

La loque européenne due à *Melissococcus plutonius* chez les abeilles domestiques *Apis mellifera* en Belgique

Auteur : Boelens, Géraldine

Promoteur(s) : Saegerman, Claude

Faculté : Faculté de Médecine Vétérinaire

Diplôme : Master en médecine vétérinaire

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/15062>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

La loque européenne due à *Melissococcus plutonius* chez les abeilles domestiques *Apis mellifera* en Belgique

The European Foulbrood caused by *Melissococcus Plutonius* affects honeybees *Apis mellifera* in Belgium

Géraldine Boelens

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecine Vétérinaire

Année académique 2021/2022

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

La loque européenne due à *Melissococcus plutonius* chez les abeilles domestiques *Apis mellifera* en Belgique

The European Foulbrood caused by *Melissococcus Plutonius* affects honeybees *Apis mellifera* in Belgium

Géraldine Boelens

Tuteur : Claude Saegerman,
professeur à l'Université Vétérinaire de Liège

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecine Vétérinaire

Année académique 2021/2022

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

La loque européenne due à *Melissococcus plutonius* chez les abeilles domestiques *Apis mellifera* en Belgique

OBJECTIF DU TRAVAIL

Recherches sur le pathogène de la loque européenne *Melissococcus plutonius*, et de sa présence sur le territoire Belge.

RESUME

Les abeilles domestiques *Apis mellifera* sont largement répandues dans le monde, elles sont essentielles à la pollinisation et de ce fait, à la survie de nos cultures et de notre biodiversité. Un grand nombre de pathogènes peuvent affecter nos abeilles et détruire leurs colonies.

La loque européenne et la loque américaine sont les deux principales infections bactériennes. Nous allons ici développer la loque européenne. Autrefois appelée loque puante, d'où elle tire son nom anglais « european foulbrood », la loque européenne est présente partout là où sont implantées les abeilles du type *Apis mellifera*, mais aussi d'*Apis cerana* et *apis laboriosa*, c'est-à-dire quasiment dans le monde entier contrairement à ce que son nom « européenne » pourrait laisser penser. L'agent pathogène de la loque européenne est *melissococcus plutonius*, c'est une bactérie Gram positive, présente sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'Organisation Internationale des Epizooties (OIE), qui va s'attaquer au couvain des ruches. Elle va toucher essentiellement les jeunes larves ; âgées de 2 à 5 jours, présentes dans le couvain dit « ouvert » car l'operculation n'a pas encore eu lieu. Cette bactérie se transmet d'abeilles aux larves ou de larves en larves, il peut y avoir des survivants mais si la pression d'infection est trop grande alors la larve décèdera. Si une colonie est fortement touchée alors tout son couvain peut être contaminé, dans ce cas il n'y aura plus de nouvelle génération pour renouveler la colonie. Il y aura donc un déclin de celle-ci, elle dépérira puis finira par s'éteindre. C'est là tout le problème de la loque européenne. Heureusement elle est plus « bénigne » que sa cousine : la loque américaine. Dans ce TFE j'expliquerai ce qu'est un couvain, puis je détaillerai la loque européenne, ferai ensuite un parallèle avec la loque américaine et terminerai par la situation sanitaire et épidémiologique de loque européenne en Belgique.

The European Foulbrood caused by *Melissococcus Plutonius* affects honeybees *Apis mellifera* in Belgium

AIM OF THE WORK

Research on the European foulbrood pathogen *Melissococcus plutonius*, and its presence in Belgium.

SUMMARY

The *Apis mellifera* honeybees are widespread and essential for pollination, therefore necessary for the survival of agriculture and biodiversity. Different types of pathogens can affect the bees and destroy their colony; two examples are the European and the American Foulbrood, the two bacterial infections.

In this dissertation, I will focus on the 'European Foulbrood' that is present where the *Apis mellifera*, *Apis cerana*, and *Apis laboriosa* bees are and found worldwide contrary to its appellation. The pathogen agent of the European Foulbrood is *Melissococcus plutonius*, a Gram-positive bacterium, that attacks the beehive and listed as a disease that is mandatory to reveal to the World Organisation for Animal Health. It is compulsory to communicate when a beehive has been infected because it first contaminates the larva when they are 2 to 5 days-old and so, when they have not operculated yet. It signifies that the bacterium will spread from a bee to a larva or from a larvae to another one until it dies if the infection rate is too high. When a colony is highly infected, it implies that the entire beehive might be contaminated, and that would eradicate the possible next generation. A decline in the succession of the next generation would cease the existence of the bees and is the fear surrounded by the European Foulbrood even though its American counterpart is more malignant. In this dissertation, I will explain the European Foulbrood and compare it to the American Foulbrood then, I will conclude with the epidemiology occurring in Belgium.

Remerciements

Je remercie ma famille, ma maman et mon papa qui m'ont soutenu durant toutes ces années d'études. Même si cela n'a pas toujours été facile, vous avez toujours été là pour me soutenir, et je tenais à vous en remercier.

Merci également à mon frère qui a dû subir mes sautes d'humeurs et mes moments de folies. Je sais que je peux compter sur toi quand j'en ai besoin, et inversement.

Je remercie également mon amoureux, Rafael qui m'a soutenu et aidé. Merci du temps que tu m'as consacré, des repas que tu m'as concoctés pendant mes blocus, de m'avoir fait rire et rendu mes jours meilleurs quand ça n'allait pas.

Je remercie également mes amis, tous ceux qui m'ont soutenu durant ces années d'études, ceux qui ont cru en moi. Merci d'avoir égaillé mes journées et de m'avoir changé les idées pendant toutes ces soirées qu'on a faites. Merci pour toutes ces journées d'études ensemble. Sans vous mes amis je ne serais peut-être pas arrivée au bout.

Merci au personnel de l'université qui nous a appris tant de chose.

Merci au personnel de la clinique bovine pour votre patience et votre bienveillance.

Merci à ma marraine, à ma belle sœur et ma voisine qui m'ont aidé dans la réalisation de ce TFE.

Tables de matières

1. Description de l'abeille domestique <i>Apis mellifera</i>	
1.1. Classification	p7
1.2. Description	p7
1.2.1. La colonie	p8
1.2.2. La ruche	p10
1.3. Le couvain	p10
1.4. Le cycle de développement	p11
2. Description du pathogène <i>Melissococcus plutonius</i>	
2.1. Taxonomie	p12
2.2. <i>Melissococcus plutonius</i>	p12
2.3. Génotype et virulence	p13
3. Pathogénie de <i>Melissococcus plutonius</i>	
3.1. Maladie du couvain	p14
3.2. Infection	p15
3.3. Transmission	p16
3.4. Développement	p16
3.5. Facteurs favorisants	p17
3.6. Agents secondaires	p18
4. Signes cliniques	p19
5. Diagnostic	
5.1. Sur le terrain	p20
5.2. En laboratoire	p20
6. Prévention	p21
7. Traitements	p22
8. Parallèle avec loque américaine	
8.1. Pathogène	p24
8.2. Infection et transmission	p24
8.3. Signes cliniques	p25
8.4. Diagnostic et traitement	p25
8.5. Lutte et prévention	p25
9. Diagnostic différentiel	
9.1. La loque européenne	p26
9.2. Le couvain sacciforme	p26
9.3. La varroose	p26
10. Description statut sanitaire et épidémiologique en Belgique	p27
11. En résumé	p28

1. Description de l'abeille domestique *Apis mellifera*

1.1 La classification :

Afin de différencier l'abeille des autres insectes, une classification systématique a été créée. Ci-dessous, celle d'*Apis mellifera* (d'après CAMPBELL, 1995 et LE CONTE, 2004)

Rang	Dénomination	Caractéristiques principales
Embranchement	Arthropodes	<ul style="list-style-type: none">- Exosquelette composé de chitine- Appendices articulées
Sous-embranchement	Hexapodes	<ul style="list-style-type: none">- Trois paires de pattes
Classe	Insectes	<ul style="list-style-type: none">- Corps divisé en trois parties- Trois paires de pattes- Deux paires d'ailes- Une paire d'antennes
Ordre	Hyménoptères	<ul style="list-style-type: none">- Tête mobile- Ailes membraneuses- Métamorphose complète- Appareil buccal de type broyeur-suceur- Aiguillon postérieur présent chez les femelles
Famille	Apidae	<ul style="list-style-type: none">- Système pour stocker le pollen sur les pattes arrières- Dimorphisme sexuel- Comportement social
Genre	<i>Apis</i>	<ul style="list-style-type: none">- Colonie permanente- Reproduction par essaimage
Espèce	<i>Apis mellifera</i>	
Sous espèce	<i>Apis mellifera mellifera</i>	<ul style="list-style-type: none">- Abeille Européenne- L'abeille noire

1.2 Description

Les abeilles sont des insectes pollinisateurs, vivants en colonie qu'on appelle eusociale, et qui se représentent par trois caractéristiques fondamentales (VON FRISCH, 2011) :

- La distinction entre la femelle spécifique pour la reproduction, et les autres femelles qui ne se reproduiront pas mais qui feront toutes les autres tâches ;
- Une coopération dans les soins apportés aux formes immatures ;

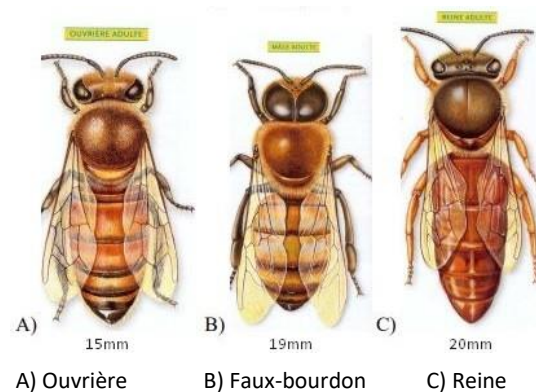
- Un chevauchement entre deux générations qui permet l'éducation des jeunes abeilles aux différentes tâches de la colonie.

Leur système social est hiérarchisé, et est composé de la reine, des faux bourdons et des ouvrières.

L'abeille européenne est considérée comme semi-domestique et est aussi appelée « l'abeille noire ». Elle présente une allure trapue, un corps avec un abdomen volumineux recouvert de poils. Ses pattes et antennes sont noires et son abdomen est rayé brun clair-brun foncé/noir (mellifica.be).

Elles vivent dans des ruches, pollinisent et produisent différentes choses, tel que le miel (source de glucides), le pollen (source de protéine), la gelée royale (donnée aux larves les premiers jours puis destinée aux futures reines), la cire (matière première de la construction des alvéoles) et le propolis (utilisé comme ciment et désinfectant dans la ruche).

Figure 1 . La morphologie des trois castes d'*Apis mellifera*
(modifié depuis CLEMENT, 2011)



1.2.1 La colonie

Après l'hiver, dès les premiers beaux jours de printemps, la colonie se réveille. Elle est composée d'environ 10 000 individus si les conditions météorologiques n'ont pas été trop rudes. La reine pond du printemps jusqu'en automne, en continu, dans le but d'arriver à une population de 40 000 à 70 000 individus à la haute saison. Puis la population diminue progressivement pour aborder le repos hivernal.

Les individus de la colonie sont différenciés en trois castes (VON FRISCH, 2011).

Les faux bourdons sont les mâles de la colonie, ils sont facilement reconnaissables via leurs gros yeux et leur taille massive comparé aux ouvrières. Ils ont la caractéristique de ne pas présenter de dard, contrairement au reste des abeilles de la colonie. Ils ont pour rôle de féconder la reine. La période de reproduction a lieu au printemps. De ce fait, ils naissent début printemps et quittent la ruche un peu plus tard quand les jeunes vierges commencent

à naître (CLEMENT, 2010), et prennent part à de grands rassemblements entre faux bourdons provenant de différentes colonies, et attendent l'arrivée de jeunes reines non fécondées (LE CONTE, 2004). L'accouplement se fait dans les airs et une fois leur tâche accomplie ils meurent, généralement via l'arrachement de l'abdomen. S'ils ne sont pas morts avant la fin de l'automne les ouvrières les éliminent ou les chassent de la ruche pour diminuer le nombre d'individus à nourrir pendant l'hiver. De ce fait, leur vie est brève et dure entre 20 et 45 jours (ALPHANDERY, 2002).

La reine est de plus grande taille que les autres et est la seule femelle féconde de la colonie, elle a deux rôles majeurs.

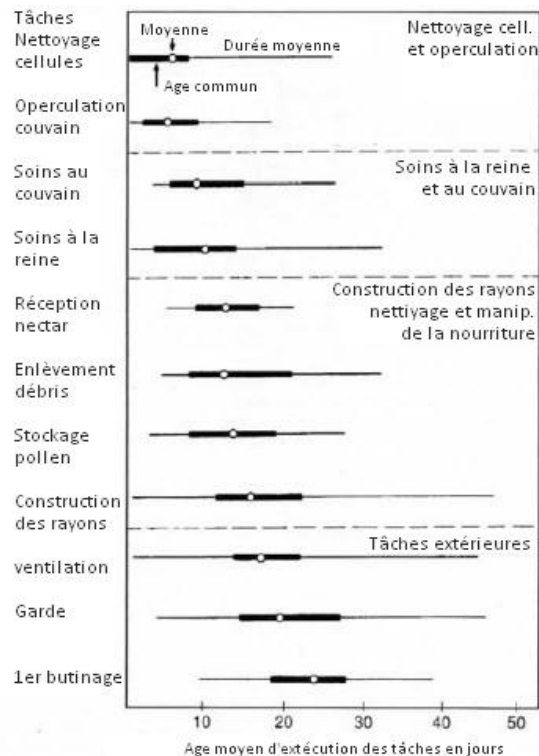
Le premier est de pondre ses œufs, qui sont indispensables à la survie de la colonie. En effet, une reine peut pondre jusqu'à 2 000 œufs par jour (BULL, 1983). Pour ce faire, elle possède deux ovaires de taille importante ainsi qu'une spermathèque très développée dans son abdomen, celle-ci stocke les spermatozoïdes reçus lors de l'accouplement entre 15-20 mâles durant le vol nuptial (LE CONTE, 2004). Cette spermathèque va généralement être sa seule source de spermatozoïdes durant toute sa vie. A l'état sauvage une reine peut vivre entre trois et cinq ans, alors que dans les ruchers domestiques, un apiculteur préférera changer de reine tous les ans, voir tous les deux ans. Si la reine n'a plus de spermatozoïdes, la ruche préférera créer une autre reine. La maturité sexuelle d'une jeune reine s'acquiert à cinq ou six jours après sa transformation en adulte, elle peut alors entreprendre son vol nuptial (LE CONTE, 2004).

Son second rôle permet la cohésion de la colonie et la régulation du comportement des ouvrières par le biais des phéromones. Il en existe de deux types, le premier va permettre d'inciter un acte, par exemple le butinage ou s'essaimage, le second va avoir un but de modification, par exemple le fait que la reine bloque l'appareil reproducteur des ouvrières pour être la seule à pouvoir être féconde.

La reine est constamment entourée par des ouvrières qui lui prodiguent les soins nécessaires, en s'occupant des œufs et en la nourrissant avec une nourriture riche lui permettant d'assurer ses rôles (WINSTON et PUNNETT, 1982).

Les abeilles ouvrières sont les femelles non fertiles et ont différents rôles qui varient chronologiquement au cours de leur vie : en premier lieu elles auront un rôle de nettoyeuses des alvéoles, ensuite elles deviennent nourrices auprès des larves et elles s'occupent du couvain, vient après les soins à la reine, puis elles vont devenir bâtisseuses, puis manutentionnaires où elles vont former les stocks lors du retour des butineuses, elles auront ensuite le rôle très important de ventileuses où elles se doivent de réguler le microclimat de la colonie (environ 34°C), puis seront gardiennes et soldats de la ruche, et elles finiront généralement leur vie en tant que butineuses. Le tableau Figure 2 reprend ces différents rôles.

Figure 2. Les diverses tâches d'une ouvrière au cours de sa vie d'adulte.
(modifié de WINSTON, 1993)



Il existe deux catégories d'abeilles ouvrières : les abeilles d'été qui vivent environ quarante jours (entre trois et six semaines) et les abeilles d'hiver qui survivent jusqu'au printemps suivant, soit quatre à cinq mois (LE CONTE, 2004)

1.2.2 La ruche

Les abeilles domestiques s'établissent dans des endroits fonctionnels, appelés ruches. La ruche est composée de 10-24 cadres contenant des milliers d'alvéoles hexagonales en cire, qui est la fondation de cette structure optimale pour l'évolution de la colonie, pour le développement larvaire et le stockage de pollen et de miel (WILSON, 1971). Le cadre est organisé par les abeilles dans un esprit pratique, au centre se trouvent les alvéoles du couvain, à l'extérieur de celles-ci nous retrouvons les alvéoles qui servent au stockage du pollen, et enfin les alvéoles aux extrémités vont servir à stocker le miel (WILSON, 1971).

1.3 Le couvain

Le couvain est ce que l'on désigne comme l'ensemble des formes immatures que l'abeille va avoir au cours de son développement : les œufs, les larves et les nymphes.

La reine pond dans ce qu'on appelle « le nid », qui se trouve être généralement le centre de la ruche. Les quelques alvéoles du couvain des futures reines, ainsi que celles des ouvrières se trouvent au centre de ce nid, vient ensuite celles des faux bourdons en périphérie.

Les alvéoles du couvain ne sont pas les mêmes en fonction de la caste désirée. Les alvéoles des ouvrières sont petites comparé aux deux autres. Celles des faux bourdons seront plus larges, tandis que celles de la reine seront plus grandes (trois à quatre fois celles des ouvrières) (VON FRISCH, 2011) et surtout seront verticales.

On distingue deux sortes de couvain, le couvain dit « ouvert » et le couvain dit « fermé ».

Le couvain est dit « ouvert » entre le moment de la ponte et le 6ème ou 7ème jour de vie de la larve. Les alvéoles sont à « ciel ouvert » car les ouvrières viennent nourrir les larves régulièrement.

Tandis qu'un couvain est dit « fermé » à partir du 7ème jour de vie, lorsque les larves sont aptes à manger seules. Les ouvrières viennent operculer l'alvéole, le sceller à l'aide de cire.

1.4 Le cycle de développement

Le développement d'une abeille en adulte passe par trois stades immatures, comme dit plus haut : l'œuf, la larve et la nymphe.

Le développement de ces trois stades dépend de la caste à laquelle la future abeille est destinée. Cette différence, en plus de l'emplacement de l'alvéole par rapport au nid, se situe dans la durée de développement de chaque étape, ainsi que du type de nourriture distribuée.

La reine va venir déposer ses œufs, ceux-ci sont petits, transparents ou blancs, et ovales. Puis les fixer en les collant par leur extrémité effilée, au fond des alvéoles du nid. La reine peut choisir de les féconder ou non, et ce, par le biais d'un mécanisme musculaire. Les fécondés deviendront des femelles diploïdes, tandis que les non fécondés deviendront des mâles haploïdes (VON FRISCH, 2011) (CLEMENT, 2010).

Trois jours après la ponte, l'œuf éclora en larve. Ces larves seront d'abord nourries pendant 3 jours avec la gelée royale, que sécrètent les jeunes ouvrières grâce à leurs glandes hypopharyngées et mandibulaires (DE LEON DOOR A.P., et al, 2020)). Ensuite, les larves recevront une nourriture différente en fonction de leur caste, les futures reines continueront à être nourries avec de la gelée royale tandis que les ouvrières et les faux bourdons seront nourris avec du miel et du pollen (VON FRISCH, 2011) (PROST et LE CONTE, 2005) (zapiculture.com).

A partir du 5ème jour pour les reines et du 7ème jour pour les faux bourdons, les larves sont autonomes pour manger seules, les ouvrières vont déposer une réserve de nourriture dans le fond de l'alvéole et l'operculer avec de la cire.

Neuf jours après l'operculation, la larve effectue plusieurs mues avant de se tisser un fin cocon et de se transformer en nymphe. Ce stade est caractérisé par le fait que la nymphe

reste immobile et ne s'alimente pas. Vient ensuite la dernière mue, qui va transformer la nymphe en adulte. Cette jeune adulte va devoir ronger l'opercule et sortir de son alvéole (WINSTON, 1993).

Une larve d'abeille ouvrière met seulement 15 jours pour se transformer en abeille, alors qu'un faux bourdon mettra 23 jours. Pour les futures reines, il leur faudra 21 jours, et la première sortie tuera les autres pour éviter la concurrence.

2. Description du pathogène *Melissococcus plutonius*

2.1 Taxonomie (BAILEYS L. ; COLLINS M.D., 1982)

Domaine : Bactéries

Embranchement : Firmicutes

Classe : Bacilles

Famille : Enterococcaceae

Genre : *Melissococcus*

Espèce : *Melissococcus plutonius*

2.2 *Melissococcus plutonius* (ou European foulbrood (EFB))

L'agent étiologique de la Loque Européenne, *Melissococcus plutonius*, est un coccus Gram positive (BAILEY L., 1983), de forme lancéolé (NAKAMURA K. et al, 2021), de taille moyenne de 0,5-1 μm , en forme de tige mais parfois pléomorphe (FORSGEN E., 2010) (FORSGEN E., et al, 2013). Les cellules se présentent le plus souvent en agglomérats, disposition caractéristique de la loque européenne, disposées en chaînes ou isolés (anses 2019).

C'est une bactérie qui nécessite du dioxyde de carbone ainsi que du phosphate et du potassium pour sa croissance, et qui est anaérobie à microaérophile. Elle ne produit pas de spores mais peut rester virulente pendant plusieurs années.

Melissococcus plutonius a été isolée non seulement chez *Apis mellifera* (l'abeille domestique européenne), mais aussi d'*Apis cerana* (l'abeille domestique asiatique) et *apis laboriosa* (l'abeille sauvage Himalayenne) (FORSGREN E, 2010).

La bactérie est présente sur tous les continents où ces trois espèces sont élevées (FORSGREN et al., 2013), elle a été ajoutée sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), et est par conséquent inclus dans la liste des espèces invasives (Cabi.org).

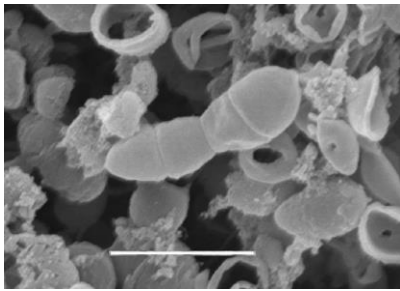


Figure 3.
Micrographie électronique à balayage
de *Melissococcus plutonius*
La barre représente 1 micromètre.
Image reproduite avec l'aimable autorisation
d'Ingemar Fries

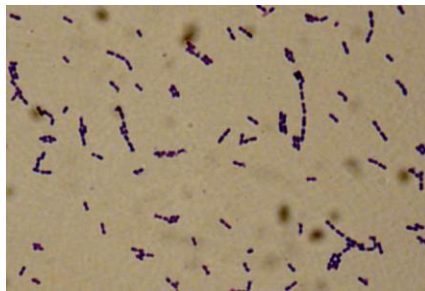


Figure 4.
Coloration de Gram de *Melissococcus plutonius*
Photographie prise par Léna Lundgren et
Karl-Erik Johansson
(FORSGREN E, 2010)

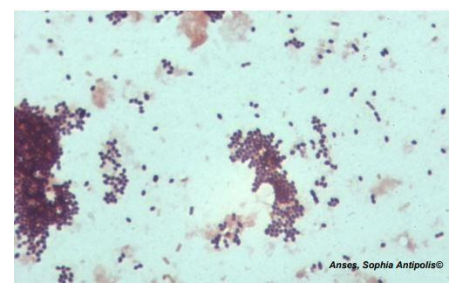


Figure 5.
Cocci de type *M. plutonius*.
Microscope optique x 1000
(coloration de Gram)
(anses 2019)

2.3 Génotype et virulence

M. plutonius a tout d'abord été classifiée par Tenover et ses confrères en 1995, via le génotype microbien ou une séquence d'ADN particulière. Ensuite, après un typage de séquence multi-locus (BUDGE G., et al, 2014), les chercheurs ont analysé plus de 380 isolats de *M. plutonius* dans plusieurs pays, ce qui a abouti à l'identification de trente-deux types de séquences (DE LEON DOOR A.P., et al, 2020). Ceux-ci ont été regroupé en trois groupes génétiquement distincts, appelé complexes clonaux (CC) : une souche typique non virulente CC13, une souche typique virulente CC3 et une souche atypique très virulente CC12 (BIOVA J. et al, 2021). La base de données conçue par Budge et ses confrères en 2014 (<https://pubmlst.org/mplutonius/>) a démontré que plus de la moitié des isolats mondiaux correspondent à CC3, viennent ensuite la CC12 et enfin la CC13 qu'on retrouve un peu moins fréquemment (DE LEON DOOR A.P., et al, 2020). Trois gènes de protéines qui pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse ont été découvert récemment : une qui permet la liaison à la chitine (Cbp), une qui favorise l'infection virale en dégradant la matrice péritrophique de l'intestin moyen des insectes (Efp), et une qui catalyse l'hydrolyse entre les chaînes de sucre de type mucine et les résidus sérine/thréonine des protéines (endo- α -GalNac-ases) (DJUKIC M. et al, 2018) (GROSSAR D., et al, 2020) (NAKAMURA K., et al, 2021).

De plus, de nombreux facteurs de virulences putatifs ont été identifiés et pourraient être impliqués dans la pathogénicité de *M. plutonius*. Par exemple des bactériocines, la production de tyramine, la dégradation des glycoprotéines, des protéines permettant l'adhésion aux cellules hôtes, la formation d'une enveloppe cellulaire, ou encore un antigène polysaccharidique entérocoque (DJUKIC M. et al, 2018). Mais aussi, et surtout, une mélissotoxine et une protéine de liaison à la matrice extracellulaire, tous deux codés sur un plasmide contenu dans les souches CC3 et CC12. Une étude a démontré que la virulence de la souche CC3 diminue significativement sans ce plasmide, contrairement à la souche CC12 qui est restée hautement virulente, ce qui laisse suggérer un autre pathomécanisme non identifié jusqu'à maintenant (NAKAMURA K., et al, 2021).

3. Pathogénie de *Melissococcus plutonius*

3.1 Maladie du couvain

La loque européenne touche les trois castes d'abeilles dans la colonie. C'est une maladie infectieuse très contagieuse qui touche principalement le couvain dit « ouvert », c'est-à-dire principalement les alvéoles du couvain qui sont non operculées, et tue les larves quand elles sont à leur 4^{ème} à 5^{ème} jour de vie (FORSGEN E., 2010) (anses.fr), donc un ou deux jours avant l'operculation (NAKAMURA K. et al, 2021) (itsap.asso.fr). On remarque que notre couvain est atteint car la larve atteinte prend une position inhabituelle, elle bouge dans son alvéole et finit généralement tordue ou étirée contre les murs de sa cellule, à la place de sa position normale enroulée au milieu de l'alvéole. (FORSGEN E, 2010). Leur couleur varie également quand elles meurent, elles passent du blanc nacré au jaune, puis au brun et enfin au gris au fur et à mesure qu'elles se décomposent, elles deviennent ensuite une bouillie (OSAV.ch), qui finit par sécher en une écaille qui n'adhérera pas au fond de la logette (Gds centre). Il peut cependant arriver que les larves meurent après leur operculation, à ce moment le signe visible est le fait que le bouchon va s'enfoncer, dès lors elle va ressembler aux signes cliniques que l'on pourrait observer pour la Loque Américaine (FORSGEN E., 2010).

Si une grande proportion de larve est touchée, le couvain devient lacunaire et va dégager une odeur aigre et son patron sera complètement inégal (FORSGREN E, 2010).

Figure 6 :

Couvain ouvert sain



Photo de l'université de Manitoba

Figure 7 :

Couvain contaminé par *M. plutonius*



Photo du département d'agriculture de Géorgie

Figure 8 :

Couvain
atteint

(Photo de
Apisavoir)



Figure 9 :

Larve saine
et
Larve atteinte



(Photo de Rob Snyder)



Figure 10 :

Couvain clairsemé, en mosaïque

(Photo de Evelynne Moody)

Les colonies atteintes de la loque européenne peuvent guérir spontanément si elles ne sont plus en contact avec une source d'infection, elles vont se rétablir et réussir à survivre (DE LEON DOOR A.P., et al, 2020). Mais si une trop grosse partie du couvain est touchée, alors il n'y a plus de renouvellement d'abeilles donc cela va entraîner un affaiblissement de la colonie et finir par la mort de celle-ci (anses.fr).

3.2 Infection

Ce sont uniquement les jeunes larves, dans leurs deux premiers jours de leur vie (gds centre), qui sont infectées, car c'est à ce moment de leur développement qu'elles sont les plus sensibles à la bactérie (anses.fr). Elles s'infectent via de la gelée royale contaminée par *M. plutonius*. Bien que la gelée royale ait une activité antimicrobienne naturelle il a été prouvé que la bactérie de la loque peut survivre dans cette dernière (TAKAMATSU D., et al 2017). Les cellules bactériennes colonisent leur intestin moyen et se multiplient vigoureusement dans le sac de la matrice péritrophique, qui est la barrière tapissant l'épithélium de celui-ci. L'impact sur l'intestin diffère selon la souche ingérée mais le plus souvent une fois dans le tube digestif elles se multiplient rapidement et finissent par occuper presque complètement la lumière intestinale (NAKAMURA K. et al, 2021). Par conséquent, il n'y a plus d'espace pour l'assimilation de la nourriture que les larves ingèrent, et les larves finissent par mourir d'inanition vers 5 jours. L'incubation de *M. plutonius* est donc d'environ 3 jours. Les larves atteintes réclament beaucoup plus à manger et se tortillent dans leur cellule, d'où le fait que leur position ne soit pas normale (gds centre). Une étude a été menée par McKee et ses collègues (MCKEE *et al.* 2004), ils ont démontré une forte corrélation entre la dose de *M. plutonius* et la mortalité des larves : la dose infectante minimum est de moins de cent cellules bactériennes, tandis que plus de deux-cents cellules vont conduire à la mort de la larve.

Une infection ne veut donc pas systématiquement dire la mort de la larve, une larve peut très bien survivre et se transformer en nymphe puis en adultes, bien que cet adulte soit de taille réduite par rapport aux autres. La larve peut être affaiblie et, soit finira par mourir, soit par montrer des signes de maladie et dans ce cas les abeilles nourricières l'expulseront de la ruche (FORSGREN E, 2010) (anses.fr).

3.3 Transmission

La transmission de la bactérie se fait via différentes voies (BAILEY L., 1983).

La première dépend de la survie des larves infectées, en effet celles-ci déposeront des matières fécales contaminées au fond de leur niche quand elles se transformeront en nymphe. Bien qu'elle ne sporule pas *M. plutonius* peut se former une coque résistante et de ce fait rester viable de longues périodes dans les cellules du couvain. Elle pourra grâce à ce mécanisme contaminer les larves suivantes (FORSGREN E, 2010).

La deuxième méthode se fait via les abeilles adultes qui s'occupent du couvain (Cabi.org) (afsca). Soit par l'abeille nourricière qui nourrit les larves avec de la nourriture contaminée. Via l'abeille nettoyeuse, qui nettoie les alvéoles contaminées par les matières fécales et les restes des débris des larves atteintes par *M. plutonius* (gds centre). Par ce biais, elles ingèrent, transportent et transmettent des cellules bactériennes aux autres alvéoles. Ou encore par la nourriture contaminée et la trophallaxie entre les abeilles adultes, c'est-à-dire l'échange de nourriture d'une abeille à une autre.

Les abeilles adultes sont résistantes à *M. plutonius* (BAILEY et BALL, 1991). Elles sont des porteuses non seulement au sein de leur colonie mais aussi entre les colonies voisines et les ruchers (FORSGREN E, 2010) donc elles peuvent contaminer leur ruche en allant piller du miel contaminé ailleurs, ou une colonie peut être contaminée par dérive d'une abeille porteuse.

Des études ont été réalisées et il s'est avéré que lorsqu'ils ont diagnostiqué une infection importante sur un rucher, ils ont généralement aussi découvert une ou plusieurs colonies présentant des symptômes cliniques situés aux alentours du rucher infecté (CHARRIERE J.D et al, 2009) (BELLOY L., et al, 2007).

Le miel peut aussi être contaminé par *M. plutonius*, en cas de vol dans une ruche infectée une abeille ouvrière peut infecter sa propre colonie (McKee et al, 2003).

La transmission se fait également par mauvaises pratiques apicoles (OSAV.ch), comme le fait de nourrir avec du miel contaminé, l'échange de cadres entre ruches, installation d'essaim ou l'intégration à une ruche d'une abeille malade, l'utilisation de matériel contaminé ou encore le non-nettoyage régulier ou le non-nettoyage correct d'une ruche atteinte (gds centre).

3.4 Développement

Les mécanismes de *M. plutonius* qui induisent la mort de son hôte sont encore incertains. Des expériences ont été menées, il en résulte qu'il y a une colonisation de l'intestin moyen des cellules bactériennes avec une telle prolifération de la matrice péritrophique que cela finit par obstruer la lumière du tractus intestinal et la larve finie par

mourir d'inanition. Cependant, des études ont démontré que cette barrière qui protège l'épithélium de l'intestin moyen est dégradé quand la larve est infectée par une souche hautement virulente, ce qui permet aux bactéries de *M. plutonius* d'agir directement sur l'épithélium de l'intestin et de pénétrer dans les tissus de l'hôte, notamment grâce à la mélissotoxine A, ce qui va amener une mort rapide de la larve (NAKAMURA K., et al, 2021). Les gènes codants pour la protéine capable de détruire la matrice péritrophique ont été isolés, des mutants avec et sans ce gène ont été créés en laboratoire. Il s'est avéré que chez les larves infectées avec le mutant sans cette protéine, les cellules bactériennes sont confinées au sac de la matrice péritrophique. Cependant, avec le temps, l'épithélium de l'intestin a tout de même été détruit, ce qui a provoqué la mort d'environ 80% du couvain infecté, cela suggère que cette protéine dégradante de la matrice n'est pas un facteur de risque indispensable pour la souche hautement pathogène CC12. Par contre, la matrice péritrophique ainsi que l'épithélium intestinal restent intacts chez les larves infectées par la souche faiblement virulente CC3 (NAKAMURA K., et al, 2021).

Nakamura et ses confrères (2021) a également testé les trois protéines Efp, Cbp et endo-alpha-GalNac-ase in vitro pour la souche hautement pathogène CC12, et les résultats ont suggéré que ces trois protéines ne sont pas des facteurs de virulence indispensables pour CC12. Ils n'ont malheureusement pas trouvé de facteurs de virulence indispensables chez CC12. Ils ont décrété que d'autres études devaient être réalisées sur les souches CC3 et CC13, ainsi que, des études réalisées sur le terrain pourraient être indispensables pour analyser les potentielles cascades d'interactions qui favoriseraient la pathogénicité dans des colonies.

Il a été émis l'hypothèse que certaines conditions pourraient être liées à la pathogénie, telles que la réponse immunitaire larvaire, la nutrition, le comportement hygiénique, une interaction entre le microbiote intestinal des larves et de *M. plutonius*, ou encore l'utilisation d'antibiotiques qui pourraient diminuer l'immunité de l'hôte et de ce fait aiderait des agents commensaux à devenir pathogènes (FORSGREN E, 2010).

3.5 Facteurs favorisants

Les principaux facteurs favorisant la loque européenne sont ceux qui fragilisent les larves et la colonie. La cause majeure de la mort des larves est le manque de protéines (DELAPLANE K, 1998) (itsap.asso.fr), qui assurent leur bon développement. La seule source de protéine chez les larves est la gelée royale, tandis que chez l'adulte il s'agit du pollen. De ce fait, une mauvaise ou un manque de nutrition est extrêmement néfaste. Ce problème peut venir de plusieurs situations (gds centre) :

- Le début du printemps, où beaucoup de larves naissent mais les conditions climatiques font qu'il n'y a pas assez de nourriture ;

- Les pesticides qui tuent les butineuses, les nourrices doivent donc quitter leur poste pour les remplacer ;
- Le varroa, ou tout autre maladie qui diminuerait la population d'abeille ;
- Une carence en pollen, dû à une zone peu pollinifère ;
- Une mauvaise météo, empêchant donc les butineuses de sortir pour récolter ;
- Un problème des glandes hypopharyngiennes des nourrices qui engendre une gelée royale de basse qualité. Ceci est dû à certaines maladies comme le couvain sacciforme.

Il existe d'autres problèmes, non liés au manque de nourriture :

- Le manque d'eau ;
 - La distance faible, moins de 50 mètres entre les ruchers (BELLOY et al, 2007) ;
 - Le pillage et la dérive des abeilles ;
 - La génétique et leur résistance du pathogène ;
 - L'immunité des larves dans leurs deux-trois premiers jours de vie, c'est à ce moment qu'elles sont le plus sensible à *M. plutonius* (FORSGREN E, 2010) ;
 - Ainsi bien entendu des mauvaises pratiques apicoles comme ne pas nettoyer les cadres, nourrir ses abeilles avec du miel contaminé d'une autre ruche ou apporter de la cire contaminée et qui n'a pas subi de traitement thermique, ne pas changer ses cadres atteints, l'échange de cadres entre colonies.
- (itsap.asso.fr)

3.6 Agents secondaires

Il a été démontré qu'une fois atteintes par *M. plutonius*, les larves qui meurent sont souvent infectées par d'autres agents (anses.fr). Ils ne peuvent pas déclencher la loque européenne, mais ils peuvent influencer les symptômes observés tel que l'odeur ou la consistance des larves mortes (gds centre). Les agents secondaires les plus courants sont (BAILEY L., 1983) (FORSGEN E., 2010) :

- *Achromobacter euridice*, qui est particulièrement présent dans le tube digestif des abeilles adultes qui récoltent le pollen frais.
- *Enterococcus faecalis*, qui est présent dans une grande partie de l'environnement et dans le tractus digestif des animaux et humains. *E. faecalis* peut être maintenue chroniquement dans des colonies malades et être pathogène à forte dose.
- *Paenibacillus alvei*, qui est une bactérie saprophyte aérobie productrice de spores, qui ne pousse que dans les larves mortes des colonies atteintes de maladies chroniques.
- *Brevibacillus laterosporus*, peut également se reproduire dans les restes larvaires

Tous ces agents peuvent se retrouver dans les larves infectées par *M. plutonius*. Bien qu'on ait pensé que ces agents étaient la cause de la mort, des études ont démontrées que

M. plutonius était bien l'agent de base causant la mortalité. Les agents secondaires colonisent seulement les larves affaiblies, immunodéficientes ou mortes (FORSGREN E, 2010) (BAILEY L., 1983).

Une étude a investigué la relation qu'il pourrait y avoir entre les trois différentes souches de *M. plutonius* et leur infection par des agents secondaires. Aucune différence n'a été prouvée en terme de survie ou de diminution de la prise de poids entre les larves infectées uniquement par *M. plutonius* et les larves qui ont également été infectées par un agent secondaire. Ce qui suggère que la virulence dépend principalement du génotype du pathogène et de son hôte, et que l'infection par des envahisseurs secondaires n'augmente pas la létalité de *M. plutonius*. (LEWKOWSKI O., et ERLER S., 2018)

4. Signes cliniques

Une fois atteinte par *M. plutonius*, la larve exprime des signes cliniques vers son 4^{ème} et 5^{ème} jour de vie (BELLOY L., et al, 2007). Visuellement, dans notre couvain nous pourrions remarquer, des larves mortes dans le couvain ouvert qui changent de couleur : blanc, jaune, brun, gris (DE LEON-DOOR A.P., et al, 2020) puis se décomposent en bouillie, non filante dans le cas de la loque européenne (gds centre).

De plus ces larves seront dans des positions atypiques dans leur cellule : position verticale dans la cellule, larves aplaties ou étirées (BELLOY L., et al, 2007).

Nous pourrions noter la présence d'écailles noires, non adhérentes, au fond des logettes, qui sont les restes séchés des larves malades (afsca.be).

Nous constaterons d'un couvain clairsemé, en mosaïque : les abeilles nettoyeuses sont capables de détecter et reconnaître les larves malades et de les éliminer (CHARRIERE J.D, et al 2009), ce qui induit un couvain lacunaire, non uniforme. Nous retrouverons des cellules contenant des restes de larves malades, des cellules vides dues à l'élimination des éléments malades ou encore une juxtaposition de couvain d'âges différents sur un même cadre dû à la nouvelle ponte de la reine pour remplacer les éléments éliminés (anses.fr 2019). Ce qui peut amener à la constatation d'une colonie faible et dépeuplée si celle-ci est fortement touchée.

Éventuellement, nous pourrions observer la présence d'opercules effondrés, sombres, qui pourrait facilement être confondus avec la loque américaine (DE LEON-DOOR A.P., et al, 2020). Les opercules pourraient également être percés, ce qui signe un nettoyage par les abeilles adultes (anses.fr 2019).

Au stade avancé, nous pourrions sentir une odeur aigre de vinaigre (afsca.be).

Attention, une colonie peut être atteinte sans présenter de symptômes, elle peut donc passer inaperçue aux yeux de l'apiculteur (MORSE et NOWOGRODZKI, 1990).

Une étude a démontré, après avoir récolté des échantillons d'abeilles dans des colonies infectées par *M. plutonius*, ainsi que dans toutes les colonies aux alentours de celles-ci, qu'il existe une relation étroite entre le taux d'infection des échantillons d'abeilles (analysé par PCR) et l'intensité des symptômes cliniques (CHARRIERE J.D et al, 2009).

5. Diagnostic

5.1 Sur le terrain

La détection de la loque européenne sur le terrain est essentiellement basée sur le diagnostic visuel :

L'apiculteur doit faire une inspection du couvain et une détection des larves malades (apiculteur.ch). Attention cependant que les symptômes de *M. plutonius* peuvent être confondus avec des anomalies du couvain ou d'autres maladies.

Plusieurs tests rapides de terrain ont été conçus, expérimentés et sont en ventes. Un immunocapteur ampérométrique basé sur un test en sandwich basé sur les anticorps de *M. plutonius* (MIKUSOVA Z., et al, 2019). Mais aussi un test de détection des antigènes de *M. plutonius* sur les larves infectées (ROETSCHI A., 2008), où il suffit de mettre une larve morte qu'on pense infectée dans le pot de liquide, de secouer et de mettre deux gouttes du liquide obtenu sur le dispositif du kit, les résultats sont visibles à l'œil nu dans les 3 à 10 min. Les lignes de réactif ainsi obtenues sont le fruit d'un complexe d'anticorps monoclonaux spécifiques à *M. plutonius*, liés à des particules de latex colorées, qui se lient aux antigènes de la bactérie pour migrer par capillarité sur le kit (Tomkies V, et al, 2008).

L'apiculteur peut aussi réaliser un test simple, qui est le test de l'allumette sur la bouillie : on trempe une allumette dans la bouillie d'une cellule, on la retire doucement, le filament qu'elle crée fait environ 1cm (apiculteur.ch).

5.2 En laboratoire

Plusieurs techniques sont envisageables pour détecter la loque européenne dans nos ruches. Pour ce faire, il faut envoyer au laboratoire un cadre intact d'au moins 10 x 10 cm du couvain touché ou suspect, des abeilles adultes prélevées sur le couvain qui seront ensuite congelées, un prélèvement de larves/écailles d'au moins 2 individus conditionné par exemple dans un tube de Eppendorf et éventuellement du miel, du pollen, ou encore des débris de ruche (BIOVA J. et al, 2021).

La mise en évidence de coques de type *M. plutonius*, via le microscope est une méthode simple et efficace : on étale le reste de larve sur une lame porte objet, on réalise

une coloration de Gram et on observe s'il y a présence ou non de coques Gram + (anses.fr 2019).

Plusieurs méthodes PCR sur des abeilles adultes du couvain, sur miel ou sur les débris de ruches, dont la méthode PCR quantitative (CHARRIERE J.D., et al, 2009), ou encore la PCR « hemi-nested » (MC KEE B.A., et al, 2003) restent les meilleures alternatives et permettent l'identification de l'espèce bactérienne *M. plutonius* (anses.fr 2016). Le centre Anses Sophia Antipolis, par exemple, commence par réaliser un examen bactérioscopique après une coloration Gram, puis confirme l'agent *M. plutonius* via la méthode PCR : Les échantillons de larves sont broyés afin d'obtenir une suspension homogène dans le but d'extraire les acides nucléiques cibles de l'ADN puis est amplifié par PCR grâce à des amorces spécifiques à *M. plutonius* (anses 2016).

Il est également possible de réaliser une mise en culture sur milieu gélosé, qui permet de mettre en évidence *M. plutonius* dont la morphologie des colonies est typique, mais cette méthode est difficile, lente et souvent contaminée par les agents secondaires (BIOVA J. et al, 2021). Ou encore via les dosages immuno-enzymatiques : test ELISA (gds centre.fr)

Un test immuno-absorbant qui utilise des nanoparticules de conversion ascendantes de photons (POLATCHOVA et al, 2019).

6. Prévention

Les mesures préventives restent à ce jour le meilleur moyen de lutte contre la loque européenne. Il en existe un grand nombre qui peuvent être mises en place pour diminuer le risque d'infection par *M. plutonius*. La désinfection de son matériel apicole et avoir de bonnes pratiques d'hygiène et d'assainissement est primordial (DE LEON DORRE A.P., et al, 2020). De plus, il est conseillé par exemple, de remplacer au minimum 3 cadres par an, pour éviter une accumulation de bactéries dans la cire. Il est également recommandé d'éviter les échanges entre les ruches (DE LEON DORRE A.P., et al, 2020) et de, par exemple, utiliser des fougères ou des plumes pour éviter d'éventuelles contamination par le biais de la brosse à abeille. (gds centre.fr)

Limiter la densité d'abeilles dans les ruches au début de saison et limiter la densité des ruches dans votre rucher vous permettra d'éviter la dérive, c'est-à-dire que les abeilles se trompent de ruche et contaminent celles-ci. De plus, la maladie affectant plus facilement les larves faibles, il est conseillé d'éviter les emplacements peu pollinifères là où on installe les ruchers, et de surveiller les réserves de la colonie et de les nourrir s'il manque de nourriture pour éviter le pillage et les carences (DE LEON DORRE A.P., et al, 2020).

Il est également conseillé d'espacer les ruchers d'un kilomètre minimum pour diminuer le risque de dérive et de pillage et donc la contamination d'une ruche saine par une abeille infectée (BELLOY L., et al, 2007).

Surveiller les ruchers, les soigner et les observer afin de déceler les ruches malades, les mettre en quarantaine ou éventuellement les détruire, reste un excellent moyen prévenir les maladies et est vivement conseillé (DE LEON DORRE A.P., et al, 2020). Ainsi que d'effectuer au minimum deux visites sanitaires des ruches par an. Maitriser l'infestation de varroa, pour ne pas nuire aux glandes hypopharyngiennes des nourrices et pour éviter qu'il y ait un dépeuplement durant l'hiver (anses.fr). Il est important de maintenir des colonies fortes et équilibrées, pour faire face plus facilement aux maladies et espérer que les colonies guérissent spontanément.

Enfin, il est conseillé de sélectionner ou se procurer de jeunes reines saines de souches dites « hygiéniques » (DE LEON DORRE A.P., et al, 2020), c'est-à-dire des abeilles qui ont un comportement qui permettent d'augmenter l'immunité sociale de la colonie, via des nettoyages précoces des cellules infectées, même si ceci a surtout été démontré contre Varroa (MONDET F et al, 2021). Et remplacer régulièrement les reines pour éviter une chute de prolificité de celles-ci, ce qui affaiblirait la colonie (DE LEON DORRE A.P., et al, 2020).

7. Traitements

Premièrement il faut savoir que toute colonie atteinte par *M. plutonius* doit obligatoirement être déclarée aux autorités vétérinaires.

Il existe différents antibiotiques à large spectre, dont le chlorhydrate d'oxytétracycline (OTC), qui est un antibiotique bactériostatique. Mais aussi la tétracycline qui a démontré une guérison de façon durable des colonies atteintes, bien que moins rapide que l'OTC (BRIZARD A. et al, 1964). Ce dernier a largement été utilisé depuis les années 50 pour lutter contre la loque européenne et américaine, il en a résulté l'apparition d'une résistance de la bactérie de la loque américaine, et l'OTC est maintenant interdit dans de nombreux pays. En 2003 une étude a été menée pour savoir s'il existait des résistances à l'OTC chez *M. plutonius*, mais il s'est avéré que notre bactérie est sensible non seulement à l'OTC mais aussi à la tétracycline dans 100% des isolats analysés. Cela peut donc être un moyen de traitement efficace (WAITE R., et al, 2003).

Des études ont également identifié et proposé l'ampicilline et l'amoxicilline pour le contrôle de la loque européenne, cependant des résidus se retrouvent dans le miel. Cela peut donc devenir un problème de santé publique, puisque si l'homme ingère des résidus d'antibiotiques, il peut créer une résistance envers ses propres bactéries (DE LEON DOOR P.A., et al, 2020).

De plus, les antibiotiques bactériostatiques suppriment les symptômes, l'éleveur peut donc penser que sa colonie est rétablie et de ce fait augmenter la propagation de la maladie. Enfin les antibiotiques sont toxiques pour le couvain et pour la microflore intestinale bénéfique aux abeilles, et de ce fait affecter la longévité et la vitalité de la colonie.

Pour toutes ces raisons, les antibiotiques sont désormais interdits dans de nombreux pays, et dans toute l'Europe. Il est donc urgent de trouver des solutions alternatives pour contrôler la loque européenne (DE LEON DOOR P.A., et al, 2020).

Une des techniques alternatives proposée est « la méthode de l'essaim secoué » ou encore « le transvasement ». Cette méthode consiste en un transfert des abeilles adultes dans une nouvelle ruche, avec de nouveaux cadres, complémenté en une alimentation riche en sucres modifiés (BUDGE G., et al 2010). Il a été démontré que la probabilité de réapparition de la loque dans la colonie était plus faible dans celles traitées avec cette méthode par rapport à celles traitées avec l'OTC (BUDGE G., et al 2010).

Nous avons également découvert qu'il existe des bactéries lactiques commensales intestinales chez les insectes, les animaux et les humains, qui agissent comme des organismes probiotiques (WU M., et al, 2014). Ces bactéries lactiques commensales sont connues pour moduler la réponse immunitaire de l'hôte en le protégeant via des métabolites antimicrobiens. La plus importante étant *Lactobacillus*, il a été trouvé dans le jabot des abeilles *Apis mellifera*, où il joue un rôle clé dans la production de miel (VASQUAREZ A., et al, 2012). Ce microbiote est transféré dès l'éclosion des œufs par trophallaxie entre les jeunes larves et les abeilles chargées des soins au couvain. Il a été démontré par des études in vivo et in vitro, que *Lactobacillus* permet d'inhiber totalement in vitro et partiellement in vivo *M. plutonius* ainsi que le pathogène responsable de la loque américaine. De ce fait l'ajout de *Lactobacillus* à la nourriture des larves d'abeilles a un effet sur la diminution significatif de la mortalité des larves (VASQUAREZ A., et al, 2012).

Des nanoparticules ou encore des extraits aqueux de plantes et d'huiles, notamment d'arbre à thé, de *Malva sylvestris*, de persan salvadora, de *Cinnamomum*, de *thymus vulgaris* et de maceligan, ont démontré des effets antibactériens importants contre *M. plutonius*. De ce fait, l'utilisation d'extraits et d'huiles essentielles de plantes est prometteuse pour le traitement de la loque européenne. Et incite donc à des recherches (Vandamme & Mortelmans, 2019).

En résumé, s'il y a présence de *M. plutonius* dans vos ruches, les antibiotiques étant inutiles et interdit en France, les obligations sont différentes en fonction du stade d'infection et symptomatologique de la maladie.

Si début, c'est-à-dire quelques larves mortes et max 3 cadres atteints : retirer et brûler les cadres contenant les larves mortes, nourrir les abeilles, et forcer les abeilles à nettoyer en bloquant la ponte, car une colonie peut guérir spontanément si les facteurs de risques sont corrigés (apiservice.biz)

Si le stade est plus avancé mais que la colonie n'est pas affaiblie : transvaser les abeilles adultes sur une cire neuve, les nourrir et détruire des cadres (gds centre.fr).

Si la colonie est très atteinte, c'est-à-dire qu'il y a plus de la moitié des cadres touchés : destruction de la colonie et des cadres, et désinfection de la ruche avec une solution d'eau chaude contenant 3 à 5% de soude caustique, puis désinfecter au chalumeau (anses.fr) (CHARRIERE J.D, et al, 2009).

Obligation de faire une visite approfondie de tous les cadres de toutes les colonies du rucher, et il est vivement conseillé de faire une deuxième visite environ 15 jours plus tard pour déceler d'éventuels nouveaux cas (gds centre).

Évidemment désinfecter correctement ou jeter le matériel qui a été en contact avec des colonies malades. Pour se débarrasser de *M plutonius* dans la cire il faut la faire fondre à plus de 80°C pendant plus de 30 minutes (gds centre.fr).

8. Parallèle avec la loque américaine

8.1 Le pathogène

La loque américaine est également une maladie bactérienne très contagieuse des abeilles, elle aussi est largement répandue dans le monde (STEPHAN J.G., et al, 2020). Son agent pathogène est *Paenibacillus larvae*, c'est une bactérie Gram positive qui, au contraire de *M. plutonius*, va former des endospores, qui sont extrêmement tenaces, qui peuvent rester viables pendant plusieurs dizaines d'années (AFSCA.be). De plus, il existe un pourcentage de colonies qui sont productrices de spores mais qui ne sont pas détectées par l'apiculteur (STEPHAN J.G., et al, 2020). Cela explique donc le fait que c'est une maladie plus grave que la loque européenne (GENERSCH E., 2010). Tout comme la loque européenne, la loque américaine infecte les larves de deux jours. Toutefois, celle-ci ne présente des signes cliniques que lorsque les alvéoles présentes dans le couvain sont operculés. Le couvain est alors appelé « couvain fermé ».

Elle est, elle aussi, une des maladies à déclaration obligatoire sur la liste de l'OIE (Anses.fr)

8.2 Infection et transmission

Tout comme pour *M. plutonius*, il n'y a que les jeunes larves jusqu'à deux jours qui sont sensibles et s'infectent via ces spores. Les abeilles adultes, elles sont porteuses et transmettent celles-ci aux larves pendant le nourrissage (GENERSCH E., 2010) (AFSCA.be). Il y a un phénomène de multiplication extrême des spores une fois qu'ils ont

été ingérés par la larve, ils prolifèrent dans l'intestin et traversent l'épithélium. Une fois que la larve meurt, elle émet des marqueurs volatils de la maladie qui sont reconnaissables par les nettoyeuses (SUJIN L., et al, 2020). Mais si la larve échappe au nettoyage, alors elle forme une écaille en séchant qui est très dur à enlever pour les abeilles nettoyeuses et qui peut contenir jusqu'à 2,5 millions de spores (Anses.fr). De ce fait, la larve infectée représente une source perpétuelle d'infection (STEPHAN J.G., et al, 2020). Les abeilles adultes étant vectrices, elles peuvent, tout comme la loque européenne, transmettre les spores de la bactérie à d'autres colonies via le pillage, l'essaimage ou la dérive. De même, l'apiculteur peut les distribuer en déplaçant du matériel contaminé entre les colonies.

8.3 Signes cliniques

Nous pouvons retrouver un couvain clairsemé, en mosaïque, avec des cellules operculées plus foncé que la couleur de base, affaissées ou présentant des perforations. Nous pouvons également retrouver des cellules ouvertes avec une écaille séchée très adhérente à la paroi de la cellule, ou un reste de larve visqueux et filandreux. Le couvain peut également dégager une mauvaise odeur (AFSCA.be). Les symptômes ont tendance à apparaître tardivement (STEPHAN J.G., et al, 2020), ce qui rend le diagnostic plus compliqué, de plus la charge de spores est directement en relation avec la présence de signes cliniques (STEPHAN J.G., et al, 2020). Cela explique pourquoi il existe un pourcentage de colonies infectées sans signes cliniques et donc une source d'infection persistante.

8.4 Diagnostic et traitement

Le diagnostic est à peu près le même que pour celui de *M. plutonius*, donc diagnostic visuel sur le terrain, ainsi que le test de l'allumette qui cette fois fait un long filament gluant. Les tests PCR en laboratoire sont indispensables, et une étude a démontré qu'un échantillon d'abeilles adultes était plus efficace que des larves pour la détection de *P. larvae* (STEPHAN J.G., et al, 2020).

Pour ce qui est du traitement, cela dépend aussi de l'état clinique de la colonie et du couvain, s'il y a des signes cliniques visibles alors les autorités obligeront la destruction de la colonie ainsi que son matériel par l'incinération (AFSCA.be). Si peu de larves sont atteintes, un transvasement est suffisant puisque la plus grosse partie de la charge de spores se trouvent dans le couvain et dans le matériel dans la ruche. Pour se débarrasser de *P. larvae* on conseille de faire fondre la cire à 120° pendant minimum trente minutes (gds centre.fr).

8.5 Lutte et prévention

Le risque de contamination peut être réduit de la même manière que pour la loque européenne, par les bonnes pratiques apicoles et de la prophylaxie (afsca.be).

9. Diagnostic différentiel

9.1 La loque américaine : *Paenibacillus larvae*

Bactérie qui touche essentiellement le couvain fermé, avec des opercules affaissés, troués, de couleur plus foncée. Mais aussi des écailles de larves mortes séchées adhérentes, et une bouillie gluante et filante (GENERSCH E., 2010).

9.2 Le couvain sacciforme : *Sacbrood Bee Virus*

Ce virus touche essentiellement le couvain fermé contrairement à la loque européenne. Nous observerons donc des opercules affaissés, déchirés ou de couleur foncée. Il se peut aussi que nous observions des cellules ouvertes mais uniquement due à une désoperculation réalisée par les abeilles.

Sacciforme comme son nom l'indique donc la larve va se redresser et former une espèce de sac, rempli de particules virales.

Une fois décomposée la larve forme une écaille en forme de barque, non adhérente (itsap.asso.fr).

9.3 La varroose : *Varroa destructor*

Nous observerons également un couvain en mosaïque, et en cas de forte infestation nous observerons au niveau du couvain des alvéoles désoperculées, du cannibalisme et des nymphes mortes (gds centre.fr).

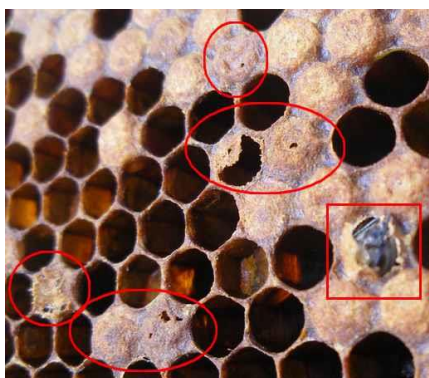


Figure 11.
Loque américaine
Photo : Apistory.fr



Figure 12.
Couvain sacciforme
Photo : itsap.asso.fr



Figure 13.
Varroose sur larve
Photo : Igor Chus

10. Statut sanitaire et épidémiologique en Belgique

Les loques sont présentes pratiquement dans le monde entier, dans toutes les zones de manière enzootique, mais vu la contagiosité de ces maladies, sans mesures de traitement ou de confinement, elle peut avoir des allures épizootiques.

En Belgique, en 2019, environ 33 000 ruches ont été déclarées lors d'un recensement en Wallonie et à Bruxelles. Une nouvelle campagne de dénombrement est actuellement en cours (beewallonie.be). Il y a environ 9000 apiculteurs enregistrés en Belgique dont 60% en Flandres (afsca.be).

D'après les données de l'agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA), les deux loques sont présentes sur le territoire belge depuis de nombreuses années.

Depuis début 2019 jusqu'à novembre 2021, 28 foyers de loque européenne ont été dénombrés en Wallonie, ainsi que 21 foyers de loque américaine.

Sur les 33 000 ruches en Wallonie ça correspond à une incidence et un pourcentage (0,085%) de cas très faible. Preuve que la Belgique a un bon plan d'action pour lutter contre ces maladies.

Malheureusement nos dernières informations sur le site de l'AFSCA remontent au 30 novembre 2021.

Au niveau du plan de lutte en Belgique : maladie à déclaration obligatoire donc à l'Unité Locale de Contrôle de la province où se trouve le rucher, celui-ci envoie un assistant apicole qui va prélever des échantillons et les envoyer au laboratoire. Dans le cas où l'échantillon serait positif, l'afsca délimite un périmètre de 3km autour de la ruche touchée. Toutes les colonies dans ce dit périmètre vont être examinées pour détecter d'éventuelles contaminations. De plus, il sera interdit de transporter des abeilles et le matériel hors ou dans cette zone.

Si des ruches sont effectivement atteintes de loque, l'AFSCA décidera si la ruche doit être détruite ou si des mesures d'assainissement seront suffisantes (health.belgium.be), en fonction du degré d'atteinte de la ruche suivant l'article 13 de l'AR du 7 mars 2007. En cas de destruction une indemnisation peut être demandée par l'apiculteur.

En résumé

La loque européenne est une maladie des abeilles due à la bactérie Gram positive *Melisococcus plutonius*, qui atteint le couvain ouvert. Elle se transmet essentiellement des abeilles nourricières, qui est porteuse, aux larves lorsque celles-ci sont à leurs 1^{er} ou 2eme jour de vie. Les cellules bactériennes prolifèrent dans l'intestin moyen de leur hôte et les larves meurent vers leur 5eme jour, généralement d'inanition. Les signes cliniques sont visibles et assez reconnaissables mais c'est le laboratoire qui est en mesure d'affirmer ou d'infirmer et qui posera le diagnostic final. Les moyens de lutte sont surtout basés sur des mesures préventives et des bonnes pratiques apicoles. Le traitement est quant à lui différent de si le couvain est peu atteint ou fortement atteint, s'il est touché à 50% ou plus la colonie devra être détruite. C'est une maladie très contagieuse qui, si on la laisse aller et si on a une forte densité d'abeilles, via le pillage et les dérives, peut vite prendre des allures d'épizootie. Cela engendrerait un phénomène d'effondrement des colonies d'abeilles domestiques, mais aussi sauvages, ce qui serait désastreux pour l'avenir de ces pollinisateurs indispensables dans notre agriculture. Ces dernières années, des études et des recherches ont été réalisées pour mieux connaître la pathogénie de cette bactérie qui est encore floue à actuellement. Trois souches différentes ont été identifiées, une non virulente, une virulente et une atypique hautement virulente. Encore maintenant, beaucoup de recherches sont en cours pour essayer de mieux comprendre et analyser les différents facteurs de virulence, dans l'espoir de mieux contrôler cette maladie mondiale.

Bibliographies

- AFSCA : <https://www.favv-afsca.be/apiculture/santeanimale/>
- ALPHANDERY R., 2002 - La route du miel : le grand livre des abeilles et de l'apiculture. Ed. Nathan, Paris, 260 p.
- Anses loque européenne : https://www.anses.fr/fr/system/files/EFB_Leaflet_Fr_V4.pdf
- Anses loque américaine : <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES-FT-LoqueAmericaineLRUE.pdf>
- Anses.fr référence : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.01 - Version 6 Août 2019 (Recherche de la loque européenne du couvain d'abeilles par examen bactérioscopique)
- Anses.fr référence : ANSES/SOP/ANA-I1.21 - Version 2 Août 2016 (Identification de *Melissococcus plutonius*, agent de la loque européenne, par PCR)
- <https://www.apiculteur.ch/loque>
- Apiservice : <https://www.apiservices.biz/fr/articles/classes-par-popularite/1260-traitement-des-ruchers-atteints-de-loque-americaine-et-de-loque-europeenne-2005>
- <https://www.apistory.fr/PAGES/loqueamericaine.html>
- BAILEY L., COLLINS M.D., 1982 - Reclassification of 'Streptococcus pluton' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom – Journal of Applied Bacteriology, 53 (2), p215-217.
- BAILEY L. (1983) *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (Apis spp.), J.Appl. Bacteriol. 55, 65–69
- BAILEY L. and BALL B.V., 1991- *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London - New York, 125 p.
- <https://bees.techno-science.ca/francais/les-abeilles/la-ruche-et-la-colonie/etapes.php>
- <https://www.beewallonie.be/apiculteurs-et-ruches/>
- Belloy L., Imdorf A., Fries I., Forsgren E., Berthoud H., Kuhn R., Charrière J.D. (2007) Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood, Apidologie 38, 136-140.
- BIOVA J., CHARRIERE J.D., DOSTUNLKOVA S., SKRABISOVA M., PETRIVALSKY M., BZDIL J., DANIHLIK J., 2021 - *Melissococcus plutonius* Can Be Effectively and Economically Detected Using Hive Debris and Conventional PCR – MDPI Journal Insects, 12, 150.
- BRIZARD A., DELORME G., ALBISETTI J., 1964 – Contrôle de l'efficacité de la « tétracycline » dans le traitement de la loque européenne – Les Annales de l'Abeille, 7 (1), p19-22
- BUDGE G., SHIRLEY M., JONES B., QUILL E., TOMKIES V., FEIL E., BROWN M., HAYNES E., 2014 - Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius* – The Isme Journal, 8, 1588-1597
- BULL J.J., 1983 – Evolution of Sex Determining Mecanisms. Benjamin Cummings Ed., Menlo Park. 67 p.

- <https://www.cabi.org/isc/datasheet/34446>
- CAMPBELL N.A. (1995). Biologie – Adaptation et révision scientifique de Richard Mathieu. Edition DeBoeck Université, Bruxelles, Belgique : 598-634 ; 982- 999
- Cari.be
- CHARRIERE J.D., ROETSCHI A., ANTON I. 2009 – La loque européenne (EFB) : nouvelle méthode de diagnostic pour faire face à la recrudescence des cas frappant la Suisse depuis 1999
- CLÉMENT H. (2010) L'abeille, sentinelle de l'environnement. Paris, Éditions Alternatives, 144p
- CLÉMENT H. (2011) Traité Rustica de l'apiculture. Paris, Rustica éditions, 3ème édition, 529 p
- DELAPLANE K., 1998 - Strictly for the hobbyist: European foulbrood and its control. *Am. Bee. J.*, 138 (10): 736 - 737.
- DE LEON DOOR A.P., PEREZ-ORDONEZ G., ROMO-CHACON A., RLOS-VELASCO C., ORNELAS-PAZ J.D.J., ZAMULDO-FLORES P.B., ACOSTA-MUNLZ C.H., 2020 – Pathogenesis, epidemiology and variants of *Melissococcus plutonius* (ex White), the causal agent of european foulbrood – J.APIC.SCI., vol64, n2, 173-188.
- DJURIC M., ERLER S., LEIMBACH A., GROSSAR D., CHARRIERE J.D., GAUTHIER L., HARTKEN D., DIETRICH S., NACKE H., DANIEL R., POEHLEIN A., 2018 - Comparative Genomics and Description of Putative Virulence Factors of *Melissococcus plutonius*, the Causative Agent of European Foulbrood Disease in Honey Bees – Genes, 9, 419.
- <http://www.gdscentre.fr/index.php/abeilles/sanitaire/loque-europeenne>
- https://bonnes-pratiques.itsap.asso.fr/wp-content/uploads/2018/09/Pages-de-ITSAP-GBPA-MAJ_2018-Fiche_M4-Web.pdf
- FORSGREN E. (2010) Journal of Invertebrate Pathology, 103, S5-S9
- FORSGREN E., BUDGE G. E., CHARRIERE J.-D., & HORNITZKY M. A., 2013 - Standard methods for European foulbrood research. - Journal of Apicultural Research, 52(1), 1-14.
- GENERSCH E., 2010 – American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae* – Journal of Invertebrate Pathology, 103, S10-S19.
- GROSSAR D., KILCHENMANN V., FORSGREN E., CHARRIERE J.D., GAUTHIER L., CHAPUISAT M., DIETEMANN V., 2020 - Putative determinants of virulence in *Melissococcus plutonius*, the bacterial agent causing European foulbrood in honey bees - virulence, 11, n1, 554-567
- Health.belgium.be/fr/animaux-et-vegetaux/animaux/sante-animale/abeilles/abeilles-menacees-des-causes-multiples-0
- 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.

- LEWKOWSKI O., ERLER S., 2019 - Virulence of *Melissococcus plutonius* and secondary invaders associated with European foulbrood disease of the honey bee – MicrobiologyOpen, 8, e649.
- McKee B.A., Djordjevic S.P., Goodman R.D., Hornitzky M.A.Z., 2003. The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. Apidologie 34, 19–27.
- MCKEE B.A., GOODMAN R.D., HORNITZCKY M. A., 2004 - The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). J. Apic. Res., 43: 93 - 100.
- MIKUSOVA Z., FARKA Z., PASTUCHA T., POLACHOVA V., OBOOILOVA R., SKLADAL P., 2019- Amperometric Immunosensor for Rapid Detection of Honeybee Pathogen *Melissococcus Plutonius* - Electroanalysis, 31, 1969-1976
- <https://www.mellifica.be/a/des-hymenopteres-a-labeille-noire/>
- Mondet F., Blanchard S., Barthes N., Beslay D., Bordier C., Costagliola G., Hervé MR., Lapeyre B., Kim SH., Basso B., Mercer AR., Le Conte Y., 2021. *Chemical detection triggers honey bee defence against a destructive parasitic threat*, Nature Chemical Biology. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00720-3>
- MORSE R.A. and NOWOGRODZKI R., 1990 - *Honey bee pests, predators and diseases*. Ed. Corne Univ. Press, Ithaca, New York. 474 p.7
- NAKAMURA K., OKUMURA K., HARADA M., OKATOMO M., OKURA M., TAKAMATSU D., 2021 - Peritrophic matrix-degrading proteins are dispensable virulence factors in a virulent *Melissococcus plutonius* strain - Scientific reports, 11, 8798
- OSAV : Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires : <https://www.blv.admin.ch/blv/fr/home/tiere/tierseuchen/uebersicht-seuchen/alle-tierseuchen/sauerbrut-bei-den-bienen.html>
- Plateforme épidémiosurveillance santé animale : https://www.pplateforme-esa.fr/node/35786?fbclid=IwAR0dL1xZ_yjpAUkCrInd2B8C4khyJ-KUq2zsbcgcefH7aLS2RQ6s30CUq5o
- Polatchova V., Pastucha M., Mikusova Z., Mickert M.J, Hlavacek A., Gorris H.H, Skladal P., Farka Z., 2019 - Click-conjugated photon-upconversion nanoparticles in an immunoassay for honeybee pathogen *Melissococcus Plutonius*. - Nanoscale, 11, 8343–8351.
- PROST J.P. et LE CONTE Y., 2005 - Apiculture : connaître l'abeille, conduire le rucher. Ed. Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 698 p.
- Roetschi A., Berthoud H., Kuhn R., Imdorf A. 2008 - Infection rate based on quantitative realtime PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation - Apidologie 39, 362-371.
- STEPHAN J.G, MIRANDA J.R, FORSGREN E., 2020 – American foulbrood in a honeybee colony : spore-symptom relationship and feedbacks between disease and colony development – BMB Ecol. 20, 15

- SUJIN L., SOOHO L., YONG-SOO C., MYEONG-LYEOL L., HYUNG K., 2020 – Volatile disease markers of American foulbrood-infected larvae in *Apis mellifera* – Journal of Insect Physiology, 122, 104040.
- Takamatsu D., Morinishi K., Arai R., Sakamoto A., Okura M., Osaki M., 2014 - Typing of *Melissococcus plutonius* isolated from European and Japanese honeybees suggests spread of sequence types across borders and between different - *Apis* species. Veterinary Microbiology, 171(1), 221-226
- Tomkies V., Flint J., Johnson G., Waite R., Wilkins S., Danks C., Watkins M., Cuthbertson A.G.S., Carpana E., Marris G., Budge G., Brown M.A., 2008. Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. Apidologie 40, 63–72.
- VANDAMME E. J., & MORTELMANS K., 2019 - A century of bacteriophage research and applications : impacts on biotechnology, health, ecology and the economy! - Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 94(2), 323-34.
- VASQUEZ A., FORSGREN E., FRIES I., PAXTON R.J., FLABERG E., SZEKELY L., OLOFSSON T., 2012 - Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees – PloS One, 7 (3), e99188.
- VON FRISCH K. (2011). Vie et moeurs des abeilles. Editions Albin Michel, Paris, 21-66.
- WAITE R., JACKSON S., THOMPSON H., 2003 - Preliminary investigations into possible resistance to oxytetracycline in *Melissococcus plutonius*, a pathogen of honeybee larvae – Lett Appl Microbiol, 36 (1), 20, 4.
- WILSON W.T., 1971 - Resistance to American foulbrood in honey bees XI. Fate of *Bacillus* larvae spores ingested by adults. J. Invertebr. Pathol., 17: 247 – 255.
- WINSTON M.L., 1993 - La biologie de l'abeille. Ed. Frison-Roche, Paris , 276 p.
- WINSTON M.L. and PUNNET E.N., 1982 - Factors determining temporal division of labor in honeybees. Can. J. Zool., 60: 2947 – 2952
- WU M., SUGIMURA Y., IWARA K., TAKAYA N., TAKAMATSU D., KOBAYASHI M., TAYLOR D., KIMURA K., YOSHIYAMA M., 2014 - Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, against *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood disease – J Insect Sci, 14, 129.
- <https://www.yumpu.com/fr/document/read/16536012/la-loque-europeenne>. Texte de Dorothée Ordonneau.
- <https://www.zapiculture.com/abeilles/le-cycle-de-vie-des-abeilles/>