



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure
et de la Recherche Scientifique
Université de Tissemsilt



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme

De Master académique en

Présenté par : *M^{elle}* **FRIKECHE Fatiha**

M^{elle} **BOUDIAF Khaldia**

Thème

Test de l'activité biologique des liquides ioniques synthétisés

Soutenu le, juin 2022

Devant le Jury

M ^{me} TALBI Sonia	Présidente	M.C.B	Univ-Tissemsilt
M ^f . CHAHBAR Mohamed	Encadreur	M.C.A	Univ-Tissemsilt
M ^{elle} HENNI Asma	Co-encadreur	Doctorante	Univ-Tissemsilt
M ^{me} SETTI AHMED Kheira	Examinatrice	M.C.B	Univ-Tissemsilt

Année universitaire : 2021-2022.



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure
et de la Recherche Scientifique
Université de Tissemsilt



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme

De Master académique en

Filière : **sciences biologiques**

Spécialité : **Biochimie Appliquée**

Présenté par : *M^{elle}* **FRIKECHE Fatiha**

M^{elle} **BOUDIAF Khaldia**

Thème

Test de l'activité biologique des liquides ioniques synthétisés

Soutenu le, juin 2022

Devant le Jury

M ^{me} TALBI Sonia	Présidente	M.C.B	Univ-Tissemsilt
M ^f . CHAHBAR Mohamed	Encadreur	M.C.A	Univ-Tissemsilt
M ^{elle} HENNI Asma	Co-encadreur	Doctorante	Univ-Tissemsilt
M ^{me} SETTI AHMED Kheira	Examinatrice	M.C.B	Univ-Tissemsilt

Année universitaire : 2021-2022.

Remerciements

Ce modeste mémoire est le résultat d'un long travail de recherche. En préambule, Nous remerciant Dieu qui nous avons donnés la force et la patience pour terminer ce travail. Si ce mémoire a abouti, c'est grâce à l'appui de différentes personnes. Le mémoire est une belle expérience, enrichissante, parfois dure, avec toutes les circonstances actuelles mais surtout captivante et qui nous a fait avancer. A l'issue de ce travail, nous adressons nos vifs remerciements à :

À notre promoteur M **CHAHBAR Mohamed** Maitre Conférence A qui nous a orientées pour réaliser ce travail et pour sa grande patience et surtout sa disponibilité et ses conseils avisés.

À notre Co-promotrice Mlle **HENNI Asma** pour son aide durant notre travail et ses conseils précieux, ses remarques pertinentes et ses aides généreuses tout au cours de la rédaction de notre mémoire.

Nous remerciant chaleureusement les membres du jury qui me font l'honneur de présider et d'examiner ce modeste travail.

Mm TALBI Sonia, maitre de conférences B pour m'avoir honorée en acceptant de présider le jury de soutenance de mon mémoire de fin d'études.

Mm SETTI AHMED kheira, maitre de conférences B pour avoir accepté de juger mon travail.

Enfin, un grand merci à tous les membres du laboratoire d'université de Tissemsilt.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

À celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoirs, à la source d'amour

Incessible, à la mère des sentiments fragiles qui ma bénie par ces

Prière.....ma mère

À mon support dans ma vie, qui m'a appris m'a supporté et ma dirigé

Vers la gloire.....mon père

À mes chères frères et sœurs

À toutes les personnes de ma grande famille

À ma meilleure amie : HOUDA et SARA

À tous mes amis de promo biochimie 2021/2022

Fatiha

Dédicaces

Tout d'abord, je remercie 'ALLAH' qui m'a donné la force, le courage et la volonté.

Je dédie ce travail à :

À ma mère, que dieu lui fasse miséricorde et que son âme repose au paradis

À mon père pour soutien son affection et la confiance qui il m'a accordé

À mes chères frères et sœurs

À tous les membres de ma famille et à tous les amis

À ma meilleure amie : HAMIDA et KHADIDJA et mon collègue FATIHA

À tous les enseignantes et enseignants qui ont contribué à ma formation du seuil du primaire jusqu'à l'université, et à tous ceux qui sèment le bonheur dans mon chemin.

A toute mes amis de 2ème année master biochimie appliquée promo 2021- 2022

Khaldia

Table des matières

Remerciements	I
Dédicaces.....	II
Table des matières	Erreur ! Signet non défini.
Listes de figures.....	VIII
Listes des tableaux.....	VIII
Listes des abréviations.....	IX

Première partie: Synthèse bibliographique

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre 01: les liquides ioniques

1. Définition.....	3
2. Histoire des liquides ioniques	4
3. Structure des liquides ioniques	6
4. La synthèse des liquides ioniques	8
4.1. Réaction de quaternisation du noyau imidazole	9
4.2. Échange anionique.....	9
5. Propriétés physiques chimiques des liquides ioniques	10
5.1. Point de fusion.....	10
5.2. Viscosité	11
5.3. Conductivité.....	12
5.4. Densité.....	12
5.5. Polarités	13
5.6. Stabilité thermique.....	13
6. Domaines d'applications des liquides ioniques	13
6.1. Application en chimie analytique	13

6.2.	Application pour l'extraction	14
6.3.	Application en électrochimie	14
7.	Toxicité des liquides ionique	14
8.	Liquides ioniques dans les techniques de séparation	15
8.1.	Extraction Liquide-Liquide	15
8.1.1.	Extraction de Molécules Organiques	15
8.1.2.	Extraction liquide/liquide d'ions métalliques dans des liquides ioniques à température ambiante	16
8.2.	Les liquides ioniques et la chromatographie	17
8.2.1.	Chromatographie en phase gazeuse	17
8.2.2.	Chromatographie en phase liquide	19
9.	Purification et pureté des LIs	19

Chapitre 02: les agents pathogènes qui touchent l'abeille domestique

1.	Les parasites et envahisseurs	21
1.1.	Varroa destructeur	21
1.1.1.	L'agent causal	22
1.2.	Acarien de la trachée	22
1.3.	Le petit coléoptère de la ruche	23
1.3.1.	Apocéphale boréal	25
1.3.2.	Tropilaelaps spp	26
2.	Les bactéries	27
2.1	La Loque Américaine	27
2.1.1.	L'effet pathogène	27
2.2.	Loque Européenne	29
2.2.2.	Traitement des loques	30
2.3.	Spiroplasmes	30
3.	Les mycètes	31

3.1. Nosema ssp	31
3.2. Ascosphaera apis	32
3.2.1. Historique.....	32
3.2.2. Définition	32
3.2.3. L'agent causal de l'ascosphérose.....	33
3.2.4. La maladie du couvain plâtré	34
3.2.5. Le pouvoir pathogène de l'ascosphérose	34
3.2.6. La lutte contre l'ascosphérose.....	36

Deuxième partie: partie pratique

Chapitre 01: Matériels et Méthodes

1. L'objectif de cette étude.....	37
2. Matériels et méthodes	37
2.1. Matériels	37
2.1.1. Matériels biologique.....	Erreur ! Signet non défini.
2.1.2. Milieux de culture et produits chimiques	37
2.1.3. Matériels de laboratoire.....	38
2.2. Méthodes	39
2.2.1. Échantillonnage et isolement	39
2.2.4. Évaluation de l'activité biologique des liquides ionique	46

Chapitre 02: résultats et discussion

1. Résultats.....	51
1.1. Étude des caractères macroscopiques et microscopique d'Ascosphaera apis	51
1.1.1. Aspect macroscopique d'Ascosphaera apis	51
1.2. Étude des caractères macroscopiques et microscopique de Paenibacillus larvae	52
1.2.1. Étude des caractères macroscopiques	52

1.2.2.	Étude des caractères microscopiques	53
1.2.3.	Tests biochimiques	53
1.3.	Étude de l'activité biologique des Lis	56
1.3.1.	Étude de l'activité antifongique des Lis	56
1.4.	Étude de l'activité antibactérien des Lis.....	57
2.	Discussion	58
	Conclusion.....	60
	Références bibliographiques	61

Listes de figures

Figure 1 :Structure chimique des principaux cations LI rencontrés dans la littérature	7
Figure 2 : Structure des liquides ioniques à motif 1-alkyl-3-méthylimidazolium	8
Figure 3 : Représentation du liquide ionique 1-hexyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate. Les zones en rouge représentent les zones chargées (cation imidazolium et anion PF6 -) et celle en vert la chaîne latérale hexyl apolaire	8
Figure 4 : Synthèse de sels d'imidazolium	9
Figure 5 : Exemple d'échange anionique avec des acides de Lewis	10
Figure 6 : Exemple d'échange anionique avec des sels organiques	10
Figure 7 :-Lorsque le pH de la solution aqueuse est de 1,5, le bleu de thymol est un zwitterion neutre (couleur rouge) et préfère la phase [BMIM][PF6] (couche inférieure).....	16
Figure 8 :Chromatogrammes CPG obtenus sur une colonne capillaire de liquide ionique.	18
Figure 9 :Acarien trachéal femelle adulte de l'abeille, <i>Acar Apis woodi</i>	23
Figure 10 : Le cycle de vie naturel du petit coléoptère de la ruche se déroule en partie à l'intérieur et en partie à l'extérieur de la colonie d'abeilles	24
Figure 11 :Mouche kombie femelle (<i>Apocephalus borealis</i>)	25
Figure 12 : Tropilaelaps femelle adult.	26
Figure 13 :La loque Américain sur un cadre du couvain	29
Figure 14 :Le couvain plâtré ascosphérose	34
Figure 15 : Aspect macroscopique d' <i>Ascospaera apis</i> ; A : Les colonies d' <i>Ascospaera apis</i> sont blanches ; B : aspect macroscopique d' <i>Ascospaera apis</i> après la formation des kystes	40
Figure 16 :Aspect microscopique d' <i>Ascospaera apis</i> (Gr X 400)	41
Figure 17 : Aspect microscopique de <i>Paenibacillus larvae</i> (Gr X 10)	43
Figure 18 : Coloration des disques d'oxydase après leur frottement avec les bactéries	44
Figure 19 :Le kit de diagnostic API 20 E	45
Figure 20 : La dissolution de liquide ionique dans l'eau stérile	47
Figure 21 : Coulage de mélange dans les boites pétri après la dissolution de MC dans la bain marie	47
Figure 22 :Aspect de boîte Témoin	48
Figure 23 : L'incubation de la souche fongique.....	48
Figure 24 : La mesure des deux diamètres A et B	49
Figure 25 : Ensemencement de la suspension bactérien sur la gélose	49

Figure 26: Aspect macroscopique d' <i>Ascospaera apis</i> ; A : Les colonies d' <i>Ascospaera Apis</i> sont blanches ; B : aspect macroscopique d' <i>Ascospaera apis</i> après la formation des kystes	51
Figure 27: Aspect microscopique d' <i>Ascospaera apis</i> (Gr X 40)	52
Figure 28 : Aspect macroscopique des colonies de <i>Paenibacillus larvae</i> sur le milieu MYPGP. Couleur beige	52
Figure 29: Aspect microscopique de <i>Paenibacillus larvae</i> après la coloration de Gram, grossissement X100. Bactéries Gram positif forme bacille	53
Figure 30: Résultat négative de test catalase de <i>Paenibacillus larvae</i>	53
Figure 31: Résultat négative de test oxydase de <i>Paenibacillus larvae</i> .	54

Listes des tableaux

Tableau 1: Résultats de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs	54
Tableau 2: les résultats du développement du champignon <i>d'Ascosphe</i> <i>apis</i>	56
Tableau 3 : les résultats du développement de la bactérie <i>Paenibacillus</i> <i>larve</i>	80

Listes des abréviations

LI : Liquide Ionique.

PIL : Liquide Ionique Protique

Td : Température De Décomposition

Dm : Dynamique Moléculaire

CPL:Chromatographie Sur Phase Liquide

ODS : Octadecyl Silane

GC : Chromatographie En Phase Gazeuse

RTIL : Liquide Ionique À Température Ambiante

[Etnh3][NO3] : Nitrate D'éthylammonium

[MIMM][Cl] : 1,3-Chlorure De Diméthylimidazolium

[BMIM][Cl] :1-Butyl-3-Chlorure De Méthylimidazolium

COV : Composés Organiques Volatils

MDO : MaladieÀ Déclaration Obligatoire

P-Larvae : *Paenibacillus Larvae*

LMR : LimiteMaximale De Résidus

S-Apis:*SpiroplasmaApis*

S-Melliferum: *SpiroplasmaMelliferum*

Introduction

Introduction

Les liquides ioniques (LI) sont des sels composés d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique, qui se trouvent à l'état liquide à des températures inférieures à 100 °C. Les LI sont caractérisés par des propriétés physico-chimiques uniques telles qu'une grande stabilité thermique, une faible combustibilité, pression de vapeur négligeable, et des propriétés de solvation favorables pour une gamme de composés polaires et non polaires (**Florio *et al*, 2019**). Les liquides ioniques (LI) sont remarquables pour leurs propriétés et leurs applications dans de nombreux domaines scientifiques (**Tantray *et al*, 2022**).

Les insectes en général et les *Apoïdes* en particulier, ont une grande valeur écologique et économique car ils ont une influence positive sur la production agro-alimentaire. Dans de nombreuses espèces de plantes cultivées, l'abeille domestique (*Apis mellifera*) semble être le principal insecte pollinisateur. De nombreuses techniques sont actuellement développées portant sur la conservation des habitats naturels des abeilles pour maintenir leurs populations, en conséquent, pour bénéficier de leurs services de pollinisation (**khalifa *et al*, 2021**).

L'ascosphérose est une maladie causée par le champignon *Ascosphaera Apis* qui, lorsqu'il se reproduit et sporule dans les larves d'abeilles mellifères (*Apis mellifera*), provoque leur momification (momies noires et blanches), réduit la taille de la population de leurs colonies et, dans certaines régions, peut entraîner des pertes élevées de production de miel. En présence d'*A. Apis*. La demande de miel biologique pour l'exportation a récemment augmenté, d'où l'option de la lutte biologique et naturels. (**Medina *et al*, 2022**).

D'autres maladies du couvain tel que *Paenibacillus larvae* un agent causal de la loque américaine qui est largement présent dans les colonies d'abeilles dans le monde entier. La loque américaine provoque une mortalité des colonies d'abeille. Cette maladie peut entraîner une diminution des populations d'abeilles, par conséquent, une baisse de la production de miel ou de sous-produits apicoles. Il est donc important de déterminer ces agents pathogènes et lutter contre ses maladies par l'utilisation des produits naturels afin d'éliminer les inquiétudes liées à l'utilisation massive d'antibiotiques est un besoin urgent pour la prévention et le traitement de la loque américaine (**Ye *et al*, 2022**).

Le présent travail se concentre sur l'isolement et l'identification macroscopique et microscopique des agents pathogènes affectant l'abeille domestique *Apis mellifera* ; il s'agit

d'un champignon *Ascospheara Apis* et d'une bactérie *Paenibacillus larvae*. Une deuxième partie de cette étude est consacrée pour l'évaluation de profil de toxicité de sept LI envers ces deux agents pathogènes. Nous avons divisé ce document en deux parties, la première porte sur une étude bibliographique et une deuxième partie dont nous avons détaillé la méthodologie suivie pour la réalisation de cette étude ainsi que les résultats obtenus avec leurs discussions.

Première partie :
Synthèse bibliographique

Chapitre 01 :

Les liquides ioniques

1. Définition

L'expression "liquides ioniques" (de l'anglais "Room Temperature Ionic Liquids") se rapporte à des composés qui ont des températures de fusion proches ou au-dessous de la température ambiante et qui sont uniquement constitués d'ions. Une propriété essentielle des liquides ioniques, comme pour les sels fondus, est que la gamme liquide de ces fluides est très étendue allant parfois jusqu'à 573 K (**Brennecke *et al*, 2001**).

Sont une forme de sels fondus organiques ou inorganiques constitués d'ions positifs et négatifs. Il y a eu plusieurs tentatives de leur utilisation dans l'industrie. Ces substances peuvent être rejetées par les sites industriels dans l'eau et les sols, provoquant ainsi une contamination. Les processus chimiques les plus importants affectant le comportement des cations liquides ioniques dans les sols sont liés à leur transport (**Studzińska *et al*, 2009**).

Un liquide ionique (IL) contenant un groupe fonctionnel 3-chloro-2-hydroxypropyle 1-(3-chloro-2-hydroxypropyl) -3-méthyl chlorure d'imidazolium a été synthétisé par la réaction de N-méthyl imidazole, d'acide chlorhydrique et d'épichlorhydrine. Le liquide ionique a montré une conductivité et une stabilité à la chaleur raisonnablement élevées jusqu'à 230°C. Ses structures ont été caractérisées par les spectres FT-IR, RMN 1H et RMN 13C. Les caractéristiques physiques du liquide ionique, telles que la conductivité et les capacités de solvation ont été étudiées. En raison de sa polarité élevée, l'IL est capable de dissoudre de nombreux sels inorganiques, et en raison d'un microenvironnement riche en hydroxyle, il est capable de dissoudre la cellulose jusqu'à 10 (% en poids).

Les LIs peuvent être utilisés pour synthétiser d'autres IL ou polyélectrolyte. Les liquides ioniques ont des propriétés thermophysiques et chimiques qui peuvent convenir au transfert de chaleur et au stockage à court terme de la chaleur dans les centrales électriques utilisant des capteurs solaires paraboliques (**Madau, 2021**).

Les propriétés thermiques importantes pour les applications de transfert de chaleur sont le point de fusion, le point d'ébullition, la plage de liquides, la capacité thermique, la chaleur de fusion, la pression de vapeur et la conductivité thermique. D'autres propriétés nécessaires pour évaluer l'utilité des liquides ioniques sont la densité, la viscosité et la compatibilité chimique avec certains métaux. Trois liquides ioniques ont été choisis pour l'étude en fonction de leur gamme de propriétés de solvant (**Valkenburg *et al*, 2005**).

2. Histoire des liquides ioniques

Le domaine des liquides ioniques a commencé en 1914 avec une observation de Paul Walden qui a rapporté les propriétés physiques du nitrate d'éthyl ammonium ($[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$; T_f 13–14 °C), qui a été formé par la neutralisation de l'éthylamine avec de l'acide nitrique concentré. C'était aussi le premier exemple d'un liquide ionique protique (PIL) (**Greaves, 2008; Greaves et Drummond, 2015**), qui allait devenir plus tard une sous-classe importante de liquides ioniques après avoir été redécouvert par Hiraoyuki Ohno en **2000**. L'intérêt de Walden pour ces sels fondus était la relation entre leur taille moléculaire et leur conductivité. Malheureusement, à part une brève mention dans une étude du parachor de certains sels fondus en 1927 (**Sugden et Wilkins, 1929**), le potentiel de cette percée est longtemps passé inaperçu.

Après 40 ans plus tard, un autre groupe a indépendamment reconnu les avantages potentiels de l'abaissement des points de fusion des sels fondus avec lesquels ils travaillaient. Hurley et Weir mélangeaient des halogénures de 1-alkylpyridinium avec de «vrais sels inorganiques», tels que des halogénures métalliques pour créer des solutions à partir desquelles les métaux pouvaient être galvanisés. Ils ont découvert que le mélange bromure de 1-éthylpyridinium-chlorure d'aluminium ($[\text{C}_2\text{py}] \text{Br-AlCl}_3$) 2:1 M était liquide à température ambiante. Ils ont créé un diagramme de phases pour ce système, contenant deux eutectiques aux rapports molaires 1: 2 (45 °C) et 2: 1 (– 40 °C) et un maximum au rapport molaire 1: 1 (88 °C), qui ils ont attribué à la formation d'espèces de bromochloroaluminate dans la masse fondue. L'électrodéposition des métaux reste une partie importante de la recherche sur les liquides ioniques (**Zhang et Etzold, 2016**).

Dans les années 1980, l'intérêt pour les liquides ioniques a commencé à se répandre lentement, avec l'arrivée de nouveaux chercheurs, tels que Ken Seddon et moi-même, qui n'avions jamais travaillé avec des sels fondus à haute température. En outre, l'éventail des enquêtes a commencé à s'élargir. $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$ est réapparu dans la littérature en 1981, dans une courte note d'Evans et al. Sur la thermodynamique de ses solutions de krypton, de méthane, d'éthane et de n-butane et en particulier la « liaison hydrophobe » (**Evans et al, 1981**).

Il est intéressant de voir que dans cet article, les auteurs ont noté que $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$ avait le potentiel d'être utilisé comme solvant non aqueux pour les systèmes biochimiques et l'importance de son réseau de liaisons hydrogène dans le contrôle de ses propriétés de solvant.

Ce groupe a ensuite étudié l'activité de la phosphatase alcaline dans des mélanges eau-[EtNH₃] [NO₃] et a découvert qu'à des concentrations plus faibles, [EtNH₃] [NO₃] avait un effet bénéfique sur l'activité de l'enzyme mais qu'à 80 % [EtNH₃] [NO₃] (v/v), il était inactif (**Magnuson et al, 1984**).

Une autre contribution de Wilkes sur les liquides ioniques à base de 1-éthyl-3-méthylimidazolium stables à l'air et à l'eau en 1992 est considérée par la plupart comme inaugurant une nouvelle phase dans le développement des liquides ioniques (**Wilkes et Zaworotk, 1992**), même si l'existence de ces liquides ioniques liquides avaient été prédits précédemment (**Cooper et Angell, 1983**) et d'autres liquides ioniques stables à l'air et à l'humidité avaient été utilisés ailleurs (**Poole et al, 1989**).

La stabilité revendiquée de ceux-ci, tant thermique qu'hydrolytique, s'est avérée plus tard quelque peu exagérée. Malgré cela, ces articles semblent avoir initié une période de croissance du nombre et de la gamme de liquides ioniques à avoir été fabriqués, par exemple l'introduction de l'ion [NTf₂] – (**Bonhote et al, 1996**), Les liquides ioniques à base de phosphonium sont également devenus une importante sous-classe de liquides ioniques (**Fraser et MacFarlane, 2009**).Également à peu près à cette époque, Jim Davis a introduit le terme liquide ionique spécifique à une tâche (**Visser et al, 2001**).

Ces liquides ioniques différaient du concept de liquides ioniques en tant que «solvants de conception» (**Freemantle, 1998**).Ces liquides ioniques ont été étudiés pour leur potentiel pour une large gamme d'applications. En 1999, Joan Brennecke a suscité beaucoup d'enthousiasme lorsqu'elle a déclaré combiner des liquides ioniques avec du CO₂ supercritique pour former un système biphasique pour les séparations (**Blanchard et al, 1999**) Cela a conduit à de nombreux travaux sur la solubilité du CO₂ et d'autres gaz dans les liquides ioniques et éventuellement à leur application possible dans la capture du carbone (**Zeng et al, 2017**).

Bien sûr, la capacité des liquides ioniques à agir comme agents de capture du CO₂ peut être combinée avec leur capacité à être d'excellents solvants pour la synthèse et la catalyse pour la conversion du CO₂ en produits de plus grande valeur (**Contreras, 2016**).Les liquides ioniques ont également été utilisés pour la valorisation électrochimique du CO₂ (**Alvarez et al, 2015**). Cette dernière approche est un exemple d'un intérêt plus large pour l'utilisation de liquides ioniques pour l'électro catalyse (**Zhang et al, 2016**).En 2013,

(**Matthew *et al*, 2013**) ont utilisé SFA avec [C4C1im] [NTf2] pour mesurer les forces d'attraction entre les surfaces d'or et de mica s'étendant bien au-delà de la stratification de surface mesurée, jusqu'à 35 nm.

Ils ont utilisé ces résultats pour affirmer que les liquides ioniques doivent être considérés comme des électrolytes dilués, la grande majorité des ions étant non dissociés et ne contribuant donc pas au blindage électrostatique des électrodes. Cela a conduit à une controverse immédiate (**Perkin *et al*, 2013**). Bien que les résultats expérimentaux ne fassent aucun doute, l'explication de ces confirmations et des confirmations ultérieures reste un sujet brûlant (**Gebbie *et al*, 2017**).

3. Structure des liquides ioniques

Les liquides ioniques sont des sels organiques liquides se différenciant de l'ensemble des sels fondus par une température de fusion inférieure à 100°C (arbitrairement fixée en référence à la température d'ébullition de l'eau) mais un grand nombre d'entre eux sont liquides à température ambiante, appelée RTIL's (« room temperature ionic liquids ») (**Chowdhury *et al*, 2007**). Ces solvants sont formés par l'association de cations organiques et d'anions; avec des variations presque infinies de structures aussi bien au niveau des anions que des cations. Parmi les cations les plus étudiés, on peut citer les ammoniums quaternaires et des composés aromatiques polycycliques tels que les noyaux imidazolium et pyrrolidinium, tandis que les cations alkylpyridinium, alkylphosphonium ou alkylsulfonium sont moins fréquemment rencontrés (**Figure1**).

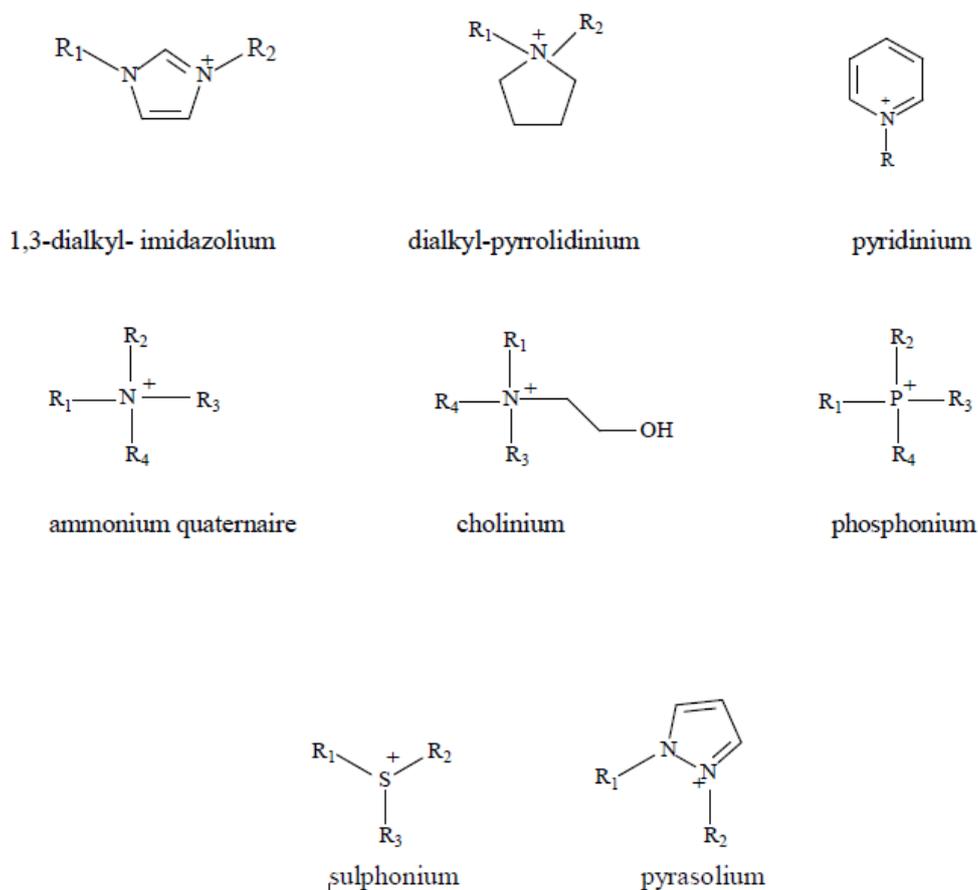


Figure 1 : Structure chimique des principaux cations LI rencontrés dans la littérature (Chowdhury *et al*, 2007).

Les contre ions les plus couramment utilisés sont soit des anions inorganiques tels que BF₄⁻, PF₆⁻, Cl⁻, NO₃⁻, AlCl₄⁻, SbF₆⁻ - etc...soient des anions organiques (CF₃SO₃⁻, (CF₃SO₂)₂N⁻, CF₃CO₂⁻ et CH₃CO₂⁻ - etc...). Les anions tétrafluoroborate (BF₄⁻) et hexafluorophosphate (PF₆⁻) sont très utilisés en chimie organique ou organométallique car ils confèrent une solubilité recherchée aux espèces ioniques qui sont à la base de très nombreux sels liquides.

Les liquides ioniques à base d'imidazolium (**Figures 2 et 3**) ont de fortes stabilités thermiques (> 400°C) et de faibles points de fusion, qui sont dues principalement à l'inefficacité de l'arrangement résultant du désordre de la position des cations dans leur structure cristalline (Chowdhury *et al*, 2007).

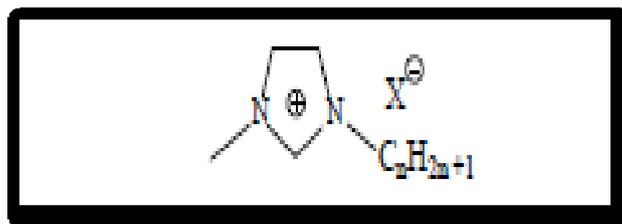


Figure 2: Structure des liquides ioniques à motif 1-alkyl-3-méthylimidazolium (Chowdhury *et al*, 2007).

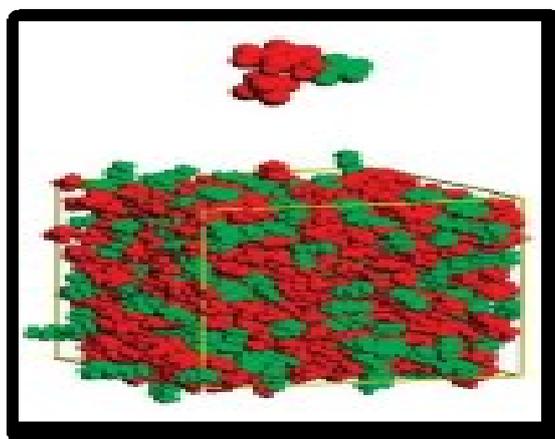


Figure 3: Représentation du liquide ionique 1-hexyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate. Les zones en rouge représentent les zones chargées (cation imidazolium et anion PF₆⁻) et celle en vert la chaîne latérale hexyl apolaire (Chowdhury *et al*, 2007).

4. La synthèse des liquides ioniques

La synthèse de liquides ioniques est simple et effectuée en deux étapes :

- Réaction de quaternisation du noyau imidazole.
- Réaction d'échange de l'anion.

Comme le nombre de combinaisons cation/anion est presque infini, nous avons considéré dans cette partie bibliographique un petit rôle en se limitant principalement à une description générale de la synthèse des sels d'imidazolium. En général, l'échange d'anions et la réaction de quaternisation par chaînes alkyle ont été étudiés. De nombreux articles décrivent la synthèse de liquides ioniques (Wilkes *et al*, 1992).

4.1. Réaction de quaternisation du noyau imidazole

De nombreux procédés de synthèse de liquides ioniques imidazolium à chaînes alkyle courtes ou longues contenant des anions halogénés ont été rapportés (**Livi en 2010**). L'imidazole subit une étape de déprotonation avec du méthoxyde de sodium, puis réagit avec un anion halogénure fonctionnalisé avec des chaînes alkyles. Les deux réactions sont effectuées en milieu solvant (acétonitrile, tétrahydrofurane, etc. ...) à la température de reflux et pour une durée de réaction de plusieurs heures à plusieurs jours, sous atmosphère inerte.

La nature chimique du groupe R_{1,2} permet d'adapter les LIs au milieu organique. Par exemple, des chaînes perfluorées peuvent être introduites (**figure 04**)

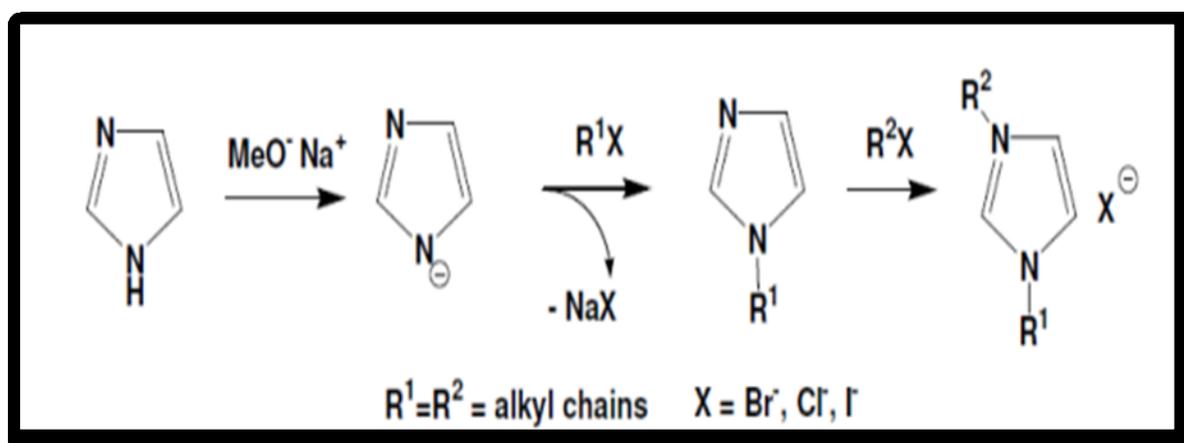


Figure 4: Synthèse de sels d'imidazolium (**Marcilla et al, 2004**).

4.2. Échange anionique

L'échange d'anions est également possible, en utilisant des acides de Lewis ou des sels organiques (sels de sodium) ou par des réactions de métathèse. Quelles que soient les méthodes utilisées, les rendements de réaction sont excellents. Le principal inconvénient de ces méthodes est qu'elles nécessitent une étape de purification qui est importante pour éliminer toutes traces d'impuretés dues à un échange incomplet (**Lin et al, 2005**).

Les anions couramment introduits après échange sont les suivants : NO₃⁻, AlCl₄⁻, BF₄PF₆⁻, CF₃SO₃⁻, (CF₃SO₂)₂⁻ ou CF₃CO₂⁻. Les figures suivantes illustrent les deux voies possibles pour effectuer une réaction d'échange avec des acides de Lewis ou des sels organiques d'un sel d'imidazolium, par exemple (**figure 05 et 06**).

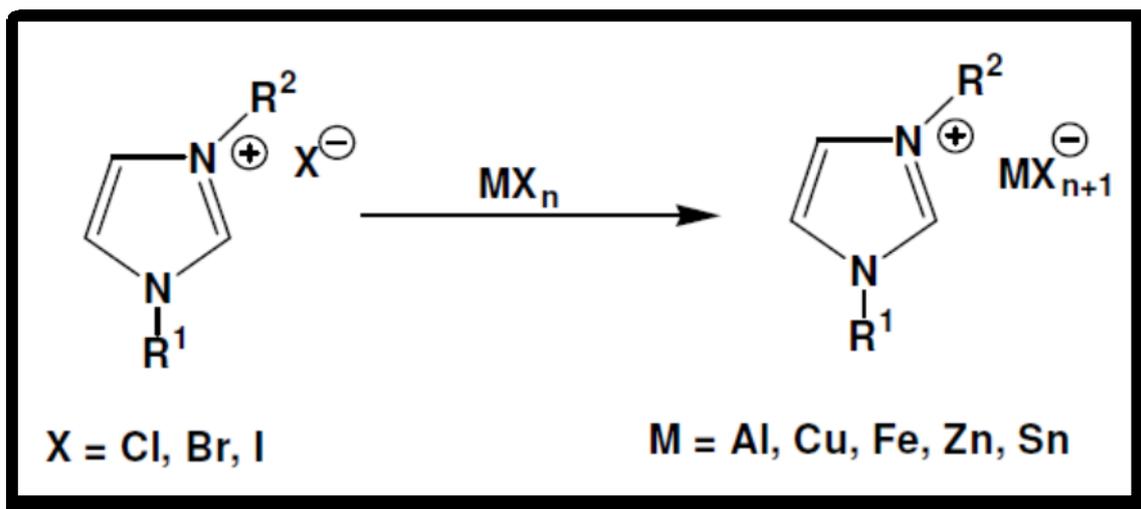


Figure 5: Exemple d'échange anionique avec des acides de Lewis

(Marcilla *et al*, 2004).

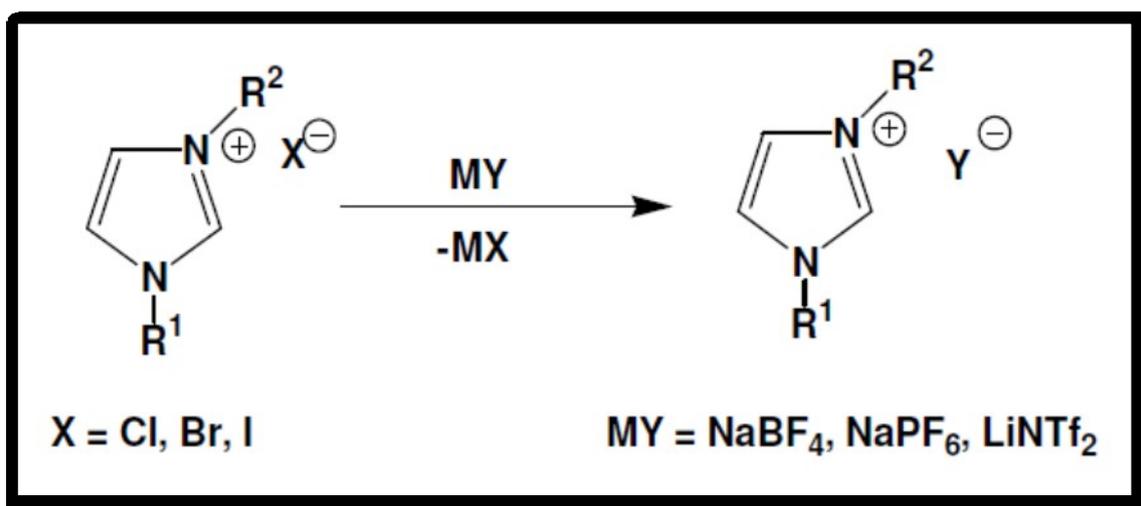


Figure 6: Exemple d'échange anionique avec des sels organiques (Lin *et al*, 2005).

5. Propriétés physiques chimiques des liquides ioniques

En général, les liquides ioniques sont thermiquement stables, ininflammables, conducteurs et à peine présentent une pression de vapeur (Billard *et al*, 2020). En raison de leur large éventail d'applications, les propriétés physico-chimiques les propriétés des liquides ioniques peuvent être ajustées en modulant leur structure moléculaire (Coleman *et al*, 2010).

5.1. Point de fusion

Les critères clés pour les liquides ioniques sont le point de fusion (T_m), la température de transition vitreuse (T_g), et la température de décomposition (T_d) qui dépendent d'un

équilibre entre la structure ionique symétrie, flexibilité de la chaîne et accessibilité des charges. A la pression atmosphérique normale, les liquides ioniques dans la plage de température 200-300 °C existent à l'état liquide (**Greaves *et al*,2007**) ; au lieu de point de fusion, la plupart des liquides ioniques présentent une température de transition vitreuse.

De plus, certains liquides ioniques à température ambiante tels que le tétrafluoroborate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium, [C2mim] [BF₄], en dessous du point de fusion, existe sous forme de liquide surfondu (**Nishida *et al*,2003**). Le point de fusion des liquides ioniques est différent des sels typiques. Par exemple, le chlorure de sodium (Na Cl) et le chlorure de potassium (KCl) a des points de fusion respectifs de 801 et 772 °C par rapport au chlorure, Cl⁻ liquides ioniques à base d'ions avec des cations organiques appropriés comme le 1,3-chlorure de diméthylimidazolium, [MIMM][Cl] (point de fusion : 125 °C) et 1-butyl-3-chlorure de méthylimidazolium, [BMIM][Cl] (point de fusion : 65 °C). Dans le cas de les sels de NaCl et de KCl, les deux ions (cation et anion) sont petits, sphériques et ont étroitementgéométrie compactée, qui se traduit par des forces coulombiennes extrêmement fortes, ont par conséquent une magnitude élevée du point de fusion.

Au contraire, les liquides ioniques avec l'ion Cl attaché à de grandes et les contre ions organiques asymétriques (cation) ont une faible énergie de réseau, ce qui entraîne une faible fusion magnitude ponctuelle (**Wasserscheid *et al*, 2000**). De même, les liquides ioniques protéiques avec des sels d'alkylammonium ont une point de fusion > 100 °C. Cependant, l'incorporation d'acides carboxyliques au cation alkylammonium et la plupart des sels avec un cation imidazolium ont une amplitude de point de fusion très faible (**Greaves et Drummond, 2008**).

5.2. Viscosité

La viscosité des liquides ioniques à base de cations ammonium quaternaire est réduite lorsqu'une des chaînes alkyles est remplacée par une chaîne alcoxy (**Zhou *et al*, 2005**). Une image microscopique du rôle joué par la fonction éther dans la diminution de la viscosité des liquides ioniques d'ammonium quaternaire est fournie ici par des simulations de dynamique moléculaire (DM). Un modèle pour le liquide ionique-éthyl-N, N-diméthyl-N-(2-méthoxyéthyl) ammonium bis (trifluorométhanesulfonyl) imide, MOENM2E TFSI, est comparé à son homologue tétraalkylammonium. Le dérivé alcoxy a une viscosité plus faible, des coefficients de diffusion ionique plus élevés et une conductivité plus élevée que le système tétra alkyle à la même densité et à la même température. Une signature claire de la

fonction éther sur la structure liquide est observée dans les corrélations cation-cation, mais pas dans les corrélations anion-anion ou anion-cation.

Dans les liquides ioniques alkyle et alcoxy, il y a agrégation de longues chaînes de cations voisins dans des structures de type micelle. Les simulations MD indiquent que l'assemblage moins efficace entre les chaînes alcoxy plus flexibles, par rapport aux chaînes alkyle, est la raison structurelle de la mobilité ionique plus élevée dans MOENM2E TFSI (**Zhou et al, 2005**).

5.3. Conductivité

Les liquides ioniques possèdent des conductivités ioniques meilleures que les systèmes solvants/électrolyte organiques (jusqu'à $\sim 10 \text{ mS.cm}^{-1}$). A températures élevées vers 200°C , une conductivité de 100 mS.cm^{-1} peut être atteinte pour quelques systèmes. La conductivité d'une espèce dépend non seulement du nombre de porteurs de charges (ions) mais aussi de leurs mobilités (**Endres et al, 2006**). Les ions volumineux constituant des liquides ioniques réduisent la mobilité de l'ion, ce qui amène par suite à la diminution des conductivités. La conductivité des liquides ioniques est inversement proportionnelle à leur viscosité. L'augmentation de température augmente la conductivité et diminue la viscosité. En outre, la formation des paires d'ions et/ou l'agrégation des ions entraînent la diminution de la conductivité (**Endres et al, 2006**).

La représentation de Walden permet de détecter non seulement l'existence de différentes formes d'association des cations avec les anions, mais aussi de mettre en évidence la présence des mobilités ioniques élevées (**Yoshizawa et al, 2006**).

5.4. Densité

La grande majorité des liquides ioniques possèdent une densité plus importante que l'eau et comprise entre 1 et $1,6 \text{ g.cm}^{-3}$. Il a été montré que la densité diminuait avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle pour un cation de type imidazolium (**Dzyuba et Bartsch, 2002**) ainsi que pour les sels de type ammonium ou sulfonium. Généralement, la densité diminue dans l'ordre suivant: pyridinium > imidazolium > ammonium > piperidinium. La densité est également affectée par l'anion et devient plus lourde par l'introduction d'éléments lourds tels que les chaînes fluor alkyles (**Chiappe et al, 2005**).

5.5. Polarités

Les polarités d'une large gamme de liquides ioniques ont été déterminées à l'aide des échelles de polarité empiriques de Kamlet – Taft α , β et π^* , avec le jeu de colorants Reichardt Dyer, N, N-diéthyl-4-nitroaniline et 4-nitroaniline. Ceux-ci ont été comparés aux mesures de ces paramètres avec différents sembles de colorants et à différentes échelles de polarité. Les résultats soulignent l'importance de reconnaître le rôle que joue la nature du soluté dans la détermination de ces échelles. Il est particulièrement à noter que les échelles de polarité basées sur des solutés chargés peuvent donner des valeurs très différentes pour la polarité des liquides ioniques par rapport à celles basées sur des sondes neutres. Enfin, les effets des impuretés courantes dans les liquides ioniques sont rapportés (**Ibrani et al,2011**).

5.6. Stabilité thermique

La température de décomposition détermine la température maximale d'utilisation de LI. Les cations imidazolium ont, généralement, des températures de décompositions plus grandes que celles des cations ammonium. Ce qui permet leur utilisation à des températures supérieures à 250 °C et dans certains cas supérieurs à 400°C La stabilité thermique d'un LI constitué d'un cation imidazolium dépend de la structure de l'anion. Ainsi, les anions qui engendrent les plus faibles interactions intermoléculaires induisent les températures de décomposition les plus élevées, avec l'ordre : PF₆⁻ > NTf₂⁻ > BF₄⁻ > I⁻ > Br⁻ > Cl⁻ (**Huddleston et al, 2001**).

6. Domaines d'applications des liquides ioniques

Les liquides ioniques sont des composés chimiques remarquables, qui trouvent des applications dans de nombreux domaines de la science moderne. En raison de leur nature hautement accordable et de leurs propriétés exceptionnelles, les liquides ioniques sont devenus des acteurs incontournables dans les domaines de la synthèse et de la catalyse, de l'extraction, de l'électrochimie, de l'analyse, de la biotechnologie, etc.... (**Egorova et al, 2017**).

6.1. Application en chimie analytique

Liquides ioniques à température ambiante (IL) sont de plus en plus reconnus comme de nouveaux solvants en chimie. Leur application en chimie analytique, en particulier dans la séparation des analytes, est méritée car les LIs ont des propriétés uniques, telles qu'une pression de vapeur négligeable, une bonne stabilité thermique, une viscosité et une miscibilité

réglables avec l'eau et les solvants organiques, ainsi qu'une bonne rétractibilité pour divers composés organiques et ions métalliques (Liu *et al*, 2005).

6.2. Application pour l'extraction

Ils sont proposés pour les extractions à partir de la solution aqueuse comme une solution de rechange aux solvants ordinaires tels que des techniques de séparation et de nouvelles propres (Huddleston *et al*, 1998). Les avantages résideraient dans la plus grande facilité de séparation des extraits, en l'absence d'émissions de vapeur et dans la haute réutilisabilité des liquides ioniques. Leur utilisation permet d'isoler les produits obtenus par synthèse par distillation simple, sans retirer le catalyseur, puis en permettant la réutilisation immédiate (Huddleston *et al*, 1998).

6.3. Application en électrochimie

Application des liquides ioniques (IL) dans divers domaines de l'électrochimie (par exemple, développement de condensateurs électrochimiques à double couche super condensateurs hybrides. Piles à combustible à basse température, métal-air (c'est-à-dire Mg et Zn primaires et secondaires), les batteries Li-ion augmentent rapidement. En raison de leur conductivité protonique élevée, certains des IL protéiques ont été utilisés comme membranes conductrices de protons pour les piles à combustible à basse et moyenne température. Certains LIs ont été utilisés pour la réduction électrochimique ou la réduction partielle du dioxyde de carbone ou du carbone monoxyde et eau... (Armand *et al*, 2011).

7. Toxicité des liquides ionique

Les liquides ioniques ont été revendus comme un substitut plus écologique et sans danger pour l'environnement pour les solvants organiques volatils et inflammables. Cependant, leur miscibilité/solubilité dans l'eau constituer une menace potentielle pour l'écosystème aquatique. Des études ont trouvé une relation forte entre la structure chimique des liquides ioniques et leur toxicité. Fragment cationique et la longueur de la chaîne alkyle influence significativement leur niveau de toxicité alors qu'un anion est un secondaire contributeur à la toxicité (Sivapragasam *et al*, 2020).

Les liquides ioniques contenant du phosphonium et de l'imidazolium sont hautement toxiques, tandis que les liquides ioniques les moins toxiques comprennent des ions thiophénium et pyrrolidinium. Ainsi, basée sur les cations, la toxicité des liquides ioniques est

la suivante : phosphoniumammonium >imidazolium >pyridinium >morpholinium >pyrrolidinium>thiophénium la réduction de la toxicité des liquides ioniques à base d'imidazolium a été observée par l'incorporation de atomes d'oxygène ou de chlore dans sa longue chaîne ou par remplacement de la chaîne alkyle paratome d'hydrogène (**Pawłowska et al, 2019**).

8. Liquides ioniques dans les techniques de séparation

L'intérêt croissant pour les liquides ioniques (LI) a entraîné une augmentation exponentielle de la production d'applications analytiques. Le potentiel des LI en chimie est lié à leurs propriétés uniques en tant que solvants non moléculaires : une pression de vapeur négligeable associée à une grande stabilité thermique (**Bendiab et al, 2014**). Les liquides ioniques ont trouvé des utilisations dans différentes sous-disciplines de la chimie analytique. Après avoir dressé un tableau rapide des propriétés physico-chimiques des LI sélectionnés, cette revue se concentre sur leur utilisation dans les techniques de séparation : chromatographie en phase gazeuse (GC), chromatographie liquide (LC) et méthodes électrophorétiques (**Liu et al, 2009**).

8.1. Extraction Liquide-Liquide

8.1.1. Extraction de Molécules Organiques

La large application des RTIL dans l'extraction de composés organique sa commencé vers 1998. Rogers et ses collègues ont déterminé le rapport de distribution de 12 dérivés benzéniques substitués entre [BMIM][PF₆] et l'eau. Le cloisonnement de ces les composés entre les deux phases dépendait à la fois la charge et l'hydrophobicité des solutés. (**Huddleston et al, 1998**) Séparation dépendante du pH d'un colorant indicateur, le thymol bleu, entre [C_nMIM] [PF₆] et l'eau a été démontré (**Figure 07**). Il a également été montré que le rapport de distribution du bleu de thymol entre [C_nMIM][PF₆] et l'eau augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle du cation IL (**Visser et al, 2000**). Nous mesuré les coefficients de partage pour 40 composés (dont acides organiques, bases, acides aminés, antioxydants, et composés neutres) à pH) 2, 5,1 et 10 entre [BMIM][PF₆] et l'eau (**Carda et al, 2003**). Coefficients de distribution pour la forme moléculaire des solutés dans le système IL/eau et dans un système 1-octanol/eau ont été comparés. Neutre les formes de composés ionisables ont montré une plus grande partition à la phase IL que leurs formes ionisées.

Triphasique systèmes heptane/IL/chloroforme et heptane/eau/li ont également été démontrés (Carda *et al*, 2003). En général, les acides aminés préfèrent résider dans une solution aqueuse solutions par opposition aux IL. [BMIM] [PF6] avec dicyclohexyl-18 couronne-6 a été utilisé pour extraire les acides aminés solutions aqueuse acide.

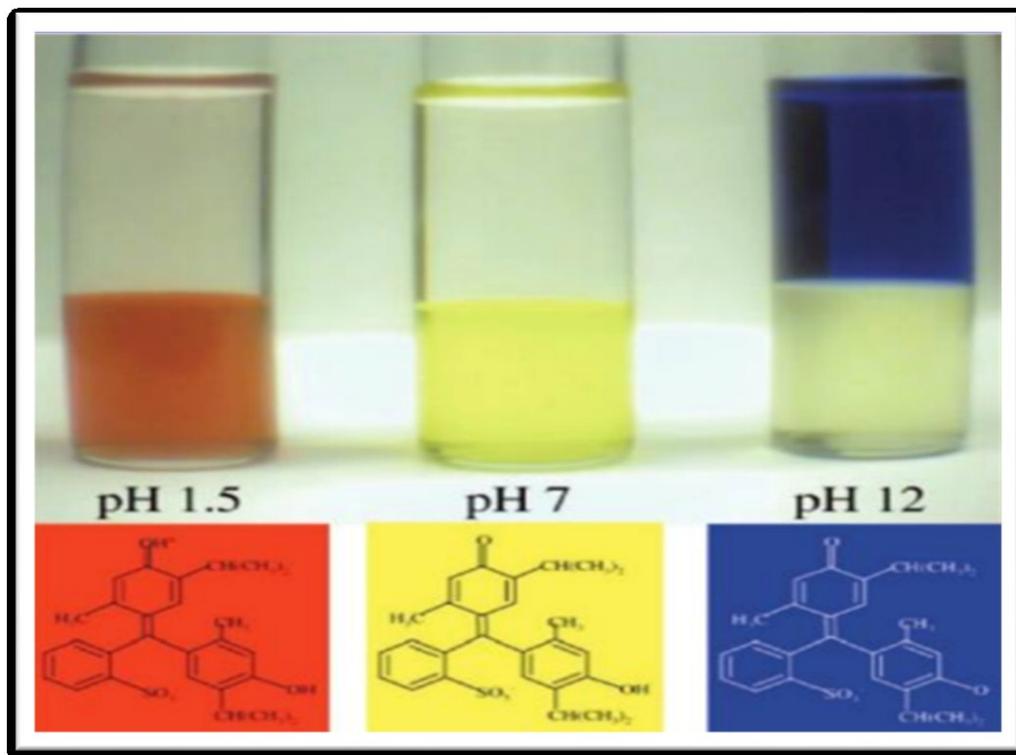


Figure 7:-Lorsque le pH de la solution aqueuse est de 1,5, le bleu de thymol est un zwitterion neutre (couleur rouge) et préfère la phase [BMIM][PF6] (couche inférieure) (Visser, 2000).

Lorsque le pH de la phase aqueuse est de 7, le bleu de thymol est sous forme monoanionique. Existence du colorant monoanionique jaune dans phase aqueuse était détectable (couche supérieure). Le colorant bleu d'anion préfère la phase aqueuse lorsque le pH de la phase aqueuse est de 12. (Visser, 2000)

8.1.2. Extraction liquide/liquide d'ions métalliques dans des liquides ioniques à température ambiante

La recherche de milieux de réaction plus respectueux de l'environnement a incité le développement d'un large éventail de systèmes alternatifs qui soutiendront les séparations diphasiques avec des solutions aqueuses sans l'utilisation de composés organiques volatils (COV). Nous avons commencé à utiliser des liquides ioniques à température ambiante (RTIL), en particulier l'hexafluorophosphate de 1-alkyl-3-méthylimidazolium

([Cnmim][PF6]), en remplacement des COV dans les séparations liquide/liquide des ions métalliques des solutions aqueuses (Visser *et al*, 2001).

Nous montrons ici que la séparation des ions métalliques dans ces nouveaux systèmes diphasiques est cohérente avec les séparations liquide/liquide traditionnelles : l'affinité des ions métalliques pour la phase hydrophobe nécessite la présence d'un extractant. Dans ce rapport, nous explorons l'application de composés organiques bien connus (1-(pyridylazo) -2-naphthol, PAN et (1-thiazolylazo) -2-naphthol, TAN) et inorganiques (CN⁻, OCN⁻, SCN⁻ et halogénures) extractant pour répartir une variété de cations métalliques entre [C4mim] [PF6] ou [C6mim][PF6] et une phase aqueuse. PAN et TAN montrent une extraction dépendante du pH de Cd²⁺, Co⁺ Ni²⁺ et Fe³⁺ où leur partition au RTIL augmente d'au moins 2 ordres de grandeur de pH 1 à 13. L'effet des halogénures sur la partition des complexes Hg²⁺ augmente F⁻ < Cl⁻ < Br⁻ < Je⁻. Les pseudos halogénures, en particulier SCN⁻, ont eu le plus grand effet sur l'amélioration de la partition de Hg²⁺ en RTIL, tandis que CN⁻ et OCN⁻ ont fourni peu d'avantages pour l'extraction de l'un des ions métalliques examinés (Visser *et al*, 2001).

8.2. Les liquides ioniques et la chromatographie

8.2.1. Chromatographie en phase gazeuse

Le caractère non volatil des liquides ioniques peut être mis en œuvre pour faire des phases stationnaires en CPG. De telles phases ont des propriétés originales : elles séparent les composés apolaires, tels que les alcanes linéaires présentés sur **la figure 08 A**, de la même façon qu'une phase stationnaire classique apolaire de CPG (polydiméthylsiloxane OV1 ou OV101, par exemple). Par contre, les molécules polaires sont très bien retenues et différenciées, comme ce que l'on obtient avec une phase classique polaire. **La figure 08 B** montre la séparation des alcools linéaires de C1 à C5 (Armstrong *et al*, 1999).

La CPG inverse est une bonne méthode d'étude des propriétés des liquides ioniques eux-mêmes : on prépare des colonnes capillaires imprégnées des différents liquides ioniques que l'on veut étudier. En observant les variations de rétention de solutés de polarités variées sur les différentes colonnes et à plusieurs températures, on peut en déduire des propriétés physico-chimiques des liquides ioniques.

Les travaux en cours montrent que les liquides ioniques qui contiennent des anions halogénures interagissent fortement (temps de rétention élevés) avec les solutés qui ont des propriétés donneur ou accepteur de protons. Les liquides ioniques à anions perfluorés sont

moins polaires et interagissent plus fortement avec les solutés apolaires (Anderson *et al*, 2003). Une autre idée est d'utiliser les liquides ioniques comme solvants pour faire des phases stationnaires de CPG.

Le [BMIM] Cl n'est liquide qu'au-delà de 65 °C, mais cette température est suffisamment basse pour faire de la CPG. Ce liquide ionique est capable de dissoudre la cyclodextrine, un dérivé du glucose ayant des propriétés de sélecteur chiral (Anderson *et al*, 2003).

Le [BMIM] Cl peut, à 80 °C, dissoudre jusqu'à 25 % en poids de cyclodextrine perméthylée. Cette solution a été utilisée pour préparer des colonnes capillaires chirales utilisables en CPG. Ces colonnes ont été capables de séparer les énantiomères de différents solutés chiraux en produisant des pics très fins. (Berthod *et al*, 2001).

Cela signifie que la cinétique de l'échange soluté phase stationnaire est très rapide, et que la colonne est très efficace (Berthod *et al*, 2001). Cependant, les colonnes préparées avec des phases classiques (polydiméthylsiloxanes) et le même sélecteur chiral sont capables de séparer davantage de paires d'énantiomères.

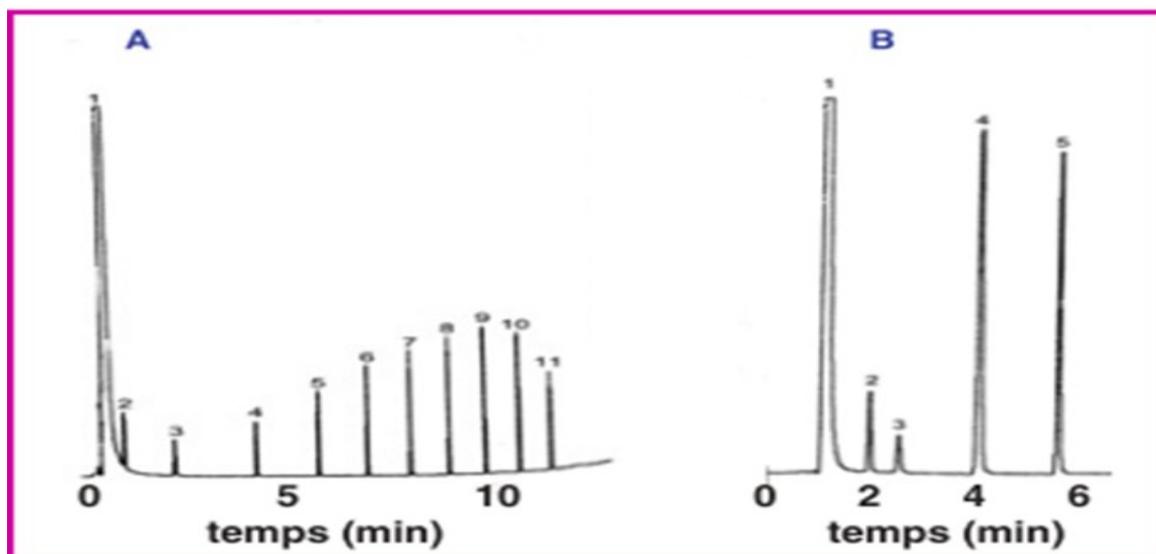


Figure 8: Chromatogrammes CPG obtenus sur une colonne capillaire de liquide ionique.

A : alcanes linéaires : 1- pic du solvant, 2- pentane, 3- hexane, 4- heptane, 5- octane, 6- nonane, 7- décane, 8- undécane, 9- dodécane, 10- tridécane, 11- tétradécane.

B : alcools linéaires : 1- pic du solvant, 2- méthanol, 3- éthanol, 4- propanol, 5- pentanol.
Colonne de 15 m, 200 µm de diamètre interne, imprégnation de liquide ionique triflate de

BMIM, épaisseur de film ~ 1 μm , gaz vecteur : hélium, 100 °C pendant 4 min, puis 10 °C/min de gradient en température, détecteur FID. (Armstrong *et al*, 1999).

8.2.2. Chromatographie en phase liquide

L'équipe de Poole a étudié les propriétés des nitrates et thiocyanates de différents tétraalkylammonium en CPL (Poole *et al*, 1986 ; Poole *et al*, 1989). Ils ont montré que ces liquides ioniques ont des propriétés marquées d'accepteur de protons et une très faible capacité de donneur de protons. Ils ont une bonne stabilité thermique et une faible tension de vapeur, mais leur viscosité est trop élevée. Il faut soit travailler à forte température, soit ajouter un co-solvant qui réduira la viscosité à un niveau acceptable en CPL. Malheureusement, ils ont également observé une dégradation rapide des colonnes de type ODS par ces sels.

La liaison –Si-O-chaîne alkyle semble se rompre facilement en présence de ces sels. Les cations contenant un (ionspyridiniums) ou plusieurs ammonium quaternaires (ions imidazoliums) sont capables de masquer les silanols résiduels des phases stationnaires à base de silice. Un tel masquage permet de séparer les molécules basiques et, en particulier, les amines en évitant les déformations de pics obtenues à cause des interactions avec les silanols résiduels. Des études sont en cours pour savoir s'il y a une différence claire entre ces résultats et ceux obtenus classiquement par addition d'amines n'absorbant pas dans l'UV (triéthylamine ou cyclo-hexylamine) (Poole *et al*, 1989).

9. Purification et pureté des LIs

La pureté des LIs est un paramètre important pour la plupart des applications car la présence d'impuretés peut gravement affecter les propriétés physico-chimiques des LIs. Comme les LIs sont très peu volatils, la purification par distillation n'est pas envisageable excepté dans des conditions sévères (Earle *et al*, 2006). A purification par chromatographie est également délicate dans la mesure où les LIs ont tendance à s'absorber sur les phases stationnaires (Stepnowski *et al*, 2006).

Par conséquent, un grand soin doit être apporté lors de la synthèse des LIs afin de limiter tant que possible les impuretés présentes dans le produit final notamment les traces d'eau, d'halogénures et d'imidazole de départ (Olivier *et al*, 2005). Il est possible de mesurer la quantité d'eau présente dans les LIs par dosage Karl Fischer, par spectroscopie infra-rouge, par spectroscopie UV ou par spectrométrie de masse (Cammarata *et al*, 2001).

La détection de traces d'halogénures est généralement réalisée par un test au nitrate d'argent mais ces impuretés peuvent être quantifiées par analyse élémentaire, par chromatographie ionique, ou par électrophorèse capillaire (**Billard *et al*, 2003**). La présence d'imidazole de départ peut être détectée par un test colorimétrique au chlorure de cuivre(II) (**Holbrey *et al*, 2001**).

Chapitre 02 :
Les agents
pathogène
qui touchent
l'abeille
domestique

L'abeille est un insecte social dont le rôle dans la pollinisation est d'une importance majeure pour l'agriculture : un tiers de la nourriture consommée dans le monde en 2005 dépendait de cette activité (**Gallai et al, 2009**). Avec les pertes de colonies, notamment hivernales, constatées depuis plus d'une bonne dizaine d'années, la maîtrise de la santé de l'abeille est devenue un véritable défi (**Gallai et al, 2009**). La présence sur le terrain de vétérinaires formés à la pathologie des abeilles peut être un atout majeur pour la filière apicole. Des facteurs environnementaux, des agents pathogènes chimiques et biologiques peuvent affecter la santé de l'abeille et des colonies (**Colin, 1999**).

L'abeille domestique, *Apis mellifera* est considérée comme un organisme essentiel au secteur agricole en raison de son rôle dans la pollinisation et la réduction de la pauvreté dans les zones rurales (**Bailey, 1968**). De nombreux ravageurs attaquent les colonies d'abeilles mellifères, causant de graves dommages et des pertes économiques. Ces ravageurs comprennent les acariens *Varroa*, les frelons *Vespa*, les teignes de la cire, les petits coléoptères des ruches et les mouches parasites (**Colin, 1999**). L'utilisation de méthodes chimiques pour lutter contre ces ravageurs a des effets négatifs sur les abeilles et contamine leurs produits, tandis que l'utilisation d'agents de lutte biologique est prometteuse et ne présente aucun danger grave (**Abou et al, 2019**).

1. Les parasites et envahisseurs

De nombreux parasites peuvent infester les abeilles et leurs colonies. Les parasites sont des acariens, des insectes, des protozoaires et des Fungi.

1.1. Varroa destructeur

La varroase est une parasitose de l'abeille adulte et de son couvain, due à un acarien parasite externe hématophage, *Varroa destructeur*. Elle est responsable d'une épizootie chez *Apis mellifera* depuis son transfert par l'abeille asiatique, *Apis cerana*, son hôte originel (**Colin et al, 1999**). Arrivé en France au début des années 1980, il est présent dans tous les ruchers de France (et du monde...), excepté dans quelques rares sanctuaires (Ile d'Ouessant). La varroase est une maladie grave de l'abeille pouvant entraîner des dégâts sévères dans les ruches et causer d'importantes pertes économiques. La gestion prophylactique de cette parasitose est un enjeu fondamental pour la santé des colonies d'abeilles (**Terrestrial en 2008**). En France, la varroase est une maladie à déclaration obligatoire (MDO) et malheureusement pas à traitement obligatoire.

1.1.1. L'agent causal

Varroa destructeur est un acarien mésostigmate de la famille des Varroidae. C'est un ectoparasite obligatoire (ne peut se développer que chez l'abeille) et phorétique (se déplace d'une colonie d'abeilles à une autre, transporté par les abeilles (**colin et al, 1999**). Dans les colonies, il provoque leur affaiblissement par augmentation du taux de mortalité des abeilles, diminution de la surface de couvain et des récoltes en miel et pollen. Les colonies deviennent plus sensibles à d'autres agents pathogènes (**Terrestrial, 2008**).

1.1.2. Traitement

Les différentes méthodes de lutte contre varroa sont :

- La lutte chimique traditionnelle en utilisant une molécule active toxique ou néfaste à varroa pour diminuer les populations.
- La lutte intégrée ou raisonnée qui combine souvent la lutte chimique avec des moyens biotechniques et biologiques (**Ghomari et al, 2014**).

1.2. Acarien de la trachée

En octobre 1984, l'acarien trachéal de l'abeille, *Acar Apis woodi*, a été trouvé en Floride (**Morse et al, 1978**). Bien qu'il ait été décrit pour la première fois par Rennie en 1921, l'acarien n'a été trouvé aux États-Unis qu'en 1984.

Rennie a décrit l'acarien des abeilles de l'île de Wight et l'a associé à la maladie de «l'île de Wight». Les symptômes de cette infestation ont été décrits comme "des abeilles rampant incapables de voler et avec des ailes décousues; on a dit que la diminution et la mortalité des colonies se produisaient rapidement, les colonies mourant en un mois." Il a été démontré plus tard que l'acarien trachéal n'était pas la cause de la maladie de "l'île de Wight" (**Bailey, 1964**), et des rapports ultérieurs indiquent qu'*Acar Apis woodi* n'est pas un ravageur des abeilles aussi grave qu'auparavant (**Bailey, 1968**).

En combinaison avec d'autres conditions défavorables cependant, de fortes infestations d'acariens peuvent entraîner une réduction de l'activité des abeilles. À l'exception de l'Australie, de la Nouvelle-Zélande, de la Scandinavie et du Canada, *Acar Apis woodi* a été trouvé partout où l'on trouve des abeilles *mellifères* (**Delfinado, 1963**). Aux États-Unis, il a été trouvé pour la première fois à Weslaco, Texas en juillet 1984, à New Iberia, Louisiane en

août 1984, et en Floride, Dakota du Nord, Dakota du Sud, New York et Nebraska en octobre 1984.

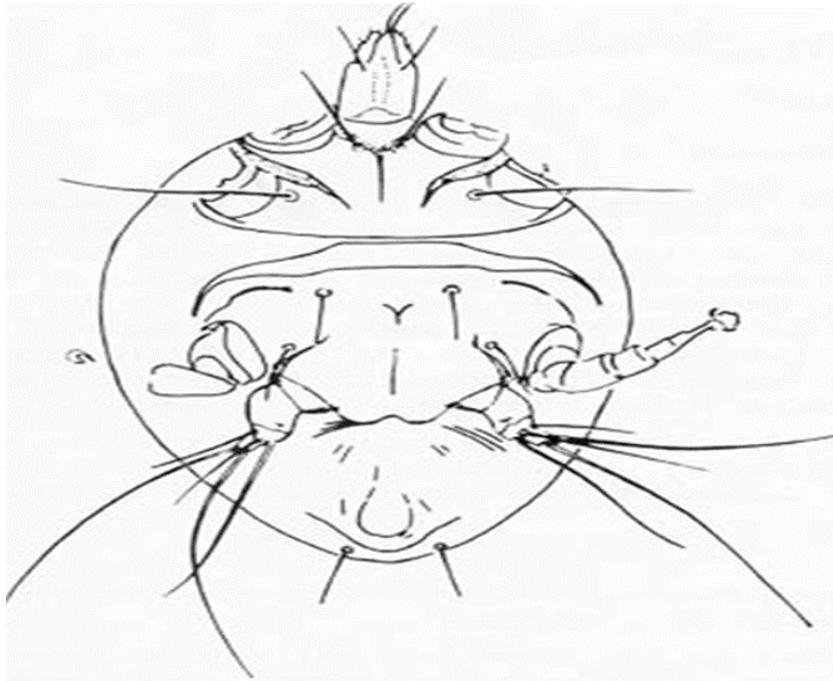


Figure 9: Acarien trachéal femelle adulte de l'abeille, Acar *Apis woodi* (Bailey, 1964)

1.3. Le petit coléoptère de la ruche

Le petit coléoptère de la ruche, *Aethinatumida* Murray (Coleoptera : Nitidulidae) est un parasite qui infeste les colonies d'abeilles mellifères originaire d'Afrique, au sud du Sahara (Burgett *et al*, 1983). Sous ces latitudes, on le trouve dans toutes les colonies grandes et petites, mais il ne fait de dégâts que dans les petites, il est apparu pour la première fois hors d'Afrique en 1996 aux Etats-Unis, en 2002 en Australie et en 2014 en Italie (Charrière *et al*, 2018). Cette propagation est probablement due à l'importation d'abeilles et de produits apicoles infestés (par exemple reines avec ses abeilles accompagnatrices).

Aux Etats-Unis et en Australie, même les colonies fortes peuvent périr en cas de forte infestation. Depuis leur apparition dans ces deux pays, leur population s'est fortement développée et ils occupent désormais de vastes territoires. L'infestation observée depuis 2014 dans le sud de l'Italie (Calabre et Sicile) reste jusqu'à 2018 confinée au sud de la péninsule italienne (Charrière *et al*, 2018). En Europe et en Suisse, les importations d'abeilles des régions infestées sont interdites pour prévenir une invasion.

Dès 2015, la Suisse a mis en place un réseau de détection précoce, le réseau Apinella. En cas d'observation de coléoptères suspects (adultes ou larves), congeler l'individu à -18°C pendant plusieurs heures et l'envoyer au Centre de recherche apicole. Ils s'accouplent dans la ruche (**Fig.10**). Les femelles pondent ensuite leurs œufs dans des fentes à l'abri des abeilles, mais aussi directement sur les rayons ou sous les opercules des cellules sous la forme de paquets caractéristiques. Après 2 à 3 jours, les larves sortent des œufs; ce sont elles qui sont responsables des dommages les plus importants causés dans la colonie. Elles se nourrissent de préférence de couvain, de pollen **Fig.10 (Charrière *et al*, 2008)**.

C'est notamment dans les stocks de cadres ou dans les locaux d'extraction souillés que la population de coléoptères peut se multiplier rapidement. En cas de forte infestation par les larves de coléoptère, l'organisation de colonies même fortes peut être bouleversée en peu de temps et les colonies peuvent ainsi être anéanties (**Charrière *et al*, 2008**).

Au terme de la phase de nourrissage, qui dure selon l'offre en nourriture et de la température entre 10 et 29 jours, les larves migrantes quittent la colonie pour s'enfouir dans le sol et effectuer leur métamorphose. Dans le cas où le sol à proximité immédiate de la ruche ne convient pas, les larves peuvent parcourir de longs trajets (> 50 m). Selon le type de sol, les larves creusent des chambres à environ 1 à 20 cm de profondeur pour effectuer leur métamorphose **Fig. 10 (Charrière, 2018)**.

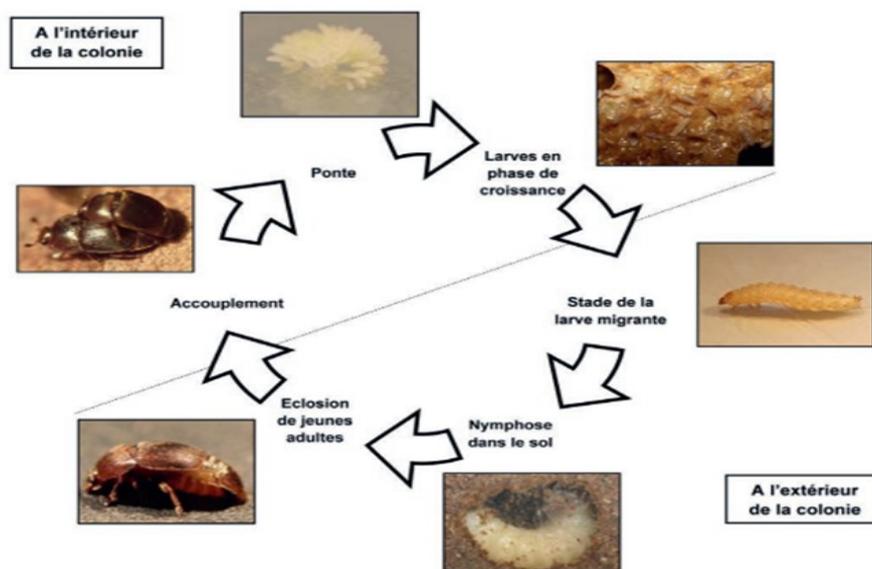


Figure 10: Le cycle de vie naturel du petit coléoptère de la ruche se déroule en partie à l'intérieur et en partie à l'extérieur de la colonie d'abeilles (**Charrière *et al*, 2008**).

1.3.1. Apocéphale boréal

Les colonies d'abeilles mellifères sont sujettes à de nombreux agents pathogènes et parasites. L'interaction entre plusieurs agents pathogènes et parasites est la cause proposée du syndrome d'effondrement des colonies (CCD), un syndrome caractérisé par des abeilles ouvrières abandonnant leur ruches (**Gallia et al, 2009**). Apocephalus borealis est un parasitoïde des hyménoptères originaire d'Amérique du Nord qui attaque également les abeilles domestiques introduites (*Apis mellifera*). Le parasitisme par cette espèce a été associé à des abeilles infestées qui s'enfuient de la ruche et meurent à l'extérieure (**Tihelka et al, 2021**).

Apocephalus borealis, une mouche phoridée originaire d'Amérique du Nord **la Fig.11** précédemment connue pour parasiter les bourdons et les guêpes cartonnières (**Otterstatter et al, 2002**) attaque également l'abeille domestique non indigène. Le genre Apocephalus est surtout connu pour les «mouches décapitantes» qui parasitent une variété d'espèces de fourmis (**Brown, 1997**). Apocephalus borealis appartient au sous-genre Mesophora, qui est un groupe qui contient des espèces qui attaquent des hôtes autres que les fourmis. Bien que les hôtes de la plupart des espèces du groupe Mesophora soient inconnus, les hôtes découverts précédemment comprennent une variété d'arthropodes, notamment des abeilles, des guêpes, des coléoptères et des araignées, mais pas les abeilles mellifères (**Brown, 1993**).

Les abeilles mellifères parasitées montrent un comportement d'abandon de ruche, quittant leurs ruches la nuit et mourant peu de temps après. En moyenne, sept jours plus tard, jusqu'à 13 larves de phorides émergent de chaque abeille morte et se nymphosent (**Core et al, 2012**). représente l'apocephalus borealis.



Figure 11: Mouche kombie femelle (*Apocephalus borealis*) (**Core et al, 2012**).

1.3.2. Tropilaelaps spp

Tropilaelaps est un ectoparasite qui ne survit pas longtemps sans couvain d'abeilles et ne peut pas voler par lui-même (**Efsa et al, 2013**). Sont des acariens ectoparasites des abeilles Apis en Asie. L'hôte d'origine des acariens Tropilaelaps est reconnu comme l'abeille géante, Apis dorsata, mais récemment, ils sont devenus un sérieux ravageur des abeilles domestiques, Apis mellifera, dans de nombreux pays asiatiques (**Anderson et Morgan, 2007**). L'infestation par les acariens Tropilaelaps est une maladie qui endommage le couvain et est soumise à déclaration obligatoire pour Apis mellifera (**Emmerich et al, 2021**). Un climat tropical ou subtropical est considéré comme un facteur majeur dans la prévalence de Tropilaelaps (**Sammataro et al, 2000**).

En Thaïlande, Tropilaelaps est considéré comme un parasite des abeilles plus problématique qu'un autre acarien, varroa (**Burgett et al, 1983; Buawangpong et al, 2015**) Tropilaelaps se reproduit rapidement et a un stade phorétique plus court que Varroa ; ainsi, ils peuvent supplanter les acariens Varroa lorsque les deux acariens sont présents (**Burgett et al, 1983 ; Ritter et al, 1988 ; Buawangpong et al, 2015**). Le parasitisme par les acariens peut entraîner la mortalité du couvain et le déclin des colonies (**Anderson et Morgan 2007; Ritter 2008**). Bien qu'il n'existe pas de produits spécifiques pour contrôler les acariens Tropilaelaps, les acaricides chimiques de synthèse utilisés pour contrôler les acariens Varroa tels que Apistan (fluvalinate), Checkmite (coumaphos) et Bayvarol® (fluméthrine) sont également efficaces sur Tropilaelaps (**Burgett et Kitprasert 1990 ; Camphor et al. 2005 ; Kongpitak et al. 2008**).

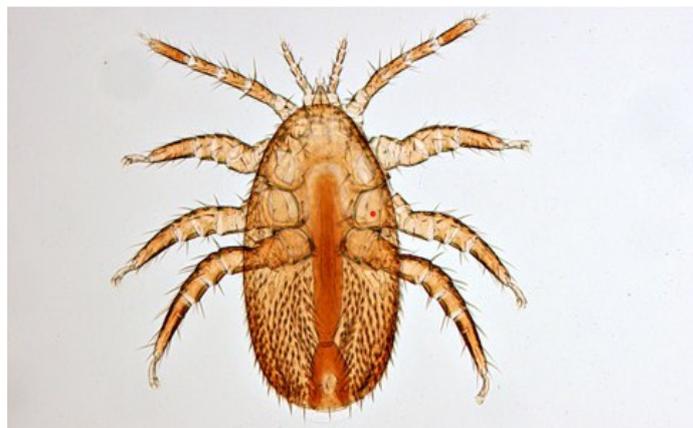


Figure 12: Tropilaelaps femelle adult. (the Pest and Diseases Library)

2. Les bactéries

Les abeilles sont exposées à un certain nombre de bactérie et d'agents pathogènes, ces derniers ayant une implication beaucoup plus importante dans la mortalité des abeilles. Donc, beaucoup doivent être activement contrôlés par les apiculteurs afin de préserver la santé des colonies.

2.1 La Loque Américaine

La Loque Américaine est une très grave maladie du couvain, dirigée dans le monde entier mais plus particulièrement dans les pays tempérés ou subtropicaux (**Mackowiak, 2009**). C'est en 1904 que le microbiologiste américain White a découvert l'agent pathogène, connu jusqu'à récemment sous le nom de *Bacillus larvae* White et renommé *Paenibacillus larvae*. La loque américaine est une maladie très sévère, qui ne guérit jamais spontanément (**Faucon et al, 2003**). La loque américaine est une maladie contagieuse du couvain de colonies du genre *Apis* notamment de celles d'*Apis mellifera*. Elle est due à une bactérie gram+ *Paenibacillus larvae*, qui touche le stade larvaire des trois castes. (**Heyndrick et al, 1996**), montre que cette dernière peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée.

Les spores représentent le stade infectieux. Par ailleurs si le couvain absorbe des spores en se nourrissant, ils germent dans l'intestin moyen de la larve et les transforme en bâtonnets. Il s'agit de la forme végétative qui est très mobile et capable de traverser la paroi de l'intestin pour pénétrer dans la cavité abdominale. À ce niveau, les spores se multiplient rapidement et provoquent la mort de la larve. Les symptômes de la maladie sont très variés, l'étude menée par (**Hafsaoui et Tahraoui, 2019**), ont signalé qu'un couvain operculé dont les opercules sont affaiblis et percés. Dans ce sens (**Samuel, 2016**), indique que la larve (ou la nymphe) change de couleur blanchâtre, elle devient brun crémeux, puis brun foncé ainsi la mort des larves ou des pupes après l'operculation des alvéoles.

2.1.1. L'effet pathogène

Une colonie atteinte de loque américaine présente divers symptômes, plus ou moins caractéristiques de cette pathologie. Cette affection peut conduire la ruche voire le rucher à une issue fatale, d'où l'importance pour l'apiculteur de savoir la détecter rapidement. L'évolution de l'atteinte peut être séparée en trois stades (**Samuel, 2016**).

2.1.1.1. Stade précoce

Ce stade présente des symptômes caractéristiques et est déjà identifiable. La mort des premières larves atteintes entraîne le nettoyage des cellules correspondantes, et le dépôt de nouveaux œufs par la reine. Il en résulte la juxtaposition, sur une même zone de cadre, de couvains de différents âges, donc operculés ou non. C'est ce qu'on appelle « couvain en mosaïque ». Les larves normales sont de couleur blanc crème. Les larves atteintes de loque américaine virent au marron plus ou moins foncé, et deviennent gluantes. Parallèlement, les alvéoles des cellules contenant des larves infestées deviennent concaves et changent de couleur (Fernandez *et al*, 2007).

2.1.1.2. Stade avancé

Lorsque l'atteinte progresse, ces symptômes se généralisent. Les larves deviennent filantes. Une allumette insérée dans la cellule atteinte ressort en faisant un fil marron. Ce test dit « de l'allumette » permet l'identification de la pathologie, mais le fait que la larve ne soit pas filante dès le début de l'affection entraîne un risque de faux négatifs. Les cadres deviennent foncés, avec un aspect humide à grasseux. Enfin, il se dégage de la ruche une forte odeur ammoniacale, de « colle de poisson », qui correspond à la production d'acides gras volatiles (Fernandez *et al*, 2007).

2.1.1.3. Stade terminal

Ce stade se caractérise par une colonie faible : les adultes ne sont plus assez nombreux pour éliminer le couvain mort qui se transforme alors en écailles foncées. A ce stade, l'odeur de colle de poisson peut ne plus être évidente. L'affection peut se terminer par la mort de la colonie (Fernandez *et al*, 2007).



Figure 13:La loque Américain sur un cadre du couvain (**Hafsaoui et Tahraoui, 2019**).

2.2. Loque Européenne

La loque européenne (european foulbrood) est une maladie infectieuse et contagieuse du couvain d'abeille, favorisée par une carence en protéines (**Alippi, 1999**). La loque européenne dont le facteur favorisant principal connu depuis longtemps est une carence en protéines (**Albisetti, 1982**), est statistiquement corrélée à la pression parasitaire de *V. destructor* (**Aubert et al, 2008**).

L'action spoliatrice du parasite se traduit, au travers de l'épuisement du corps gras des abeilles nourrices, par la production d'une gelée royale de moindre qualité favorisant la loque européenne. Elle est due à *Melissococcus pluton*, d'autres germes se développant secondairement (*Lactobacillus eurydice*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus apiarius*, *Enterococcus faecalis*).

Le plus souvent constatée au printemps et à l'apogée de la période de couvain, elle se traduit par l'atteinte de ce couvain qui peut être en mosaïque et présenter une odeur dépendante des germes secondaires présents, et par un affaiblissement de colonie en cas de forte infection (**Shimanuk et Knox, 2000**). À ce moment-là, de grandes surfaces de couvain sont à nourrir et le nourrissage des formes immatures, peut être désorganisé par différents facteurs : varroase, carences en pollen (unique source de protéines de l'abeille), confinement, déséquilibre des populations nourrices/larves, infection des nourrices par le virus du couvain sacciforme (Sacbrood Bee Virus, SBV).

2.2.1. Symptômes

- ✓ Couvain est en mosaïque ;
- ✓ larves prennent une couleur anormale, jaune à gris brun ;
- ✓ position anormale redressée des larves, elles sont fragiles mais non filantes. Elles meurent généralement avant operculation ;
- ✓ larves et écailles non adhérentes sont facilement évacuées par les abeilles (**paris et al, 2021**)

2.2.2. Traitement des loques

Dans de nombreux pays, les loques sont traitées par une antibiothérapie. Cependant du fait, notamment, de la sporulation de *P. larvae*, ce traitement « blanchit » les colonies (**Vidal, 2012**) et favorise les phénomènes d'antibiorésistance (**Alippi et al, 2007**).

Enfin, les limites maximales de résidus(LMR) des antibiotiques et le temps d'attente n'ont pas été définis pour le miel ni pour les autres productions de la ruche, ce qui en interdit leur prescription. La loque européenne dont le facteur favorisant principal connu depuis longtemps est une carence en protéines (**Albisetti, 1982**), est statistiquement corrélée à la pression parasitaire de *V. destructor* (**Aubert et al, 2008**). L'action spoliatrice du parasite se traduit, au travers de l'épuisement du corps gras des abeilles nourrices, par la production d'une gelée royale de moindre qualité favorisant la loque européenne.

2.3. Spiroplasma

Les colonies d'abeilles mellifères peuvent être infectées à tout moment de l'année par deux espèces de bactéries spiroplasma, chacune ayant une dynamique de prévalence unique l'une de l'autre. Bien que les abeilles mellifères maintiennent ces populations de spiroplasma d'année en année, elles ne sont pas fixées dans la population et doivent être considérées comme des symbiotes facultatifs. La prévalence des infections à spiroplasma dans les colonies d'abeilles mellifères est considérablement variable, en fonction du temps et de la géographie, avec le potentiel d'influencer la santé des abeilles et les cycles de la maladie (**Schwarz et al, 2014**).

Les spiroplasma sont un groupe monophylétique de bactéries qui ont des protéines membranaires cytoplasmiques uniques (c'est-à-dire la spiraline) (**Razin et al, 1998**) et une architecture cytosquelettique qui permet une motilité rapide de leur forme hélicoïdale à travers des substrats liquides sans l'utilisation de flagelles ou de cils (**Trachtenberg et al,**

2003 ; Shaevitz *et al*, 2005). Les deux abeilles *Spiroplasma* spp. Représentent deux des trois principaux clades *Spiroplasma* (Gasparich 2004; Bi *et al*, 2008).

Les trois clades comprennent des agents étiologiques de maladies chez les arthropodes, avec des espèces supplémentaires qui sont des pathogènes végétaux bien connus. *Spiroplasma apis* et *Spiroplasma Melliferum* sont connus comme agents pathogènes des abeilles et sont détectés par des méthodologies non spécifiques telles que la culture ou la microscopie à fond noir (Meeus *et al*, 2012).

Les spiroplasmes sont de petites eubactéries mobiles, hélicoïdales et descendantes de bactéries gram positives et dépourvues de paroi cellulaire (Regassa et Gasparich, 2006). Les insectes sont le principal réservoir de spiroplasmes, où ils envahissent principalement la lumière intestinale, mais certaines espèces ont élargi leur habitat pour inclure l'hémolymphe, les ovaires, les corps adipeux, l'hypoderme et les glandes salivaires (Regassa et Gasparich, 2006).

Les spiroplasmes sont également connus comme agents pathogènes des plantes ; agent étiologique *Spiroplasmacitri* et *Spiroplasma kunkelii* provoquent la maladie tenace des agrumes et la maladie du rabougrissement du maïs et sont transmises par les cicadelles (Bove, 1997 ; Clark, 1982). La plupart des spiroplasmes sont des commensaux, bien que *Spiroplasma poulsonii* provoque des troubles du sex-ratio chez *Drosophilame lanogaster*, tandis que *Spiroplasma apis* et *Spiroplasma melliferum* sont des agents pathogènes des abeilles.

3. Les mycètes

3.1. Nosema ssp

Nosema ceranae est un parasite émergent d'*Apis mellifera* décrit dans certaines régions comme la cause majeure de la mortalité des abeilles. Dans d'autres cas, il est soupçonné d'affaiblir les colonies par l'interaction avec d'autres facteurs de pression de l'environnement. Dans le cadre du phénomène global de la mortalité des abeilles (Dussaubat *et al*, 2012).

Nosema apis et *Nosema ceranae* sont des parasites microsporidiens intracellulaires infectant les cellules épithéliales de l'intestin moyen des abeilles mellifères adultes (Forsgren *et al*, 2010). *Nosema apis* a été décrit pour la première fois en 1909 par le chercheur allemand Enoch Zander²⁵ mais il a été démontré que les spores provoquaient la maladie chez l'abeille adulte bien plus tôt²⁵. On pense que la soi-disant «maladie de l'île de Wight» en Angleterre

est causée par des infections à *N. apis* jusqu'à ce que Rennie et ses collègues montrent qu'*N. apis woodi* était une cause plus probable de cette maladie (Fries et Ingemar, 1993). *Nosema apis* infectant *Apis mellifera* a été décrit il y a plus de cent ans. Récemment, un deuxième microsporidies, *Nosema ceranae*, infectant le même hôte a été signalé (Huang *et al*, 2005 ; Higes *et al*, 2006). Cette espèce de parasite n'avait auparavant été caractérisée que chez les abeilles *Apis cerana* naturellement infectées (Fries *et al*, 1996).

Les maladies fongiques des abeilles mellifères, en particulier la maladie *Nosema* causée par le parasite intracellulaire sporulant *Nosema*, sont répertoriées par l'Office international des épizooties (OIE) et ont un impact sur la santé et les performances des abeilles mellifères de multiples façons et sont souvent associées à des pertes de colonies dans le monde entier (Chenet *al*, 2021).

3.2. *Ascospheera apis*

3.2.1. Historique

La maladie du couvain plâtré chez les abeilles mellifères a été reconnue au début des années 1900 (Masse, 1913). Jusqu'à la seconde moitié du 20^e siècle, le couvain de craie n'était pas largement vu en dehors de l'Europe. Elle est connue depuis longtemps en Allemagne (Drêche, 1938), en Scandinavie, en Russie (Betty, 1932) et en Grande-Bretagne (Heath, 1982 ; Heath, 1985). En 1977, le couvain calcaire était reconnu comme la maladie infectieuse la plus grave des abeilles en Norvège (Heath, 1985). L'un des premiers rapports du champignon en dehors de l'Europe était en Nouvelle-Zélande en 1957.

3.2.2. Définition

Ascospheera est un genre de 28 espèces de champignons spécialistes de l'abeille, avec une distribution mondiale dans les régions tempérées et tropicales. Toutes les espèces réalisent leur cycle de vie entier dans des nids d'abeilles. Sept espèces d'*Ascospheera* sont courantes en Europe. Bien qu'*Ascospheera* vive en association avec des abeilles solitaires et des abeilles sociales, la majorité des espèces identifiées (25 parmi 28) ont été décrites initialement chez des abeilles solitaires (Fluret *al*, 1998). La plupart des espèces d'*Ascospheera* sont des saprophytes.

En d'autres termes, ils se nourrissent de déchets générés par les abeilles. *Ascospheera callicarpa*, par exemple, est commun sur les fèces des larves de l'abeille solitaire *Chelostoma florissomne*. Chez les abeilles sauvages, les adultes « n'élèvent » pas le couvain, ne soignent

pas les larves. Par conséquent, dans ces cas de figure, l'immunité sociale fait défaut. L'oeuf éclot sur un amas de nourriture, prévu pour la croissance larve, qui constitue également un terreau favorable au développement de champignons spécialisés, comme *Ascospaera*. Cependant, toutes les espèces d'*Ascospaera* ne sont pas aussi inoffensives. Certaines espèces sont pathogènes, quoique censées n'affecter que les larves des abeilles (**Ferron, 1975**).

Ascospaera apis est la cause fongique de la maladie larvaire de l'abeille mellifère (*Apis mellifera*). Les spores de ce champignon germent dans le tube digestif des abeilles, puis commencent la croissance mycélienne au cours du dernier stade du développement larvaire. Les abeilles larvaires et pupes mortes apparaissent crayeuses grâce à la croissance du mycélium dans toute l'abeille.

Ces «momies» crayeuses sont très contagieuses et les spores de ce champignon réinfectent souvent les colonies via des réserves de nourriture ou un transport direct vers les jeunes larves par des abeilles adultes travaillant dans le nid. Les abeilles adultes réduisent les effets de ce champignon sur la colonie en identifiant et en éliminant fréquemment les individus malades. La maladie est associée à une forte densité de couvain (productivité) et à des températures extérieures plus fraîches (**Anderson et al, 1998**).

3.2.3. L'agent causal de l'ascosphérose

Ascospaera Apis est un champignon filamenteux de la famille des Ascomycètes qui constituent une vaste division de champignons. Les Ascomycètes se caractérisent par la formation de spores sexuelles, appelées « ascospores », à l'intérieur d'organes particuliers, les asques. Les filaments, ou hyphes, de cette espèce fongique sont segmentés et mesurent autour de 5 µm en diamètre. La ramification des filaments forme un mycélium (**Roudel et Mathieu, 2013**). Pour sa reproduction sexuée, *A. apis* nécessite deux genres de mycéliums, morphologiquement semblables mais physiologiquement différents, ayant des polarités contraires : l'un de signe « + » ; l'autre de signe « - ».

C'est ce qu'on appelle un champignon hétérothallique. Lorsque des mycéliums de sexes opposés entrent en contact, il y a formation de corps de fructification : des sortes de globules de 80 µm de diamètre en moyenne ; ce qui équivaut au diamètre de la section d'un cheveu. Les corps de fructification, aussi appelés « sporocystes », sont de couleur vert foncé, brun foncé ou noirs (**Gilliam et al, 1988**).

3.2.4. La maladie du couvain plâtré

Le couvain plâtré est une maladie fongique du couvain d'abeilles causée par *Ascospheera apis*. Cette maladie est maintenant présente dans le monde entier et il y a des indications que l'incidence du couvain calcaire pourrait être en augmentation (Aronstein *et al*, 2010). Le couvain plâtré est une mycose invasive des abeilles mellifères (*Apis mellifera*) produite par *Ascospheera apis* (Massent ex Claussen) Olive et Spiltoir (Spiltoir, 1955 ; Spiltoir et Olive, 1955) qui affecte exclusivement le couvain d'abeilles.

Bien que mortelle pour les larves individuelles, la maladie ne détruit généralement pas une colonie d'abeilles entière. Cependant, il peut entraîner des pertes importantes en termes de nombre d'abeilles et de productivité des colonies (Bailey, 1963, Wood, 1998), avec des réductions de la production de miel de 5 à 37 % signalées (Heath, 1982 ; Yacobson *et al*, 1991 ; Zaghoul *et al*, 2005).

Le couvain crayeux se trouve maintenant dans les colonies d'abeilles mellifères du monde entier, et il semblerait que l'incidence du couvain crayeux ait augmenté ces dernières années (Heath, 1985, Kluser et Peduzzi, 2007 ; Ajzen *et al*, 2009) ont montré que les activités humaines liées à l'augmentation de la demande alimentaire ont des effets directs et indirects qui pourraient être au moins en partie responsables de cette tendance.



Figure 14:Le couvain plâtré ascosphérose (Aronstein *et al*, 2010).

3.2.5. Le pouvoir pathogène de l'ascosphérose

Les larves d'abeilles peuvent ingérer les spores pathogènes à tout âge. Généralement, ce sont les larves de faux bourdons qui sont atteintes en premier, puis les larves d'ouvrières, voire celles des reines. Les spores se développent dans le tube digestif des larves et donnent naissance à un mycélium (forme végétative du champignon) qui traverse d'abord la paroi

intestinale, puis envahit tous les tissus de l'insecte en formation et passe finalement à travers la cuticule. Bien qu'on n'ait pas détecté de chitinases chez le champignon parasite, l'équipement enzymatique d'*Ascospaera apis* est néanmoins capable de lyser des constituants de l'exosquelette de l'abeille. Les très jeunes larves (âgées de 1 à 2 jours) cessent de se nourrir peu de temps après la consommation des spores d'*A apis* (Aronstein *et al*, 2013).

Elles peuvent survivre jusqu'à 48 h, mais meurent généralement avant l'apparition de signes visibles de la maladie fongique. Les larves plus âgées (3 à 7 jours) continuent de se nourrir, mais à un rythme ralenti. Dans un premier temps, des masses blanchâtres de mycélium sont visibles sous la cuticule translucide de la larve contaminée qui meurt généralement 72 h après l'inoculation du germe pathogène. Ensuite, un feutre fongique couvre progressivement le cadavre larvaire, excepté la tête, en commençant par la partie postérieure. Les larves mortes deviennent d'abord spongieuses, puis sèchent, durcissent et prennent l'apparence *ascosphérose* d'un morceau de craie: d'où la dénomination de « couvain plâtré » (Aronstein *et al*, 2010).

Les larves « momifiées » n'adhèrent pas aux parois des alvéoles et produisent un bruit de grelot lorsqu'on secoue un cadre fortement atteint. Les abeilles perforent les opercules des cellules contenant des momies pour les évacuer. À ce stade, on note la présence de larves momifiées blanches et/ou noires dans le fond de la ruche et sur la planche (Alonso *et al*, 1993).

Les espèces pathogènes d'*Ascospaera* n'affectent que le stade larvaire des abeilles. Généralement, les larves malades meurent au stade larvaire; cependant, dans de rares cas, on a observé que les larves entrent en nymphose avant d'être vaincues par le champignon. Les espèces pathogènes d'*Ascospaera* semblent être des champignons hautement spécialisés avec des ascospores qui ne germent généralement que lorsqu'elles se trouvent dans l'intestin moyen de leur hôte. La germination des spores est suivie d'une croissance rapide des hyphes, le champignon consommant la larve de l'intérieur vers l'extérieur (Stephen *et al*, 1981).

Deux espèces pathogènes répandues, *Ascospaera* agrégat et *A. apis*, présentent un intérêt économique en raison de leur potentiel d'impact négatif sur les populations de pollinisateurs commerciaux, à savoir *Apis mellifera* et *Megachilerotundata* (Fabricius) (James, 2008) ; (Aronstein, 2010).

3.2.6. La lutte contre l'ascosphérose

Le diagnostic clinique de la maladie du couvain plâtré est particulièrement simple. Il s'appuie sur une analyse visuelle du couvain. En cas d'ascosphérose, on observe des larves dépériées dans leurs cellules, des opercules perforés et des momies présentes au fond de la ruche et sur la planche d'envol (**Metropolitaine, 1991**).

Les cadavres larvaires récents sont recouverts d'un mycélium cotonneux, alors que les larves desséchées (momies) blanches ont la consistance du plâtre. D'autres momies sont partiellement, voire presque totalement noires et recouvertes d'une couche granuleuse. Ces grains noirs sont remplis de spores (ascospores) contagieuses. Les spores des momies noires sont contagieuses pendant plus de dix ans (**Metropolitaine, 1991**). Même les spores répandues dans le milieu extérieur à la ruche gardent un pouvoir infectieux pendant plusieurs années. On sait qu'un certain nombre de facteurs favorisent l'apparition de la maladie du couvain plâtré, à savoir, entre autres :

- L'humidité.
- Une ventilation insuffisante de la ruche.
- Un temps trop froid pendant le développement de la colonie.
- L'atteinte des abeilles par d'autres agents pathogènes (Varroa, loques, virus).
- Des manipulations techniques, comme la formation d'essaims par exemple, qui diminuent le rapport abeilles adultes/couvain.

Deux actions prépondérantes permettent de réduire la charge infectieuse d'une colonie d'abeilles touchée par *A. Apis* :

1) La conduite hygiénique des abeilles, qui repose sur un mécanisme complexe de détection et d'extirpation des larves infectées.

2) Le diagnostic précoce de la maladie par l'apiculteur qui assainira la ruche parasitée.

Aucun traitement spécifique contre l'ascosphérose n'est commercialisé à ce jour. Cependant, il est intéressant de noter que des chercheurs français ayant fait un essai de médication à base d'huile essentielle de sarriette, incorporée dans un nourrissement hivernal à base de candi à une concentration de 0,1 %, ont enregistré une nette régression de l'affection pendant les 75 jours suivant le traitement (**Colin et al, 1989**).

Deuxieme partie :

Partie Pratique

Chapitre 01 :

Matériels et Méthodes

1. L'objectif de cette étude

Dans cette étude, nous visons à remplacer les traitements chimiques de certaines maladies d'abeille, en l'occurrence la loque américaine *Paenibacillus larvae* et l'ascosphérose *Ascosphaera Apis*, par l'utilisation des produits naturels afin de limiter les résidus des traitements chimiques sur le miel et d'assurer une meilleure efficacité. Pour le faire, nous avons testé l'activité de sept liquides ioniques sur ces maladies.

2. Matériels et méthodes

Le présent travail consiste à étudier l'activité antimicrobienne de sept liquides ioniques synthétisés sur deux agents pathogènes. Le premier est un champignon appelé *Ascosphaera Apis* et le deuxième est une bactérie *Paenibacillus larvae*. Ces deux agents sont isolés à partir des colonies d'abeille infectées appartenant à la région d'Alger (Algérie).

2.1. Matériels

2.1.1. Matériels biologiques

Les colonies de la loque américaine *Paenibacillus larvae* sont isolées à partir des couvains infectés présentant des signes cliniques typiques de la maladie, notamment le couvain en mosaïque, l'odeur aigre et le test d'allumette positif. Pour l'ascosphérose *Ascosphaera Apis*, ce champignon a été isolé en utilisant des larves momifiées qui ont été prélevées à l'entrée de la ruche.

2.1.2. Milieux de culture et produits chimiques

*L'ensemencement du champignon a été fait sur le milieu Sabouraud Dextrose Agar

*La culture de la bactérie a nécessité l'utilisation de milieu spécifique MYPGP

*Sept liquides ioniques sont testés sur le champignon :

- ✓ LI poly Décationique
- ✓ LI Décationique,
- ✓ LI New 3,
- ✓ LI Lithium imédazium,
- ✓ LI mono particule avec Mn₂,
- ✓ LI mono particule son Mn₂,
- ✓ LI ThiaCl-OH

*Quatre liquides ioniques sont testés sur la Bactérie :

✓ LI poly Décationique

✓ LI Décationique,

✓ LI New 3,

✓ LI Thia Cl'OH

*l'eau ultra pure (eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente).

*l'éthanol de concentration supérieure ou égale à 70 %.

*Kit de coloration de Gram

Il contient une solution de cristal violet (ou violet de Gentiane), du lugol, un produit décolorant différentiateur (alcool ou mélange d'alcool-acétone), un colorant de type safranine ou fuchsine.

*Huile à immersion

*Bleu de Méthylène

2.1.3. Matériels de laboratoire

A. Appareillages

✓ Étuve 37°C pour bactérie et 28°C pour champignon

✓ Bain-marie

✓ Balance

✓ Agitateur + barreau magnétique

✓ 2 Bec bunsen

B. Verreries

✓ Boite de pétri

✓ Anse de platine

✓ Pipette pasteur

✓ Micropipette

✓ Pro pipette

✓ Bécher

✓ Flacon en verre

✓ Para film

2.2. Méthodes

2.2.1. Échantillonnage et isolement

2.2.1.1. Isolement et identification de l'ascosphérose *Ascosphaera apis*

A. Isolement des champignons

Une partie de chaque prélèvement infecté (cire battue) est déposée stérilement et individuellement dans une boîte de Pétri contenant le milieu Dextrose Sabourand après un rinçage par l'hypochlorite de sodium à 10 % pendant 10 min. Après un lavage dans deux bains successifs par l'eau distillée, il faut incuber la boîte à 28°C pendant 5 jours. (Sevim *et al*, 2022).

B. Purification

La purification a pour but l'obtention de colonies fongiques pures, spécifiques, afin d'identifier les champignons en cause. À l'aide de l'extrémité inférieure d'une pipette Pasteur stérile, nous coupons des disques mycéliens puis les transférer dans un nouveau milieu Sabourand Dextrose agar, tout en prenant soin de mettre le mycélium en contact avec le milieu Sabourand Dextrose agar. Il faut ensuite, incuber les boîtes de Pétri contenant les colonies fongiques à 28°C pendant 5 jours. L'opération doit être reprise jusqu'à l'obtention des colonies pures (Liu *et al*, 2022).

C. Méthode d'identification

La souche fongique mise en causes est identifiée en utilisant des examens et des observations macroscopiques et microscopiques (Sevim *et al*, 2022).

D. Examen macroscopique

Il faut observer attentivement dans un endroit bien éclairé l'aspect du champignon, en vérifiant l'homogénéité des colonies (l'obtention des colonies identiques).

E. Aspect macroscopique d'*Ascosphaera apis*

Les colonies sont blanches et dense, leurs diamètres varient entre 5cm et 8 cm. Après 8 jours de germination, le mycélium était blanc et aérien (fig. 15A). Elles deviendront noires lors de la formation des kystes (fig. 15B).

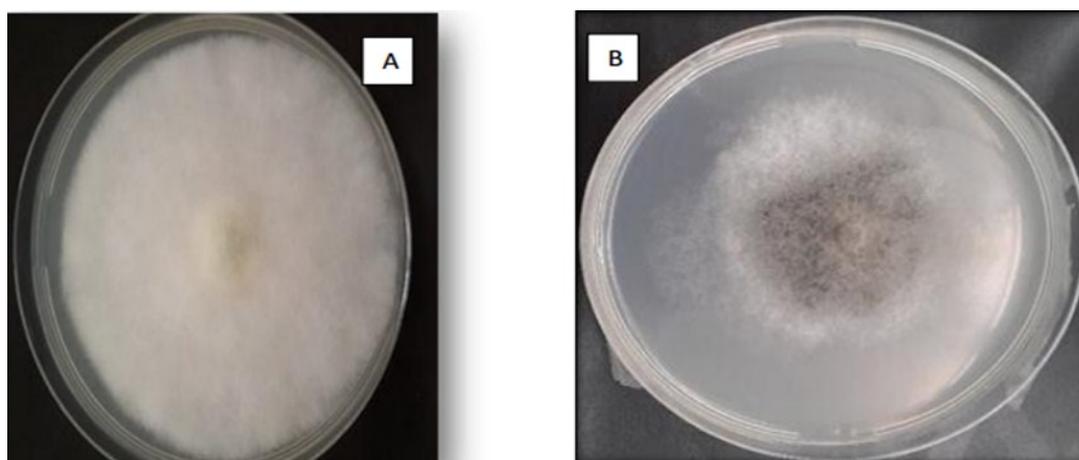


Figure 15 : Aspect macroscopique d'*Ascospaera apis* ; A : Les colonies d'*Ascospaera apis* sont blanches ; B : aspect macroscopique d'*Ascospaera apis* après la formation des kystes (Chahbar, 2017).

F. Examen microscopique

Les observations sous microscope concernent la morphologie des spores, leur taille et surtout la façon dont elles sont rattachées aux filaments (isolées en chaînes ramifiées, présence de produits phialides, ...etc.). Cet examen peut se faire par un montage entre lame et lamelle avec l'ajout d'une goutte de bleu de méthylène ou d'une goutte d'eau distillée stérile (Reynaldi *etal*, 2015).

G. Préparation microscopique

La préparation est effectuée en prélevant une fraction de mycélium avec une aiguille stérile à l'extrémité de la colonie (car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif). Cet inoculum est déposé sur une lame contenant une petite goutte d'eau, ensuite il faut remuer délicatement pour avoir une préparation homogène. L'ensemble est recouvert d'une lamelle tout en évitant la formation des bulles d'air. Ensuite, observer rapidement au microscope optique au grossissement GX 40 puis GX 100.

H. Aspect microscopique d'*Ascosphaera apis*

Les hyphes sont cloisonnés, leurs diamètres oscillèrent entre 2,5 μm et 8 μm , présentant des ramifications dichotomiques prononcées.

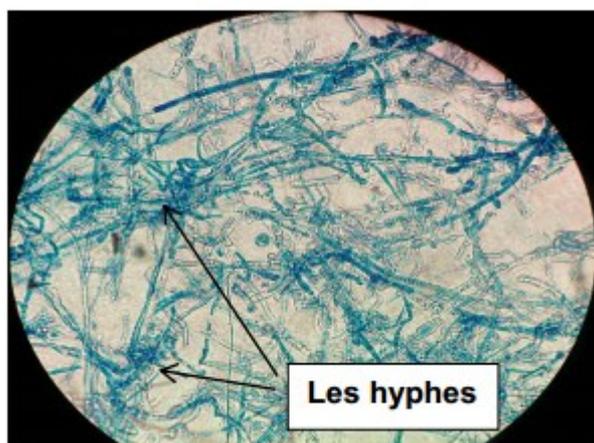


Figure 16: Aspect microscopique d'*Ascosphaera apis* (Gr X 400) (Chahbar, 2017)

2.2.1.2. Identification de la loque américaine *Paenibacillus larvae*

A. Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture sélectif MYPGP est utilisé pour la mise en évidence de *Paenibacillus larvae* (Dingmanne et Stahly, 1983). Il est composé de 10 g de Bouillon Mueller-Hinton (Oxoid CM0405), 15 g d'extrait de levure, 3 g de phosphate de potassium (K₂PO₄), 2 g de glucose, 1 g de pyruvate de sodium (C₃H₃NO₃) et de 20 g d'agar.

Tous les ingrédients mentionnés sont versés dans un flacon de 1000 ml, ensuite compléter le flacon jusqu'à 1000 ml par l'eau distillée. Le milieu est stérilisé après homogénéisation à 120°C pendant 1 heure. La gélose préparée est coulée dans les boîtes de Pétri pour l'isolement de la bactérie.

Une partie du prélèvement est mise en suspension dans de l'eau stérile puis chauffée à 80°C durant 20 minutes pour éliminer toutes les bactéries non sporulées. Car *P. larvae* est une bactérie génératrice de spores, son isolement dans les échantillons biologiques est typiquement précédé par une étape de traitement thermique pour tuer tous les micro-organismes végétatifs. Cette étape réduit de manière significative le risque que les colonies de *P. larvae* soient masquées par des concurrents.

B. Ensemencement et incubation

Le prélèvement est ensuite ensemencé sur une gélose MYPGP (Dingmanne et Stahly, 1983). Ce milieu donne de meilleurs résultats surtout s'ils sont incubés en présence de

5% de CO₂. Après 2 à 4 jours d'incubation à 35-37°C, les colonies suspectes (petites colonies grisâtres, d'aspect butyreux et à contour régulier) sont identifiées (OIL, 2014 ; De Graaf *et al* 2013).

C. Macroscopiques

La morphologie des colonies de *P. larvae* ensemencées sur la gélose MYPGP, les colonies sont petites, régulières, en général rugueuses, plates ou surélevées, blanchâtres ou beiges sur la gélose MYPGP, pour l'isolement de la bactérie (OIL, 2014 ; De Graaf *et al*, 2013).

D. Examen microscopique

L'examen microscopique après une coloration des spores permet la mise en évidence de nombreuses spores qui ne peuvent pas être différenciées des spores des autres espèces des genres *Paenibacillus* (OIL, 2014). La coloration de Gram est une coloration différentielle. La coloration de Gram consiste à soumettre un frottis bactérien sec et fixé à l'action d'un colorant primaire violet (violet de gentiane dans le cas de la coloration de Gram classique), puis à un mordantage au Lugol (solution iodo-iodurée). A ce stade le cytoplasme de toutes les bactéries est coloré en violet.

L'étape suivante, la plus délicate, est la différenciation à l'alcool. Elle consiste à soumettre les bactéries ayant subi la coloration primaire violette à l'action contrôlée de l'éthanol. Certaines bactéries dont la paroi est imperméable à l'alcool dans des conditions opératoires de la coloration restent colorées en violet, elles sont Gram positif. D'autres, dont la paroi est perméable à l'alcool dans les mêmes conditions, sont des Gram négatif. À l'issue de l'étape de différenciation, les bactéries Gram positif sont colorées en violet, les bactéries Gram négatif sont incolores. La dernière étape est la coloration secondaire dite coloration de contraste qui consiste à soumettre le frottis à un colorant rose (Gillet *et al*, 2009) (la fuchsine pour le Gram classique). La coloration terminée, observer la préparation avec l'objectif **Gr X10** à immersion.

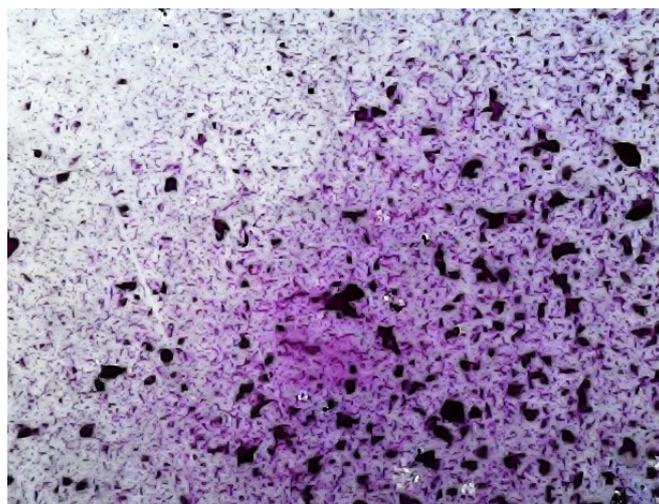


Figure 17: Aspect microscopique de Paenibacillus larvae (Gr X 10) (**originale**)

E. Mode opératoire

- Une goutte de la suspension est étalée sur la lame
- Sécher le frottis par passage de 15 à 20 cm au-dessus de la flamme
- Fixer le frottis en poursuivant l'échauffement un peu plus bas sur la flamme
- Laisser refroidir la lame
- Verser le violet de Gentiane sur le frottis et laisser agir 1 à 2 minutes
- Débarrasser la lame du violet, verser le lugol et permet agir 1mn
- Verser le contenu, ajouter l'alcool à 96%. Laver abondamment pour arrêter la décoloration
- Couvrir la lame d'eau
- Verser de la Fuschine et laisser agir 5 secondes
- Laver et sécher sur papier à filtret
- Examen au microscope grossissement x100 après de verser une goutte d'huile d'immersion sur la lame

Les bactéries à gram + apparaissent colorées en bleu violet

2.2.2. Tests de confirmation biochimique de *P. larvae*

Pour confirmer la présence de *P. larvae* dans les échantillons, nous avons utilisé plusieurs testent de confirmation biochimique. Letest de catalase, le test d'oxydase, les galeries biochimiques API 20 E sont utilisés dans cette partie.

2.2.2.1. Test d'oxydase

La recherche de l'oxydase est une technique d'identification concernant les bactéries à Gram négatif, les bactéries possédant l'enzyme oxydase peuvent oxyder la N-diméthyle-paraphénylene diamine, ce qui donne des produits violacés.

À l'aide d'une pince stérile, placer un disque d'oxydase sur une lame stérile. Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester. Puis, prélever la colonie choisie à l'aide d'un bâtonnet ou d'une anse (ne pas utiliser d'anse de métal, à l'exception du platine, cela peut provoquer des réactions faussement positives). Ensuite, frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes. L'absence de coloration ou coloration au-delà de 30 secondes constitue une réponse négative. Une réaction positive se traduit par une coloration bleu foncé à violet apparaissant dans un délai de 30 secondes (**Fig. 18**).



A : Oxydase positive

B : Oxydase négative

Figure 18: Coloration des disques d'oxydase après leur frottement avec les bactéries
(Chahbar, 2017)

2.2.2.2. Test de catalase

Une goutte d'eau oxygénée à 3 % est placée sur une culture en croissance active sur le milieu de culture (MYPGP). La plupart des bactéries aérobies décomposent le peroxyde en eau et en oxygène, produisant une mousse effervescente, mais *P. larvae* est presque toujours négatif pour cette réaction, ou légèrement positif (mais avec retard) (**Haynes, 1972**).

La décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase se traduit par un dégagement gazeux abondant sous la forme de bulles. L'absence de bulles constitue une réponse négative.

2.2.2.3. Galeries biochimiques

Le kit de diagnostic API 20 E a été utilisé pour une caractérisation biochimique de *P. larvae*. La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés (**Fig.19**). Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.



Figure 19:Le kit de diagnostic API 20 E (**Chahbar, 2017**)

ONPG : Détermination de la présence de l'enzyme β -galactosidase. ADH : Transformation de L'arginine (acide aminé) par l'arginine déshydrolase. LDC : Transformation de la lysine (acide aminé) par la lysine décarboxylase. ODC : Transformation de l'ornithine (acide aminé) par l'ornithine décarboxylase. CIT : Utilisation du citrate comme seule source de carbone. H2S : Production du sulfure d'hydrogène (H2S) à partir du thiosulfate (S2O3). URE : Libération d'ammoniac à partir de l'urée grâce à l'uréase. TDA : Formation de l'acide indole pyruvique à partir du tryptophane (acide aminé) grâce à tryptophane désaminase. IND : Formation d'indole à partir du tryptophane (acide aminé). VP : Formation d'acétoïne à partir du pyruvate de sodium. GEL : Liquéfaction de la gélatine (protéine). Production de l'acide en conditions aérobies à partir d'un hydrate de carbone (tester la capacité pour la fermentation des

sucres) : GLU (glucose) ; MAN (mannitol) ; INO (inositol) ; SOR (sorbitol) ; RHA (rhamnose) ; SAC (saccharose) ; MEL (mélobiose) ; AMY (amygdaline) ; ARA (L+arabinose).

2.2.3. Préparation de la galerie

Il faut réunir le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation. Puis, répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Éviter d'utiliser d'eau avec additifs ou dérivés susceptibles de libérer des gaz comme le CO₂. Il est préférable d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte (ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation). Enfin, sortir la galerie de son emballage et la placer dans la boîte d'incubation.

2.2.3.1. Préparation de l'inoculum

À l'aide d'une anse de platine, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile. Puis bien agiter à l'aide d'un vortex. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).

2.2.3.2. Inoculation de la galerie

Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette. Poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant afin d'éviter la formation bulle au fond des tubes. Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir le tube et la cupule. Quant aux autres tests, les tubes uniquement doivent être remplis (et non pas les cupules). Concernant les tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE, la création d'une anaérobiose est obligatoire en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Par la suite, refermer la boîte d'incubation et incubé à 37°C pendant 18-24 heures.

2.2.4. Évaluation de l'activité biologique des liquides ionique

Premièrement et avant de commencer la manipulation il est plus important de respecter les procédures de sécurité et d'hygiène à l'intérieur du laboratoire, mettre des blouses et des ligans, nettoyage de la paillasse et les verreries avec l'eau javèle pour éviter la contamination. Puis Allumage de deux becs bunsen pour créer une zone stérile d'environ 20 cm de rayon.

2.2.4.1. Test sur champignon

L'un des propriétés des liquide ionique qu'ils sont solubles dans l'eau, sont des sels possèdent une température de fusion inférieur à 100 °C et souvent même inférieur à la température ambiante (Clough *et al*, 2015). 5 dilutions (0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml, 3ml) de chaque LI sont préparés par rapport au milieu de culture par l'ajout de LI après la dissolution de LI dans l'eau stérile

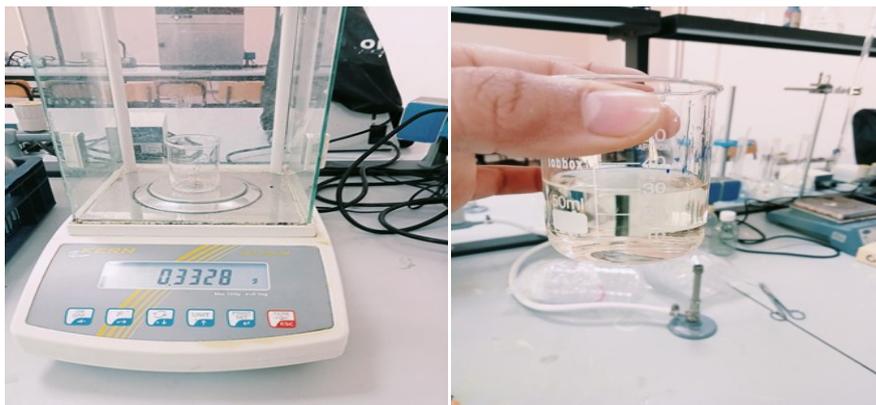


Figure 20: La dissolution de liquide ionique dans l'eau stérile (**originale**)

a. Mode opératoire

Les flacons de milieu de culture sont mis dans un bain-marie (**fig21**), un mélange LI + milieu de culture est fait pour chaque dose. Le mélange préparé est coulé dans les boîtes de Pétri.



Figure 21: Coulage de mélange dans les boîtes pétri après la dissolution de MC dans la bain marie (**originale**).

Pour témoin = milieu de culture + Champignon *Ascospheara apis* (**fig22**).



Figure 22:Aspect de boîte Témoin (**originale**)

b. Ensemencement

À l'aide de l'extrémité inférieure d'une pipette pasteur stérile, Nous coupons des disques mycéliens puis les transférons dans un milieu Sabourand dextrose agar, tout en prenant soin de mettre le mycélium en contact avec le milieu. Même méthode est respectée pour les autres concentrations et LI restés.

c. Incubation

Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 5 jours à 7 jours à 28°C.



Figure 23 : L'incubation de la souche fongique (**originale**)

d. Lecture

La lecture a été faite par la mesure des deux diamètres (A : diamètre plus longeur B: diamètre peu longeur) à l'aide d'un pied à coulisse.



Figure 24: La mesure des deux diamètres A et B (originale)

2.2.4.2. Test sur bactérie

Après l'identification macroscopique et microscopique de *Paenibacillus larvae* et la confirmation, le protocole suivant est réalisé pour tester l'efficacité de 04 LI sur cette bactérie.

a. Mode opératoire

Le milieu de culture sélectif MYPGP est utilisé pour la mise en évidence de *Paenibacillus larvae* (Dingmann et Stahly, 1983). La gélose préparée est coulée dans les boîtes de Pétri pour l'isolement de la bactérie.

b. Ensemencement

Le prélèvement est ensuite ensemencé sur un mélange MYPGP + LI, Il s'agit de créer une cavité dans la gélose. Cette cavité est ensuite remplie d'un volume donné de liquide ionique qui diffuse dans la gélose.



Figure 25: Ensemencement de la suspension bactérien sur la gélose (originale)

c. Incubation

Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

d. Lecture

Après incubation, des zones d'inhibition de la croissance de la suspension bactérienne ont été obtenues et mesurées avec deux diamètres différents.

Chapitre 02 :

Résultats et Discussion

1. Résultats

1.1. Étude des caractères macroscopiques et microscopique d'*Ascosphaera apis*

Cette partie d'étude porte sur les caractères macroscopiques et microscopiques d'*Ascosphaera apis*.

1.1.1. Aspect macroscopique d'*Ascosphaera apis*

Les colonies sont blanches et denses, leurs diamètres varient entre 5cm et 8 cm. Après 7 jours de germination, le mycélium était blanc et aérien (fig. 26A). Elles deviendront noires lors de la formation des kystes (fig. 26B).



Figure 26: Aspect macroscopique d'*Ascosphaera apis* ; A : Les colonies d'*Ascosphaera Apis* sont blanches ; B : aspect macroscopique d'*Ascosphaera apis* après la formation des kystes(**Originale**)

1.1.1.1. Aspect microscopique d'*Ascosphaera apis*

Les hyphes sont cloisonnés, leurs diamètres oscillèrent entre 2,5 μm et 8 μm , présentant des ramifications dichotomiques prononcées. Pour sa reproduction sexuée, *A. apis* nécessite deux genres de mycéliums. Ces mycéliums sont morphologiquement semblables et physiologiquement différents, possédant des polarités opposées, l'une de signe positif « + » et l'autre de signe négatif « - ». C'est ce qu'on appelle un champignon hétérothallique avec deux types sexuels, positif « + » et négatif « - » (**Hemmerlé, 2015**).

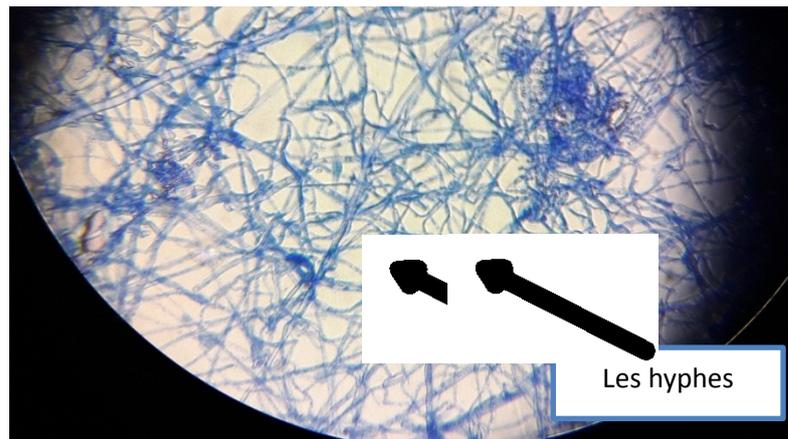


Figure 27: Aspect microscopique d'*Ascosphaera apis* (Gr X 40) (Originale)

1.2. Étude des caractères macroscopiques et microscopique de *Paenibacillus larvae*

Les résultats de différents caractères macroscopiques, microscopiques, et biochimiques de *Paenibacillus larvae* sont détaillés.

1.2.1. Étude des caractères macroscopiques

Les colonies de *Paenibacillus larvae* apparaissent sur le milieu MYPGP, sous forme de petites colonies arrondies concaves de forme plates ou surélevées, de couleur beige (**fig. 28**) ou blanchâtre.

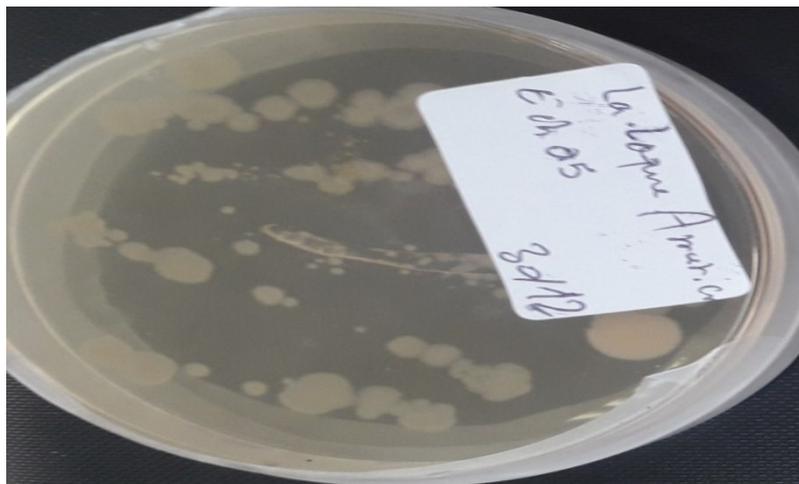


Figure 28 : Aspect macroscopique des colonies de *Paenibacillus larvae* sur le milieu MYPGP. Couleur beige(Originale)

1.2.2. Étude des caractères microscopiques

Les résultats d'observation à l'état frais, sous microscope optique au grossissement X100, montrent que les bactéries semblent mobiles, se déplacent dans tous les sens. Après l'utilisation de la coloration de Gram, les résultats positifs sont traduits par une coloration, les seuls bacilles à Gram positif ont subi une série de différents tests pour confirmer que cette souche est *Paenibacillus larvae*.



Figure 29:Aspect microscopique de *Paenibacillus larvae* après la coloration de Gram, grossissement X100. Bactéries Gram positif forme bacille (**Originale**).

1.2.3. Tests biochimiques

1.2.3.1. Test catalase

Le résultat de test catalase montre une absence de bulles veut dire que la bactérie ne possède pas d'enzyme de catalase



Figure 30:Résultat négative de test catalase de *Paenibacillus larvae* (**originale**).

1.2.3.2. Test Oxydase

Le résultat de test oxydase montre une absence de coloration violette veut dire que la bactérie ne possède pas d'enzyme d'oxydase



Figure 31: Résultat négative de test oxydase de *Paenibacillus larvae* (originale).

1.2.3.3. Galeries biochimiques

Les résultats de galerie biochimique Api 20E est organisé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1: Résultats de la galerie biochimique après incubation et ajout des réactifs

Microtube	Résultat	Interprétation	Microtube	Résultat	Interprétation
ONPG	-	La bactérie ne possède pas la β -galactosidase car elle n'a pas hydrolysé l'orthonitrophényl-galactoside	IND	-	La bactérie n'a pas produit l'indole à partir du tryptophane donc elle ne possède pas de tryptophanase.
ADH	-	La bactérie n'a pas hydrolysé l'arginine donc elle ne possède pas d'arginine dihydrolase.	GLU	Glu positif + - Nitrate Négatif	. La bactérie a la capacité de fermenter le glucose (substrat carboné) en nitrate, mais elle est incapable de dégrader le nitrate en nitrite.

LDC	-	La bactérie ne possède pas la lysine décarboxylase car elle n'a pas hydrolysé la lysine.	MAN	-	La bactérie n'est pas capable de fermenter le manitol
ODC	-	La bactérie n'a pas hydrolysé l'ornithine alors, elle ne possède pas l'ornithine décarboxylase.	INO	-	La bactérie n'est pas capable de fermenter l'insitol
CIT	-	La bactérie n'a pas utilisé le citrate comme source de carbon.	SOR	-	La bactérie n'a pas la capacité de fermenter le sorbitol
H2S	-	La bactérie n'a pas la capacité de produire l'H2S	RHA	-	La bactérie n'est pas capable de fermenter le rhamnose
TDA	-	La bactérie n'a pas la capacité de désaminer le tryptophane en acide indolepyruvique grâce à l'enzymetryptophane désaminase.	SAC	+	La bactérie a la capacité de fermenter le saccharose.
VP	-	La bactérie n'a pas produit l'acétoine (3-hydroxybutanone) à partir du pyruvate de sodium.	MEL	+	La bactérie est capable de fermenter le mélobiose

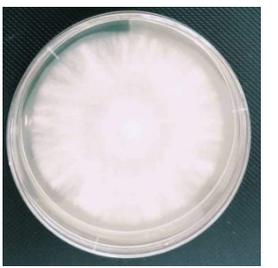
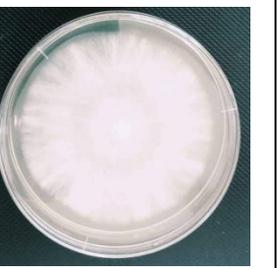
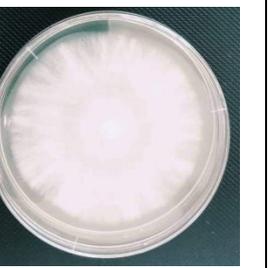
GLE	-	La bactérie ne possède pas la gélatinase	AMY	-	La bactérie n'a pas la capacité de fermenter l'amygdaline
URE	+	La bactérie possède l'uréase puisqu'elle a hydrolysé l'urée en ammoniacque.	ARA	+	La bactérie est capable de fermenter l'arabinose

1.3. Étude de l'activité biologique des Lis

1.3.1. Étude de l'activité antifongique des Lis

Après l'incubation de la souche fongique qui reste presque 8 jours dans un incubateur à 28°C, nous avons obtenu les résultats qui sont illustrés dans le tableau ci-dessous (**Tableau : 02**)

Tableau 2: les résultats du développement du champignon *d'Ascospheara apis*

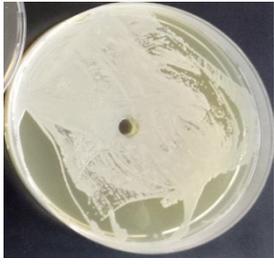
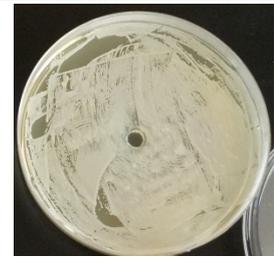
			
Témoin	LI New3	LI Décationique	LI Poly Décationique
			
LI Lithium imédazium	LI ThiaCl-OH	LI mono particule avec Mn2	LI mono particule son Mn2

Selon les résultats de l'ensemble des liquides ionique testé sur le champignon *Ascospheera apis*, nous avons trouvé que les 07 produits testés ne donnent aucun résultat. Par contre, l'apparition des premières colonies de champignon avait lieu après seulement 24 heures d'incubation. Nous pouvons suggéré que ces liquides ioniques peuvent jouer le rôle d'un bio-stimulant pour le développement de champignon *A. apis*.

1.4. Étude de l'activité antibactérien des LIs

Concernant les résultats obtenus après l'incubation de la suspension bactérienne qui dure 24 heures à 37°C, les résultats sont illustrés dans le tableau 03.

Tableau 3: les résultats du développement de la bactérie *Paenibacillus larve*.

			
LI poly Décationique	LI ThiaCl-OH	LI New 3	LI Décationique
			
Témoin			

Selon les résultats de l'ensemble des liquides ionique testé sur le champignon, *Ascospheera apis*, nous avons trouvé qu'il n'a pas de différence entre les témoins et les 07 produits testés. Les même résultats sont obtenus pour le teste des 04 LI sur la bactérie *Paenibacillus larve*.

2. Discussion

Dans cette étude, nous visons à tester l'activité antifongique et antibactérienne des nouveaux liquides ioniques synthétisés sur deux agents pathogènes qui touchent l'abeille domestique *apis mellifera*, la loque américaine *Paenibacillus larvae* et l'ascosphérose *Ascospheera apis*.

Après plusieurs expériences pour tester l'activité biologique des liquides ioniques sur les deux agents pathogènes, nous avons constaté qu'ils ne donnaient aucune efficacité.

À l'heure actuelle, les études qui portent sur les tests biologiques des liquides ioniques synthétisés sont très peu et très récentes, qui sont datées depuis environ 2017 seulement. Plusieurs recherches scientifiques plus récentes, ont fait l'objet des études des activités biologiques des liquides ioniques, Ils ont trouvé que les liquides ionique présentent une activité biologique très rare, Par contre d'autres chercheurs (**Virendra et al, 2020**) ont trouvé que les liquides ionique présentent une activité biologique considérable contre les bactéries gram- négatives et sont donné des bon résultats.

Nous avons trouvé des résultats négatifs pour tous les 4 liquides ioniques testés sur la bactérie *Paenibacillus larvae*. L'inefficacité trouvé est peut être due à la composition membranaire Gram+ positif. Nos résultats sont confirmés par (**Zlitni et al, 2020**) qui ont trouvé une efficacité que pour la bactérie pathogène de Gram-négative.

L'inefficacité trouvée sur le champignon peut être du a la dose appliqué car l'efficacité de l'inhibition dépend de l'utilisation de concentration plus élevée du liquide ionique ou bien ces liquides sont des biostimulants pour ces agents car le développement de champignon mis en cause avait lieu après seulement 48 heures d'incubation au lieu de 7 jours. Ces résultats obtenus sont en contradictions avec ceux obtenus par Karaman en 2020, qui a trouvé que 17 des 18 IL testés sont révélés positifs pour l'activité antifongique via des tests in vitro contre les souches fongiques *A. padwickii*, *A. dauci* et *A. linicola*. De plus, l'influence des anions sur la toxicité de l'IL est subordonnée à l'effet des cations. L'activité antifongique des IL d'imidazolium et des sels de thiosemicarbazidium indique que le cation, la longueur de la chaîne latérale alkyle et la fonctionnalité de la chaîne latérale du groupe polaire influencent tous les effets sur les souches d'*Alternaria* (**karaman et al, 2020**).

En 2014, Ferraz a fait des études sur les activités antibactériennes de nouveaux liquides ioniques d'ingrédients pharmaceutiques actifs (API-IL) basés sur l'anion ampicilline

[AMP] ont été évaluées. Ils ont montré une inhibition de la croissance et des propriétés bactéricides sur certaines bactéries sensibles et en particulier certaines bactéries résistantes à Gram négatif (**Ferraz et al, 2014**). Ce qui peut être dû à la propriété des liquides ioniques qui possèdent une activité considérable pour les bactéries a gram négative, par contre pour notre étude, nous avons travaillé sur une bactérie (*Paenibacillus larvae*) qui est a gram positive.

D'autres chercheurs ont démontrés que les liquides ioniques (IL) qui présentent une activité antimicrobienne sont fortement affectés par les longueurs de chaîne alkyle. Des substituants plus courts sur le cation entraînent un manque d'activité contre les coccidés, les bâtonnets et les champignons. Les IL contenant 10, 11, 12 et 14 atomes de carbone dans un groupe alcoxy présentent des activités antimicrobiennes très élevées. L'utilisation de micro-organismes dans l'IL nécessite la prise en compte de leurs valeurs de concentration minimale inhibitrice (MIC) (**Pernak et al, 2003**).

D'autre chercheures ont fait l'objet de remplacer les antibiotiques, utilisés pour lutter contre certaines maladies de l'abeille domestique, par des traitements à base de propolis (**Cristina et al, 2012**). Dans le même ordre d'idée, une autre équipe de recherche (**Mikio et al, 2012**) a étudié la possibilité d'inhiber la croissance de la bactérie *Paenibacillus larvae* en utilisant des bactéries lactiques isolées à partir des matières fermentées. Cette équipe a évalué également, in vivo, la capacité des bactéries lactiques à induire l'expression de gènes peptidiques antimicrobiens. (**Mikio et al,2012**) suggèrent que certaines bactéries lactiques stimulent la réponse immunitaire innée chez les abeilles, qui peuvent être utiles pour prévenir les maladies bactériennes chez les abeilles.

Conclusion

Dans la présente étude, une évaluation comparative de différents types de liquides ioniques comme agents antimicrobiens a été réalisée. Nous avons essayé de tester l'efficacité de 07 liquides ioniques synthétisés sur une souche de champignon *A. apis* isolée à partir d'une colonie infectée. Ainsi, nous avons pu tester l'activité antibactérienne de quatre liquides ioniques synthétisés sur une bactérie *P. larvae* infectant l'abeille domestique.

Il s'agit de la première étude systématique qui porte sur le potentiel antimicrobien de différents types de liquides ioniques en utilisant des procédures standard pour les tests de sensibilité antimicrobienne. L'activité antimicrobienne élevée et l'activité hémolytique relativement faible des IL 1-3 suggèrent leur application possible comme agents antimicrobiens, tels que les agents anti-biofilm.

D'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans leur activité antimicrobienne, ainsi que d'autres variables concernant la toxicité et, en général, l'exploitabilité pour leur éventuelle application dans la pratique clinique.

Notre résultat a montré que ces liquides ioniques ne sont pas efficaces contre les deux souches testées, par contre nous avons trouvé que le développement de champignon augmentait en présence de liquide ionique par rapport au témoin (effet inverse). Nous suggérons, d'après les résultats obtenus, que ces liquides ioniques possèdent une activité bio-stimulatrice pour le développement de champignon *A. apis*.

Références bibliographiques

- Abou-Shaara, H. F., & Staron, M. (2019).** Present and future perspectives of using biological control agents against pests of honey bees. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 1-7.
- Aizen, M. A., & Harder, L. D. (2009).** The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, 19(11), 915-918.
- Alippi, A. M., Albo, G. N., Leniz, D., Rivera, I., Zanelli, M. L., & Roca, A. E. (1999).** Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American foulbrood of honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 38(3-4), 149-158.
- Alippi, A. M., López, A. C., Reynaldi, F. J., Grasso, D. H., & Aguilar, O. M. (2007).** Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Veterinary Microbiology*, 125(3-4), 290-303.
- Alonso, J. M., Rey, J., Puerta, F., de Mendoza, J. H., de Mendoza, M. H., & Flores, J. M. (1993).** Enzymatic equipment of *Ascosphaera apis* and the development of infection by this fungus in *Apis mellifera*. *Apidologie*, 24(4), 383-390.
- Anderson, D. L., & Fuchs, S. (1998).** Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 69-78.
- Anderson, D. L., & Gibson, N. L. (1998).** New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia. *Australian Systematic Botany*, 11(1), 53-72.
- Anderson, D. L., Gibbs, A. J., & Gibson, N. L. (1998).** Identification and phylogeny of spore-cyst fungi (*Ascosphaera* spp.) using ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 102(5), 541-547.
- Anderson, D.L., Morgan, M.J. (2007).** Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. *Exp. Appl. Acarol.* 43, 1–24.

Anderson, J. L., & Armstrong, D. W. (2003).High-stability ionic liquids.A new class of stationary phases for gas chromatography. *Analytical Chemistry*, 75(18), 4851-4858.

Armand, M., Endres, F., MacFarlane, D. R., Ohno, H., & Scrosati, B. (2011).Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. *Materials for sustainable energy: a collection of peer-reviewed research and review articles from Nature Publishing Group*, 129-137.

Armstrong, D. W., He, L., & Liu, Y. S. (1999).Examination of ionic liquids and their interaction with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography. *Analytical chemistry*, 71(17), 3873-3876.

Aronstein, K. A., & Murray, K. D. (2010).Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S20-S29.

Aronstein, K. A., Murray, K. D., & Saldivar, E. (2010).Transcriptional responses in honey bee larvae infected with chalkbrood fungus. *BMC genomics*, 11(1), 1-12.

B. Lin et C. S. Vasam. (2005) «Metal-containing ionic liquids and ionic liquid crystals based on imidazolium moiety,» *Journal of organometallic chemistry*, vol. 690, no 15, pp. 3498-3512.

Bailey, L. (1964). The 'Isle of Wight disease': the origin and significance of the myth. *Bee World*, 45(1), 32-37.

Bailey, L. (1968). Honey bee pathology. *Annual review of entomology*, 13(1), 191-212.

Bee. J., 112: 130 - 131.

Bendiab, M. S. A. T., Kadi, M. H., Benabdallah, M. T., Bekka, M. A., & Makhoukhi, M. B. (2014).*Les Liquides Ioniques & Le D2ehpa/Tbp Dans L'extraction Liquide-Liquide De Zn (Ii), Cd (Ii) & Hg (Ii)* (Doctoral Dissertation, Université De Tlemcen).

Berthod, A., He, L., & Armstrong, D. W. (2001).Ionic liquids as stationary phase solvents for methylated cyclodextrins in gas chromatography. *Chromatographia*, 53(1), 63-68.

Bi, K., Huang, H., Gu, W., Wang, J., & Wang, W. (2008). Phylogenetic analysis of Spiroplasmas from three freshwater crustaceans (*Eriocheirsinensis*, *Procambarus clarkia* and *Penaeus vannamei*) in China. *Journal of invertebrate pathology*, 99(1), 57-65.

Billard, I., & Lagrost, C. (2020). Liquides ioniques, espoirs et raison, de la recherche à l'industrie. *Techniques de l'Ingénieur. Physique Chimie*.

Billard, I., Moutiers, G., Labet, A., El Azzi, A., Gaillard, C., Mariet, C., & Lützenkirchen, K. (2003). Stability of divalent europium in an ionic liquid: Spectroscopic investigations in 1-methyl-3-butylimidazolium hexafluorophosphate. *Inorganic chemistry*, 42(5), 1726-1733.

Billy, E. (2012). Application des liquides ioniques à la valorisation des métaux précieux par une voie de chimie verte (*Doctoral dissertation*, Grenoble).

Bissett, J. (1988). Contribution toward a monograph of the genus *Ascospaera*. *Canadian Journal of Botany*, 66(12), 2541-2560.

Blanchard, L. A., Hancu, D., Beckman, E. J., & Brennecke, J. F. (1999). Green processing using ionic liquids and CO₂. *Nature*, 399(6731), 28-29.

Blanchard-Laville, C. (1999). L'approche clinique d'inspiration psychanalytique: enjeux théoriques et méthodologiques. *Revue française de pédagogie*, 9-22.

Bonhote, P., Dias, A. P., Papageorgiou, N., Kalyanasundaram, K., & Grätzel, M. (1996). Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorganic chemistry*, 35(5), 1168-1178.

Brennecke, J. F., & Maginn, E. J. (2001). Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing. American Institute of Chemical Engineers. *AIChE Journal*, 47(11), 2384.

Brizard, A., & Albisetti, J. (1982). Notions essentielles de pathologie apicole: vade-mecum de l'apiculteur. *Opida*.

Brown, B. V. (1993). Taxonomy and preliminary phylogeny of the parasitic genus *Apocephalus*, subgenus *Mesophora* (Diptera: Phoridae). *Systematic entomology*, 18(3), 191-230.

Brown, B. V. (1997). Revision of the Apocephalus atrophilus-group of ant-decapitating flies (Diptera: Phoridae). Revisión del grupo atrophilus del género Apocephalus de moscas decapitadoras de hormigas (Diptera: Phoridae). *Contributions in Science (Los Angeles)*, (468), 1-60.

Buawangpong, N., de Guzman, L. I., Khongphinitbunjong, K., Frake, A. M., Burgett, M., & Chantawannakul, P. (2015). Prevalence and reproduction of *Tropilaelaps mercedesae* and *Varroa destructor* in concurrently infested *Apis mellifera* colonies. *Apidologie*, 46(6), 779-786.

Burgett, M., Akwatanakul, P., & Morse, R. A. (1983). *Tropilaelaps clareae*: a parasite of honeybees in south-east Asia. *Bee world*, 64(1), 25-28.

Cammarata, L., Kazarian, S. G., Salter, P. A., & Welton, T. (2001). Molecular states of water in room temperature ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3(23), 5192-5200.

Carda-Broch, S., Berthod, A., & Armstrong, D. W. (2003). Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 375(2), 191-199.

Chahbar, M. (2017). Principales maladies et ennemis de l'abeille domestique *Apis mellifera* L., 1758 en Algérie (Doctoral dissertation).

Charrière, J. D., Dietemann, V., & Dainat, B. (2018). Guide de la santé de l'abeille.

Chen, Y., & Evans, J. D. (2021). Honey Bee Fungal Diseases. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*, 295-305.

Chiappe, C., & Pieraccini, D. (2005). Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 18(4), 275-297.

Chowdhury, S., Mohan, R. S., & Scott, J. L. (2007). Reactivity of ionic liquids. *Tetrahedron*, 63(11), 2363-2389.

Clough, M. T., Crick, C. R., Gräsvik, J., Hunt, P. A., Niedermeyer, H., Welton, T., & Whitaker, O. P. (2015). A physicochemical investigation of ionic liquid mixtures. *Chemical science*, 6(2), 1101-1114.

Clough, M. T., Geyer, K., Hunt, P. A., Son, S., Vagt, U., & Welton, T. (2015). Ionic liquids: not always innocent solvents for cellulose. *Green Chemistry*, 17(1), 231-243.

Coleman, D., & Gathergood, N. (2010). Biodegradation studies of ionic liquids. *Chemical Society Reviews*, 39(2), 600-637.

Colin, M. E., de Lahitte, J. D., Larribau, E., & Boué, T. (1989). Activité des huiles essentielles de Labiées sur *Ascophaera apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie*, 20(3), 221-228.

Colin, M.E. 1999. Intoxications. In *Bee Disease Diagnosis, Options Méditerranéennes*, 25, série B (ed M. E. Colin, B. Ball, M. Kilani), pp. 167–175. Ciheam, Saragoss.

Constans Aubert, A., Alonso Espadalé, R. M., & Pérez Nicolás, J. (2008). Utilización de los equipos de protección individual frente al riesgo biológico por el personal sanitario. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, 54(210), 35-45.

Contreras Moreno, V. (2016). Captage et valorisation du CO₂ par voie chimique: application à la synthèse de carbonates cycliques à partir d'époxydes (*Doctoral dissertation*, Rouen, INSA).

Cooper, E. I., & Angell, C. A. (1983). Versatile organic iodide melts and glasses with high mole fractions of LiI: glass transition temperatures and electrical conductivities. *Solid State Ionics*, 9, 617-622.

Core, A., Runckel, C., Ivers, J., Quock, C., Siapno, T., DeNault, S., ... & Hafernik, J. (2012). A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly *Apocephalus borealis*. *PloS one*, 7(1), e29639.

Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., ... & Lipkin, W. I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848), 283-287.

Cristina Rossi, A., & Mullin, P. (2012). The etiology of maternal mortality in developed countries: a systematic review of literature. *Archives of gynecology and obstetrics*, 285(6), 1499-1503.

De Graaf D.C., Alippi A.M., Antunez K., Aronstein K.A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D.W., Evens J.D., Foster L.J., Funhfhhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K.D., Nguyen B.K., Poppinga L., Spivak M., vanEngelsdorp D., Wilkins S. and Genersch E., 2013. Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural research*, 52(1), 27p. DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.11

Dingmann D.W. Stahly D.P., 1983. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 (4):860-869.

Dussaubat-Arriagada, C. M. (2012, December). Effets de Nosemaceranae (Microsporidia) sur la santé de l'abeille domestique *Apis mellifera* L.: changements physiologiques et comportementaux. Avignon.

Dzyuba, S. V., & Bartsch, R. A. (2002). Influence of structural variations in 1-alkyl (aralkyl)-3-methylimidazolium hexafluorophosphates and bis(trifluoromethylsulfonyl)imides on physical properties of the ionic liquids. *ChemPhysChem*, 3(2), 161-166.

Earle, M. J., Esperança, J. M., Gilea, M. A., Canongia Lopes, J. N., Rebelo, L. P., Magee, J. W., ... & Widegren, J. A. (2006). *The distillation and volatility of ionic liquids.* *Nature*, 439(7078), 831-834.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW).(2013). Scientific Opinion on the risk of entry of *Aethinatumida* and *Tropilaelaps* spp. in the EU. *EFSA Journal*, 11(3), 3128.

Egorova, K. S., Gordeev, E. G., & Ananikov, V. P. (2017). Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine. *Chemical Reviews*, 117(10), 7132-7189.

Emmerich, I. U., & Christian, A. (2021). Parasitellusfucorum in the debris of *Apis mellifera*-a risk of confusion with *Tropilaelaps* spp. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/nutztiere*, 49(1), 60-64.

Endres, F., & El Abedin, S. Z. (2006). Air and water stable ionic liquids in physical chemistry. *Physical chemistry chemical physics*, 8(18), 2101-2116.

Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*, 292(5819), 154-156.

Fatiha, M. E. R. K. A. N. E., & SOUAD, B. D. (2019). Etude morphologique et physiologique d'une collection de variétés de lentille (*Lens culinaris*) dans la zone de haut Chélif.

Faucon, J. P., & Jeanne, F. (2003). Practical guidelines for beekeeping. Health.American foulbrood [*Paenibacillus larvae larvae*]. *Bulletin Technique Apicole* (France).

Faucon, J. P., & Chauzat, M. P. (2008). Varroase et autres maladies des abeilles: Causes majeures de mortalité des colonies en France. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 161(3), 257-263.

Fernandez, N., & Coineau, Y. (2007). *Maladies, parasites et autres ennemis de l'abeille mellifère*. Atlantica.

Ferraz, R., Teixeira, V., Rodrigues, D., Fernandes, R., Prudêncio, C., Noronha, J. P., ... & Branco, L. C. (2014). Antibacterial activity of Ionic Liquids based on ampicillin against resistant bacteria. *Rsc Advances*, 4(9), 4301-4307.

Ferron, P. (1975). Les champignons entomopathogènes (1).

Florio, W., Becherini, S., D'Andrea, F., Lupetti, A., Chiappe, C., & Guazzelli, L. (2019). Comparative evaluation of antimicrobial activity of different types of ionic liquids. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109907.

Florio, W., Becherini, S., D'Andrea, F., Lupetti, A., Chiappe, C., et Guazzelli, L. (2019). Comparative evaluation of antimicrobial activity of different types of ionic liquids. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109907.

Fluri, P., Herrmann, M., Imdorf, A., Bühlmann, G., & Charrière, J. D. (1998). Santé et maladies des abeilles Connaissances de base. *Communication du Centre Suisse de Recherche Apicole*, (33).

Forsgren, E., & Fries, I. (2010). Comparative virulence of *Nosemaceranae* and *Nosemaapis* in individual European honey bees. *Veterinary parasitology*, 170(3-4), 212-217.

Fraser, K. J., & MacFarlane, D. R. (2009). Phosphonium-based ionic liquids: An overview. *Australian journal of chemistry*, 62(4), 309-321.

Fries, I. (1993). Nosemaapis—a parasite in the honey bee colony. *Bee World*, 74(1), 5-19.

Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniazek, N. J. (1996). Nosemaceranae n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32(3), 356-365.

Gasparich, G. E., Whitcomb, R. F., Dodge, D., French, F. E., Glass, J., & Williamson, D. L. (2004). The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 893-918.

Ghomari, F. N., Kouache, B., Arous, A., & Cherchali, S. (2014). Effet de traitement par fumigation du thym (*Thymus vulgaris*) sur le *Varroa destructor* agent de la varroase des abeilles. *Nature & Technology*, (10), 34.

Gillet P., Boel L. et Jacobs J., 2009. Bactériologie médicale tropicale (notes pratiques). Post-graduat en médecine tropicale et santé internationale Module 1 & Module 2, Institut de médecine tropicale, Nationalestraat, 155 B -2000 Antwerpen, pp: 8-11

Gilliam, M., Taber III, S., Lorenz, B. J., & Prest, D. B. (1988). Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(2), 314-325.

Greaves, T. L., & Drummond, C. J. (2008). Protic ionic liquids: properties and applications. *Chemical reviews*, 108(1), 206-237.

Greaves, T. L., & Drummond, C. J. (2015). Protic ionic liquids: evolving structure–property relationships and expanding applications. *Chemical reviews*, 115(20), 11379-11448.

Greaves, T. L., Weerawardena, A., Fong, C., & Drummond, C. J. (2007). Many protic ionic liquids mediate hydrocarbon-solvent interactions and promote amphiphile self-assembly. *Langmuir*, 23(2), 402-404.

Greaves, T. L., Weerawardena, A., Krodkiewska, I., & Drummond, C. J. (2008).Protic ionic liquids: physicochemical properties and behavior as amphiphile self-assembly solvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(3), 896-905.

Hafsaoui K, Tahraoui A (2019).Contribution a l'étude du déclin de la population des abeilles en Algérie

Haynes W.C., 1972. The catalase test, an aid in the identification of *Bacillus larvae*. *Am.*

Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., ...& Berkeley, R. C. W. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 46(1), 270-279.

Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., & Meana, A. (2007).Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosemaceranae* (Microsporidia). *Journal of invertebrate pathology*, 94(3), 211-217.

Higes, M., Martín, R., & Meana, A. (2006).*Nosemaceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology*, 92(2), 93-95.

Hirao, M., Sugimoto, H., & Ohno, H. (2000). Preparation of novel room- temperature molten salts by neutralization of amines. *Journal of the Electrochemical Society*, 147(11), 4168.

Holbrey, J. D., & Rogers, R. D. (2002, August). Clean synthesis of 1, 3-dialkylimidazolium ionic liquids. In *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* (Vol. 224, pp. U612-U612). 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA: AMER CHEMICAL SOC.

Holbrey, J. D., Seddon, K. R., & Wareing, R. (2001).A simple colorimetric method for the quality control of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquid precursors. *Green Chemistry*, 3(1), 33-36.

Huddleston, J. G., Visser, A. E., Reichert, W. M., Willauer, H. D., Broker, G. A., & Rogers, R. D. (2001).Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room

temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green chemistry*, 3(4), 156-164.

Huddleston, J. G., Willauer, H. D., Swatloski, R. P., Visser, A. E., & Rogers, R. D. (1998). Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean' liquid-liquid extraction. *Chemical Communications*, (16), 1765-1766.

Ibrani, M., Ahma, L., Hamiti, E., & Haxhibeqiri, J. (2011). Derivation of electromagnetic properties of child biological tissues at radio frequencies. *Progress In Electromagnetics Research Letters*, 25, 87-100.

James, R. R., & Pitts-Singer, T. L. (2008). The problem of disease when domesticating bees. *Bee pollination in agricultural ecosystems*.

Karaman, M., Vraneš, M., Tot, A., Papović, S., Miljaković, D., Gadžurić, S., & Ignjatov, M. (2020). Ionic liquids as potentially new antifungal agents against *Alternaria* species. *Rsc Advances*, 10(38), 22318-22323.

Karim, S. M., Rahman, M. S., & Hossain, M. I. (2011, December). A new approach for LSB based image steganography using secret key. In *14th international conference on computer and information technology (ICCIT 2011)* (pp. 286-291). IEEE.

Khalifa, S. A., Elshafiey, E. H., Shetaia, A. A., El-Wahed, A. A. A., Algethami, A. F., Musharraf, S. G., ... & El-Seedi, H. R. (2021). Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*, 12(8), 688

Kilani, M. 1999. Nosemosis. In *Bee Disease Diagnosis, Options Méditerranéennes*, 25, série B (ed. M.E. Colin, B. Ball, M. Kilani), pp. 9-24. Saragosse, CIHEAM.

Kongpitak, P., Polgár, G., Heine, J., & Bayer Healthcare, A. G. (2008). The efficacy of Bayvarol® and Check Mite® in the control of *Tropilaelaps mercedesae* in the European honey bee (*Apis mellifera*) in Thailand. *Apiacta*, 43, 12-16.

Lefort, T. (2019). Réseaux époxy/liquide ionique avec et sans anhydride: Etude des mécanismes de polymérisation et des propriétés diélectriques (*Doctoral dissertation*, Université de Lyon).

Lin, I. J., & Vasam, C. S. (2005). Metal-containing ionic liquids and ionic liquid crystals based on imidazolium moiety. *Journal of organometallic chemistry*, 690(15), 3498-3512.

Liu, N. N., Ren, Z. Y., Ren, Q. D., Chang, Z. G., Li, J. L., Li, X. A., ... & Xing, X. M. (2022). Full length transcriptomes analysis of cold-resistance of *Apis cerana* in Changbai Mountain during overwintering period. *Gene*, 830, 146503.

Livi, S. (2010). Ionic liquids: multifunctional agents of the polymer matrices (*Doctoral dissertation, Lyon, INSA*).

Mackowiak, C. (2009). Le déclin de l'abeille domestique, *Apis mellifera* en France (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).

Madau, M. (2021). Hydrogels adaptatifs stimuli-sensibles (température et lumière) à base d'acide hyaluronique (HA) (*Doctoral dissertation, Normandie*).

Marcilla, R., Alberto Blazquez, J., Rodriguez, J., Pomposo, J. A., & Mecerreyes, D. (2004). Tuning the solubility of polymerized ionic liquids by simple anion-exchange reactions. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(1), 208-212.

Medina-Flores, C. A., Medina, L. A. M., & Guzmán-Novoa, E. (2022). Effect of hygienic behavior on resistance to chalkbrood disease (*Ascosphaera apis*) in Africanized bee colonies (*Apis mellifera*). *Rev Mex Cienc Pecu*, 13(1), 225-239.

Meeus, I., Vercruyssen, V., & Smagghe, G. (2012). Molecular detection of *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma melliferum* in bees. *Journal of invertebrate pathology*, 109(1), 172-174.

Metropolitaine, U. E. F. (1991). *Campus Veterinaire De Lyon* (Doctoral Dissertation, Université Claude-Bernard-Lyon I).

Mikio, N., Hiroto, M., Koji, M., & Kunio, K. (2012). Consideration on Kerguelen-Davis Oscillation Index (KDOI) influencing variability on environmental ecosystem in the Prydz Bay region, east Antarctica: data exploration.

Nishida, T., Ban, T., & Kobayashi, N. (2003). High-color-rendering light sources consisting of a 350-nm ultraviolet light-emitting diode and three-basal-color phosphors. *Applied physics letters*, 82(22), 3817-3819.

OIE Terrestrial Manual. 2008. Small hive beetle infestation (*Aethinatumida*), pp. 415–418.

OIE., 2013.Chapter 2.2.4 *Nosemosis of honey bees*. In: (OIE.) Office international des epizooties, Manual of standarts for diagnostic test and vaccines 2014. Volume 1, Paris, France, 6. <http://www.oie.int>

OIE., 2014.Chapter 2.2.2. *American foulbrood of honey bees*. In: (OIE.) Office international des epizooties, Manual of standarts for diagnostic test and vaccines 2014. Paris, France, 15p.

Otterstatter, M. C., Whidden, T. L., & Owen, R. E. (2002).Contrasting frequencies of parasitism and host mortality among phorid and conopid parasitoids of bumblebees.*Ecological Entomology*, 27(2), 229-237.

Paris, L., Thomarat, J. C., Gastaldi, C., Dubois, E., Schurr, F., & François, S. (2021, October). Résultats de l'étude exploratoire ECLEA sur les cas de loque européenne «atypique» en France. In *Journéesvétérinairesapicoles*.ONIRIS.

Pawlowska, B., Telesiński, A., & Biczak, R. (2019).Phytotoxicity of ionic liquids.*Chemosphere*, 237, 124436.

Pernak, J., Sobaszekiewicz, K., & Mirska, I. (2003). Anti-microbial activities of ionic liquids. *Green Chemistry*, 5(1), 52-56.

Poole, C. F., Kersten, B. R., Ho, S. S., Coddens, M. E., & Furton, K. G. (1986).Organic salts, liquid at room temperature, as mobile phases in liquid chromatography.*Journal of Chromatography A*, 352, 407-425.

Poole, S. K., Shetty, P. H., & Poole, C. F. (1989).Chromatographic and spectroscopic studies of the solvent properties of a new series of room-temperature liquid tetraalkylammoniumsulfonates.*Analyticachimica acta*, 218, 241-264.

Razin, S., Yogev, D., & Naot, Y. (1998).Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.*Microbiology and molecular biology reviews*, 62(4), 1094-1156.

Regassa, L. B., & Gasparich, G. E. (2006).Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity. *Front Biosci*, 11(1), 2983-3002.

Reynaldi, F. J., Lucia, M., & Garcia, M. L. G. (2015). Ascospaera apis, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees (*Xylocopa augusti*): *cFirst report in South Ameria*. *Revista iberoamericana de micologia*, 32(4), 261-264.

Ritter, W., & Schneider-Ritter, U. (1988). Differences in biology and means of controlling *Varroajacobsoni* and *Tropilaelapsclareae*, two novel parasitic mites of *Apis mellifera*. *Africanized honey bees and bee mites/editors, Glen R. Needham...[et al.]*.

Roudel, M. (2013). Diversité génétique et recherche de facteurs de virulence de *Nosemaceranae*, parasite de *l'abeille mellifère* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).

S. Wilkes et M. J. Zaworotko, «Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium. Sammataro, D., Gerson, U., Needham, G. (2000). Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Annu.Rev. Entimol* 45, 519–54.

Schwarz, R. S., Teixeira, E. W., Tauber, J. P., Birke, J. M., Martins, M. F., Fonseca, I., & Evans, J. D. (2014).Honey bee colonies act as reservoirs for two *Spiroplasma* facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. *Microbiology Open*, 3(3), 341-355.

Sevim, A., Akpınar, R., Karaoğlu, Ş. A., Bozdeveci, A., & Sevim, E. (2022). Prevalence and phylogenetic analysis of *Ascospaera apis* (Maassen ex Claussen) LS Olive & Spiltoir (1955) isolates from honeybee colonies in Turkey. *Biologia*, 1-11.

Shaevitz, J. W., Lee, J. Y., & Fletcher, D. A. (2005). *Spiroplasma* swim by a processive change in body helicity. *Cell*, 122(6), 941-945.

Shimanuki, H., & Knox, D. A. (2000).Diagnosis of honey bee diseases.United States Department of Agriculture.*Agriculture Handbook*, (690).

Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M., &Goto, M. (2020). An overview on the toxicological properties of ionic liquids toward microorganisms. *Biotechnology journal*, 15(4), 1900073.

Skou, J. P. (1986). Notes on habitats, morphology and taxonomy of spore cyst fungi. In International Apicultural Congress (pp. 260-264).*International Federation of Beekeepers Association, Apimondia*.

Spiltoir, C. F., & Olive, L. S. (1955).A reclassification of the genus *Pericystis* Betts.*Mycologia*, 47(2), 238-244.

Stephen, W. P., Bohart, G. E., & P. F. (1969).The Biology and External Morphology of Bees with a Synopsis of the Genera of North-western America.

Stephen, W. P., Vandenberg, J. D., & Fichter, B. L. (1981).Etiology and epizootiology of chalkbrood in the leafcutting bee, *Megachilerotundata* (Fabricius), with notes on *Ascospaera species*.

Stepnowski, P., Nichthausser, J., Mrozik, W., & Buszewski, B. (2006).Usefulness of π ... π aromatic interactions in the selective separation and analysis of imidazolium and pyridinium ionic liquid cations.*Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(8), 1483-1491.

Studzińska, S., Kowalkowski, T., & Buszewski, B. (2009).Study of ionic liquid cations transport in soil. *Journal of hazardous materials*, 168(2-3), 1542-1547

Sugden, S., & Wilkins, H. (1929). CLXVII.—The parachor and chemical constitution. Part XII. Fused metals and salts.*Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1291-1298.

Tantray, A. A., Rode, N. R., Shinde, S. S., Nandre, V., Kodam, K. M., & Terdale, S. S. (2022). Influence of the alkyl chain length on the physicochemical properties and microbial biocompatibility of phosphonium based fatty acid ionic liquids. *Canadian Journal of Chemistry*, 100(1), 35-45.

Tantray, A. A., Rode, N. R., Shinde, S. S., Nandre, V., Kodam, K. M., et Terdale, S. S. (2022). Influence of the alkyl chain length on the physicochemical properties and microbial biocompatibility of phosphonium based fatty acid ionic liquids. *Canadian Journal of Chemistry*, 100(1), 35-45.

Tihelka, E., Hafernik, J., Brown, B. V., Quock, C., Zink, A. G., Croppi, S., ... & Zhu, C. D. (2021).Global invasion risk of *Apocephalus borealis*, a honey bee parasitoid.*Apidologie*, 52(6), 1128-1140.

Trachtenberg, S., Gilad, R., & Geffen, N. (2003). The bacterial linear motor of *Spiroplasma melliferum* BC3: from single molecules to swimming cells. *Molecular microbiology*, 47(3), 671-697.

Van Valkenburg, M. E., Vaughn, R. L., Williams, M., & Wilkes, J. S. (2005).Thermochemistry of ionic liquid heat-transfer fluids.*Thermochimica Acta*, 425(1-2), 181-188.

Vidal-Naquet, P. (2012). Les assassins de la mémoire: " Un Eichmann de papier" et autres essais sur le révisionnisme. La Découverte.

Visser, A. E., Swatloski, R. P., & Rogers, R. D. (2000). pH-dependent partitioning in room temperature ionic liquids provides a link to traditional solvent extraction behavior. *Green Chemistry*, 2(1), 1-4.

Visser, A. E., Swatloski, R. P., Griffin, S. T., Hartman, D. H., & Rogers, R. D. (2001). Liquid/liquid extraction of metal ions in room temperature ionic liquids. *Separation Science and Technology*, 36(5-6), 785-804.

Visser, A. E., Swatloski, R. P., Reichert, W. M., Mayton, R., Sheff, S., Wierzbicki, A., ... & Rogers, R. D. (2001). Task-specific ionic liquids for the extraction of metal ions from aqueous solutions. *Chemical Communications*, (1), 135-136.

Wasserscheid, P., & Keim, W. (2000). Ionic liquids—new “solutions” for transition metal catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(21), 3772-3789.

Wilkes, J. S., & Zaworotko, M. J. (1992). Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (13), 965-967.

Ye, M., Li, X., Ren, Z., Tarequl, I. M., Ji, C., Ji, J., ... et Yang, S. (2022). Identification of gallic acid in *Trapa bispinosa* as an effective inhibitor of the vegetative growth and spore germination of *Paenibacillus* larvae. *Apiology*, 53(2), 1-13.

Yoshizawa, M., Tamura, M., & Fujita, M. (2006). Diels-Alder in aqueous molecular hosts: unusual regioselectivity and efficient catalysis. *Science*, 312(5771), 251-254.

Zein El Abedin, S., Mustafi, E. M., Himmelman, R., Natter, H., & Endres, F. (2006). Electrodeposition of nano- and microcrystalline aluminium in three different air and water stable ionic liquids. *Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 7(7), 1535-1543.

Zeng, X., Zhou, T., Leng, C., Zang, Z., Wang, M., Hu, W., ...& Zhou, M. (2017). Performance improvement of perovskite solar cells by employing a CdSe quantum dot/PCBM composite as an electron transport layer. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(33), 17499-17505.

Zhang, G. R., Munoz, M., & Etzold, B. J. (2016). Accelerating Oxygen- Reduction Catalysts through Preventing Poisoning with Non- Reactive Species by Using Hydrophobic Ionic Liquids. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(6), 2257-2261.

Zhou, Z. B., Matsumoto, H., & Tatsumi, K. (2005). Low- melting, low- viscous, hydrophobic ionic liquids: aliphatic quaternary ammonium salts with perfluoroalkyltrifluoroborates. *Chemistry—A European Journal*, 11(2), 752-766.

Zlitni, A., Gowrishankar, G., Steinberg, I., Haywood, T., & Sam Gambhir, S. (2020). Maltotriose-based probes for fluorescence and photoacoustic imaging of bacterial infections. *Nature communications*, 11(1)

ملخص

شهدت السنوات الأخيرة اهتمامًا متجددًا باستخدام السوائل الأيونية (IL) للاستخراج. إلى جانب هذا النمو للسوائل الأيونية، هناك قلق كبير بشأن تأثير ILs على استخراج الكتلة الحيوية. لذلك كان الهدف من هذا العمل هو دراسة التأثير المثبط للسوائل الأيونية المُصنَّعة، ولا سيما بولي ديكيشينيك، ديكيشينيك، نيو 3، الليثيوم إيميدازيوم، الجسم الأحادي مع Mn2، الجسم الأحادي Mn2 و ThiaCl-OH. تم تنفيذ أنشطة مضادة للبكتيريا والفطريات ضد يرقات Paenibacillus و Ascospheara Apis وهما من مسببات الأمراض الرئيسية التي تؤثر على نحل العسل Apis mellifera intermissa بعد عزله وتحديد السبب في أضرار جسيمة في تربية النحل لدينا بعد عزله وتحديد. أظهرت النتائج أن التأثيرات المثبطة لـ poly Decationic، Decationic، New 3، LI ThiaCl-OH، Lithium، poly Decationic، Decationic، New 3، Lithium (يرقات Paenibacillus) والتأثيرات المثبطة لـ poly Decationic، Decationic، New 3، Lithium، imedazium، Mn2، mono particle with Mn2، الجسم المفرد لم يتم تمديد Mn2 و ThiaCl-OH ضد الفطريات (Ascospheara) مع منطقة خالية من التثبيط في جميع الاختبارات التي أجريت. تمثل هذه النتيجة التأثير غير المثبط لـ ILs على الفطريات والبكتيريا التي تم اختبارها في هذه الدراسة. **الكلمات المفتاحية:** السوائل الأيونية، نحل العسل، الفطريات والبكتيريا.

Résumé

Ces dernières années ont vu un regain d'intérêt pour l'application des liquides ioniques (LI) à l'extraction. Parallèlement à cette croissance des liquides ioniques, l'effet des IL sur l'extraction de la biomasse suscite de grandes inquiétudes. Le but de ce travail était donc d'étudier l'effet inhibiteur des liquides ioniques synthétisés, en particulier le poly Décationique, le Décationique, le New 3, le Lithium imédazium, la mono particule avec Mn2, la mono particule son Mn2 et le ThiaCl-OH. Des activités antibactériennes et antifongiques ont été réalisées contre *Paenibacillus larvae* et *Ascospheara Apis* qui sont les principaux pathogènes qui touche l'abeille domestique *Apis mellifera intermissa* après avoir isolé et identifié et cause des dégâts grave dans notre cheptel apicole après avoir isolés et identifiés. Les résultats ont montré que les effets inhibiteurs de poly Décationique, Décationique, New 3, LI ThiaCl-OH contre la bactérie (*Paenibacillus larvae*) et les effets inhibiteurs de poly Décationique, le Décationique, le New 3, le Lithium imédazium, la mono particule avec Mn2, la mono particule son Mn2 et le Thia Cl-OH contre le champignon (*Ascospheara Apis*) étaient non étendus avec une zone d'inhibition nulle dans les tous les tests réalisé. Ce résultat représente l'effet non inhibiteur des LIs sur le champignon et la bactérie testées dans cette étude. **Les mots clé :** LI : Liquide ionique, *Paenibacillus larvae*, *Ascospheara Apis*, l'abeille domestique *Apis mellifera intermissa*

Summary

Recent years have seen a resurgence of interest in the application of ionic liquids (ILs) to extraction. Along with this growth of ionic liquids, there is great concern about the effect of ILs on biomass extraction. The aim of this work was therefore to study the inhibitory effect of synthesized ionic liquids, in particular poly Decationic, Decationic, New 3, Lithium imedazium, mono particle with Mn2, mono particle its Mn2 and ThiaCl-OH. Antibacterial and antifungal activities were realized against *Paenibacillus larvae* and *Ascospheara Apis* which are the main pathogens that affect the honey bee *Apis mellifera intermissa* after isolating and identifying and cause serious damage in our bee population. The results showed that the inhibitory effects of poly Decationic, Decationic, New 3, LI ThiaCl-OH against the bacterium (*Paenibacillus larvae*) and the inhibitory effects of poly Decationic, Decationic, New 3, Lithium imedazium, Mono particle with Mn2, Mono particle with Mn2 and ThiaCl-OH against the fungus (*Ascospheara Apis*) were non-extended with zero zone of inhibition in all the tests performed. This result represents the non-inhibitory effect of ILs on the fungus and the bacterium tested in this study. **Keywords :** Ionic liquids (ILs), *Paenibacillus larvae*, *Ascospheara Apis*, honey bee *Apis mellifera intermissa*