

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN  
BIOLOGIE

OPTION: ECOTOXICOLOGIE

**Efficacité de quelques acaricides sur le varroa et effets  
secondaires chez *Apis mellifera intermissa*: Aspects  
toxicologique, physiologique et biochimique**

Présentée par: Mme. ROUIBI Asma

Devant un jury composé de:

Pr. KILANI-MORAKCHI S.	Président	Université Badji-Mokhtar. Annaba
Pr. ACHOU M.	Directeur de thèse	Université Badji-Mokhtar. Annaba
Pr. HOUHAMDI M.	Examineur	Université 8 Mai 1945. Guelma
Pr. TADJINE A.	Examineur	Université Chadli Bendjedid. El-Tarf

Année universitaire 2015/2016

## *Remerciements*

*Je tiens à remercier chaleureusement et vivement Mr. Mohamed Achou, Professeur à l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba, pour avoir accepté de diriger cette thèse ainsi que pour ses précieux conseils et ses encouragements.*

*Je suis très honorée que Mme. Samira Kilani-Morakchi, Professeur à l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba, ait accepté de présider ce jury. Je vous exprime toute ma gratitude.*

*J'exprime toutes ma reconnaissance aux membres du jury Madame Aïcha Tadjine, Professeur à l'Université Chadli Bendjedid d'El-Tarf et Mr. Moussa Houhamdi, Professeur à l'Université 8 mai 1945 de Guelma, qui ont accepté d'évaluer ce travail; qu'ils trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements.*

*Je remercie profondément Mr. Nourreddine Soltani, Professeur à l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba et directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, de m'avoir accueilli et permis de réaliser ce travail dans son laboratoire.*

*C'est avec une grande sincérité que je remercie Mme Wahida Loucif-Ayad, Professeur à l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba, pour ses précieux conseils, ses renseignements, ses aides bibliographiques et pour tous les échanges et discussions scientifiques ou apicoles qui m'ont permis d'évoluer professionnellement ainsi que de développer une nouvelle passion pour l'apiculture.*

*Je garde une pensée toute particulière pour Mme Wided Bouchema avec qui j'ai passé d'inoubliables moments sur le terrain et au laboratoire. Un grand merci pour son aide et sa gentillesse.*

*Je tiens également à remercier Mlle Karima Sifi, Maître de Conférences à l'Université Badji- Mokhtar d'Annaba, pour son aide, son encouragement et son soutien moral.*

*Un grand merci à Mr. Farhat Boussouak, apiculteur, pour ses explications techniques et son aide précieuse et généreuse au rucher.*

*Je souhaite exprimer ici ma profonde gratitude et adresser mes sentiments à celles et à ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail.*

*Enfin, je remercie affectueusement mon mari pour son aide, sa patience, son amour et son soutien.*

## *Dédicace*

*A la mémoire de mon défunt père, que Dieu ait son  
âme.*

*A ma très chère mère, que Dieu lui accorde la  
guérison.*

*A mes plus précieux réconforts: mon cher mari et  
mes trois enfants Anas, Farah et Badis*

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>10</b>
1. Présentation de l'abeille	10
2. Structure d'une colonie d'abeille	11
3. Organisation sociale	12
4. Présentation du parasite de l'Abeille	14
4.1. Position systématique	14
4.2. Cycle de vie du <i>V. destructor</i>	16
5. Technique d'élevage	17
6. Sélection des ruches	18
7. Présentation des acaricides et traitements	18
7.1. Présentation du fluvalinate	18
7.2. Présentation de l'acide oxalique	19
8. Prélèvement des échantillons	20
9. Calcul des taux d'infestation	20
9.1. Les abeilles adultes	20
9.2. Le couvain operculé	21
10. Calcul du taux d'efficacité	23
11. Extraction et dosage des métabolites dans le corps	23
11.1. Dosage des protéines	24
11.2. Dosage des glucides	25
11.3. Dosage des lipides	26
12. Dosage des métabolites dans l'hémolymphe	28
13. Dosages des activités enzymatiques	29
13.1. Dosage de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase	29
13.2. Dosage de l'activité spécifique de la glutathion S-transférase	31
14. Analyse statistique	33
14.1. Analyse de l'efficacité des acaricides	33
14.2. Analyse biochimique et enzymatique	33
<b>RESULTATS</b>	<b>34</b>

1.	Taux d'infestation	34
2.	Efficacité des traitements	35
3.	Effets des acaricides sur les métabolites du corps et de l'hémolymphe	37
3.1	Effets des acaricides sur les métabolites dans le corps entier	37
3.1.1.	Taux des protéines	38
3.1.2.	Taux des glucides	39
3.1.3.	Taux des lipides	40
3.2.	Effet des acaricides sur les métabolites dans l'hémolymphe	41
3.2.1.	Concentration des protéines	41
3.2.2.	Concentration des glucides	42
3.2.3.	Concentration des lipides	43
4.	Effets des acaricides sur les activités enzymatiques	44
4.1.	Effets des acaricides sur l'activité spécifique de l' AChE	44
4.2.	Effets des acaricides sur l'activité spécifique de la GST	45
<b>DISCUSSION</b>		<b>48</b>
1.	Efficacité des acaricides sur le <i>Varroa destructor</i>	48
2.	Effets des acaricides sur les métabolites du corps et de l'hémolymphe	51
3.	Effets des acaricides sur les activités spécifiques de l'AChE et de la GST	55
3.1.	Effets des acaricides sur l'activité spécifique de l'AChE	55
3.2.	Effets des acaricides sur l'activité spécifique de la GST	57
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>		<b>61</b>
<b>RESUMES</b>		
<b>RESUME</b>		<b>64</b>
<b>ABSTRACT</b>		<b>66</b>
<b>ملخص</b>		<b>68</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		<b>70</b>



## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
01	Morphologie de l'abeille (Hennebelle, 2010).	11
02	Couvain d'ouvrières et de faux-bourçons (Mallick, 2013). <i>De haut en bas et de gauche à droite : alvéoles garnies de miel, alvéoles contenant du pollen, couvain de faux-bourçons, couvain d'ouvrières pollen, couvain de faux-bourçons, couvain d'ouvrières</i>	12
03	Morphologie des trois castes d' <i>Apis. Mellifera</i> (Clément, 2011)	14
04	Photographie au microscope électronique à balayage d'une femelle de <i>Varroa destructor</i> (Fernandez & Coineau 2002). <i>A gauche: vue dorsale / A droite: vue ventrale</i>	15
05	<i>V. destructor</i> sur une nymphe d'abeille (Ellis & Zettelalen, 2010)	15
06	<i>V. destructor</i> sur une abeille adulte (Ellis & Zettelalen, 2010)	15
07	Les différents stades de développement du <i>V. destructor</i> (Rosenkrans <i>et al.</i> , 2010). <i>En haut, de gauche à droite: Protonymphe, deutonymphe mobile, deutonymphe immobile. En bas, de gauche à droite: jeune femelle nouvellement émergée, femelle adulte (le parasite), mâle adulte.</i>	16
08	Cycle biologique du <i>V. destructor</i> (Rosenkranz <i>et al.</i> , 2010).	17
09	Localisation de la région d'échantillonnage des abeilles	17
10	Structure chimique du fluvalinate ( <a href="http://www.chemspider.com">www.chemspider.com</a> )	19
11	Structure chimique de l'acide oxalique ( <a href="http://www.chemspider.com">www.chemspider.com</a> )	19
12	Dosage des protéines du corps: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine ( $\mu\text{g}$ ).	24
13	Dosage des glucides du corps: droite de régression exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose ( $\mu\text{g}$ ).	25

<b>14</b>	Dosage des lipides du corps : droite de régression exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité d'huile de table ( $\mu\text{g}$ ).	<b>26</b>
<b>15</b>	Extraction (d'après Shibko et <i>al.</i> , 1966) et dosage des glucides, lipides et protéines selon Duchateau et Florkin, (1959), Goldsworthy et <i>al.</i> , (1972) et Bradford, (1976) respectivement.	<b>27</b>
<b>16</b>	Dosage des protéines hémolympatiques : droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine ( $\mu\text{g}$ )	<b>28</b>
<b>17</b>	Dosage des glucides hémolympatiques: droite de régression exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose ( $\mu\text{g}$ ).	<b>28</b>
<b>18</b>	Dosage des lipides hémolympatiques: droite de régression exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité d'huile de table ( $\mu\text{g}$ )	<b>29</b>
<b>19</b>	Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine ( $\mu\text{g}$ ).	<b>31</b>
<b>20</b>	Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine ( $\mu\text{g}$ ).	<b>33</b>
<b>21</b>	Taux d'infestation (%) par <i>Varroa destructor</i> d' <i>A.m. intermissa</i> avant et après traitement aux acaricides dans les ruches expérimentales ( $m \pm SE$ )	<b>34</b>
<b>22</b>	Efficacité moyenne des traitements acaricides à l'encontre de <i>V. destructor</i> évalué selon le pourcentage de mortalité	<b>37</b>
<b>23</b>	Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la teneur en protéines totales dans le corps entier ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) chez les Abeilles adultes d' <i>A.m. intermissa</i> : ( $m \pm SE$ , n=4-6).	<b>38</b>
<b>24</b>	Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur le taux des glucides totaux dans le corps entier ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez des Abeilles adultes d' <i>A.m. intermissa</i> : ( $m \pm SE$ , n=4-6).	<b>39</b>
<b>25</b>	Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la teneur en lipides totaux dans le corps entier ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) chez des Abeilles adultes d' <i>A.m. intermissa</i> : ( $m \pm SE$ , n=4-6)	<b>40</b>
<b>26</b>	Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la concentration en protéines hémolympatiques ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez les Abeilles adultes <i>A.m. intermissa</i> : ( $m \pm SE$ ; n=4-6)	<b>41</b>

<b>27</b>	Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la concentration en glucides hémolymphatiques ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez les Abeilles adultes <i>A.m. intermissa</i> : ( $m \pm \text{SE}$ , $n=4-6$ )	<b>42</b>
<b>28</b>	Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la concentration en lipides hémolymphatiques ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez des Abeilles adultes <i>d'A.m. intermissa</i> : ( $m \pm \text{SE}$ , $n=4-6$ )	<b>43</b>
<b>29</b>	Activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>A.m. intermissa</i> après traitement aux acaricides : comparaison des moyennes pour un même âge entre les différents groupes ( $m \pm \text{SE}$ , $n= 4-6$ ).	<b>45</b>
<b>30</b>	Activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>A.m. intermissa</i> après traitement aux acaricides : comparaison de moyennes pour un même âge entre les différents groupes ( $m \pm \text{SE}$ ; $n= 4-6$ )	<b>46</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
01	Dosage des protéines du corps de l'Abeille : réalisation de la gamme d'étalonnage.	24
02	Dosage des glucides du corps de l'Abeille : réalisation de la gamme d'étalonnage.	25
03	Dosage des lipides du corps de l'Abeille : réalisation de la gamme d'étalonnage.	26
04	Nombre moyen de <i>V. destructor</i> morts par semaine avant, pendant et après traitement aux acaricides dans les ruches expérimentales (m±SE).	36

# *INTRODUCTION*



## INTRODUCTION

Environ 225 000 espèces de plantes à fleurs (Angiosperme) sont pollinisées par 200 000 espèces d'animaux (Buchmann & Nabhan, 1996; Kearns *et al.*, 1998). Les animaux pollinisateurs correspondent à quelques vertébrés (oiseaux, chauves-souris, rongeurs...) mais surtout à des insectes tels que des Hyménoptères, des Lépidoptères, des Diptères ou des Coléoptères. Parmi les insectes pollinisateurs les abeilles domestiques, *Apis mellifera* (Hymenoptera; Apidae), contribuent de manière importante au maintien d'une biodiversité essentielle pour les écosystèmes (Straub, 2007). Elles jouent un rôle primordial dans les diverses phases de la vie de nombreuses espèces végétales et animales. En effet, les abeilles, présentent de multiples intérêts dont la pollinisation de nombreux végétaux (Gallai *et al.*, 2009; Rader *et al.*, 2009; Moritz *et al.*, 2010). Les abeilles ont ainsi un rôle écologique de premier plan en réalisant la reproduction des plantes entomophiles et en favorisant le maintien de la diversité génétique (Anderson *et al.*, 2011; Ashman *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2006; Krupke *et al.*, 2012).

La pérennité des activités agricoles dans le monde est liée en partie aux insectes pollinisateurs. L'abeille joue un rôle économique important puisque 35% de la production agricole dépend directement des pollinisateurs (Klein *et al.*, 2007 ; Ricketts *et al.*, 2008) et 84% des espèces cultivées sont liées à l'activité de ces insectes (Williams, 1996). L'abeille mellifère est de loin le pollinisateur dont l'importance économique est la plus grande pour les cultures au niveau mondial. En agronomie, une meilleure pollinisation assurée par les abeilles va augmenter le rendement quantitatif, mais aussi qualitatif de nombreuses plantes cultivées (Free, 1970).

Outre, l'amélioration de la fécondation des plantes cultivées ainsi que son rôle de bio-indicateur (Free, 1993; Kevan, 1999), l'abeille domestique revêt d'autres intérêts dont la production du miel, de la propolis, de la gelée royale, du pollen et de la cire. Ces produits de la ruche sont connus non seulement pour leur importance économique grâce à leur commercialisation mais aussi pour leurs effets bénéfiques sur la santé (Bogdanov, 2006). En tant qu'espèce animale à comportement social, elle constitue donc un modèle biologique d'intérêt majeur (Von Frisch, 1967) et doit être préservée et protégée contre toute maladie ou source polluante.



L'augmentation de la pression environnementale et anthropique à laquelle sont exposées les populations d'abeilles domestiques est soupçonnée d'être à la base de leur déclin à l'échelle mondiale (Beismejjer *et al.*, 2006; Oldroyd, 2007; Paxton *et al.*, 2007; Stokstad, 2007; Grixti *et al.*, 2009; vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Ratnieks & Carreck, 2010; Whitehorn *et al.*, 2012). Dans son environnement, l'abeille est soumise à divers facteurs tels que les prédateurs, les bactéries, les champignons, les parasites, les résidus des pesticides (Henry *et al.*, 2012; James & Xu, 2012), agissant seuls ou en synergie et contribuant à l'affaiblissement et à la mortalité des colonies d'abeilles (vanEngelsdorp *et al.*, 2009; vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Bien qu'elles possèdent des moyens de défenses contre les maladies, tels que le comportement hygiénique ou la production de substances antimicrobiennes (Seeley, 1985), les colonies d'abeilles souffrent toujours d'un certain nombre de maladies (Bailey & Ball, 1991; Schmid-Hempel, 1998) dont la plupart peuvent causer des dommages aux colonies d'abeilles (Williams, 2000).

Parmi les maladies de l'abeille domestique, la varroase. Cette dernière qui est une maladie parasitaire grave et contagieuse de l'abeille et de son couvain (Fernandez & Coineau, 2002), est causée par le parasite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) (Anderson & Trueman, 2000) qui est considéré comme une des plus sérieuses menaces d'origine biologique pour *Apis mellifera* (de la Rúa *et al.*, 2009; vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Brodschneider *et al.*, 2010; Chauzat *et al.*, 2010; Dahle, 2010; Genersch *et al.*, 2010; Guzmán-Novoa *et al.*, 2010; Potts *et al.*, 2010; Rosenkranz *et al.*, 2010; Schäfer *et al.*, 2010; Topolska *et al.*, 2010; VanEngelsdorp *et al.*, 2009; Noireterre, 2011; Martin *et al.*, 2012).

*V. destructor* est un acarien ectoparasite d'*Apis. cerana* Fabr. et d'*Apis mellifera* L. (Calderone & Lin, 2001); il a été pendant longtemps confondu avec *V. jacobsoni* Oud. (Oudemans, 1904). Ces deux espèces de varroa sont à l'origine, des parasites de l'abeille asiatique *A. cerana* Fabr (Anderson & Trueman, 2000; Colin *et al.*, 2001). Cependant, en 1957, *V. jacobsoni*, actuellement identifié comme étant *V. destructor*, a parasité l'abeille occidentale *A. mellifera* L et s'est répandu dans la majeure partie du monde (Oldroyd, 1999; Anderson & Trueman, 2000). Les femelles d'acariens qui parasitent les abeilles se nourrissent par ponction de l'hémolymphe des abeilles du couvain et surtout des adultes qu'ils utilisent pour leur dispersion (Anderson & Trueman, 2000; Sammataro *et al.*, 2000; Martin, 2001; Bubalo *et al.*, 2005). Dans les colonies d' *A. mellifera*, les acariens se reproduisent dans les cellules d'ouvrières et de mâles du couvain (De Jong *et al.*, 1982b; Boot *et al.*, 1997; Beetsma



*et al.*, 1999, Calderone & Lin, 2001), mais pas dans les cellules de reines (Romaniuk *et al.*, 1988; Rehm et Ritter, 1989), ou rarement (Harizanis, 1991).

La reproduction de l'acarien est en parfaite synchronisation avec le cycle de vie d' *A. mellifera*. Les femelles adultes *V. destructor* parasitent les abeilles ouvrières adultes et les faux bourdons (phase phorétique) pendant au moins 48 heures puis, elles pénètrent dans les cellules mâles et femelles du couvain un jour avant l'operculation (Mélathopoulos *et al.*, 2000; Bowen-Walker & Gunn, 2001) pour se reproduire dans les cellules scellées du couvain (Calderone & Lin 2001; Bubalo *et al.*, 2005). La sélectivité du couvain d'ouvrières et de mâles résiderait dans le fait que les acariens répondent à un nombre d'esters d'acides gras produits par les larves de mâles et d'ouvrières (Leconte *et al.*, 1989) ou encore à des stimuli chimiques (Calderone & Lin 2001). Des médiateurs chimiques provenant de la nourriture larvaire affectent le processus d'invasion des cellules par l'acarien (Nazzi *et al.*, 2001).

Le nombre moyen de varroa trouvé dans les cellules du couvain mâle est 7-8 fois plus grand que celui dans les cellules d'ouvrières (Sulimanovic *et al.*, 1982; Fuchs, 1990; Calderone & Kuenen, 2001). La différence dans l'attractivité entre les cellules des mâles et d'ouvrières du couvain (Fuchs, 1990) pourrait aussi dépendre de la plus grande quantité de nourriture larvaire contenue dans les cellules des mâles et d'une différence dans la composition de la nourriture larvaire fournie à ces deux types de cellules du couvain (Nazzi *et al.*, 2001). De plus, il semblerait que les acariens font activement la différence entre les larves d'ouvrières et de reines (Calderone *et al.*, 2002). La faible présence d'acariens dans les cellules de reines est partiellement due à l'activité répulsive de la gelée royale et vraisemblablement à des différences spécifiques dans la chimie des larves (Calderone *et al.*, 2002).

La forme aplatie et la forte musculature des pattes munies de crochets permettent aux varroas de bien s'accrocher à leur hôte. Les pièces buccales des varroas leurs permettent de percer la cuticule des abeilles et des larves et de se nourrir de leur hémolymphe (Dahle, 2010; Martin *et al.*, 2010; 2012; Nazzi *et al.*, 2012). *V. destructor* peut avoir trois types d'action sur *Apis mellifera*: mécanique (Kanbar & Engels, 2003), vecteur de nombreux agents infectieux de l'abeille (Weinberg & Madel, 1985; Tentcheva *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Prisco *et al.*, 2011; Wendling, 2012; Dainat *et al.*, 2012) et spoliateur (Duay *et al.*, 2003). Cette invasion du milieu interne de l'abeille par *V. destructor* est à la base de la pathologie de la varroase et est



fort probablement la cause de plusieurs infections virales et bactériennes secondaires (Ball & Allen 1988; Chen & Siede 2007; Sammataro *et al.*, 2000).

Au niveau de la colonie, les symptômes de la varroase se manifestent en fonction du degré d'infestation. A de faible taux, les symptômes sont absents. Plus les niveaux d'infestation augmentent, plus les symptômes sont apparents (Duay 2002).

Les conséquences de la varroase sur les abeilles sont principalement une réduction du poids corporel, de la concentration des protéines et des glucides hémolympatiques à l'émergence (Smirnov 1978; De Jong *et al.*, 1982, Weinberg & Madel, 1985; Achou & Soltani, 1997; Bowen-Waker & Gunn, 2001) et de la longévité (De Jong & De Jong, 1983; Schneider & Drescher 1987; Kovak & Craisheim, 1988, Amdam *et al.*, 2004). On assiste aussi à une activité de butinage précoce des ouvrières (Schneider & Drescher 1987) et à des difficultés à survivre pendant l'hiver (Kovac & Craisheim, 1988). D'autres caractéristiques physiologiques consistent en une dégénérescence des corps adipeux et un sous-développement des glandes hypopharyngiennes (De jong *et al.*, 1982; De Jong & De Jong, 1983; Schneider & Drescher, 1987). On assiste également à une altération de l'ontogenèse et de l'expression des glycoprotéines des spermatozoïdes avec une réduction du diamètre de la glande à mucus et de la vésicule séminale ainsi que du nombre de spermatozoïdes (Rinderer *et al.*, 1999). Une diminution de la taille du flagelle antennaire et du nombre de sensilles antennaires (Abd EL-Wahab *et al.*, 2006) ainsi qu'une diminution de la survie à l'émergence (Rinderer *et al.*, 1999), du nombre de bourdons atteignant l'âge de la maturité sexuelle (Collins & Pettis, 2001) et des fréquences de vol (Schneider & Drescher 1987) ont été enregistrées. Tous ces effets affectent négativement le processus compétitif de l'accouplement (Bubalo *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la connaissance de la relation hôte-parasite présente un grand intérêt pour développer une meilleure stratégie de lutte, En effet, le suivi du développement de l'acarien dans la colonie permet à l'apiculteur de déterminer les moments opportuns pour effectuer les traitements.

L'homme a joué un rôle très important dans la diffusion du varroa. Le manque de connaissance et les intérêts économiques ont permis à l'acarien de se trouver répandu aujourd'hui pratiquement dans le monde entier (Fernandez & Coineau, 2002) et afin de lutter contre ce fléau, de nombreuses méthodes de contrôle de cet acarien ont été étudiées. On



retrouve des méthodes biotechniques (Boot *et al.*, 1995), biologiques (Nazzi *et al.*, 2004), génétiques (Martin *et al.*, 2001) et chimiques par l'utilisation des acaricides. Ces dernières sont celles qui sont les plus utilisées sur le terrain (Maggi *et al.*, 2009; Calderone, 2010). Les traitements chimiques correspondent à l'utilisation de plusieurs familles de pesticides à l'intérieur de la ruche: des pyréthrinoïdes (fluvalinate et fluméthrine), des organophosphorés (coumaphos) et des formamidines (amitraze) (Bogdanov, 2006; Haubruge *et al.*, 2006). Divers travaux ont montré que les acaricides utilisés dans la lutte contre le varroa entraînaient des modifications dans la signalisation cellulaire. Les pyréthrinoïdes (fluméthrine, fluvalinate) perturbent l'ouverture des canaux sodium voltage-dépendant (Soderlund & Bloomquist, 1989; Narahashi, 1992) et les formamidines (amitraze) agissent comme agonistes des récepteurs d'octopamine dans les synapses excitatrices du système nerveux des arthropodes (Wang *et al.*, 2012). Il a été démontré que la sensibilité envers les pyréthrinoïdes variait selon les races d'abeilles (Danka & Rinderer, 1986; Elzen *et al.*, 2000; Claudianos *et al.*, 2006). Parmi les pyréthrinoïdes utilisés dans la lutte anti varroa, le fluvalinate apparaît comme la molécule la plus fréquemment retrouvée dans de nombreuses études (Bernal *et al.*, 2010; Mullin *et al.*, 2010; Orantes-Bermejo *et al.*, 2010). Le fluvalinate est une molécule insecticide et acaricide non sélective qui agit principalement sur la transmission nerveuse et le modulateur des canaux sodium (Sherby *et al.*, 1986; Colin *et al.*, 1997; Ray & Fry, 2006; Davies *et al.*, 2007; Rosenkranz *et al.*, 2010). Cette molécule est non volatile et liposoluble. Elle est bien tolérée par les colonies d'abeilles aux doses utilisées pour le contrôle de *V. destructor* (Colin *et al.*, 1997). Comparativement aux autres pyréthrinoïdes qui sont très toxiques pour les abeilles, le fluvalinate, à forte concentration, semble être toléré par les abeilles grâce, en partie, à la détoxification rapide par la famille des cytochromes P450 mono-oxygénases (Johnson *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2011). Cependant, la fréquence d'utilisation du fluvalinate a diminué ces dernières années suite à l'apparition de phénomènes de résistance du varroa (Lodesani *et al.*, 1995; Colin *et al.*, 1997; Baxter *et al.*, 1998; Trouiller, 1998; Wang *et al.*, 2002; Gracia-Salinas *et al.*, 2006) et de résidus dans le miel (Lodesani *et al.*, 1992; Wallner, 1999; Lodesani *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009) et dans la cire (Wallner, 1999; Bogdanov, 2006; Berry, 2009; Mullin *et al.*, 2010). De plus, le fluvalinate présente des effets secondaires néfastes sur la santé de l'abeille (Stoner *et al.*, 1985; Sokol, 1996; Currie, 1999; Rinderer *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000; Fell & Tignor, 2001; Haarmann *et al.*, 2002; Lodesani & Costa, 2005; Martel *et al.*, 2007; Frazier *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2009; Locke *et al.*, 2012). Il est donc important de s'orienter vers des molécules naturelles de moindre toxicité et non polluantes tels que les acides organiques (acide oxalique, acide formique) et les



huiles essentielles (thymol, menthol, eucalyptol) (Quarles, 1996; Imdorf *et al.*, 1999; Lindberg *et al.*, 2000; Gregorc & Planincy, 2002; Ariana *et al.*, 2002; Eguaras *et al.*, 2003; Stanghellini & Raybold, 2004; Floris *et al.*, 2004; Satta *et al.*, 2005). Parmi ces molécules, l'acide oxalique, constitue une alternative intéressante en remplacement des acaricides chimiques du fait de son action acaricide efficace à l'encontre de *V. destructor* (Prandin *et al.*, 2001; Gregorc & Planincy, 2001; 2002; Marcangeli *et al.*, 2003; Nanetti *et al.*, 2003; Rademacher et Harz, 2006; Marinelli *et al.*, 2006; Bacandritsos *et al.*, 2007). Il est aussi naturellement présent dans le miel (Bogdanov, 2006; Rademacher & Harz, 2006) et son utilisation (Prandin *et al.*, 2001; Gregorc & Planincy, 2001; 2002; Marcangeli *et al.*, 2003, Nanetti *et al.*, 2003; Marinelli *et al.*, 2006; Rademacher & Harz, 2006; Bacandritsos *et al.*, 2007), ne pose pas de problèmes de résistance et de contamination des produits de la ruche (Bogdanov *et al.*, 2002). Le mode d'action de l'acide oxalique contre *V. destructor* est encore inconnu, mais un contact entre cet acarien et l'acide oxalique est nécessaire pour obtenir une efficacité de ce traitement (Aliano & Ellis, 2008). L'acide oxalique est efficace à l'encontre de *V. destructor* quand il est administré en solution sucrée, permettant une bonne adhésion des produits actifs aux abeilles (Aliano & Ellis, 2008). Par contre, dilué dans l'eau seulement, il ne présente aucun effet sur l'ectoparasite (Charrière & Imdorf, 2002). La majorité des tests a montré la grande efficacité de l'acide oxalique et sa bonne tolérance par l'abeille (Imdorf *et al.*, 1997). Néanmoins, l'acide oxalique n'est pas sans danger pour les abeilles et des recherches ont montré sa toxicité envers *A. mellifera* (Higes *et al.*, 1999; Nozal *et al.*, 2003; Gregorc *et al.*, 2004; Hatjina & Haristos, 2004; Gregorc & Smodis Skerl, 2007; Martin-Hernandez, 2007; Aliano et Ellis, 2008; Wagnitz & Ellis, 2010; Schneider *et al.*, 2011; Carrasco-Letelier *et al.*, 2012; Locke *et al.*, 2012; Wermelinger, 2013).

L'abeille mellifère possède les caractéristiques propres d'une espèce sentinelle (Lagadic *et al.*, 1998; Elliott *et al.*, 2011) et constitue un modèle biologique d'intérêt majeur. De nombreuses études ont montré que les abeilles et les matrices associées (miel, pollen ...) pouvaient être utilisées comme sentinelles de la contamination de l'environnement par les xénobiotiques (Celli & Maccagnani, 2003; Porrini *et al.*, 2003; Ghini *et al.*, 2004; Sabatini, 2005; Ponikvar *et al.*, 2005; Bogdanov, 2006). L'abeille représente un véritable témoin de la qualité de l'environnement par le biais de ses caractéristiques biologiques et son activité intense de butinage qui la mettent en contact avec les produits phytopharmaceutiques et autres polluants environnementaux (Wallwork-Barber *et al.*, 1982; Saifutdinova & Shangaraeva, 1997; Kevan, 1999; Devillers & Pham-Delègue, 2002; Celli & Maccagnani,



2003; Porrini *et al.*, 2003; Ghini *et al.*, 2004; Leita *et al.*, 2004; Sabatini, 2005; Balayiannis & Balayiannis, 2008; Chauzat *et al.*, 2011; Perugini *et al.*, 2011). En effet, pour détecter la présence de pesticides et leur impact sur l'environnement, une des méthodes utilisées est l'approche biologique basée sur l'étude d'espèces bioindicatrices et de leurs marqueurs biologiques. Les abeilles constituent un modèle pertinent pour le développement des biomarqueurs afin d'évaluer la contamination de l'environnement (Wallowork-barber *et al.*, 1982; Leita *et al.*, 2004).

Les biomarqueurs mesurent l'interaction entre un système biologique et un agent environnemental. Ils peuvent être chimiques, physiques ou biologiques (Who, 1993). Ils sont mesurés chez des organismes exposés à des conditions de stress liées à la présence de substances polluantes dans l'environnement (Hugget *et al.*, 1992). Ils représentent la réponse biologique initiale des organismes face à des perturbations ou des contaminations du milieu dans lequel ils vivent; en conséquence, ils sont en général plus sensibles que les paramètres mesurés à un niveau supérieur d'organisation biologique tel que l'organe, l'individu ou la population (Stegeman *et al.*, 1992). Différents biomarqueurs ont été étudiés (Hyne & Maher, 2003; Badiou-Bénéteau *et al.*, 2012). Ces biomarqueurs sont fortement stimulés après une exposition aux molécules toxiques. Le suivi de leur activité dans le temps constitue le système de veille environnementale et la modification de leur activité crée l'alerte.

L'acétylcholinestérase (AChE) représente ainsi un biomarqueur de neurotoxicité largement utilisé pour identifier une exposition aux insecticides anticholinestérasiques comme les organophosphates et les carbamates (Guilhermino *et al.*, 1998; Bandyopadhyay, 1982) et plusieurs pyréthriinoïdes (Badiou *et al.*, 2008; Bendahou *et al.*, 1999). Chez les abeilles, la majorité de l'AChE est localisée dans la tête, au niveau du cerveau (Belzunces *et al.*, 1988; Kreissl & Bicker, 1989; Huang & Knowles, 1990; Abdallah *et al.*, 1991).

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme clé du système nerveux central chez les insectes. Elle est responsable de l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine en choline et acétate au niveau des synapses (Eldefrawi, 1985). L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE permet la fermeture des canaux associés aux récepteurs du neurotransmetteur. Si l'action de cette enzyme est bloquée, la membrane post-synaptique reste continuellement excitée ce qui conduit à l'accumulation de l'acétylcholine dans la région synaptique provoquant ainsi une hyperexcitation causant la mort de l'insecte (Haubruge & Amichot, 1998). Le rôle de l'AChE est particulièrement important chez les insectes sociaux tels que les abeilles qui sont sujettes à



des effets non intentionnels des produits agrochimiques et dont le comportement sociétal conditionne la vie et la productivité de la colonie (Belzunces *et al.*, 1992).

Le système de détoxification impliqué dans la dégradation des pesticides est un élément majeur dans le devenir des toxiques dans l'organisme. Il constitue un élément essentiel pour la survie de l'individu.

Les Glutathion S-Transférases (GSTs), enzymes de détoxification, jouent un rôle important dans le mécanisme de détoxification (Motoyama & Dauterman, 1980; Clark *et al.*, 1985; Fournier *et al.*, 1992; Kostaropoulos *et al.*, 2001; Papadopoulos *et al.*, 2004). Les GSTs représentent une famille de protéines multifonctionnelles, mutagènes, appartenant au système de détoxification de phase II, enzymes cytosoliques qui catalysent la conjugaison du glutathion réduit (GSH) en une variété de composés électrophiles endogènes ou exogènes (Maxwell, 1992; Stone *et al.*, 2002; Barata *et al.*, 2005). La GST pourrait aussi jouer un rôle important dans la protection des tissus contre le stress oxydatif (Hyne & Maher, 2003; Babczynska *et al.*, 2006). Chez les abeilles, la GST est principalement localisée au niveau de l'intestin moyen. L'histopathologie, comme outil d'analyse, peut également apporter des renseignements sur l'impact de l'environnement. Elle fournit des biomarqueurs qui sont sensibles puisque les tissus et les organes sont altérés même à faibles concentrations de contaminants (Abdallah, 2004; Szymas *et al.*, 2012).

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur l'abeille, mais peu d'informations existent sur les effets secondaires des xénobiotiques utilisés dans les traitements préconisés pour lutter contre le varroa. En effet, l'abeille au cours de son activité d'ouvrière, peut subir une contamination primaire par pulvérisation directe du produit agrochimique; elle est aussi l'objet de contaminations secondaires par contact avec les parties florales traitées, ou avec la nourriture (pollen et nectar) contaminée.

Dans ce contexte, le présent travail de thèse a été entrepris sur les abeilles domestiques, *Apis mellifera intermissa* afin d'évaluer:

1/- L'efficacité de deux traitements acaricides, synthétique (Fluvalinate ou Apistan) et naturel (Acide oxalique), utilisés dans la lutte contre l'infestation des abeilles par *V. destructor*.



2/- Les éventuels effets secondaires de ces deux traitements acaricides, sur les principaux métabolites (protéines, glucides et lipides) dans le corps entier des abeilles ainsi que dans l'hémolymphe.

3/- L'impact de ces deux acaricides sur l'activité spécifique de deux biomarqueurs enzymatiques: l'acétylcholinestérase (AChE), biomarqueur de neurotoxicité, et la glutathion-S-transférase, enzyme de détoxification.

*MATERIEL*

*ET*

*METHODES*



## MATERIEL ET METHODES

### 1. Présentation de l'abeille

L'abeille algérienne appartenant à la lignée Africaine A est représentée par *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906) et *Apis mellifera sahariensis* (Baldensperger, 1924). La race *intermissa* est la plus répandue et son aire de répartition s'étend sur toute l'Afrique du Nord, du Maroc à la Tunisie (Cornuet *et al.*, 1988; Grissa *et al.*, 1990; Hepburn & Radloff, 1996, Barour *et al.*, 2011; Loucif-Ayad *et al.*, 2014). Sa position systématique est la suivante:

<b>Embranchement:</b>	Arthropodes
<b>Sous embranchement :</b>	Mandibulates
<b>Classe :</b>	Insectes
<b>Sous-classe :</b>	Ptérygotes
<b>Ordre :</b>	Hyménoptères
<b>Sous-ordre :</b>	Apocrites
<b>Section :</b>	Aculéates
<b>Famille :</b>	Apidés
<b>Genre :</b>	<i>Apis</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Apis mellifera</i>
<b>Sous-espèce :</b>	<i>Apis mellifera intermissa</i> (Buttel-Reepen, 1906)

L'abeille domestique *A.mellifera* est un invertébré de la famille des Apidés, qui possède six pattes et deux paires d'ailes. Elle n'a pas de squelette interne mais dispose d'une enveloppe externe faite de chitine (exosquelette). Son corps comprend trois parties bien distinctes: la tête, le thorax et l'abdomen. Elle possède deux paires d'ailes membraneuses couplées par des crochets, des pièces buccales de type broyeur- lécheur, un cerveau bien développé et une parthénogenèse (Fig.1).

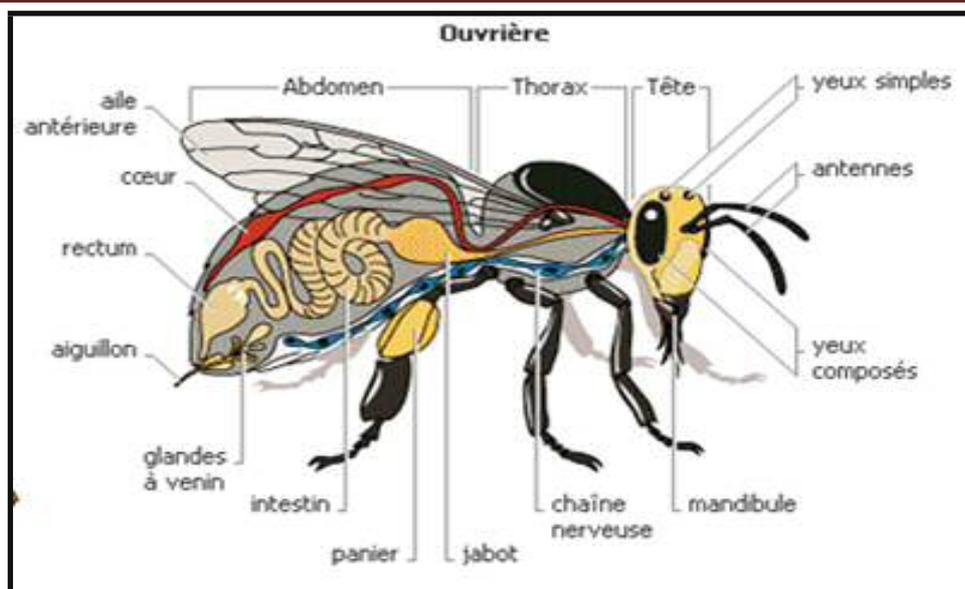


Figure 1. Morphologie de l'abeille (Hennebelle, 2010).

## 2. Structure d'une colonie d'abeille

D'après Le Conte (2002), toute colonie se regroupe dans une ruche. Celle-ci est composée de rayons de cire verticaux plus au moins parallèles, formé sur les deux faces d'une juxtaposition de cellules hexagonales. Ces alvéoles abritent au centre le couvain et à la périphérie les provisions (le pollen et le miel) qui seront consommés ou stockés par les ouvrières magasinieres pour l'hivers. Chaque colonie est composée:

- **Des individus adultes ou (castes):** une seule reine; plusieurs milliers d'ouvrières et quelques centaines de faux bourdons (mâles).
- **Du couvain:** désigne l'ensemble des formes immatures de l'abeille au cours de son développement (oeufs, larves et nymphes):
  - **Couvain ouvert :** qui est constitué des œufs et des larves dont la durée de vie est respectivement 3 et 5 jours pour toutes les castes.
  - **Couvain operculé :** correspond au stade nymphal. Les alvéoles renferment les nymphes sont couvertes par une mince couche de cire produites par les ouvrières cirières. La durée de ce stade diffère d'une caste à une autre. Elle est de 7 jours pour la reine, 13 jours pour l'ouvrière et 16 jours pour le mâle.

Le couvain d'ouvrières et les quelques alvéoles de reines se situent au centre du nid, tandis que le couvain de faux-bourdons se trouve en périphérie. Ils sont différenciables par



leur taille: les alvéoles pour faux-bourçons sont plus larges que celles des ouvrières (fig.2), tandis que les alvéoles pour reines sont beaucoup plus spacieuses (trois à quatre fois plus grande que les alvéoles d'ouvrières) (Von Frisch, 2011).



**Figure 2:** Couvain d'ouvrières et de faux-bourçons (Mallick, 2013). *De haut en bas et de gauche à droite : alvéoles garnies de miel, alvéoles contenant du pollen, couvain de faux-bourçons, couvain d'ouvrières*

### 3. Organisation sociale

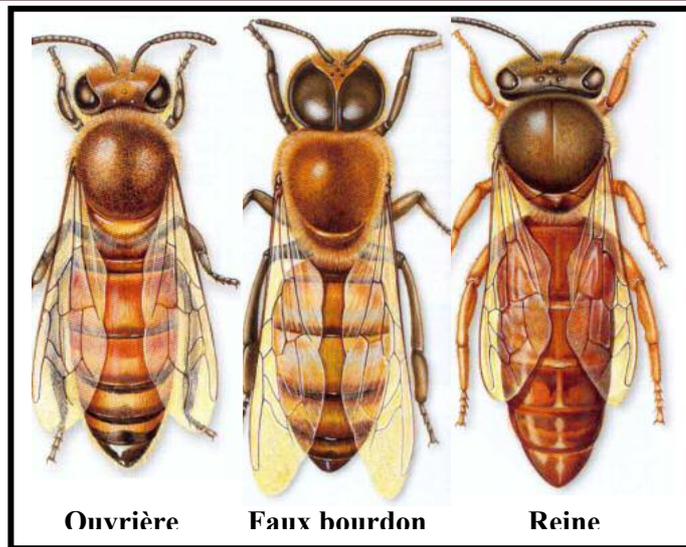
L'abeille est un insecte eu-social qui est défini selon trois critères : une coopération entre les individus adultes dans l'entretien du couvain, une présence simultanée d'au moins deux générations d'adultes et l'existence d'une division reproductible du travail (Wilson, 1971). La colonie d'abeille est organisée selon une structure sociale bien établie, constituée de trois castes: la reine, les ouvrières et les faux bourçons (Fig.3). Fort différents sur le plan morphologique comme dans leur espérance de vie, les membres de chaque caste assurent une tâche particulière. Au sein de la ruche, aucun individu ne peut vivre seul (Clément, 2009). En fonction de la taille et du stade de développement de la colonie, l'effectif de la population peut varier de 20 000 à 80 000 individus, dont une reine, 1000 à 4000 mâles, le reste étant constitué par les ouvrières (Martin, 2001; Le Conte, 2002). Les reines et les ouvrières diploïdes résultent d'oeufs fertilisés. La qualité et la quantité de la nourriture donnée aux larves femelles déterminent si une ouvrière ou une reine sera produite (Laidlaw & Page, 1997; Caron, 1999; Le Conte, 2004; Biri, 2010; Wendling, 2012).



**La reine:** Seule femelle fertile de la colonie est unique. Diploïde, elle résulte d'un œuf fertilisé (Caron, 1999). Elle se différencie par une taille plus grande, un abdomen très développé, un thorax plus volumineux que celui des ouvrières et une langue de taille réduite. Elle est totalement dépourvue des organes spécialisés qui caractérisent les ouvrières. Elle ne peut récolter elle-même la nourriture (qui lui est fournie par les ouvrières). Elle est nourrie à l'état larvaire exclusivement avec de la gelée royale (Clément 2000; Le Conte *et al.*, 2001). Seule la reine pond des œufs susceptibles de générer une descendance pour assurer la pérennité de la colonie. Sa durée de développement est de 16 jours (Laidlaw et Page, 1997) et peut vivre jusqu'à plusieurs années (Fluri, 1994).

**Les ouvrières** (femelles non reproductives): Elles résultent d'œufs fertilisés (Caron, 1999) et représentent la très grande majorité de la population. Elles sont caractérisées par une langue développée qui leur permet la récolte du nectar, des pattes dotées de brosses et d'une corbeille pour la récolte du pollen. Leurs ovaires sont atrophiées mais peuvent dans certaines circonstances pondre des œufs qui ne donneront naissance qu'à des faux bourdons (Ravazzi, 1996; Le Conte, 2002). Leur durée de développement est de 21 jours (Laidlaw & Page, 1997). Leur activité varie au cours de leur vie: nourrices, nettoyeuses, sécrétrices de cire, butineuses de pollen et de miel,...etc. Leur nombre assure, en outre, la régulation thermique de la colonie. Les ouvrières ont une espérance de vie de 15 à 70 jours pour les abeilles d'été et de 170 à 243 jours pour celles d'hiver (Fluri, 1994).

**Les mâles:** Haploïdes, ils dérivent d'œufs infertilisés, pondus par la reine ou par les ouvrières (Caron, 1999). Ils sont caractérisés par un corps plus trapu et une taille plus grande que celle des ouvrières. Ils possèdent aussi des yeux composés de surface plus importante mais pas de dard. Leur organe buccal étant atrophié, ils ne peuvent pas se nourrir et dépendent entièrement des ouvrières pour l'alimentation (Straub, 2007; Le Conte, 2002). La tâche essentielle des mâles est d'assurer la reproduction (fécondation des reines vierges). En outre, ils peuvent aussi aider à réchauffer le couvain ou à répartir le nectar. Il a été découvert également que leur rôle dans la pollinisation des arbres fruitiers était assez important (Fronty, 1990). Leur durée de développement est de 24 jours (Laidlaw & Page, 1997) et dépassent rarement une durée de vie de 60 jours (Page & Peng, 2001).



**Figure 3.** Morphologie des trois castes d'*Apis Mellifera* (Clément, 2011)

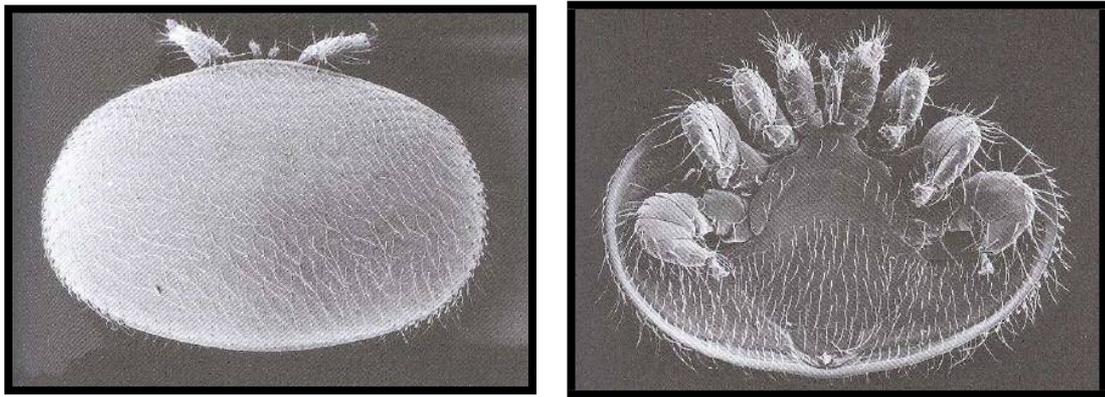
#### 4. Présentation du parasite de l'Abeille

En 2000, Anderson et Trueman distinguent *Varroa destructor* de *Varroa jacobsoni* sur des critères morphologiques et génétiques. Le varroa est un acarien ectoparasite d'*Apis cerana* et d'*Apis mellifera* (Calderone & Lin, 2001). Le varroa que l'on trouve sur les abeilles adultes est une femelle. Il se présente sous forme d'un disque bombé dorsalement, aux contours elliptiques et de couleur brun-roux (Fernandez & Coineau, 2002). Il est généralement installé sur l'abeille entre les segments, où se trouve une membrane très mince, facile à perforer pour prélever l'hémolymphe (Fernandez & Coineau, 2002).

##### 4.1. Position systématique

La classification systématique de *Varroa destructor* est détaillée ci-dessous:

<b>Embranchement :</b>	Arthropodes
<b>Sous embranchement :</b>	Chélicérates
<b>Classe :</b>	Arachnides
<b>Ordre :</b>	Acariens
<b>Sous ordre :</b>	Mesotigmates
<b>Famille :</b>	Dermanycidae (Gamassidae)
<b>Sous famille :</b>	Varroinae
<b>Genre :</b>	<i>Varroa</i>
<b>Espèce :</b>	<i>destructor</i> (Anderson & Trueman, 2000)



**Figure 4.** Photographie au microscope électronique à balayage d'une femelle de *Varroa destructor* (Fernandez & Coineau 2002). *A gauche: vue dorsale / A droite: vue ventrale*



**Figure 5.** *V. destructor* sur une nymphe d'abeille (Ellis & Zettelalen, 2010)



**Figure 6.** *V. destructor* sur une abeille adulte (Ellis & Zettelalen, 2010)



#### 4.2. Cycle de vie du *V. destructor*

Dans les colonies d'*Apis mellifera*, les acariens se reproduisent dans les cellules du couvain des ouvrières et des faux bourdons (De jong *et al.*, 1982b; Boot *et al.*, 1997; Beetsma *et al.*, 1999; Rehm & Ritter, 1989). Le succès reproducteur de l'acarien sur *A. mellifera* est corrélé avec la durée de l'étape d'operculation de son hôte, qui est la plus longue pour les faux bourdons, intermédiaire pour les ouvrières et, courte pour les reines (Martin, 1994). La femelle fondatrice quitte l'ouvrière qui la transporte et se glisse sous la larve 20 heures avant l'operculation des cellules chez les ouvrières et 40h avant chez les faux bourdons (Boot *et al.*, 1992; Infantidis & Rosenkranz, 1988). La femelle passe entre la larve et la paroi de la cellule et progresse jusqu'à la gelée larvaire (Donzé, 1995) où elle va s'immerger (Infantidis, 1988) ce qui lui permet d'être à l'abri des attaques des abeilles. Le premier œuf qu'elle pondra, donnera naissance à un male et les suivants donneront tous naissance à des femelles (Fernandez & Coineau, 2002). La ponte, la fécondation et le développement des acariens se produisent avant l'apparition de l'abeille adulte (Colin *et al.*, 2001). La durée de développement de l'acarien dans les cellules operculées est de 8 à 13 jours (Bowen-Walker & Gunn, 2001). Le male fécondera ses sœurs les femelles filles dès qu'elles atteignent le stade adulte et avant l'éclosion de l'abeille. Lors de l'éclosion, les femelles s'embarquent sur l'abeille et après une période de transport, elles deviennent elles mêmes des femelles fondatrices; elles relanceront ainsi le processus de reproduction dans d'autres cellules de couvain (Fernandez & Coineau, 2002) (fig.7,8).



**Figure 7:** Les différents stades de développement du *V. destructor* (Rosenkrans *et al.*, 2010).  
En haut, de gauche à droite : Protonymphe, deutonymphe mobile, deutonymphe immobile. En bas, de gauche à droite : jeune femelle nouvellement émergée, femelle adulte (le parasite), mâle adulte.



Reproduction à l'intérieur de

Figure 8: Cycle biologique du *V. destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010).

### 5. Technique d'élevage

Les abeilles appartenant à la sous-espèce *intermissa* sont élevées au niveau d'un rucher situé dans la commune de Ben Ammar, wilaya d'El-Tarf, dans le Nord-Est Algérien (36°76'N, 7°80'E) dans des ruches modernes de types Langstroth (fig.9). Ces ruches ne font pas l'objet de transhumance et n'ont pas été traitées avec des pesticides au préalable.



Figure 9. Localisation de la région d'échantillonnage des abeilles



## **6. Sélection des ruches**

Avant les expérimentations, toutes les colonies d'abeilles ont été contrôlées afin d'estimer la densité des populations, la présence du couvain, la présence de nourriture dans chaque ruche et le taux d'infestation.

Un premier lot constitué de quatre groupes de ruches infestées a été sélectionné sur la base d'un taux d'infestation homogène (Floris *et al.*, 2001b; Satta *et al.*, 2005) afin d'évaluer l'efficacité des acaricides sur l'acarien parasite de l'abeille *V. destructor*. Le premier groupe n'a subi aucun traitement et a servi de témoin, le deuxième groupe a été traité avec un acaricide chimique le fluvalinate et les deux autres groupes ont été traités avec un acaricide naturel l'acide oxalique à 3,25g (Charrière *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2011) et à 6,5g (Charrière, 2001). Toutes les expérimentations ont été effectuées durant la période de Septembre - Octobre 2010.

Un deuxième lot, constitué également de quatre groupes de ruches saines exemptes du parasite *V. destructor* (afin d'éviter le biais causé par les maladies et l'infestation), a servi à l'évaluation des éventuels effets secondaires des acaricides. Les quatre groupes de ces ruches ont subi les mêmes traitements précédemment énumérés et un groupe a servi de témoin.

## **7. Présentation des acaricides et traitements**

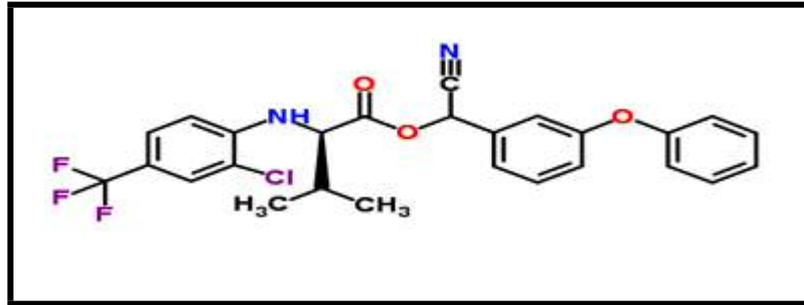
Les traitements acaricides utilisés (fluvalinate et acide oxalique) sont des produits vétérinaires homologués, utilisés dans la lutte contre l'acarien ectoparasite de l'abeille *V. destructor*.

### **7.1. Présentation du fluvalinate**

Le fluvalinate, de formule chimique  $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$  (fig.10) et dont le nom commercial est Apistan (Laboratoire Vita Europe) est non volatil et lipophile avec un temps de demi vie élevé (5 ans) (Bogdanov *et al.*, 2004). C'est un composé de synthèse appartenant à la famille des pyréthriinoïdes. L'acaricide se présente sous forme de lanières en plastique d'environ 25 cm de longueur, de 3 cm de large et de 0,75 cm d'épaisseur à raison de 0,80g de fluvalinate par lanière. Deux lanières sont placées dans la ruche, entre les cadres aussitôt la dernière récolte du miel effectuée et laissées en place six semaines. Ce procédé permet une libération lente de la matière active qui va agir sur les varroas au fur et à mesure de leur sortie



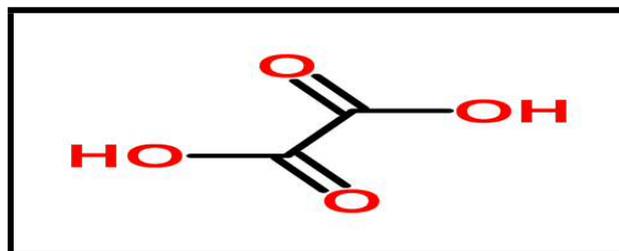
du couvain (Fernandez & Coineau, 2002; Gregorc & Smodis skerl, 2007; Lodesani *et al.*, 2008).



**Figure 10.** Structure chimique du fluvalinate ([www. chemspider.com](http://www.chemspider.com))

## 7.2. Présentation de l'acide oxalique

L'acide oxalique est un acide organique de formule chimique  $H_2C_2O_4$  (fig.11). Ce composé est non volatil et hydrosoluble. Il a été appliqué par dégouttement qui consiste à faire couler goutte à goutte, à l'aide d'une seringue, 50 ml d'une solution d'acide oxalique (6,5g ou 3,25g acide oxalique +100 ml eau + 50g sucre) sur les rayons et sur les abeilles du nid à couvain: 5 ml au niveau des neufs espaces situés entre les dix cadres et 2,5 ml au niveau des deux espaces formés entre le 1er cadre et l'extrémité de la ruche et le 10ème cadre et l'autre extrémité de la ruche (Gregorc & Poklukar, 2003; Gregorc & Smodis Skerl, 2006).



**Figure 11.** Structure chimique de l'acide oxalique ([www. chemspider.com](http://www.chemspider.com))



## **8. Prélèvement des échantillons**

Pour l'étude biochimique et enzymatique, les différents échantillons prélevés correspondent à des ouvrières adultes âgées de 0, 7 et 21 jours après l'exuviation adulte. Les Abeilles ont été préalablement marquées à l'émergence (les abeilles échantillonnées de chaque ruche correspondent à une couleur de marquage précise) afin de faciliter leur datation (Amdam *et al.*, 2004). Les Abeilles récoltées sont transportées au laboratoire dans de petites ruchettes transparentes. Elles sont préalablement immobilisées en les introduisant au réfrigérateur pendant 3 minutes afin de pouvoir effectuer le prélèvement de l'hémolymphe.

Les échantillons hémolympatique ont été prélevés par ponction (3 $\mu$ l par Abeille) au niveau des membranes inter-segmentaires des tergites 2 et 3 de l'abeille (Amdam *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2006). Le prélèvement hémolympatique se fait grâce à des microcapillaires préalablement calibrés. L'hémolymphe est ensuite conservé dans 300  $\mu$ l d'éthanol.

Les corps entiers des Abeilles femelles ont été ôtés de leurs tubes digestifs afin d'éviter tout biais relatif à l'alimentation (Hrassnigg & Crailsheim, 2005) puis pesés avant d'être conservés dans 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) (20%). Ces échantillons sont par la suite, conservés au congélateur jusqu'au dosage des métabolites.

Un deuxième lot d'abeilles ont été décapitées. Les corps pesés, et conservés au frais dans 1 ml de tampon phosphate de sodium ont servis pour le dosage de la glutathion S-transférase. Les têtes pesées et stockées au congélateur dans 1 ml de solution détergente ont permis le dosage de l'Acétylcholinestérase.

## **9. Calcul des taux d'infestation**

Au cours de notre expérience, le taux d'infestation par l'acarien a été évalué dans les colonies traitées et non traitées avec les acaricides, sur des abeilles adultes et le couvain operculé.

### **9.1. Les abeilles adultes**

L'examen des abeilles adultes permet d'établir leur niveau d'infestation et d'évaluer l'importance de la population de l'acarien. Pour cela une collecte de 300 abeilles sur environ 3 rayons par ruche a été effectuée (Ritter & Ruttner, 1980; Floris *et al.*, 2001b; Satta *et al.*, 2005).



Après avoir localisé la reine afin d'éviter de la perdre au moment de la capture des abeilles, un cadre est pris d'une main et avec l'autre un coup sec est donné au dessus d'un entonnoir qui débouche dans un récipient contenant de l'alcool et pourvu d'une étiquette avec l'identification de l'échantillon qui comporte la date de l'échantillonnage ainsi que le numéro de la ruche (Fernandez & Coineau, 2002). L'opération est alors répétée avec d'autres cadres de la même ruche de façon à capturer 300 à 500 abeilles (Floris, 1992).

Après avoir effectué les récoltes nécessaires des différentes ruches, les récipients contenant les abeilles, sont agités modérément puis laissés reposés quelques minutes. Le contenu du bocal est vidé dans un petit bac blanc. Les abeilles sont ensuite retirées une à une à l'aide d'une pince tout en s'assurant en les agitant dans l'alcool du bac qu'aucun varroa n'est resté accroché. Une cale en bois placée sous le bac permet d'avoir une bonne profondeur d'alcool du coté opposé. La même opération est répétée pour chaque bocal des différentes ruches.

Après avoir effectué le comptage des abeilles, on vide le flacon, ensuite on procède au comptage des varroas en les passant au sec à l'aide d'un pinceau (Fernandez & Coineau, 2002).

On connaît alors le nombre d'abeilles et le nombre de varroas, ce qui permet d'établir le taux d'infestation.

$$\text{Taux d'infestation estimatif} = \frac{\text{Nombre de varroas}}{\text{Nombre d'abeilles}} \times 100$$

## **9.2. Le couvain operculé**

L'estimation du taux d'infestation peut être une méthode très précise en prenant en considération à la fois des échantillons du couvain et des abeilles adultes (Branco et *al.*, 2006).

L'examen du couvain operculé consiste à prélever les varroas qui se trouvent dans les cellules operculées du couvain. Pour cela, un morceau de couvain est prélevé avec un



couteau bien affûté en guidant la découpe à l'aide d'une planchette de 8 cm sur 4. Le nombre de cellules qui doivent être examinées se situe aux environs de 300 (Floris, 1992). La planchette est ensuite placée au centre du cadre, là où le nombre de cellules operculées est le plus important. Le morceau du couvain operculé est d'abord enveloppé dans du papier journal, mis dans un sac en plastique puis étiqueté. C'est au laboratoire que l'on procédera à la désoperculation des cellules. Pour cela, on travaille dans un petit bac blanc et l'on doit avoir trois flacons étiquetés avec les mêmes renseignements que sur le sac en plastique et contenant tous de l'alcool à 70%. Dans deux d'entre eux, on y mettra des abeilles, le troisième est destiné à recevoir les acariens (Fernandez & Coineau, 2002).

La désoperculation s'effectue à l'aide d'une petite pince qui permet de saisir les abeilles. Les abeilles non parasitées sont mises dans le premier récipient pour permettre plus tard de les compter tranquillement. Celles qui sont parasitées sont mises dans le deuxième récipient et les acariens obtenus dans le troisième. Un pinceau mouillé à l'alcool est également passé à l'intérieur des cellules pour vérifier qu'il n'y a plus de varroas. A la fin de l'opération, on compte les acariens obtenus ainsi que les abeilles parasitées et non parasitées (Fernandez & Coineau, 2002). Cette technique de lavage à l'alcool peut être un bon indicateur afin d'estimer les niveaux d'infestation des abeilles par le varroa (Stanghellini & Raybold, 2004). Le taux d'infestation (exprimé en %) est estimé selon la formule:

$$\text{Taux d'infestation estimatif} = \frac{\text{Nombre de varroas récoltés}}{\text{Nombre de cellules échantillonnées}} \times 100$$

On peut estimer à titre indicatif (Robaux, 1986) :

- Qu'une colonie ayant un taux d'infestation de 5% est une colonie faiblement parasitée, sans risque immédiat.
- Qu'un taux d'infestation situé entre 5% et 10% correspond à une colonie sérieusement atteinte et qu'il faut faire un traitement.
- Que les colonies qui présentent entre 10% et 20% de parasites doivent être immédiatement traitées.
- Enfin, si les colonies présentent plus de 20%, elles ont une haute probabilité de s'effondrer au bout de quelques jours ou de quelques semaines.



## 10. Calcul du taux d'efficacité

Le nombre d'acarien tombés des ruches traitées et témoins a été compté chaque semaine en utilisant un plateau enduit de vaseline et déposé sur le fond de chaque ruche (Gregorc & Jelenc, 1996; Floris et al., 2001a; Gregorc & Planincy, 2005). Le plateau est muni d'un grillage empêchant les abeilles d'y accéder (Calderone & Lin, 2003; Gregorc et Planincy, 2005).

La mortalité du varroa a été enregistrée une semaine avant le traitement et chaque semaine durant la période de traitement (6 semaines) et enfin, une semaine après le traitement

L'efficacité des traitements acaricides a été évaluée sur la base du pourcentage de mortalité du varroa en tenant compte aussi de la mortalité naturelle des acariens dans les ruches témoins (Floris et al., 2001a, 2004; Satta et al., 2005) selon la formule:

$$M\% = 100 [ 1 - (Bc \cdot At / Bt \cdot Ac) ]$$

Bt et At: Correspondent aux taux d'infestation par le varroa dans les ruches traitées respectivement avant et après traitement

Bc et Ac: Correspondent aux taux d'infestation par le varroa dans les ruches non traitées (témoins) respectivement avant et après traitement.

## 11. Extraction et dosage des métabolites dans le corps

L'extraction des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) a été réalisée selon le procédé de Shibko et al. (1966) sur le corps des Abeilles ouvrières adultes *d'A.m. intermissa* récoltées à 0, 7 et 21 jours et conservées dans 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20% (Fig. 15).

Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100 µl et les taux des différents métabolites du corps ont été quantifiés grâce aux équations des droites de régression déterminées à partir des courbes de références (Fig. 12, 13 et 14).



### 11.1. Dosage des protéines

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de coomassie G 250 comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard (Tableau 1). La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm (Fig. 13).

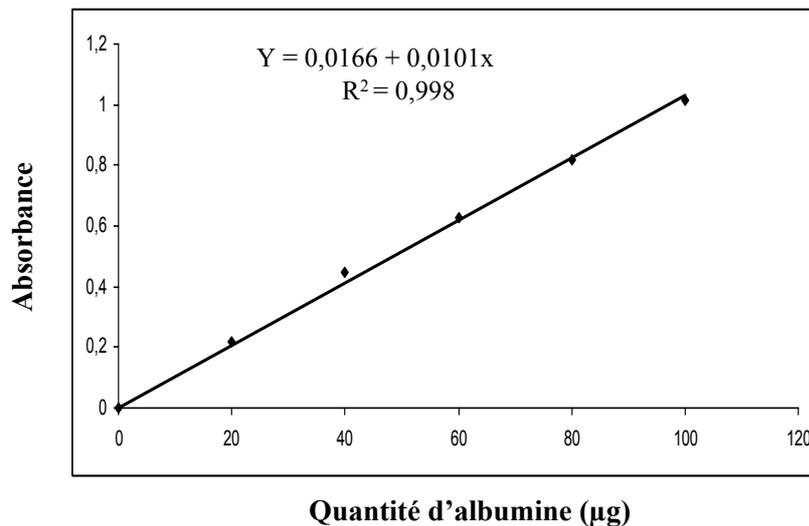
Le Bleu brillant de coomassie se prépare comme suit:

- 100 mg de BBC + 50 ml d'éthanol + Agitation pendant deux heures + 100 ml d'acide ortho-phosphorique à 85% et le tout est complété à 1000 ml avec l'eau distillée.

**Tableau 1:** Dosage des protéines du corps de l'Abeille: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

La droite de régression est la suivante:



**Figure 12.** Dosage des protéines du corps: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).



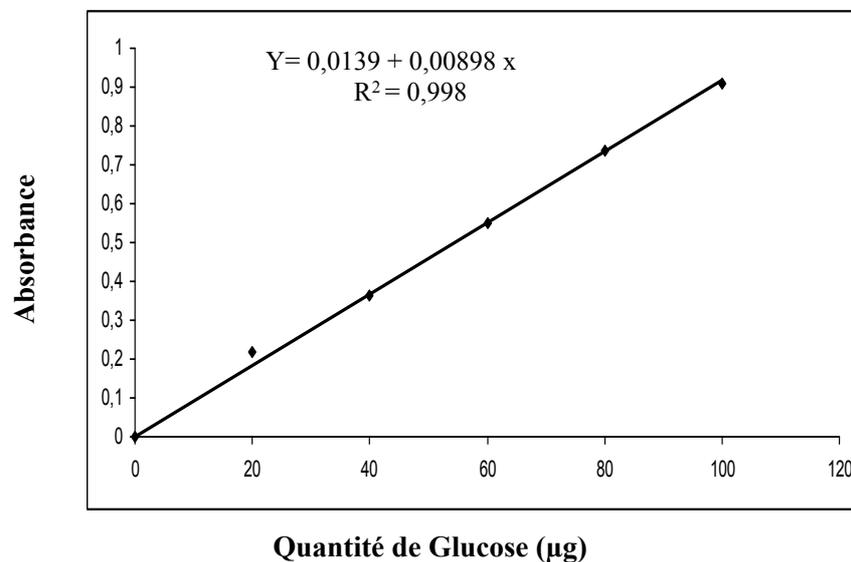
### 11.2. Dosage des glucides

Le dosage des glucides a été réalisé selon Duchateau & Florkin (1959). Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillée) et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard (Tableau 2). La lecture des absorbances est réalisée à 620 nm (Fig.14).

**Tableau 2:** Dosage des glucides du corps de l'Abeille : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

La droite de régression est la suivante:



**Figure 13.** Dosage des glucides du corps: droite de régression exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose (µg).



### 11.3. Dosage des lipides

Les lipides ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy et *al.* (1972) utilisant la vanilline<sup>1</sup> comme réactif et une solution mère de lipides<sup>2</sup> (2,5µl) comme standard (Tableau 3). Les absorbances sont lues, après 30 minutes d'obscurité, à une longueur d'onde de 530 nm (Fig.15).

<sup>1</sup>: 0,38 g de vanilline + 55 ml d'eau distillée + 195 ml d'acide ortho-phosphorique à 85%

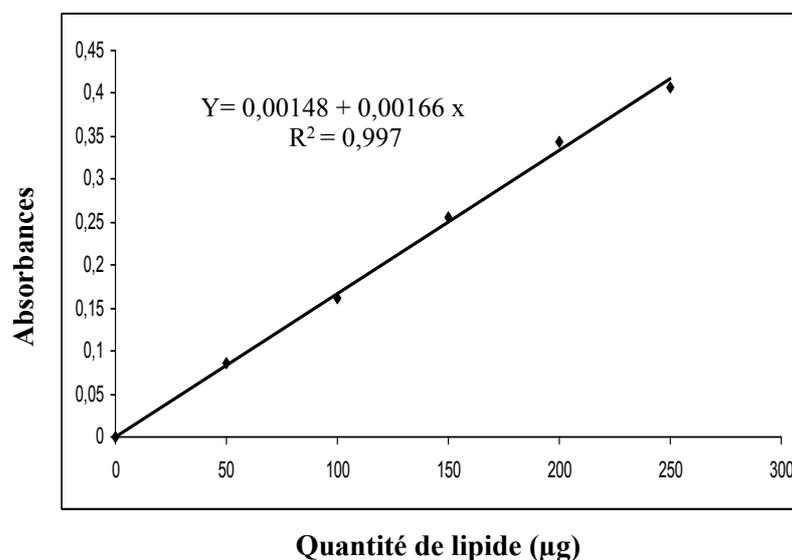
<sup>2</sup>: 25 mg d'huile de table + 10 ml de solvant éther/chloroforme (V/V).

Le dosage des lipides du corps des Abeilles a été effectué dans une fraction aliquote de 100µl.

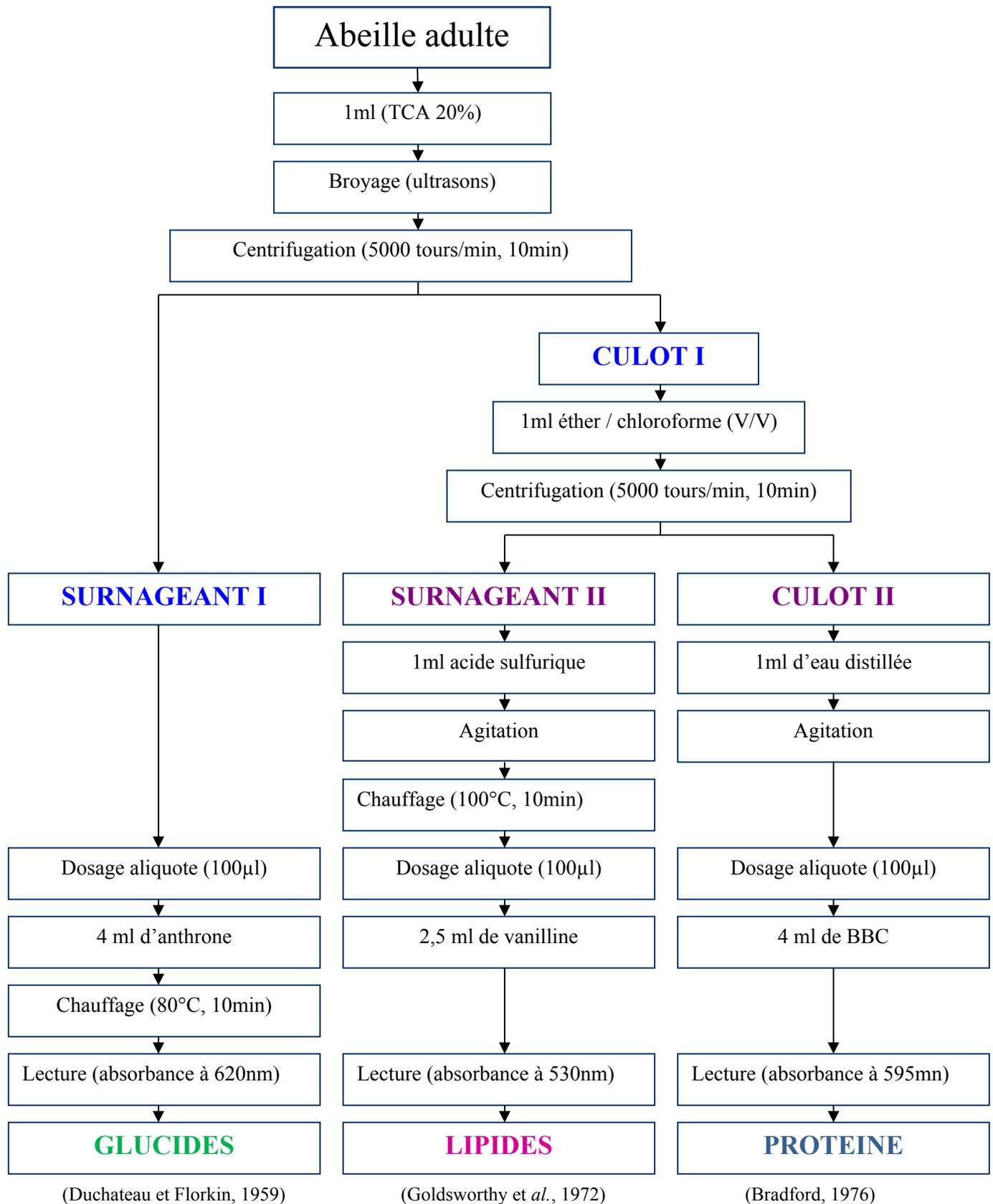
**Tableau 3** : Dosage des lipides du corps de l'Abeille : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant Ether-Chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

La droite de régression est la suivante:



**Figure 14.** Dosage des lipides du corps : droite de régression exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité d'huile de table (µg).



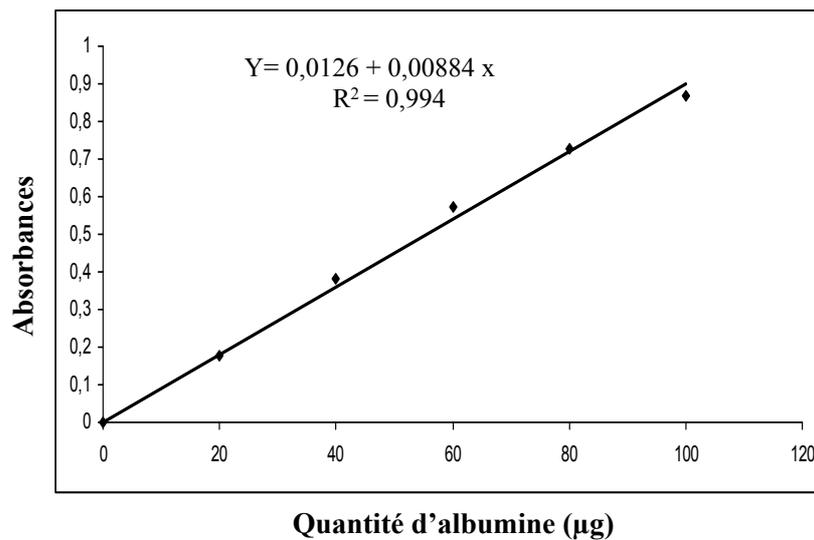


**Figure 15.** Extraction (d'après Shibko *et al.*, 1966) et dosage des glucides, lipides et protéines selon Duchateau et Florkin, (1959), Goldsworthy *et al.*, (1972) et Bradford, (1976) respectivement.

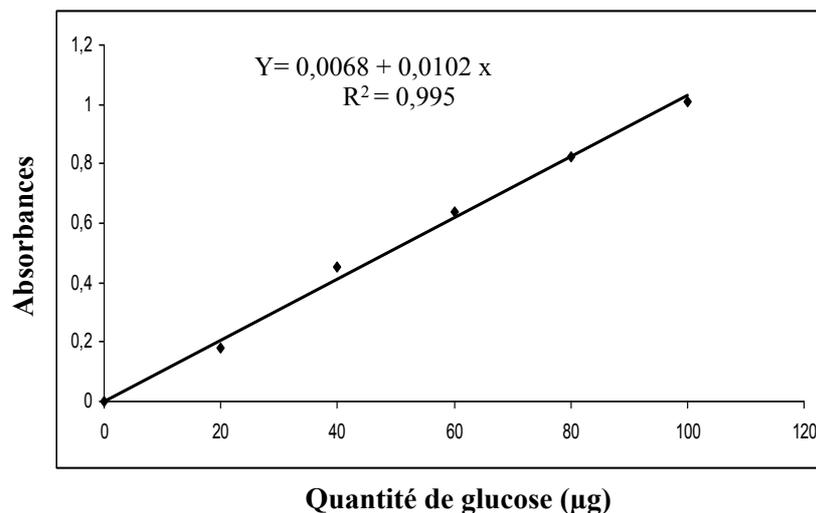
## 12. Dosage des métabolites dans l'hémolymphe

La concentration en protéines, glucides et lipides a été déterminée au niveau de l'hémolymphe des ouvrières adultes d'*A.m.intermissa* récoltées à 0, 7 et 21 jours.

Les dosages de chaque métabolite ont été effectués sur une fraction aliquote de 100µl selon les méthodes précédemment décrites. Les concentrations des différents métabolites de l'hémolymphe ont été quantifiées grâce aux équations des droites de régression respectives déterminées à partir des courbes de références (Fig. 16, 17 et 18).

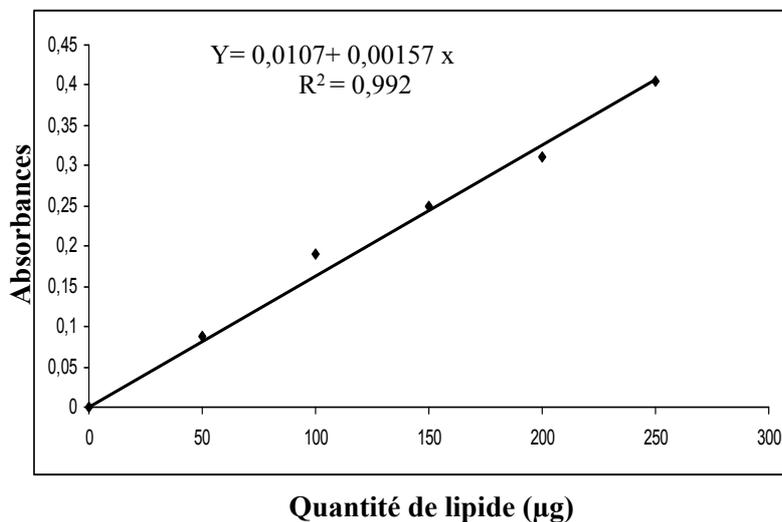


**Figure 16.** Dosage des protéines hémolympatiques : droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).





**Figure 17.** Dosage des glucides hémolympmatiques: droite de régression exprimant l'absorbance à 620 nm en fonction de la quantité de glucose ( $\mu\text{g}$ ).



**Figure 18.** Dosage des lipides hémolympmatiques: droite de régression exprimant l'absorbance à 530 nm en fonction de la quantité d'huile de table ( $\mu\text{g}$ ).

### 13. Dosages des activités enzymatiques

#### 13.1. Dosage de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase

Le dosage de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) a été réalisé selon la méthode d'Ellman et *al.* (1961) qui consiste à fournir à l'enzyme AChE un substrat artificiel, l'acétylcholine dont l'hydrolyse libérera de l'acide acétique et de la thiocholine. Cette dernière, en présence du DTNB (acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque), donne un produit jaune : le TNB (acide 5-thio-2-nitrobenzoïque) que l'on dose à une longueur d'onde de 412 nm.

Les têtes des abeilles ouvrières des groupes témoins et traités (pool de trois têtes) ont été homogénéisées dans 1ml de solution détergente<sup>1</sup> à l'aide d'un homogénéiseur à ultrasons. L'homogénat a été centrifugé (5000 tours/min pendant 5 min) et le surnageant récupéré a servi comme source d'enzyme pour la mesure de l'activité de l'AChE.



Le dosage de l'activité de l'AChE a été réalisé sur une fraction aliquote de 100 µl de surnageant à laquelle ont été ajoutés 100 µl de DNTB<sup>2</sup> et 1 ml de tampon Tris (0,1 M, pH 7). Après 3 à 5 min, et afin d'épuiser la réaction spontanée, 100 µl de solution substrat acétylthiocholine<sup>3</sup> ont été rajoutés. La lecture des absorbances a été faite toutes les 4 min pendant 20 min à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc de gamme où 100 µl de solution détergente remplaçant la source d'enzyme. L'activité spécifique a été déterminée selon la formule:

$$X (\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta \text{DO} / \text{mn}}{1,36 \times 10^4} \times \frac{V_t}{V_s} / \text{mg de protéines}$$

**Δ DO:** pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

**Vt:** Volume total de la cuve = 1,3ml (0,1 ml du surnageant + 0,1 ml DTNB + 1 ml Tampon Tris + 0, 1 ml acétylcholine).

**Vs:** Volume du surnageant (0,1 ml).

**1,36 x 10<sup>4</sup>:** coefficient d'extinction molaire du DTNB (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**mg de protéines:** quantité de protéine exprimée en mg.

<sup>1</sup>: 38,03 mg éthylène glycol bis bêta aminoéthyl éther N,N,N',N'-tetraacétique (EGTA) + 1 ml Triton X 100% + 5,845 g NaCl (1N)+ 80 ml tampon Tris (10mM, pH 7).

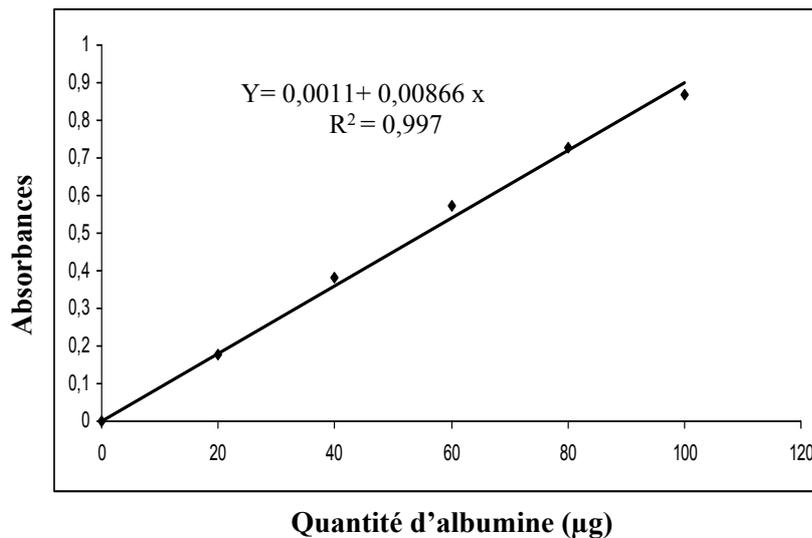
<sup>2</sup>: 39,6 mg DTNB + 15 mg CO<sub>3</sub>HNa dans 10 ml du tampon Tris (0,1 M, pH 7).

<sup>3</sup>: 118 mg acétylthiocholine + 5 ml eau distillée.

Les protéines ont été également quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de Coomassie G 250 comme réactif et l'albumine de sérum de boeuf (BSA) comme standard (1mg/ml). La lecture des absorbances a été réalisée à une longueur



d'onde de 595 nm. Les teneurs des protéines ont été quantifiées grâce à l'équation de la droite de régression déterminée à partir de la courbe de référence (Fig. 19).



**Figure 19.** Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).

### 13.2. Dosage de l'activité spécifique de la glutathion S-transférase

Le dosage de l'activité de la GST a été réalisé selon la méthode de Habig et *al.* (1974) basée sur la mesure photométrique de la cinétique de conjugaison du produit formé avec un substrat : le 1-chloro-2,4 dinitrobenzène (CDNB) en présence d'un co-facteur: le glutathion (GSH). Les abeilles décapitées ont été d'abord débarrassées de leur dard et de la glande à venin (Popadopoulos et *al.*, 2004) puis ont été homogénéisées dans 1ml de tampon de phosphate<sup>1</sup> de sodium (0,1 M ; pH6) à l'aide d'un broyeur à ultrasons dans une cuve remplie de glace. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé à 14000 tours/min pendant 30 minutes et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

La méthode utilisée dans notre dosage consiste à faire agir les GSTs contenus dans l'échantillon, sur un mélange de GSH + CDNB à une température ambiante. Une fraction



aliquote de surnageant de 0,2 ml a été ajoutée à 1,2 ml du mélange [CDNB (1Mm) – GSH (5mM)]<sup>2</sup> dans un tampon phosphate (0,1M ; pH6). La lecture des absorbances se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec 0,2 ml d'eau distillée remplaçant le surnageant. La variation de la densité optique due à l'apparition du complexe CDNB-GSH est mesurée toutes les minutes pendant 5 minutes et à une longueur d'onde de 340 nm dans un spectrophotomètre UV. L'activité de l'enzyme a été déterminée d'après la formule suivante:

$$X (\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta \text{DO}}{9,6} \times \frac{V_t}{V_s} / \text{mg de protéines}$$

**$\Delta \text{DO}$**  : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

**9,6** : coefficient d'extinction molaire du CDNB ( $\text{m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

**$V_t$** : Volume total de la cuve = 1,4ml (0,2 ml du surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB-GSH)

**$V_s$** : Volume du surnageant dans la cuve (0,2 ml).

**mg de protéines**: quantité de protéine exprimée en mg.

<sup>1</sup> – 61,5 ml (solution A) + 438,5 ml (solution B) + 21,3925 g de saccharose.

- (solution A: 17,805 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dilué dans 500 ml d'eau distillée).

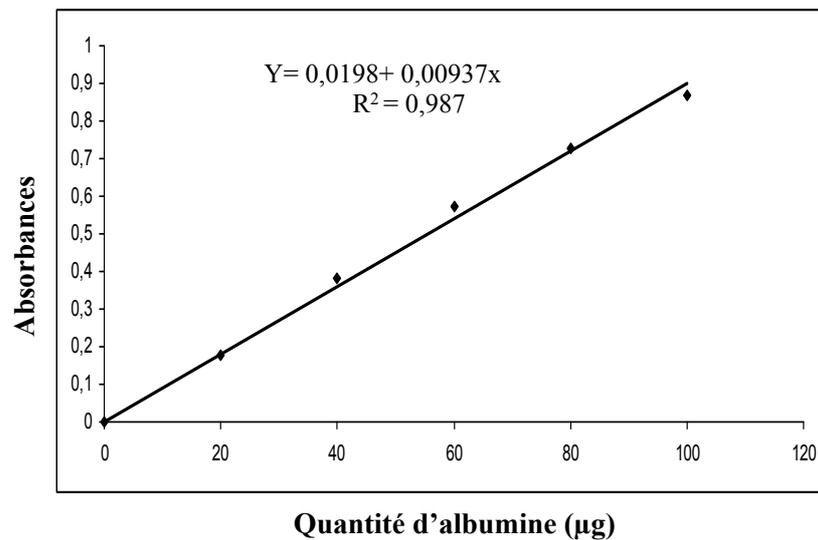
- (solution B: 6,39 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dilué dans 500 ml d'eau distillée).

<sup>2</sup> – 4,052 mg CDNB + 30,73 mg GSH + 0,8 ml éthanol + 20 ml tampon phosphate.

Aussi, les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de Coomassie G 250 comme réactif et l'albumine de sérum de boeuf (BSA) comme standard (1mg/ml). La lecture des absorbances a été réalisée à une longueur d'onde de



595 nm. Les teneurs des protéines ont été quantifiées grâce à l'équation de la droite de régression déterminée à partir de la courbe de référence (Fig. 20).



**Figure 20.** Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).

## 14. Analyse statistique

### 14.1. Analyse de l'efficacité des acaricides

Les données relatives aux nombres d'acariens ainsi que celles relatives aux pourcentages de mortalité sont exprimées en moyennes  $\pm$  standard erreur ( $m \pm SE$ ). L'analyse de la variance à un critère de classification et le test de Tukey au seuil de  $p=0,05$  ont été appliqués.

Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement statistique des données MINITAB version 13.3.1 (X, 2000).

### 14.2. Analyse biochimique et enzymatique



Les données relatives aux teneurs et aux concentrations des protéines, glucides et lipides ainsi que celles relatives aux activités spécifiques enzymatiques sont exprimées en moyennes  $\pm$  standard erreur ( $m \pm SE$ ). L'analyse de la variance à un critère de classification et le test de Tukey au seuil de  $p=0,05$  ont été appliqués. Pour toutes les séries données, l'égalité des variances a été contrôlée par les tests de Bartlett et de Levene.

# *RESULTATS*



## RÉSULTATS

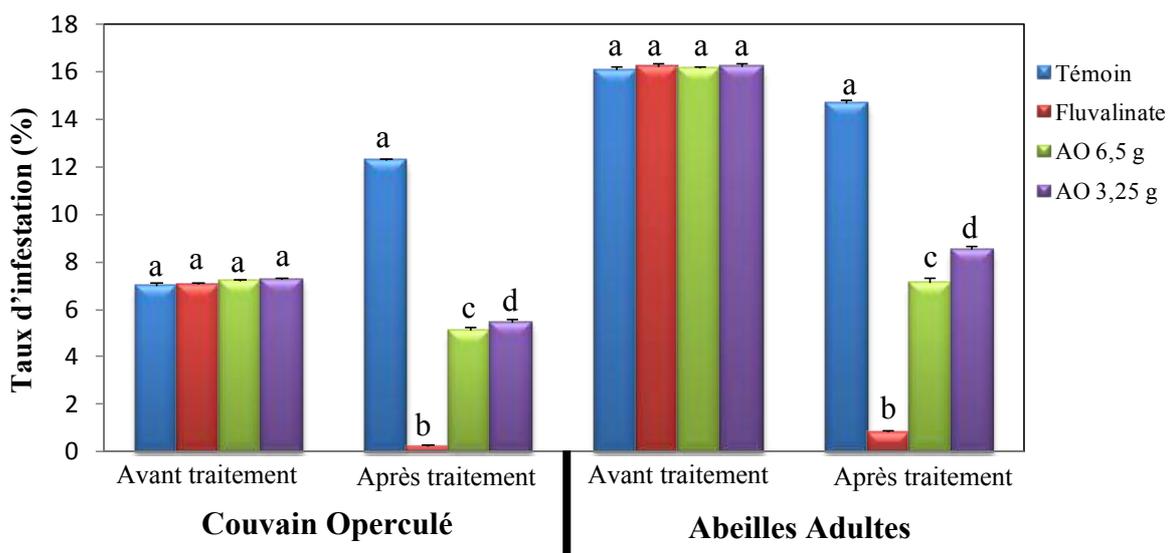
### 1. Taux d'infestation

Les taux d'infestation des abeilles par l'acarien *Varroa destructor* avant et après traitement sont illustrés par la figure 21.

Les résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification avant traitement montrent qu'aucune différence significative n'a été constatée, que ce soit pour l'infestation du couvain ( $p= 0,283$ ) ou celle des abeilles adultes ( $p= 0,809$ ) (Annexe 1: tableau 1). Ainsi, les traitements acaricides peuvent être évalués selon leur efficacité.

A la fin du traitement, les niveaux d'infestation sont significativement plus faibles dans les ruches traitées par rapport aux témoins ( $p < 0,001$  pour le couvain operculé;  $p < 0,001$  pour les ouvrières adultes). Les traitements testés entraînent une mortalité importante du varroa, ce qui explique le faible taux d'infestation obtenu après la période de traitement (Annexe 1: tableau 2).

Dans les ruches n'ayant pas été traitées (témoins), l'infestation des abeilles par l'acarien *V. destructor* continue d'augmenter.



**Figure 21.** Taux d'infestation (%) par *Varroa destructor* d'*A.m. intermissa* avant et après traitement aux acaricides dans les ruches expérimentales ( $m \pm SE$ ).



## 2. Efficacité des traitements

Le nombre d'acariens récoltés chaque semaine sur le fond de chaque ruche est donné dans le tableau 4.

Une semaine avant le début du traitement, le nombre d'acariens récoltés n'est pas significativement différent ( $p = 0,287$ ) dans l'ensemble des ruches. Au cours des deux premières semaines de traitement, toutes les ruches traitées présentent un nombre significativement plus élevé d'acariens récupérés sur les plateaux grillagés comparativement aux ruches témoins ( $p < 0,001$ ). Aussi, le nombre d'acariens récoltés est significativement plus élevé dans les ruches traitées avec l'acaricide synthétique fluvalinate comparativement aux ruches traitées avec l'acide oxalique, aux deux doses testées (6,5g et 3,25g).

Dans les ruches non traitées, une mortalité plus élevée des acariens est constatée après la 4<sup>ème</sup> semaine jusqu'à la fin de l'expérience, comparativement aux ruches traitées, probablement dû à une augmentation du niveau d'infestation dans ces ruches.



**Tableau 4:** Nombre moyen de *V. destructor* morts par semaine avant, pendant et après traitement aux acaricides dans les ruches expérimentales (m ± SE).

Périodes	Témoin	fluvalinate	A.O 6,5 g	A.O 3,25g	ANOVA
1 <sup>ère</sup> semaine avant le début du traitement	104,75±8,04 <b>a</b>	101,25±5,42 <b>a</b>	105,25±3,47 <b>a</b>	91,25±3,94 <b>a</b>	p > 0,05
1 <sup>ère</sup> semaine de traitement	99,50 ± 5,06 <b>a</b>	1724,3 ± 45,8 <b>b</b>	984,3 ± 24,6 <b>c</b>	743,3 ±37,7 <b>d</b>	p < 0,001 ***
2 <sup>ème</sup> semaine de traitement	56,75 ± 3,84 <b>a</b>	180,0 ± 4,56 <b>b</b>	68,0 ± 2,86 <b>c</b>	65,75 ±4,05 <b>c</b>	p < 0,001 ***
3 <sup>ème</sup> semaine de traitement	44,50 ± 3,43 <b>a</b>	40,50 ± 3,43 <b>a</b>	26,25 ± 2,53 <b>b</b>	25,75 ±1,75 <b>b</b>	p < 0,001 ***
4 <sup>ème</sup> semaine de traitement	29,25 ± 2,81 <b>a</b>	16,50 ± 1,55 <b>b</b>	15,75 ± 1,38 <b>b</b>	16,25 ±2,17 <b>b</b>	p < 0,01 **
5 <sup>ème</sup> semaine de traitement	57,50 ± 2,63 <b>a</b>	10,0 ± 0,913 <b>b</b>	12,0 ± 1,47 <b>b</b>	11,25 ±2,02 <b>b</b>	p < 0,001 ***
6 <sup>ème</sup> semaine de traitement	48,75 ± 1,49 <b>a</b>	4,5 ± 0,645 <b>b</b>	8,5 ± 1,55 <b>b</b>	7,75 ± 1,38 <b>b</b>	p < 0,001 ***
1 <sup>ère</sup> semaine après la fin du traitement	51,0 ± 1,47 <b>a</b>	1,75 ± 0,490 <b>b</b>	5,75 ± 0,629 <b>c</b>	6,5 ± 0,645 <b>c</b>	p < 0,001 ***

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de p > 0,05.

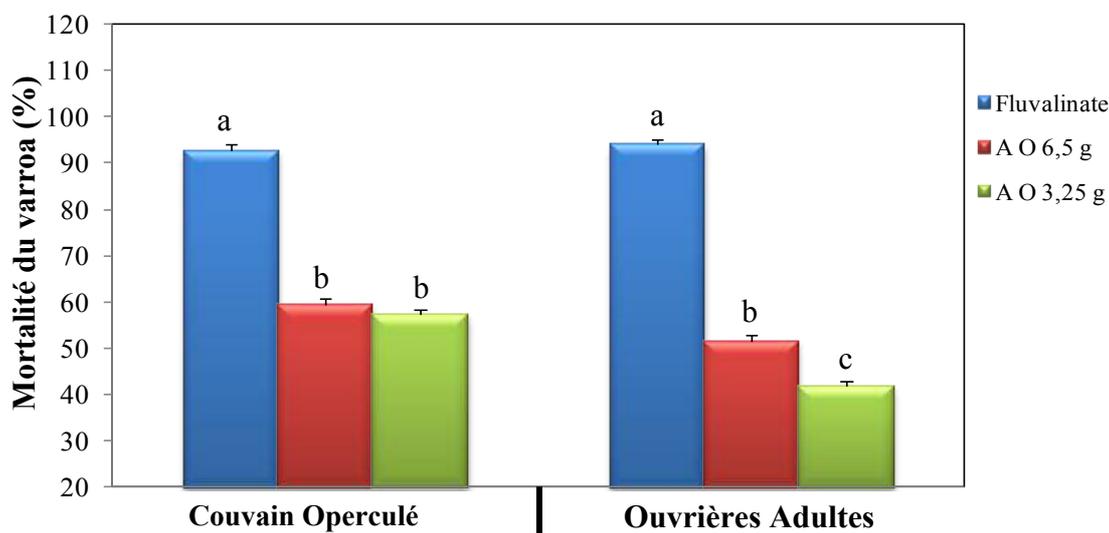
\*\* : Différences très significatives.

\*\*\* : Différences hautement significatives.

Les résultats de l'analyse de la variance montrent une différence hautement significative (p < 0,001) dans l'efficacité entre les deux traitements acaricides (fig. 22). En effet; l'efficacité la plus élevée est obtenue avec l'acaricide synthétique (fluvalinate), où le pourcentage enregistré de la mortalité des acariens est de 94,13 ± 0,85 pour les abeilles



adultes et de  $92,85 \pm 1,14\%$  pour le couvain operculé. Par contre pour l'acaricide naturel (acide oxalique), l'efficacité de traitement dans le contrôle de l'infestation du varroa est de  $51,37 \pm 1,51$ ;  $59,45 \pm 1,20\%$  et  $41,91 \pm 1,02$ ;  $57,23 \pm 1,23\%$  pour les abeilles adultes et le couvain operculé pour les doses 6,5g et 3,25g respectivement (Annexe 1: tableau 3).



**Figure 22.** Efficacité moyenne des traitements acaricides à l'encontre de *V. destructor* évalué selon le pourcentage de mortalité.

### 3. Effets des acaricides sur les métabolites du corps et de l'hémolymphe

Une analyse de la variance (ANOVA) à un critère de classification relative aux différentes molécules d'acaricides testées (fluvalinate et acide oxalique aux doses 6,5 et 3,25g) sur la concentration et la teneur des métabolites (protéines, glucides et lipides) dans l'hémolymphe et le corps des ouvrières adultes d'*A. m. intermissa* âgées de 0, 7 et 21 jours a été réalisée.

#### 3.1. Effets des acaricides sur les métabolites dans le corps entier

L'étude biochimique a permis de déterminer les taux des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) dans le corps des Abeilles ouvrières adultes témoins et traitées avec l'acide oxalique (6,5 g, 3,25 g) et le fluvalinate à différents âges de la vie adulte.



### 3.1.1. Taux des protéines

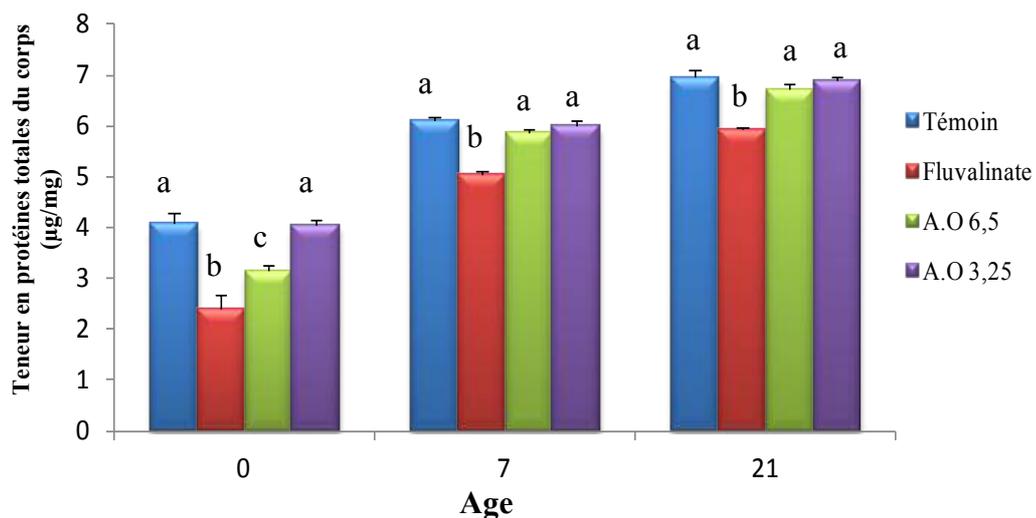
L'analyse de la variance à un critère de classification montre un effet traitement hautement significatif ( $p < 0,001$ ) sur les teneurs en protéines du corps chez les ouvrières âgées de 0, 7 et 21 jours.

La comparaison des moyennes montre des différences significatives ( $p < 0,001$ ) entre les groupes témoins et traités et entre les différents traitements pour la même série d'âge (Annexe 1: tableau 4).

Une diminution significative des protéines du corps par rapport aux témoins est observée après traitement avec le fluvalinate chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours (Fig. 23)

Une diminution significative des protéines du corps est observée également après traitement avec l'acide oxalique (6,5 g) chez les abeilles âgées de 0 jour par contre aucune différence significative n'a été observée chez celles âgées de 7 et 21 jours (Annexe 1:Tableau 4).

Aucune différence n'a été observée par rapport aux séries témoins après traitement avec l'acide oxalique à la dose 3,25 g chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours.



**Figure 23.** Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la teneur en protéines totales dans le corps entier ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) chez les Abeilles adultes *d'A.m intermissa*: ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).



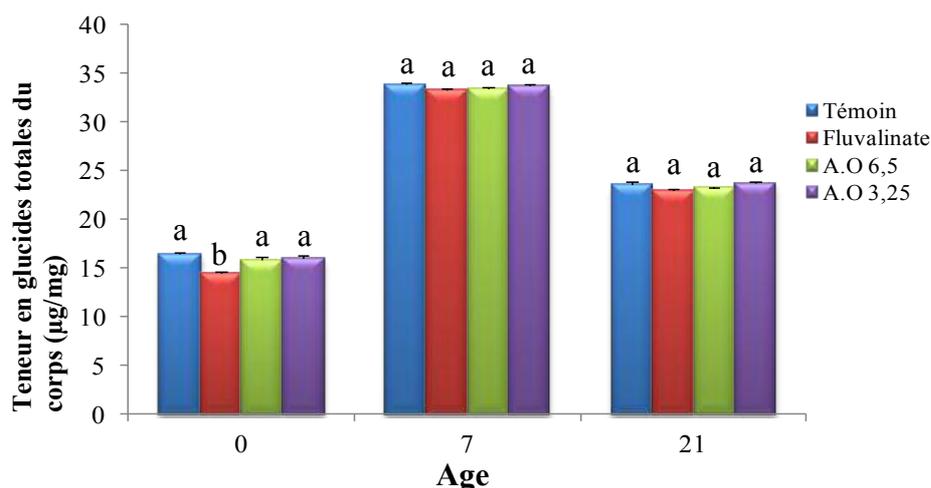
Le classement effectué selon le test de Tukey révèle l'existence de trois groupes chez les abeilles âgées de 0 jour. Le premier groupe est représenté par les abeilles témoins et celles traitées avec l'acide oxalique (3,25 g), le deuxième par les abeilles traitées avec l'Acide oxalique (6,5 g) et le dernier groupe, par celles traitées avec le fluvalinate.

Les abeilles âgées de 7 et 21 jours sont classées chacune en deux groupes. Le premier groupe représente les abeilles témoins et celles traitées avec l'acide oxalique (6,5 g et 3,5 g) et le second par celles traitées par le fluvalinate.

### 3.1.2. Taux des glucides

L'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet traitement significatif ( $p = 0,022$ ) sur les teneurs en glucides du corps des ouvrières à l'émergence âgées de 0 jours traitées par le fluvalinate (Annexe 1: tableau 5). En effet; Une diminution significative des glucides du corps par rapport aux témoins a été observée. Cependant, aucun effet traitement n'est observable ( $p = 0,055$  et  $0,133$ ) chez les ouvrières adultes âgées respectivement de 7 et 21 jours (fig.24).

Aucune différence n'a été observée par rapport aux séries témoins après traitement avec l'acide oxalique aux deux doses testées (3,25 g et 6,5 g) chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours (Annexe 1: tableau 5).



**Figure 24.** Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur les teneurs en glucides totaux dans le corps entier ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez des Abeilles adultes *d'A.m. intermissa* : ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).



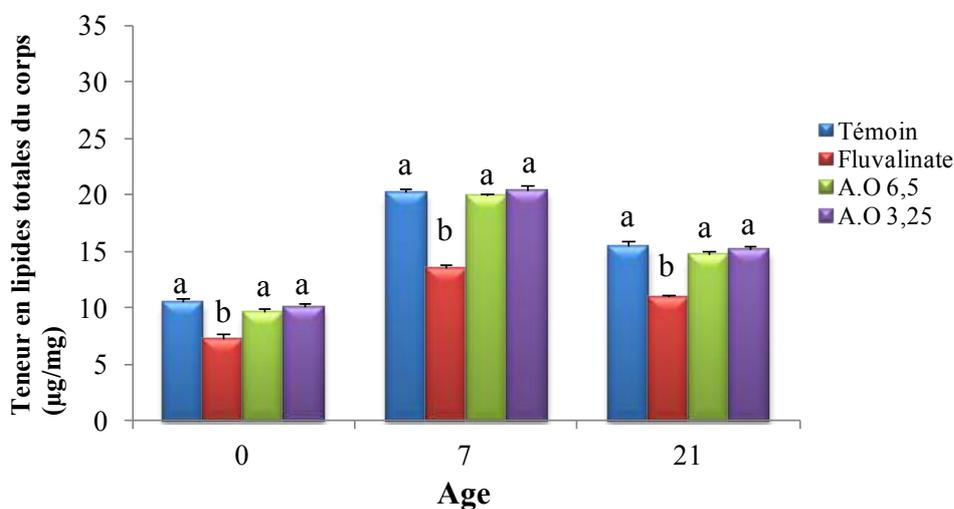
Le classement effectué selon le test de Tukey révèle l'existence chez les abeilles âgées de 0 jour de deux groupes. Le premier groupe est représenté par les abeilles témoins et celles traitées avec l'Acide oxalique (3,25 g et 6,5 g) et le second groupe par celles traitées avec le Fluvalinate. Les abeilles âgées de 7 et 21 jours sont classées chacune en un seul groupe.

### 3.1.3. Taux des lipides

Les résultats de l'ANOVA montrent un effet traitement hautement significatif ( $p < 0,001$ ) sur les teneurs en lipides du corps des ouvrières âgées de 0, 7 et 21 jours (Annexe 1: tableau 6).

La comparaison des moyennes montre des différences significatives entre les groupes témoins et traités et entre les différents traitements pour la même série d'âge. Une diminution significative des lipides du corps par rapport aux témoins est observée après traitement avec le fluvalinate chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours (fig. 25).

Aucune différence n'a été observée par rapport aux séries témoins après traitement avec l'acide oxalique (3,25 g et 6,5 g) chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours (Annexe 1: tableau 6).



**Figure 25:** Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la teneur en lipides totaux dans le corps entier ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) chez des Abeilles adultes *d'A.m. intermissa* : ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Le classement effectué selon le test de Tukey révèle l'existence chez les abeilles âgées respectivement de 0, 7 et 21 de deux groupes. Le premier groupe est représenté par les



abeilles témoins et celles traitées avec l'Acide oxalique (3,25 g et 6,5 g) et le second par celles traitées avec le fluvalinate.

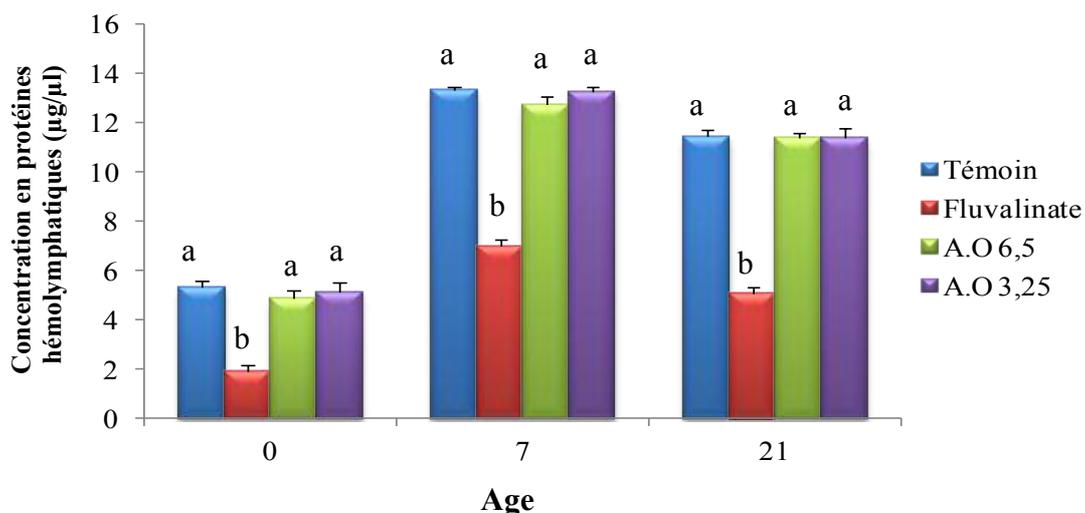
### 3.2. Effet des acaricides sur les métabolites dans l'hémolymphe

L'étude biochimique a permis de déterminer les concentrations des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) dans l'hémolymphe des Abeilles ouvrières adultes témoins et traitées avec l'Acide oxalique (6,5 g, 3,25 g) et le fluvalinate à différents âges de la vie adulte.

#### 3.2.1. Concentration des protéines

Chez les Abeilles adultes âgées de 0, 7 et 21 jours, l'analyse de la variance à un critère de classification a été réalisée. Cette dernière montre un effet traitement hautement significatif ( $p < 0,001$ ) sur la concentration en protéines hémolympatiques des ouvrières âgées de 0, 7 et 21 jours.

La comparaison des moyennes montre des différences significatives entre les groupes témoins et traités et entre les différents traitements pour la même série d'âge (Annexe 1: tableau 7). Une diminution significative des protéines hémolympatique par rapport aux témoins est observée après traitement avec le fluvalinate chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours (fig. 26). Par contre, aucune différence n'a été observée par rapport aux séries témoins après traitement avec l'acide oxalique (3,25 g et 6,5 g) chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours.



**Figure 26:** Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la concentration en protéines hémolympatiques ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez les Abeilles adultes *A.m. intermissa* : ( $m \pm \text{SE}$  ;  $n=4-6$ )

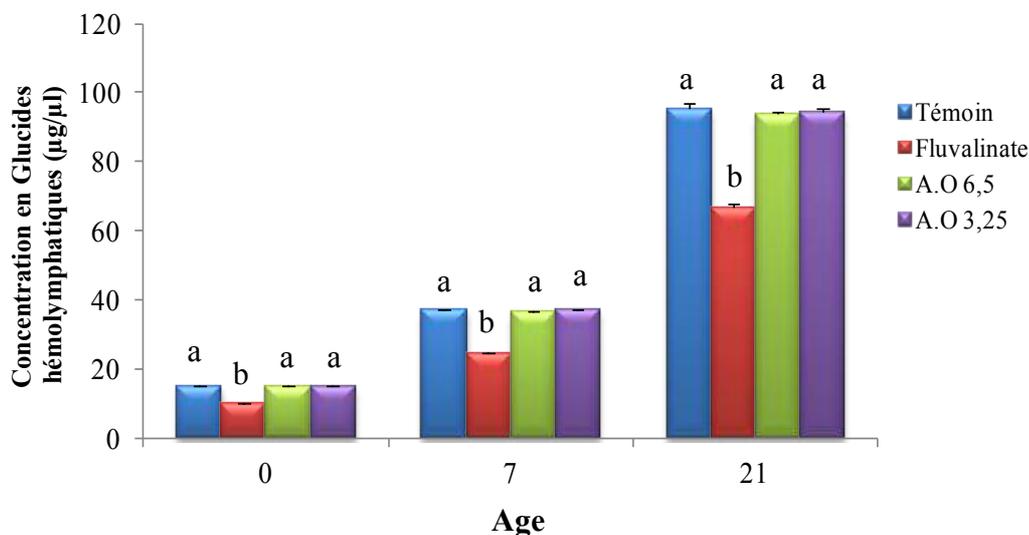


Le classement effectué selon le test de Tukey révèle l'existence chez les abeilles âgées respectivement de 0, 7 et 21 jours de deux groupes pour chacune d'elles. Le premier groupe est représenté par les abeilles témoins et celles traitées avec l'acide oxalique (3,25 g et 6,5 g) et le second par celles traitées avec le fluvalinate.

### 3.2.2. Concentration des glucides

L'analyse de la variance à un critère, montre un effet traitement hautement significatif ( $p < 0,001$ ) sur la concentration en glucides hémolympatiques des ouvrières âgées de 0 jours, 7 jours et 21 jours.

Une diminution significative des glucides hémolympatiques par rapport aux témoins est observée après traitement avec le fluvalinate chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours (fig. 27). Par contre, aucune différence n'a été observée par rapport aux séries témoins après traitement avec l'acide oxalique (3,25 g et 6,5 g) chez les abeilles âgées adultes (Annexe 1: tableau 8).



**Figure 27:** Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la concentration en glucides hémolympatiques ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez les Abeilles adultes *A.m. intermissa* : ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Le classement effectué selon le test de Tukey révèle l'existence chez les abeilles âgées respectivement de 0, 7 et 21 jours de deux groupes pour chacune d'elles. Le premier groupe est représenté par les abeilles témoins et celles traitées avec l'acide oxalique (3,25 g et 6,5 g) et le second par celles traitées avec le fluvalinate.

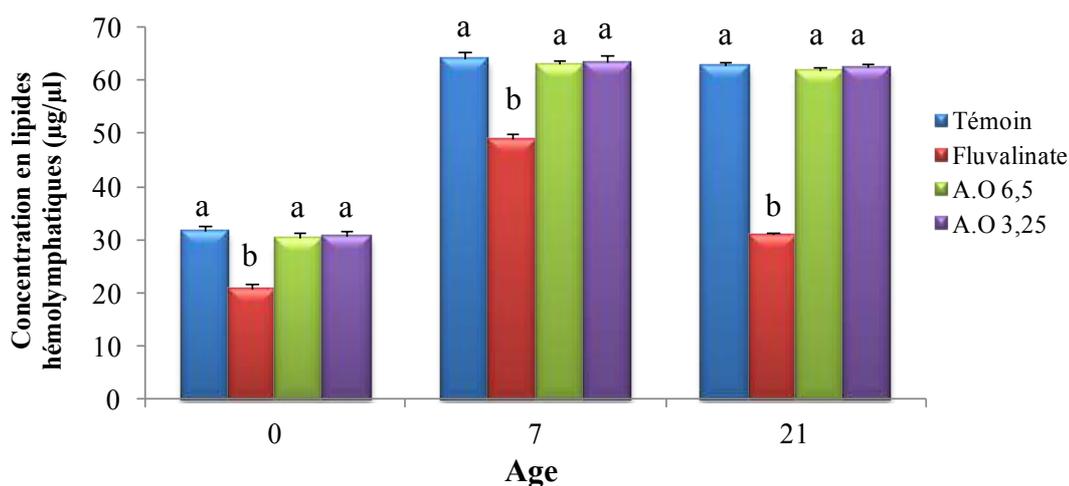


### 3.2.3. Concentration des lipides

L'analyse statistique montre un effet traitement hautement significatif ( $p < 0,001$ ) sur la concentration en lipides hémolymphatiques des ouvrières âgées de 0, 7 et 21 jours.

La comparaison des moyennes montre des différences significatives entre les groupes témoins et traités et entre les différents traitements pour la même série d'âge.

Une diminution significative des lipides hémolymphatiques par rapport aux témoins est observée après traitement avec le fluvalinate chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours (fig.28). Par contre, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux séries témoins après traitement avec l'acide oxalique (3,25 g et 6,5 g) chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours (Annexe 1: tableau 9).



**Figure 28:** Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la concentration en lipides hémolymphatiques ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez des Abeilles adultes *d'A.m. intermissa* : ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Le classement effectué selon le test de Tukey révèle l'existence chez les abeilles âgées respectivement de 0, 7 et 21 jours de deux groupes. Le premier groupe est représenté par les abeilles témoins et celles traitées avec l'acide oxalique (3,25 g et 6,5 g) et le second groupe par celles traitées avec le fluvalinate.



#### 4. Effets des acaricides sur les activités enzymatiques

L'étude enzymatique a permis de déterminer l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ainsi que la glutathion-S- transférase (GST) chez les abeilles ouvrières adultes témoins et traitées à différents âges de la vie adulte.

##### 4.1. Effets des acaricides sur l'activité spécifique de l'AChE

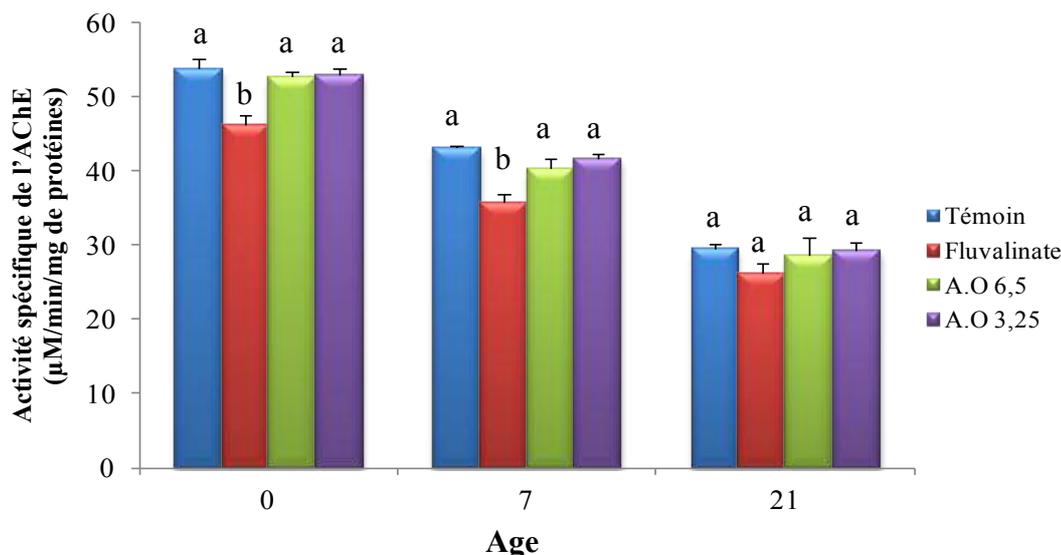
L'activité spécifique de l'AChE exprimée en  $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines a été déterminée au niveau de la tête des abeilles ouvrières d'*A. m. intermissa* âgées de 0, 7 et 21 jours. Cette activité est calculée par application de la formule d'Ellman *et al.*, (1961) en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l'absorbance en fonction du temps. Les résultats obtenus sont exprimés par rapport à une quantité de protéines exprimée en milligramme (mg).

Chez les témoins, l'activité spécifique de l'AChE est plus faible chez les ouvrières âgées de 21 jours comparativement aux abeilles âgées de 0 et 7 jours. Cette évolution est similaire dans les groupes traités avec les deux acaricides.

La comparaison des moyennes montre des différences significatives entre les groupes témoins et traités et entre les différents traitements uniquement chez les abeilles adultes âgées de 0 et 7 jours. Cependant aucune différence significative n'a été observée chez celles âgées de 21 jours (Annexe 1: tableau 10).

Une diminution significative de l'activité spécifique de l'AChE par rapport aux témoins est observée après traitement avec le fluvalinate chez les abeilles âgées de 0 et 7 jours. Par contre aucune différence n'a été observée chez les abeilles âgées de 21 jours comparativement avec les témoins. Aussi, aucune différence n'a été constatée par rapport aux séries témoins après traitement avec l'acide oxalique (3,25 g, 6,5 g) chez les abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours (fig. 29).

L'analyse de la variance montre un effet traitement très significatif ( $p = 0,001$ ) sur l'activité spécifique de l'AChE des ouvrières à l'émergence âgées de 0 jour, hautement significatif ( $p < 0,001$ ) sur celle des ouvrières âgées de 7 jours et aucun effet traitement ( $p = 0,331$ ) sur celle des ouvrières adultes âgées de 21 jours.



**Figure 29:** Activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez *A.m. intermissa* après traitement aux acaricides : comparaison des moyennes pour un même âge entre les différents groupes ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Le classement effectué selon le test de Tukey révèle l'existence chez les abeilles âgées de 0 et 7 jours de deux groupes. Le premier groupe est représenté par les abeilles témoins et celles traitées avec l'acide oxalique (3,25 g et 6,5 g), le second par celles traitées avec le fluvalinate. Les abeilles âgées de 21 jours sont classées chacune en un seul groupe.

#### 4.2. Effets des acaricides sur l'activité spécifique de la GST

L'activité spécifique de la GST exprimée en  $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines a été estimée par application de la formule de Habig *et al.*, (1974) en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l'absorbance en fonction du temps. Les résultats obtenus sont exprimés par rapport à une quantité de protéines exprimée en milligramme (mg). Un dosage au niveau du corps des abeilles ouvrières d'*A m. intermissa* âgées de 0, 7 et 21 jours a été effectué.

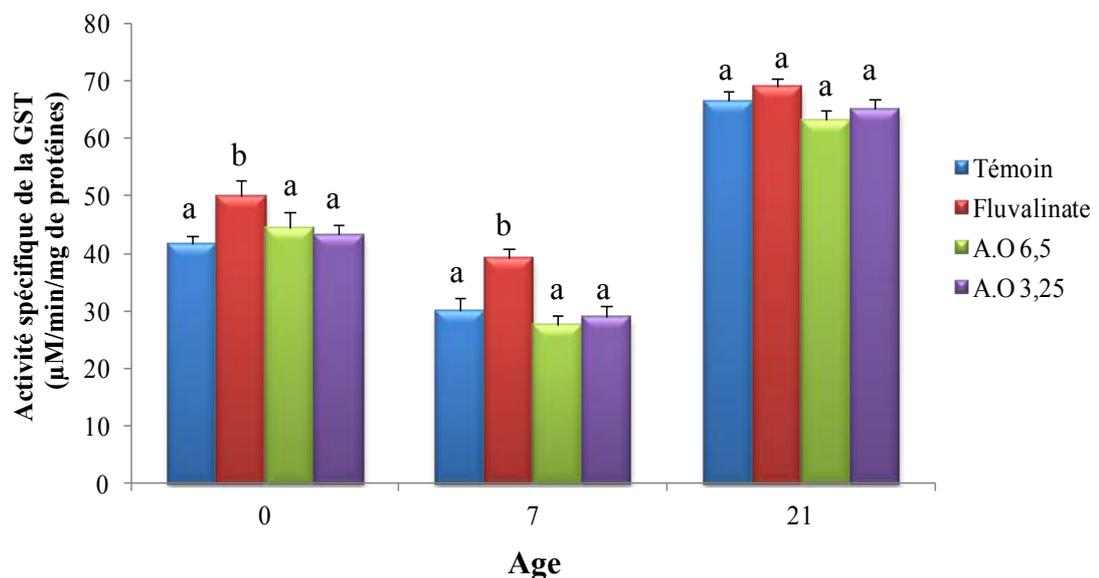
Chez les abeilles témoins, les valeurs de l'activité spécifique de la GST sont plus faible chez les nourrices âgées de 7 jours comparativement aux abeilles nouvellement émergées âgées de 0 et les butineuses âgées de 21 jours. Cette évolution de l'activité spécifique de la GST est similaire dans les groupes traités avec les deux acaricides (Annexe 1: tableau 11).



La comparaison des moyennes montre des différences significatives entre les groupes témoins et traités et entre les différents traitements uniquement chez les abeilles âgées de 0 et 7 jours. Cependant aucune différence significative n'a été observée chez les abeilles âgées de 21 jours.

Une augmentation significative de l'activité spécifique de la glutathion-S- transférase par rapport aux témoins est observée après traitement avec le fluvalinate chez les abeilles âgées de 0 et 7 jours par contre aucune différence significative n'a été observée chez celles âgées de 21 jours. Aucune différence n'a été observée par rapport aux séries témoins après traitement avec l'acide oxalique (3,25 g, 6,5 g) chez les abeilles émergentes, nourrices et butineuses (fig. 30).

L'analyse de la variance à un critère de classification a été réalisée. Cette dernière montre un effet traitement très significatif ( $p = 0,008$ ) sur l'activité spécifique de la GST des ouvrières à l'émergence âgées de 0 jour, un effet traitement significatif ( $p = 0,030$ ) pour celles âgées de 7 jours et aucun effet significatif ( $p = 0,103$ ) pour celles âgées de 21 jours (Annexe 1: tableau 11).



**Figure 30:** Activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez *A.m. intermissa* après traitement aux acaricides: comparaison de moyennes pour un même âge entre les différents groupes ( $m \pm \text{SE}$  ;  $n= 4-6$ ).



Le classement effectué selon le test de Tukey révèle l'existence chez les abeilles âgées de 0 jour de deux groupes. Le premier groupe est représenté par les abeilles témoins et celles traitées avec l'acide oxalique (3,25 g et 6,5 g), le second par celles traitées avec le fluvalinate.

Les abeilles âgées de 7 jours sont classées en trois groupes. Le premier groupe est représenté par les abeilles témoins, le deuxième groupe par celles traitées avec l'acide oxalique (6,5 g et 3,5 g) et le troisième par celles traitées avec le fluvalinate. Les abeilles âgées de 21 jours sont classées en un seul groupe.

# *DISCUSSION*



## DISCUSSION

L'abeille domestique est un des principaux pollinisateurs des plantes et des arbres fruitiers entomophiles. L'impact de sa disparition serait désastreux pour l'agriculture et la biodiversité. L'abeille est pourtant soumise durant toute sa vie à de nombreux stress toxiques environnementaux et iatrogènes. La détermination du risque toxique encouru par les abeilles est donc une nécessité absolue pour sa protection. Ce risque est le fruit d'un rapport entre la toxicité d'un composé et les doses auxquelles les individus sont exposés. De nombreuses études se sont penchées sur la mesure de l'efficacité des produits utilisés par les apiculteurs (en majorité des acaricides) et les agriculteurs sur le parasite de l'abeille *V. destructor*. Mais force est de constater qu'à l'opposé, le nombre d'études visant à déterminer les effets secondaires de ces composés pour l'abeille est très limité.

Les expositions aux pesticides perturbent divers paramètres physiologiques, biochimiques, anatomiques et comportementaux (Hyne & Maher, 2003). Deux traitements acaricides employés dans notre étude, synthétique (Le fluvalinate ou apistan), et naturel (l'acide oxalique aux doses 3,25 et 6,5g). Cette étude nous a permis d'évaluer l'efficacité de ces deux acaricides sur le parasite *V. destructor* ainsi que leurs effets secondaires sur l'abeille *A. m. intermissa* par le dosage des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) dans le corps entier de l'abeille et son hémolymphe et sur l'activité spécifique enzymatique de l'AChE et la GST.

### 1. Efficacité des acaricides sur le *Varroa destructor*

L'étude de la dynamique de la population du varroa nous a permis de déterminer le degré d'infestation de nos colonies. D'après Faucon (1992); l'action pathogène du varroa est liée directement à la proportion du nombre de parasite par rapport au nombre d'abeilles dans la colonie et les symptômes s'aggraveront quand la population d'abeilles diminuera pendant que celle du varroa restera constante ou continuera de progresser.

Depuis l'apparition de la varroase qui est considérée comme la principale pathologie qui affecte l'élevage apicole, de nombreux travaux ont été réalisés afin de trouver un traitement efficace pour limiter les dégâts occasionnées par celle-ci. Pour cela, plusieurs molécules ont été mises sur le marché.



Les résultats de notre étude indiquent clairement que l'acaricide synthétique fluvalinate (Apistan) montre une meilleure efficacité dans la lutte contre *V. destructor* ( $94,13 \pm 0,85$  pour les abeilles adultes et de  $92,85 \pm 1,14\%$  pour le couvain operculé) par rapport à l'acaricide naturel acide oxalique ( $51,37 \pm 1,51$ ;  $59,45 \pm 1,20\%$  et  $41,91 \pm 1,02$ ;  $57,23 \pm 1,23\%$  pour les abeilles adultes et le couvain operculé pour les doses 6,5g et 3,25g respectivement).

Les résultats obtenus relatifs à la mortalité élevée des acariens suite au traitement avec l'acaricide synthétique fluvalinate ne sont pas en accord avec ceux obtenus par Adjlane *et al.* (2013) où un taux d'efficacité de 77,75% a été enregistré. Aussi, Pileckas *et al.* (2011) ont révélé un taux d'efficacité de 81,7%. D'autres travaux ont été réalisés par Loucif-Ayad *et al.*, 2010 par l'utilisation de deux acaricides chimiques Apivar (Amitraze) et Bayvrol (pyréthrinolide à base de fluméthrine) ont montré respectivement une efficacité de 85% et 86%. Ces résultats se rapprochent de ceux d'Adjlane *et al.* (2013) où une efficacité de 86,50% a été enregistrée après traitement par l'apivar et de 91,62% par Byvarol. Floris *et al.* (2001b) ont constaté que l'efficacité de l'amitraze sous forme de lanière dans les colonies en présence de couvain était de 74,90%. Des études ont été réalisées en Turquie en utilisant un produit à base de fluméthrine par Akkaya & Vurusaner (1996 et 1997) montrent une efficacité de 87,7% et 100%. Jelinski (1993) révèle une efficacité de 59,6% suite au traitement au Byvarol. Des études réalisées en 1989 par Milani et Barbattini ont révélé une efficacité du Byvarol située entre 98,79% et 99,86% pour une utilisation du produit pendant 42 jours. Selon Ferrer-Dufol *et al.* (1993) les deux pyréthroïdes Byvarol et fluvalinate présentent la même efficacité. Selon Fernandez et Coineau (2002), l'efficacité du Fluvalinate est de l'ordre de 99%, le traitement montre une innocuité importante pour les abeilles et il présente en outre une remarquable homogénéité dans son efficacité entre les mêmes ruches d'un rucher, et entre les différents ruchers. Il donne des résultats comparables sous différents climats et il est utilisé dans diverses conditions avec de bons résultats. Les résultats d'Al-ghamdi (2007) ont montré une baisse de l'efficacité de fluvalinate et de byvarol, ceci est dû au développement d'une résistance chez *V. destructor* pour les deux molécules de fluvalinate et fluméthrine.

de nombreux travaux antérieurs ont montré que, suite à l'utilisation intensive et durant plusieurs années de ces acaricides chimiques, il y a eu développement de résistance par le varroa envers ces molécules (Lodesani *et al.*, 1995; Vandame *et al.*, 1995; Londzin & Sledzinky 1996; Elzen *et al.*, 1998; Milani & Della Vedova 2002; Garcia-Salinas *et al.*, 2006; Semkiw *et al.*, 2013). Notamment la résistance au fluvalinate (Lodesani *et al.*, 1995; Colin *et*



*al.*, 1997; Baxter *et al.*, 1998; Trouiller, 1998; Wang *et al.*, 2002; Gracia-Salinas *et al.*, 2006), qui provoque aussi une contamination des produits de la ruche par les résidus du fluvalinate (Lodesani *et al.*, 1992; Wallner, 1999; Bogdanov, 2006; Lodesani *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009; Mullin *et al.*, 2010) sans oublier ses effets secondaires néfastes sur les abeilles.

Dans toutes les études réalisées, le phénomène de résistance à ces molécules reste variable : certaines populations de varroas sont entièrement sensibles, d'autres moyennement résistantes et d'autres entièrement résistantes. Ceci suggère que seulement certaines lignées d'acariens ont acquis une capacité de résistance, en lien notamment avec des pressions de sélection différentes (Mozes-Koch *et al.*, 2000). Le développement de résistances est le résultat de l'interaction entre de nombreux facteurs, notamment le niveau d'exposition au toxique, la vitesse de reproduction de l'agent, le degré de dominance du gène conférant la résistance, pouvant lui-même être associé à un gène apportant un avantage sélectif à la lignée, ainsi que d'autres facteurs écologiques (Mozes Koch *et al.*, 2000). Dans ces conditions, leur utilisation résulte malheureusement en une efficacité moindre (< 50%).

Les résultats relatifs à la mortalité des acariens suite au traitement avec l'acaricide naturel acide oxalique (6,5 et 3,25g) sont également conformes avec ceux trouvés dans la bibliographie dans le cas où le traitement a été utilisé en présence de couvain. En effet, une efficacité de 61% a été enregistrée en Europe centrale (Charrière *et al.*, 1998) et d'autres auteurs ont montré une efficacité se situant entre 30 à 40% (Fernandez & Coineau, 2002). Aussi, d'autres études ont montré une efficacité de l'acide oxalique inférieur à 50% en présence de couvain (Charriere & Imdorf, 2002; Gregoric & planincy, 2002; Gregorc, 2005; Rademacher & Harz, 2006; Chen & Chen, 2008).

La majorité des tests ont montré la grande efficacité de l'Acide oxalique et sa bonne tolérance à l'abeille (Imdorf *et al.*, 1997), seulement une meilleure efficacité du traitement dépassant les 90% et se rapprochant de 100% est obtenue uniquement en absence de couvain. En effet, une efficacité de 97 à 98,8% a été enregistrée en Europe centrale (Charrière *et al.*, 1998; Charière *et al.*, 2004 ; Radetzki, 1994). D'autres auteurs ont également montré une efficacité supérieure à 95% en absence de couvain (Imdorf *et al.*, 1995a, Imdorf *et al.*, 1995b). Il semblerait aussi que certains acaricides naturels tels que l'Apiguard (Thymol) ainsi que Apilife Var (Thymol combiné à l'eucalyptol, camphre et menthol) ont montré des résultats similaires (Loucif-Ayad *et al.*, 2010). Cela limite l'emploi de l'acide oxalique aux régions où il y a des arrêts de couvain.



Bien que la toxicité intense n'ait pas été prouvée, plusieurs rapports montrent qu'une forte concentration en acide oxalique, administrée en automne par écoulement, affaiblit la colonie (Charrière et Imdorf, 1999; Nanetti, 2001).

Les produits naturels tels que les acides organiques (Formique, lactique) ainsi que les huiles essentielles (Thymol, menthol, camphre, eucalyptol, etc) ont été alors employés et ont également montré leurs efficacités dans la lutte anti-varroa (Imdorf et *al.*, 1999; Ariana et *al.*, 2002; Gregorc & Planincy, 2002; Eguaras et *al.*, 2003; Floris et *al.*, 2004; Satta et *al.*, 2005)

L'acide oxalique, bien qu'il soit naturellement présent dans le miel et non polluant; il constitue une bonne alternative comme traitement acaricide à l'égard de *V. destructor*, et qu'aucun phénomène de résistance de cet ectoparasite à cette substance n'ai été décrit à ce jour (Le Conte et *al.*, 2010), il n'est cependant pas sans effets néfastes sur les abeilles.

## **2. Effets des acaricides sur les métabolites du corps et de l'hémolymphe**

Les métabolites (protéines, glucides, lipides) jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces vivantes. Les perturbations enregistrées au niveau de ces métabolites peuvent compromettre les possibilités d'une croissance normale de la colonie et peuvent avoir également des conséquences sur son développement (Cremonez et *al.*, 1998).

En effet, les protéines sont nécessaires pour nourrir le couvain et la production de sécrétions glandulaires spécialement par les glandes hypo pharyngiennes des nourrices (Brouwers, 1982; Knecht & Kaatz, 1990). Les nourrices privées d'une partie de leurs protéines, secréteront une gelée nutritive de moindre qualité, ce qui se répercutera sur le développement des larves (Barbançon, 2002). Les protéines leur permettent aussi de survivre pendant les périodes difficiles (Maurizio, 1950; Fluri et *al.*, 1982). Les Abeilles domestiques adultes se procurent les protéines surtout du pollen pour assurer le développement de tissus et d'organes comme les glandes nourricières et les corps adipeux (Soudek, 1927; Kratky, 1931). Ces derniers sont essentiels pour l'exercice des activités sociales au sein de la communauté (Soudek, 1927; Kratky, 1931, Maurizio, 1950). La croissance des ouvrières est associée à la consommation du pollen (De Groot, 1950; Haydak, 1970) et à la trophallaxie du transfert de protéines entre les ouvrières engendrant ainsi une augmentation des protéines du corps.

Les Abeilles se procurent la majorité de leur énergie à partir des sucres et non des autres substrats (Beenackers, 1960; Sacktor, 1970). En effet, le taux des sucres chez elle est



très élevé (Bishop *et al.*, 1925). Dans l'hémolymphe des Abeilles ouvrières, les différents sucres trouvés sont surtout le glucose, sucrose et tréhalose (Alumot *et al.*, 1969). Le sucrose n'est pas toujours présent (Arslan *et al.*, 1986; Woodring *et al.*, 1993) ou bien trouvé à faible concentration seulement (Abou-Seif *et al.*, 1993). Le manque en glucides qui est la source la plus importante en énergie, affaiblit la colonie et réduit la capacité du vol. En effet, selon (Bowen-Walker & Gunn, 2001), une réduction des glucides durant les stades nymphaux peut avoir des répercussions sur le développement normal des abeilles.

Les lipides peuvent être utilisés aussi comme sources d'énergie mais de façon négligeable (Surholt *et al.*, 1988). Les Abeilles ouvrières adultes nouvellement émergées, n'ont pas suffisamment de réserves lipidiques c'est la raison pour laquelle elles ne peuvent survivre pendant de longues périodes sans se nourrir (Hrassnigg & Crailsheim, 2005). Leur survie est négativement corrélée avec l'intensité des soins et l'activité du vol (Merz *et al.*, 1979; Neukirch, 1982) et positivement corrélée avec les réserves en graisses corporelles (Maurizio, 1954; Fluri & Bogdanov, 1982). Des changements dans le comportement et dans les réserves corporelles augmentent la durée de vie des ouvrières et leurs permettent de survivre pendant l'hiver (Mattila *et al.*, 2001).

Nos abeilles âgées de 0, 7 et 21 jours, ayant subi des traitements acaricides montrent des concentrations et des teneurs en métabolites plus faibles comparativement aux témoins. Par ailleurs, le traitement synthétique fluvalinate entraîne des diminutions plus importantes que celles du traitement naturel acide oxalique (6,5 g et 3,25 g). Les mêmes résultats ont été observés après traitement aux acaricides synthétiques Apivar (Amitraze) et Apilife Var (Pyréthrinolide à base de fluméthrine) et aux acaricides naturels Apiguard (Thymol) et Bayvarol (Tymol combiné à l'eucalyptol, camphre et menthol) (Loucif-Ayad *et al.*, 2010).

Les abeilles adultes traitées avec le fluvalinate révèlent des perturbations biochimiques non seulement au niveau du corps mais aussi au niveau de l'hémolymphe. Malgré que quelques travaux ont montré que les traitements avec certains acides organiques tels que l'acide oxalique et l'acide formique entraînent une mort cellulaire chez les larves d'abeilles domestiques (Gregorc *et al.*, 2004). Nos abeilles adultes traitées avec l'acaricide naturel acide oxalique (6,5 g et 3,25 g) ne présentent aucune variation dans les taux et les concentrations des métabolites du corps et de l'hémolymphe sauf pour celles âgées de 0 jour et traitées à l'Acide oxalique 6,5 g, il a été constaté une petite diminution au niveau des protéines du corps.



Il a été démontré que les ouvrières fraîchement émergées présentaient des quantités faibles de glucoses et de lipides (Czoppelt & Rembold, 1970; Kunert & Crailsheim, 1988; Panzenbock & Crailsheim, 1997, Hrasnigg & Crailsheim, 2005) indiquant qu'elles n'ont pas suffisamment de réserves pour survivre pendant une longue période sans s'alimenter. De plus, le développement glandulaire chez les abeilles, en relation avec les changements comportementaux évoluant avec l'âge des ouvrières nécessite de grandes réserves métaboliques (Winston, 1987). Si cela, s'ajoute une réduction des principaux métabolites, suite à l'application des acaricides, la situation pourrait être néfaste aux abeilles. Cependant, les abeilles naissantes devraient alors avoir impérativement accès à une nourriture riche en glucose afin de pouvoir restaurer rapidement leurs réserves (Bowen-Walker & Gunn, 2001) car cette carence pourrait perturber le bon fonctionnement de la colonie.

Une diminution des lipides, notamment dans l'intestin peut être induite par l'acaricide chimique, l'amitrazé (M'Diaye & Bounias, 1991). Cette diminution peut perturber, le fonctionnement des sites demandeurs de lipides tels que le cerveau et/ou les muscles (M'Diaye & Bounias, 1991). La diminution des concentrations en protéines chez les abeilles traitées pourrait être due à leur exposition aux acaricides et par conséquent, ceci pourra entraîner une inhibition de la croissance (Nielson *et al.*, 2000).

Lors de cette étude, il n'a pas été observé une augmentation anormale des taux de mortalité des abeilles ouvrières ou de reine et aucun affaiblissement de la colonie ou de l'activité du vol. Il semble qu'à des concentrations plus élevées, la forte acidité affecte les abeilles trempées dans la solution (Anchling, 2001). Par conséquent, les pertes de ces métabolites ne sont pas assez graves pour être responsables de la mortalité des abeilles. Cependant, il ne peut pas être exclu que la réduction en protéines, glucides et lipides peuvent affecter d'autres aspects comme la survie hivernale de la colonie (Ayad-Loucif, 2009).

Des études antérieures ont montrés que l'application de certains acaricides naturels tels que ceux à base de thymol ou de menthol était sans risque apparent pour les abeilles (Steen, 1992; Schulz, 1993; Imdorf *et al.*, 1994). Cependant, certains effets secondaires ont été notés suite à l'application des mêmes acaricides. En effet, une diminution du poids de la colonie et de la production du miel (Cox *et al.*, 1989), une augmentation de la mortalité larvaire (Mattila *et al.*, 2000) et une stimulation du pillage ainsi qu'une augmentation de l'agressivité chez les abeilles ont été enregistrés.



Des effets négatifs aussi sont cités suite à des traitements avec certains acaricides chimiques. En effet, une mort cellulaire dans les glandes hypopharyngiennes (Moraes & Bowen, 2000) et dans l'intestin moyen (Gregorc & Bowen, 1998; 2000) ainsi qu'une mortalité élevée des ouvrières adultes (Floris *et al.*, 2001b) ont été enregistrées après un traitement à base d'amitraze. Le fluvalinate affaiblit le système immunitaire de l'abeille (Locke *et al.*, 2012) ce qui les rend plus vulnérables aux infections virales (Locke *et al.*, 2012). Il agit aussi en synergie avec différents acaricides administrés dans les colonies d'abeilles (Johnson *et al.*, 2009). Le fluvalinate réduit la production des spermatozoïdes chez les faux bourdons (Rinderer *et al.*, 1999; Fell & Tignor, 2001; Frazier *et al.*, 2008) et provoque chez les reines, non seulement une réduction du poids du corps, des ovaires ainsi que du nombre moyen de spermatozoïdes contenus dans la spermathèque (Haarmann *et al.*, 2002) mais aussi une mortalité (Sokol, 1996; Currie, 1999). Des études effectuées par Nozal *et al.* (2003) ont montré que l'acide oxalique traverse la cuticule et pourrait contribuer à l'effet toxique. Une partie de l'acide oxalique est aussi ingérée par les abeilles (Martin-Hernandez *et al.*, 2007), notamment lors du comportement de nettoyage, qui est par ailleurs fortement induit chez les abeilles traitées, du à la présence des résidus de cet acaricide sur la surface du corps des abeilles (Schneider *et al.*, 2012). Ainsi, suite à l'ingestion de l'acide oxalique, on assiste à une résorption insuffisante des nutriments à travers l'épithélium de l'intestin entraînant un affaiblissement des abeilles (Martin-Hernandez *et al.*, 2007). L'acide oxalique provoque des lésions cellulaires non seulement au niveau des organes digestifs (Pulkkanen *et al.*, 2000; Gregorc & Smodis Skerl, 2007; Martin-Hernandez *et al.*, 2007) et excréteurs (Martin-Hernandez *et al.*, 2007) mais également au niveau des glandes salivaires (Silva-Zacarin *et al.*, 2006). Aussi, il pourrait avoir un effet négatif sur le cycle de Krebs (Strachecka *et al.*, 2012). L'acide oxalique cause une réduction du couvain (Higes *et al.*, 1999), une mort larvaire (Gregorc *et al.*, 2004; Hatjina & Haristos, 2004) et des pertes de reines (Higes *et al.*, 1999; Wagnitz & Ellis, 2010). Il entraîne une diminution de l'activité des ouvrières (Bacandritsos *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2012) et de leur longévité ce qui affecte l'état général de la colonie d'abeilles (Schneider *et al.*, 2012) conduisant à un affaiblissement des abeilles qui résistent moins bien aux virus, bactéries et parasites (Wermelinger, 2013).



### 3. Effets des acaricides sur les activités spécifiques de l'AChE et de la GST

#### 3.1. Effets des acaricides sur l'activité spécifique de l'AChE

Les insectes développent des adaptations pour se protéger contre les composés potentiellement toxiques comme les pesticides. Ces derniers ont généralement pour cible le système nerveux de l'insecte (Francis *et al.*, 2002). En effet, certains pesticides altèrent la transmission de l'influx nerveux en réduisant l'activité catalytique de l'enzyme synaptique qui est l'acétylcholinestérase (AChE), responsable de l'hydrolyse de neurotransmetteur cholinergique universel acétylcholine (Rosenberry, 1975).

L'AChE qui est un sujet d'étude depuis de nombreuses années en raison de son importance biologique, est impliquée dans de nombreux problèmes tels que les intoxications aux insecticides (Badiou, 2007). Elle représente ainsi un biomarqueur de neurotoxicité largement utilisé pour identifier une exposition aux insecticides anticholinestérasiques (Coppage et Matthews, 1975; Fulton et Key, 2001; Matozzo *et al.*, 2005).

L'inhibition de l'AChE a été fréquemment employée en toxicologie pour diagnostiquer l'exposition aux produits chimiques anticholinestérase, tels que les organophosphorés (OP) et les carbamates (Fossi *et al.*, 2001; Fulton & Key, 2001; Sanchez, 2001). Par conséquent, ces troubles peuvent affecter la locomotion et l'équilibre des organismes exposés (Little *et al.*, 1990; Richmonds & Dutta, 1992; Hart 1993), qui conduisent généralement à la tétanie musculaire et à la mort de l'organisme (Badila, 1995; Bocquené, 1996; Bainsy, 2000).

Les organophosphorés et carbamates agissent en se fixant sur les acétylcholinestérases à la place de l'acétylcholine, empêchant la dégradation de cette dernière. Ainsi l'acétylcholine s'accumule donc dans la fente synaptique, ce qui conduit à une hyperexcitation des synapses, causant, ici encore, la mort de l'individu. Les pyréthrenoïdes agissent sur les canaux sodium voltage dépendants de la membrane des cellules nerveuses ou sur les récepteurs canaux tels les récepteurs nicotiques (Narahashi, 1996). Des études ont montré que les pyréthrenoïdes peuvent avoir des effets secondaires de neurotoxicité par des effets sur le système cholinergique et en particulier sur l'activité de l'AChE (Bandyopadhyay, 1982; Lisanti *et al.*, 1990; Reddy *et al.*, 1991; szegletes *et al.*, 1995; Djordjevic *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2005). Les résistances de nombreux insectes et acariens aux insecticides s'expliquent par une



modification de l'acétylcholinestérase, rendant le site de fixation des insecticides moins accessible (Haubruge & Amichot, 1998).

L'évolution de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase dans nos colonies traitées aux acaricides et celles témoins, est similaire à l'évolution décrite par de nombreux auteurs. En effet, Belzunces *et al.* (1992) ont montré que pendant le développement nymphal d'*A.m. intermissa*, l'activité spécifique de l'AChE augmente progressivement pour atteindre une valeur maximum à l'émergence (0 jour). A l'état adulte, l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase est plus faible chez les butineuses (21 jours) comparativement aux ouvrières émergentes (Belzunces *et al.*, 1992; Polyzou *et al.*, 1997).

Les changements significatifs chez les colonies d'abeilles traitées à l'acaricide synthétique Apistan (pyréthrinolide à base de fluvalinate) et âgées de 0 et 7 jours, suggèrent que l'acaricide synthétique affecte l'activité spécifique de l'AChE. En effet, certaines familles de pyréthrinolides ou d'insecticides induisent des modifications de l'activité de l'AChE ce qui explique sa diminution chez nos abeilles âgées de 0 et 7 jour après leur traitement à l'acaricide chimique fluvalinate. Nos résultats sont conformes avec certains auteurs. En effet, il a été constaté que la deltaméthrine (pyréthrinolide) entraînait une diminution de l'activité spécifique de l'AChE (Badiou *et al.*, 2008). Aussi, La perméthrine appartenant à la famille des pyréthrinolide, provoque une diminution dans l'activité spécifique de l'AChE chez les abeilles (Bandyopadhyay, 1982). Des pesticides de la famille de pyréthrinolide ont été testés sur les ouvrières d'*A. m. intermissa* entraînent également une inhibition dans l'activité spécifique de l'AChE (Nabti *et al.*, 2014). D'autres pyréthrinolide présentent des effets similaires sur l'activité spécifique de l'AChE (Bandyopadhyay, 1982; Bendahou *et al.*, 1999; Hossain *et al.*, 2005; Rao & Rao, 1995). Par contre, il a été constaté que les acaricides chimiques: Apivar (à base d'amitraze) et le Bayvarol (pyréthrinolide à base de fluméthrine) n'entraînait aucun effet négatif sur l'activité spécifique de l'AChE (Loucif-Ayad *et al.*, 2008).

Aucun effet négatif sur l'activité spécifique de l'AChE n'a été observé chez les abeilles ouvrières d'*A.m.intermissa* âgées de 21 jours suite au traitement au fluvalinate et ceci pourrait s'expliquer par le fait que les butineuses sont exposées aux acaricides à un degré moindre que celles destinées à effectuer des tâches à l'intérieur de la ruche.

Certaines classes de pyréthrinolides sont neurotoxiques (Gammon & Cassida, 1981; Casida *et al.*, 1983) et ont diverses cibles secondaires telles que les ATPases, le récepteur



GABA ou les voies de transduction de signal, en changeant la cascade de phosphorylation des protéines qui peut avoir, entre autre, comme conséquence, la mort programmée des cellules (Desaiah *et al.*, 1975; Rashatwar & Matsumura, 1985; Enan & Matsumura, 1993).

Depuis quelques années, des études ont révélé que la réduction de l'activité de l'AChE n'était pas seulement due aux insecticides anticholinestérasiques mais que d'autres classes de contaminants environnementaux comme les détergents, les métaux pouvaient être impliquées (Diamantino *et al.*, 2003; Frasco *et al.*, 2005; Guilhermino *et al.*, 1998; Payne *et al.*, 1996).

Les changements non significatifs dans l'activité spécifique de l'AChE chez les colonies d'abeilles traitées à l'Acide oxalique (6,5 et 3,25 g), à différents stades du développement adulte (0, 7 et 21 jours), suggèrent que l'acaricide naturel l'Acide oxalique n'affecte pas l'activité spécifique de l'AChE de l'Abeille. Les mêmes résultats ont été démontrés par Loucif-Ayad *et al.*(2008), où les traitements naturels Apiguard (thymol) et Apilife Var (thymol combiné à l'eucalyptol, camphre et menthol), n'entraînaient aucun effet négatif sur l'activité spécifique de l'AChE chez les larves, nymphes et adultes d'*A. m. intermissa*. Weick & Thorn (2002) ont trouvé des résultats similaires avec un autre acaricide, le coumaphos, où aucun effet significatif n'a été constaté sur l'activité spécifique de l'AChE chez les abeilles.

Cependant, l'absence d'un effet au niveau de l'activité de l'AChE n'élimine pas le fait que les abeilles dans les colonies traitées aux acaricides aient été physiologiquement affectées par le traitement. De plus, les traitements ont été effectués en utilisant des doses préconisées. Il est fort probable qu'une altération de l'activité de l'AChE pourrait se produire dans le cas d'un surdosage. En effet il est à noter, que certains apiculteurs ne respectent pas les doses d'acaricides prescrites ou encore laissent les lanières imprégnées d'acaricides plus longtemps dans les ruches induisant de ce fait un effet de surdosage pouvant être nuisible aux abeilles.

### **3.2. Effets des acaricides sur l'activité spécifique de la GST**

Les glutathion-S-transférases, jouent un rôle important dans la physiologie du stress, le transport intracellulaire et dans les différentes voies biosynthétiques (Wilce & Parker, 1994). La GST représente une famille des enzymes substrats spécifiques qui catalysent la conjugaison du GSH avec les xénobiotiques dans la phase II de métabolisation favorisant leur élimination de l'organisme (Leaver *et al.*, 1992; Malmezat *et al.*, 2000).



Chez les insectes, les GSTs représentent un mécanisme très important de détoxification dus à leur participation dans la résistance aux insecticides (Motoyama & Dauterman, 1980; Clark *et al.*, 1985; Fournier *et al.*, 1992; Kostaropoulos *et al.*, 2001; Papadopoulos *et al.*, 2004; Yu, 2004). Ce système actif d'enzymes de détoxification chez les abeilles est situé majoritairement à deux emplacements stratégiques: l'intestin et le corps gras. Cette localisation particulière lui permet d'intervenir rapidement sur les molécules qui doivent soit être transformées pour être biologiquement actives (comme certaines hormones) soit au contraire pour être inactives ou détoxifiées (Gilbert & Wilkinson, 1974; Yu, 1984; Yu *et al.*, 1984; Smirle & Winston, 1988).

Il a été démontré que les activités de la GST sont âge-dépendant chez les invertébrés (Hazelton & Lang, 1983; Wood *et al.*, 1986; Kotze & Rose, 1987; Kostaropoulos *et al.*, 1996). Chez les abeilles, cette activité enzymatique de détoxification semble être influencée non seulement par l'âge mais aussi par le comportement et la démographie de la colonie (Smirle & Winston, 1988; Smirle, 1993).

L'évolution de l'activité spécifique de la GST observée dans nos résultats obtenus avec *A.m. intermissa* est en accord avec certains résultats cités dans la littérature. En effet, il a été constaté que les abeilles nouvellement émergées et les nourrices présentaient une basse activité spécifiques des enzymes de détoxification par rapport aux butineuses.

Smirle (1993) a constaté que les abeilles nouvellement émergées ont de basses activités spécifiques des enzymes de détoxification. Ces mêmes résultats ont été également observés par Ayad-Loucif *et al.* (2008). Cette basse activité de la GST pourrait rendre les abeilles plus vulnérables aux substances toxiques (Brodsgaard *et al.*, 1999) et pose un risque considérable à la colonie puisque la mort des abeilles nouvellement émergées prive la colonie des rôles effectués par les ouvrières le long de leur vie (Smirle et Winston, 1987). L'augmentation de l'activité enzymatique chez les butineuses, pourrait correspondre à une stratégie biochimique adaptée à la recherche de la nourriture dans les écosystèmes (Smirle et Winston, 1988; Nielson *et al.*, 2000).

Le traitement des abeilles avec les acaricides utilisés dans la lutte anti-varroa a entraîné une augmentation de l'activité spécifique de la GST dans les colonies traitées par le fluvalinate chez les jeunes abeilles adultes (émergente et nourrice) et dans les colonies traitées avec l'acide oxalique aucune différence significative de l'activité spécifique de la GST n'a été



constatée chez les émergentes, les nourrices et les butineuses. Le fluvalinate constitue un facteur de stress néfaste à la santé de la colonie d'abeilles (Haarmann *et al.*, 2002). Nos résultats sont conformes avec les résultats obtenus par Loucif-Ayad *et al.* (2008) où une augmentation significative a été enregistrée chez les larves, les nymphes et les jeunes abeilles adultes (émergentes et nourrices) après traitement aux acaricides synthétiques (fluméthrine et amitrase) et aucun effet n'a été observé après traitement aux acaricides naturels (thymol et huiles essentielles). Aussi, Brodsgaard *et al.* (1999) ont constatés qu'aucun effet n'a été enregistré sur l'activité spécifique de la GST chez les nymphes et les adultes nouvellement émergés traités par l'acide oxalique.

Chez les butineuses, aucun effet négatif n'a été observé après le traitement aux deux acaricides synthétique et naturel comparativement aux témoins, ceci est dû au fait que les butineuses sont exposées aux acaricides à des degrés moindres par rapport aux abeilles âgées de 0 et 7 jours qui assurent leur tâche à l'intérieur de la ruche et qui sont le plus exposées aux acaricides (Nielson *et al.*, 2000). En effet, les jeune abeilles (moins de 21 jours), peuvent éprouver différents stress chimiques causés par les acaricides utilisés dans la lutte contre *V. destructor* (Gregorc *et al.*, 2004). Cependant, l'augmentation de la GST suite aux traitements chez ces jeunes ouvrières qui sont responsables de la transformation de la nourriture (Winston, 1987), pourrait avoir des conséquences négatives pour la survie de la colonie. Il a été démontré que l'emploi de certains pyrétrinoïdes tels que la fluméthrine expose les abeilles à un stress toxique pouvant avoir comme conséquences, des ouvrières plus petites de taille ou encore, causer une mortalité accrue avant l'âge adulte (Nielson *et al.*, 2000).

L'induction de la GST a été rapportée suite à l'exposition des abeilles aux insecticides organophosphorés (Hayaoka & Gauterman, 1982; Clark, 1989) et organochlorés (Hayaoka & Gauterman, 1982; Lagadic *et al.*, 1993; Papadopoulos *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 2000; Kostaropoulos *et al.*, 2001), mais également après exposition aux pyrétrinoïdes (Yu *et al.*, 1984; Punzo, 1993; Loucif-Ayad *et al.*, 2008; Badiou-Bénéteau *et al.*, 2012). Ces pesticides agissent individuellement ou en synergie et créent un environnement toxique aux abeilles (Johnson *et al.*, 2010). Dans les colonies d'abeilles, où les apiculteurs n'ôtaient pas les lanières imprégnées d'acaricides après chaque traitement ou encore, lorsqu'ils les réutilisaient, une augmentation de la GST a été constatée (Nielson *et al.*, 2000).

Des travaux antérieurs ont montré que les acides organiques entraînaient des altérations des structures anatomiques et physiologiques des abeilles favorisant la pénétration



des agents pathogènes et créant un environnement favorable au développement fongique (Howis *et al.*, 2010).

Le fluvalinate et l'acide oxalique affectent les aptitudes (fitness) et les performances des abeilles (Stoner *et al.*, 1985; Lodesani & Costa, 2005; Moosbeckhofer, 2001; Schneider *et al.*, 2012) et entraînent des modifications du comportement (Schneider *et al.*, 2012). Ils affectent les facultés d'apprentissage et de mémorisation chez les ouvrières (Taylor *et al.*, 1987; Schneider *et al.*, 2012; Frost *et al.*, 2013). De ce fait, tous ces changements rendraient les abeilles plus faibles et moins vitales ce qui pourrait affecter l'état de santé général des colonies d'abeilles (Schneider *et al.*, 2012).

*CONCLUSION*

*ET*

*PERSPECTIVES*



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour se prémunir de nombreuses espèces dites nuisibles, l'Homme disperse volontairement dans la nature (et dans la ruche) des substances toxiques, le plus souvent synthétiques. Pour évaluer l'impact de ces substances sur des organismes qui ne sont pas initialement ciblés et définir les risques associés, certaines espèces animales ont été choisies comme modèle d'étude. L'abeille domestique *Apis mellifera* est un sujet d'étude d'autant plus pertinent qu'elle est l'outil de travail de plusieurs millions d'apiculteurs et participe activement par son activité pollinisatrice au maintien de la biodiversité végétale.

Les abeilles sont victimes d'un parasite létal contre lequel elles n'ont pas de défense; il s'accroche sur leur thorax, leur perce la cuticule et se nourrit de leur fluide vital, les affaiblissant et les rendant vulnérables à de nombreuses infections et complications secondaires. Face au plus dévastateur des parasites de l'abeille, *Varroa destructor*, les apiculteurs ont dû recourir à l'utilisation de toute une batterie d'acaricides.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'efficacité de deux traitements acaricides, l'un synthétique, le fluvalinate, et l'autre naturel, l'acide oxalique, appliqué à deux doses (3,25g et 6,5g), utilisés dans la lutte contre l'infestation de l'abeille *Apis mellifera intermissa* par l'acarien ectoparasite, *V. destructor*.

Les traitements acaricides testés sont efficaces dans le contrôle de l'infestation des abeilles par l'acarien *V. destructor*, néanmoins, le traitement acaricide synthétique (fluvalinate) présente une efficacité plus importante comparativement au traitement naturel (Acide oxalique aux doses 6,5g et 3,25g). L'emploi de l'acide oxalique en présence de couvain permet d'expliquer ce résultat. La majorité des tests ont montré la grande efficacité de l'acide oxalique, seulement en absence de couvain.

Aussi, durant notre étude expérimentale nous avons évalué les éventuels effets secondaires de ces deux traitements acaricides sur les principaux métabolites (protéines, glucides et lipides) dans le corps entier des abeilles ainsi que dans l'hémolymphe. Pour cela, des échantillons d'abeilles adultes âgées de 0, 7 et 21 jours ont été recueillis au niveau des colonies d'abeilles traitées par les acaricides synthétique et naturel et ont été comparés à des colonies non traitées au sein d'un même rucher. Le fluvalinate entraîne des perturbations biochimiques au niveau de l'hémolymphe et du corps entier des abeilles. En effet, une



réduction a été enregistrée dans les teneurs et les concentrations des protéines, glucides et lipides, dans le corps et dans l'hémolymphe. L'acide oxalique (6,5 g et 3,25 g) ne semble pas en général affecter les quantités de ces principaux métabolites.

Ces différentes perturbations et changements dans la composition des métabolites pourraient avoir des conséquences négatives sur le développement, la croissance et la longévité des abeilles.

L'impact de ces deux acaricides sur l'activité spécifique de deux biomarqueurs enzymatiques: l'acétylcholinestérase (AChE), biomarqueur de neurotoxicité, et la glutathion-S-transférase (GST), enzyme de détoxification chez les abeilles ouvrières a été mise en évidence.

Le fluvalinate, entraîne une diminution significative de l'activité spécifique de l'AChE chez les abeilles nouvellement émergées (0 jour) et nourrices (7 jours), traitées comparativement à celles témoins; ceci précise l'action neurotoxique de cet acaricide. Chez les butineuses, l'activité enzymatique de l'AChE est similaire dans tous les groupes d'abeilles; ceci est expliqué par le fait que les butineuses sont exposées à un degré moindre aux acaricides. L'acide oxalique (6,5 g et 3,25 g) ne semble pas avoir une action neurotoxique sur les abeilles adultes.

Le fluvalinate, affecte également le système de détoxification chez *A.m. intermissa*. L'augmentation significative de la GST, suite à l'exposition des abeilles à cet acaricide, montre que la molécule provoque un stress toxique avec la mise en place d'un processus de détoxification chez les ouvrières émergentes et nourrices. Chez les butineuses, exposées à un degré moindre aux acaricides, l'activité spécifique de la GST est similaire dans tous les groupes. L'acide oxalique (6,5 g et 3,25 g) ne semble pas avoir un effet toxique sur les abeilles adultes.

Cependant, l'absence d'effet sur les abeilles suite au traitement par l'acaricide naturel acide oxalique n'élimine pas le fait qu'elles aient été physiologiquement affectées par le traitement. De plus, le traitement a été effectué en utilisant des doses préconisées. Il est fort probable que des altérations pourraient se produire dans le cas d'un surdosage. En effet, il est à noter que certains apiculteurs ne respectent pas les doses d'acaricides prescrites.



Il est cependant impératif que les acaricides soient employés d'une manière rigoureuse en respectant les doses prescrites, le moment et la durée de leur utilisation. Aussi, les acaricides devraient être utilisés sous surveillance par les services concernés afin d'éviter les perpétuelles infestations et sauver ainsi l'abeille domestique, sentinelle de l'environnement.

La lutte contre *V. destructor* par l'utilisation des différents acaricides est un domaine très vaste. Les recherches doivent se poursuivre afin de mettre en place une meilleure stratégie de lutte qui doit commencer par un dépistage régulier tant pour détecter la présence du varroa que pour évaluer son importance une fois l'infestation commencée. La surveillance des populations de *V. destructor* qui vivent dans les colonies est donc essentielle afin de contrôler ce parasite. Cette opération permet de déceler à temps l'approche de taux élevés d'infestation de varroas et d'appliquer un moyen de contrôle. Chaque apiculteur doit faire régulièrement une évaluation du taux de parasitisme en utilisant un moyen de dépistage recommandé par les autorités locales.

D'autre part, la connaissance de la relation abeille-varroa est d'une importance capitale. En effet, afin de bien comprendre le comportement de notre abeille locale *A. mellifera intermissa* vis-à-vis de ce parasite, d'évaluer la réinfestation des colonies et de déterminer le phénomène de résistance au sein de nos colonies, il serait intéressant de suivre la dynamique de la population de l'abeille locale sur plusieurs années et faire une étude comparative entre l'évolution de la population du varroa au niveau des ruches mères et les essaims issus de celle-ci dans différents ruchers du pays.

Il serait aussi important de poursuivre les recherches sur d'autres acaricides homologués afin d'évaluer leurs éventuels effets secondaires sur la physiologie de l'abeille et de tester leur efficacité dans la lutte anti-varroa.

L'étude de la présence des acaricides dans les différents produits de la ruche et chez l'abeille doit être entreprise par l'analyse des résidus.

L'abeille est un excellent indicateur biologique. Elle signale l'état de santé de l'environnement dans lequel elle vit. Elle assure en outre la biodiversité grâce à son rôle de pollinisateur. L'abeille mérite donc d'être protégée!

# *RÉSUMÉS*



## RÉSUMÉ

L'acarien *Varroa destructor*, ectoparasite de l'abeille *Apis mellifera intermissa* adulte et de son couvain, joue un rôle de première importance dans le phénomène de mortalité des colonies. Pour lutter contre ce parasite, divers traitements acaricides sont employés par les apiculteurs.

Notre étude a porté sur l'évaluation d'une part de l'efficacité de deux traitements acaricides, l'un synthétique, le fluvalinate (Apistan), et l'autre naturel, l'acide oxalique appliqué à deux doses (3,25g et 6,5g) à l'égard de l'acarien parasite de l'abeille *Varroa destructor* et d'autre part, sur les éventuels effets secondaires de ces acaricides sur les abeilles adultes âgées de 0, 7 et 21 jours par le dosage des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) dans le corps entier de l'abeille et son hémolymphe ainsi que sur l'activité spécifique enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) et la glutathion-S-transférase (GST).

Les résultats obtenus concernant l'efficacité des traitements montrent que les deux acaricides réduisent significativement le niveau d'infestation chez les ouvrières adultes et dans le couvain operculé d'*A.m. intermissa*. L'efficacité, exprimée en pourcentage de mortalité du varroa, était plus élevée dans les colonies d'abeilles traitées au fluvalinate par comparaison aux colonies traitées à l'acide oxalique où le pourcentage enregistré de mortalité des acariens est de  $94,13 \pm 0,85$  % pour les abeilles adultes et de  $92,85 \pm 1,14$ % pour le couvain operculé, alors que pour l'acide oxalique, le pourcentage de mortalité du varroa est de  $51,37 \pm 1,51$ %;  $59,45 \pm 1,20$ % et  $41,91 \pm 1,02$ %;  $57,23 \pm 1,23$ % pour les abeilles adultes et le couvain operculé pour les doses 6,5g et 3,25g respectivement.

Aussi, l'analyse statistique a révélé que l'acaricide synthétique le fluvalinate entraîne des perturbations physiologiques caractérisées par une diminution significative au niveau des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) du corps et de l'hémolymphe chez les abeilles adultes âgées de 0, 7 et 21 jours. Aucun effet négatif n'a été enregistré chez les abeilles traitées à l'acide oxalique avec les deux doses testées.

Les réponses des deux biomarqueurs, l'AChE et la GST montrent des fluctuations importantes en relation avec le stress subis par les abeilles ouvrières. En effets, une diminution au niveau de l'activité enzymatique de l' AChE et une augmentation au niveau de



l'activité enzymatique de la GST ont été enregistrées chez les ouvrières émergentes (0 jour) et les nourrices (7 jours) traitées au fluvalinate. Chez les butineuses, l'activité enzymatique de la l'AChE et de la GST sont similaires dans tous les groupes d'abeilles. Néanmoins, l'acide oxalique (6,5 g et 3,25 g), ne semble pas provoquer de modifications dans l'activité enzymatique de l'AChE et de la GST.

**Mots clés:**

*Apis mellifera intermissa*, *Varroa destructor*, fluvalinate, acide oxalique, métabolites, biomarqueurs.



## ABSTRACT

The mite *Varroa destructor*, ectoparasitic of both adult and brood honey bees *Apis mellifera intermissa*. It is considered to play a major role in the phenomenon of mortality of the colonies. To fight against this parasite, various acaricides treatments are used by beekeepers.

Our study was about, in one way, the evaluation of effectiveness of two acaricides treatments; synthetic, the fluvalinate (Apistan) and natural, oxalic acid of two doses (3,25g and 6,5g) against the parasitic mite *Varroa destructor* and another way, the potential side effects of these acaricides on adult honeybees of 0, 7 and 21 days old with the dosage of different metabolites (Proteins, carbohydrates and lipids) in the body tissues of the honeybee and its hemolymph and on the specific enzymatic activity of acetyl cholinesterase (AChE) and glutathione-S-transferase (GST).

The obtained results regarding the effectiveness of treatments show that both acaricides reduce significantly the level of mite infestation on adult workers and capped brood of *A.m. intermissa*. The efficiency expressed as a percentage of mite mortality, was higher in the colonies treated with fluvalinate compared to the colonies treated with oxalic acid in which the percentage of mite mortality is  $94,13 \pm 0,85\%$  on adult honeybees and  $92,85 \pm 1,14\%$  on the capped brood, in contrast; for the oxalic acid, the percentage of mite mortality is  $51,37 \pm 1,51$ ;  $59\%$ ,  $45 \pm 1,20\%$  and  $41,91 \pm 1,02\%$ ;  $57,23 \pm 1,23\%$  on the adult honeybees and on the capped brood for both doses 6,5g and 3,25g respectively.

Also, statistical analysis revealed that the synthetic acaricide, fluvalinate, causes physiological disturbances characterized by a significant decrease in the concentrations of proteins, carbohydrates and lipids in the body tissues and hemolymph of adult honeybees of 0, 7 and 21 days old. In contrast, no negative effect was recorded in honeybees treated with oxalic acid with two tested doses.

The response of two biomarkers, AChE and GST shows significant fluctuations in relation to the stress endured by the workers bees. Indeed, a significant decrease in the specific activity of AChE and a significant increase in the specific activity of GST were observed after treatment by fluvalinate in newly emerged workers (0 jour) and in nurse bees (7 days) as compared to controls. In the forager bees, the AChE and the GSTs activities were



similar in all groups of honeybees. However, the oxalic acid (6,5g and 3,25g) has not caused any significant alteration of the GST activity in the adult stage (0, 7 and 21 days old).

**Key words:**

*Apis mellifera intermissa*, *Varroa destructor*, fluvalinate, oxalic acid, metabolites, biomarkers.



## ملخص

يعتبر قراد الفاروا *Varroa destructor* طفيل خارجي عند نحل العسل *Apis mellifera* *intermissa* البالغ وخصنته، وبذلك فهو يلعب دورا مهما في ظاهرة موت مستعمرات النحل. ومن أجل مكافحة هذا الطفيل يستخدم مربو النحل معالجات مختلفة بمبيدات القراد.

تمحورت هذه الدراسة حول تقييم مدى فاعلية المعالجة باثنين من مبيدات القراد، الأول اصطناعي، يتمثل في الفلوفالينات (Apistan)، والثاني طبيعي يتمثل في حمض الأوكزاليك، حيث تم استعمال تركيزين مختلفين (3,25 غ و 6,5 غ)، ومن جهة أخرى حول التأثيرات الثانوية المحتملة لهذه المبيدات على النحل من خلال معايرة المركبات الأيضية (البروتينات والغلوسيدات والليبيدات) في كامل الجسم واللف الدموي وكذلك النشاط المتخصص للإنزيمات "أسيتيلكولين استيراز" (AChE) و"الجلوتاثيون S ترانسفيراز" (GST).

بينت النتائج المتحصل عليها والمتعلقة بفاعلية المعالجة أن المبيدين الاثنين يخفضان بصورة معتبرة مستوى إصابة عاملات النحل البالغات وكذلك خصنتها المغلفة. وكانت نسبة الفاعلية التي تم التعبير عنها بالنسبة المئوية لموت قراد الفاروا مرتفعة عند مستعمرات النحل المعالجة بـ "الفلوفالينات" بالمقارنة مع مستعمرات عولجت بـ "حمض الأوكزاليك" وقد قدرت النسبة المئوية المسجلة لموت القراد بالفلوفالينات  $0,85 \pm 94,13\%$  بالنسبة للنحل البالغ و  $1,14 \pm 92,85\%$  بالنسبة للحضنات المغلفة، بالمقابل فإن النسبة المئوية المسجلة لموت قراد الفاروا باستعمال حمض الأوكزاليك هو:  $1,51 \pm 51,37$ ،  $1,20 \pm 59,45$  و  $1,02 \pm 41,91$ ،  $1,23 \pm 57,23$  بالنسبة للنحل البالغ والحضنات المغلفة في التركيزين 6,5 و 3,25 غ على الترتيب.

أظهر التحليل الإحصائي أن مبيد القراد الاصطناعي "الفلوفالينات" يسبب اضطرابات فسيولوجية تتمثل بانخفاض معتبر لمستوى مختلف المركبات الأيضية (بروتينات، غلوسيات وليبيدات) للأجسام واللف الدموي عند النحل البالغ في عمر من 0,7 و 21 يوم. وبالمقابل لم يسجل أي تأثير سلبي عند النحل البالغ في حالة حمض الأوكزاليك بكلا التركيزين المستعملين.

بينت استجابات الواصمين الحيويين، (AChE) و (GST) وجود تغيرات معتبرة لها علاقة بالتوتر عند العاملات. فقد تم تسجيل انخفاض في مستوى النشاط الإنزيمي لـ (AChE) وارتفاع بالنسبة لـ



(GST) عند العاملات الناشئة (0 يوم) والحاضنات (7 أيام) المعالجة بـ "الفلوفالينات". كما كان النشاط الإنزيمي لـ (AChE) و لـ (GST) متشابه عند النحل السارح في كل مجاميع النحل. غير أن مبيد القراد الطبيعي المتمثل في حمض الأوكزاليك (6,5 غ و 3,25 غ)، لم يحدث تغيرات في النشاط الإنزيمي لكل من (AChE) و (GST).

#### الكلمات المفتاحية:

نحل العسل *Apis mellifera intermissa*، قراد الفاروا *Varroa destructor*، فلوفالينات، حمض الأوكزاليك، مركبات أيضية، واصمات حيوية.

*REFERENCES*

*BIBLIOGRAPHIQUES*



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdallah E.A. M., Eldefrawi M.E. & Eldefrawi A.T., 1991.** Pharmacological characterization of muscarinic receptors of insect brains. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **17**: 107-118.
- Abdallah A.T., 2004.** On the efficiency of some histological techniques as biomarker for heavy metal pollution. *Science, Technology and Education of Microscopy*, 287-296.
- Abd El Wahab T.E., Zakaria M. E. & Nour M.E., 2006.** Influence of the infestation by varroa mite *Varroa destructor* on some Antennal sense organs of the worker and drone honey bees *Apis mellifera* L. *J. of Applied Sciences Res.*, **2(2)**: 80-85.
- Abou-Seif M.A.M., Maier V., Fuchs J., Mezger M., Pfeiffer E. F. & Bounias M., 1993.** Fluctuations of hemolymph of honeybee (*Apis mellifica*) after fasting, feeding and stress, *Horm. Metab. Res.* **25**: 4-8.
- Achou M. & Soltani N., 1997.** Impact of *Varroa jacobsoni* Oud. on the morphometry and biochemical composition of hemolymph in honeybees *Apis mellifera intermissa* L. *Parasitica*, **53**: 127-134.
- Adjlane N., Haddad N. & Tarek O., 2013.** Evaluation of the efficacy of different acaricides against *Varroa destructor* on *Apis mellifera intermissa* in Algeria. *Acarina* **21 (2)**: 141-146
- Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L. & Aizen, M.A., 2006.** Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology letters* **9**: 968-80.
- Akkaya A. & Vurusaner C., 1996.** Field experiment to determine the efficacy of flumethrin (Bayvarol Strips) and fluvalinate (Apistan Strips) against varroaosis of the honey bee colonies. *Acta Parasitologica Turcica*, **20 (3-4)**: 457-460.
- Akkaya A. & Vurusaner C., 1997.** Field experiment to determine the efficacy of flumethrin and coumaphos against varroasis according to the state of the honey bee colonies. *Acta Parasitologica Turcica*, **21 (1)**: 83-86.
- Al-ghamdi A., 2007.** Evaluation of the relative efficacy of different acaricides against *Varroa destructor* on *Apis mellifera carnica*. *Annals of agricultural science Cairo*, **52 (2)**: 501.
- Aliano N.P. & Ellis M.D., 2008.** Bee-to-bee contact drives oxalic acid distribution in honey bee colonies. *Apidologie*, **39**: 481-487.
- Allen-Wardell G., Bernhardt P., Bitner R., Burquez A., Buchmann S., Cane J., Cox P.A., Dalton V., Feinsinger P., Ingram M., Inouye D., Jones C.E., Kennedy K., Kevan P., Koopowitz H., Medellin R., Medellin-Morales S. & Nabhan G.P., 1998.** The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology*, **12**: 8-17.



- Alumot E., Lensky Y. & Holstein P., 1969.** Sugars and trehalase in the reproductive organs and hemolymph of the queen and drone honey bees (*Apis mellifera* L. Var. *Ligustica* Spi.), *Comp. Biochem. Physiol.* **28**: 1419–1425.
- Amdam G., Hartfelder K., Norberg K., Hagen A. & Omholt S. W., 2004.** Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidea) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidea): A factor in colony loss during overwintering. *J. Econ. Entomol.*, **97**: 741- 747.
- Anchling F., 2001.** Les tribulations de l'acide oxalique. *Abeille de France* **876**: 567-569. [In French].
- Anderson D.L. & Trueman J.W.H., 2000.** *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.*, **24**: 165- 189.
- Anderson K.E., Sheehan T.H., Eckholm B.J., Mott B.M. & DeGrandi-Hoffman G., 2011.** An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honeybee and hive (*Apis mellifera*). *Insect. Soc.*, **58**: 431-444.
- Ariana A., Ebadi R. & Tahmasebi G., 2002.** Laboratory evaluation of some plant essences to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **27**: 319–327.
- Arslan A., Standifer L;N., & Don H., 1986.** Carbohydrate in honeybee hemolymph, *Comp. Biochem. Physiol.* **84B**: 363- 367.
- Ashman T.-L., Knight T.M., Steets J.A., Amarasekare P., Burd M., Campbell D.R., Dudash M.R., Johnston M.O., Mazer S.J., Mitchell R.J., Morgan M.T. & Wilson W.G., 2004.** Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* **85**: 2408– 2421.
- Ayad-Loucif W., 2008.** Etude de la diversité génétique des abeilles domestiques algériennes (*Apis mellifera* L.) et évaluation de l'effet de divers acaricides sur les abeilles et leur parasite *Varroa destructor*. *Thèse de doctorat d'état*, Université d'Annaba, 171p.
- Babczynska A., Wilczek G. & Migula P., 2006.** Effects of dimethoate on spiders from metal pollution gradient. *Sci. Total Environ.*, **370**: 352–359.
- Bacandritsos N., Papanastasiou I., Saitanis C., Nanetti A. & Roinioti E., 2007.** Efficacy of repeated trickle applications of oxalic acid in syrup for varroosis control in *Apis mellifera*: Influence of meteorological conditions and presence of brood. *Veterinary Parasitology*, **148**:174-178.
- Bacher R., 2006.** Les abeilles, le miel et l'apiculture. Ed. Terre vivante (l'Ecologie Pratique. 141p.
- Badilla S., 1995.** Regulation and research issues related to cholinesterase inhibition. *Toxicol.*, **102**: 105.



- Badiou A., 2007.** Caractérisation Cinétique et Moléculaire du Biomarqueur Acétylcholinestérase chez l'Abeille, *Apis mellifera*. *Thèse de doctorat*. Université Paul Cezanne Aix-Marseille III.
- Badiou A., Melek M. & Belzunces L.P., 2008.** Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase-A biomarker to detect delmethrin exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **69**: 246-253.
- Badiou-Bénéteau A., Carvalho S.M., Brunet J.-L., Carvalho G.A., Buleté A., Giroud B. & Belzunces L.P., 2012.** Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and environmental safety*, **82**: 22-31.
- Bailey, L. & Ball, B.V., 1991.** Honey Bee Pathology, 2nd edn. *Academic Press*, London, UK.
- Bainy, A.C.D., 2000.** Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture*, **191**: 163-168.
- Balayiannis G. & Balayiannis P., 2008.** Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **55**: 462-470.
- Baldensperger P. J., 1924.** North African bees. II. *Bee World*, **5**: 189- 190
- Ball B.V. & Allen M.F., 1988.** The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Annals of Applied Biology* **113**: 237-244
- Bandyopadhyay R., 1982.** Inhibition of acetylcholine esterase by permethrin and its reversion by acetylthiocholine. *Indian J. Exp. Biol.*, **20**: 488-491.
- Barata C., Navarro J., Varo I., Riva M., Arun S. & Porte C., 2005.** Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B140**: 81-90.
- Barbançon, 2002.** Le Traité Rustica de l'Apiculture. Ed. Rustica. 528p
- Barour C., Tahar A. & Baylac M., 2011.** Forewing shape variation in Algerian honeybee populations of *Apis mellifera intermessa* (Buttel-Reepen, 1906) (Hymenoptera: Apidae): A landmark based geometric morphometrics analysis. *African Entomology*, **19(1)**: 11-22.
- Baxter J., Eischen F., Pettis J., Wilson W.T. & Shimanuki H., 1998.** Detection of fluvalinate-resistant varroa mites in US honey bees. *Amer. Bee J.*, **138**: 291.
- Beenackers A.M.T., 1960.** Carbohydrate and fat as fuel for insect flight. A comparative study, *J. Insect Physiol.* **15**: 335- 361.
- Beetsma J., Boot W.J. & Calis J., 1999.** Invasion behaviour of *Varroa jacobsoni* Oud. from bees into brood cells. *Apidologie*, **30**: 125- 140



- Beismejjer J.C., Roberts S.P.M., Reemer M., Ohlemüller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A.P., Potts S.G., Kleukers R., Thomas C.D., Settele J. & Kunin W.E., 2006.** Parallel declines in pollinators and insect pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, **313**: 251-353.
- Belzunces, L.P., Toutant, J.P. & Bounias M., 1988.** Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation. *Biochem. J.*, **255**: 463–470.
- Belzunces L.P., Gauthier M. & Colin M.E., 1992.** Acetylcholinesterase in *Apis mellifera* head during postembryonic development-existence of a glycoinositol-anchored membrane form at early pupal stages. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **103**: 57–63.
- Bendahou N., Bounias M. & Fleche C., 1999.** Toxicity of cypermethrin and fenitrothion on the hemolymph carbohydrates, head acetylcholinesterase, and thoracic muscle Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of emerging honeybees (*Apis mellifera mellifera*. L). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*; **44**:139-146.
- Bishop G.H., Briggs A.P. & Ronzoni E., 1925.** Osmotic effect of haemolymph constituents in bee larva. *J. Biol. Chem*, **66**: 77-88.
- Bernal J., Garrido-Bailon E., del Nozal M.J., Gonzalez-Porto A.V., Martin-Hernandez R., Diego J.C., Jimenez J.J., Bernal J.L. & Higes M., 2010.** Overview of pesticide residues instored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economic Entomology*, **103**: 1964-1971.
- Berry J., 2009.** Pesticides, bees and wax: an unhealthy mix Bee. *Culture*, **137**: 33-35.
- Biri M., 2010.** Tout savoir sur les abeilles et l'apiculture. 7e éd. Paris : De Vecchi. 302 p.
- Bocquené, G., 1996.** L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Thèse Doctorat, Ecole Pratique des Hautes Etudes. 250 p.
- Bogdanov S., Charrière J.D., Imdorf A, Kilchenmann V. & Fluri P., 2002.** Determination of residues in honey after repeated field trials with formic and oxalic acid. *Apidologie*, **33(4)**: 399-409.
- Bogdanov, S., Ruoff, K. & Persano Oddo, L., 2004.** Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* **35**: S4–S17.
- Bogdanov S., 2006.** Contaminants of bee products. *Apidologie*, **38 (1)**: 1-18.
- Boot W.J., Calis J.N.M. & Beetsma J., 1992.** Differential periods of *Varroa* mite Invasion into worker and drone cells of honey bees. *Exp. Appl.Acarol.***16**: 295-301.
- Boot W.J., Schoenmaker J., Calis J.N.M. & Beetsma J., 1995.** Invasion of *Varroa jacobsoni* into drone brood cells of the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie*. **26**: 109-118.



- Boot W. J., Tan N. Q., Dien P. C., Huan L. V., Van Dung N., Long L. T. & Beetsma J., 1997.** Reproductive success of *Varroa jacobsoni* in brood of its original host, *Apis cerena*, in comparison to that of its new host, *A. mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Bull. Entomol. Res.*, **87**: 119- 126
- Bowen-Walker P. L. & Gunn A., 2001.** The effect of ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate and lipid levels. *Entomol. Exp. Appl.*, **101**: 207- 217
- Bradford M. M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72** : 248- 254.
- Branco M., Kidd N.A.C. & Pickard R., 2006.** A comparative evolution of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari: Varoidae) population estimation. *Apidologie*, **37**: 1- 10
- Brodtschneider R., Moosbeckofer R., & Crailsheim K., 2010.** Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *Journal of Apicultural Research*, **49(1)**: 23-30.
- Brodsgaard C. J., Hansen H. & Hansen C.W., 1997.** Effect of lactic acid as the only control method of varroa mite population during four successive years in honey bee colonies with a brood free period. *Apiacta*, **32**: 81-88
- Brodsgaard C.J., Jensen S.E., Hansen C.W. & Hansen H., 1999.** Spring treatment with oxalic acid in honeybee colonies as varroa control. *DIAS Report Horticulture*, **6(2)**: 1- 16.
- Brouwers E.V.M., 1982.** Measurement of hypopharyngeal gland activity in the honeybee, *J.Apic. Res.* **21**: 193-198.
- Bubalo D., Pechhacker H., Licek E., Kezic N. & Sulimanovic D., 2005.** The effect of *Varroa destructor* infestation on flight activity and mating efficiency of drones (*Apis mellifera* L.). *Vet. Med. Austria*, **92**: 11–15.
- Büchler R., Drescher W. & Tornier., 1992.** Grooming behavior of *Apis dorsata* and its effect on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Exp. Appl. Acarol.*, **16**: 313-319.
- Buchmann S.L. & Nabhan G.P., 1996.** *The forgotten pollinators*. Island Press, Washington (DC), 312p.
- Buttel-Reepen H. V., 1906.** Apistica Beiträge Zur Systematik. Biologie Sowie zur geschichtlichen und geographischen verbeitrung du Honigbiene (*Apis mellifera* L.) ihare varietaten und übrigen. Apis- Arten., Berlin
- Calderone N. W. & Lin S., 2001.** Arrestment activity of extracts of honey bee worker and drone larvae, cocoons and brood food on female *Varroa destructor*. *Physiol. Entomol.*, **26** : 241- 350.



- Calderone N.W. & Kuenen L.P.S., 2001.** Effect of Honey Bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), Colony, Cell Type and Larval Sex on Host Selection by Female *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), *J. Econ. Entomol.* **94**: 1022–1030
- Calderone N. W., Lin S. L. & Kuenen P. S., 2002.** Differential infestation of honey bee, *Apis mellifera* worker and queen brood by the parasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, **33**: 389- 398.
- Calderone N.W. & Lin S., 2003.** Rapid determination of the numbers of *Varroa destructor*, a parasitic mite of the honey bee, *Apis mellifera*, on sticky- board collection devices. *Apidologie*, **34**: 11- 17.
- Calderone N.W., 2010.** Evaluation of Mite-Away-IITM for fall control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in colonies of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern USA. *Exp. Appl. Acar.*, **50**: 123- 132.
- Carrasco-Letelier L., Mendoza Y. & Branchiccela M.B., 2012.** Acute contact toxicity test of insecticides (Cipermetrina 25, Lorsban 48E, Thionex 35) on honeybees in the southwestern zone of Uruguay. *Chemosphere*.
- Caron D. M., 1999.** Honey bee biology and beekeeping. *Wicwas Press*, LLC. Cheshire, CT. 355p.
- Caron D., Burdick E., Ostigui N. & Frazier M., 2005.** Mid-Atlantic Apiculture Research and extension Consortium Survey Preliminaries. Department of Entomology, 501 Ag Sciences & Industries Bldg., Penn State University, PA 16802 and Dept of entomology, 250 Townsend Hall, University of Delaware, Newark, DE 19716, 7 p.
- Casida J.E., Gammon D.W., Glickman A.H. & Lawrence L.J., 1983.** Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**: 413–438.
- Celli G. & Maccagnani B., 2003.** Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology*, **56**:137-139.
- Chan Q.W.T., Howes C.G. & Foster L.J., 2006.** Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**: 2252- 2262.
- Charrière J.D., Imdorf A. & Fluri P., 1998.** Potentiel et limites de l'acide oxalique pour lutter contre *Varroa*. *Rev. Suisse d'Apic.* **95(8)** : 311-316.
- Charrière J.D. & Imdorf A., 1999.** Nouveaux résultats des essais de traitements à l'acide oxalique par dégouttement. *La santé de l'Abeille*. **174** : 335-342.
- Charrière J.D., 2001.** Optimisation of the oxalic acidtrickling method and bee tolerability of differentwinter treatments: trials in Liebefeld during thelast 3 years, Meeting of the European Group for Integrated *Varroa* Control, York, <http://www.apis.admin.ch/host/varroa/york.htm>.



- Charrière J.D. & Imdorf A., 2002.** Oxalic acid treatment by trickling against *Varroa destructor*: recommendations for use in central Europe and under temperate climate conditions. *Bee World*, **83**: 51-60.
- Charrière J.D., Imdorf A. & Kuhn R., 2004.** Bienenvertraglichkeit von *Varroa* behandlungen im Winter, Schweiz. Bienen-Ztg. **4** : 19-23
- Chauzat M. P., Carpentier P., Madec F., Bougeard S., Cougoule N., Drajnudel P., Clément M.C., Aubert M. & Faucon J.P., 2010.** The role of infectious agents in parasites in the health of honey bee colonies in France. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, **49**: 31-39.
- Chauzat M.P., Martel A-C., Cougoule N., Porta P., Lachaize J., Zeggane S., Aubert M., Carpentier P. & Faucon J.P., 2011.** An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **30**:103-111.
- Chen, Y. P. & Siede R., 2007.** Honey bee viruses. *Advances in Virus Research* **70**:33-80.
- Chen, Y. W., & Chen P. L. 2008.** The Control of *Varroa destructor* Using Oxalic Acid Syrup in Brood-right Honeybee Colonies. *Formosan Entomologist* **28**: 31-41.
- Clark A.G., Dick G.L., Martindale S.M. & Smith J.N., 1985.** Glutathione S-transferases from the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*: their isolation and characterization and the effect on their activity of endogenous factors. *Insect Biochem.*, **15**: 35– 44.
- Clark, A.G., 1989.** The compar *Biochem. Physiol. B*, **92**: 419– 446.
- Claudianos C., Ranson H., Johnson R.M., Biswas S., Schuler M.A., Berenbaum M.R., Feyereisen R. & Oakeshott J.G., 2006.** A deficit of detoxification enzymes:pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, **15** : 615–636.
- Clément H., 2000.** Les cahiers de l'élevage. Editions Rustica. 543p. Paris
- Clément H., 2009.** L'abeille sentinelle de l'environnement. Paris, Alternatives, 144 p.
- Clément H., 2011.** Traité Rustica de l'apiculture. Paris, *Rustica éditions*, 3ème édition, 529 p
- Colin M.E., Vandame R., Jourdan P., & Pasquale S., 1997.** Fluvalinate resistance of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae) in Mediterranean apiaries of France. *Apidologie*, **28**: 375-384.
- Colin M., Tchamitchian M., Bonmatin J. M. & Di Pascal S., 2001.** Presence of chitinase in adult *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of *Apis mellifera*. *Experimental and Applied Acarology*, **25**: 947- 955.
- Collins A.M. & Pettis J.S. 2001.** Effect of *Varroa* infestation on semen quality. *Am. Bee J.*, **141**:590-593.



- Colombo M., Lodesani M. & Spreafico M., 1993.** Resistance of *Varroa jacobsoni* to fluvalinate, Preliminary results of investigations conducted in Lombardy. *Ape Nostra Amica*, **15**: 12-15.
- Cook S.M., Awmack C.S., Murray D.A. & Williams I.H., 2003.** Are honeybees foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology*, **28**: 622-627.
- Cornuet J. M., Daoudi A., Mosshine E.H. & Fresnaye J., 1988.** Etude biométrique de populations d'abeilles Marocaines. *Apidologie*, **19**: 355- 366.
- Coppage D.L. & Matthews E., 1975.** Brain-acetylcholinesterase inhibition in a marine teleost during lethal and sublethal exposures to 1,2- dibromo-2,2-dichloroethyl dimethyl phosphate (naled) in seawater. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **31**: 128–133.
- Cox, R.L., Moffett J.O., Wilson W.T. & Ellis M., 1989.** Effects of late spring and summer menthol treatment on colony strength, honey production, and tracheal mite infestation levels. *Am. Bee J.*, **129(8)**: 547-549.
- Cremonese T.M., De Jong D. & Bitondi R.M.G., 1998.** Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, **91**: 1284-1289.
- Currie R.W., 1999.** Fluvalinate queen tabs for use against *Varroajacobsoni*Oud.: efficacy and impact on honeybee, *Apis mellifera* L., queen and colony performance. *Am. Bee J.*, **139(11)**: 871- 876.
- Czoppelt Ch. & Rembold H., 1970.** Vergleichende Analyse des Kohlenhydratstoffwechsels bei den Kasten der Honigbiene, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, **16**: 1249–1264.
- Dahle B., 2010.** The role of *Varroa destructor* for honey bee colonies losses in Norway. *Journal of Apicultural Research*, **49 (1)**: 124-125.
- Dainat B., Evans J.D., Chen Y. P., Gauthier L., & Neumann P., 2012.** Dead or Alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78** : 981-987.
- Danka R.G., Rinderer T.E., 1986.** Africanized bees and pollination, *Am. Bee J.*, **126**: 680-682.
- Davies T. G. E., Field L. M., Usherwood P. N. R., & Williamson M. S., 2007.** DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *Internat. Union Biochem. Molec. Biol. Life*, **59**: 151-162.
- De Groot A.P., 1950.** The influence of temperature and kind of food on increase in the nitrogen content of the young worker honeybee (*Apis mellifera* L.), Proc. K. Ned. Akad. Wet. Ser. C 53, Zoology, 560-566.



- De Jong D., De Jong P.H. & Goncalves L.S., 1982.** Weight loss and other damage to developing worker honey bees from infestation with *Varroa Jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, **21**: 161-167.
- De Jong D., Morse R. A & Eickwort G. C., 1982b.** Mite pests of honey bees. *Annu. Rev. Entomol.*, **27** : 229- 252
- De Jong, D., & De Jong P.H., 1983.** Longevity of Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes: Varroidae). *J. Econ. Entomol.*, **76**: 766-768.
- De la Rúa P., Jaffé R., Dall’Olio R., Muñoz I., & Serrano J., 2009.** Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, **40**: 263-284.
- Desaiah D., Cutkomp L.K., Vea E.V. & Koch R.B., 1975.** The effect of three pyrethroids on ATPases of insects and fish. *Gen. Pharmac.*, **6**: 31–34.
- De Vericourt, M., 2007.** Abeilles : Pourquoi meurent-elles toujours ? *Science et vie*, **1073**: 78-81.
- Devillers J. & Pham-Delègue M.H., 2002.** Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. *Editeurs Taylors & Francis*, Philadelphia, USA, 332p.
- Diamantino T.C., Almeida E., Soares A.M. & Guilhermino L., 2003.** Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* and their inhibition by zinc. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **71**: 219–225.
- Diego J.C., Jimenez J.J., Bernal J.L., & Higes M., 2010.** Overview of pesticide residues instored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economic Entomology*, **103**: 1964-1971.
- Djordjevic, J.T., Del Poeta, M., Sorrell, T.C., Turner, K.M. & Wright, L.C., 2005.** Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. *Biochem. J.*, **389**: 803–812.
- Donzé, G., 1995.** Adaptations comportementales de l’acarien ectoparasite *Varroa jacobsoni* durant sa phase de reproduction dans les alvéoles operculées de l’abeille mellifère, *Apis mellifera*. Thèse de Doctorat, Université de Neuchâtel, 159p.
- Donzé, G., Fluri P. & Imdorf A., 1998a.** Un si petit espace, une si grande organisation : La reproduction de varroa dans le couvain operculé de l’abeille. *Revue suisse de l’apiculture* **12**: 11-18.
- Duay P., 2002.** Relation between the level of preimaginal infestation by the broodmite *Varroa destructor* and adult life expectancy in drone honeybees (Hymenoptera : Apidae : *Apis mellifera*). *Entomologia Generalis* **26**: 213 218.
- Duay P., De Jong D. & Engels W., 2003.** Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, **34**: 61-65.



- Duchateau G. & Florkin M., 1959.** Sur la trehalosemie des insectes et sa signification. *Arch. Insect Physiol. Biochem.*, **67**: 306- 314.
- Eguaras M., Palacio M.A., Faverin C., Basualdo M., Del Hoyo M.L., Velis G. & Bedascarrasbure E., 2003.** Efficacy of formic acid in gel for varroa control in *Apis mellifera* L.: Importance of the dispenser position inside the hive. *Veter. Parasitol.*, **111**: 241-245.
- Eischen F.A., 1995.** Varroa resistance to Fluvalinate. *Am. Bee J.*, 815-816.
- Eldefrawi A.T., 1985.** Acetylcholinesterase and anticholinesterase; in *Comprehensive Insect. Physiology, Biochemistry and pharmacology*, Kerkut G.A and Gilbert L.I. (eds), vol. 12, pp. 115-130, Pergamon, New york
- Elliott J.E., Bishop C.A. & Morrissey C.A., 2011.** *Wildlife Ecotoxicology, forensic Approaches*. Springer. 463 pp.
- Ellis J.D. & Zettelalen C. M., 2010.** Varroa mite, *Varroa destructor*, Anderson and Trueman (Arachnida: Acari: Varroidae). EENY-763, 5pp.
- Ellman G. L. , Courtney K. D., Andres V. & Featherstone R. M., 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **38**: 84-90.
- Elzen P.J., Eischen F.A., Baxter J.B., Pettis J., Elzen G.W. & Wilson W.T., 1998.** Fluvalinate resistance in *Varroa jacobsoni* from several geographic locations. *American Bee Journal* **138**: p. 674-676.
- Elzen P.J., Baxter J.R., Spivak M. & Wilson W.T., 2000.** Control of *Varroa jacobsoni* Oud. Resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie*, **31**:437-441.
- Erkmen O., 2008.** Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J. Med. Food*, **7**: 587-592.
- Enan E. & Matsumura F., 1993.** Activation of phosphoinositide/protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids. *Biochem. Pharmacol.*, **45**: 703–710.
- Faucon J.P. & Colin M.E., 1983.** Bizarres disparitions. *Rev. Fr. Apic.* 422. 411.
- Faucon, J.P., 1992 :** Précis de pathologie, connaître et traiter les maladies des abeilles. Edit. FNOSAD 512p.
- Faucon J.P., Drajnudel P. & Fleche C., 1995.** Mise en évidence d'une diminution de l'efficacité de l'Apistan utilisé contre la varroase de l'abeille (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, **26**: 291-296
- Faucon J.P., Mathieu L., Ribière M., Martel A.C., Drajnudel P., Zeggane S., Aurières C. & Aubert M.F.A., 2002.** Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee World*, **83**: 14-23



- Fell R.D. & Tignor K., 2001.** Miticide effects on the reproductive physiology of queens and drones. *Am. Bee J.*, **141(12)**: 888-889.
- Fernandez N. & Coineau Y., 2002.** Varroa Tueur d'abeilles, bien le connaître pour mieux le combattre. Ed. Atlantica (Anglet), 237 p.
- Ferrer-Dufol M., Moreno Manera C., Martinez-Vinuales A., Sanchez-Acedo C., & Gracia-Salinas M., 1993.** Tratamiento con dos piretroides (fluvalunato y flumethrin) en presencia de cria operculada. *Vida apícola* **62**: 45-48.
- Floris I., 1992.** Osservazioni sulloinfestazione da *Varroa jacobson* Oud di covata femminile opercolata di *Apis mellifera ligustica* Spin., pp. 87- 98, in Atti Convegno Stato Attuale e Sviluppo della Ricerca in Apicoltura, 25- 26 October 1991, Sassari, Italy.
- Floris I., Satta A., Garau V. L., Melis M., Cabras P. & Aloul N., 2001.** Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strops in the apiary control of *Varroa destructor*. *Apidologie*, **32**: 577- 585.
- Floris I. Cabras P. Garau V. L., Minelli, E. V., Satta A. & Troullier J., 2001a.** Persistence and effectiveness of pyrethroids in plastic strips against *Varroa jacobsoni* (Acari : Varroidae) and mite resistance in a Mediterranean area. *J. Econ. Entomol.*, **94** : 806-810.
- Floris I., Satta A., Garau V. L., Melis M., Cabras P. & Aloul N., 2001b.** Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strops in the apiary control of *Varroa destructor*. *Apidologie*, **32**: 577- 585.
- Floris I., Satta A., Cabras P., Garau V. L. & Angioni A., 2004.** Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: Effectiveness, persistence, and residues. *J. Econ. Entomol.*, **97 (2)**: 187- 191
- Flores J.M., Puerta F. & Padilla F., Campano F., Ruiz J.A. & Ruiz D., 1994.** Lucha contra la varroasis. Situacion actual y perspectivas de futuro. *Vida Apicola*, 36-43.
- Fluri P. & Badganov S., 1982.** Age dependence of fat body protein in summer and winter bees (*Apis mellifera*), in: Eder J., Rembold N. (Eds.), Chemistry and biology of social insects, Verlag J. Peperny, München, pp. 170-171
- Fluri P., Lüscher M., Wille H. & Gerig L., 1982.** Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone and vitellogenin in worker honeybees. *J. Insect Physiol.* **28**: 61 – 68.
- Fluri P., 1994.** Réflexions des chercheurs en apiculture sur la régulation de la durée de vie des ouvrières. *Journal suisse d 'Apiculture*, **91**: 19-27.
- Fossi, M.C., Minutoli, R. & Guglielmo, L., 2001.** Preliminary results of biomarker responses in zooplankton of brackish environments. *Mar. Pollut. Bull.*, **42**: 745-748.



- Fournier, D., Bride, J.M., Poirie, M., Berge, J.-B. & Plapp Jr. F., 1992.** Insect glutathione S-transferases: biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.*, **267**: 1840– 1845.
- Francis F., Haubruge E., & Dierickx P., 2002.** Glutathione S-transferase isoenzymes in the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **49**: 158-166.
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F. & Guilhermino L., 2005.** Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, **10**: 360–375.
- Frazier M., Mullin C., Frazier J. & Ashcraft S., 2008.** What have pesticides got to do with it? *American Bee Journal*, **148(6)**: 521-523.
- Free J.B., 1970.** Insect pollination of crops. Academic Press, London. 544p.
- Free J.B., 1993.** Insect Pollination of Crops, 2<sup>nd</sup> ED., Academic Press, London, 684p
- Fronty A, 1990.** L'apiculture aujourd'hui. DRAGAUD EDITEUR. 222p
- Frost E.H., Shutler D., & Hillier N.K., 2013.** Effects of fluvalinate on honey bee learning, memory, responsiveness to sucrose, and survival. *J. Exp. Biol.*, **216**: 2931-2938.
- Fuchs S., 1988.** The distribution of *Varroa jacobsoni* on honeybee brood combs and within brood cells as a consequence of fluctuation infestation rates. European research on varroaosis control; Procc. Meet. EC. Exp. Group. Bad. Homburg 1986 Cavalloro Ed. Ed. Rotterdam: 73-76.
- Fuchs S., 1990.** Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie* 21 : 1993-199.
- Fulton, M.H. & Key, P.B., 2001.** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 37–45.
- Gallai N., Salles J.-M., Settele J. & Vaissiere B.E., 2009.** Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.*, **68**: 810-821.
- Gammon D.W. & Casida J.E., 1981.** Two classes of pyrethroid action in the cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **15**: 181–191.
- Gary N.E., 1975.** Activities and behaviour of honeybees. *In: The hive and the honeybee*, Dadant sons, Eds. Hamilton, Illinois, 185- 264
- Genersch E., von der Ohe W., Kaatz H., Schroeder A., Otten C., Büchler R., Berg S., Ritter W., Mühlen W., Gisder S., Meixner M., Liebig G. & Rosenkranz P., 2010.** The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, **41**: 332-352.



- Gilbert, M.D. & Wilkinson, C.F., 1974.** Microsomal oxidases in the honey bee *Apis mellifera* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **4**: 56-66.
- Ghini S., Fernández M., Picó Y., Marín R., Fini F., Mañes J. & Girotti S., 2004.** Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **47**: 479-488.
- Goldsworthy G., Mordue W. & Guthkelch J., 1972.** Studies on insect adipogenetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **18**: 545- 551.
- Gracia-Salinas M.J., Ferrer-Dufol M., Latorre-Castro E., Moneromanera C., Castillo-Hernandez J.A., & Lucientes-Curd J., 2006.** Detection of fluvalinate resistance in *Varroa destructor* in Spanish apiaries. *J. Apic. Res.*, **45**:101-105.
- Gregorc A. & Jelenc J., 1996.** Control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies using Apilife- Var. Zbornik Veterinarske Fakultete Univerza Ljubljana, **33**: 231- 235
- Gregorc A. & 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.
- Gregorc A. & Bowen I.D., 2000.** The histochemical characterisation of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, amitraz and oxytetracycline. *Cell Biol. Int.*, **24**: 319–324.
- Gregorc A., & Planincy I., 2001.** Acaricidal effect of oxalic acid in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* **32**: 333-340.
- Gregorc A. & Planincy I., 2002.** The control of *Varroa destructor* using oxalic acid. *Veter. J.*, **163**: 306-310.
- Gregorc A. & Poklukar J., 2003.** Rotenone and oxalic acid as alternative acaricidal treatments for *Varroa destructor* in honeybee colonies. *Vet. Parasitol.*, **111**: 351-360.
- Gregorc A., Pogacnik A & Bowen I.D., 2003.** Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie* (2004) **35**: 453-460
- Gregorc A., Pogacnik A.P. & Bowen I.D., 2004.** Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie*, **35**: 453-460.
- Gregorc, A. 2005.** Efficacy of oxalic acid and apiguard against varroa mites in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Acta Veterinaria Brno* **74**: 441-447.
- Gregorc A. & Planincy I, 2005.** The control of *Varroa destructor* in honey bee colonies using the thymol-based acaricides, Apiguard. *Am. Bee J.*, **145**: 672- 675
- Gregorc A & Smodis Skerl M.I., 2006.** Toxicological and immunohistochemical testing of honeybees after oxalic acid and rotenone treatments. *Apidologie* **38**: 296-305.



- Gregorc A. & Smodis Skerl, M.I., 2007.** Combating *Varroa destructor* in honeybee colonies using flumethrin or fluvalinate. *Acta Veterinaria Brno*, **76**: 309–314.
- Grissa K., Cornuet J. M., M’Sadda K. & Fresnaye J., 1990.** Etude biométrique de populations d’abeilles Tunisiennes. *Apidologie*, **21** : 303- 310.
- Grixti J.C., Wong L.T., Cameron S.A., & Favret C., 2009.** Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biol. Conserv.*, **142**:75-84.
- Guilhermino L., Barros P., Silva M.C. & Soares A., 1998.** Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, **3**: 157–163.
- Guzmán-Novoa E., Eccles L., Calvete Y., McGowan J., Kelly P. G. & Correa-Benitez A., 2010.** *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, **41**: 443-450.
- Haarmann T., Spivak M., Weaver D., Weaver B. & Glenn T., 2002.** Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J. Econ. Entomol.* , **95(1)**: 28-35.
- Habig W. H., Pabst M.J. & Jakoby W.B., 1974.** Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**: 7130- 7139.
- Harizanis P.C., 1991.** Infestation of queen cells by the mite *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **22**: 533-535
- Hart A.D.M., 1993.** Relationship between behaviour and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**: 321-336.
- Hatjina F. & Haristos L., 2004.** Project Report to the Prefecture of Chalkidiki on the situation of *Varroa* and *Nosema* infestation levels of honey bee colonies situated in the Paliouri area. Project funded by Hellenic Ministry of Agricultural Development and Food for 2004- 2005. *Hellenic Institute of Apiculture*, p. 8.
- Haubruge E. & Amichot M., 1998.** Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, **2(3)**: 161-174.
- Haubruge E., Nguyen B.K., Widart J., Thomé J.P., Fickers P. & Depauw E., 2006.** Le dépérissement de l’abeille domestique, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae): faits et causes probables. *Notes fauniques de Gembloux*, **59(1)**: 3-21.
- Hayaoka T. & Gauterman W.C., 1982.** Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital and pesticides in various housefly strains and its effect on toxicity. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **17**: 113– 119.
- Haydak M.H., 1970.** Honeybee nutrition, *Annu. Rev. Entomol.* **15**, 143-156.



- Hazelton G.A. & Lang C.A., 1983.** Glutathione S-transferase activities in the yellow-fever mosquito [*Aedes aegypti* (Louisville)] during growth and ageing. *Biochem. J.*, **210**: 281–287.
- Hennebelle, 2010.** L'abeille In Doc apiculture.
- Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S. & Decourtye A., 2012.** A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, **336**:348–350.
- Hepburn H.R. & Radloff S.E., 1996.** Morphometric and pheromonal analyses of *Apis mellifera* L. along a transect from the Sahara to the Pyrenees. *Apidologie*, **27**: 35- 45.
- Higes M., Meana A., Suárez M. & Llorente J., 1999.** Negative long-term effects on bee colonies treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni*Oud. *Apidologie*, **30**:289-292.
- Hossain M.M., Suzuki T., Sato I., Takewaki T., Suzuki K. & Kobayashi H., 2005.** Neuromechanical effects of pyrethroids, allethrin, cyhalothrin and deltamethrin on the cholinergic processes in rat brain. *Life Sci.*, **77**: 795–807.
- Howis M., Chorbiński P. & Nowakowski P., 2010.** Influence of exposure to formic acid on the physiological status of the apian (*Apis mellifera* L.) midgut. In Proceedings of the XLVIII Conference, *Scientific Apiculture Conference*, Puławy, Poland, 5–7, Poland, p. 21.
- Hrassnigg N. & Crailsheim K., 2005.** Differences in drone and worker physiology in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, **36**: 255-277.
- Huang Z. Y. & Knowles C., 1990.** Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in honey bee (*Apis mellifera*) brain. *Comp. Biochem. Physiol.*, **97**: 275-281.
- Hugget R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M. & Bergman, H.L., 1992.** Biomarkers: Biochemicals, physiological and histological markers of anthropogenic stress. *Boca Raton, Lewis Publisher*, 347 p.
- Hyne R.V. & Maher W.A., 2003.** Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **54**: 366-374.
- Imdorf A., Kilchenmann V., Maquelin C. & Bogdanor J., 1994.** Optimization of the use of Apilife Var to combat *Varroa jacobsoni* Oud. in honeybee colonies. *Apidologie*, **24**: 497–499.
- Imdorf A., Charriere J., Maquelin C., Kilchenmann V. & Bachofen B., 1995a.** Alternative Varroa control. Federal Dairy Research Institute. Apicultural Department. Liebefeld, Switzerland.
- Imdorf A., Charrière J., Maquelin C., Kilchenmann V. & Bachofen B., 1995b.** Méthodes alternatives de lutte contre la varroase. *Rev. Sui. d'Apiculture* 8 : 281-292.



- Imdorf A., Charrière J.-D. & Bachofen B., 1997.** Utilisation de l'acide oxalique pour le contrôle de l'efficacité des méthodes de lutte contre *Varroa jacobsoni*. *Apiacta* **32(3)** : 89-91.
- Imdorf A., Bogdanov S., Ibanez Ochoa R. & Calderone N.W., 1999.** Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*, **30**: 209-228.
- Infantidis M.D., 1988.** Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honeybee (*Apis mellifera*) brood cells. *Apidologie*: **19(4)**: 387-396.
- Infantidis D., & Rosenkranz P., 1988.** Reproduktion der Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* (Acarina: Varroidae). *Entomol.Gener.* **14(2)**: 111-122.
- James R.R. & Xu J., 2012.** Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertebr. Pathol.*, **109**: 175-182.
- Jakoby W.B., 1978.** The glutathione S-Transferase: a group of multi- fonctionnal detoxication enzymes. *Adv; Enzym. Relat. Areas. Mol. Biol.*, **46**: 383-414.
- Jelinski, M. 1993.** Effectiveness of the preparation of Bayvarol-Strips (R) in control of *Varroa jacobsoni* mites. *Wiad Parazytol.*, **39**: 411-414.
- Johnson R.M., Wen Z., Schuler M.A. & Berenbaum M.R., 2006.** Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *J. Econ.Entomol.*, **99**: 1046-1050.
- Johnson R.M., Pollock H.S. & Berenbaum M.R., 2009.** Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.*, **102**:474-479.
- Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A. & Frazier M., 2010.** Pesticides and honey bee toxicity. *Apidologie*, **41**:312-332.
- Kanbar G. & Engels W., 2003.** Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites, *Parasitol. Res.*, **90**: 349-354.
- Kearns C.A., Inouye D.W. & Waser N.M. 1998.** Endangered mutualisms : the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology System* **29**:83-112.
- Kevan P.G., 1999.** Pollinators as bioindicators of the state of environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **74**: 373-393.
- Klein A.M., Vaissière B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C. & Tscharntke T. 2007.** Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Roy. Soc. Lond., B., Biol. Sci.*, **274 (1608)**: 303-313.
- Knecht D., & Kaatz H.H., 1990.** Paterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees, *Apidologie* **21**: 457-468.



- Kostaropoulos I., Mantzari A.E. & Papadopoulos A.I., 1996.** Alterations of some glutathione S-transferase characteristics during the development of *Tenebrio molitor* (Insecta: Coleoptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **26**: 963–969.
- Kostaropoulos I., Papadopoulos A.I., Metaxakis A., Boukouvala E. & Papadopoulou-Mourkidou E., 2001.** Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroids in insect. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **31**: 313–319.
- Kotze A.C. & Rose H.A., 1987.** Glutathione S-transferase in the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Wiedeman). *Pestic. Biochem. Physiol.*, **29**: 77–86.
- Koulianos S. & Crozier R.H., 1991.** Two ancient mitochondrial alleles in Australian honeybees. *Apidologie*, **22**: 621-626.
- Kovak H. & Crailsheim K., 1988.** Lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *Varroa jacobsoni* Oud. in relation to season and extent of infestation. *J. Apic. Res.*, **27**: 230-238.
- Kratky E., 1931.** Morphologie und Physiologie der drüsen in kopf und Thorax der Honigbiene. Zeitschrift für die alttestamentlich Wissenschaft Zoology **139**: 120-200.
- Kreissl S. & Bicker G., 1989.** Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honey bee. *J. Comp. Neurol.*, **286**: 71-84.
- Krupke C.H., Hunt G.J., Eitzer B.D., Andino G. & Given K., 2012.** Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLoS One*, **7(1)**: e29268. doi:10.1371/journal.pone.0029268.
- Kunert K. & Crailsheim K., 1988.** Seasonal changes in carbohydrate, lipid and protein content in emerging worker honeybees and their mortality. *J. Apic. Res.*, **27**: 13–21.
- Lagadic L., Cuany A., Berge J.-B. & Echaubard M., 1993.** Purification and partial characterization of glutathione S-transferases from insecticide resistant and lindane-induce susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **23**: 467–474.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C. & Ramade F., 1998.** Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier, Editions Tec & Doc, Paris, France, 320p.
- Laidlaw H. H. & Page R.E., 1997.** Queen rearing and bee breeding. *WicwasPress, Cheshire, CT*: 224-78.
- Le Conte Y. & Arnold G., 1987.** Influence de l'âge des abeilles (*Apis mellifica* L.) et de la chaleur sur le comportement de *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **18** (4) : 305-320.
- Le Conte Y., Arnold G., Trouiller J., Chappe B & Ourisson G., 1989.** Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey bee by simple aliphatic esters. *Science* **245**: 638-639.



- Le Conte Y., Mohammadi A. & Robinson G.E., 2001.** Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proc Biol Sci* **268**: 163-8.
- Le Conte Y., 2002.** Le traité rustica de l'apiculture. Rustica edition, Paris, p. 12-83.
- Le Conte Y., 2004.** Mieux connaître l'abeille. La vie sociale de la colonie. In : Bruneau E., Barbançon J.-M., Bonnaffé P., Clément H., Domerego R., Fert G., Le Conte Y., Ratia G., Reeb C., Vaissière B. Le traité Rustica de l'apiculture. Rustica éditions, Paris, 12-83.
- Le Conte Y, Ellis M. & Ritter W., 2010.** *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, **41**: 353-363.
- Leaver M.J., Clarke D.J. & George S.D., 1992.** Molecular studies of the phase II xenobiotic conjugative enzymes of marine pleuronectid flatfish. *Aqua. Toxicol.*, **22**: 265-278.
- Leita L., Muhlbachova G., Cesco R., Barbattini R. & Mondini C., 2004.** Investigation of the use of honeybees and honeybee products to assess heavy metals contamination. *Environ. Monitor Assess*, **43**: 1-9.
- Lindberg C.M., Melathopoulos A.P. & Winston M.L., 2000.** Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *J. Econ. Entomol.*, **93**(2): 189-198
- Lisanti, M.P., Rodriguez-Boulan, E. & Saltiel, A.R., 1990.** Emerging functional roles for the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchor. *J. Membrane Biol.*, **117**: 1-10.
- Little, E.E., Archeski, R.D., Flerov, B.A. & Koslovskay, V.I., 1990.** Behavioural indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**: 380-385.
- Locke B., Forsgren E., Fries I. & De Miranda J.R., 2012.** Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa* destructor-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Applied Environmental Microbiology*, **78**(1):227-35.
- Lodesani M., Pellacani A., Bergomi S., Carpana E., Rabitti T. & Lasagni P., 1992.** Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie*, **23**:257-272.
- Lodesani M., Colombo M. & Spreafico M., 1995.** Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*, **26**: 67-72.
- Lodesani M. & Costa C., 2005.** Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues, *Bee World*, **86**:102-109.
- Lodesani M., Costa C., Serra G., Colombo R. & Sabatini A.G., 2008.** Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*, **39**:324-333.
- Loglio G. & Plebani G., 1992.** An appraisal of apistan effectiveness. *Apic. Mod.*, **83**: 95-98.



- Londzin W. & Sledzinsky B., 1996.** Resistance of honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni* to varroacide preparates containing tau-fluvalinate. *Medicina Weterynaryjna*, **52**: 526–528.
- Loucif-Ayad W., Aribi N. & Soltani N., 2008.** Evaluation of secondary effects of some acaricides on *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase activities. *European Journal of Scientific Research*, **21(4)**: 642-649.
- Loucif-Ayad W., Aribi N., Smagghe G. & Soltani N. 2010.** Comparative effectiveness of some acaricides used to control *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Algeria. *African Entomology*, **18 (2)**: 259–266.
- Loucif-Ayad W., Achou M., Legout H., Alburaki M. & Garnery L., 2014.** Genetic assessment of Algerian honeybee populations by microsatellite markers. *Apidologie*, DOI: 10.1007/s13592-014-0331-0.
- Maggi M.D., Ruffinengo S.R., Damiani N., Sardella, N.H. & Eguaras M.J., 2009.** First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Exp. Appl. Acar.*, **47**: 317-320.
- Mallick A., 2013.** Action sanitaire en production apicole : Gestion de la Varroose face à l'apparition de résistance aux traitements chez *Varroa Destructor*. These de doctorat. Université Claude-Bernard- Lyon1 (Médecine- Pharmacie). 164P
- Malmezat, T., Breuille, D., Capitan, P., Mirand, P.P. & Obled, C., 2000.** Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J. Natr.*, **130**: 1239-1246.
- Mannervik B., Alin P., Guthenberg C., Jensson H., Tahir M.K., Warholm M. & Jornvall H., 1985.** Identification of three classes of cytosolic glutathione transferases common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**: 7202– 7206.
- Mao W., Schuler M.A., & Berenbaum M.R., 2011.** CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **108**: 12657-12662.
- Marcangeli J.A., García M.C, Cano G., Distefano L., Martín M.L., Quiroga A., Raschia F. & Vega C., 2003.** Eficacia del Oxavar® para el control del ácaro *Varroa destructor* (Varroidae) en colmenas de *Apis mellifera* (Apidae). *Revista de la Sociedad de Entomología Argentina*, **62**:75-79.
- Marchetti, S., Chiesa F., & D'Agaro M. D., 1987.** Bee mortality following treatment with Perzin in colonies of *Apis mellifera carnica* and *A.m. ligustica*. *Apicoltura*, **2**: 67-76.
- Marinelli E., Formato G., Vari G., & De Pace F.M., 2006.** Varroa control using cellulose strips soaked in oxalic acid water solution. *Apiacta*, **41**:54-59.
- Martel A.C., Zeggane S., Aurieres C., Drajnudel P., Faucon J.P., & Aubert M., 2007.** Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol® 50. *Apidologie*, **38**:534-544.



- Martin S., 1994.** Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honey bee *Apis mellifera* L. under natural conditions, *Exp. Appl.Acarol.* **18**: 87–100.
- Martin S.J., 2001.** The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J. Appl.Ecol.*, **53**: 105-112.
- Martin C., Provost E., Roux M., Bruchou C., Crauser D., Clément J.J. & Leconte Y., 2001.** Resistance of the honey bee, *Apis mellifera* to the acarian parasite *Varroa destructor* behavioural and electroantennographic data. *Physiological Entomology*, **26**: 362-370.
- Martin S.J., Ball B.V. & Carreck N.L., 2010.** Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies.- *Journal of Apicultural Research*, **49 (1)**: 72-79.
- Martin S.J., Highfield A.C, Brettell L., Villalobos E. M., Budge G.E., Powell M., Nikaido S. & Schroeder D.C., 2012.** Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite.- *Science*, **336 (6086)**: 1304-1306.
- Martin-Hernandez R., Higes M., Pérez J. L., Nozal M. J., Gómez L. & Meana A., 2007.** Short term negative effect of oxalic acid in *Apis mellifera iberiensis*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **5(4)**: 474-480.
- Matozzo V., Tomei A. & Marin M.G., 2005.** Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 1686–1693.
- Mattila H.R., Otis G.W., Daley J. & Schulz T., 2000.** Trials of Apiguard, a thymol based miticide part 2. non-target effects on honey bees. *Am. Bee J.*, **140(1)**: 68-70.
- Mattila H.R., Harris J.L. & Otis G.W., 2001.** Timing of reproduction of winter bees in honeybee (*Apis mellifera*) colonies, *Insects Soc.* **48**: 88-93.
- Maurizio A., 1950.** The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological conditions of the honeybee. *Bee World* **31**: 9-12.
- Maurizio A., 1954.** Pollenernährung und Lebensvorgänge bei der Honigbiene (*Apis mellifica* L.), *Landw. Jahrb. Schweiz* **62**: 115- 191.
- Maxwell D.M., 1992.** The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**: 306-312.
- M’Diaye K. & Bounias M., 1991.** Sublethal effects of the formamidine amitraz on honeybees gut lipids, following in vivo injections. *Biomed Environ Sci.*, **4(4)**: 376-383.
- Melathopoulos A.P., Winston M.L., Whittington R.S., Lindberg C.M. & Mukaiand A. 2000.** Comparative laboratory toxicity of pesticides to honey bee (Hymenoptera: Apidae), their mite parasite *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarpis woodi* (Aacari : Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascospaera apis*. *J. Econ. Entomol.*, **93(2)**: 199-209.



- Merz R., Greig L., Wille H. & Leuthold R., 1979.** Das Problem der Kurz- und Langlebigkeit bei der Einund Auswinterung im Bienenvolk ((*Apis mellifica* L.): Eine Verhaltensstudie, *Rev. Suisse Zool.* **86**, 663- 671.
- Mesquida J., 1976.** Incidence de la sécheresse sur le développement des abeilles. *B.T.A.*, **3**: 33-38.
- Michener C.D., 2000.** The bees of the world. Johns Hopkins University Press Baltimore, MD.
- Milani N. & Barbattini R., 1989.** Treatment of varroatosis with Bayvarol strips (flumethrin) in northern Italy. *Apicoltura* **4**: 39-58. 242; 290
- Milani N., 1992.** La resistenza agli acaricidi: un problema emergente nella lotta contro la varroa. *Ape Nostra Amica*, **15 (4-5)**: 7-11.
- Milani N. & Della Vedova G., 2002.** Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids. *Apidologie*. **33**: 417-422.
- Molga P., 2007.** La mort des abeilles met la planète en danger. *Les Echos* du 20 août 2007, page 12.
- Moosbeckhofer R., 2001.** Varroabekämpfung mit Oxalsäure im Träufelverfahren, *Bienenvater* **12**: 7-12.
- Moraes R.L.M.S. & Bowen I.D., 2000.** Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Cell Biol. Int.*, **24**: 734-737.
- Moritz F., De Miranda J., Fries I., Le Conte Y., Neumann P. & Paxton R.J., 2010.** Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, **41**: 227-242.
- Motoyama N. & Dauterman W.C., 1980.** Glutathione S-transferases: their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. *Rev. Biochem. Toxicol.*, **2**: 49– 69.
- Mozes-Koch R., Slabezki Y., Efrat H., Kalev H., Kamer Y., Yakobson B.A. & Dag A., 2000.** First detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods. *Exp Appl Acarol.* **24**: 35-43.
- Mullin C.A., Frazier M., Frazier J.L., Ashkraft S., Simonds R., Van Engeldorp D. & Pettis J.S., 2010.** High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0009754.
- Nabti D., Achou M., Soltani N., 2014.** Evaluating the Effects of Pesticides Used in East-Algerian Orchards on *Apis mellifera intermissa*: Enzymatic Activity of Acetylcholinesterase. *Academic Journal of Entomology*. **7(4)**:128-133.
- Nanetti A., 2001.** Oxalic acid in varroa control. An overview on the last five years of experiments. Report of the sixth Meeting of the European Group for Integrated Varroa



- Control, in York, UK, 22-23 June. Available in <http://www.apis.admin.ch/english/host/pdf/alternativ/York/nanetti.pdf> [12 Feb 2002].
- Nanetti A., Büchler R., Charriere J.-D., Fries I., Helland S., Imdorf A., Korpela S. & Kristiansen P., 2003.** Oxalic acid treatments for varroa control, *Apiacta*, **38**:81-87.
- Narahashi T., 1992.** Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**:236-241.
- Narahashi T., 1996.** Neuronal ions channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology and toxicology* **79**: 1-14
- Nazzi F., Milani N., Vedova G.D. & Nimis M., 2001.** Semiochemicals from larval food affect the locomotory behaviour of the varroa mite. *Apidologie*, **32**: 149-155.
- Nazzi F., Milani N. & Vedova G.D., 2004.** A semiochemical from larval food influences the entrance of *Varroa destructor* into brood cells. *Apidologie*, **35**: 403-410.
- Nazzi F., Brown S. P., Annoscia D., Del Piccolo F., Di Prisco G., Varricchio P., Della Vedova G., Cattonaro F., Caprio E. & Pennacchio F., 2012.** Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies.- *PLoS Pathogens*, **8** (6): e1002735.
- Neukirch A., 1982.** Dependence of the life span of honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption, *J. Comp. Physiol.* **146**, 35-40
- Nguyen B.K., Saegerman C., Pirard C., Mignon J., Widart J. & Thirionet B., 2009.** Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? *J.Econ. Entomol.*, **102**:616-623.
- Nielson A.S., Brodsgaard C.J. & Hansen H., 2000.** Effects on detoxification enzymes in different life stages of honey bees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae) treated with a synthetic pyrethroid (flumethrin). *ATLA*, **28**: 437- 443.
- Noireterre P., 2011.** Biologie et Pathogénie de *Varroa destructor*. *Bulletin des GTV.* **62**: 101-106.
- Nozal M.J., Bernal J.L., Gomez L.A., Higes M. & Meana A., 2003.** Determination of oxalic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie*, **3**: 181-188.
- Oldroyd B.P., Sheppard W.S. & Stelzer J.A., 1993.** Genetic characterisation of the bees of Kangaroo Island, South Australia. *J. Apic. Res.*, **31**: 141-148.
- Oldroyd B.P., 1999.** Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends Ecol Evol.* 1999 Aug;14(8):312-315.
- Oldroyd B.P., 2007.** What's killing American honey bee? *PLoS Biol.*, **5**: 1195-1199.
- Orantes-Bermejo F.J., Gómez-Pajuelo A., Megías-Megías M. & Torres Fernández-Piñar C., 2010.** Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey



- bee colonies (*Apis mellifera* L) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research*, **49**: 243-250.
- Oudemans A.C., 1904.** Nog iets aangaande de “Afbeeldingen met beschrijving van insecten, schadelijk voor naaldhoot”. *Entomologische Berichten*, **18**: 156-164.
- Page R.E. & Peng C.Y., 2001.** Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, **36**: 695-711.
- Papadopoulos A.I., Stamkou E.I., Kostaropoulos I. & Papadopoulou- Mourkidou E., 1999.** Effect of organophosphate and pyrethroid insecticides on the expression of GSTs from *Tenebrio molitor* larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **63**: 26–33.
- Papadopoulos A. I., Boukouvala E., Kakaliouras G., Kostaropoulos I. & Papadopoulou- Mourkidou E., 2000.** Effect of organophosphate and pyrethroid insecticides on the expression of GSTs from *Tenebrio molitor* pupae. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **68**: 26-33.
- Papadopoulos A. I., Polemitou I., Laifi P., Yiangou A. & Tananaki C., 2004.** Glutathione S-transferase in the developmental stages of the insect *Apis mellifera* macedonica. *Comparative Biochem. Physiol. C*, **139**: 87-92.
- Payne J.F., Mathieu A., Melvin W. & Fancy L.L., 1996.** Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.*, **32**: 225–231.
- Panzenböck U. & Crailsheim K., 1997.** Glycogen in honeybee queens, workers and drones (*Apis mellifera carnica* Pollm.). *J. Insect Physiol.*, **43**: 155–165.
- Paxton R.J., Klee J., Korpela S. & Fries I. 2007.** *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, **38**: 558- 565.
- Peng Y.S., Yin C.M. & Yin L.R.S., 1992.** Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiol. Entomol.*, **17**: 269-276.
- Perugini M., Manera M., Grotta L., Abete M.C., Tarasco R. & Amorena M., 2011.** Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biol. Trace Elem. Re.*, **140**: 170-176.
- Pettis J.S., Collins A.M., Wilbanks R. & Feldlaufer M.F., 2004.** Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, **35**: 605-610.
- Phibbs A., 1996.** Three year survey of varroa mite and tracheal mite infestation of honey bees in Wisconsin. *American Bee Journal* **136**, p. 589-592.
- Pileckas V. & Klimas R., 2011.** The evaluation of efficiency of some preparations needed to decimate *Varroa destructor* parasites. *Acta Biol. Universit. Daugavpil.*, **11 (1)**: 101–105.



- Pineau F., 1989.** Varroase: Une nouvelle technique de lutte avec le produit Apistan. La Santé de l'abeille 109 : 12-13.
- Polyzou A., Debras J-F. & Belzunces L.P., 1997.** Changes in Acetylcholinesterase during pupal development of *Apis mellifera* queen. *Archives of Insect Biochem. Physiol.*, **36**: 69-84.
- Ponikvar M., Snajder J. & Sedej B., 2005.** Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO<sub>2</sub>. *Apidologie*, **36**:403-409.
- Porrini C., Sabatini A.G., Girotti S., Ghini S., Medrzycki P., Grillenzoni F., Bortolotti L., Gattavecchia E. & Celli G. 2003.** Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta.*, **38**: 63-70.
- Potts S.G., Roberts S.P.M., Dean R., Marris G., Brown M.A., Jones R., Neumann P. & Settele J., 2010.** Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, **49**: 15-22.
- Prandin L. N., Dainese B., Girardi O., Damolin R. Piro & Mutinelli F., 2001.** A scientific note on long-term stability of a homemade oxalic acid water sugar solution for controlling varroosis. *Apidologie*, **32**:451-452.
- Prisco G., Pennacchio F., Caprio E., Boncristiani h. F. JR, Evans J. D. & Chen Y., 2011.** *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Genetic Virology*, **92 (1)**: 151-155.
- Pulkkanen K.J., Laukkanen M.O., Naarala J., & Yla- Herttuala S., 2000.** False-positive apoptosis signa in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis*, **5**: 33-329.
- Punzo F. (1993).** Detoxification enzymes and the effects of temperature on the toxicity of pyrethroids to the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **105**: 155-158.
- Quarles W., 1996.** EPA exempts least-toxic pesticides. *IPM Practitioner*, **9**: 16-17.
- Rademacher E., & Harz M., 2006.** Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies – a review. *Apidologie*, **37**: 98-120.
- Rader R., Howlett B.G., Cunningham S.A., Westcott D.A., Newstrom-Lloyd L.E., Walker M.K., Teulon D.A.J. & Edwards W., 2009.** Alternative Pollinator Taxa are Equally Efficient but not as Effective as the Honeybee in a Mass-flowering Crop, *Journal of Applied Ecology*, **46**: 1080-1087.
- Radetzki T., 1994.** Oxalsäure eine weitere organische Säure zur Varroabekämpfung. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* **12**: 11-15.
- Rao G.V., & Rao KS., 1995.** Modulation in acetylcholinesterase of rat brain by pyrethroids in vivo and an in vitro kinetic study. *J Neurochem.* **65**: 2259-2266.



- Rashatwar S.S., & Matsumura F., 1985.** Interaction of DDT and pyrethroids with calmodulin and its significance in the expression of enzyme activities of phosphodiesterase. *Biochem. Pharmacol.*, **34**: 1689–1694.
- Ratnieks F.L.W. & Carreck N.L., 2010.** Clarity on honey bee collapse? *Science*, **327**:152-153.
- Ray D.E. & Fry J.R., 2006.** A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol. Ther.* **111**: 174-193.
- Ravazzi G., 1996.** Cours d'apiculture. Editions de Vecchi. 135p.
- Reddy A.T. Ayyanna K., & Yellamma K., 1991.** Sensitivity of brain cholinesterase to cypermethrin toxicity in freshwater teleost *Tilapia mossambica*. *Biochem. Int.*, **23**: 959–962.
- Rehm S.M. & Ritter W., 1989.** Sequence of sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie*, **20**: 339- 343.
- Rinderer T.E., De Guzman L.I., Lancaster V.A., Delatte G.T., J.A. & Stelzer J.A., 1999.** *Varroa* in the mating yard: I. The effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan on drone honey bees. *Am. Bee J.*, **139**: 134-139.
- Richmonds C. & Dutta H.M., 1992.** Effect of malathion on optomotor behaviour of bulue gill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102**: 523-526.
- Ricketts T.H., Regetz J., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Bogdanski A., Gemmill-Herren B., Greenleaf S.S., Klein A.M., Mayfield M.M., Morandin L.A., Ochieng' A., Potts S.G., & Viana B.F., 2008.** Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology letters* **11**: 499–515.
- Rickli M., Guerin P.M., Diehl P.A., 1992.** Palmetic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servosphere. *Naturwiss.* **79**: 320-322.
- Ritter W. & Ruttner F., 1980.** Die varroatose de honigbiene, 3. Diagnoseverfahren, *Allg. Dtsch. Imkerztg.*, **14**: 548-551.
- Robaux, 1986.** Varroa et varroatose. Opida 238pp.
- Romaniuk K., Brobrzecki J. & Wilde J., 1988.** The effect of invasion of *Varroa jacobsoni* on the development of queen bees. *Wiad Parazytol* **34**: 295-300.
- Rosenberry T. L., 1975.** Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol.*, **43**: 103-300.
- Rosenkranz P., Aumeier P. & Ziegelmann B., 2010.** Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103** : S96-S119.



- Sabatini A.G., 2005.** L'Abeille bio-indicateur, l'abeille sentinelle de l'environnement. *Abeille & Compagnie*, **108**: 12-16.
- Sacktor B., 1970.** Regulation of intermediary metabolism, with special reference to the control mechanisms in insect flight muscle, *Adv. Insect Physiol.* **7**, 267-347.
- Saifutdinova Z. & Shangaraeva G., 1997.** Honeybee populations as ecotoxicological indicators. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **8**: 379- 596.
- Sammataro, D., Gerson U. & Needham G., 2000.** Parasitic mites of honey bees: Life history, implications, and impact. *Annual Review of Entomology* **45**: 519- 548.
- Sammataro D., Untalan P., Guerro F. & Finley J., 2005.** The Resistance of Varroa Mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *International Journal of Acarology* **31**, p. 67-74.
- Sanchez, J.C., 2001.** Wildlife exposure to organophosphorus insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **172**: 21-63.
- Satta A., Floris I., Eguaras M., Cabras P., Garau V.L. & Marinella M., 2005.** Formic acid-based treatments for control of *Varroa destructor* in a Mediterranean area. *J. Econ. Entomol.*, **98**: 267-273.
- Schäfer M. O., Ritter W., Pettis J. S. & Neumann P., 2010.** Winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*): The role of infestations with *Aethina tumida* and *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology*, **103**: 10-15.
- Schmid-Hempel P., 1998.** Parasites in Social Insects. *Princeton University Press*, Princeton, NJ.
- Schneider P. & Drescher W., 1987.** The influence of *Varroa jacobsoni* Oud. on weight, development and hypopharyngeal glands, and longevity of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, **18**: 101-109.
- Schneider S., Eisenhardt, D. & Rademacher E., 2011.** Sublethal Effects of Oxalic Acid on *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): Changes in Behavior and Longevity. *Apidologie* **43**:218–225.
- Schneider C.W., Tautz J., Grunewald B. & Fuchs S., 2012.** RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **7**:e30023 DOI 10.1371/journal.pone.0030023.
- Schulz A., 1984a.** Reproduktion und population senwicklung der parasitischen Milbe *Varroa jacobsoni* Oud. in Abhängigkeit von Brutzyklus ihre Wirts *Apis mellifera* L. Dissertation; Fachberich Biologie, Johann- Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt/Main, Germany.
- Schulz A., 1984b.** Reproduktion und populationsenwicklung der parasitischen Milbe *Varroa jacobsoni* Oud. in Abhängigkeit von Brutzyklus ihre Wirts *Apis mellifera*. *Apidologie* **15(4)**: 401-420.



- Schulz S., 1993.** Treatments of varroaosis with essential oils depending on the Apilife Var dosage. *Apidologie*, **24**: 497-499.
- Seeley T.D., 1985.** Honeybee Ecology: A Study of adaptation in social life. *Princeton University*, Princeton, NJ.
- Semkiw P., Skubida P. & Pohorecka K., 2013.** The amitraz strips efficacy in control of *Varroa destructor* after many years application of amitraz in apiaries. *Journal of Apicultural Science*, **57 (1)**: 107–121.
- Shen M., Yang X., Cox-Foster D. & Cui L., 2005.** The role of *varroa* mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, **342**: 141-149.
- Sherby S. M., Eldefrawi A. T., Deshpande S. S., Albuquerque E. X., Eldefrawi M. E., 1986.** Effects of pyrethroids on nicotinic acetylcholine receptor binding and function. *Pest Biochem. Phys.*, **26**: 107-115.
- Sheppard W.S., 1989.** A history of the introduction of honey bee races into the states, *Am. Bee. J.*, **129**: 617-619, 664-667.
- Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyek C.A., Newhall A.R. & Friedman L., 1966.** A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid, and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Anal. Biochem.*, **19**: 514-528.
- Silva-Zacarin E.C.M., Gregorc A. & Silva de Moraes R.L.M., 2006.** In situ localization of heat shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honey bee larvae, *Apidologie*, **37**: 1-9.
- Smirle, M. J. & Winston M. L., 1987.** Intercolony variation in pesticide detoxification by the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, **80**: 5-8.
- Smirle M.J. & Winston M.L., 1988.** Detoxifying enzyme-activity in worker honey bees. An adaptation for foraging in contaminated ecosystems. *Can. J. Zool.*, **66**: 1938–1942.
- Smirle M.J., 1993.** The influence of colony population and brood rearing intensity on the activity of detoxifying enzymes in worker honey-bees. *Physiol. Entomol.*, **87**: 420–424.
- Smirnov A.M., 1978.** Research results obtained in USSR concerning etiology, pathogenesis, epizootiology, diagnosis and control of varroa disease. *Apiacta*, **13**: 149-162.
- Sokol R., 1996.** Effects of long-term persistence of Fluwarol (fluvalinate) on honey bee colonies. *Med. Weter.*, **52(11)**: 718-720.
- Soderlund D.M. & Bloomquist J.R., 1989.** Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Entomol.*, **34**: 77-96.
- Soudek S., 1927.** The pharyngeal glands of Honey bee. *Bull. Ecole Brno*. **10**, p. 1- 63.



- Stanghellini M.S. & Raybold P., 2004.** Evaluation of selected biopesticides for the late fall control of varroa mites in a northern temperate climate. *Am. Bee J.*, **144**: 475-486.
- Steen V., 1992.** The effect of a mixture of etheric oils on honeybee colonies with varroa mites infesting. *Apidologie*, **23**: 383–385.
- Stegeman J.J., Bruwer, M., Di Giulio, R.T., Forlin, L., Flower, B.A., Sanders, B.M. & Van Veld, P.A., 1992.** Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. *In*: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Merhle, P.M. & Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. A Special Publication of SETAC. Lewis Publishers, Chelsea, MI.*, 235-335 pp.
- Stokstad E., 2007.** The case of the empty hives. *Science.*, **316**: 970–972.
- Stone D., Jepson P. & Laskowski R., 2002.** Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, **132**: 105-112.
- Stoner A., Wilson W.T. & Harvey J., 1985.** Honey bee exposure to beeswax foundation impregnated with fenvalerate or carbaryl, *Am. Bee J.*, **125**: 513-516.
- Strachecka A., Paleolog J., Olszewski K. & Borsuk G., 2012.** Influence of Amitraz and Oxalic Acid on the Cuticle Proteolytic System of *Apis mellifera* L. Workers. *Insects*, **3(3)**: 821-832.
- Strange J.P & Sheppard W.S., 2001.** Treatment thresholds and timing for the control of *Varroa destructor* in honey bee colonies in Washington State. *Journal of Economic Entomology* **94**, p. 1324-1333.
- Straub P., 2007.** (in Science.Direct.com). Faune et Flore. L'abeille sentinelle écologique.
- Sulimanovic D., Ruttner F. & Pechhacker H., 1982.** Studies on the biology of reproduction in *Varroa jacobsoni*, *Honeybee Sci.* **3**, 109–112.
- Surholt B., Greive H., Hommel C. & Bertsch A., 1988.** Fuel uptake, storage and use in male bumble bees *Bombus terrestris* L., *J. Comp. Physiol.* **158B**: 263- 269.
- Szegletes T., Balint T., Szegletes Z.S. & Nemcsok J., 1995.** *In vivo* effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **31**: 258–263.
- Szymas B., Langowska A. & Kazimierczak-Baryczko M., 2012.** Histological structure of the midgut of honey bees (*Apis mellifera* L.) fed pollen substitutes fortified with probiotics. *Journal of Apicultural Science*, **56(1)**, DOI: 10.2478/v10289-012-0001-2.
- Tautz J., 2009.** L'étonnante abeille. Edition Deboeck, Bruxelles, Belgique, 277p.



- Taylor K. S., Waller G. D. & Crowder L. A., 1987.** Impairment of a classical conditioned response of the honey bee (*Apis mellifera* L.) by sublethal doses of synthetic pyrethroid insecticides. *Apidologie*, **18**: 243-252.
- Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F. & Colin M.E., 2004.** Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 7185-7191.
- Tepedino V.J. & Ginsberg H.S., 2000.** Report of the US Department of Agriculture and US Department of the Interior joint workshop on declining pollinators. *Information and Technology Report USGS/ BRD/ITR 2000-0007*, Fort Belvoir, VA
- Testud F. & Grillet J.P., 2007.** Pyréthrinoïdes de synthèse. In : Produits phytosanitaires : Intoxications aiguës et Risques professionnels, éd ESKA, PARIS, 125-137
- Topolska G., Gajda A., Pohorecka K., Bober A., Kasprzak S., Skubida M. & Semkiw P., 2010.** Winter colony losses in Poland. *Journal of Apicultural Research.*, **49**: 126-128.
- Townsend M. D., Tew K.D. & Tapiero H., 2003.** The importance of glutathione in human disease. *Biomed & Pharmacol.*, **57**: 145-155.
- Trouiller J. & Moosbeckhofer R., 1997.** Resistenz der varroa gegen Pyrethroide. *Bienenvater*, **118**: 6-9.
- Trouiller J., 1998.** Monitoring of *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in Europe. *Apidologie*, **29**: 537-546.
- Vandame R., Meled M., Colin M.-E. & Belzunces L. P., 1995.** Alteration of the homing-flight in the honey bee *Apis mellifera* exposed to sublethal dose of deltamethrin. *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**: 855-860
- Van Engelsdorp D., Saegerman E. J., Mullin C., Haubruge C., Nguyen E., Frazier B. K., Frazier M., Coxfoster J., Chen D. & Underwood Y., 2009.** Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE*, **4**: 64-81.
- VanEngelsdorp D. & Meixner M.D., 2010.** A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.*, **103**: 80- 95.
- Von Frisch K., 1967.** Honeybees: Do they use direction and distance information provided by their dances? *Science*, **158**: 1072- 1076.
- Von Frisch K., 2011.** Vie et moeurs des abeilles. Editions Albin Michel, Paris, 21-66.
- Wallner K., 1999.** Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, **30**: 235- 248.
- Wallowork-Barber A. K., Ferenbaugh R.W. & Gladney E.S., 1982.** The use of honey bees as monitors of environmental pollution. *American Bee Journal*, **122 (11)**: 770- 772.



- Wang X.H., Andrae L. & Engeseth N.J., 2002.** Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *J. Agric. Food. Chem.*, **50**: 6923-6928.
- Wang X. W., Xu S. M., Peng L., Wang Z., Wang C. L., Zhang C. B. & Wang X. B., 2012.** Exploring Scientists' Working Timetable: Do Scientists Often Work Overtime. *Journal of Informetrics*, **6(4)**: 655-660.
- Wagnitz J. & Ellis M.D., 2010.** The effect of oxalic acid of honey bee queens. *Science of Bee Culture*, **138 (12)**: 8-11.
- Weick J. & Thorn RS., 2002.** Effects of Acute Sublethal Exposure to coumaphos or diazinon on acquisition and discrimination of odor stimuli in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ. Entomol.* **95**:227-236.
- Weinberg K.P. & Madel G., 1985.** The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oud on the protein concentration and the hemolymph volume of the brood of workers and drones of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie*, **16**: 421- 436.
- Wendling S., 2012.** *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000), un acarien ectoparasite de l'abeille domestique *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Revue bibliographique et contribution à l'étude de sa reproduction. Thèse de doctorat vétérinaire, *Faculté de Médecine, Créteil*, 190 p.
- Wermelinger A., 2013.** Zeitgemässe und zielgerichtete Imkermethoden. FreeTheBees, Lutte alternative contre le varroa
- Westcott L.C. & Winston M.L., 1999.** Chemical acaricides in *Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae) colonies; do they cause nonlethal effects? *Can. Entomol.*, **131**: 363- 371.
- Whitehorn P.R., O'Connor S., Wackers F.L. & Goulson D., 2012.** Neonicotinoid pesticide reduces Bumble Bee colony growth and queen production. *Science*, **336**: 351-352.
- Who I.P.C.S., 1993.** Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and risk assesement: concepts and principales. IPCS, World Health Organisation, Geneva.
- Wilce M.C. & Parker M. W., 1994.** Structure and function of glutathione-S-transferase. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1205**: 1.
- Williams D.L., 2000.** A veterinary approach to the European Honey Bee. The veterinary journal **160**: p. 61-73
- Williams I.H., 1996.** Aspects of bee diversity and crop pollination in the European Union. In: Matheson A, Buchmann SL, O'Toole C, Westrich P, Williams IH, editors. The conservation of bees Linnean Society Symposium Series, 18. London: Academic Press;. p.63-80.
- Wilson E.O., 1971.** The Insect Societies. The Belknap Press of the Harvard
- Winston M.L., 1987.** The biology of the honey bee, *Harvard University Press*, Cambridge, MA. 548 p.



**Wood E., Casabe N., Melgar F. & Zerba E., 1986.** Distribution and properties of glutathione S-transferase from *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **84**: 607– 618.

**Woodring J., Boulden M., Das S. & Gad G., 1993.** Studies on blood sugar homeostasis in the honeybee (*Apis mellifera* L.), *Insect physiol.*, **39**: 89-97.

**Yu S.J., 1984.** Interactions of allelochemicals with detoxication enzymes of insecticide-susceptible and resistant fall armyworms. *Pest. Biochem. Physiol.*, **22**: 60-68.

**Yu S.J., Robinson F.A. & Nation J.L., 1984.** Detoxification capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Biochem. Physiol.*, **22**: 360- 368.

**Yu S.J., 2004.** Introduction of detoxification enzymes by triazine herbicidein the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : NNoctuidae. *Pest. Biochem. Physiol.*, **80**: 113-122

# *ANNEXES*



## ANNEXE I

**Tableau 1:** Taux d'infestation (%) par *V. destructor* du couvain operculé et des abeilles ouvrières adultes *A.m. intermissa* avant traitement aux acaricides dans les ruches expérimentales ( $m \pm SE$ ) : comparaison entre les différentes ruches.

Traitements	Taux d'infestation du couvain operculé (%)	Taux d'infestation des ouvrières adultes (%)
Témoin	7,015 $\pm$ 0,099 <b>a</b>	16,135 $\pm$ 0,123 <b>a</b>
Fluvalinate	7,050 $\pm$ 0,120 <b>a</b>	16,228 $\pm$ 0,116 <b>a</b>
A. oxalique 6,5 g	7,210 $\pm$ 0,090 <b>a</b>	16,168 $\pm$ 0,074 <b>a</b>
A. oxalique 3,25 g	7,285 $\pm$ 0,056 <b>a</b>	16,245 $\pm$ 0,118 <b>a</b>
ANOVA	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de  $p > 0,05$ .

**Tableau 2:** Taux d'infestation (%) par *V. destructor* du couvain operculé et des abeilles ouvrières adultes *A.m. intermissa* après traitement aux acaricides dans les ruches expérimentales ( $m \pm SE$ ) : comparaison entre les différentes ruches.

Traitements	Taux d'infestation du couvain operculé (%)	Taux d'infestation des ouvrières adultes (%)
Témoin	12,278 $\pm$ 0,109 <b>a</b>	14,673 $\pm$ 0,169 <b>a</b>
Fluvalinate	0,240 $\pm$ 0,088 <b>b</b>	0,870 $\pm$ 0,04 <b>b</b>
A. oxalique 6,5 g	5,115 $\pm$ 0,141 <b>c</b>	7,147 $\pm$ 0,181 <b>c</b>
A. oxalique 3,25 g	5,453 $\pm$ 0,140 <b>d</b>	8,577 $\pm$ 0,092 <b>d</b>
ANOVA	$p < 0,001$ ***	$p < 0,001$ ***

\*\*\* : Différences hautement significatives.



**Tableau 3:** Efficacité des traitements acaricides à l'encontre du *V. destructor* au niveau du couvain operculé et des ouvrières adultes d'*A. m. intermissa* évalué selon le pourcentage de mortalité (M%) : comparaison entre les différentes ruches.

Traitements	Efficacité au niveau du couvain operculé (%)	Efficacité au niveau des ouvrières adultes (%)
Fluvalinate	92,85 ± 1,14 <b>a</b>	94,136 ± 0,850 <b>a</b>
A. oxalique 6,5 g	59,45 ± 1,20 <b>b</b>	51,37 ± 1,51 <b>b</b>
A. oxalique 3,25 g	57,23 ± 1,23 <b>c</b>	41,91 ± 1,02 <b>c</b>
ANOVA	p < 0,001 ***	p < 0,001 ***

\*\*\* : Différences hautement significatives.

**Tableau 4:** Effets de deux acaricides (acide oxalique et fluvalinate) sur la teneur en protéines totales dans le corps entier (µg/mg) chez les Abeilles adultes *A.m intermissa* : comparaison des moyennes pour un même âge entre les différentes séries (m ± SE, n=4-6).

Age (jours)	Témoin	fluvalinate	acide oxalique 6,5g	acide oxalique 3,25g	ANOVA
0	4,09 ± 0,19 <b>a</b>	2,39 ± 0,28 <b>b</b>	3,17 ± 0,07 <b>c</b>	4,05 ± 0,10 <b>a</b>	p < 0,001 ***
7	6,10 ± 0,06 <b>a</b>	5,05 ± 0,06 <b>b</b>	5,87 ± 0,07 <b>a</b>	6,00 ± 0,93 <b>a</b>	p < 0,001 ***
21	6,97 ± 0,12 <b>a</b>	5,93 ± 0,03 <b>b</b>	6,71 ± 0,12 <b>a</b>	6,89 ± 0,76 <b>a</b>	p < 0,001 ***

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de p > 0,05.

\*\*\* : Différences hautement significatives.



**Tableau 5:** Effets de deux acaricides (acide oxalique et fluvalinate) sur la teneur en glucides totaux dans le corps entier ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) chez des Abeilles adultes *A.m. intermissa* : comparaison des moyennes pour le même âge entre les différentes séries ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Age (jours)	Témoin	Fluvalinate	acide oxalique 6.5 g	acide oxalique 3.25 g	ANOVA
0	16,43 $\pm$ 0,16 <b>a</b>	14,52 $\pm$ 0,15 <b>b</b>	15,87 $\pm$ 0,23 <b>a</b>	15,09 $\pm$ 0,19 <b>a</b>	$p < 0,05$ *
7	33,89 $\pm$ 0,13 <b>a</b>	33,29 $\pm$ 0,07 <b>a</b>	33,44 $\pm$ 0,10 <b>a</b>	33,67 $\pm$ 0,19 <b>a</b>	$p > 0,05$
21	23,59 $\pm$ 0,32 <b>a</b>	22,93 $\pm$ 0,19 <b>a</b>	23,27 $\pm$ 0,08 <b>a</b>	23,68 $\pm$ 0,17 <b>a</b>	$p > 0,05$

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de  $p > 0.05$ .

\* : Différences significatives.

**Tableau 6:** Effets de deux acaricides (acide oxalique et fluvalinate) sur la teneur en lipides totaux dans le corps entier ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) chez des Abeilles adultes *A.m. intermissa* : comparaison des moyennes pour le même âge entre les différentes séries ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Age (jours)	Témoin	fluvalinate	acide oxalique 6.5 g	acide oxalique 3.25 g	ANOVA
0	10,51 $\pm$ 0,39 <b>a</b>	7,24 $\pm$ 0,44 <b>b</b>	9,64 $\pm$ 0,36 <b>a</b>	9,03 $\pm$ 0,36 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***
7	20,18 $\pm$ 0,39 <b>a</b>	13,50 $\pm$ 0,31 <b>b</b>	19,96 $\pm$ 0,20 <b>a</b>	20,36 $\pm$ 0,50 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***
21	15,40 $\pm$ 0,45 <b>a</b>	10,94 $\pm$ 0,25 <b>b</b>	14,72 $\pm$ 0,38 <b>a</b>	15,21 $\pm$ 0,25 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de  $p > 0.05$ .

\*\*\* : Différences hautement significatives.



**Tableau 7:** Effets de deux acaricides (Acide oxalique et fluvalinate) sur la concentration en protéines hémolymphatiques ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez les Abeilles adultes *A.m.intermissa* : comparaison des moyennes pour un même âge entre les différentes séries ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Age (jours)	Témoin	fluvalinate	acide oxalique 6,5 g	acide oxalique 3,25 g	ANOVA
0	5,31 $\pm$ 0,27 <b>a</b>	1,90 $\pm$ 0,28 <b>b</b>	4,87 $\pm$ 0,33 <b>a</b>	5,13 $\pm$ 0,38 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***
7	13,31 $\pm$ 0,17 <b>a</b>	7,04 $\pm$ 0,24 <b>b</b>	12,77 $\pm$ 0,32 <b>a</b>	13,28 $\pm$ 0,19 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***
21	11,45 $\pm$ 0,28 <b>a</b>	5,06 $\pm$ 0,24 <b>b</b>	11,36 $\pm$ 0,24 <b>a</b>	11,40 $\pm$ 0,38 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de  $p > 0,05$ .  
\*\*\* : Différences hautement significatives.

**Tableau 8:** Effets de deux acaricides (acide oxalique et fluvalinate) sur la concentration en glucides hémolymphatiques ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez des Abeilles adultes *d'Apis mellifera intermissa* : comparaison des moyennes pour le même âge entre les différentes séries ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Age (jours)	Témoin	fluvalinate	acide oxalique 6,5 g	acide oxalique 3,25 g	ANOVA
0	15,11 $\pm$ 0,12 <b>a</b>	10,15 $\pm$ 0,16 <b>b</b>	15,02 $\pm$ 0,06 <b>a</b>	15,09 $\pm$ 0,10 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***
7	37,23 $\pm$ 0,13 <b>a</b>	24,80 $\pm$ 0,14 <b>b</b>	36,85 $\pm$ 0,12 <b>a</b>	37,17 $\pm$ 0,16 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***
21	95,67 $\pm$ 1,32 <b>a</b>	66,71 $\pm$ 1,06 <b>b</b>	93,78 $\pm$ 0,93 <b>a</b>	94,50 $\pm$ 0,85 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de  $p > 0,05$ .  
\*\*\* : Différences hautement significatives.



**Tableau 9:** Effets de deux acaricides (acide oxalique et fluvalinate) sur la concentration en lipides hémolymphatiques ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) chez des Abeilles adultes *A. m. intermissa* : comparaison des moyennes pour le même âge entre les différentes séries ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Age (jours)	Témoin	fluvalinate	acide oxalique 6,5 g	acide oxalique 3,25 g	ANOVA
0	31,56 $\pm$ 0,99 <b>a</b>	20,68 $\pm$ 0,95 <b>b</b>	30,34 $\pm$ 0,96 <b>a</b>	30,68 $\pm$ 0,93 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***
7	64,19 $\pm$ 1,11 <b>a</b>	49,09 $\pm$ 0,93 <b>b</b>	63,06 $\pm$ 0,80 <b>a</b>	63,44 $\pm$ 1,11 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***
21	62,81 $\pm$ 0,72 <b>a</b>	30,93 $\pm$ 0,36 <b>b</b>	61,93 $\pm$ 0,53 <b>a</b>	62,43 $\pm$ 0,75 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de  $p > 0,05$ .  
 \*\*\* : Différences hautement significatives.

**Tableau 10:** Activité spécifique de l'AcHe ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez *A.m intermissa* après traitement aux acaricides : comparaison des moyennes pour un même âge entre les différents groupes ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n=4-6$ ).

Age (jours)	Témoin	fluvalinate	acide oxalique 6,5 g	acide oxalique 3,25 g	ANOVA
0	53,82 $\pm$ 1,40 <b>a</b>	46,22 $\pm$ 1,26 <b>b</b>	52,703 $\pm$ 0,677 <b>a</b>	52,927 $\pm$ 0,822 <b>a</b>	$p < 0,01$ **
7	43,093 $\pm$ 0,354 <b>a</b>	35,79 $\pm$ 1,15 <b>b</b>	40,33 $\pm$ 1,34 <b>a</b>	41,780 $\pm$ 0,50 <b>a</b>	$p < 0,001$ ***
21	29,549 $\pm$ 0,519 <b>a</b>	26,30 $\pm$ 1,24 <b>a</b>	28,66 $\pm$ 2,36 <b>a</b>	29,28 $\pm$ 1,06 <b>a</b>	$p > 0,05$

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de  $p > 0,05$ .  
 \*\* : Différences très significatives.  
 \*\*\* : Différences hautement significatives.



**Tableau 11:** Activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez *A.m intermissa* après traitement aux acaricides : comparaison des moyennes pour un même âge entre les différents groupes ( $m \pm \text{SE}$ ,  $n= 4-6$ ).

Age (jours)	Témoin	fluvalinate	acide oxalique 6,5 g	acide oxalique 3,25 g	ANOVA
0	41,79 $\pm$ 2,06 <b>a</b>	50,05 $\pm$ 1,72 <b>b</b>	44,45 $\pm$ 1,71 <b>a</b>	43,27 $\pm$ 1,90 <b>a</b>	$p < 0,01$ **
7	30,16 $\pm$ 1,24 <b>a</b>	39,24 $\pm$ 2,77 <b>b</b>	27,49 $\pm$ 2,62 <b>a</b>	28,94 $\pm$ 1,83 <b>a</b>	$p < 0,05$ *
21	66,51 $\pm$ 1,60 <b>a</b>	68,97 $\pm$ 1,46 <b>a</b>	63,19 $\pm$ 1,73 <b>a</b>	65,26 $\pm$ 1,54 <b>a</b>	$p > 0,05$

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de  $p > 0,05$ .

\* : Différences significatives.

\*\* : Différences très significatives.



## Annexe 2

### Productions Scientifiques

#### Communications

- **ROUIBI A.** & ACHOU M. Etude morphométrique du parasite de l'abeille *Varroa destructor* (Acari: Verroidae) en Algérie. (Apimondia.15-20 septembre 2009. Montpellier – France).

- **ROUIBI A.**; BOUCHEMA W. F. & ACHOU M. Evaluation des effets secondaires d'un acaricide "acide oxalique" sur les abeilles ouvrières d'*Apis mellifera intermissa*: Aspect biochimique. 1<sup>er</sup> Congrès de la Biodiversité Animale et Ecologie de la Santé. (15-18 Octobre 2011, Annaba, Algérie)

- AYAD LOUCIF W., BOUCHEMA W.F. ,NEDJI N., **ROUIBI A.**, ACHOU M., & SOLTANI N. La varroase, maladie des abeilles : état des lieux et moyens de lutte contre l'agent causal. 1<sup>ère</sup> journée sur l'apiculture : perspectives et développement. Souk Ahras, le 12 décembre 2012.

- **ROUIBI A.**, BOUCHEMA W.F., AYAD LOUCIF W. & ACHOU M. Impact de deux acaricides (Fluvalinate et Acide oxalique) sur les abeilles ouvrières d'*Apis mellifera intermissa* : Aspect biochimique. 3<sup>ème</sup> congrès Franco-Maghrebin de Zoologie et d'Ichtyologie, Marrakech-Maroc- 6 au 10 Novembre 2012.

#### Publication

**1- Rouibi Asma**, Bouchemma Wided-Fella, Loucif-Ayad Wahida, Achou Mohamed, Soltani Nouredine. **2016.** **JEZS:** Risks assessment of two acaricides (fluvalinate and oxalic Acid) in *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities