparé les abdomens et les avons broyés dans un mortier en ajoutant 1 ml d'eau par abeille. Le matériel broyé a été filtré à travers une mousseline et le filtrat a été centrifugé pendant dix minutes à 3000 rpm (Anon, 2008b). Le surnageant a été séparé à l'aide d'une pipette et utilisé pour l'infection artificielle des colonies d'abeilles. Le nombre de spores a été déterminé par comptage dans un hémocytomètre, selon Bürker - Türk (Cantwell, 1970).

Avant le test, nous avons prélevé 30 abeilles par colonie à l'entrée de la ruche et les avons examinées au microscope pour détecter la présence de spores de *N. apis*.

Nous avons utilisé trois groupes de colonies d'abeilles :

- Le groupe de contrôle est nourri de façon stimulante avec une solution de sucre 1:1. (A)
- Le groupe de test artificiellement infecté par des spores de *N. apis* en suspension dans l'eau.

et traités simultanément de manière préventive avec Nozevit. (B)

- Le groupe test est artificiellement infecté par la suspension de spores de *N. apis*. (C)

Test n° 1 :

Des groupes de colonies d'abeilles (B, C) ont été infectés avec une suspension de spores de *N. apis* (40,1 x 10 spores par 1 ml) dans une solution de sucre 1:1 préparée avec de l'eau. Dix ml de la suspension ont été mélangés à un demi-litre de solution sucrée (C) et 20 gouttes de Nozevit (B) ont été ajoutées, après quoi les colonies d'abeilles ont été nourries avec le mélange pendant cinq jours consécutifs. Au lieu de la suspension de spores de *N. apis*, le groupe de contrôle a été nourri avec le mélange pendant cinq jours consécutifs.

(A) ont reçu une quantité égale d'eau ajoutée à la solution de sucre. Les mélanges pour les différents groupes ont été préparés immédiatement avant d'être placés dans le nourrisseur situé sous le toit de la ruche.

Des échantillons ont été prélevés sur environ 60 abeilles adultes (Anon, 2008b) à l'entrée de la ruche les 10e, 15e et 22e jours après l'infection artificielle et la présence de spores de *N. apis* a été vérifiée à l'aide d'un microscope. Les échantillons d'abeilles ont été collectés dans des récipients en plastique propres vers midi. Les abeilles ont été comptées dans chaque échantillon, leurs abdomens

ont été séparés et 1 ml d'eau par abeille a été ajouté. Les abdomens ont été soigneusement écrasés. Quatre échantillons de spores ont été comptés dans chaque échantillon à l'aide d'un hémocytomètre selon Bürker - Türk, et la dose infectieuse a été calculée selon Cantwell (1970). Nous avons utilisé un grossissement de 400x au microscope à champ clair OlympusBx41 et pris des photos avec l'appareil photo Olympus DP12 U -TVO. Le matériel de comptage a été soigneusement lavé après chaque comptage d'échantillon afin d'éviter la contamination par les spores de l'échantillon précédent.

Test n° 2 :

Les groupes test (B, C) et le groupe témoin (A) du test précédent ont été utilisés pour évaluer l'efficacité du traitement de la nosérose avec la préparation phytopharmacologique Nozevit. Un mélange d'un demi-litre de solution sucrée 1:1 et de 20 gouttes de Nozevit a été administré aux groupes test (B, C). Le traitement a été répété quatre fois à des intervalles de quatre jours. Le groupe témoin (A) a reçu une solution sucrée. Les 15e, 20e et 25e jours après le début du traitement (ou les 36e, 40e et 47e jours après l'infection artificielle), nous avons prélevé des échantillons d'environ 60 abeilles adultes à l'entrée de la ruche (Anon, 2008b) et les avons examinés au microscope pour détecter la présence de spores de *N. apis*. Les procédures d'échantillonnage et la méthode d'extermination en laboratoire étaient les mêmes que pour l'essai 1.

Des échantillons pour les préparations histologiques ont été prélevés sur trois groupes d'abeilles :

- Abeilles non infectées
- Abeilles atteintes de la maladie de Nosema et traitées avec Nozevit.
- Abeilles atteintes de la maladie de Nosema

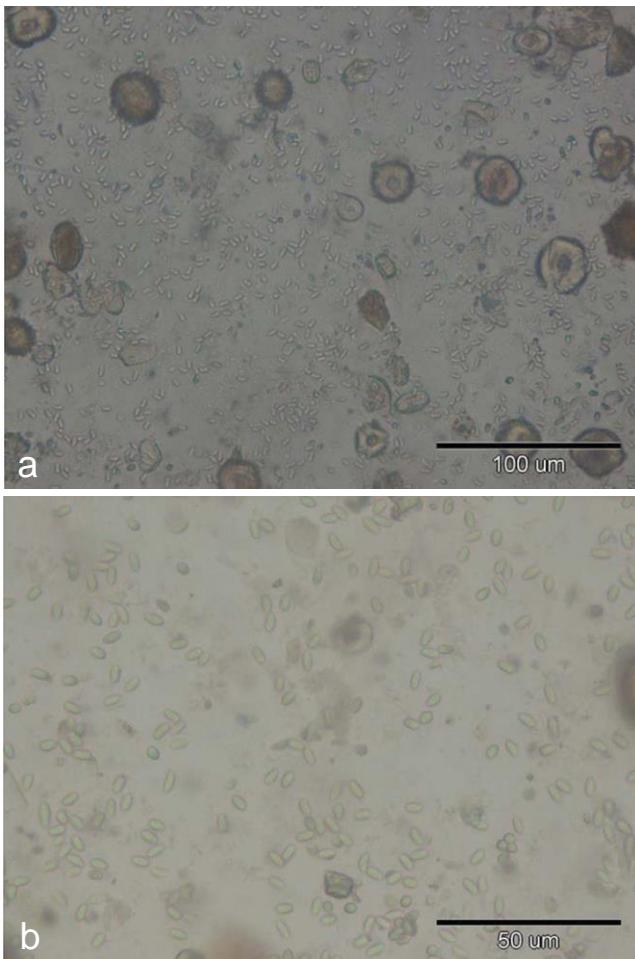


Figure 3. Spores de *N. apis* (a, b) sous microscope à champ clair Olympus Bx41, photographies prises avec Olympus DP12 U -TVO.

Vingt abeilles ont été prélevées dans chaque groupe et les intestins de chaque abeille ont été prélevés. Pour ce faire, une grande paire de pinces a été utilisée pour tenir la tête et la poitrine de chaque abeille, et une plus petite paire de pinces pour tenir le sommet du dernier segment abdominal et extraire soigneusement les intestins. Les intestins ont été fixés dans une solution de formaldéhyde à 4 %, insérés dans des blocs de paraffine, coupés à l'aide d'un microtome en sections de 6 µm d'épaisseur et colorés selon la méthode Hemalaon-Eozinic (HE) (Roulet, 1948).

Tous les calculs et les tests de signification des différences ont été effectués à l'aide du logiciel Statistica Release 8.

RÉSULTATS

Les spores pour l'infection artificielle des abeilles ont été isolées à partir de l'échantillon groupé d'abeilles positives à *N. apis* (40,1 x 10 spores par 1 ml). Le test de présence de spores de *N. apis* avant l'étude a donné des résultats négatifs dans les trois groupes (A, B, C). L'infection artificielle avec les résultats de l'examen microscopique de la présence de spores aux 10e, 15e et 22e jours après l'infection artificielle sont présentés dans le tableau 1 et la figure 1. Les résultats du traitement "Nozevit" aux 15e, 20e et 25e jours après son introduction (ou aux 36e, 40e et 47e jours après l'invasion artificielle) sont présentés dans le tableau 2 et la figure 2. Une différence statistiquement significative a été trouvée pour le traitement préventif dans le groupe B le 22e jour ($p < 0,05$), par rapport au 10^e jour après l'infection artificielle avec des spores de *N. apis*.

Les résultats des examens histologiques sont présentés dans les figures 4 à 8.

DISCUSSION

La nosérose est une maladie parasitaire affectant les abeilles adultes. En raison de ses signes discrets et de la nécessité de l'éradiquer par l'échange de cadres avec du couvain dans une ruche désinfectée, les apiculteurs accordent une attention insuffisante à la maladie ou la négligent souvent. L'UE interdisant l'utilisation d'antibiotiques, il semble nécessaire d'introduire des préparations à base de plantes dans le traitement de la maladie Nosema.

Le but de notre étude était de déterminer l'efficacité de la préparation phytopharmacologique "Nozevit" après des traitements préventifs et curatifs répétés des abeilles atteintes de la maladie. L'étude a porté sur des colonies d'abeilles élevées dans un rucher d'essai à échelle réduite. Elle a été divisée en deux parties afin de déterminer tout d'abord la performance préventive de "Nozevit", c'est-à-dire sa capacité à inhiber l'infection par le virus de la grippe aviaire.

N. apis, puis de déterminer l'efficacité de la préparation dans le traitement des colonies affectées. Nous avons supposé qu'une étude préliminaire à petite échelle démontrerait si "Nozevit" a le potentiel pour traiter efficacement les colonies d'abeilles souffrant de la maladie Nosema. Dans la première partie de l'étude, concernant l'activité préventive de "Nozevit", nous avons utilisé trois groupes de colonies d'abeilles, à savoir : le groupe de contrôle (A) qui était exempt de spores de *N. apis* et qui n'a pas été traité par "Nozevit".

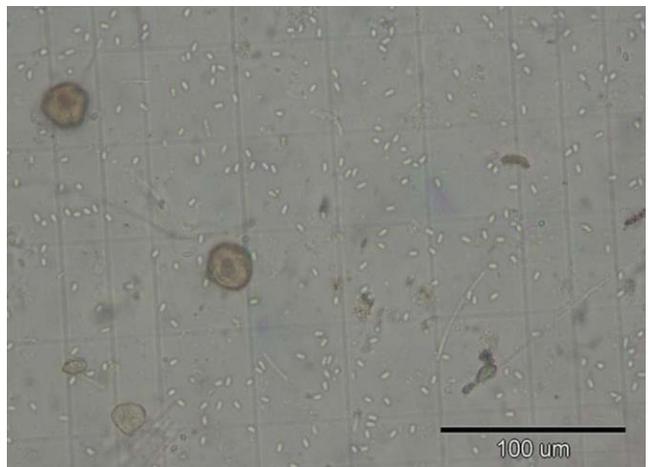


Figure 4. Spores de *N. apis* sur la grille de l'hémocytomètre, selon Bürker - Türk, à un grossissement de 400x au microscope à champ clair Olympus Bx41, photographes pris avec Olympus DP12 U -TVO.

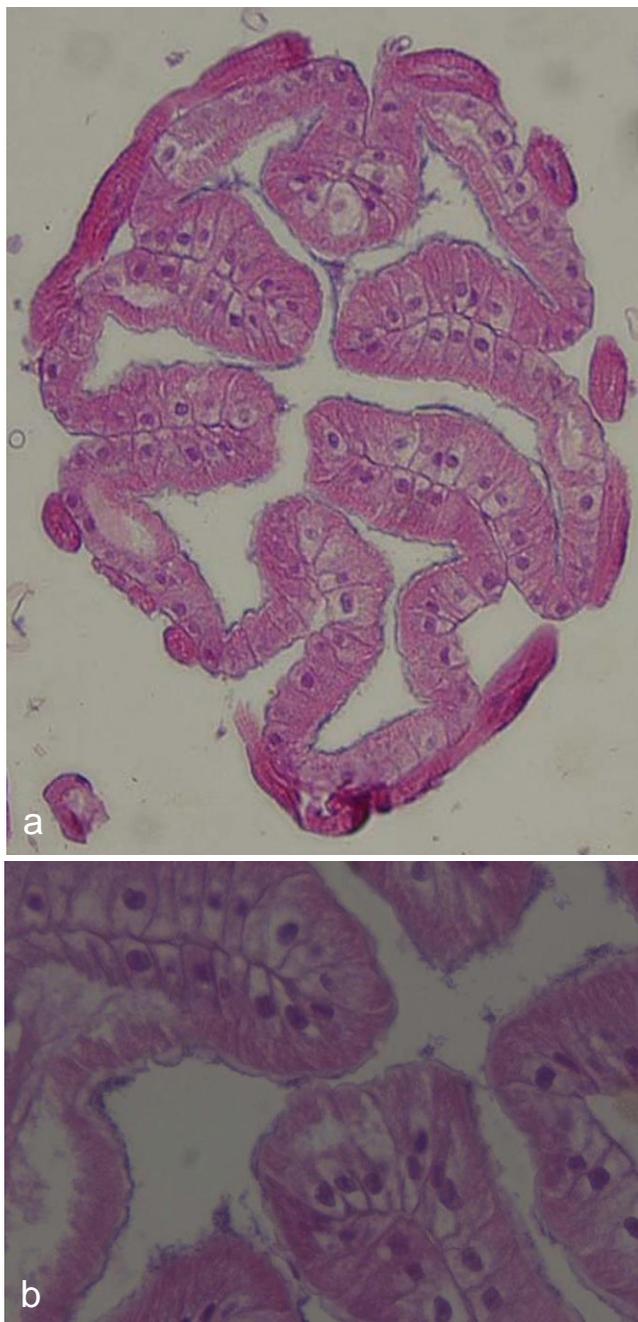


Figure 5. Partie médiane de l'intestin d'une abeille non infectée (a, b), sous le microscope à fond clair Olympus Bx41, photo-graphes pris avec Olympus DP12 U -TVO.

traité avec "Nozevit" ; le groupe test (B) qui a été artificiellement infecté par des spores et simultanément traité avec "Nozevit" ; et le groupe test (C) qui a été artificiellement infecté par les spores.

Les résultats de cette partie de notre étude ont démontré que la maladie n'a pas été évitée dans les colonies d'abeilles testées. Cependant, en comparaison avec le groupe (C), qui n'a pas été traité, une réduction considérable des spores a été obtenue (48,73 % le 10^e jour^{ab} ; 50,46 % le 15^e jour^{ab} et 70,91 % le 22^e jour^{ad} après l'infection artificielle avec des spores de *N. apis*). Les résultats de la deuxième partie de l'étude ont montré que le traitement avec "Nozevit" n'a pas réussi à éliminer les spores de *N. apis*, c'est-à-dire que la colonie d'abeilles infectée par la maladie Nosema n'a pas été complètement guérie. Malgré l'échec de la guérison complète, il faut souligner que le groupe traité avec "Nozevit" dès le début de notre étude, d'abord préventivement et ensuite curativement, avait un nombre réduit de spores par rapport au groupe qui a reçu le traitement préventif et curatif.

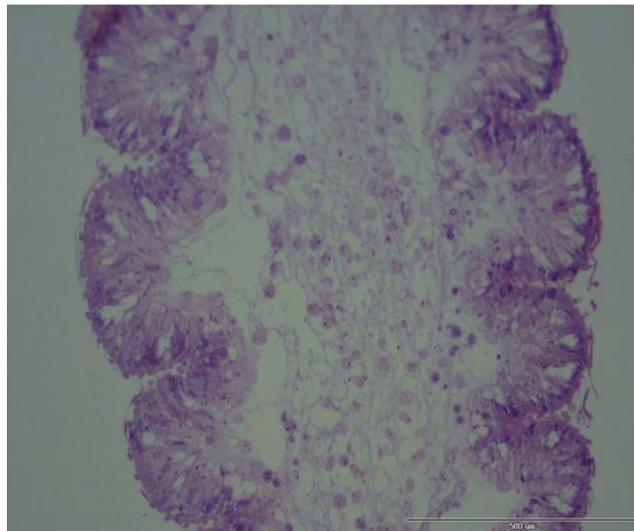


Figure 6. Partie moyenne de l'intestin d'une abeille infectée par des spores de *N. apis*, non traitée, à un grossissement de 100x sous le microscope à champ clair Olympus Bx41, photographies prises avec Olympus DP12 U -TVO.

Les abeilles ont été nourries avec la solution sucrée additionnée de "Nozevit" uniquement à des fins curatives et comparées au nombre de spores comptées au début du traitement (78,37 % le 15^e ; 75,47 % le 20^e et 23,92 % le 25^e jour après le traitement curatif). On a également observé que les abeilles nourries avec une solution sucrée à laquelle on a ajouté du "Nozevit" ont consommé la nourriture offerte deux fois plus rapidement que celles nourries uniquement avec une solution sucrée (*observation personnelle*). Notre intention était d'assurer une présence constante de la préparation phyto-pharmacologique dans les intestins des abeilles testées en utilisant continuellement "Nozevit", d'abord à titre préventif pendant cinq jours, puis à titre curatif quatre fois à des intervalles de quatre jours. Cependant, le mode d'administration n'était peut-être pas approprié, de sorte que toutes les abeilles n'ont pas reçu uniformément une dose suffisante. Oliver (2008) a testé l'activité de la même préparation en utilisant la méthode du "drench", qui permet à chaque abeille de recevoir une partie de la préparation à base de plantes en raison de son comportement social. Cette méthode consiste à prélever tout le sirop de sucre imbibé et à le partager "de proboscis" à proboscis", de sorte que la substance active puisse être répandue dans l'ensemble de la colonie d'abeilles avec un stockage minimal dans les rayons de miel. Il pensait cependant que la dose donnée de la préparation était insuffisante et que, par conséquent, les abeilles affamées ne pouvaient pas stocker suffisamment de préparation pour assurer un apport continu de la dose dans leurs intestins entre les traitements.

N. ceranae n'a pas été déterminée en Croatie à ce jour, mais elle pourrait être présente dans les infections mixtes car un pourcentage élevé de spores de *Nosema* a été détecté également pendant l'été, et parce qu'il a été diagnostiqué dans certains pays voisins. Toutefois, cette hypothèse doit être confirmée par des méthodes moléculaires (Fries et al., 2006 ; Martin - Hernandez et al., 2007).

Etant donné que l'étude préliminaire de l'efficacité de "Nozevit" a été réalisée sur un petit nombre de colonies d'abeilles, les résultats ne peuvent pas être considérés comme concluants. Etant donné qu'une réduction considérable du nombre de spores a été obtenue dans les colonies d'abeilles traitées, une étude à grande échelle devrait être réalisée dans un rucher de production. En outre, le nombre de spores de *Nosema* et la dose d'invasion devraient être testés sur une plus longue période. Il est également nécessaire de déterminer la dose optimale par colonie d'abeilles, la fréquence des traitements et le nombre total de traitements nécessaires à la guérison. Actuellement, le fabricant recommande de pulvériser 15 à 20 gouttes de "Nozevit" sur les abeilles, de les ajouter à une solution de sucre ou de les mélanger à un pain de miel et de sucre pour compléter l'alimentation stimulante. Le traitement doit être effectué deux ou trois fois à des intervalles de 10 jours pendant les mois d'été. Jusqu'à présent, aucun rapport n'a fait état de toxicité ou de résidus nocifs éventuels dans le miel ou d'autres produits apicoles. La possibilité de concentrer la préparation a été testée en dissolvant l'extrait de plantes dans une quantité d'eau deux fois plus petite (Manger 2008, *commentaire personnel*).

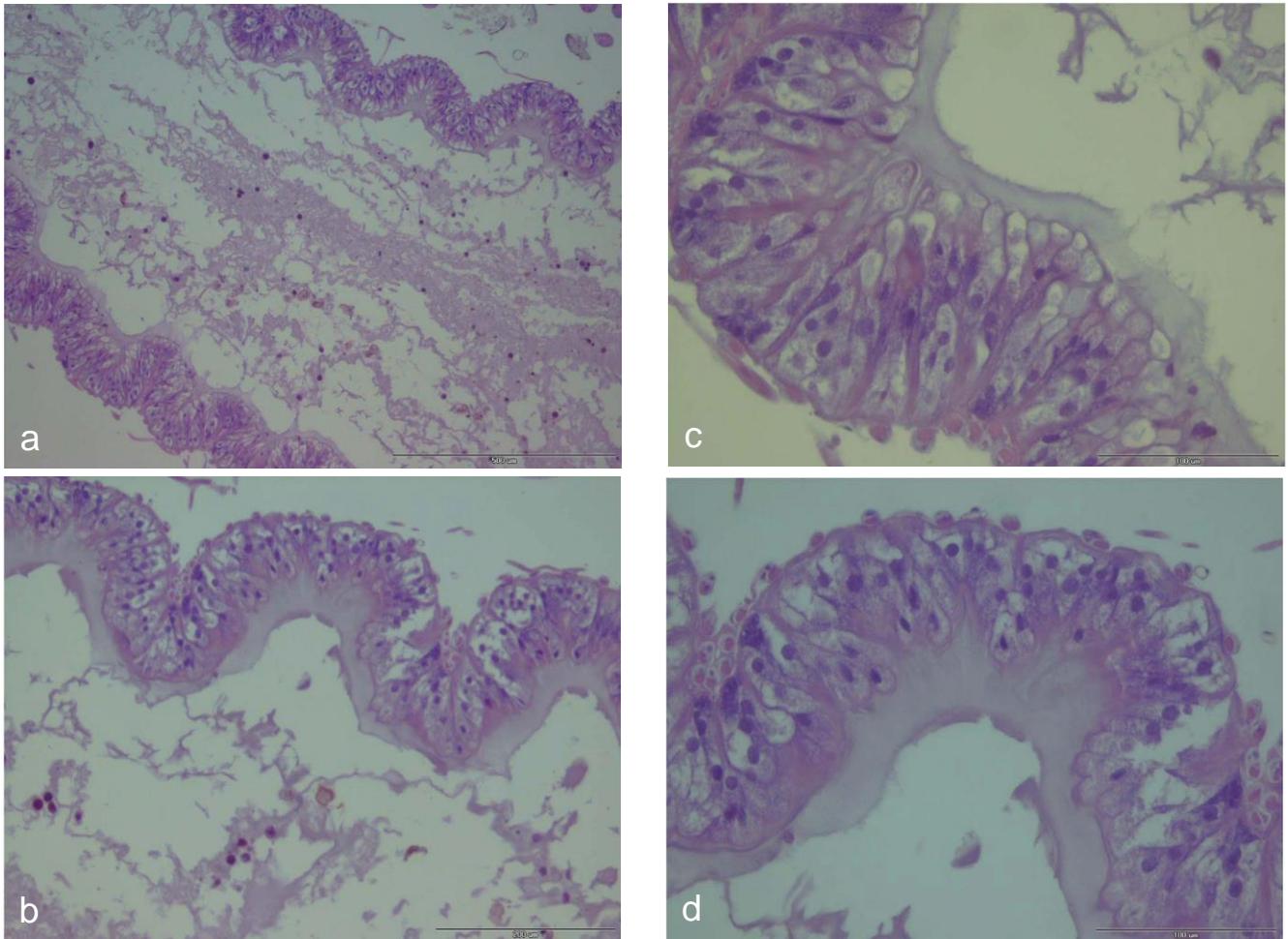


Figure 7. Partie centrale de l'intestin d'une abeille infectée par des spores de *N. apis*, traitée avec la préparation phytopharmacologique "Nozevit" (a, b, c, d), sous microscope à fond clair Olympus Bx41, photographies prises avec Olympus DP12 U -TVO. La lumière intestinale des abeilles est recouverte d'une couche ferme.

Les analyses (spectrophotomètre UV/VIS Beckman DU-530 ; 1100nm - 190 nm, dilution 1:20 dans l'eau) ont montré des concentrations de l'extrait très similaires ou se chevauchant. La conclusion est que l'extrait de plantes lie l'eau jusqu'au point de saturation maximal et que cette méthode n'est pas satisfaisante pour concentrer la préparation.

Le "Nozevit" est un extrait naturel d'écorce de chêne qui est connu depuis de nombreuses années comme une source riche en tanins (Wikipedia 2008). Les tanins sont des polyphénols végétaux naturels et amers dont la principale propriété est la fixation, la précipitation ou la coagulation des protéines. Ils sont utilisés en médecine humaine pour traiter les maladies inflammatoires du tube digestif. Les tanins adhèrent à la muqueuse pour former une membrane élastique (dans le traitement des aphtes) ou exercent une activité anti-inflammatoire (dans l'atténuation des symptômes inflammatoires du syndrome de l'intestin irritable). Ces phénols de poids moléculaire élevé contiennent un nombre suffisant de groupes hydroxyles pour former des complexes avec les protéines, la cellulose et certains minéraux et ainsi inhiber la diarrhée. Si nous faisons une comparaison avec la diarrhée induite par la maladie Nosema, les tanins de "Nozevit" devraient être capables d'arrêter la diarrhée et donc de réduire considérablement la propagation de l'agent pathogène dans les colonies d'abeilles.

La question reste de savoir si les substances actives contenues dans "Nozevit" recouvrent la lumière intestinale moyenne des abeilles ou les spores de *Nosema* ? Si elles recouvrent la lumière de l'intestin moyen, c'est-à-dire la membrane péritrophique, la question est de savoir si cette couche est sélectivement perméable. Si la germination des spores est empêchée et qu'elles ne peuvent pas pénétrer les cellules épithéliales de l'intestin moyen, se pose alors la question de la digestion normale à travers cette membrane. Qu'advient-il des cellules excrétées et des enzymes digestives expulsées par ces cellules ? De même, que se passe-t-il avec l'absorption des aliments si ceux-ci sont digérés ? Tous les processus physiologiques suivent-ils un cours normal ? Toutes ces questions doivent être réétudiées dans le cadre d'un programme de recherche sur les maladies infectieuses.

Les conditions de laboratoire sont identiques, avec un nombre connu d'abeilles dans chaque groupe et un niveau connu d'ingrédient actif par abeille dans la préparation. De cette manière, tout effet négatif extrinsèque serait éliminé, y compris le mauvais temps ou la force inégale des colonies d'abeilles. Les résultats de l'examen histologique montrent que la lumière intestinale des abeilles traitées avec "Nozevit" est recouverte d'une couche ferme, tandis que les abeilles non traitées présentent une zone de membrane péritrophique beaucoup plus lâche et pas clairement limitée. On a également observé que le contenu intestinal contenant de nombreuses spores a tendance à être comprimé au centre de la lumière, ce qui entrave probablement la germination des spores. Nous supposons que "Nozevit" recouvre simultanément la lumière intestinale et les spores de *Nosema*. Le mécanisme d'action de "Nozevit" nécessite des études biologiques et histologiques plus détaillées, tout comme les différences dans la pathogenèse de *N. apis* et *N. ceranae* (Higes et al., 2007).

Etant donné que l'étude préliminaire de l'efficacité de "Nozevit" a été réalisée sur un petit nombre de colonies d'abeilles, les résultats de l'étude ne peuvent pas être considérés comme concluants. Cependant, sur la base du fait que le nombre de spores de *Nosema* a été considérablement réduit lors de l'utilisation préventive et curative de "Nozevit", nous pensons que la préparation mérite d'être étudiée plus avant.

RÉFÉRENCES

Anderson, D. L. et Giacon, H. (1992) : Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera : Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *J. Econ. Entomol.* 85 (1) : 47 - 51.

Anon (2008a) : Naredba o izmjenama Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju.

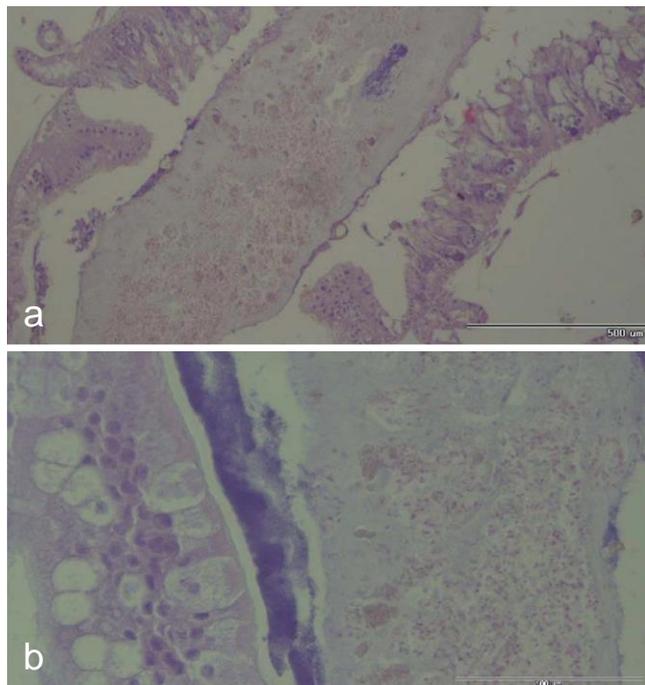


Figure 8. Partie médiane de l'intestin d'une abeille infectée par des spores de *N. apis*, traitée avec la préparation phytopharmacologique "Nozevit" (a, b), sous microscope à fond clair Olympus Bx41, photographies prises avec Olympus DP12 U -TVO. Le contenu intestinal contenant de nombreuses spores a tendance à être comprimé au centre de la lumière.

u 2008. godini. N.N. 10/08.

Anon (2008b) : La nosémose de l'abeille. Manuel terrestre de l'OIE. Chapitre 2.2.4, 410 - 414.

Bailey L. et Ball B. (1999) : Honey Bee Pathology. Deuxième édition. Academic Press 64 - 143.

Bailey, L. (1972) : *Nosema apis* in drone honey bees. *J. apic. Res.* 11, 171 - 174.

Cantwell, G. E. (1970) : Méthodes standard pour le comptage des *Nosema* spores. *Am.Bee J.* 110, 222 - 223.

Fries I., R. Martin, A. Meane, P. Garcia-Palencia, M. Higes (2006) : Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *J. Apicul.*

- Res. 45, 230 - 232).
- Fries, I. (1995)** : *Nosema apis* - un parasite dans la colonie d'abeilles. *Bee World* 74, 5 - 19.
- Hassanien, M. H. (1951)** : Studies on the effect on infection with *Nosema apis* on the physiology of the queen honey bee. *Q. Jl. mi-crosc. Sci.* 92, 225 -231.
- Higes M., P. Garcia-Palencia, R. Martin-Hernandez, A. Meana (2007)** : Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* 94, 3, 211 - 217.
- Hornitzky M. (2005)** : A report for the Rural Industries Research and Development Corporations 1 - 16.
- Laere Van, O. (1977)** : Facteurs influençant la germination des spores de *Nosema apis*. In : Biological aspects of Apimondia Symposium, Merelbeke, Belgique.
- Liu, T. P. (1984)** : Virus like cytoplasmic particles associated with lysed spores of *Nosema apis*. *J. Invertebr. Pathol.* 44, 103 - 105.
- Martin - Hernandez R., L. Prieto, A. Martinez Salvador, E. Gar-rido-Bailon, M. Higes (2007)** : Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 20, 6331 - 6338.
- Matašin, Ž., I. Tlak, Z. Petrinc (2007)** : Značenje dijagnosticiranja nosemoze. Međunarodni stručno - znanstveni skup 4. Dani meda. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. Zbornik radova 98.
- Morse, R. A. et Shimanuki, H. (1990)** : Résumé des méthodes de lutte. In : Honey bee pests, predators, and diseases. Second edition. Morse R. A. et R. Nowogrodzki (Ed.). Cornell University Press. Ithica et Londres, 341 - 354.
- Muresan, E., C. Duca, Z. Papay (1975)** : L'étude de quelques indicateurs histo-chimiques de l'intestin moyen, sain et infecté par *Nosema apis* Z., de l'abeille *Apis mellifica carpatica*. In : Proc. XXV Int. Cong. Apimondia. Maison publique, Grenoble, 384 385.
- Oliver, R. (2008)** : A Test of the "Drench" Method for *Nosema* Treatment. *American Bee Journal* 148, 10, 917 - 927.
- Peroutka, M., V. Vesely (1976)** : Apimondia symposium Biological aspects of Merelbeke. Livre des résumés 65 - 68.
- Roulet, F. (1948)** : Méthodes d'histologie pathologique. Springer-Verlag. Wien.
- Shimanuki H., Knox, D. A., Furgale, B. Caron D. M. et Williams, J. L. (1992)** : La ruche et l'abeille. 10^e édition. Graham, Dadant and Sons (ed.), Hamilton, Illinois.
- Somerville, D. (2002)** : dans Abeilles. Agnote DAI, 124.
- Sulimanović, Đ., Lj. Zeba, J. Marković (1995)** : Prepoznavanje i suzbijanje pčelinjih bolesti. PIP. Zagreb.
- Wikipedia (2008)** : Tanins. <http://en.wikipedia.org/wiki/Tannins>

Remerciements

Les auteurs de cet article souhaitent exprimer leurs sincères remerciements à Danijela Grilec, Gordana Husinec et Predrag Manger pour leur assistance technique, leurs conseils et leurs encouragements pendant toute la durée de l'étude.

* Adresse de contact :

Ivana Tlak Gajger, DVM, Département de biologie et de pathologie des poissons et des abeilles, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Zagreb, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Croatie, Tél : +385 1 2390 136 ; Fax : +385 1 2441 390 ; E-mail : ivana.tlak@vef.hr

Effet du Nozevit sur l'activité de la leucine aminopeptidase et de l'estérase dans l'intestin moyen des abeilles mellifères (*Apis mellifera*)

I. Tlak Gajger, S. Nejedli, Z. Kozaric

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Zagreb, Zagreb, Croatie

ABSTRACT : L'activité histochimique de l'aminopeptidase et de l'estérase non spécifique, deux enzymes importantes du métabolisme intermédiaire dans l'intestin moyen des abeilles mellifères (*Apis mellifera*), a été étudiée. La lutte contre la nosérose constitue un défi majeur, et le traitement de cette grave maladie parasitaire à l'aide de préparations phytopharmaceutiques naturelles pourrait être très bénéfique. En outre, les effets des résidus et de leurs sous-produits dans le miel et la cire constituent une préoccupation environnementale et une autre raison de réduire l'utilisation des méthodes de contrôle chimique conventionnelles dans l'apiculture. Nozevit est une solution aqueuse de polyphénols végétaux préparée naturellement et distribuée sur le marché en tant que "partenaire pour la répression de la maladie de Nosema". Des échantillons du tissu de l'intestin moyen ont été utilisés pour décrire l'activité enzymatique des abeilles infectées avant le traitement et 1, 2, 3, 5, 8 et 12 jours après un traitement unique avec Nozevit. Les effets possibles du traitement au Nozevit sur l'activité des enzymes étudiées et sur la digestion sont discutés.

Mots clés : abeille mellifère (*Apis mellifera*) ; maladie Nosema ; Nozevit ; LAP ; estérase

Les abeilles mellifères sont des insectes importants d'un point de vue économique et écologique, car elles améliorent la productivité agricole et contribuent au maintien de la biodiversité en effectuant une pollinisation précieuse. La nosérose est une maladie parasitaire grave de l'abeille domestique adulte causée par les deux espèces décrites de micro-sporidies, *Nosema apis* (Zander 1909) et *Nosema ceranae* (Fries et al. 1996). Les modifications pathologiques des cellules épithéliales de l'intestin moyen provoquent des troubles digestifs et métaboliques (Bailey et Ball 1991), une réduction de la glande hypopharyngienne (Malone et Gatehouse 1998), une modification de la composition en acides gras de l'hémolymphe (Roberts 1968), ainsi qu'une malnutrition, tous ces phénomènes entraînant la mort prématurée

des abeilles domestiques malades et une diminution de la taille des colonies d'abeilles domestiques. Le stress énergétique est la cause probable du raccourcissement de la durée de vie observé chez les abeilles infectées (Mayack et Naug 2009) ; comme les microsporidies sont dépourvues de mitochondries et ont donc peu de capacités métaboliques elles-mêmes (Agnew et Koella 1997), elles volent de l'énergie directement aux abeilles infectées.

N. ceranae dispose de meilleurs mécanismes pour échapper à l'immunité de l'hôte qui cible sa croissance et sa reproduction.

La capacité immunitaire de *N. ceranae* est supérieure à celle de *N. apis* (Chen et al. 2009). Il a également été constaté que *N. ceranae* possède des gènes de réponse immunitaire différents et qu'il est capable de se développer dans une gamme de températures plus large (Martin-Hernandez et al. 2009), de sorte qu'il exerce son influence négative sur une plus longue période de l'année. Ces différences en font un agent pathogène plus virulent pour les abeilles. Les butineuses ont la plus grande demande énergétique et sont celles qui ont la plus grande charge de spores de *Nosema* sp. (Higes et al. 2008). Même une prolifération précoce des stades végétatifs des spores de *Nosema* sp. dans les cellules de l'intestin de l'abeille peut provoquer des perturbations en imposant des exigences métaboliques élevées à l'abeille. En outre, le remplacement ultérieur du cytoplasme des cellules épithéliales de l'intestin par les spores et la lyse cellulaire qui s'ensuit peuvent perturber l'ensemble de la structure et probablement la fonction de l'épithélium de l'intestin (Malone et Gatehouse 1998). La digestion et l'absorption des aliments ont lieu dans l'intestin moyen des abeilles (Chapman 1978 ; Cruz-Landim et al. 1996 ; Snodgrass et Erickson 2003). La paroi de l'intestin moyen se compose de trois couches : l'épithélium interne, la membrane basale médiane et l'enveloppe musculaire externe (Chapman 1978). La paroi médiane

L'épithélium intestinal est composé de différents types de cellules telles que les cellules cylindriques, les cellules régénératrices, les cellules endocrines et les cellules de gobelet. Les cellules cylindriques sont le type de cellules prédominant, formant un bord transversal strié - rhabdiorium - sur leur surface supérieure (Cruz-Landim et Cavalcanate 2003). Pour croître et se développer normalement, les abeilles mellifères doivent obtenir une quantité suffisante de protéines par le biais de la nourriture. L'infection des cellules intestinales par la nosérose a un effet insidieux car elle réduit la capacité de l'intestin à digérer le pollen et à absorber les nutriments et détourne les protéines qui seraient normalement utilisées pour la production de gelée royale vers le remplacement des cellules intestinales endommagées.

Les enzymes protéolytiques sont sécrétées par les cellules épithéliales du milieu de l'intestin des abeilles (Malone et Gatehouse 1998), et sont extrêmement importantes pour la digestion du pollen qui est la principale source de protéines dans le régime alimentaire des abeilles (Brodschneider et Crailsheim 2010). Ces enzymes catalysent de préférence l'hydrolyse des peptides et des protéines. La leucine-aminopeptidase (LAP) appartient à un groupe d'enzymes protéolytiques dont l'activité conduit à la dégradation des protéines en acides aminés. Les aminopeptidases appartiennent au groupe des enzymes exo-peptidases et séparent l'acide aminé N-terminal de la chaîne peptidique. Les estérases sont des enzymes hydrolysantes qui dégradent les esters en acides et en alcools au cours de la réaction chimique d'hydrolyse. Crailsheim et Stolberg (1989) ont constaté que chez les abeilles saines, l'activité des enzymes protéolytiques est la plus élevée au cours des sept premiers jours de la vie, après quoi elle diminue jusqu'à une certaine valeur maintenue

tout au long de la vie (Grogan et Hunt 1980). Les estérases glucidiques catalysent la dégradation des saccharides. On distingue deux groupes de substrats à dégrader : celui dans lequel les sucres représentent un "acide", comme la pectine-méthylester, et celui dans lequel les sucres se comportent comme des alcools, comme le xylane (Bitondi et al. 1983 ; Mackert et al. 2008).

La lutte contre la maladie de Nosema étant un problème majeur et les réglementations de l'Union européenne et de la Croatie interdisant l'utilisation d'antibiotiques dans le traitement des maladies apiaires, il est nécessaire de produire et d'utiliser des préparations phytopharmacologiques naturelles pour le traitement de la maladie de Nosema. Nozevit est une solution aqueuse de polyphénols végétaux préparée naturellement, distribuée et commercialisée comme "le partenaire pour la répression de la maladie de Nosema". Le but de cette étude était de déterminer l'effet de Nozevit sur l'activité enzymatique de la LAP et de l'estérase dans l'intestin moyen des abeilles mellifères avant le traitement et 1, 2, 3, 5, 8 et 12 jours après le traitement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Traitement des colonies d'abeilles avec la préparation phyto- pharmacologique Nozevit.

L'étude a porté sur deux groupes de colonies : un groupe expérimental infecté par des spores de *N. ceranae* et traité simultanément avec Nozevit et un groupe expérimental infecté par des spores de *N. ceranae* qui n'a pas reçu de traitement. Chaque groupe expérimental était composé de 12 colonies d'abeilles. Les colonies d'abeilles ont été nourries individuellement une fois avec un mélange de 0,5 l de sirop de sucre dans un rapport 1 : 1 avec l'ajout de 20 gouttes de Nozevit. Le groupe témoin de colonies n'a reçu que du sirop de sucre préparé de la même manière.

Échantillonnage. 1, 2, 3, 5, 8 et 12 jours après un traitement unique avec Nozevit, 30 abeilles butineuses de chaque colonie ont été capturées lors du vol de retour à la ruche à l'aide de longues pinces, puis échantillonnées. Les abeilles ont été placées dans des gobelets en plastique étiquetés avec des couvercles fermes et livrés au laboratoire. Dix abeilles de chaque échantillon ont été utilisées pour la détermination en laboratoire du nombre de spores de *Nosema* et pour le diagnostic moléculaire différentiel de la spécificité des espèces. L'intestin moyen des 20 abeilles restantes de l'échantillon a été préparé pour la partie histologique de la recherche.

Tests de laboratoire pour *Nosema*. Les échantillons d'abeilles ont été examinés au microscope pour détecter la présence de spores de *Nosema* sp. Pour ce faire, les 10 abeilles de chaque échantillon ont été écrasées à l'aide d'un bâton en plastique dans un pot auquel 10 ml d'eau distillée ont ensuite été ajoutés. Ces frottis natifs du contenu intestinal ont été examinés à l'aide d'un microscope optique Olympus BX41 avec un grossissement de 400 × et un contraste de phase. Le nombre de spores de *Nosema* sp. a

été déterminé en comptant les spores à l'aide d'un hémocytomètre Bürker-Türk (Cantwell 1970), et pour identifier l'espèce de *Nosema* sp. des méthodes de diagnostic moléculaire ont été utilisées (Tlak Gajger et al. 2009a). Les mêmes échantillons d'abeilles écrasées ont été utilisés pour extraire les spores de *Nosema* sp. Pour induire la rupture mécanique des spores de chaque suspension d'un échantillon individuel, nous avons transféré 50 µl dans un nouveau tube Eppendorf et l'avons chauffé dans un bloc thermique à 100 °C pendant 30 minutes. Pour isoler l'ADN génomique, les échantillons de spores bouillis ont été centrifugés à 14 000 g pendant dix minutes. Ensuite, 30 µl de surnageant ont été séparés et du tampon TE 10× à une concentration finale de 10mM et 5mM EDTA, à pH 8, a été ajouté. Ce surnageant a été utilisé comme source d'ADN pour les analyses ultérieures. Les échantillons ont été conservés à une température de -20 °C ou ont été directement utilisés pour la PCR. La procédure PCR

a été réalisée conformément aux instructions du fabricant de la Taq polymérase (Sigma, USA). Le mélange de réaction PCR contenait 200µM de chaque dNTP, 3mM de MgCl₂, 0,5µM d'amorces avant et arrière et une unité d'ADN polymérase Taq. A ce mélange PCR ont été ajoutés 4 µl d'ADN extrait (Tlak Gajger et al. 2010a). La taille moléculaire des produits PCR a été déterminée par électrophorèse sur des gels d'agarose TAE (acide tris-acétate-éthylène diamine tétra acétique) à 2 % avec un tampon TAE standard coloré au vert SYBR. Un système de documentation des gels UviTec a été utilisé pour la visualisation.

Détermination de l'activité enzymatique.

Après que les échantillons d'abeilles ont été soumis au laboratoire, ils ont été soumis à une réfrigération à basse température (4 °C) pendant 10 minutes. Ensuite, nous avons lentement et soigneusement retiré les intestins de 20 abeilles de chaque échantillon. Au cours de cette procédure, nous avons soigneusement tenu la poitrine et l'abdomen de l'abeille avec de grandes pinces et, avec de petites pinces anatomiques, la dernière écaille de l'abdomen observée, et nous avons retiré le boyau. Ensuite, nous avons immédiatement coupé les parties avant (vessie à miel) et arrière (rectum) de l'intestin. Des échantillons de l'intestin moyen des abeilles ont été fixés dans des tubes de verre avec une solution réfrigérée (4 °C) de formol-calcium pendant 24 heures au réfrigérateur. Cette solution a ensuite été retirée et du saccharose refroidi a été versé. Les échantillons préparés ont été conservés au réfrigérateur jusqu'à leur traitement ultérieur. Des échantillons de l'intestin moyen des abeilles ont ensuite été inclus dans des blocs de paraffine et coupés à l'aide d'un microtome en sections de 10 µm. Les coupes dégraissées de l'intestin moyen ont été colorées selon la méthode HE (Roulet 1948) pour déterminer les caractéristiques morphologiques générales du tissu, et colorées avec des colorants spéciaux pour la détermination de l'activité LAP (Hrapchak et

Shennan 1980) et de l'activité estérase (Burstone 1962).

Le niveau d'activité enzymatique a été déterminé par un examen microscopique qualitatif (Olympus BX41), sous un grossissement de 10 à 40x, et les préparations histologiques ont été photographiées à l'aide de l'appareil photo Olympus DP12 U-TVO. Les zones d'activité enzymatique de la LAP dans l'échantillon se colorent en rouge-violet. Les zones où l'activité de la LAP est plus forte sont plus foncées, tandis que les zones où l'activité est plus faible se colorent en rouge-violet plus clair. Les zones où l'activité estérasique est plus forte dans les échantillons se colorent en gris-bleu. Les zones où l'activité estérasique est plus forte sont plus foncées, tandis que les zones où l'activité est plus faible ont une teinte plus claire de la même couleur. L'intensité de l'activité enzymatique a été décrite comme suit : pas de réaction enzymatique, faible (à peine perceptible),

réaction enzymatique, réaction enzymatique variable et réaction enzymatique forte.

RÉSULTATS

Dix jours après le traitement unique des colonies d'abeilles avec Nozevit, une réduction de 78,65 % du nombre de spores de *Nosema* sp. a été déterminée par rapport aux échantillons des groupes de contrôle (Tlak Gajger et al. 2011).

Les résultats de l'amplification PCR utilisant des paires génériques d'amorces *Nosema* correspondaient parfaitement aux résultats de la multiplication de *N. ceranae* avec des paires d'amorces spécifiques. Les résultats montrent également qu'après la multiplication avec des paires d'amorces spécifiques, tous les échantillons d'abeilles examinés étaient négatifs pour la présence du parasite *N. apis* (données non montrées).

L'examen histologique des préparations de l'intestin moyen d'abeilles dans lesquelles on n'a pas trouvé de spores de *Nosema* sp. a révélé la présence de toutes les couches de la paroi intestinale - couche musculaire externe longitudinale et transversale, membrane basale médiane recouverte d'une couche de cellules épithéliales très cylindriques parmi lesquelles des cellules régénératives individuelles étaient visibles, rabdorium et membrane périthrophique en partie pelée à côté de la lumière intestinale. Dans les préparations histologiques de l'intestin moyen d'abeilles infectées par des spores de *N. ceranae*, nous avons trouvé des changements dégénératifs et des processus lytiques dans les cellules épithéliales et, selon la gravité de l'invasion et la pression osmotique élevée qui en résulte en raison de la présence d'un grand nombre de spores, des cellules épithéliales détruites.

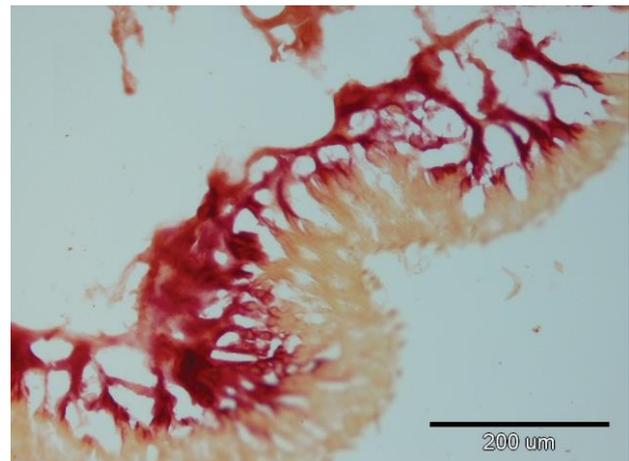


Figure 1. Activité LAP dans l'intestin moyen des abeilles un jour après le traitement au Nozevit ; grossissement 20×

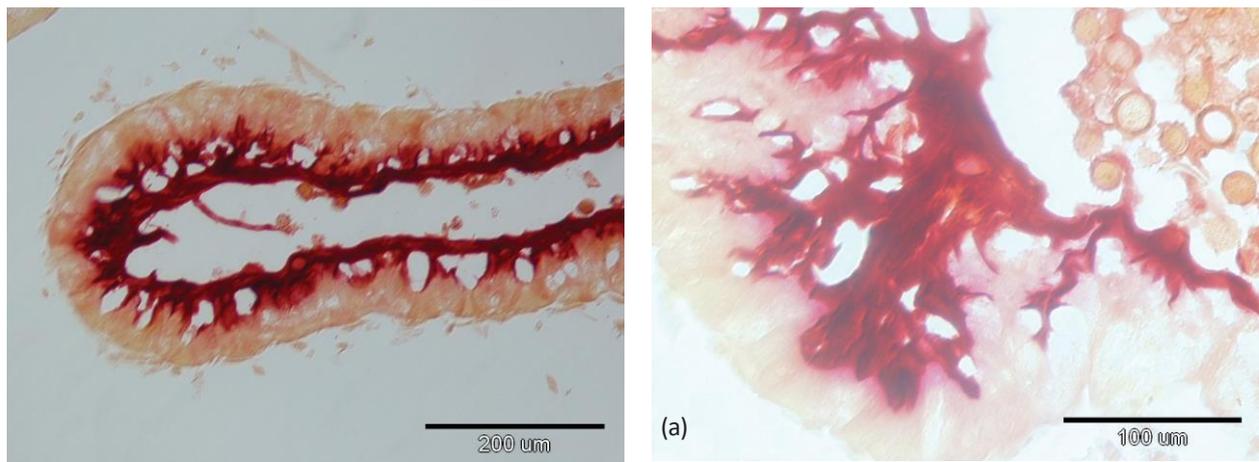


Figure 2. Activité LAP dans l'intestin moyen des abeilles deux jours après le traitement au Nozevit ; grossissement 20× ; (a) = grossissement 40×

Dans tous les échantillons de l'intestin moyen des abeilles échantillonnées provenant du groupe expérimental, nous avons trouvé une activité LAP présente et visible, surtout dans les parties apicales des entérocytes. Une forte réaction a été détectée dans les échantillons d'intestin moyen extraits deux et trois jours après le traitement unique des colonies avec Nozevit, tandis qu'au jour 1st, 5th, 8th et 12th l'activité LAP était plus faible ou variable. Dans les échantillons de l'intestin moyen des abeilles prélevées dans le groupe de contrôle, l'activité de la LAP a été faible pendant toute la période expérimentale, et il n'y a pas eu de différences entre les jours individuels. Les résultats décrits sont présentés dans les figures 1, 2, 2a, 3, 4, 5 et 5a.

Dans les préparations histologiques de l'intestin moyen d'abeilles provenant de groupes expérimentaux, nous avons trouvé une faible activité estérasiq, plus visible dans la zone du radorium et en partie dans la lumière de l'intestin lui-même. L'intensité de la réaction était similaire



Figure 3. Activité LAP dans l'intestin moyen des abeilles trois jours après le traitement au Nozevit ; grossissement 20×

Dans les échantillons d'intestin moyen des abeilles des groupes de contrôle, l'activité estérasique a été négative ou à peine visible pendant toute la période expérimentale et nous n'avons pas noté de différences d'activité entre les différents jours. Dans les échantillons d'intestin moyen des abeilles des groupes de contrôle, l'activité estérasique était négative ou à peine visible pendant toute la période expérimentale, et aucune différence n'a été constatée entre les différents jours. Les résultats décrits sont présentés dans les figures 6 et 7.

DISCUSSION

La nosérose causée par les microsporidies de *N. ceranae* est une maladie des abeilles adultes à peine perceptible lors de l'examen clinique des colonies (Hornitzky 2005). La pathogénie de la maladie est actuellement peu étudiée et mal comprise. La prévalence de la maladie ne présente aucune saisonnalité (Martin-

Figure 4. Activité LAP dans l'intestin moyen des abeilles huit jours après le traitement au Nozevit ; grossissement 20×



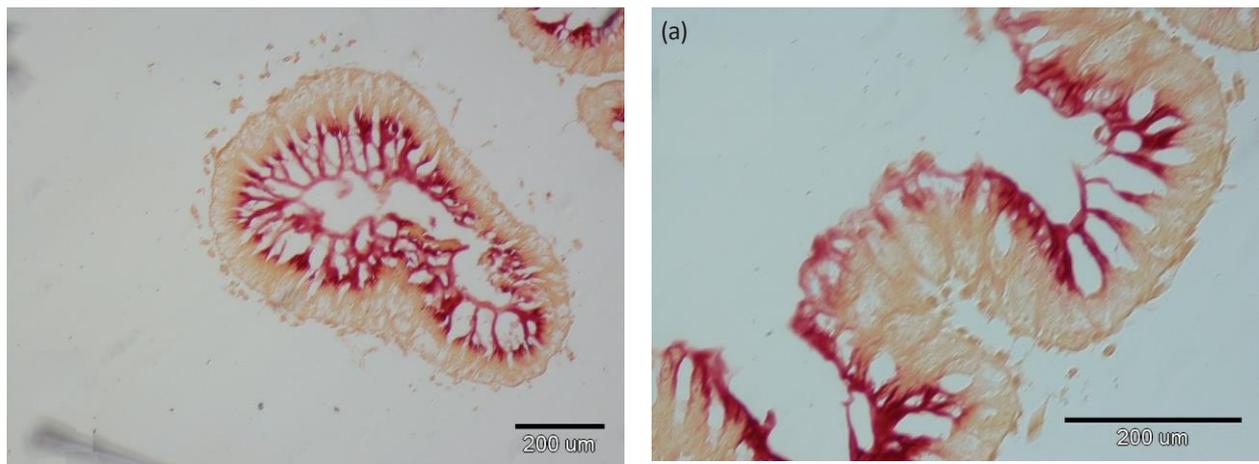


Figure 5. Activité LAP dans l'intestin moyen d'abeilles non traitées deux jours après l'échantillonnage initial ; grossissement 10× ; (a) = grossissement 20×

Hernandez et al. 2007) et est considéré comme causant la mort soudaine des colonies sans signes visibles préalables de maladie (Morse et Shimanuki 1990 ; Malone et al. 1995). Les résultats associés à la distinction diagnostique des espèces de *Nosema* sp. Les spores ont uniquement confirmé la présence d'un "nouveau ravageur des abeilles européennes", *N. ceranae*, ce qui corrobore les résultats d'études antérieures visant à déterminer la prévalence de *Nosema* sp. dans les abeilles européennes.

N. ceranae dans certaines parties de la Croatie (Grilec 2010 ; Tlak Gajger et al. 2010a, b).

L'activité des enzymes digestives de l'abeille mellifère est étroitement liée aux processus de digestion des aliments et d'absorption des nutriments digérés, et dépend des habitudes alimentaires (Brodschneider et Crailsheim 2010). Comme le miel, le pollen et l'eau constituent la base de l'alimentation de l'abeille, les enzymes LAP et estérase sécrétées par l'épithélium de l'intestin moyen sont des enzymes digestives.

Les cellules des abeilles ont un rôle particulièrement critique parmi les enzymes digestives importantes pour le métabolisme intermédiaire (Malone et Gatehouse 1998). L'activité de ces enzymes est la plus forte chez les jeunes abeilles, et ces enzymes sont nécessaires à la dégradation des protéines et des esters, qui sont essentiels à la construction de tout l'organisme de l'abeille, en particulier au développement du tissu glandulaire, et par conséquent à leurs fonctions physiologiques. Afin d'achever le développement correct des glandes hypopharyngiennes et de la graisse corporelle, les abeilles doivent digérer de grandes quantités de protéines (Winston 1987).

Gatehouse et Malone (1998) ont évalué quantitativement le niveau de l'enzyme LAP en utilisant la méthode de Christeller et Shaw (1989), et nous l'avons évalué qualitativement, en fonction de l'intensité de la couleur dans les préparations histologiques colorées. Dans la littérature disponible, les différentes activités LAP

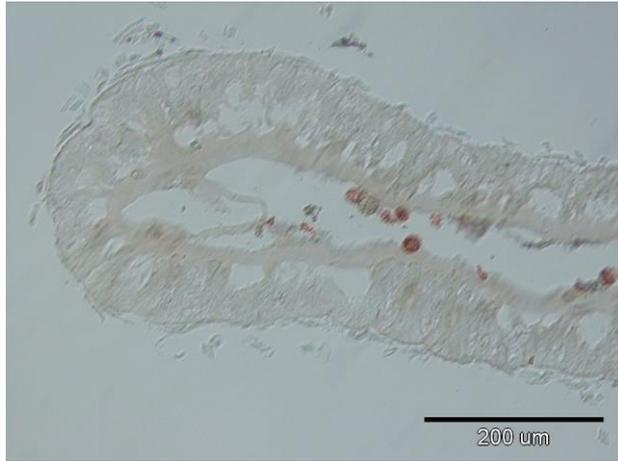


Figure 6. Activité de l'estérase dans l'intestin moyen des abeilles deux jours après le traitement au Nozevit ; grossissement 20×

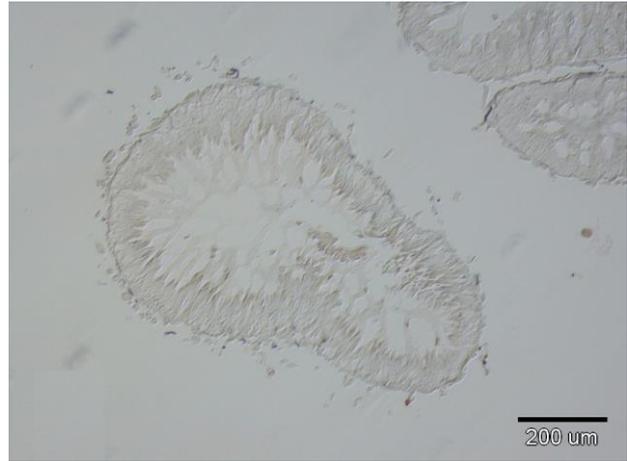


Figure 7. Activité de l'estérase dans l'intestin moyen d'abeilles non traitées deux jours après l'échantillonnage initial ; grossissement 10×

On a signalé une activité protéasique chez les abeilles saines et malades (Malone et Gatehouse 1998), mais on manque de données sur l'étendue de l'activité enzymatique chez les abeilles naturellement infectées par la nosérose ou chez celles qui sont traitées avec des préparations phytopharmaceutiques naturelles. Chez les abeilles infectées par la nosérose, l'activité protéasique était généralement plus faible, et l'on pense que l'une des façons dont *Nosema* sp. perturbe la capacité digestive des abeilles infectées est par le biais d'une réduction de la capacité protéolytique (Liu 1984).

Les actes normatifs en vigueur dans l'UE et en Croatie interdisent l'utilisation d'antibiotiques et de fumagilline dans le traitement de la nosérose et d'autres maladies apicoles, notamment en raison du développement potentiel d'une résistance aux multiples chimiothérapies utilisées et de la présence possible de résidus d'agents dans les produits apicoles destinés à la consommation humaine. Actuellement, les apiculteurs d'autres régions du monde utilisent la fumagilline, qui s'est avérée efficace pour le traitement de la nosérose causée par la

N. apis. Cependant, l'effet de la fumagilline dans le traitement et la suppression de la nosérose causée par *N. ceranae* est encore à l'étude (Williams et al. 2008). Les résultats médiocres de l'utilisation de la fumagilline pour combattre le parasite apparenté *Nosema bombi* chez les bourdons (Whittington et Winston 2003) indiquent que cet antibiotique pourrait ne pas convenir pour le traitement continu de la nosérose causée par le parasite *N. ceranae*.

L'utilisation de produits végétaux en tant que traitement alternatif de la nosérose doit faire l'objet d'études supplémentaires, mais les résultats récemment publiés concernant Nozevit montrent sa grande efficacité en tant que mesure préventive et curative pour lutter

contre les maladies des abeilles infectées par *N. ceranae* (Tlak Gajger et al. 2009a, b, 2011). Sur la base des résultats de ces études, on suppose que Nozevit empêche mécaniquement la germination des spores de *Nosema* sp. qui ont pénétré dans la lumière intestinale et enveloppe partiellement la membrane épithéliale de l'intestin moyen de rhabdiorium et la membrane péritrophique pour former une protection mécanique supplémentaire contre de nouvelles invasions. Des études histochimiques réalisées précédemment ont également montré que l'utilisation de Nozevit dans l'intestin moyen des abeilles traitées stimule la production et la sécrétion de plusieurs types différents de mucus mucopolysaccharidique qui contribuent aux processus de digestion, en particulier la digestion du pollen, et à l'enveloppement de la membrane péritrophique (Tlak Gajger et al. 2011).

Les activités enzymatiques de la LAP et de l'estérase ont été plus importantes dans les échantillons d'intestin moyen des abeilles mellifères traitées avec Nozevit que dans les groupes de contrôle, en particulier dans le cas des abeilles traitées avec Nozevit.

surtout le 2nd et le 3rd jour après le traitement. L'activité LAP était nettement plus forte au cours des trois premiers jours après le traitement par Nozevit que dans les groupes témoins, ce qui indique que toutes les phases du développement et de la multiplication du pathogène, ainsi que le nombre de spores, interfèrent avec la production d'enzymes protéolytiques. La très faible activité enzymatique dans les échantillons d'intestin moyen des groupes de contrôle observés le 8e et le 12e jourth est similaire aux résultats de Malone et Gatehouse (1998), alors que toutes les préparations faites aux jours 8 et 24 montrent le remplacement du tissu de l'abeille par des spores de *Nosema*, ce qui entraîne la lyse des cellules épithéliales infectées et fournit une explication évidente de la chute de l'activité enzymatique. L'activité estérasique s'est révélée très faible, ce qui n'est pas surprenant si l'on considère que l'étude a été menée sur des abeilles adultes butineuses infectées par des spores de *Nosema* sp. Ces résultats montrent que l'utilisation de Nozevit dans l'intestin moyen des abeilles traitées stimule l'activité des enzymes protéolytiques étudiées. Dans les recherches futures, il sera nécessaire de déterminer l'effet de Nozevit sur la durée de vie des abeilles et si son administration entraîne des effets négatifs sur les processus physiologiques des abeilles. Ces données pourraient finalement permettre de tirer une conclusion quant à son efficacité.

Remerciements

Les auteurs expriment leur sincère gratitude à l'apiculteur Goran Duzaic et à Nada Crnogaj (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Zagreb) pour leur assistance technique et leurs encouragements pendant toute la durée de cette étude.

RÉFÉRENCES

- Agnew P, Koella JC (1997) : Virulence, mode de transmission du parasite et asymétrie fluctuante de l'hôte. Proc. R. Soc. London B : Biological Sciences 264, 9-15.
- Bailey L, Ball B (1991) : Honey Bee Pathology. Academic Press, Londres. 64-143.
- Bitondi MG, Mestriner MA (1983) : Esterase isozymes of *Apis mellifera* : Substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. Biochemical Genetics 21, 985-1002.
- Brodtschneider R, Crailsheim K (2010) : Nutrition et santé des abeilles. Apidologie 41, 278-294.

- Burstone MS (1962) : Enzyme Histochemistry and its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York. 406 p.
- Cantwell GE (1970) : Standard methods for counting Nosema spores. American Bee Journal 110, 222-223. Chapman RF (1978) : The Insects Structure and Function. English University Press Ltd, Londres. 819 pages.
- Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gunderson-Rindal D, Pettis JS (2009) : Caractérisation morphologique, moléculaire et phylogénétique de *Nosema ceranae*, un parasite microsporidien isolé de l'abeille européenne, *Apis mellifera*. Journal of Eucariotic Microbiology 56, 142-147.
- Christeller JT, Shaw BD (1989) : The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bovine trypsin and *Costelytra zelandica* trypsin. Insect Biochemistry 19, 233-241.
- Crailsheim JT, Stolberg E (1989) : Influence du régime alimentaire, de l'âge et de la condition de la colonie sur l'activité protéolytique intestinale et la taille des glandes hypopharyngiennes chez l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.). Journal of Insect Physiology 35, 595-602.
- Cruz-Landim C, Cavalcanate MV (2003) : Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae : Apinae). Zoological Science 20, 1099-1107.
- Cruz-Landim C, Silva-De-Moraes RL, Serrao JE (1996) : Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). Journal Computational Biology 1, 29-40.
- Gatehouse SH, Malone AL (1998) : The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora) : DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. Journal of Invertebrate Pathology 71, 97-105.
- Fries I, Feng F, Da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ (1996) : *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), caractérisation morphologique et moléculaire d'un parasite microsporidien de l'abeille asiatique *Apis ceranae* (Hymenoptera, Apidae). European Journal of Protistology 32, 356-365.
- Grilec D (2010) : La prévalence de *Nosema ceranae* dans les ruchers de Koprivnica-Krizevci. [Travail de fin d'études] Faculté de médecine vétérinaire, Sveučilišta u Zagrebu.
- Grogan DE, Hunt JH (1980) : Age correlated changes in midgut protease activity of the honeybee, *Apis mellifera*. Experientia 36, 1347-1348.
- Higes M, Martin-Hernandez R, Botias C, Garrido-Bailon E, Gonzalez-Porto AV, Barrios L, del Nozal MJ, Bernal JL, Jimenez JL, Garcia-Palencia P, Meana A (2008) : How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environmental Microbiology 10, 10, 2659-2669.

- Hornitzky M (2005) : Un rapport pour les sociétés de recherche et de développement des industries rurales. Publication No. 03/028. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, Australie, 1-16.
- Hrapchak BB, Shennan DC (1980) : Enzyme histochemistry. In : Théorie et pratique de l'histotechnologie. 2nd ed. Battelle Press, Columbus, Ohio. 304-305.
- Liu TP (1984) : Virus-like cytoplasmic particles associated with lysed spores of *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 44, 103-105.
- Mackert A, Nascimento AM, Bitondi MG, Hartfelder K, Simoes ZP (2008) : Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. : Expression analysis and functional assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 150, 33-44.
- Malone AL, Gatehouse SH (1998) : Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*Apis mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity. *Journal of Invertebrate Pathology* 74, 169-174.
- Malone AL, Giacon HA, Newton MR (1995) : Comparaison des réponses de certaines abeilles mellifères (*Apis mellifera* L.) de Nouvelle-Zélande et d'Australie à *Nosema apis* Z. *Apidologie* 2, 495-502.
- Martin-Hernandez R, Prieto L, Martinez Salvador A, Garrido-Bailon E, Higes M (2007) : Résultat de la colonisation d'*Apis mellifera* par *Nosema ceranae*. *Applied Environmental Microbiology* 73, 6331-6338.
- Martin-Hernandez R, Meana A, Garcia-Palencia P, Marin P, Botias C, Garrido-Bailon E, Barrios L, Higes M (2009) : Effet de la température sur le potentiel biotique des microsporidies de l'abeille. *Applied Environmental Microbiology* 75, 8, 2554-2557.
- Mayack C, Naug D (2009) : Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 100, 185-188.
- Morse RA, Shimanuki H (1990) : Résumé des méthodes de contrôle. In : Morse RA, Nowogrodzki R (eds.) : *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca et Londres. 341-354.
- Roberts MD (1968) : Fatty acids in honey bees (*Apis mellifera*) infected with the protozoan *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 11, 234-236.
- Roulet F (1948) : *Methoden der Pathologischen Histologie*. Springer-Verlag, Vienne. 567 pp.
- Snodgrass RE, Erickson EH (2003) : L'anatomie de l'abeille mellifère. Graham JM (ed.) : *The Hive and the Honeybee* : Dadant and Sons, Hamilton, Illinois, USA.
- Tlak Gajger I, Vugrek O, Pinter L, Petrinc Z (2009a) : "Nozevit patties" treatment of honey bees (*Apis mellifera*) for the control of *Nosema ceranae* disease. *American Bee Journal* 149, 1053-1056.

Tlak Gajger I, Petrinc Z, Pinter L, Kozaric Z (2009b) : Experimental treatment of nosema disease with "Nozevit" phyto-pharmacological preparation. *American Bee Journal* 149, 485-490.

Tlak Gajger I, Vugrek O, Petrinc Z, Grilec D, Tomljanovic Z (2010a) : Detection of *Nosema ceranae* in honey bees from Croatia. *Journal of Apicultural Research* 49, 4, 340-341.

Tlak Gajger I, Vugrek O, Grilec D, Petrinc Z (2010b) : Prévalence et distribution de *Nosema ceranae* dans les colonies d'abeilles croates. *Veterinarni Medicina* 55, 9, 457 - 462.

Tlak Gajger I, Kozaric Z, Berta D, Nejedli S, Petrinc Z (2011) : Effet de la préparation à base de plantes Nozevit sur la structure de l'intestin moyen des abeilles mellifères (*Apis mellifera*) infectées par les spores de *Nosema*. *Veterinarni Medicina* 56, 343-350.

Whittington R, Winston ML (2003) : Effects of *Nosema bombi* and its treatment fumagillin on bumble bee (*Bombus occidentalis*) colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* 84, 54-58.

Williams GR, Shafer ABA, Rogers REL, Shutler D, Stewart DT (2008) : Première détection de *Nosema ceranae*, un parasite microsporidien de l'abeille européenne (*Apis mellifera*), au Canada et dans le centre des États-Unis. *Journal of Invertebrate Pathology* 97, 189-192.

Winston ML (1987) : *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Zander E (1909) : Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Munchener Bienenzeitung* 31, 196-204.

Reçu : 2012-10-03 Accepté après corrections : 2013-08-31

Auteur correspondant :

Ivana Tlak Gajger, Université de Zagreb, Faculté de médecine vétérinaire, Département de biologie et de pathologie des poissons et des abeilles, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Croatie

Courriel : ivana.tlak@vef.hr
