



**République Algérienne Démocratique et populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur**

**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'études pour l'obtention du diplôme**

**de Master académique en :**

**Filière : sciences agronomiques**

**Spécialité : production animale**

**Présenté par :- Mlle.RABBAS Sanaa**

**- Mme.NOURI Zahra**

**THÈME**

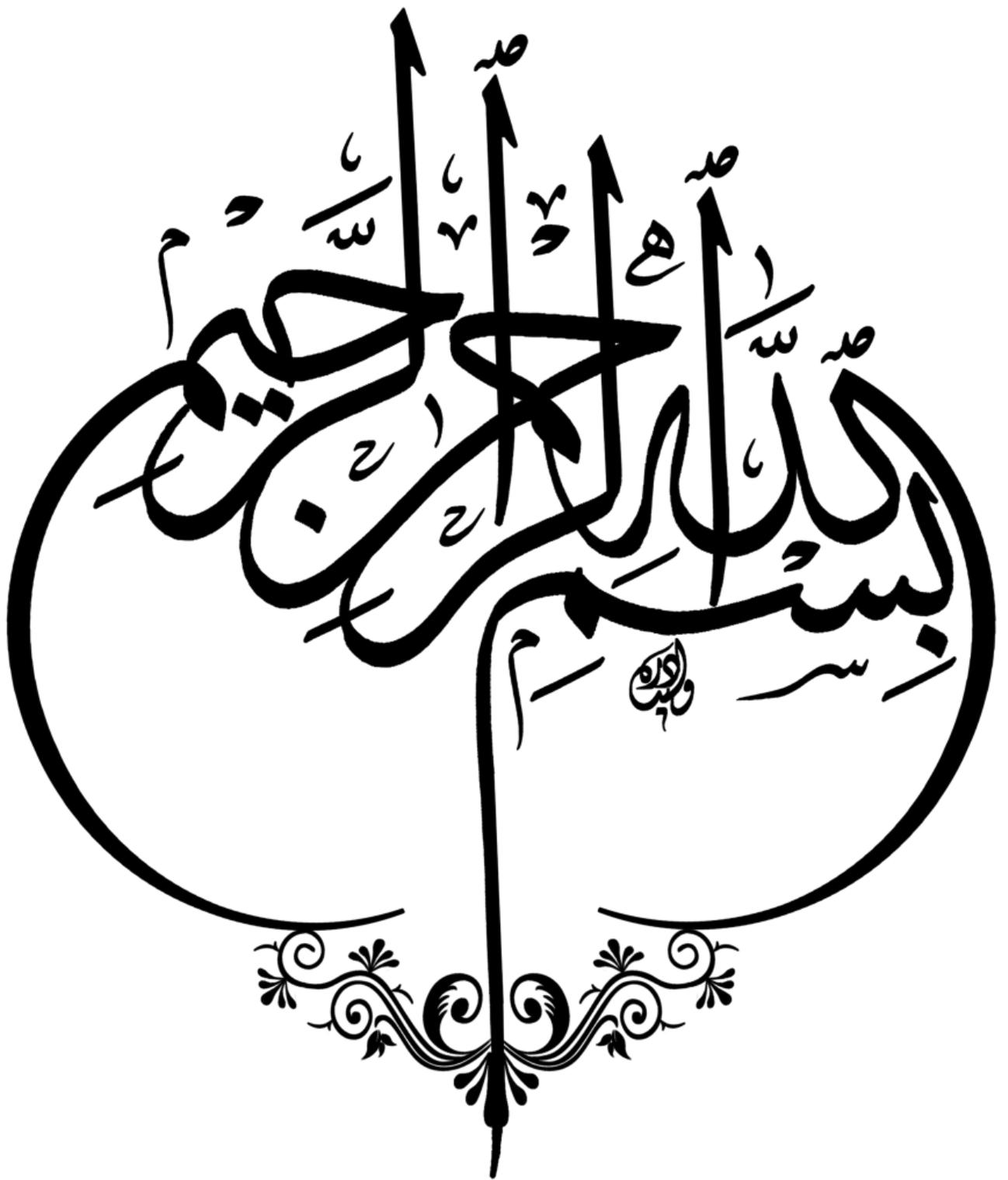
**Test de l'activité antifongique de l'huile essentielle de  
thym contre les champignons affectant l'abeille  
domestique *Apis mellifera***

**Soutenu le : 11/06/2023**

**Devant le jury :**

Dr. TEFIEL H.	Président	M.C.A	Univ-Tissemsilt
Dr. CHAHBAR .M	Encadrant	M.C.A	Univ-TissemsiltDr.
HALLAL N.	Examinatrice	M.C.B	Univ-Tissemsilt

**Année Universitaire : 2022/2023**





*Si l'abeille disparaissait de la surface du globe. l'homme  
n'aurait plus que quatre années à vivre. plus de  
pollinisation, plus  
d'herbes, plus d'animaux, plus  
d'HOMMES  
Albert Einstein*

# Remerciement

« Un nid d'abeilles ne se fait pas par une abeille toute seule »

*Louange à Allah qui a illuminé le chemin de la science et de la connaissance et m'a aidés à remplir ce devoir et m'a permis d'accomplir ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent particulièrement à notre encadrant **Dr CHAHBAR MOHAMED** qui a dirigé ce travail avec patience et abnégation et qui n'ont pas épargné pour ses précieux conseils et orientations.*

*A Melle HENNI Asma, Doctorante au département SNV nos remerciements Messieurs le président Dr TEFIEL H. et les membres de jury*

*Dr HALLAL N. d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Nous tenons à adresser nos remerciements les plus chaleureux et notre profonde gratitude à **Dr mehouel bentamra** praticien privé pour son soutien et son aide tout au long de ce travail.*

*Aussi, tous nos remerciements à tous les cadres de la Direction des Services Agricoles et les Subdivisions agricoles de la wilaya de Tissemsilt et particulièrement à **Mr zerrouki Abdelkader** pour son aide lors de ce travail.*

*Nous profitons de cette dernière occasion pour exprimer notre gratitude à tous les enseignants et le personnel de notre université*

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail :*

*Avant tout propos, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné la capacité et le courage pour réaliser ce travail.*

*A la mémoire de mon cher papa **NOURI MOHAMED** \*\* Qu'Allah l'accueille dans son vaste paradis\*\*, disparu trop tôt. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de ma part ...*

*A ma chère maman qui m'a appris le sens de la persévérance tout du long De mon étude, tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.*

*A mon époux **Bentamra** l'homme le plus éminent de ma vie, qui m'a soutenu et poussé à continuer mes études, de son sacrifice, de ses conseils et de ses encouragements et leur soutien moral et leur amour et mes enfants : **Maram , Aroua , Mohamed***

*A mes très chers sœurs et mes frères que dieu veuille toujours sur vous.*

*A ma chère amie **Gharbi omkhir** la sœur que ma mère n'a pas enfantée.*

*A mon binôme **Sanaa** avec qui j'ai passé des bons moments inoubliables.*

*A mes chères et adorables copines **khadidja et Sennia** .*

*A tous les étudiants de promotion de production Animale Et toute personne qui me connaît.*

**Zahra**



# Dédicace

*Avec l'aide de DIEU le puissant on a réussi ce travail, je me dédie ;*

*Mon père **RABBAS AHMED** que dieu lui fasse miséricorde, qui m'a honoré de porter son nom et qui a fourni le plus cher de son âme afin d'arriérer à un degré scientifique plus haut mais, malheureusement, il nous quitte avant de voir le fruit de sa plantation.*

*A ma chère mère, ma reine, ma vie, mon âme, et tous ce qui est joliedans cette vie.*

*A ma sœur **SOULEF** ma chaton et ses enfants ; **IYED ET ATHIR ET** ma niece **RIHAB**.*

*A mes frères **TOUFIK ET AZIZ** mes gardiensanges ;  
A toute la famille **RABBAS**.*

*A mon binôme **ZAHRA** avec qui j'ai passé des bons moments inoubliables.*

*A tous mes amis de promotion de 2 ème année master production animale ;*

*A toute personne qui occupe une placedans mon cœur.*



# Liste des tableaux

---

## Liste des tableaux

**Tableau 01 :** Classification de *Thymus lanceolatus* Desf. (Quezel et Santa (1963).

**Tableau 02 :** Découpages administratifs de la wilaya de Tissemsilt (DPAT, 2019).

**Tableau 03 :** Données pluviométriques (2010-2020) (DSA, 2021).

**Tableau 04:** Répartition de la population par dispersion (DPAT, 2019).

**Tableau 05:** volume de la main d'oeuvre (DSA, 2021).

**Tableau 06:** Cheptel animal existant dans la wilaya de Tissemsilt (2019/2020) (DSA, 2021).

**Tableau 07 :** Ressources hydriques dans la wilaya de Tissemsilt (DRE, 2021).

**Tableau 08:** Répartition des espèces dans la wilaya de Tissemsilt.

**Tableau 09:** Nombre apiculteur par commune dans la région de tissemsilt 2010-2022 (DSA, 2023).

**Tableau 10 :** Evolution de l'effectif des ruches dans la région de tissemsilt 2010-2022 (DSA, 2023).

**Tableau 11 :** La production de miel par commune.

**Tableau 12:** Résultats des maladies obtenues par la DSA.

**Tableau 13 :** Rendement on huile essentiel de thym.

**Tableau 14:** Resultat des HE de thym sur *A . apis*.

**Tableau 15:** Détermination des doses inhibitrices de l'huile essentielle de thym contre l'ascosphérose.

**Tableau 16:** Détermination des doses inhibitrices de l'hydrolat de l'huile essentielle de thym contre l'ascosphérose.

**Tableau 17 :** Groupement des concentrations homogènes d'huile essentielle avec son hydrolat.

## Liste des figures

---

### Liste des figures

**Figure 01 :** *Thymus lanceolatus. Desf*, avant et après inflorescence (**Khadir et al., 2013**).

**Figure 02 :** Unité industrielle typique de distillation à la vapeur pour l'extraction des huiles essentielles (**Masango, 2005**).

**Figure 03 :** Les étapes de croissance mycélienne dans une température optimale (25°C à 30°C). A, B et C : à 25°C ; D, E et F : à 30°C (**Chahbar, 2017**).

**Figure 04:** Des larves d'abeilles âgées de trois jours ont été infectées en étant nourries avec un régime contenant des spores. (A) témoin. (B) 72 heures après l'infection. (C) 78 heures après l'infection. (D) 6 jours après l'infection. (**Aronstein et Murray, 2010**).

**Figure 05 :** Les momies de l'ascosphérose sont blanches, brunes ou noires. (**Aronstein et Murray, 2010**).

**Figure 06 :** Un cadre de couvain provenant d'une colonie d'abeilles mellifères présentant des symptômes cliniques de l'ascosphérose. (**Jensen et al., 2013**).

**Figure 07 :** Les momies noires et blanches de l'ascosphérose. (**Jensen et al., 2013**).

**Figure 08 :** Images au microscope électronique à balayage de la fructification d'*Ascospaera apis* ; A. Fructification sphérique ; B. Fructification fissurée avec des boules de spores ; sporeballs ; C. Sporeballs avec plusieurs ascospores. (**Jensen et al., 2013**).

**Figure 09 :** Situation générale de la wilaya de Tissemsilt.

**Figure 10 :** Carte pluviométrique de la Wilaya de Tissemsilt (**DSA, 2021**).

**Figure 11:** Carte des pentes de la wilaya de Tissemsilt

**Figure 12:** Répartition de la population occupée par secteur de l'agriculture (**DPAT, 2019**).

**Figure 13:** Répartition de la superficie agricole par spéculation (compagne 2019/2020) (**DSA, 2021**).

**Figure 14:** Réseau hydrographique de la wilaya de Tissemsilt (**DRE, 2021**).

**Figure 15:** Carte de végétation de la wilaya de Tissemsilt.

## Liste des figures

---

**Figure 16:** Les espèces végétales présentées dans la wilaya Tissemsilt (**Sarmoum *et al.*, 2013**).

**Figure 17 :** *Thymus lanceolatus* Desf sèche.

**Figure 18 :** Situation géographique de la région de melaab source (**commune melaab 2023**).

**Figure 19:** Montage de distillation simple utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.

**Figure 20 :** Montage de type Clevenger utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.

**Figure 21 :** Aspect macroscopique d'*Ascosphaera apis*(**chahbar, 2017**).

**Figure 22 :** Aspect microscopique d'*Ascosphaera apis* (Gr X 400) (**chahbar, 2017**).

**Figure 23:** incuber les boites de pétri dans une étuve à 28°C.

**Figure 24:** pris les mesures de diamètre des disques.

**Figure 25:** la représentation de l'efficacité des vapeurs d'extraits de plantes dans l'inhibition de la croissance mycélienne du champignon (*ascosphaera apis*) sur le milieu. (**Krutmuang *et al.*, 2022**).

**Figure 26:** Evolution de nombre d'apiculteur dans la region de tissemsilt 2010-2022(**DSA 2023**).

**Figure 27:** Evolution de l'effectif des ruches dans la région de tissemsilt 2010-2022(**DSA, 2023**).

**Figure 28 :** Evolution de la production du miel dans la région de tissemsilt 2010-2022(**DSA 2023**).

**Figure 29:** Le rendement d'extraction d'huile essentiel par deux types d'hydrodistillation.

**Figure 30 :** *Ascosphaera Apis* après incubation, **A:** Observation macroscopique, **B :** Observation microscopique (**G X 40**).

**Figure 31 :** Résultat de test L'activité antifongique des huiles essentielles de thym contre d'*Ascosphaera Apis*.

**Figure 32:** Résultat de test L'activité antifongique de hydrolat huiles essentielles de thym contre d'*Ascosphaera Apis*.

**Figure 33 :** Schéma de la confrontation (champignon / huile essentielle) par deux méthodes in vitro.(**Boudegga, 2010**).

**Figure 34 :** Développement des témoins d'*Ascosphaera Apis* en présence des traitements dans la même étuve. A: présence d'HE, B: présence hydrolat ; C: aucun traitement.

## Liste des figures

---

**Figure 35 :** Les doses d'inhibition mycélienne de l'huile essentielle de thym.

**Figure 36:** Les doses d'inhibition mycélienne de l'hydrolat de l'huile essentielle de thym.

# Liste des abréviations

---

Liste des abréviations

**A. *Apis*** : *Ascospaera Apis*.

**HE** : huile essentielle.

**HY** : hydrolat.

**%** : pourcentage.

**DSA** : Direction des services agricole.

**TEH**:Theniet el had.

**CDF**:Consevation des forêts Tissemsilt.

**DPAT** : Direction de la programmation et suivi Budgétaires.

**DRE** : Direction des Ressources en Eau.

**B.B.N**: Borj bounaama.

**B.A.AEK**: Bordj Amir Abd kader.

**S. A** : Sidi Antri.

**S.B** :Sidi Boutchent.

**O. B** : Ouled besssem.

**D.L** : Dose létales.

# **Tables des matières**



# Table des matières

---

Tables des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

## Chapitre 01 : Généralité sur le thym

1.1. Généralité sur le thym	01
1.1.2. Description botanique de la plante	01
1.1.3. Classification de la plante	02
1.1.4. Principes actifs du thym	03
1.1.4.1. Phénols	03
1.1.4.2. Flavonoïdes	03
1.1.4.3. Tanin	03
1.1.4.4. Saponosides	03
1.1.4.5. Quinones	04
1.1.4.6. Alcaloïdes	04
1.1.5. Pharmacologie du <i>thymus lanceolatus</i> Desf	04
1.1.5.1. Activité antifongique	05
1.1.5.2. Activité antibactérienne	05
1.1.5.3. Activité antivirale	05
1.1.5.4. Activité antioxydante	05
1.1.5.5. Activité anti-inflammatoire	06
1.1.5.6. Autre activité pharmacologique	06
1.2. Méthode d'extraction des huiles essentielles	07
1.2.1. Méthodes conventionnelles d'extraction des huiles essentielles	07
1.2.1.1. Expression à froid	07
1.2.1.2. Extraction par solvant	08
1.2.1.3. La méthode de l'enfleurage	08
1.2.1.4. La distillation	08
1.2.1.5. Extraction avec des gaz supercritiques	09
1.2.2. Nouvelles méthodes d'extraction	09
1.2.2.1. Extraction assistée par micro-ondes	09
1.2.2.2. Extraction assistée par ultrasons	10

## Chapitre 02 : Généralité sur l'ascosphérose

2.1. Généralité sur l'ascosphérose	12
2.1.1. Historique et répartition géographique de l'ascosphérose	12
2.1.2. La position systématique de l'agent causal	13
2.2. Infection et multiplication	14
2.3. Symptômes	15
2.4. La bio-écologie de l'ascosphérose, causée par <i>ascosphaera apis</i>	15
2.4.1. Étude de la croissance mycélienne de champignon <i>ascosphaera apis</i>	15
2.5. Les facteurs de stress qui déclenchent la maladie	16
2.6. Facteurs favorisant l'apparition de l'ascosphérose	17
2.7. Pathogénèse	17
2.8. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques de <i>ascosphaera apis</i>	20

# Table des matieres

---

2.8.1. Le diagnostic macroscopique de l'ascosphérose chez apis mellifera	20
2.8.2. Diagnostic microscopique	21
2.8.3. Diagnostic biologique	22
2.9. Dégâts de l'ascosphérose	22
2.10. Lutte contre l'ascosphérose	23
2.11. Prévention et traitement	24

## Chapitre 03 : Présentation de la zone étude

3.1. Présentation de la région d'étude	26
3.1.1. Situation et limites géographiques	26
3.1.2. Daïras et communes	27
3.1.3. Climat	27
3.1.4. Pluviométrie	28
3.1.5. Relief	29
3.1.6. Les principaux indicateurs du secteur de l'agriculture	29
3.1.6.1. Population	30
3.1.6.2. Emploi agricole	30
3.1.6.3. Volume de la main d'oeuvre Campgne Agricole 2019/2022	31
3.1.6.4. Productions agricoles	31
3.1.6.5. Ressources animales	32
3.1.6.6. Potentialités hydriques	32
3.1.6.7. Ressources hydriques	33
3.2. Richesse de la région de tissemsilt en espèce végétale	33

## Chapitre 04 : Matériel et méthode

4.1. Etat de lieu	38
4.2. L'extraction de l'huile essentielle et récupération l'hydrolat	38
4.2.1. Récolte de thym	38
4.2.2. L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation	39
4.2.2.1. Hydro distillation (distillation simple)	39
4.2.2.2. Hydro distillation de type cleverger	40
4.2.3. Conservation des huiles essentielle	41
4.2.4. Calcul de rendement	41
4.3. Isolement et identification de champignon l'ascosphaera apis	42
4.3.1. Isolement de champignon	42
4.3.2. Purification	42
4.3.3. Méthode d'identification	42
4.3.3.1. Examen macroscopique	43
4.3.3.2. Examen microscopique	43
4.4. Test de l'activité antifongique sur ascosphaera apis	44
4.4.1. Préparation des doses (concentration) d'huile essentielle de thym sur l'ascosphérose	44
4.4.2. Préparation des doses (concentration) d'hydrolat de d'huile essentielle de thym sur l'ascosphérose	44
4.5. Test des concentrations de champignon	45

# Table des matieres

---

4.5.1. Ensemencement	45
4.5.2. L'incubation	45
4.5.3. La lecture	45
4.5.4. Taux d'inhibition	46
4.6. Analyses statistiques	47

## Chapitre 05 : Résultats et discussions

5.1. Etat de lieu	49
5.1.1. Répartition des apiculteurs sur les communes	49
5.1.2. Nombre des ruches pleines	51
5.1.3. La production de miel	52
5.1.3.1. La production du miel par commune	53
5.1.4. Les données sur les maladies et les ennemies	55
5.1.4.1. Méthode de prospection	55
5.1.4.2. Résultat des maladies prospectées par commune	56
5.1.5. Méthode d'identification des ruches	59
5.2. Détermination du rendement de l'huile essentielle	59
5.3. Test de l'activité antifongique d'HE contre ascosphaera apis	60
5.3.1. Exman macroscopique et microscopique	61
5.3.2. Résultats de test préliminaire des doses d'inhibitions	61
5.3.3. Le taux inhibition maximale	64
5.3.4. Période de traitement _taux d'inhibition	65
5.3.5. Les méthodes de traitement _ efficacité	65
5.3.6. Les doses _ taux inhibition	67
5.3.7. Effet de l'odeur et de la vapeur sur d'ascosphaera apis	68
5.3.8. Origine géographique de thym _ efficacité	69
5.3.9. Détermination des doses létales	70
5.3.10. Origine traitement _ taux inhibition	73
Conclusion et perspective	77
Annexe	102
Résumé	108

# **Introduction**

## Introduction

---

Les abeilles, ces "pharmaciennes ailées", nous offrent un produit qui est à la fois plaisant visuellement, gustativement et olfactivement, un aliment merveilleux et un médicament délicieux entièrement naturel. **(Donadieu, 2003)**.

L'apiculture occupe une place importante dans la vie des Algériens. Elle présente des intérêts socio-économiques, écologiques, religieux, nutritionnels et apithérapeutique. Ainsi, le développement du secteur apicole peut jouer un rôle crucial dans la diversification des activités agricoles en Algérie **(Cayrolet *et al.*, 2018)**. Les principaux produits recherchés par les apiculteurs, par ordre d'importance, sont le miel, le pollen, la gelée royale et la propolis. Dans cette optique, nos agriculteurs ont modernisé les pratiques apicoles, telles que la pollinisation croisée de nombreuses plantes cultivées, favorisée par les abeilles **(Donadieu, 2003)**.

Les abeilles domestiques et sauvages jouent un rôle essentiel dans les écosystèmes terrestres. En effet, plus de 80 % des espèces à fleurs ne pourraient accomplir leur cycle de développement sans l'aide des pollinisateurs, qui contribuent de manière significative à la reproduction de nombreuses plantes **(Vaissiere, 2002 ; Haubruge *et al.*, 2006 ; Breeze *et al.*, 2011)**. Grâce à leur comportement social complexe, les abeilles représentent l'un des meilleurs modèles scientifiques pour étudier les fonctions d'apprentissage, de mémorisation et d'orientation lors des déplacements à des fins de butinage. En outre, d'un point de vue écologique, cet insecte bénéfique joue le rôle d'un bio-indicateur extrêmement sensible aux polluants provenant de diverses sources **(Kevan, 1999)**. Compte tenu de son importance dans

L'environnement, le législateur accorde à l'abeille le statut d'insecte protégé. Malgré cela, les effondrements de colonies d'abeilles continuent d'être constatés. Actuellement, ces affaiblissements sont désignés par l'acronyme CDD (Colony Collapse Disorder) ou syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles. **(Higeset *et al.*, 2007)**.

Les abeilles mellifères jouent un rôle crucial en raison de leur contribution à la pollinisation de nombreuses fleurs sauvages et cultures agricoles, ainsi qu'à la production de produits apicoles tels que le miel, la gelée royale, la propolis, la cire d'abeille et le pollen. De plus, elles sont également utilisées dans le domaine scientifique en tant que modèles de recherche **(Wallberg *et al.*, 2019)**. Cependant, en tant qu'insectes eusociaux, les abeilles mellifères sont exposées à divers pathogènes et parasites tels que les bactéries, les champignons, les virus et le Varroa **(Chen *et al.*, 2017 ; Zhu *et al.*, 2022)**. Parmi les maladies les plus redoutables nous citons l'ascosphérose (*Ascospaera apis*), étant un champignon pathogène obligatoire de l'abeille domestique. Ce champignon provoque l'ascosphérose, entraînant un déclin significatif de la force et de la productivité des colonies, soit seul, soit en

## Introduction

---

combinaison avec d'autres facteurs biotiques ou abiotiques, ce qui a des conséquences graves pour l'industrie apicole (**Aronstein et Murray, 2010**).

Les plantes aromatiques et médicinales, également appelées "PAM", sont une source de substances ayant différentes vertus thérapeutiques, utilisées depuis l'Antiquité dans la pharmacopée traditionnelle de nombreux pays. Ces extraits volatils ont été utilisés pour traiter des maladies infectieuses avant même la découverte des microorganismes (**Lang et Buchbauer, 2012**). À cet égard, les huiles essentielles sont recommandées pour leurs propriétés antibiotiques, antivirales, antiseptiques, fongicides, cicatrisantes, digestives, anti-inflammatoires, sédatives, etc (**Richard, 1992**).

Le genre *Thymus* est reconnu pour ses propriétés médicinales, ce qui le rend parmi les genres les plus intéressants en termes d'activité biologique. Appartenant à la famille des Lamiaceae. Le genre *Thymus* comprend une variété d'espèces, dont une grande partie se trouve dans la région méditerranéenne (**Hazzitet al., 2006**). En Algérie, 12 espèces de *Thymus* sont présentes sur le territoire du pays (**Dobet al., 2006**).

Parmi ces espèces, certaines sont endémiques de l'Algérie, telles que *Thymus pallescens* de Noé, *Thymus dreatensis* Batt., *Thymus guyonii* de Noé et *Thymus lanceolatus* Desf., tandis que d'autres sont endémiques de l'Afrique du Nord, comme *Thymus ciliatus* Desf., *Thymus fontanesii* Boiss. Et Reut., *Thymus numidicus* Poiret., *Thymus munbyanus* Boiss. et Reut. et *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (**Bekhechi et al., 2007 ; Hazzitet al., 2006 ; Hazzitet al., 2009**).

*Thymus lanceolatus* Desf. est une espèce endémique d'Algérie largement utilisée en médecine traditionnelle. Elle est connue pour ses effets anti-infectieux, antidiabétiques et pour le traitement des affections pulmonaires (**Khadir et al., 2013**).

Ce présent travail de recherche a pour objectifs, d'étudier, premièrement, l'état de lieu de cheptel apicole dans la région de Tissemsilt durant la période s'étalant entre 2010 et 2022. Et de tester, au laboratoire, l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus lanceolatus* Desf. sur l'Ascospérose (*Ascospheera apis*) qui touche l'abeille domestique *Apis mellifera*.

Ce présent document est divisé en quatre chapitres. Les deux premiers chapitres portent sur une étude bibliographique. Tandis que les deux derniers chapitres sont consacrés pour rédiger la partie expérimentale, particulièrement la méthodologie de travail et les résultats obtenus avec leurs discussions.

**Première partie :**  
**Étude bibliographique**

**Chapitre 01 :**  
**Généralité sur la plante**  
**étudiée**

**« Le thym *Thymus* sp. »**

## Chapitre 01 Généralité sur la plante étudiée

---

### 1.1. Généralité sur le thym

Le nom "*Thymus*" est dérivé du mot grec "*thymos*", qui signifie "parfumer", en raison de l'odeur agréable dégagée par la plante. (Pariante, 2001).

Le terme "Thym" a été introduit dans la langue française au XIIe siècle. Il dérive du latin "*thymus*", qui lui-même l'a emprunté au grec "*thymos*", signifiant "grosseur ou loupe", en référence à la glande, le *thymus*. Certains pensent plutôt que le mot vient du grec "*thymos*", qui signifie "fumée", en allusion au fait qu'il était autrefois brûlé comme encens et qu'on lui attribuait le pouvoir d'éloigner les créatures venimeuses. Enfin, d'autres font remonter le mot au grec "*thymus*", qui signifie "courage", la plante étant considérée autrefois comme revigorante (Chenni, 2016).

Pendant longtemps, le thym a été principalement utilisé en médecine et dans les rituels religieux ou magiques, ses utilisations culinaires se limitant à l'aromatisation du fromage et des liqueurs. Les Égyptiens l'utilisaient pour embaumer leurs morts, les Grecs pour parfumer les temples et l'eau des bains, et les Romains pour purifier leurs appartements (Chenni, 2016).

De nos jours, le thym est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne. Ses feuilles sont riches en huiles essentielles, dont les propriétés sont exploitées en phytothérapie et en médecine (Kholkhal, 2014).

Il existe une variété d'espèces de thym, dont une grande partie se trouve dans la zone méditerranéenne. En Algérie, 12 espèces de *Thymus* sont présentes sur le territoire du pays, dont le *Thymus lanceolatus* Desf. (Khadir et al., 2013).

#### 1.1.2. Description botanique de la plante

Le *Thymus lanceolatus* Desf. Est une espèce endémique d'Algérie appartenant à la famille des lamiacées (figure 01), appelée localement "Zaater". Il se présente sous la forme d'un arbrisseau (Khadir et al., 2013). Il se caractérise par des feuilles longues et lancéolées (12-17 mm / 3-8,5 mm), avec un pétiole de (1-3 mm). Les feuilles de l'apex sont arrondies, présentant des nervures marquées sur la face inférieure, avec des glandes sphéroïdales, parfois ciliées vers la base. Les fleurs sont disposées en inflorescences denses de couleur rose, arrangées en verticilles approximatifs. Elles sont pédonculées, mesurant environ 3 mm de haut, et persistantes. Elles sont disposées à l'extrémité des rameaux en un épi cylindrique. Les tiges sont dressées, densément poilues avec des poils blancs et raides, les nœuds inférieurs étant dépourvus de feuilles simples ou ramifiées (Ramon, 1994).



**Figure 01 :** *Thymus lanceolatus. Desf.*, avant et après inflorescence (Khadiret *al.*, 2013)

### 1.1.3. Classification de la plante

Selon (Quezel et Santa, 1963), la classification du *Thymus lanceolatus Desf.* est mentionnée dans le tableau 1.

**Tableau 01 :** Classification de *Thymus lanceolatus Desf.*

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>tracheobionta</i>
Embranchement	<i>magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>magnoliophytina</i>
Classe	<i>magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus lanceolatus Desf</i>

### 1.1.4.Principes actifs du Thym

Les substances actives du thym sont des composés synthétisés par les plantes supérieures à travers des voies métaboliques complexes. Ces composés sont utilisés par les plantes pour diverses fonctions adaptatives, notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques auxquels elles peuvent être exposées (**Bougharara, 2016**).

#### 1.1.4.1. Phénols

Les phénols sont des composés qui possèdent un noyau aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyle. Ils ont des propriétés antiseptiques, antifongiques, antibactériennes, anti-inflammatoires et anti-oxydantes (**Belyagoubi, 2011**).

#### 1.1.4.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe de plus de 6 000 composés naturels présents dans presque toutes les plantes vasculaires. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et d'influencer le comportement de différents systèmes cellulaires. Les flavonoïdes ont également de nombreuses activités biologiques, telles que des propriétés anti-oxydantes, vasculoprotectrices, anti-hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-ulcéreuses et même anti-tumorales significatives (**Ghedira, 2005**).

#### 1.1.4.3. Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques présents dans de nombreuses plantes, comme les écorces d'arbres. Ils contribuent à l'activité anti-diarrhéique en protégeant les organes digestifs des attaques nuisibles. De plus, ils ont un pouvoir cicatrisant en favorisant la régénération des tissus en cas de blessure superficielle (**Yezza, 2013**).

#### 1.1.4.4. Saponosides

Les saponosides (ou saponines) sont des hétérosides généralement présents dans les plantes. Ils sont formés d'une génine de type triterpène ou stéroïde appelée sapogénine, qui est associée à un ou plusieurs groupements osidiques. Les saponosides ont des propriétés émulsifiantes grâce à leur capacité à former des mousses, ainsi que des propriétés pharmacologiques telles que des effets analgésiques et antidépresseurs (**Betna-Bencharif, 2014**).

### 1.1.4.5. Quinones

Les quinones sont présentes dans de nombreux organismes, principalement dans le règne végétal, et sont hautement réactives. Elles ont généralement des propriétés antimicrobiennes, anti-protazoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques (Belyagoubi, 2011).

### 1.1.4.6. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale, de nature alcaline et de structure hétérocyclique complexe. La plupart des alcaloïdes ont été utilisés comme médicaments, stimulants ou poisons. Ils sont biologiquement actifs et présentent des activités pharmacologiques diverses, y compris des propriétés antibiotiques (Touhami, 2017).

### 1.1.5. Pharmacologie du *thymus lanceolatus* Desf

La plupart des espèces de thym sont largement utilisées comme herbes médicinales (Bukvicki *et al.*, 2018) en raison de leurs propriétés pharmacologiques et biologiques. En médecine traditionnelle, les parties florales et les feuilles des espèces de *Thymus* ont été largement utilisées comme tisane tonique, carminative, antitussive, antiseptique et pour le traitement du rhume (Labiad *et al.*, 2017).

Parmi les différentes propriétés biologiques rapportées pour le thym, certaines sont bien établies, telles que ses activités anti-oxydantes, insecticides, antibactériennes, antifongiques, antivirales, anti-inflammatoires (Sidaliet *al.*, 2017) et anti helminthiques. Le thym a également été recommandé comme agent de prévention du cancer (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2015). Toutes ces activités sont liées à sa teneur élevée en monoterpènes et en composés phénoliques, notamment le thymol et le carvacrol, ainsi qu'à d'autres composés plus ou moins biologiquement actifs tels que l'eugénol, le p-cymène, le  $\gamma$ -terpinène, le linalol, le germiniol et le broneol (Sidali *et al.*, 2017).

Le thym est considéré comme une source importante d'huiles essentielles (Sobeh *et al.*, 2020). Son huile fait partie des dix meilleures huiles essentielles au monde, présentant des propriétés antibactériennes, antimycotiques, anti-oxydantes et conservatrices des aliments (Mahdavi et Karimzadeh, 2010).

### 1.1.5.1. Activité antifongique

La plupart des espèces de thym contiennent une quantité élevée de monoterpènes phénoliques, ce qui confère des effets fongicides en raison de la présence de composés phénoliques tels que le thymol comme composant principal, qui peuvent perturber la membrane cellulaire des champignons. Les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer et perturber la paroi cellulaire des champignons ainsi que les membranes cytoplasmiques, les rendant perméables et endommageant finalement les membranes mitochondriales (**Leal et al., 2017**).

### 1.1.5.2. Activité antibactérienne

Un grand nombre d'huiles essentielles de *Thymus*, d'extraits et de leurs composés isolés ont été étudiés pour leur activité antimicrobienne. Ces produits suscitent un intérêt particulier car aucune résistance ou adaptation bactérienne n'a été observée, et des effets secondaires minimes ou insignifiants ont été constatés tant pour les huiles essentielles que pour les extraits complets (**Nabavi et al., 2015**). Plusieurs scientifiques attribuent l'activité antimicrobienne des espèces du genre *Thymus* à la concentration élevée de carvacrol dans leur huile essentielle. Ce composé possède des propriétés biocides qui perturbent la membrane des bactéries. De plus, il est capable de traverser les membranes cellulaires, d'atteindre l'intérieur des cellules et d'interagir avec des sites intracellulaires essentiels pour leurs activités antibactériennes (**Hussein et al., 2018**).

### 1.1.5.3. Activité antivirale

L'activité antivirale des huiles essentielles est encore peu connue. Certaines huiles ont été rapportées comme ayant une activité contre certains virus, mais leurs mécanismes d'action n'ont pas été entièrement décrits. En 2011, Saderi et Abbasi ont observé que l'huile de thym était potentiellement efficace contre les adénovirus (**Adaszyńska-Skwirzyńska et Szczerbińska, 2017**).

### 1.1.5.4. Activité antioxydante

Le thym est une source de diverses substances bioactives naturelles. Il contient de nombreux flavonoïdes tels que la lutéine, l'apigénine, la naringénine, la lutéoline et la thymonine, ainsi que du thymol et du carvacrol dans son huile essentielle. Ces deux composés phénoliques sont considérés comme de puissants antioxydants (**El-Guendouz et al., 2019**). Plusieurs chercheurs ont évalué l'activité antioxydante des différentes espèces de *Thymus* en utilisant le test de DPPH. Ces études ont montré que la structure chimique des composés

phénoliques présents dans les huiles essentielles de thym leur permet de donner de l'hydrogène aux radicaux libres, ce qui explique leur activité anti-oxydante (Nieto, 2017).

### 1.1.5.5. Activité anti-inflammatoire

Les plantes du genre *Thymus* ont démontré une activité anti-inflammatoire dans divers modèles d'inflammation in vitro et in vivo. Les extraits de thym pourraient efficacement inhiber la réponse induite par le collagène de type II (CII) chez les rats atteints de polyarthrite rhumatoïde, ainsi que réduire les niveaux de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) et d'interleukine-1 beta (IL-1 $\beta$ ). Par ailleurs, ils pourraient inhiber la réponse inflammatoire aiguë provoquée par la carraghénane et l'albumine d'œuf, réduisant ainsi le gonflement des articulations et augmentant le seuil de douleur (Li *et al.*, 2019).

### 1.1.5.6. Autres activités pharmacologiques

L'extrait de thym a démontré des effets réparateurs sur la mémoire et les troubles comportementaux induits par la scopolamine chez les rats, suggérant son potentiel bénéfique dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Rabiei *et al.*, 2015). Les effets insecticides de l'huile essentielle de thym ont également été signalés. En effet, la toxicité directe sur les insectes adultes est attribuée à l'inhibition de la reproduction par des effets ovicides et larvicides. L'huile essentielle a également montré des effets insecticides et répulsifs sur les moustiques, les larves de *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles gambiae* (Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012). Des effets herbicides et phytotoxiques du thym ont également été mentionnés (Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012).

## 1.2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Depuis l'Antiquité, on sait que plusieurs espèces de plantes contiennent des composés chimiques volatils pouvant être extraits sous forme d'huiles essentielles à l'aide d'un solvant lipidique approprié. Les huiles essentielles représentent une petite fraction de la composition globale d'une plante, mais elles confèrent aux plantes aromatiques les propriétés caractéristiques utilisées dans les industries pharmaceutique, alimentaire et des parfums. Différentes méthodes sont utilisées pour séparer ces huiles des différentes parties végétales. Bien qu'il puisse sembler relativement simple d'isoler ces huiles, leur composition peut varier considérablement en fonction de la méthode d'extraction utilisée (Cassel *et al.*, 2009).

### 1.2.1. Méthodes conventionnelles d'extraction des huiles essentielles

#### 1.2.1.1. Expression à froid

## Chapitre 01 Généralité sur la plante étudiée

---

L'expression ou la pression à froid est la méthode d'extraction la plus ancienne et est utilisée presque exclusivement pour la production d'huiles essentielles d'agrumes. Cette méthode désigne tout processus physique au cours duquel les glandes à huiles essentielles présentes dans la peau et la cuticule sont brisées afin de libérer l'huile. Ce processus aboutit à la formation d'une émulsion aqueuse, qui est ensuite centrifugée pour séparer l'huile essentielle (**Bousbia et al., 2009**).

Jusqu'au début du XXe siècle, la production industrielle d'huiles d'agrumes pressées à froid était réalisée manuellement. Aujourd'hui, les seuls systèmes utilisés pour la production industrielle d'huiles d'écorce sont les machines "sfumatric", "speciale sfumatrici", "Pellatrici", "Food Machinery Corporation whole fruit process", "bergamot oil extractors" et les "brown oil extractors" (**Arnodou, 1991 ; Dugo et Di Giacomo, 2002**). L'extraction des huiles essentielles d'écorces d'agrumes par des méthodes mécaniques s'explique par l'instabilité thermique des aldéhydes présents. Les huiles essentielles des fruits autres que les agrumes, comme les baies, ne sont généralement pas extraites selon cette méthode (**Dugo et Di Giacomo, 2002**).

### 1.2.1.2. Extraction par solvant

L'extraction par solvant peut être utilisée pour extraire les huiles essentielles thermiquement labiles (par exemple, celles des fleurs). Dans cette méthode, le matériau végétal est placé dans un bain de solvant qui le dissout. Après l'extraction, le mélange liquide contenant l'huile essentielle (ainsi que d'autres composés) est soumis à un processus de filtration et à une distillation ultérieure. Les solvants couramment utilisés pour l'extraction sont l'alcool, l'hexane, l'éthanol, l'éther de pétrole et le méthanol. L'avantage principal de l'extraction par rapport à la distillation est l'utilisation d'une température plus basse pendant le processus, ce qui réduit le risque de changements chimiques dus aux températures élevées utilisées dans la distillation. L'extraction par solvant est peu coûteuse et relativement rapide. Étant donné que les taux de diffusion sont influencés par la température, il est possible d'accélérer le processus en utilisant des solvants chauds. L'huile essentielle produite contiendra une petite quantité de solvant résiduel, ce qui rend son utilisation impossible dans des applications alimentaires. Cependant, si l'alcool est utilisé comme solvant, il est apte à la consommation et considéré comme "de qualité alimentaire". Cette méthode est couramment utilisée par l'industrie de la parfumerie (**Starý, 2013**).

### 1.2.1.3. La méthode de l'enfleurage

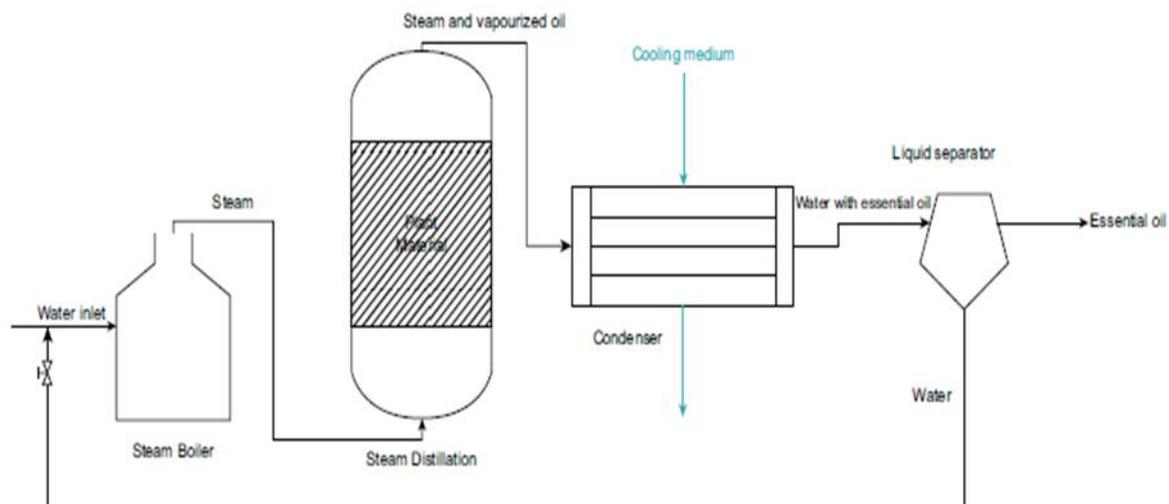
L'enflourage est une autre méthode d'extraction conventionnelle qui remonte à l'Antiquité. Elle était principalement utilisée pour extraire les huiles essentielles des fleurs (comme le jasmin). Dans cette méthode, une graisse froide purifiée et inodore est appliquée sur le matériau végétal (par exemple, les fleurs). Les odeurs sont libérées par les fleurs et se dissolvent dans la graisse. De nouvelles fleurs sont ajoutées pour remplacer les anciennes, et le processus est répété pendant de très longues périodes jusqu'à ce que la graisse soit saturée. Ensuite, la graisse est collectée et extraite avec de l'alcool. Selon les critères actuels, cette méthode est considérée comme longue, laborieuse et coûteuse. Elle ne semble pas avoir d'applications dans l'industrie alimentaire et est pratiquement obsolète de nos jours (**verbeke, 2006**).

### 1.2.1.4. La distillation

La méthode d'extraction la plus couramment utilisée est la distillation à la vapeur ou à l'eau (figure 2). Ce processus d'extraction peut durer entre 1 et 10 heures. La quantité d'huile produite dépend de la durée de la distillation, de la température, de la pression et du type de matériau végétal (**Naves, 1974**).

Pendant la distillation, le matériau végétal est exposé à de l'eau bouillante ou à de la vapeur d'eau pour libérer l'huile essentielle qu'il contient par évaporation. Lorsque la vapeur et les vapeurs d'huile essentielle se condensent, elles sont recueillies et séparées dans un récipient généralement appelé "flacon florentin" (**Dugo et Di Giacomo, 2002**).

Bien que l'extraction d'une huile essentielle par distillation puisse sembler un processus simple, elle présente de nombreux inconvénients. Les huiles essentielles étant exposées à l'eau bouillante pendant de longues périodes, il est possible que des artefacts se forment en raison de la température élevée ou de l'acidité de l'eau. Cela peut entraîner des variations dans la composition des huiles volatiles extraites. Pendant la distillation, l'hydrolyse des esters en alcools et en acides peut se produire, ce qui peut avoir des conséquences graves dans le cas d'huiles contenant des quantités importantes d'esters. De plus, certaines huiles essentielles doivent être rectifiées. Ce processus implique la redistillation de l'huile pour éliminer les impuretés indésirables (comme les cires) ainsi que les constituants qui peuvent donner une odeur inacceptable (**Dugo et Di Giacomo, 2002**).



**Figure 02 :** Unité industrielle typique de distillation à la vapeur pour l'extraction des huiles essentielles (Masango, 2005).

### 1.2.1.5. Extraction avec des gaz supercritiques

En général, les méthodes d'extraction conventionnelles telles que la distillation à la vapeur et l'extraction par solvant ont été traditionnellement utilisées ; cependant, ces méthodes présentent des inconvénients tels qu'un faible rendement, une perte de composés volatils, des temps d'extraction longs et des résidus de solvants toxiques (Khajeh *et al.*, 2005).

Cela a conduit au développement de techniques d'extraction alternatives qui peuvent surmonter ces problèmes. Une alternative à ces méthodes conventionnelles est l'extraction par fluide supercritique (ESF), qui a été introduite et étudiée en profondeur. L'ESF peut être réalisée en mode batch, semi batch et continu. En général, le matériau solide est placé dans un récipient dans lequel le fluide supercritique est ajouté à un débit spécifique jusqu'à ce que les conditions d'extraction appropriées soient atteintes (Khajeh *et al.*, 2005).

## 1.2.2. Nouvelles méthodes d'extraction

### 1.2.2.1. Extraction assistée par micro-ondes

Une autre technologie qui a attiré une attention particulière est l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) en raison de son mécanisme de chauffage unique basé sur la friction, de son coût raisonnable et de ses bonnes performances dans des conditions atmosphériques. Comparée aux méthodes conventionnelles d'extraction telles que l'extraction Soxhlet, la MAE permet d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés, des temps d'extraction plus courts et une plus grande sélectivité (Chen *et al.*, 2007).

### 1.2.2.2. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) dans la technologie de transformation des aliments est intéressante car elle facilite l'extraction des composants tels que les huiles, les protéines et les polysaccharides. Les principaux avantages de l'application des ultrasons sont les effets minimes sur les composés extractibles, la réduction ou l'évitement des solvants organiques (car elle est également efficace avec des solvants généralement reconnus comme sûrs) et la réduction du temps d'extraction (**Vilkhu *et al.*, 2008**). Les effets des ultrasons sont dus au phénomène de cavitation, qui implique la production et la décomposition de bulles microscopiques. Lorsque ces bulles augmentent en taille, elles s'effondrent violemment, créant ainsi des forces mécaniques qui endommagent les membranes cellulaires (**Cameron *etal.*, 2009**). Cela permet d'obtenir un rendement élevé et une extraction rapide (**Shah *et al.*, 2005 ; Sharma et Gupta, 2006**).

# **Chapitre 02 : Généralité sur l'ascosphérose**

## 2.1. Généralités sur l'ascosphérose

L'ascosphérose est une maladie du couvain de l'abeille domestique, *Apis mellifera*, causée par le champignon pathogène *Ascosphaera apis*. Elle est considérée comme une maladie liée au stress, avec de multiples facteurs génétiques et environnementaux interagissant entre eux et influençant la gravité des épidémies (**Roberts et Armstrong, 2021**).

L'ascosphérose est une mycose invasive qui affecte exclusivement le couvain des abeilles mellifères (*Apis mellifera* L.) et est provoquée par *Ascosphaera apis* (**Spiltoir et Olive, 1955**). Bien qu'elle soit fatale pour les larves individuelles, la maladie ne détruit généralement pas une colonie d'abeilles entière. Cependant, elle peut entraîner des pertes significatives en termes de nombre d'abeilles et de productivité de la colonie (**Bailey, 1963 ; Wood, 1998**), avec des réductions de la production de miel allant de 5 à 37% (**Aronstein et Murray, 2010**).

L'ascosphérose est désormais présente dans les colonies d'abeilles du monde entier, et il existe des indications que son incidence a augmenté ces dernières années (**Aronstein et Murray, 2010**), les activités humaines liées à l'augmentation de la demande alimentaire ayant des effets directs et indirects qui pourraient être responsables en partie de cette tendance.

### 2.1.1. Historique et répartition géographique de l'ascosphérose

La maladie de l'ascosphérose chez les abeilles domestiques a été identifiée pour la première fois au début des années 1900 (**Maassen, 1913**). Jusqu'à la seconde moitié du XXe siècle, cette maladie était peu répandue en dehors de l'Europe. Elle était depuis longtemps connue en Allemagne (**Dreher, 1938**), en Scandinavie, en Russie (**Aronstein et Murray, 2010**) et au Royaume-Uni (**Heath, 1982; Heath, 1985**). En Norvège, la maladie a été reconnue comme la plus grave des maladies infectieuses de l'abeille dès 1977 (**Heath, 1985**). Le premier signalement de ce champignon en dehors de l'Europe a été fait en Nouvelle-Zélande en 1957 (**Seal, 1957; Gilliamet al., 1978**).

Au milieu des années 1980, la maladie a été signalée dans des ruches commerciales (**Reid, 1988**), et en 1987, elle s'était répandue dans la majeure partie de la Nouvelle-Zélande. En Argentine, la maladie a été observée dans plusieurs régions dès 1978, bien qu'elle soit considérée comme un problème mineur jusqu'en 1988. À cette époque, des niveaux élevés d'infection ont été constatés dans de nombreuses provinces du pays (**Reid, 1993**). L'ascosphérose a été détectée au Mexique (**Wilson et al., 1984**) et est maintenant présente

dans la plupart des régions apicoles du Chili, d'Amérique centrale, du Japon et des Philippines (Heath, 1985; Reynaldi *et al.*, 2003). Dans les années 1987, plusieurs pays méditerranéens n'avaient aucun rapport sur l'ascosphérose (Bradbear, 1988), bien qu'il soit probable qu'elle soit présente. *Ascospaeraapis* a été signalée pour la première fois en Israël en 1984, mais à un niveau très faible jusqu'en 1990, lorsque l'infection a considérablement augmenté (Yacobson *et al.*, 1991). Des enquêtes menées en 1988 ont montré que l'ascosphérose était répandue dans de nombreuses régions productrices de miel en Turquie. La principale source de cette infestation était la cire d'abeille contaminée importée de plusieurs pays différents entre 1986 et 1988 (Tutkun *et al.*, 1993). En Amérique du Nord, la maladie de l'ascosphérose a été découverte dans les années 1960, et en 1971, elle a commencé à avoir un impact économique (Hitchcock et Christensen, 1972). Les premiers signalements de la maladie aux États-Unis ont été faits en Utah en 1965 (Baker et Torchio, 1968), puis en Californie en 1968 (Hitchcock et Christensen, 1972), bien qu'elle ait pu être présente aux États-Unis bien avant (Gilliam, 1997). De 1969 à 1975, elle s'est propagée en Arizona, Nebraska, Wyoming, Montana, Minnesota, Dakota du Nord, Wisconsin, Illinois, Texas et Floride (Hitchcock et Christensen, 1972; Gilliam *et al.*, 1978). À peu près à la même époque, on a constaté sa présence dans les régions du centre-ouest et de l'ouest du Canada (Hitchcock et Christensen, 1972).

Depuis lors, l'ascosphérose s'est répandue dans tous les États-Unis, y compris en Alaska et à Hawaï. Plus récemment, en Australie, l'ascosphérose a été identifiée pour la première fois dans le Queensland en 1993, mais en quelques années seulement, elle s'est répandue dans tous les États australiens (Hornitzky, 2001). La nature migratoire de l'apiculture commerciale en Amérique du Nord et en Australie est probablement le facteur le plus important contribuant à la propagation de la maladie de l'ascosphérose sur ces deux continents. (Aronstein et Murray, 2010)

### 2.1.2. La position systématique de l'agent causal

La plupart des membres du genre *Ascospaera* sont associés aux abeilles sociales et solitaires. Certains d'entre eux sont saprophytes (Skou, 1972; Skou, 1988; Anderson et Gibson, 1998), mais plusieurs espèces sont pathogènes. *A. apis* était initialement connu sous le nom de *Pericystis apis* (Maassen, 1913), mais il a été reclassifié en tant qu'*Ascospaera apis* (Spiltoir, 1955).

En effet, l'application de nouvelles méthodes basées sur l'ADN dans la systématique fongique a récemment entraîné une réorganisation complète de la systématique mycologique (James, 2006; Hibbett, 2007). Cependant, dans certains cas, la signification des données basées sur l'ADN n'est pas encore claire et les conclusions tirées de ces études peuvent ne pas éclaircir les classifications. Par exemple, en utilisant l'amplification PCR et le séquençage de l'ADNr, (Berbee et Taylor, 1992; Anderson *et al.*, 1998) ont conclu que le genre *Ascospaera* devrait être maintenu dans la classe des *Plectomycètes*, où il était classé traditionnellement.

Cependant, cette conclusion n'a pas été largement acceptée et le terme *Plectomycètes* a été abandonné ces dernières années. La lignée taxonomique actuelle du champignon de l'ascosphérose est la suivante : *Ascomycota* ; *Pezizomycotina* ; *Eurotiomycetes* ; *Eurotiomycetidae* ; *Onygenales* ; *Ascospaeraceae* ; *Ascospaera apis* (Lumbsch et Huhndorf, 2007).

## 2.2. Infection et multiplication

Les larves âgées de 3 à 4 jours ingèrent les spores du champignon avec leur nourriture. Une fois dans l'intestin, ces spores germent et produisent un mycélium qui se développe et finit par traverser les larves. Lorsque des mycéliums mâles et femelles se rencontrent à la surface du corps, un corps de fructification noir se forme, contenant de nouvelles spores qui constituent une forme de résistance (Guilliford, 1994). Les larves infestées par les champignons, également appelées momies, deviennent foncées et sont contagieuses (Bailey, 1967).

La propagation de l'ascosporose se fait par les spores de ce champignon par le biais de deux voies de contamination. La voie buccale est la plus courante et se produit par ingestion de nourriture contaminée. Cependant, il existe également une voie transcutanée qui affecte initialement l'intestin moyen des abeilles et finit par envahir tout l'organisme (Heath, 1985). La dissémination de la maladie entre les colonies se produit lors du pillage, de la dérive et lors des manipulations apicoles. L'apparition de cette pathologie est favorisée par une chute brusque de la température et des conditions d'humidité élevée (Pederson, 1976; Heath, 1982).

### 2.3. Symptômes

Parmi les symptômes typiques de la pathologie, on observe devant la ruche ou sur la planche d'envol des larves momifiées, dures et blanches (Thurber, 1979). En ce qui concerne le couvain, il apparaît clairsemé, avec une apparence "mosaïque" et non compacte, avec une répartition aléatoire des larves de différents âges. La maladie entraîne également la formation d'un amas cotonneux de filaments mycéliens blancs autour des larves, occupant l'alvéole (Thorstensen, 1976).

Les symptômes de l'ascosphérose comprennent :

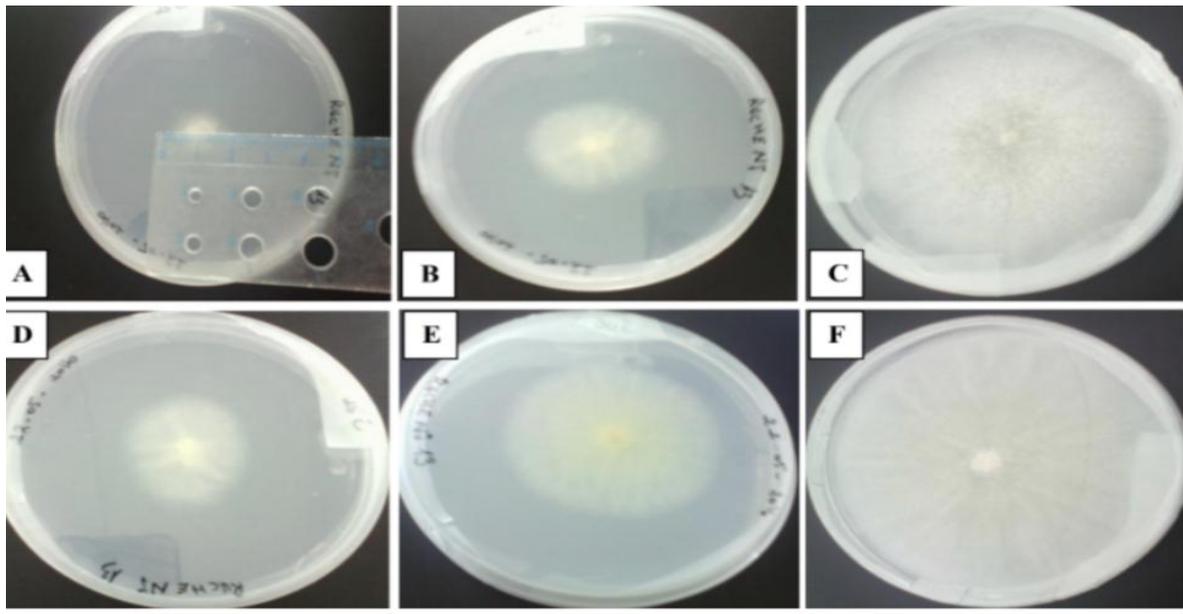
- Présence de larves momifiées blanches et/ou noires au fond de la ruche ou devant le trou de vol.
- Présence des momies blanches et/ou noires dans le couvain operculé ou non operculé.
- Bruit de grelot lorsqu'on secoue un cadre de couvain atteint.
- Aspect irrégulier et en mosaïque du couvain.
- Présence de taches légères ou d'affaissement sur le couvain operculé.
- Sortie de larves ou de nymphes par les abeilles devant le trou de vol.
- Présence de larves "droites" (en position redressée) dans une cellule désoperculée.
- Affaiblissement de la colonie, avec un dépeuplement plus ou moins important (Ballis, 2013).

### 2.4. La bio écologie de l'ascosphérose, causée par *Ascospheera apis*

#### 2.4.1. Etude de la croissance mycélienne de champignon *Ascospheera apis*

L'étude portait sur l'identification des facteurs optimaux pour la croissance mycélienne du champignon *A. apis*, notamment la température et la durée de germination. La souche d'*A. apis* a été isolée à partir de larves momifiées résultant d'infections par l'ascosphérose. La croissance mycélienne a été évaluée quotidiennement pendant les huit premiers jours d'incubation à différentes températures (10, 15, 20, 25, 30 et 35 °C).

Après huit jours de germination, la croissance mycélienne à 10 °C, 15 °C et 35 °C était faible (inférieure à 20 mm). En revanche, aux températures de 20 °C, 25 °C et 30 °C, la croissance mycélienne était maximale (pouvant atteindre jusqu'à 84 mm) après environ six jours de germination (figure 03). Ainsi, la croissance mycélienne optimale pour le champignon *Ascospheera apis* se situe dans une plage de température de 20 °C à 30 °C. Les caractéristiques des colonies de champignons comprenaient leur taille, leur apparence en surface, leur texture et leur couleur. De plus, l'examen microscopique du mycélium a permis d'observer la présence ou l'absence de cloisons, le diamètre du mycélium et les types de reproduction sexuée et asexuée (Pornpukdeewattana *et al.*, 2017).



**Figure 03** :Les étapes de croissance mycélienne dans une température optimale (25°C à 30°C).

A, B et C : à 25°C ; D, E et F : à 30°C (Chahbar, 2017).

### 2.5. Les facteurs de stress qui déclenchent la maladie

L'abeille domestique joue un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de nombreux écosystèmes terrestres. Elle fournit non seulement des aliments précieux et médicinaux, mais elle est également un pollinisateur pour de nombreuses plantes (Vorobeva et Sannikova, 2013; Liubimov *et al.*, 2020). Cependant, l'apiculture est influencée par divers facteurs, qu'ils soient abiotiques, biotiques ou anthropiques (Kalashnikov et Udina, 2014; Kolbina *et al.*, 2015; Liubimov *et al.*, 2020). Au cours des dernières années, le déclin des colonies d'abeilles est observé en raison de diverses maladies (virus, bactéries, acariens) et des changements environnementaux. Le phénomène du syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles, connu sous le nom de CCD (Colony Collapse Disorder), est largement répandu (Krivtsov, 2011; Liubimov *et al.*, 2020). Les épidémies localisées de Varroas et nosémose et d'ascosphérose entraînent une diminution de l'immunité des insectes et, par conséquent, une réduction du nombre de colonies et de la productivité de l'industrie apicole dans son ensemble. Aujourd'hui, la recherche de traitements respectueux de l'environnement pour lutter contre les différentes maladies des colonies d'abeilles est une préoccupation urgente. L'incidence de diverses maladies infectieuses et invasives a été identifiée lors d'études menées dans la République d'Oudmourtie, notamment la varroas, la nosémose, l'acariose, la loque européenne et américaine, ainsi que l'ascosphérose. Le pourcentage le plus élevé de colonies d'abeilles malades, soit 77,5 %, était associé au champignon *Ascospheera apis* (Liubimov *et al.*, 2020).

## 2.6. Facteurs favorisant l'apparition de l'ascosphérose

La maladie de l'ascosphérose est devenue un problème croissant pour de nombreux apiculteurs australiens ces dernières années, mais les facteurs à l'origine des épidémies actuelles ne sont pas clairs (**Roberts et Armstrong, 2021**).

Les facteurs génétiques qui influencent les épidémies de l'ascosphérose comprennent la réponse immunitaire des larves, les comportements d'immunité sociale (par exemple, le comportement hygiénique) et la virulence des souches de l'ascosphérose (**Roberts et Armstrong, 2021**).

Le remplacement des reines est une stratégie couramment utilisée pour surmonter les infections par l'ascosphérose, l'idée étant que les nouvelles reines auront une meilleure immunité larvaire innée ou un meilleur comportement hygiénique (**Roberts et Armstrong, 2021**).

Les facteurs suivants peuvent favoriser l'apparition de l'ascosphérose :

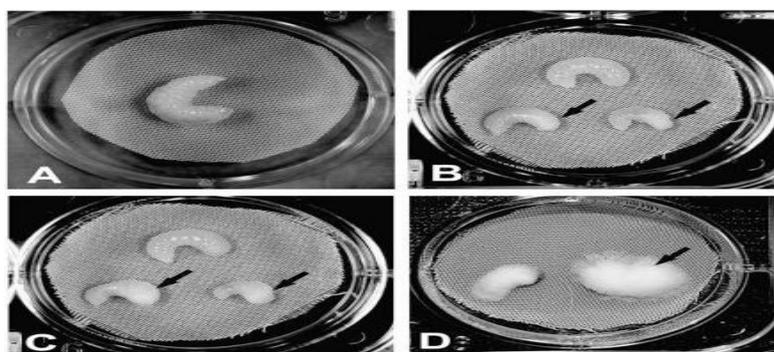
- L'humidité.
- Une ventilation insuffisante de la ruche.
- L'atteinte des abeilles par d'autres agents pathogènes tels que *Varroa*, les loques ou les virus.
- Des manipulations techniques, telles que la formation d'essaims, qui réduisent le rapport entre les abeilles adultes et le couvain.

## 2.7. Pathogénèse

Les spores d'*A. apis* produites sexuellement (ascospores) sont historiquement considérées comme la principale source d'infection du couvain (**Spiltoir, 1955 ; Hitchcock et Christensen, 1972 ; Rose et al., 1984**). Les premières études suggéraient que deux voies d'infection par les ascospores étaient possibles : la pénétration à travers la cuticule (**Aronstein et Murray, 2010**) et l'ingestion (**Matus et Sarbak, 1974 ; Gilliam, 1978**). Il est maintenant largement accepté que les spores d'*A. apis* ne peuvent pas germer sur la cuticule des larves, elles doivent donc être ingérées pour infecter les larves (**Maurizio, 1934 ; De Jong, 1976 ; Heath, 1982 ; Puerta et al., 1994 ; Flores et al., 1996**). *A. apis* peut infecter le couvain de toutes les castes (ouvrières, faux-bourçons ou reines).

Selon **Bailey (1963)**, les larves sont les plus sensibles à l'ascosphérose à l'âge de 3 à 4 jours, tandis que d'autres études indiquent que les larves âgées de 1 à 2 jours sont également très sensibles (**Maurizio, 1934 ; De Jong, 1976 ; Gilliam *et al.*, 1978**). Bien que les abeilles adultes ne soient pas sensibles à cet agent pathogène, elles peuvent néanmoins le transmettre dans et entre les ruches. La transmission de matériel infectieux entre abeilles adultes au sein de la colonie semble se produire par le partage de nourriture (**Gilliam et Vandenberg, 1997**). Les spores fongiques peuvent être transportées par les abeilles butineuses et transmises aux larves par les abeilles nourricières qui les alimentent avec de la nourriture contaminée. La transmission entre les colonies gérées est principalement facilitée par les apiculteurs en raison des matériaux contaminés (**Gilliam et Vandenberg, 1997**). Étant donné que les spores peuvent s'accumuler sur toutes les parties de la ruche et dans tous les produits de la ruche (tels que la cire de fondation, le pollen stocké et le miel) et rester viables pendant au moins 15 ans, tout matériel de ruche contaminé par des spores fongiques constitue une source d'infection durable (**Toumanoff, 1951 ; Gilliam, 1986 ; Gilliam et Taber, 1991 ; Anderson *et al.*, 1997 ; Flores *et al.*, 2005**).

Les spores consommées par les larves d'abeilles domestiques germent dans les lumières de l'intestin, probablement activées par le CO<sub>2</sub> (**Heath et Gaze, 1987 ; Bailey et Ball, 1991**). Les larves infectées réduisent rapidement leur consommation de nourriture, puis cessent complètement de s'alimenter. **Theantana et Chant-awannakul (2008)** ont récemment identifié plusieurs enzymes produites par *A. apis*, certaines d'entre elles jouant un rôle dans la pénétration du pathogène dans la membrane péritrophique de l'intestin moyen des larves d'abeilles.



**Figure 04:** Des larves d'abeilles âgées de trois jours ont été infectées en étant nourries avec un régime contenant des spores. (A) témoin. (B) 72 heures après l'infection. (C) 78 heures après l'infection. (D) 6 jours après l'infection. (**Aronstein et Murray, 2010**).

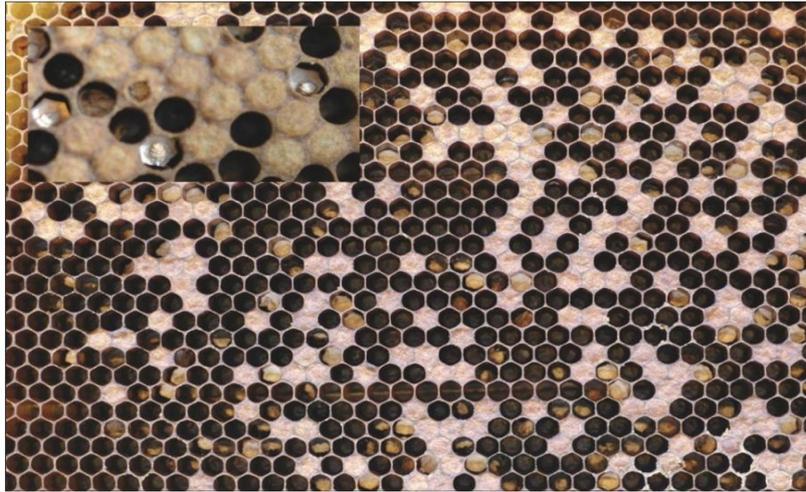


**Figure 05** : Les momies de l'ascosphérose sont blanches, brunes ou noires.(Aronstein et Murray, 2010).

## 2.8. Caractères macroscopiques et microscopiques *d'ascosphaera apis*

### 2.8.1. Le diagnostic macroscopique de l'ascosphérose chez *Apis mellifera*

Les symptômes caractéristiques observés dans une colonie affectée par cette maladie comprennent des opercules de cire irréguliers sur les cellules du couvain et des cellules non operculées dispersées sur les cadres du couvain (Figure 06). Les opercules des cellules peuvent également présenter de petits trous ou sembler légèrement aplatis. Les momies de couvain atteint de l'ascosphérose peuvent souvent être observées sur les rayons, à l'entrée de la ruche ou sur le plateau inférieur (Figure 07). L'observation des rayons peut révéler différents stades de la maladie : des larves mortes récemment recouvertes d'un mycélium blanc semblable au coton, ainsi que des momies desséchées qui apparaissent sous forme de masses solides blanches ou foncées. Les momies desséchées blanches ressemblent à de petits morceaux de chaux, d'où le nom de la maladie. Les momies foncées sont colorées par les fructifications des champignons. (Jensen *et al.*, 2013)



**Figure 06 :**Un cadre de couvain provenant d'une colonie d'abeilles mellifères présentant des symptômes cliniques de l'ascosphérose.(**Jensen *et al.*, 2013**)



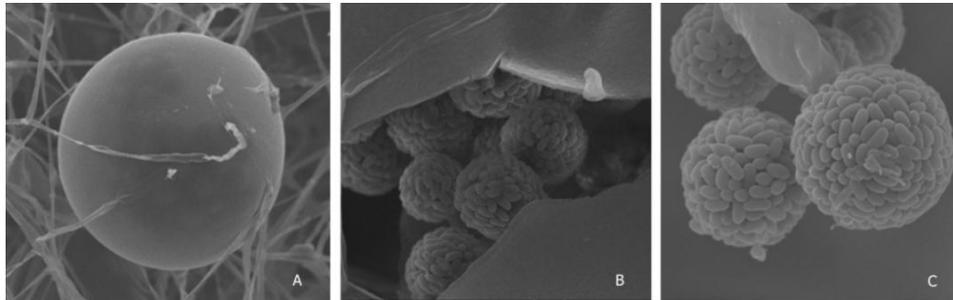
**Figure 07 :** Les momies noires et blanches de l'ascosphérose. (**Jensen *et al.*, 2013**)

### 2.8.2. Diagnostic microscopique

Le diagnostic sur le terrain repose généralement sur l'observation de momies crayeuses (comme décrit précédemment). Après le diagnostic initial sur le terrain, un examen microscopique est souvent nécessaire pour confirmer la présence de kystes de spores dans les échantillons, en utilisant la technique du frottis sur lame de microscope. Les spores peuvent être montées sur une lame de microscope avec une goutte d'eau distillée et observées à un grossissement de 100-400x. (**Jensen *et al.*, 2013**)

*Ascospaera apis* présente des hyphes septés (de 2,5 à 8,0  $\mu\text{m}$  de diamètre) avec des ramifications dichotomiques prononcées (**Spiltoir, 1955 ; Skou, 1988**). Comme mentionné précédemment, il s'agit d'un champignon hétérothallique avec deux types d'accouplement, et

la formation de corps fructifères ne se produit que lorsque les souches + et - sont à proximité. Les fructifications sont des kystes de spores sphériques (de 47 à 140 µm de diamètre ; Figure 8a) qui contiennent de nombreuses boules de spores (de 9 à 19 µm, Figure 8b) composées de spores hyalines (de 2,7 à 3,5 x 1,4 à 1,8 µm, Figure 8c) (Skou, 1972 ; Krivtsov, 2011).



**Figure 08 :** Images au microscope électronique à balayage de la fructification d'*Ascospaera apis*. A. Fructification sphérique ; B. Fructification fissurée avec des boules de spores ; sporeballs ; C. Sporeballs avec plusieurs ascospores. (Jensen *et al.*, 2013)

### 2.8.3. Diagnostic biologique

Diagnostic biologique L'identification des stades végétatifs du champignon peut être réalisée par un test d'accouplement avec deux souches de référence (AFSEF 7405 et ARSEF 7406). La production de kystes de spores avec l'une des souches de référence permettrait de confirmer l'identification d'*A. Apis*. (Jensen *et al.*, 2013).

## 2.9. Dégâts de l'ascosphérose

L'ascosphérose affecte principalement les colonies non cultivées. Elle ne présente un danger que lorsque la colonie est affaiblie par d'autres facteurs, notamment en cas de manque de nutrition (Flores *et al.*, 2005).

Elle tue rarement les abeilles. Cependant, cela peut entraîner un retard de la croissance au printemps, ainsi qu'une diminution de la vigueur de la ruche au fur et à mesure que le miel s'écoule, ce qui peut éventuellement entraîner une mauvaise récolte (Colin, 1989).

Malgré l'impact négligeable d'*A. Apis* sur la santé des colonies, l'infection peut entraîner des pertes importantes en termes de nombre d'abeilles et de productivité des colonies, notamment les suivantes (Aronstein et Murray, 2010) :

- Réduction de la production de miel de 1 à 5 %, une réduction de 23 % de la vigueur de la colonie et une diminution de 49 % du butinage (Heath, 1982 ; Zaghoul *et al.*, 2005).

- Lorsque les mycéliums mâles et femelles se rencontrent à la surface du corps, un corps de fructification noir se forme, contenant de nouvelles spores qui constituent la forme de résistance (**Jones, 2005**).
- Les larves infectées meurent en raison de lésions mécaniques et enzymatiques, d'une perturbation de la circulation de l'hémolymphe et d'une toxicose générale (**Glinski et Buczek, 2003**).

### 2.10. Lutte contre l'ascosphérose

La maladie de l'ascosphérose chez les abeilles mellifères (*Apis mellifera L.*) est causée par une infection à *Ascosphaera apis* (**Olive et Spiltoir, 1955**) qui affecte le couvain en développement. Les larves ingèrent les spores fongiques lorsqu'elles se nourrissent, ce qui permet à la maladie de se développer chez les larves étendues après l'operculage. Les larves étirées sont tuées et sèchent ensuite, laissant un cadavre momifié rappelant un petit morceau de craie, qui devient sombre si des fructifications de champignons se sont formées (momies sporulées).

Cette maladie nécessite une condition prédisposante dans le couvain sensible pour se développer (**Revue par Heath, 1982**). Les larves au cinquième stade, avant et quelques heures après l'operculage, sont les plus sensibles à la maladie (**Bailey, 1967 ; Puerta et al., 1994 ; Flores et al., 1996**). Afin de préserver les caractéristiques saines et naturelles du miel et des autres produits apicoles, il est nécessaire de développer des méthodes alternatives pour lutter contre l'ascosphérose, afin d'éviter l'utilisation de fongicides qui pourraient contaminer les produits de la ruche. Une mesure de précaution importante que les apiculteurs peuvent prendre est d'éviter de transférer des rayons de cire entre des colonies infectées par l'ascosphérose et des spores, car l'apparition d'*A. apis* et des spores constitue un facteur de risque pour les abeilles.

L'apparition de la maladie est proportionnelle à la quantité de spores en circulation (**Puerta et al., 1990**). Tout matériel contenant des spores d'*A. apis* qui entre en contact avec des abeilles peut entraîner la transmission de la maladie (**Revue par Heath, 1982 ; Gilliam, 1990**). On a émis l'hypothèse que les spores présentes dans la cire de fondation (la base de cire utilisée en apiculture, sur laquelle les abeilles construisent les cellules de cire pour le développement du couvain ou le stockage du miel et du pollen) sont une source d'infection. Toutefois, cette conjecture n'a pu être confirmée que lorsque des techniques permettant l'expression expérimentale des symptômes cliniques de manière contrôlée tout en maintenant les conditions naturelles des ruches ont été utilisées (**Puerta et al., 1994 ; Flores et al., 1996**).

En refroidissant le couvain sensible pour le prédisposer à l'infection (**Puerta et al., 1994 ; Flores et al., 1996**), nous avons pu démontrer le rôle de l'infection dans les ruches et son impact sur l'expression de la maladie des larves de l'ascosphérose .

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'élimination des larves infectées.
- 2) Le diagnostic précoce de la maladie par l'apiculteur permettra de nettoyer la ruche parasitée.

### **2.11. Prévention et traitement**

À ce jour, il n'existe aucun traitement commercialisé pour lutter contre l'ascosphérose. En cas d'infestation légère, l'apiculteur doit remplacer la reine et, de préférence, introduire des reines sélectionnées en fonction de leur comportement de nettoyage. Il est également recommandé d'enlever les rayons fortement infestés (**TABER, 1986**). En cas d'infestation importante, il est nécessaire de former un essaim artificiel et de le placer dans une ruchette contenant de nouveaux cadres (**STACE, 1994**).

Cependant, il est intéressant de noter qu'une étude menée par des chercheurs français a testé l'utilisation d'une médication à base d'huile essentielle de sarriette, incorporée dans un nourrissage hivernal à base de candi à une concentration de 0,1 %. Ils ont observé une nette régression de l'affection pendant les 75 jours suivant le traitement (**Colin et al., 1989**).

Il n'existe aucun traitement reconnu. Le docteur Marc-Edouard Colin, chercheur à SupAgro (Montpellier), a proposé une solution basée sur l'utilisation d'huile essentielle de sarriette des montagnes, incorporée au nourrissage hivernal à base de candi à une concentration de 0,01 % en volume, qui semble donner des résultats intéressants.

- La guérison spontanée est fréquente lorsque les conditions de température s'améliorent (température supérieure à 30°C).
- Éliminez les cadres atteints.
- Changez de reine (race/lignée).
- En cas d'infestation importante, transférez la ruche et détruisez les cadres contaminés. Changez la reine pour des "abeilles nettoyeuses".
- La prévention passe par la possession de colonies fortes, dans un rucher bien exposé au soleil. Favorisez l'aération des ruches (ventilation).
- Les spores (forme de résistance du champignon) peuvent survivre

jusqu'à 15 ans à l'intérieur des larves momifiées, dans le miel et la cire, et jusqu'à 4 ans dans l'environnement extérieur. Toutefois, ils sont détruits lors de la fonte de la cire (**Ballis, 2013**).

# **Chapitre 03**

## **Présentation De**

### **La Zone d'Etude**



### 3.1.2. Dairas et communes

Selon le découpage administratif de 1984, la wilaya de Tissemsilt est constituée de 08 Dairas et 22 communes dans le tableau 02.

**Tableau 02:** Découpages administratifs de la wilaya de Tissemsilt (DPAT, 2019).

Dairas	Nombre de communes
Tissemsilt	Tissemsilt et Ouled Bessem
Bordj bounaama	Bordj Bounaama, Béni Chaib, Sidi Slimane et Beni Lahcene
Theniet El Had	Theniet El Had et Sidi Boutouchent
Bordj Emir AEK	Bordj Emir AEK, Youssoufia
Khemisti	Khemisti et Laayoune
Ammari	Ammari, Sidi abed et Maacem
Lardjem	Lardjem, Sidi Lantri, Melaab et Tamellahet
Lazharia	Lazharia, Larbaa et Boucaid

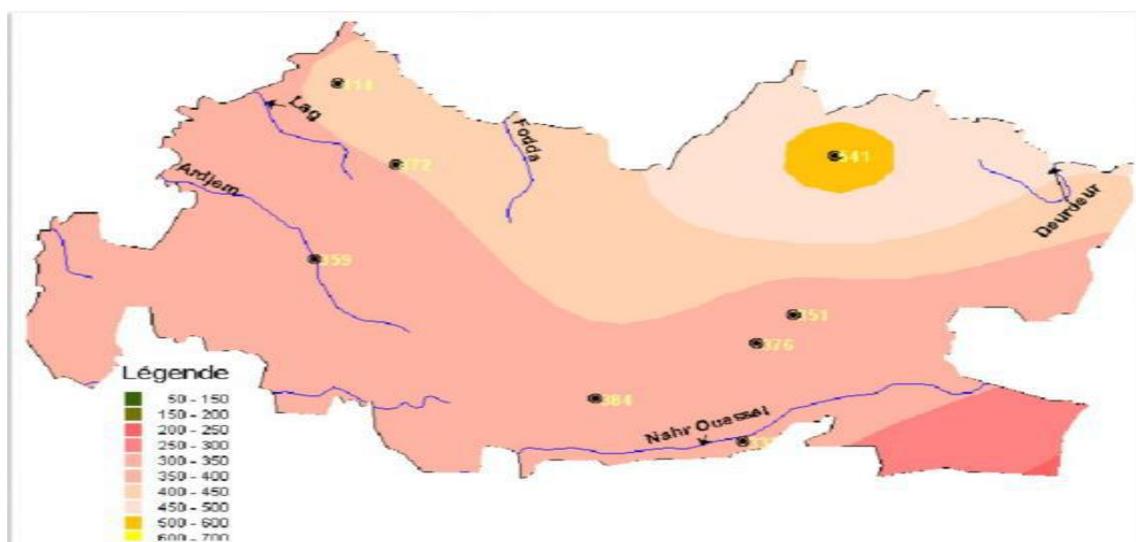
### 3.1.3. Climat

La connaissance des caractéristiques climatiques est fondamentale pour permettre une meilleure évaluation des besoins en eau des différentes cultures et une détermination des facteurs qui ont un effet néfaste sur la production et le rendement.

La wilaya de Tissemsilt révèle du domaine méditerranéen caractérisé par un été chaud sec et long s'étalant d'Avril à octobre et un hiver froid et pluvieux qui s'étale de Novembre à Avril.

La pluviométrie (figure 10) est décroissante du nord au sud et d'ouest en est.

- 300 à 450 mm sur les piémonts et le centre (les plaines)
- 300 mm et moins au Sud–Est.



**Figure 10:** Carte pluviométrique de la Wilaya de Tissemsilt (DSA, 2021)

La précipitation se limite entre 350 mm et 450 mm pendant 65 jours durant une année normale dont la concentration est située entre les mois d'octobre et avril. Il neige en moyenne 3 à 5 jours par an. Généralement, les écarts de températures ainsi que les amplitudes thermiques sont importants, la moyenne du mois le plus chaud se situe à 38°C. Les températures négatives sont fréquentes durant les mois de mars, les gelées sont fréquentes surtout au printemps (Mars à Mai) et très importantes durant le mois de décembre, le siroco est à craindre de Mai à Juin.

Selon la classification de Köppen-Geiger, 2020. Sur l'année, la température moyenne de la Wilaya de Tissemsilt est de **14.9°C** et les précipitations sont en moyenne de **362.1 mm**.

#### 3.1.4. Pluviométrie

La pluviométrie est un facteur essentiel dans l'alimentation directe en eau et par conséquent dans le développement des plantes. En effet le manque ou l'insuffisance en cet élément à certaine période (phase critique) de l'année a des conséquences sur la croissance et la production de la culture (**Boussen et al.,2005**). Le tableau 03 ci-dessous synthétise les données pluviométriques durant les dix dernières années (2010-2020).

**Tableau 03** : Données pluviométriques (2010-2020) (**DSA, 2021**).

Année	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Pluviométrie (mm)</b>	365.08	389.50	358.40	632.83	415.90	343.00	324.60	262.70	671.65	409.65	256.20

L'analyse de la répartition des précipitations (annuelles et mensuelles) est importante pour la production des cultures en sec et pour déterminer les besoins en eau d'irrigation.

Les données pluviométriques disponibles pour les années 2010 à 2020, nous donnent un moyen annuel de 462,7 mm, et nous montrent les principales contraintes suivantes :

- Une grande variation et irrégularité des précipitations avec un caractère aléatoire et une concentration pendant une période courte de quelques jours de l'année, ce qui entraîne des séquences de sécheresse.
- Cette irrégularité des précipitations mensuelles exerce une influence considérable sur le développement agricole et rural.



raison que l'agriculture constitue une richesse renouvelable qui devait être utilisée et orientée pour atteindre l'autosuffisance et réduire par conséquent la dépendance alimentaire.

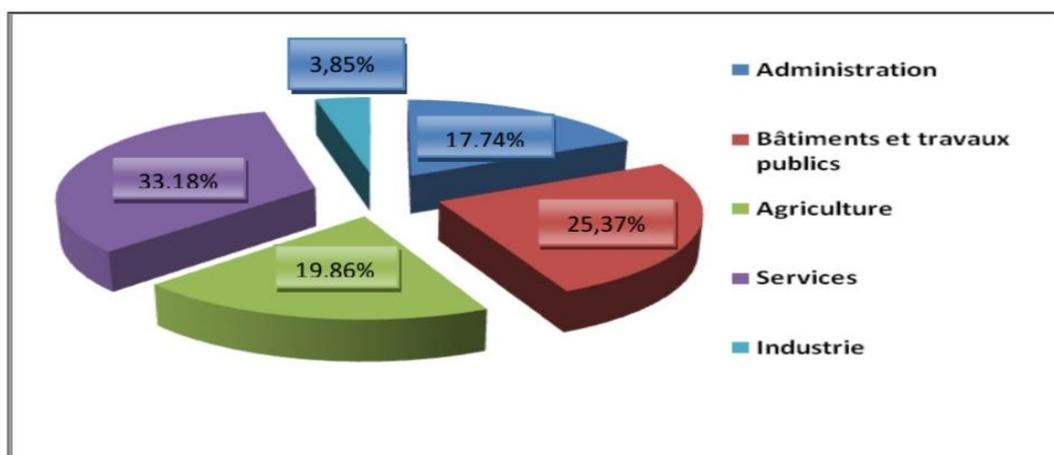
### 3.1.6.1. Population

La population totale de la wilaya est estimée à 361 960 habitants soit une densité de 93 habitants au km<sup>2</sup> (wilaya Tissemsilt, 2019).

Une grande partie de la population est concentrée dans les communes de Tissemsilt, khemisti, theniet el had, larjem et bordj bounaama. Elle est caractérisée principalement par la jeunesse car plus de la moitié à moins de 20 ans (52,56%) et nombre au l'état de croissance continue (DPAT, 2019).

### 3.1.6.2. Emploi agricole

L'effectif de la population occupée par le secteur de l'agriculture adopte la troisième place après les services, le secteur des Bâtiments et travaux publics, soit 19.86% (DPAT, 2019).



**Figure 12:** Répartition de la population occupée par secteur de l'agriculture (DPAT, 2019)

Il est à signaler que la population rurales représentent 57 % de la totalité de la population et encore 50 % de l'emploi. Il y a cependant un fort déclin de l'emploi agricole dans le monde rural où le taux de chômage y est plus élevé qu'en zone urbaine où ce chômage touche en particulier les populations jeunes dans le tableau 04.

**Tableau 04:** Répartition de la population par dispersion (source : DPAT, 2019)

<b>Population urbain</b>	<b>157 478</b>
<b>Population rurale</b>	<b>204 482</b>
<b>Population agricole</b>	<b>127 327</b>
<b>Population Agricole Active</b>	<b>40 678</b>
<b>Population Agricole Occupée</b>	<b>24 622</b>

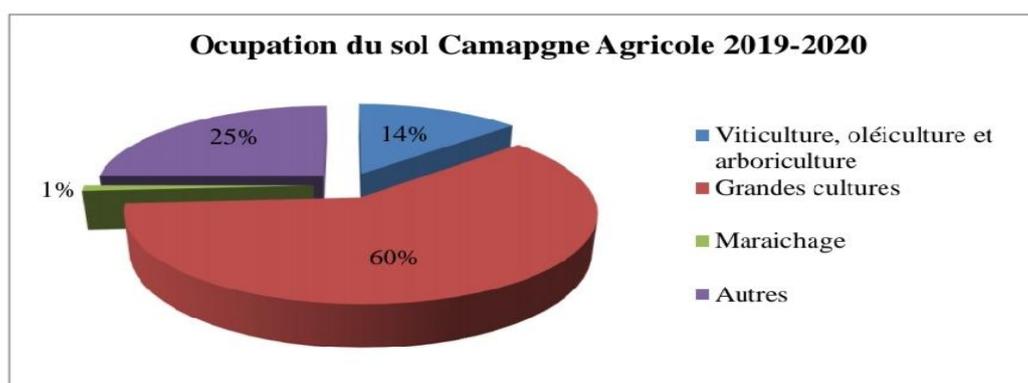
### 3.1.6.3. Volume de la main d'oeuvre Campgne Agricole 2019/2020

**Tableau 05:** volume de la main d'oeuvre (DSA, 2021)

<b>Main d'oeuvre permanente</b>	<b>14 042</b>
<b>Main d'oeuvre saisonnière</b>	<b>75 397</b>

### 3.1.6.4. Productions agricoles

La wilaya de Tissemsilt constitue une source très remarquable en matière de production végétale et animale pour la région. L'occupation du sol au titre de la campagne agricole 2019/2020 (figure 13) se présente comme suit :

**Figure 13:** Répartition de la superficie agricole par spéculation (campagne 2019/2020)

(DSA, 2021).

L'agriculture dans la région s'articule principalement autour de la production des grandes cultures en particulier la production céréalière qui occupe une grande superficie de la SAU qui est de l'ordre de 81 456 ha soit 60%. Elles sont localisées surtout en zone de plaine (50%).

Il est à signaler que les céréales est la principale culture agricole dans la wilaya. La production céréalière fait vivre une grande partie de la population rurale.

Les céréales restent dépendantes d'une bonne pluviométrie. En conséquence, le rendement peut varier d'une année à une autre en fonction des conditions climatiques. Pour les fourrages, la superficie réservée est de 4 926 h soit 56% et ils se trouvent en zone de montagne. Par contre, les légumes secs sont limités (1 447 ha) et 95% des superficies qui sont consacrées aux légumes secs se trouvent en zone de plaine.

L'arboriculture présente un autre créneau pour la production et la conservation des terres dans les zones montagneuses. Néanmoins, cette filière ne représente qu'une faible proportion de la SAU soit 14 % (19 567,54 ha) (dont, olivier : 8359,53 ha) où l'amandier et l'olivier sont les principales espèces y cultivées.

### 3.1.6.5. Ressources animales

L'élevage ovin dont l'alimentation dépend de la céréaliculture, occupe la première place avec 484 700 têtes. Il est suivi par l'élevage bovin dont l'effectif est évalué à 19 408 têtes dont 9 941 vaches laitières alors que l'élevage caprin est de type traditionnel soit 53 279 têtes (tableau 06). Pour les petits élevages, les effectifs évalués sont de 210 950 sujets de poulets de chair, de 8 359,53 sujets de poulets de pontes et de 107 760 sujets pour la dinde. Enfin, pour l'apiculture on enregistre la présence de 32 944 ruches (tableau 06).

**Tableau 06 :** Cheptel animal existant dans la wilaya de Tissemsilt (2019/2020) (DSA, 2021).

<b>BOVIN</b>	<b>Dont V laitières</b>	<b>Ovin</b>	<b>Caprin</b>	<b>équin</b>	<b>Total</b>
<b>19 400</b>	<b>9 941</b>	<b>436 000</b>	<b>53 279</b>	<b>264</b>	<b>508 943</b>
<b>Poules Pondeuses</b>	<b>Poulets de chair</b>	<b>Dindes</b>	<b>Apiculture Nb de ruches pleines</b>		
<b>210 950</b>	<b>6 082 734</b>	<b>107 760</b>	<b>13 135</b>		

### 3.1.6.6. Potentialités hydriques

Le réseau hydrographique se situe en majeure partie au nord de la wilaya, constituant un réservoir d'eau pour la vallée du Cheliff. Du point de vue découpage hydraulique, Le

territoire de la wilaya est situé principalement dans le grand bassin versant du Cheliff. Il est traversé par de nombreux oueds tels que l'Oued Nahr Ouassel au sud, Oued Sly, Oued Fodda et Oued Rhiou au nord (figure 14).



Figure 14 : Réseau hydrographique de la wilaya de Tissemsilt (DRE, 2021).

### 3.1.6.7. Ressources hydriques

Tableau 07: Ressources hydriques dans la wilaya de Tissemsilt (DRE, 2021).

Ouvrage	Nombre	
Barrages	02	Capacité de 90,8 millions m <sup>3</sup>
Petits barrages	02	1 capacité de 14,9 millions m <sup>3</sup>
Forages	1315	Un débit de 3 268 l/s
Puits	2007	Un débit de 892 l/s
Sources	216	/
Retenues	10	Capacité de 1 812 000 m <sup>3</sup>

### 3.2. Richesse de la région de tissemsilt en espèce végétale

L'altitude plus que le sol impose son empreinte en ce domaine. Le manteau forestier demeure sans doute l'élément le plus remarquable du massif de l'Ouarsenis. Nous rencontrons le chêne-vert sur les terres assez argileuses et le Pin d'Alep sur les roches calcaires (Tableau 08). Dans les parties basses, où la forêt a été à peu près détruite, c'est le maquis avec lentisques et oliviers. Au-dessus, quand le Diss n'envahit pas le terrain, c'est le pin d'Alep qui domine. A partir de 900 mètres, c'est le domaine des chênes (Chênes vert – Chêne liège et Chêne zèen). Au-dessus de 1300 m apparaît le cèdre (Djebel Meddad en particulier à Theniet el Had), (figure 15).

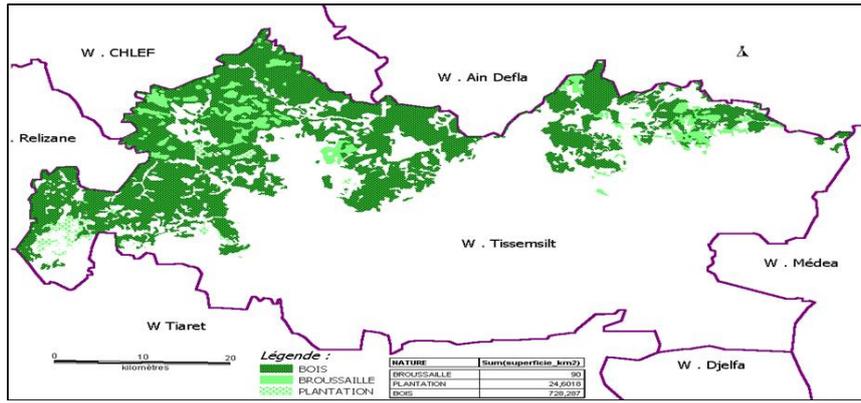


Figure 15: Carte de végétation de la wilaya de Tissemsilt(CDF).

La wilaya de tissemsilt recouvre une flore riche et diversifié engendrée par l'existence de 157 espèces (figure 16). Les familles les mieux représentées sont: lamiacea, Astéracées, Poacées et Fabacées. En plus on trouve Le chêne liège souvent mélangé avec des essences forestières telles que: le chêne vert, le chêne zeen, le cèdre de l'Atlas et le genévrier oxycedre (Sarmoum *et al.*, 2013).

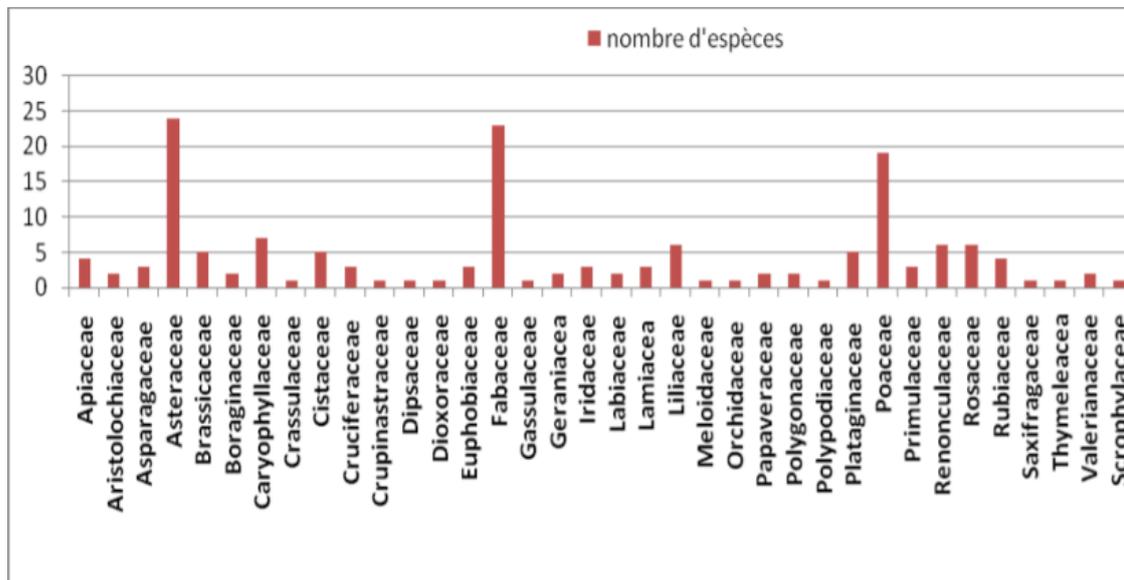


Figure 16: les espèces végétales présentées dans la wilaya Tissemsilt (Sarmoum *et al.*, 2013).

**Tableau 08** : Répartition des espèces dans la wilaya de Tissemsilt (CDF).

Type de formation	Superficie (Has)	(%)
Pin d'Alep	40 641	44,32
Chene Vert	14263	15,55
Cedre de l'Atlas	3707	4,04
Thuya de Berberie	2300	2,51
Chene Liege	1392	1,52
Cypres Vert	815	0,89
Genevrier Oxycedre	750	0,82
Chene Zeen	210	0,23
Eucalyptus	200	0,22
Maquis,Parcours et autres	27430	29,91
<b>Total</b>	<b>91708 Has</b>	<b>100%</b>

Les terres forestières ne sont pas réparties sur tout le territoire de la wilaya. Elles sont concentrées au niveau de trois (03) sous zones seulement qui regroupent à elles seules 99% de l'occupation forestière de la wilaya. Il s'agit des sous zones suivantes :

- Dhebel Ouarsenis : 36252has
- Massif de l'Ouarsenis Sud Est : 36983has
- Djebel Tafrent et Melaab : 19034has

**Deuxième partie**  
**Étude expérimentale**

# **Chapitre 04**

## **Matériels et méthode**

#### 4.1. Etat de lieu

Les données qui porte sur l'état de la wilaya de Tissemsilt en filière apicole sont collectées en s'adressant à la DSA de Tissemsilt. Cette étude porte sur des données en relation avec le nombre d'apiculteurs, nombre des ruchers, la production de miel, la prévalence des maladies prospectées et les ennemis naturels. et ce à partir de l'année 2010 jusqu'au 2022.

#### 4.2.L'extraction de l'huile essentielle et récupération de l'hydrolat

Plusieurs étapes sont suivies afin d'obtenir l'huile essentielle de thym, commençant par la récolte de la matière végétale sur terrain jusqu'au l'obtention de l'huile au laboratoire. L'extraction de l'huile essentielle de la plante a été effectuée par Hydro distillation.

##### 4.2.1. Récolte de thym

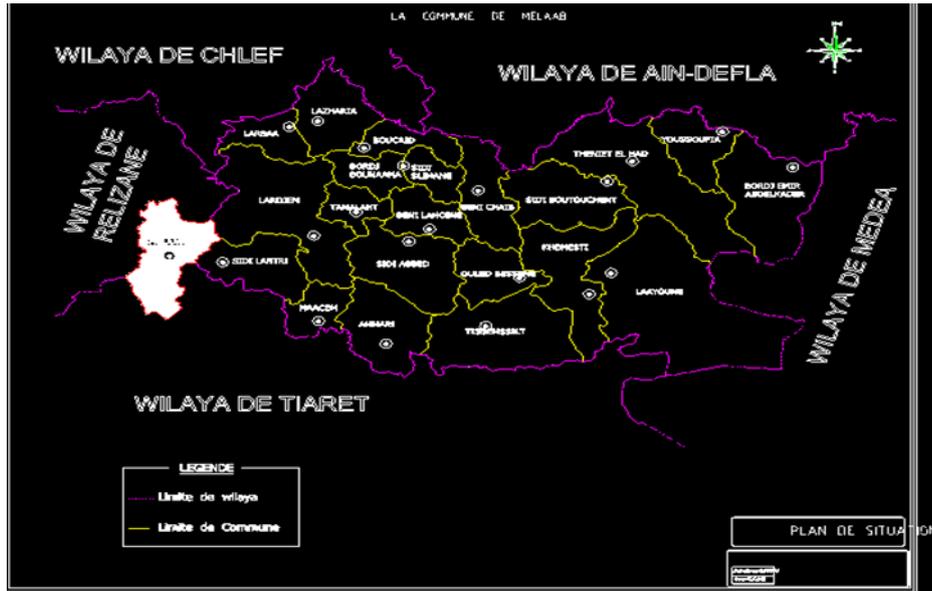
La plante étudiée appartient à l'espèce *Thymus lanceolatus Desf* Appartiennent à la famille des lamiacées. Prélevée et récoltée au niveau de la région Melaab dans la Wilaya de Tissemsilt.

Elle a été identifiée par Dr Chouhim K de département SNV, Faculté ST de l'Université de Tissemsilt.



**Figure 17:** Les feuilles séchées de *Thymus lanceolatus Desf* utilisées dans cette étude.  
(Originale)

L'étude expérimentale a été faite en utilisant un échantillon de thym qui est récolté dans la willaya de Tissemsilt, la commune de melaab (Figure 18). Le thym a été récolté au printemps à l'état vert puis séché, Afin d'éviter la détérioration de ses composants.



**Figure 18:** Situation géographique de la région de Melaab (commune Melaab,2023)

### 4.3.2. L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

Deux méthodes sont utilisées pour l'extraction de l'huile essentielle de thym, la première est basée sur l'utilisation d'un simple hydrodistillateur, tandis que la deuxième consiste à l'utilisation de type Clevenger.

#### 4.3.2.1. Hydrodistillation simple

Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 1999). Une quantité de 200 g de matière végétale sèche est transvasée dans un ballon de 2000 ml auquel un volume de 1500 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant 3 heures ; à l'aide d'une micropipette, on a récupéré l'huile essentielle obtenu qui a été mise dans des Tube à essai ou tube eppendorf couvres par aluminium et stockée à 4°C jusqu'à utilisation (Figure 19).



**Figure19:** Montage de distillation simple utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (originale)

#### 4.3.2.2. Hydro distillation de type Clevenger

Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (**Bruneton, 1999**). Une quantité de 125 g de matière végétale sèche est transvasée dans un ballon de 2000 ml auquel un volume de 950 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant 2 heures ; à l'aide d'une micropipette, on a récupéré l'huile essentielle obtenu qui a été mise dans des Tube à essai ou tube eppendorf couvres par aluminium et stockée à 4°C jusqu'à utilisation (Figure 20).



**Figure 20** : Montage de type Clevenger utilisé pour l'extraction Des huiles essentielles (**originale**) .

#### 4.4.3. Conservation d'huile essentielle obtenue

Pour éviter tout risque de dégradation de l'huile essentielle due à l'action de l'air et de la Lumière, nos échantillons étaient conservés au réfrigérateur (4-6°C) dans des flacons bruns bien fermés. L'huile essentielle obtenue a été mise dans des Tube à essai ou tube eppendorf et qui sont ensuite couvrés par l'aluminium.

#### 4.4.4. Calcul de rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la massed'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traiter.Selon la norme(**Afnor, 1992**), le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (MHE) et la masse de la matière végétale utilisée (MS). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$\text{RHE}(\%) = \text{MHE} / \text{Mms} \cdot 100.$$

**R** : Rendement en extraits fixes en g /50 g de matière sèche

**MHE**: quantité d'extrait récupérée exprimée en g.

**Mms** : quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

#### 4.5. Isolement et identification de champignon *Ascospheera Apis*

L'étude a porté sur une seule espèce fongique *Ascospheera apis*. Afin de déterminer l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus*. Nous avons choisi cette espèce fongique, car *Ascospheera apis* est parmi les espèces les plus dangereuses qui attaquent les colonies d'abeille provoquant des problèmes majeurs. (Fluriet *al.*, 1998)

##### 4.5.1. Isolement de champignon

Une partie d'un échantillon historique des larves et de la cire battue infectées est déposée stérilement et individuellement dans une boîte de Pétri contenant le milieu Sabouraud 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 (Jensen *et al.*, 2013).

##### 4.5.2. Purification

La purification vise à obtenir des colonies fongiques pures et spécifiques afin d'identifier les champignons en question. À l'aide de l'extrémité inférieure d'une pipette Pasteur stérile, nous prélevons des disques de mycélium que nous transférons dans un nouveau milieu Sabouraud, en veillant à mettre le mycélium en contact avec le milieu Sabouraud. Ensuite, les boîtes de Petri contenant les colonies fongiques sont incubées à 28°C pendant 5 jours. Cette opération doit être répétée jusqu'à l'obtention de colonies pures. (Yilmaz *et al.*, 2019).

##### 4.5.3. Méthode d'identification

Après l'obtention des colonies pures, une étape d'identification de ces dernières basée sur l'observation des critères cultureux et morphologiques est réalisée par deux examens, macroscopique et microscopique.

Une fois que des colonies pures ont été obtenues, une étape d'identification de celles-ci est réalisée en se basant sur l'observation des critères culturels et morphologiques à travers deux examens, à savoir l'examen macroscopique et l'examen microscopique.

#### 4.5.3.1. 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). Sur le milieu de culture, les colonies d'*Ascospheera apis* sont blanches et denses, leurs diamètres varient entre 5 cm et 8 cm. Après 8 jours de germination, le mycélium était blanc et aérien (chahbar, 2017)(figure 21).



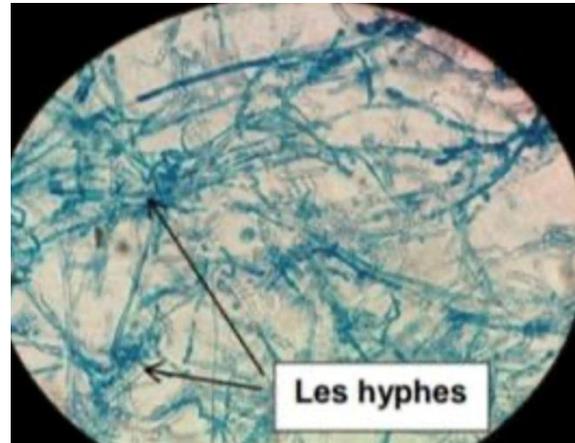
Figure 21 : Aspect macroscopique d'*Ascospheera apis*(chahbar, 2017).

#### 4.5.3.1. Examen 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 de bleu méthylène, 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. Aussi pour identifier l'apparence des champignons, nous avons utilisé la méthode de scotch. Elle consiste à coller doucement un scotch transparent sur la surface du champignon, puis à la place sur une lame pour l'examiner sous microscope. Cette méthode est particulièrement utile pour les champignons qui poussent sur les surfaces difficiles à prélever et pour ceux qui ne peuvent pas être coupés en tranches pour être examinés.

Les hyphes d'*Ascospheera apis* sont segmentés et ont des diamètres compris entre 2,5  $\mu\text{m}$  et 8  $\mu\text{m}$ . Ils présentent des ramifications dichotomiques bien marquées. Les fructifications se présentent sous forme de kystes de spores sphériques, appelés également sporocytes ou ascoma, avec un diamètre variant entre 47  $\mu\text{m}$  et 140  $\mu\text{m}$ . L'ascoma renferme de nombreuses

balles de spores, appelées asques, avec un diamètre oscillant entre 9  $\mu\text{m}$  et 19  $\mu\text{m}$ . Les spores hyalines, appelées ascospores, ont des dimensions d'environ 2,7  $\mu\text{m}$  à 3,5  $\mu\text{m}$  de longueur et de 1,4  $\mu\text{m}$  à 1,8  $\mu\text{m}$  de largeur maximales respectivement (**Chahbar, 2017**) (figure 22).



**Figure 22 :** Aspect microscopique d'*Ascosphaera apis* (Gr X 400) (**chahbar, 2017**)

#### **4.6. Testde l'activité antifongique sur *Ascosphaera apis***

L'efficacité de l'huile essentielle de thym, a été testée contre le champignon entomopathogène *Ascosphaera apis* pour évaluer son activité antifongique.

##### **4.6.1. Préparation des doses (concentration) d'huile essentielle de thym**

Nous avons mis séparément les doses d'huile essentielle de thym dans 09 bécher stériles par différentes concentrations (13,5 $\mu\text{l}$ . 12 $\mu\text{l}$ . 10,5 $\mu\text{l}$ . 9 $\mu\text{l}$ . 7,5 $\mu\text{l}$ . 6 $\mu\text{l}$ . 4,5 $\mu\text{l}$ . 3 $\mu\text{l}$  et 1,5 $\mu\text{l}$ ). Ensuite nousajoutons dans chaque bécher 30ml de milieu culture sabouraud dissoute, on mélange, puis on le vide dans les Boites Pétri .Où chaque bécher remplit trois Boites Pétri puis Laissez-le pendant 15 minutes jusqu'à ce qu'il durcisse au milieu de culture.Pour le témoin, nous mélangeons le champignon *A. apis* avec le milieu de culture sélectif

##### **4.6.2. Préparation des doses (concentration) d'hydrolat de l'huile essentielle de thym**

Nous avons misséparément les doses d'hydrolat de huiles essentielles de thym dans 10 bécher stériles par différentes concentrations (0,3ml. 0,6ml. 0,9ml. 1,2ml. 1,5ml. 1,8ml. 2,1ml. 2,4ml. 2,7ml et 3ml). Ensuite on ajoute danschaque bécher 30ml de milieu culture sabouraud dissoute, on mélange, puis on le vide dans les Boites Pétri .Où chaque bécher remplit trois Boites Pétri puis laissez-le pendant 15 minutes jusqu'à ce qu'il durcisse au milieu

de culture. Pour le témoin, nous mélangeons le champignon *A. apis* avec le milieu de culture sélectif.

### 4.6.3. Test des concentrations de champignon

#### 4.6.3.1. Ensemencement

En utilisant l'extrémité inférieure d'une pipette Pasteur stérile, nous prélevons des disques mycéliens que nous transférons dans un milieu Sabouraud, en veillant à mettre le mycélium en contact avec le milieu. Nous répétons cette opération avec le reste des concentrations de la même manière.

#### 4.6.3.2. L'incubation

Les boîtes de Petri sont placées en incubation pendant 5 jours à une température de 28°C (figure 23). Les résultats sont ensuite évalués en mesurant en centimètres le diamètre de la zone d'inhibition. L'expérience est répétée trois fois pour chaque extrait d'huile essentielle, et les résultats expérimentaux sont exprimés en fonction du diamètre du développement du champignon *Ascospheera apis*.



**Figure 23** : incuber les boites de pétri dans une étuve à 28°C. (Originale)

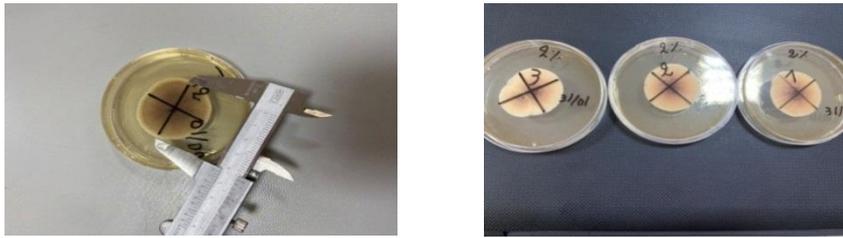
#### 4.6.3.3. La lecture

L'évaluation de l'activité antifongique des extraits d'huile essentielle est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à différentes concentrations. La lecture a été faite par la mesure des diamètres des développements du champignon *d'Ascospheera apis* au tour des disques à l'aide d'un pied à colis. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et symbolisés par des signes (A et B) (la figure 24)

On classe les démettre de développement d'ascosphaera apis selon la longueur

A : démettre plus long (longueur)

B: démettre peu long (largeur)



**Figure 24 :** pris les mesures de diamètre des disques (**originale**)

D'autres chercheurs (**Krutmuang et al., 2022**) ont utilisé la même méthode pour mesurer le diamètre de l'inhibition des colonies du champignon. Les mesures sont effectuées sur les axes X et Y (A : caractéristique de la mise en place du champignon sur le milieu, B: évaluation de la croissance fongique sur le milieu.) (Figure 25), puis le pourcentage moyen d'inhibition de la croissance de champignon a été estimé.



**Figure 25:** la représentation de l'efficacité des vapeurs d'extraits de plantes dans l'inhibition de la croissance mycélienne du champignon (*Ascosphaera apis*) sur le milieu.

(**Krutmuang et al., 2022**).

#### 4.6.3.4. Taux d'inhibition

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne est déterminé après 5 jours d'incubation à 28°C, en utilisant la formule d'Abbott (**Motiejunaite et Peiculyie, 2004**).

$$T = (DK - D0) / DK * 100$$

**DK** : diamètre de la colonie fongique du témoin (en mm).

**D0** : diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait (en mm).

**T** : taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage (%).

**4.7. Analyses statistiques**

Toutes les analyses statistiques sont faites par logiciel SAS version 9. La probabilité était acceptée à 95 %. Pour étudier l'efficacité et l'impact des différentes concentrations de l'huile essentielle ainsi que son hydrolat, nous avons utilisé le test statistique nonparamétrique de Wilcoxon. Un modèle linéaire généralisé (GLM) a été utilisé pour différencier entre l'efficacité des produits valorisés dans cette étude. Nous avons exploité l'option « Means Duncan Waller » pour le groupement des doses homogènes issues de ces deux produits utilisés. Et ce pour grouper les doses qui ont les mêmes efficacités. La procédure Proc PROBIT LOG10 a été utilisée pour estimer les concentrations inhibitrices de la croissance mycélienne.

# **Chapitre 05**

## **Résultats et discussion**

## 5.1. Etat de lieu

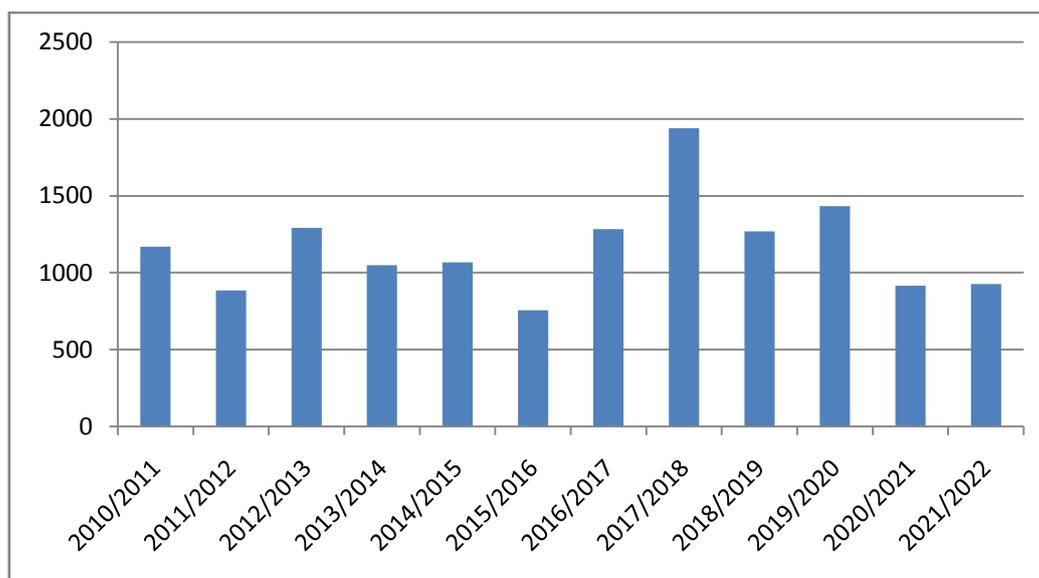
Pour étudier l'état de cheptel apicole dans la région de Tissemsilt, nous avons collecté des informations sur apiculture au niveau de la DSA de Tissemsilt, et ce pour une période qui s'étale entre 2010 et 2022.

### 5.1.1. Répartition des apiculteurs sur les communes

Le nombre d'apiculteurs par année et par commune est illustré dans le tableau (09) et la figure (26). Nous avons constaté que le nombre d'apiculteurs est très important en 2017/2018 (1040 apiculteurs) (tableau 09 figure 26). Ce qui peut être justifié par le soutien de l'état qui a lancé en 2017 par la DSA. Aussi, pendant les années 1990, les agriculteurs ont quitté leurs villages pour des mesures de sécurité, mais actuellement ces agriculteurs ont rejoint leurs terrains. Ce qui peut expliquer l'augmentation en nombre d'apiculteurs par rapport les années passées. En revanche, entre 2018 et 2022, le nombre d'apiculteurs a diminué considérablement. Après la distribution des ruches pour les agriculteurs, en 2017, il est à signaler que le manque d'accompagnement et d'orientation a favorisé l'abondance de la filière par les agriculteurs pour des raisons de manque de compétences. D'autres facteurs aussi peuvent être considérés comme étant des causes de cette diminution. Parmi eux, nous citons les changements climatiques et la réduction en précipitation, la pauvreté en plantes mellifères influençant le rendement en termes de quantité de miel produit. Entre les années 2010 et 2016, le nombre d'apiculteurs était très faible relativement. Selon les services concernés de la DSA, durant ces années il avait seulement des apiculteurs amateurs ou bien ceux qui considèrent l'apiculture comme fonction secondaire. Ainsi selon les mêmes sources, il n'y avait pas de recensement de l'ensemble des apiculteurs de la région. Les mêmes résultats étaient signalés par **Kidoud (2020)**, dont la plupart des apiculteurs sont des apiculteurs amateurs avec certains d'autre qui considèrent l'apiculture comme une fonction secondaire (**Kidoud, 2020**). En conséquence, le niveau de technicité des apiculteurs amateurs, est insuffisant.

**Tableau 09 :** Nombre apiculteur par commune dans la région de tissemsilt 2010-2022(DSA, 2023).

Année Commune	10/11	11/12	12/13	13/14	14/15	15/16	16/17	17/18	18/19	19/20	20/21	21/22
Tissemsilt	10	7	35	26	38	15	38	115	74	74	24	24
BBN	110	99	115	104	104	90	90	143	121	113	56	56
THE	65	65	63	76	44	59	71	209	76	120	56	56
LAZHARIA	120	101	125	89	79	56	56	58	44	63	42	42
BENI CHAIB	70	38	72	61	61	68	79	107	63	58	38	38
LARDJEM	50	12	58	38	49	35	83	98	37	44	104	104
MELAAB	40	18	52	14	39	11	50	73	49	83	25	25
SIDI LANTRI	25	13	48	36	47	12	59	68	31	70	45	45
B/EMIR AEK	30	22	30	30	39	15	42	75	62	69	35	35
Laayoun	5	5	8	12	12	27	31	58	22	48	33	33
Khemisti	6	6	8	9	19	45	45	49	27	39	29	29
Ouled bessem	15	22	22	18	27	17	32	19	29	47	27	29
Ammari	65	65	65	68	41	36	93	103	63	63	43	48
Yousoufia	10	10	10	10	13	17	21	40	20	22	50	50
Sidi boutouchent	25	34	24	26	30	39	44	87	45	66	58	58
Larbaa	70	35	71	38	37	13	20	44	39	49	32	38
Maacem	41	41	55	31	31	10	44	32	32	30	19	20
Sidi abed	83	83	83	80	79	17	84	111	80	79	21	25
Tamelaht	30	19	34	29	34	13	29	90	50	50	25	25
Sidi slimen	90	76	104	104	100	76	109	134	134	99	31	31
Boucaid	85	03	88	47	50	30	50	100	50	54	38	32
Beni lahcen	124	110	122	103	97	55	113	127	120	93	84	84
Total	1169	944	1292	1049	1076	756	1283	1940	1268	1433	915	927



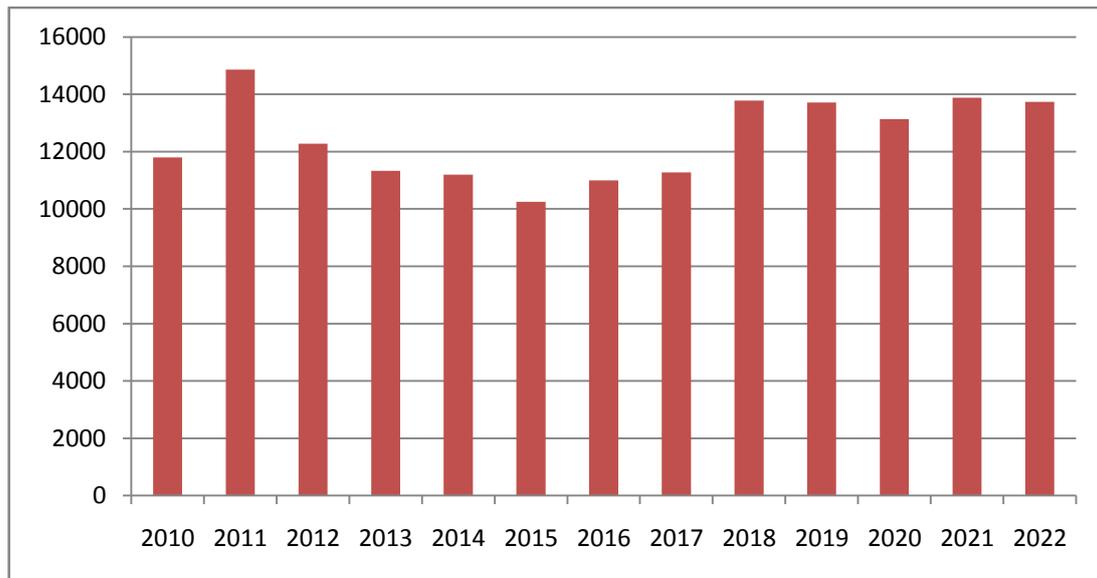
**Figure 26:** Evolution de nombre d'apiculteurs dans la région de Tissemsilt 2010-2022(DSA, 2023).

### 5.1.2. Nombre des ruches pleines

La figure (27) montre l'évolution d'effectifs des ruches pleines au niveau de la wilaya de Tissemsilt depuis 2010 jusqu'à 2022, Selon **DSA(2023)**, nous remarquons que il n'ya pas une grande différence, durant cette période. La moyenne est de 12480 ruches avec un nombre maximal de 14860 ruches. en 2011. Le nombre le plus faible a été trouvé en 2015 avec 10250 ruches (tableau 10).

**Tableau 10 :** Evolution de l'effectif des ruches dans la région de tissemsilt 2010-2022(DSA, 2023).

<b>Année</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
<b>Nombre des ruches</b>	<b>11800</b>	<b>14860</b>	<b>12280</b>	<b>11330</b>	<b>11200</b>	<b>10250</b>	<b>11000</b>
<b>Année</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>2021</b>	<b>2022</b>	
<b>Nombre des ruches</b>	<b>11271</b>	<b>13778</b>	<b>13712</b>	<b>13135</b>	<b>13887</b>	<b>13739</b>	



**Figure 27:** Evolution de nombre des ruches dans la région de Tissemsilt 2010-2022(DSA, 2023).

### 5.1.3. La production de miel

D'après les données de la direction des services agricoles de la wilaya de Tissemsilt, la production du miel varie d'une commune à une autre et d'une année à une autre, et ce à cause de plusieurs facteurs. Pendant la saison apicole 2017 - 2018, la production du miel est la plus importante avec une quantité de 1200 Qs (Figure 28). En comparant cette production avec les autres années, la cause principale était l'effet de l'environnement. La précipitation, les formations d'apiculteurs en raison de distribution des ruches dans le cadre de soutien agricole de l'état au personne ayant une expérience ou compétence dans ce domaine. En comparant cette production avec celle des années précédentes (2010 à 2016), la production est moins importante. Plusieurs facteurs peuvent influencer la production, parmi lesquels nous citons manque de sensibilisation sur l'intérêt de cette filière auprès des agriculteurs, des apiculteurs amateurs et des instances étatiques concernées.

Alors que, pour les dernières années (entre 2019 et 2022), la production est presque stable (constante) et précieuse et cela indique que ce domaine est devenu d'une grande importance mais l'impact de l'environnement reste essentiel sur la quantité et la qualité de miel produit. Mais on ne peut pas passer de l'influence de l'état sanitaire de l'abeille domestique dans la production apicole, notamment, l'apparition de plusieurs maladies et ennemis, conduisant à une perte économique importante.

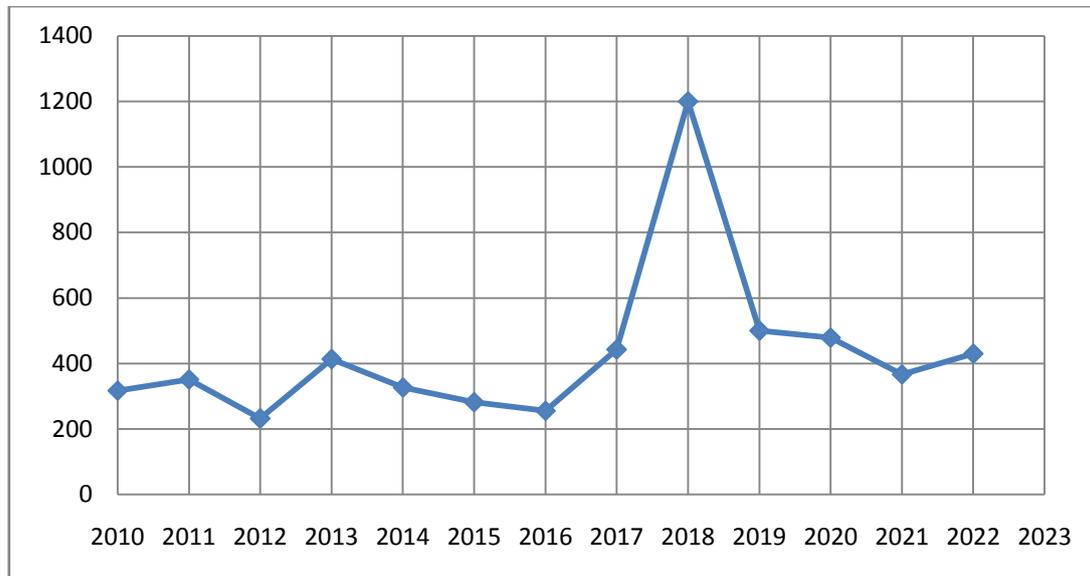
### 5.1.3.1. La production du miel par commune

Nous avons trouvé que les communes Bordj.B.N, Benichaib, Sidi Slimen, Sidi Lantri et Beni Lahcen sont caractérisées par une production du miel très importante (tableau 11). Ce qui peut être justifié par l'impact des conditions climatiques, particulièrement la pluviométrie, et des conditions géographiques (zones agricoles disponibles sur les pâturages apicoles, et des zones forestières). Il est à noter que les conditions environnementales de ces régions sont favorables à la production par rapport aux autres communes. Les communes de Borj el Amir AEK, Sidi Bououchent et Boucaïed sont caractérisées par une production très faible. Cela est dû à plusieurs facteurs, particulièrement ceux géographiques et climatiques, plus précisément la sécheresse et l'étage bioclimatique semi-aride de la wilaya. En revanche, la production de miel est quasi inexistante dans les communes de Tissemsilt, Laayoune, Khemisti, Ammari el Yousofia. Ce qui est expliqué par les conditions géographiques et l'absence des forêts, en plus les réchauffements climatiques entraînant des changements climatiques dans le monde et en Algérie. Aussi, le vent sirocco (Al-shahili) soufflant dans les zones de la wilaya pendant une période de plus de 20 jours en moyenne, un autre facteur influençant la production apicole. L'incendie sur le territoire de la wilaya, qui a eu un impact négatif et important sur la détérioration du couvert forestier et végétal et sur la détérioration de la biodiversité en général.

Les conditions environnementales, telles que la saison, les steppes, les zones forestières (THE, BBN, Sidi Slimen, Lazharia, Boucaïd, Sidi Lantri, Melaab, Bordj Amir Aek, Yousofia) et les zones agricoles, ont un impact sur la production de miel. Par exemple, certaines communes comme Ammari, Khemisti et Laayoun. La précipitation est un facteur qui entraîne une augmentation de la productivité. De plus, les facteurs climatiques, en particulier l'humidité, jouent un rôle important, car il existe une corrélation positive très significative entre la production de miel et l'humidité.

Tableau 11: La production de miel par commune (2009 – 2022)

Année \ Commune	09/ 10	10/ 11	11/ 12	12/ 13	13/ 14	14 /15	15/ 16	16/ 17	17/ 18	18/ 19	19/ 20	20/ 21	21 /22
<b>Tiss</b>	0	1	0	4	2	4	2	7	38	15	15	22	7
<b>BBN</b>	30	55	35	55	48	42	32	26	115	93	64	41	26
<b>T.H.E</b>	21	16	15	14	19	10	19	36	143	9	15	9	26
<b>Laz</b>	21	22	11	23	12	10	16	10	28	14	12	11	10
<b>Bch</b>	26	35	26	35	29	27	19	25	83	26	18	17	25
<b>Ldjm</b>	19	15	4	27	16	24	22	38	78	38	76	58	38
<b>Mlb</b>	20	9	2	17	9	13	8	21	43	3	11	6	21
<b>S.A</b>	22	6	3	22	13	15	15	26	43	12	32	19	26
<b>B.A.A</b>	12	11	5	7	6	9	11	15	39	9	17	5	15
<b>Lyn</b>	0	6	1	2	3	3	2	7	33	7	10	4	7
<b>Khst</b>	0	9	2	3	3	4	3	14	27	9	12	6	14
<b>O.bsm</b>	20	4	6	6	3	6	3	8	4	8	13	14	8
<b>Amr</b>	0	6	11	18	20	13	9	34	71	29	15	28	34
<b>Ysf</b>	0	2	2	2	2	3	6	7	18	4	2	7	7
<b>S.b</b>	12	4	14	8	6	11	19	23	71	9	12	7	20
<b>Lrb</b>	19	13	8	17	7	7	10	15	25	11	10	6	15
<b>Mcm</b>	11	1	5	3	3	2	1	5	9	4	2	5	5
<b>S.bed</b>	8	3	6	8	7	7	5	18	31	7	7	12	18
<b>Tmt</b>	9	12	3	14	8	12	10	19	32	4	13	7	19
<b>S.s</b>	34	45	26	50	50	35	25	40	93	103	65	43	40
<b>Bcd</b>	14	15	6	14	6	6	10	15	70	17	18	12	15
<b>B.L</b>	19	62	41	66	57	18	10	34	108	71	40	27	34
<b>Totale</b>	317	351	232	413	327	282	256	443	1200	500	479	367	430



**Figure 28:** Evolution de la production du miel dans la région de Tissemsilt 2010-2022. (DSA 2023)

#### 5.1.4. Les données sur les maladies et les ennemis

##### 5.1.4.1. Méthode de prospection

Concernant la méthode d'échantillonnage (prélèvement) effectuée pour les inspecteurs vétérinaires de la DSA sur les colonies d'abeille identifiées, nous avons reçu les informations ci-mentionnées.

Chaque apiculteur qui veut prendre l'agrément sanitaire de son exploitation apicole, il devait contacter le vétérinaire de la subdivision communale pour prélever des échantillons d'abeilles vivantes. Les échantillons doivent prendre les mêmes numéros que ceux qui sont déjà utilisés pour l'identification des ruches. Dans chaque ruche, les inspecteurs utilisent des petites cagettes qui contiennent entre 30 et 50 abeilles et qui sont percées pour ventiler les abeilles, ces boîtes contiennent une solution sucrée pour attirer les abeilles à la boîte.

Les échantillons doivent être conservés dans un réfrigérateur (glacière) afin de les envoyer à l'inspection vétérinaire. Après 48 heures, ces échantillons seront envoyés au laboratoire régionale de la médecine vétérinaire de Mostaganem. Tout en accompagnant ces échantillons avec une demande d'analyse apicole. La demande est rédigée par l'inspecteur vétérinaire en précisant la nature des maladies à détecter (virus, bactérie, parasite). La réponse de laboratoire est fixée, au maximum, dans une semaine et envoyée par fax ou bien par email. L'accord de l'agrément sanitaire à l'apiculteur est conditionné par l'obtention des résultats négatifs des maladies analysées.

#### 5.1.4.2. Résultat des maladies prospectées par commune

Au niveau de la DSA, les seules données disponibles sont surtout celles qui portent sur la prévalence de varroase de la nosérose, de la loque américaine et de la fausse teigne. Selon le tableau(12) la varroase est la maladie la plus répandue dans cette région, suivie par la nosérose et en dernière position l'infestation de la fausse teigne. L'ensemble des communes prospectées sont caractérisées par des résultats positifs pour la varroase. Cette maladie, selon plusieurs chercheurs à travers le monde entier, est cosmopolite (Fernandez et Coineau, 2002). Cependant la fausse teigne ne se trouve que dans certaines communes, notamment Ouled bessem, et qui n'a été signalée que durant l'année 2010. Cette année (2010) est caractérisée par une période hivernale froide relativement, qui peut favoriser l'infestation de ce parasite. Ce parasite a été signalé particulièrement dans les faibles colonies et les colonies à faible effectif. La fausse teigne apprécie l'endroit à forte taux d'humidité relative et les espaces confinés. Il se développe à une altitude inférieure à 1000 mètres et il peut causer plus de dégâts durant ces stades larvaires (insecte de faibles colonies).

Pour la nosérose, elle existe dans certaines communes, particulièrement, durant la période s'étalant entre 2019 et 2020. La direction des services agricoles n'ont pas pris des prélèvements pour les analyser à cause de l'épidémie Covid 19.

Nous avons remarqué qu'aucune maladie n'a été détectée, hormis les parasites, pendant l'année 2010. Aussi, aucune détection n'a été signalée dans certaines communes pendant certaines années. Nous signalons la commune de Sidi Slimen en 2014, S. Lantri ; Ammari en 2017, TEH et S. Boutouchent en 2021, Ammari, BEK, laayoun, khemisti, S. Abed et TEH en 2022.

L'apparition et la propagation des maladies apicoles varient considérablement d'une commune à une autre, ce qui peut être justifié par l'intervention de plusieurs facteurs. Nous citons parmi eux les changements environnementaux (Anderson, 1988), dont ces changements peuvent entraîner des différences dans les composés chimiques et les facteurs microbiens présents dans un écosystème affectant la santé des abeilles. Nous avons par exemple, l'usine de barytine à Boucaïd, et la station de concassage à Theneit el Had et Bordj Amir AEK.

Ainsi, la propagation des maladies est conditionnée par le régime alimentaire (**Brodtschneider et Crailsheim, 2010**), dont chaque modification du régime alimentaire des abeilles peut entraîner une propagation rapide de certaine maladie. Certains aliments de qualité médiocre peuvent contribuer à l'émergence et à la propagation d'infections. Dans le même ordre d'idée, l'exposition aux produits chimiques utilisés dans différentes zones peuvent avoir des effets négatifs sur les santé des abeilles en augmentant le risque d'affection par des maladies. Les changements climatiques peuvent influencer la propagation des maladies, car les températures élevées peuvent favoriser la propagation des maladies dans certaines communes. Cependant, il est difficile de prédire les causes exactes des épidémies chez les abeilles mellifères, mais il est indispensable de comprendre les facteurs potentiels afin de prendre des mesures préventives appropriées qui peut aider à réduire la propagation de la maladie et à protéger les abeilles.

Tableau 12 : Résultats des maladies obtenues par la DSA

	La commune	Nombre D'apiculteur	Nombre des Ruches prélevé	Les maladies Résultat de l'Abo
2010	O.Bessam	02	05	Fausse teigne +varroas
	Sidi slimen	01	05	————
2011	TEH	01	15	Varroas
2012	TEH	04	402	Varroas
2013	Khemisti	01	43	Mauvaise conditionnement
2014	S.lantri	01	25	————
	TEH	04	45	Varroas + nosérose
	Ammari	02	20	————
2015	TEH	01	07	Nosérose
	B.AMIR .AEK	04	79	Varroas
2016	TEH	04	41	Varroas + nosérose
	S.boutouchent	01	23	Varroas
	BBN	01	37	Varroas + nosérose
	Lardjem	02	13	Varroas
	Boucaid	01	30	Varroas + nosérose
2017	THE	01	12	————
	S.boutouchent	02	23	————
2018	S.boutouchent	03	39	Varroas + nosérose
	S.lantri	01	50	Varroas + nosérose
2019		-	-	-
2020		-	-	--
2021	Ammari	02	23	————
	B.E.AEK	01	15	————
	Laayoun	01	10	————
	Khemisti	02	11	————
	Tamelah	01	11	Varroas
	Laardjem	01	07	————
	Malaab	02	12	Varroas
2022	Boucaid	07	114	————
	Lardjem	01	19	Varroas + nosérose
	Khemisti	01	05	Varroas
	B.E.AEK	01	10	Varroas + nosérose
	S.Abed	02	23	————
	T.E.H	01	10	Varroas + nosérose

### 5.1.5. Méthodes d'identification des ruches

L'identification des ruches dans la région de Tissemsilt a été suggéré par l'ancien directeur des services agricoles. Il s'agit de la définition des ruches des abeilles au niveau des communes de la wilaya de Tissemsilt depuis 2017 au 2018. L'apiculteur devait déclarer sur la pratique de l'apiculture, puis il s'engage à soumettre ses ruches à une identification et un suivi sanitaire vétérinaire saisonnier. Le suivi est assuré en prélevant des échantillons vivants sur les abeilles de chaque ruche. Tous les échantillons sont envoyés au laboratoire régional de la santé animale de Mostaganem. L'agrément est délivré à l'apiculteur lorsque les résultats des tests des maladies sont négatifs. Ensuite, le chef de lieu (subdivisionnaire) avec le délégué et le vétérinaire de la subdivision de chaque commune font une sortie sur le terrain chez l'apiculteur pour identifier ces ruches en fixant la numérotation sur la ruche. L'identifiant doit contenir certaines informations, à titre d'exemple : 38/01/13/04.

38 → signifier le numéro de la wilaya

01 → numéro de la commune

13 → numéro de l'apiculteur

04 → numéro de la ruche chez l'apiculteur

Cette procédure a été prise afin de faciliter le travail de la chambre agricole

### 5.2. Détermination du rendement de l'huile essentielle

Le rendement d'huile de *thymus lanceolatus* Desf extraite par les deux méthodes, à savoir l'hydrodistillation et Clevenger, au niveau de laboratoire pédagogique de département snv de l'université de Tiaret, a donné dans des résultats qui sont illustrés dans le tableau 13 et la figure 29.

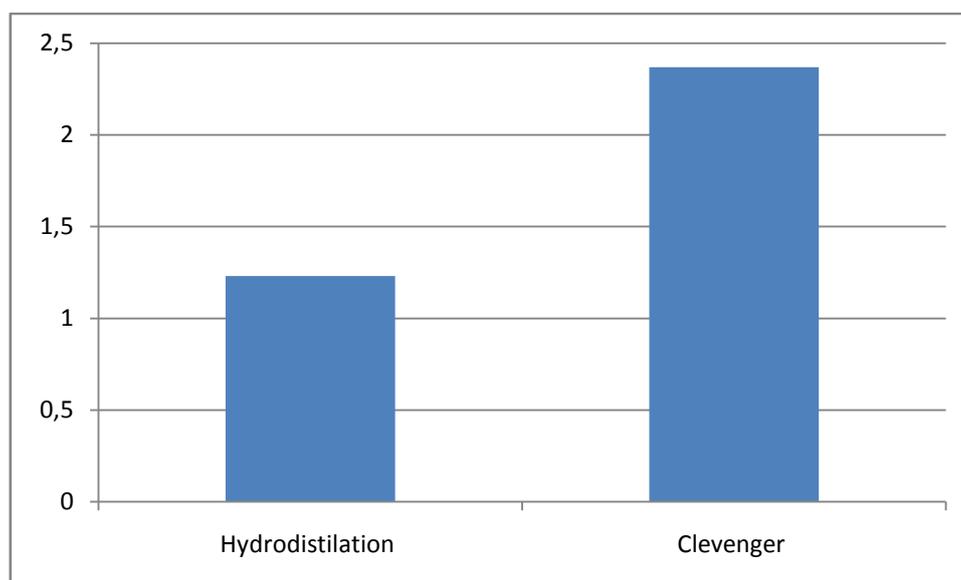
**Tableau 13** : rendement de l'huile essentielle de thym

	Hydrodistillation	Clevinger
<b>Rendement %</b>	<b>1,23±0,27</b>	<b>2,37±0,22</b>

D'après le tableau 13, nous avons enregistré des pourcentages de rendement qui se différencient selon la méthode d'extraction. Cette différence qui a été constatée, en utilisant les

deux manières d'extraction, pourrait être justifié par existence de différents facteurs affectant le processus d'extraction. Nous citons parmi eux, la qualité des outils et des matériaux utilisées dans le processus, les conditions de stockage et de séchage, la température et la pression de l'eau utilisée dans le processus, ainsi que la durée de l'extraction. (Kouch, 2014).

En ce qui concerne, le rendement de l'huile essentielle de thym extraite, se révèle meilleur que celui rapporté par Naili *et al.*, (2013) qui était de 0,84%. Selon certains auteurs, (Nouasri *et al.*, 2015) la composition chimique et le rendement en huile essentielle peuvent varier en fonction de différentes conditions, telles que la méthode utilisée, les parties de la plante utilisées, les produits et réactifs utilisés lors de l'extraction, l'environnement, le génotype de la plante, son origine géographique, la période de récolte, le degré et les conditions de séchage, la température, ainsi que la présence de parasites, de virus et de mauvaises herbes (Naili *et al.*, 2013).



**Figure 29** : le rendement d'huile essentielle de thym extraite par deux méthodes

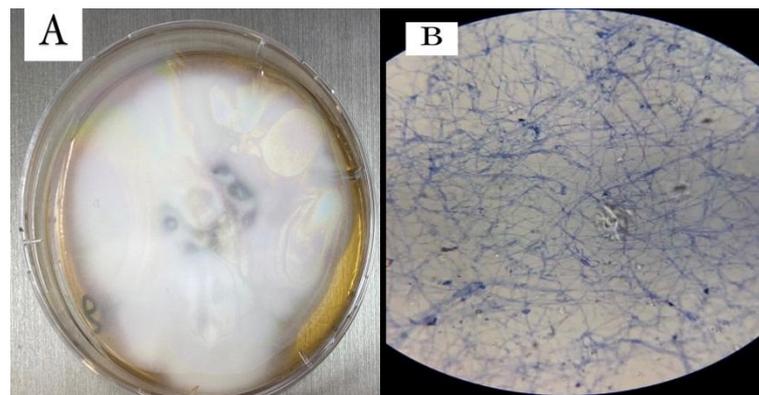
### 5.3. Test de l'activité antifongique d'HE contre *Ascosphaera apis*

Dans cette partie, nous avons testé l'activité antifongique de l'huile essentielle de thym contre un champignon entomopathogène *Ascosphaera apis*. L'ensemble des résultats obtenus sont illustrés dans cette partie.

### 5.3.1. Examen macroscopique et microscopique

Nous avons trouvé que le mycélium est apparu blanc et dense, concernant l'aspect microscopique les hyphes sont cloisonnés, les fructifications sont des sporanges sphériques.

Les résultats obtenus par l'observation macroscopique et microscopique d'*A.apis* sont similaires avec ceux qui ont été trouvés par plusieurs chercheurs (Jensen *et al*, 2013 ; Hemmerlé, 2015 ; Reynaldi *et al*, 2015 ; Chahbar, 2017).



**Figure 30:** *Ascosphaera Apis* après incubation, **A:** Observation macroscopique, **B :** Observation microscopique (G X 40).

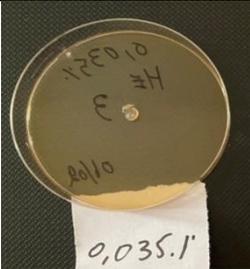
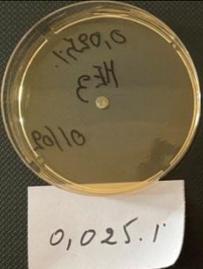
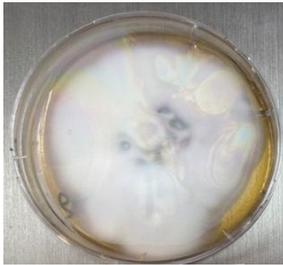
### 5.3.2. Résultats de test préliminaire des doses d'inhibitions

Vu que il n'y avait pas de donner bibliographique sur les doses d'inhibition de champignon *A . Apis* en utilisant l'huile essentielle de thym et son hydrolat. Aussi, il est à signaler qu'aucun chercheur n'a travaillé sur ce sujet. Donc nous avons trouvé utile de travailler sur des doses éloignées pour avoir une idée sur la fourchette de la dose inhibitrice. Les doses sont comme suit (13,5  $\mu$ l ; 12  $\mu$ l ; 10,5  $\mu$ l ; 9  $\mu$ l ; 7,5  $\mu$ l ; 6  $\mu$ l ; 4,5  $\mu$ l ; 3  $\mu$ l ; 1,5  $\mu$ l). et celles de l'hydrolat sont (0,3ml ; 0,6ml ; 0,9ml ; 1,2ml ; 1,5ml ; 1,8ml ; 2,1ml ; 2,4ml ; 2,7ml ; 3ml).

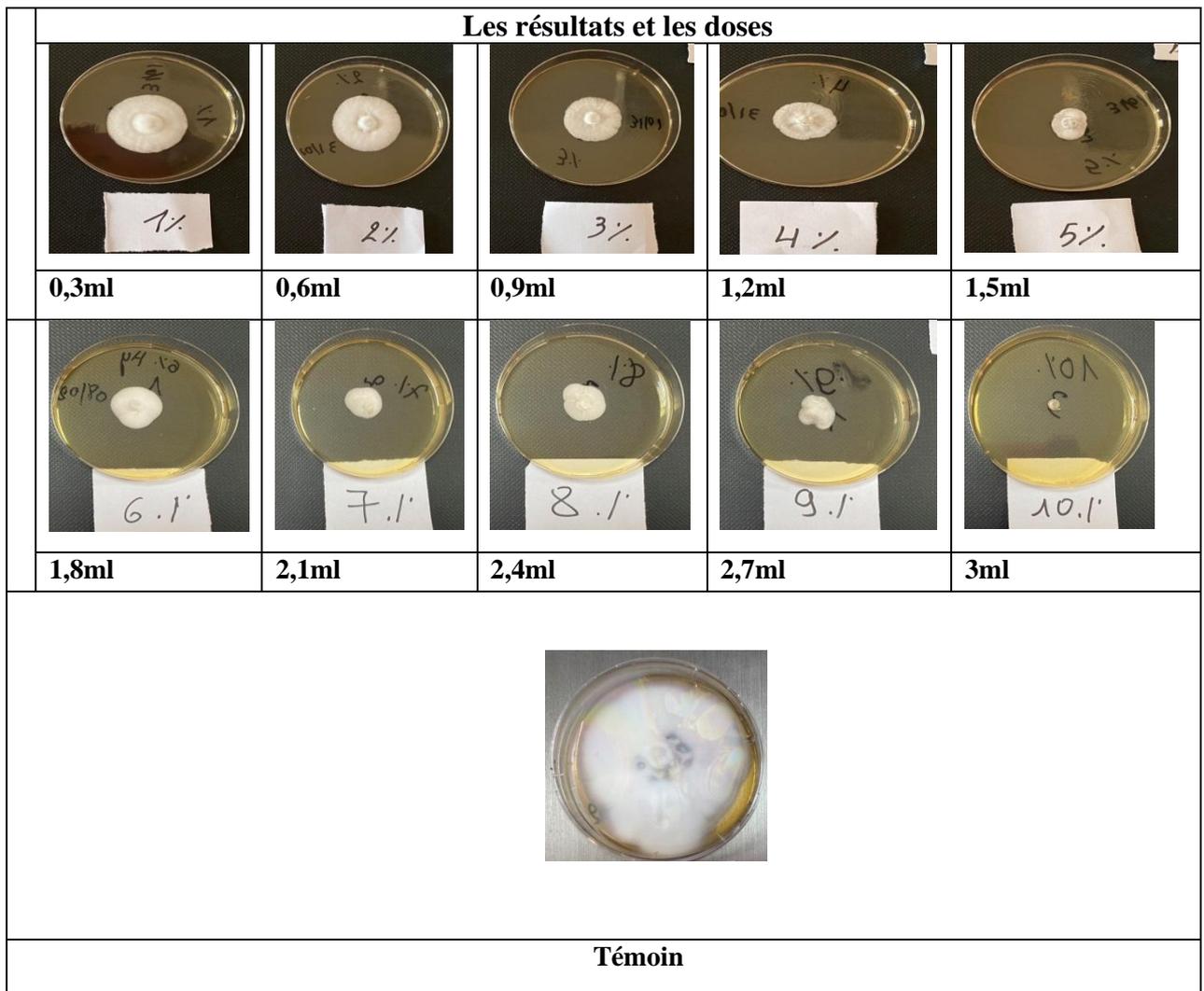
D'après le tableau cumilatif des résultats préliminaire de test, nous remarquons qu'à partir de 0,015 %, le taux d'inhibition de champignon était à 100 % (tableau 14 ; figure 30).

Tableau 14 : resultat des HE de thym sur *A. apis*

	Dosage HE %	HE en $\mu$ l	Dosage de milieu ml	Résultat
<b>HE</b>	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin
	0,045 %	13,5 $\mu$ l	30 ml	-
	0,04 %	12 $\mu$ l	30 ml	-
	0,035 %	10,5 $\mu$ l	30 ml	-
	0,03 %	9 $\mu$ l	30 ml	-
	0,025 %	7,5 $\mu$ l	30 ml	-
	0,020 %	6 $\mu$ l	30 ml	-
	0,015 %	4,5 $\mu$ l	30 ml	-
	0,010 %	3 $\mu$ l	30 ml	+
	0,005 %	1,5 $\mu$ l	30 ml	+
	Dosage de HY %	HY en ml	Dosage de milieu ml	Résultat
<b>HY</b>	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin
	1 %	0,3 ml	30 ml	+
	2 %	0,6 ml	30 ml	+
	3 %	0,9 ml	30 ml	+
	4 %	1,2 ml	30 ml	+
	5 %	1,5 ml	30 ml	+
	6 %	1,8 ml	30 ml	+
	7 %	2,1 ml	30 ml	+
	8 %	2,4 ml	30 ml	+
	9 %	2,7 ml	30 ml	+
	10 %	3 ml	30 ml	-

Les résultats et les doses				
				
13,5 µl	12 µl	10,5 µl	9 µl	7,5 µl
				
6 µl	4,5 µl	3 µl	1,5 µl	
				
<b>Témoin</b>				

**Figure 31:** Résultat de test L'activité antifongique de l'huile essentielle de thym contre *Ascosphaera Apis*



**Figure 32 : Résultat de test de l'activité antifongique d'hydrolat de l'huile essentielle de thym contre *Ascosphaera Apis***

### 5.3.3. Le taux d'inhibition maximal

Pour HE de thym, à partir de la dose 0,015%, le taux d'inhibition était à 100%. Donc il n'est pas évident de travailler sur les autres doses dépassant 0,015%. Cette dose trop faible (tableau 14) que nous avons utilisée a donné une inhibition totale de champignon.

Pour l'hydrolat, à partir de la dose 10%, le taux d'inhibition était à 100%. Donc n'est pas évident de travailler sur les autres doses dépassant 10%. Cette dose forte par rapport aux autres doses (tableau 14) que nous avons utilisées a donné une inhibition totale de champignon.

Ce qui peut être expliqué par une forte activité antifongique de thym, particulièrement contre l'ascosphérose. Plusieurs chercheurs ont étudié l'activité des huiles essentielles (**Zienab et Hassanein, 2022 ; Colinet *al.*, 1989.**) et des extraits végétaux (**Krutmuang *etal.*, 2022, Chaimanee *et al.*, 2017**) contre *Ascosphaera Apis*.

Il est à signaler que certains auteurs (**Zienab et Hassanein, 2022**) ont appliqué un mélange d'huiles naturelles, à savoir l'huile de thym, huile de clou girofle et huile de camphre avec concentration de 5%, avec l'acide formique 65% contre asosphérose, et ce dans des conditions de terrain.

Les résultats trouvés par **Zienab et Hassanein (2022)** ont confirmé que la réduction de l'infection dans le couvain scellé a été nettement réduite après les traitements à base d'huiles mélangées avec l'acide formique. Alors que les pourcentages de réduction des huiles mélangées ont atteint (85,5 %) et ceux de l'acide formique ont atteint (91,7 %) sur le couvain scellé. Les données obtenues ont montré que la réduction la plus forte de l'infection a eu lieu en mai. Les résultats de cet auteur montrent que le mois de mai est considéré comme étant la période d'inhibition maximale en utilisant la même dose que les autres mois alors que le taux d'inhibition le plus faible a été remarqué pendant le mois d'avril. Les résultats de cette étude étaient basés sur la quantification de nombre de momies qui ont été ressorties par les nettoyeuses. Cependant, à l'état naturel, sans y avoir de traitement, les abeilles nettoyeuses ont ressorti les larves momifiées pendant la période printanière après avoir une intensité dans l'activité de l'abeille (**Medina-Flores et al., 2022**).

Il est aussi à signaler que le comportement hygiénique est influencé par la génétique des abeilles domestiques (**Medina-Flores et al., 2022**).

#### 5.3.4. Période de traitement \_ taux d'inhibition

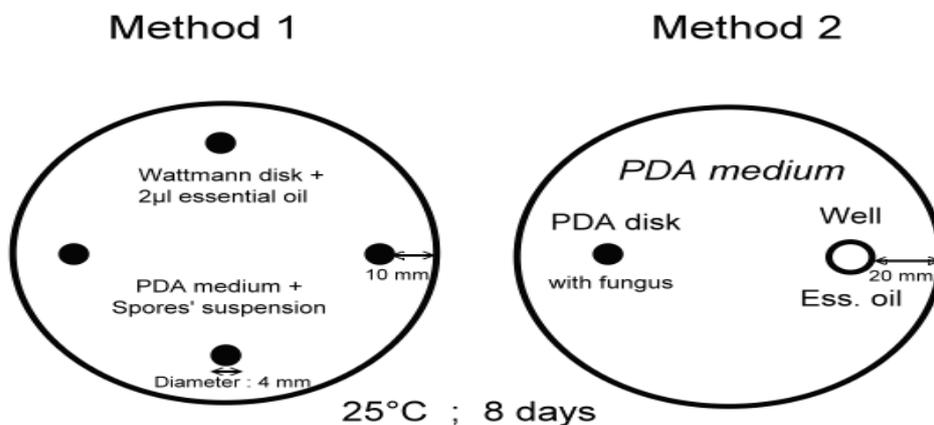
Cette étude a été réalisée pendant le mois de novembre, en pratiquant des tests in vitro, avec une température de 28°C. Mais in vivo la période de traitement peut influencer considérablement le taux d'inhibition. Ce qui a été confirmé par (**Zienab et Hassanein, 2022**) dont cette étude était réalisée sur 3 mois, à savoir mars, avril et mai. Cet auteur a signalé que le mois de mai est considéré comme étant la période d'inhibition maximale en utilisant les mêmes doses que celles utilisées pendant les autres mois. Alors que le taux d'inhibition le plus faible a été remarqué pendant le mois d'avril pour l'acide formique et le mois de mars pour les HE mixte.

#### 5.3.5. Les méthodes de traitement \_ efficacité

Nous avons testé in vitro l'efficacité d'HE de thym et de son hydrolat contre *Ascosphaera apis* en utilisant la méthode d'ensemencement de champion *A. Apis* sur un milieu

de culture spécifique Sabouraud. L'étude consiste à suivre le développement des souches *d'A. Apis* en présence d'huile essentielle de thym ou de son hydrolat.

D'autre méthode décrite par **Boulaghmen et al., 2018**, c'est la méthode de diffusion en gélose. Elle consiste à l'utilisation des disques de papier wathman stériles déposés au centre des boîtes de pétri contenant le sabouraud d'extrose agar. Ces disques sera imbibés par différentes concentrations d'huiles essentielle. **Boudeggaet al. (2010)** ont utilisées deux techniques différentes pour évaluer l'effet des huiles essentielles. La première expérience (Figure 32) était de suivre le développement des souches *d'A. Apis* en présence d'huiles essentielles. Cela s'est fait par contact direct entre les huiles et les micro-organismes. Des disques de papier ils ont utilisés et l'inoculum a été mélangé au milieu de culture par suffusion. La technique consiste à déposer des spores dans une boîte de Pétri de 90 mm, juste avant l'écoulement du milieu de culture. Après solidification, des disques de papier Whatman stériles ont été placés dans des distances égales et imbibés de spores. Dans la deuxième expérience (Figure 32), la technique était basée sur une confrontation entre les puits d'huile essentielle et le disque PDA portant du mycélium *d'A. apis*. Le milieu PDA a été versé dans des boîtes de Pétri. Après solidification, un disque de mycélium est placé face aux puits, destinés à recevoir les huiles testées.



**Figure 33** : Schéma de la confrontation (champignon / huile essentielle) par deux méthodes in vitro. (Boudeggaet al. 2010)

Certains chercheurs (**Zienab et Hassanein, 2022**) ont fait une étude basée sur le test de l'activité antifongique des substances naturelles in vivo. Leur expériences sont divisées en trois parties, chaque partie étant composée de cinq Colonies d'abeille (contrôle sans traitement - mélange d'huiles naturelles 5% - acide formique

65%). Les mesures de couvain operculé et ouvert étaient estimés avant et après le traitement, tous les 12 jours, une feuille de plastique est placée sous un rayon recouvert de vaseline pour attraper les momies tous les 3 jours.

Une lutte technique peut être utilisée contre le champignon mis en cause

Les conditions environnementale particulièrement la température, humidités, peuvent limiter le développement de la maladie (Chahbar, 2017), Donc le choix de site de rucher et la transhumance peuvent être considérés comme les méthodes de traitement technique. (Flores *et al.*, 1996).

### 5.3.6. Les doses\_ taux inhibition

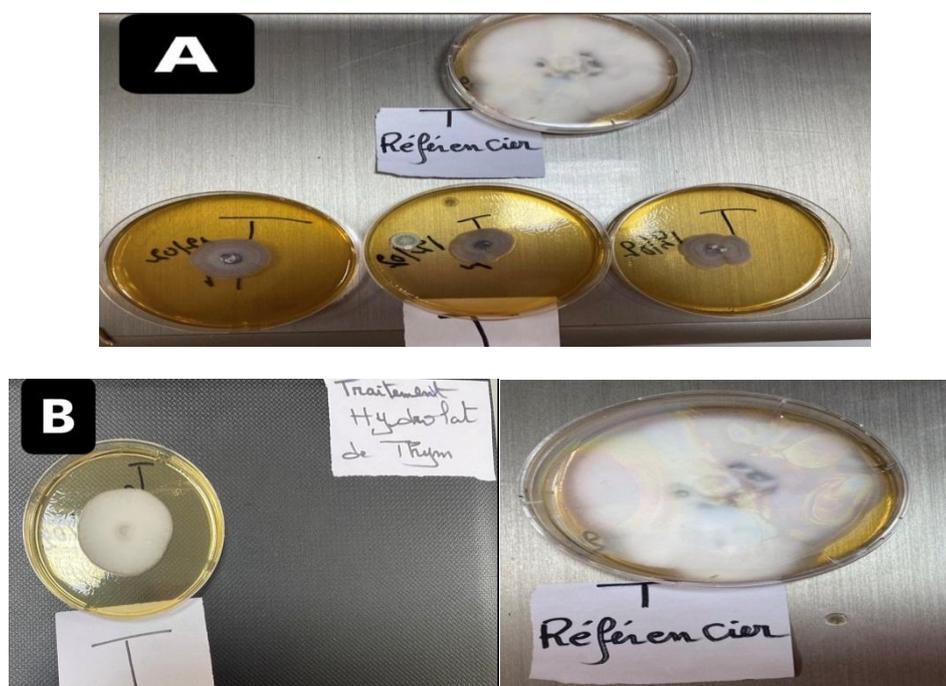
Pour tester l'efficacité de l'huile essentielle de thym ainsi que son hydrolat, nous avons utilisé le test non paramétrique de Wilcoxon, dans SAS9, pour comparer entre les moyennes. En considérant le taux d'inhibition comme étant un facteur variable et les différentes concentrations comme étant un facteur fixe. Pour l'huile essentielle, une différence significative a été trouvée entre les différentes concentrations (ddl=3 ; Chi2= 11 ; P=0,0117). Pour l'hydrolat, la différence entre les doses était hautement significative (ddl=10 ; Chi2= 32 ; P=0,0004). D'après les résultats obtenus, nous constatons que la croissance mycélienne d'*Ascosphaera Apis* diminue lorsque les doses augmentent. Et la zone d'inhibition se diffuse en intermédiaire des disques mycéliens (Figure 30 ; 31). D'Après ce que nous avons trouvée, la dose de traitement peut influencer considérablement l'efficacité des produits utilisés, effectivement plusieurs chercheurs ont travaillé sur différentes doses pour chaque produit (Colin *et al.*, 1989 ; Boudeggaet *et al.*, 2010). Nous avons utilisé différentes doses pour tester l'efficacité de l'huile essentielle de thym. En effet, plusieurs chercheurs (Boutarfaia et Benyahia, 2015 ; Belhamel *et al.*, 2021) rapportent que les champignons ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle dans leur milieu de culture où le diamètre de la colonie se réduit à chaque fois qu'on augmente la dose jusqu'à une inhibition totale où aucune croissance n'est observée. Certains chercheurs (Lee, 2007) ont signalé que le concept de dose est important en médecine clinique. Lors du traitement pharmacologique de nombreuses conditions, les médecins commencent en général par prescrire une dose qu'ils estiment être la dose efficace minimale. Si le patient ne réagit pas, cette dose initiale pourra être amenée par titrations progressive jusqu'à la dose maximale au-delà de laquelle les effets secondaires du médicament deviennent inacceptables pour le traitement.

Des résultats similaires que nous avons trouvés sont obtenus par plusieurs auteurs (**Belhamel et al., 2021 ; Nadjet et Naima, 2019 ; Boutarfaia et Benyahia, 2015**). Ces auteurs ont trouvé que les diamètres de la croissance mycélienne ont diminué en parallèle avec l'augmentation de la dose des huiles essentielles, ceci peut être dû à la présence de plus de composés actifs avec l'accroissement de la concentration en huile essentielle.

### 5.3.7. Effet de l'odeur et de la vapeur sur *Ascosphaera Apis*

En comparant les témoins de différents tests réalisés au laboratoire, nous observons que le développement d'*Ascosphaera Apis* n'était pas similaire avec l'existence de différents traitements (figure 33). Pour chaque test, nous avons installé des témoins afin de comparer les résultats de l'efficacité des produits utilisés (HE, hydrolat). Pour les témoins de champignon *Ascosphaera Apis* qui sont mis dans la même étuve que *A.apis* traité par l'huile essentielle, le développement était faible par rapport à celui des témoins qui sont mis en présence de l'hydrolat. Cependant, les témoins qui sont mis seuls, sans y avoir aucun traitement dans l'étuve, le développement de champignon était maximale (100%).

De ce fait, nous pouvons suggérer que l'odeur de certains traitements a un effet considérable sur le développement d'*Ascosphaera apis*. Nos résultats ont été confirmés par **Krutmuang et al., (2022)**. Ces auteurs ont trouvé que la vapeur de plusieurs extraits végétaux a un effet inhibiteur sur *A.apis*, et ce avec des pourcentages d'inhibitions différents.



**Figure 34:** développement des témoins d'*Ascosphaera Apis* en présence des traitements dans la même étuve. A: présence d'HE, B: présence d'hydrolat, C: aucun traitement (**originale**)

### 5.3.8. Origine géographique de thym \_efficacité

D'après ce que nous avons trouvé dans cette étude l'huile essentielle de thym exerce une efficacité (ddl=3 ; Chi2= 11 ; P=0,0117) contre le champignon pathogène affectant l'abeille domestique (*Ascosphaera Apis*). **Villar-Rodríguez et al., 2022** ont signalé que les huiles essentielles ont une thérapie alternative possible avec des preuves empiriques de bons résultats, et les effets antifongiques des HE peuvent être une solution très prometteuse pour surmonter les insuffisances thérapeutiques des médicaments antimycotiques qui augmentent avec l'apparition de souches résistantes. Cependant, l'efficacité de l'huile essentielle de thym se diffère en fonction de l'origine géographique et en fonction de la variété de thym utilisée. Cette différence dans l'efficacité est justifiée par la différence dans la composition de thym utilisé. D'après (**El mehdi et al., 2021**), l'effet antifongique de ces composés volatiles est dû à sa richesse en composés terpéniques, alcooliques et phénoliques avec des concentrations relativement différentes.

L'huile de thym clone 133 montre une bonne stabilité des propriétés antifongiques, mais ce en fonction de l'année de récolte.

Plusieurs recherches ont révélé que le thym possède un effet contre les champignons. En 2012 De Lira Mota et ses collaborateurs, (2012), ont montré que l'huile essentielle de *T. vulgaris* est considérée comme un antifongique efficace et pourrait être utilisé pour le traitement de la mucormycose en raison de son interférence avec l'ergostérol provoquant une perturbation de la membrane des champignons et la perte de contenu intracellulaire. Aussi, il inhibe la germination des sporangiospores et le développement de mycélium. L'huile essentielle de thym, riche en thymol et autres substances antifongiques, utilisées pour désinfecter les murs moisissés dans les habitations à faible concentration (**Šegvić Klarić et al., 2007**).

**Leal et al., 2017** ont révélé que l'effet des plantes de *Thymus* sur les micro-organismes fongiques par exemple l'espèce *Thymus vulgaris* inhibe le développement des différentes maladies fongiques notamment (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium chrysogenum*), une autre espèce de *Thymus eriocalyx* *Thymus x-porlock* a un effet sur *Aspergillus niger*, et il y a une autre espèce *Thymus schimperii* qui affecte sur plusieurs souches des champignons notamment en (*Penicillium chrysogenum*, *Verticillium* sp., *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus minutus*, *Beauveria bassiana*, *Microsporium gypseum*).

Aussi Plusieurs scientifiques attribuent l'activité antimicrobienne d'espèces du genre *Thymus* à la forte concentration de carvacrol dans son huile essentielle. Il a des propriétés biocides qui entraînent des perturbations de la membrane bactérienne. De plus, il peut traverser les membranes cellulaires, atteindre l'intérieur de la cellule et interagir avec les sites intracellulaires vitaux pour les activités antibactériennes (Hussein *et al.*, 2018). Par exemple *Thymus vulgaris* Une forte activité antibactérienne est enregistré contre 120 souches de *Staphylococcus*, *Enterococcus*, Genres *Escherichia* et *Pseudomonas* (Sienkiewicz *et al.*, 2011),

Un autre espèce *Thymus leucotrichius* et l'huile essentielle préparée à partir de *Thymus syriacus* déclaré par (Al-Mariri et Safi, 2014 ; Ulukanli *et al.*, 2011) que L'activité antibactérienne des extraits de méthanol et d'acétone est enregistrée contre certaines souches d'*E. Coli vérocytotoxinogène*,

D'autre auteur (Usai *et al.*, 2010) ont prouvé que L'huile essentielle *Thymus capitatus* présente une activité plus élevée que les extraits contre *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*,

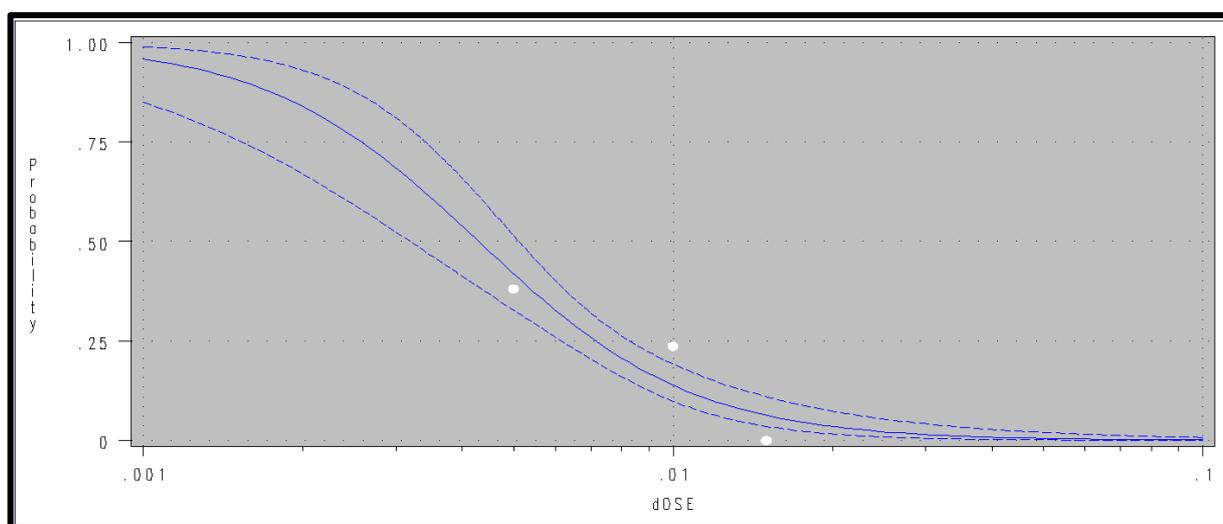
Certaine étude ont trouvé que *Thymus maroccanus* a un effet antibactérien est significativement supérieur à l'activité antimicrobienne de la tétracycline, utilisée comme contrôle positif contre les espèces *B. subtilis*, *S. aureus* et *Salmonella* (Belaqziz *et al.*, 2013).

### 5.3.9. Détermination des doses létales

En conversant les données en données logarithmiques nous avons pu estimer les valeurs plus exactes des doses inhibitrices de la croissance mycélienne, et ce par l'utilisation de la procédure PROBIT LOG 10 dans SAS9, Nous avons obtenus des estimations des doses inhibitrices de l'huile essentielle et qui sont mentionnées dans le tableau (15), en considérant l'erreur à partir de 5%. La dose inhibitrice totale (DL100) était estimée à 0,036 %, avec un intervalle de confiance qui donne des valeurs oscillaient entre 0,08 et 0,023. Aussi, La DL50 était estimée à 0,004 % avec des valeurs varient entre 0,003 et 0,005. Et il à signaler que l'intervalle de confiance est acceptable (Figure 34) mais d'autres études, sur d'autres doses intermédiaires, sont envisagées pour pouvoir estimer les doses d'inhibition exactes.

**Tableau 15:**Détermination des doses inhibitrices de l’huile essentielle de thym contre l’ascosphérose.

Probabilité	dOSE	95% Fiducial Limits	
0.01	0.03592	0.02364	0.08057
0.02	0.02595	0.01843	0.04990
0.03	0.02141	0.01588	0.03763
0.04	0.01865	0.01427	0.03076
0.05	0.01674	0.01311	0.02629
0.06	0.01531	0.01221	0.02310
0.07	0.01419	0.01149	0.02070
0.08	0.01327	0.01089	0.01881
0.09	0.01251	0.01037	0.01728
0.10	0.01185	0.00992	0.01601
0.15	0.00957	0.00825	0.01192
0.20	0.00814	0.00708	0.00968
0.25	0.00713	0.00615	0.00827
0.30	0.00635	0.00537	0.00730
0.35	0.00571	0.00471	0.00658
0.40	0.00517	0.00413	0.00601
0.45	0.00471	0.00363	0.00553
0.50	0.00429	0.00319	0.00511
0.55	0.00391	0.00280	0.00474
0.60	0.00356	0.00244	0.00439
0.65	0.00322	0.00212	0.00406
0.70	0.00290	0.00182	0.00373
0.75	0.00258	0.00153	0.00341
0.80	0.00226	0.00126	0.00307
0.85	0.00192	0.0009967	0.00271
0.90	0.00155	0.0007274	0.00230
0.91	0.00147	0.0006718	0.00221
0.92	0.00139	0.0006154	0.00211
0.93	0.00130	0.0005576	0.00201
0.94	0.00120	0.0004982	0.00189
0.95	0.00110	0.0004367	0.00177
0.96	0.0009864	0.0003722	0.00163
0.97	0.0008594	0.0003035	0.00147
0.98	0.0007091	0.0002283	0.00127
0.99	0.0005122	0.0001410	0.0009902

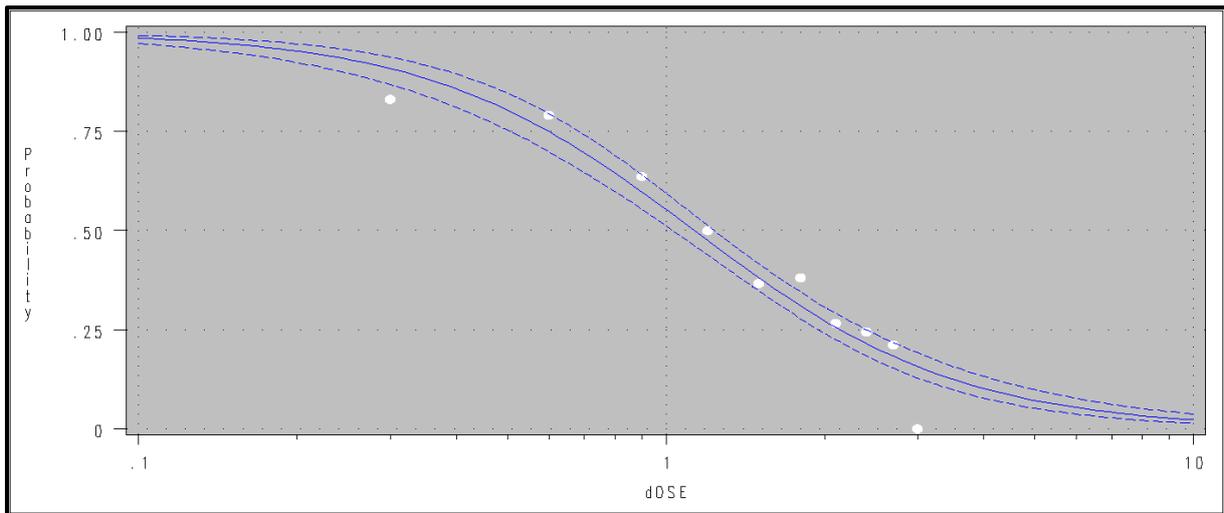


**Figure 35 :** Les doses d’inhibition mycélienne de l’huile essentielle de thym.

Pour les doses d'inhibition de la croissance mycélienne de l'hydrolat, nous avons obtenus des résultats qui sont illustrés dans le tableau(15). En utilisant la même procédure, PROC PROBIT LOG10.La dose inhibitrice totale (DL100) était estimée à 16,21 ml, avec un intervalle de confiance qui donne des valeurs oscillaient entre 11,80 et 24,70. Aussi, La DL50 était estimée à 1,13 ml avec des valeurs varient entre 1,03 et 1,23. Et il à signaler que l'intervalle de confiance est acceptable (Figure 35).

**Tableau 16:** Détermination des doses inhibitrices de l'hydrolat de l'huile essentielle de thym contre l'ascosphérose.

Probabilité	DOSE	95% Fiducial Limits	
0.01	16.20803	11.79592	24.70250
0.02	10.78468	8.24641	15.37684
0.03	8.47672	6.67122	11.62353
0.04	7.13266	5.72922	9.51302
0.05	6.22993	5.08385	8.13195
0.06	5.57129	4.60537	7.14518
0.07	5.06392	4.23173	6.39831
0.08	4.65775	3.92903	5.80948
0.09	4.32312	3.67698	5.33092
0.10	4.04122	3.46257	4.93271
0.15	3.09125	2.72312	3.62854
0.20	2.52647	2.26709	2.88654
0.25	2.13867	1.94345	2.39589
0.30	1.84894	1.69364	2.04220
0.35	1.61995	1.48960	1.77246
0.40	1.43145	1.31617	1.55813
0.45	1.27133	1.16462	1.38202
0.50	1.13182	1.02963	1.23286
0.55	1.00762	0.90771	1.10293
0.60	0.89491	0.79631	0.98672
0.65	0.79077	0.69337	0.88020
0.70	0.69283	0.59710	0.78023
0.75	0.59897	0.50584	0.68414
0.80	0.50704	0.41787	0.58926
0.85	0.41440	0.33121	0.49237
0.90	0.31699	0.24295	0.38833
0.91	0.29632	0.22469	0.36587
0.92	0.27503	0.20608	0.34256
0.93	0.25297	0.18703	0.31821
0.94	0.22993	0.16740	0.29252
0.95	0.20562	0.14702	0.26511
0.96	0.17960	0.12562	0.23535
0.97	0.15112	0.10276	0.20221
0.98	0.11878	0.07764	0.16366
0.99	0.07904	0.04831	0.11448



**Figure 36:** Les doses d'inhibition mycélienne de l'hydrolat de l'huile essentielle de thym.

### 5.3.10 Origine traitement \_ taux inhibition

Les résultats obtenus, en utilisant un modèle linéaire généralisé pour comparer entre les taux d'inhibition chez les témoins, l'huile essentielle et son hydrolat, nous constatons que l'huile essentielle de thym donne des meilleurs résultats que son hydrolat ( $ddl=2$  ; Valeur de  $F= 314,85$  ;  $P<0,0001$ ) pour l'inhibition de la croissance mycélienne d'*Ascosphaera Apis*. Pour chacun de ces deux produits utilisés, nous avons observé que lorsque les concentrations augmentent l'inhibition de la croissance mycélienne diminue. Aussi, d'un produit à un autre, il peut y avoir le même taux d'inhibition mais en utilisant des concentrations différentes, et parfois très éloignées. Ce qui a été trouvé en comparant l'efficacité des différentes concentrations de l'huile essentielle ainsi que son hydrolat. Le groupement des groupes homogènes révèle que certaines doses très concentrées de l'hydrolat possèdent les mêmes efficacités que celles possédées par des faibles concentrations d'huile essentielle (Tableau 17). Nous citons à titre d'exemple, le groupe F, qui contient deux doses, celle de l'huile essentielle avec une concentration de 0,005 % et l'autre de l'hydrolat avec une concentration de 1,8 %. Ainsi, le taux d'inhibition maximal a été enregistré dans un groupe L, qui regroupe deux doses qui sont 0,015 % et 3% pour l'huile essentielle et l'hydrolat, respectivement.

**Tableau 17 :** Groupement des concentrations homogènes d'huile essentielle avec son hydrolat.

Groupement de Duncan Waller	Taux d'inhibition (%)	Produit avec concentration
A	100	Témoin 0 %
B	83,1	Hydrolat 0,3
C	79 ,1	Hydrolat 0,6
D	63,7	Hydrolat 0,9
E	50	Hydrolat 1,2
F	38,1	HE 0,005
F	38,1	Hydrolat 1,8
G	36,7	Hydrolat 1,5
H	26,6	Hydrolat 2,1
I	24,5	Hydrolat 2,4
J	23,7	HE 0,01
K	21,2	Hydrolat 2,7
L	0	HE 0,015
L	0	Hydrolat 3

Nos résultats sont en accord avec ceux signalés par **Zienab et Hassanein, (2022)**. Ces auteurs ont utilisé l'acide formique avec une concentration de 65 %, ce qui a donné presque les mêmes résultats que l'huile essentielle mixtée avec une concentration de 5%. Mais certains produits ont des résidus dans la cire à l'intérieur de la colonie qui a provoqué des mortalités pour les abeilles (**Medina et al., 2012**).

**Colin et al., 1989** a déclaré que les essais d'un traitement in vitro montrent que plusieurs huiles essentielles sont très actives et mériteraient d'être essayées sur le terrain, en particulier le clone 133 du thym largement distribué dans la Drôme.

Un certain nombre d'huiles possèdent une CMF voisine de 0,05% (organ de la Drôme, sarriettes, thym 133, 077, 756,557). Elles sont toutes généralement riches en carvacrol (taux > 30%), bien que ce composant ne soit probablement pas responsable seul des propriétés antimycosiques.

Certains chercheurs (**Habouche, 2018**) ont prouvé que l'efficacité de l'éthanol contre *ascosphaera apis* était beaucoup moins importante que celle des extraits végétaux. Egalement **Elisabeth(2020)** a confirmé que l'efficacité de propolis est considérable contre les agents pathogènes. **D'autres chercheurs(Chaimanee *et al.*, 2017)** ont démontré qu'il existe de nombreux extraits de plantes efficaces contre les champignons. A partir d'une expérience au laboratoire, trente-deux extraits de plantes, notamment romarin, citronnelle, feuille de laurier, origan, basilic thaï, palmarosa .... etc, ont été sélectionnés pour étudier leurs activités antifongique. Certains de ces produits avaient une inhibition importante de la croissance mycélienne d'*A. Apis*, mais certains d'autres extraits des plantes (cajéput, poivre noir, phléi) n'ont présenté aucun résultat positif (**Krutmuang *et al.*, 2022**).

D'autres chercheurs ont testé plusieurs produits pour lutter contre *A. Apis*, notamment des extraits végétaux (**Krutmuang *et al.*, 2022 ; El Mehdi *et al.*, 2021**) et HE (**VillarRodríguez *et al.*, 2022**) ; propolis (**Moussaoui et Lahouel, 2019**) ; éthanol (**Bouharb, 2014 ; Ouattara *et al.*, 2018**) ; hydrolat (**Kader, 2022**) ; d'HE, huile commercialisée (**Tahar et Zeradna, 2022**)...ect.

Des chercheurs ont montré qu'il ya d'autres produits naturels qui sont efficaces contre les infections mycosique, parmi ces auteurs, nous citons (**Colin *et al.*, 2007 ; Albo *et al.*, 2003 ; Colin *et al.*, 1989**). Ils sont trouvés que des huiles essentielles de labiées (*thym type carvacol, origan*) présentent des pouvoirs fongicides sur *Ascosphaera Apis*, déterminés in vitro.

# **Conclusion et perspective**

## Conclusion et perspective

---

La première partie de cette étude porte sur l'état de lieu de cheptel apicole dans la région de Tissemsilt. L'effondrement des colonies d'abeilles est d'origines multifactorielles, et les obstacles du développement de l'apiculture sont multiples. Ce travail a permis d'apporter une contribution à l'étude de l'état de la filière apicole de la région Tissemsilt à partir des données collectées en allant à la DAS de Tissemsilt. Ces données sont en relation avec le nombre d'apiculteurs, nombre des ruchers, la production de miel, la prévalence des maladies prospectées et les ennemis naturels. Et ce à partir de l'année 2010 jusqu'à 2022. Les résultats de cette première partie présentent les principaux obstacles du développement de l'apiculture dans la wilaya de Tissemsilt. Nous citons certaines contraintes signalées par la DSA, particulièrement celles causées par les pathologies apicoles, à savoir : la nosérose et Fausse teigne et surtout la varroase qui est la plus fréquente, Cependant il existe une maladie fongique qui provoque un déclin remarquable aux colonies d'abeille, *Ascosphaera apis*, mais qui n'est pas déclarée ni prospectée par les services concernés.

Ensuite, nous visons à remplacer les traitements par des produits chimiques et des antibiotiques par d'autres substances étant naturelles. Et ce pour limiter la contamination des produits de la ruche par les résidus indésirables des traitements. Pour ce faire, nous avons fait appel à l'utilisation de l'huile essentielle de thym ainsi que son hydrolat contre un champignon entomopathogène *Ascosphaera apis* affectant l'abeille domestique *Apis mellifera* intermissa. Au cours de notre expérimentation, nous avons déterminé les doses létales de l'huile essentielle de thym et de son hydrolat contre l'ascosphérose qui affecte cette abeille.

Les résultats de l'isolement des colonies d'*Ascosphaera apis* révèlent que à l'examen macroscopique, le mycélium est apparu blanc et dense. Ainsi qu'à l'examen microscopique, nous avons trouvé que les hyphes sont cloisonnés, les fructifications sont des sporanges sphériques

Concernant le rendement de thym en huile essentielle, nos résultats ont montré que le thym possède un très bon rendement, soit  $2,37 \pm 0,22$  ml pour hydrodistillation de type Clevenger et  $1,23 \pm 0,27$  ml pour hydrodistillation simple.

Les résultats obtenus, en utilisant un modèle linéaire généralisé pour comparer entre les taux d'inhibition chez les témoins, l'huile essentielle et son hydrolat, nous constatons que l'huile essentielle de thym donne des meilleurs résultats que son hydrolat ( $ddl=2$  ; Valeur de  $F= 314,85$  ;  $P < 0,0001$ ) pour l'inhibition de la croissance mycélienne d'*Ascosphaera apis*. Pour chacun de ces deux produits utilisés, nous avons observé que lorsque les concentrations

## Conclusion et perspective

---

augmentent le taux d'inhibition de la croissance mycélienne. Aussi, d'un produit à un autre, il peut y avoir le même taux d'inhibition mais en utilisant des concentrations différentes, et parfois très éloignées. Ce qui a été trouvé en comparant l'efficacité des différentes concentrations de l'huile essentielle ainsi que son hydrolat. Ainsi, le taux d'inhibition maximal a été enregistré dans les deux doses qui sont 0,015 % et 3% pour l'huile essentielle et l'hydrolat, respectivement. De plus, Nous avons également conclu que l'odeur de l'huile essentielle de thym a un effet significatif sur le développement d'*Ascosphaera apis*. Nous concluons que l'huile essentielle de thym, son hydrolat et son odeur ont exercé une activité inhibitrice remarquable contre ce champignon pathogène responsable de la maladie du couvain pétrifié chez les abeilles.

Ces résultats sont encourageants et nécessitent d'autres perspectives d'exploration. En effet, la lutte contre l'ascosphérose à base d'huiles essentielles est un domaine très vaste. Des recherches supplémentaires doivent être menées afin de mettre en place une nouvelle stratégie de lutte qui permettrait peut-être d'éradiquer cette maladie et d'obtenir ainsi des abeilles fortes et des produits de la ruche sains.

Des études qui sont basées sur la détermination des principes actifs des substances naturelles, notamment de thym, sont primordiales pour la préparation et la fabrication des produits finis aptes pour la commercialisation.

Sur terrain, *in vivo*, il est souhaitable de faire des essais sur les colonies abeilles touchées par l'ascosphérose pour qu'on puisse avoir des informations complémentaires sur l'efficacité de traitement naturel, ces effets sur l'activité de l'abeille et sur ces résidus dans les produits de la ruche.

# Références bibliographiques

## Référence bibliographique

---

### Les références bibliographiques

**Abu-Darwish, M.S., Al-Ramamneh, E.A., Kyslychenko, V.S., Karpiuk, U.V., 2012.** The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ashshoubak region—South of Jordan. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25 (1), 239–246.

**Adaszyńska-Skwirzyńska, M., & Szczerbińska, D. (2017).** Use of essential oils in broiler chicken production—a review. *Annals of Animal Science*, 17(2), 317.

**Afnor, N. (1992).** Recueil des Normes Françaises: Huiles Essentielles. *AFNOR: Paris*.

**Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., & Klein, A. M. (2009).** How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of botany*, 103(9), 1579-1588.

**Albo, G. N., Henning, C., Ringuelet, J., Reynaldi, F. J., De Giusti, M. R., & Alippi, A. M. (2003).** Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie*, 34(5), 417-427.

**Al-Mariri, A., & Safi, M. (2014).** In vitro antibacterial activity of several plant extracts and oils against some gram-negative bacteria. *Iranian journal of medical sciences*, 39(1), 36.

**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., Giaccon, H., & Gibson, N. (1997).** Detection and thermal destruction of the chalkbrood fungus (*Ascospaera apis*) in honey. *Journal of apicultural research*, 36(3-4), 163-168.

**Anderson, D. L., Gibbs, A. J., & Gibson, N. L. (1998).** Identification and phylogeny of spore-cyst fungi (*Ascospaera* spp.) using ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 102(5), 541-547.

**ANDERSON D.L., 1988** - Pathologist report. *New Zealand Beekeeper*, 199: 12 – 15.

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

## Référence bibliographique

---

**Ayyathurai, K.T.**, 2012. A synergistic herbal extract composition for use in treating and preventing mastitis.

**Babaei, M., Abarghoei, M.E., Ansari, R., Vafaei, A.A., Taherian, A.A., Akhavan, M.M.**, 2008. Antispasmodic effect of hydroalcoholic extract of *Thymus vulgaris* on the guinea-pig ileum. *Nat. Prod. Res.* 22 (13),1143–1150.

**Bailey, L. (1963).**Infectious diseases of the honey-bee.

**BAILEY L., BALL B.V. and PERRY J.N., 1981-** The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Ann. Appl. Biol.*, 97: 109 – 118.

**Bailey, L., 1967.** The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus,

*Ascosphaera apis*, for larvae of the honey bee. *Apis mellifera*. In: Van der Laan, P.A.

(Ed.), *Insect Pathology and Microbial Control*. North Holland Publishing Co.,

Amsterdam, The Netherlands, pp. 162–167.

**Bailey, L., Ball, B.V., 1991.** Honey Bee Pathology. Academic Press, London, UK.pp. 53–62.

**Baker, G. M., & Torchio, P. F. (1968).** New records of *Ascosphaera apis* from North America. *Mycologia*, 60(1), 189.

**Bekhechi, C., Bekkara, F. A., Abdelouahid, D. E., Tomi, F., & Casanova, J. (2007).**Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii* Boiss.et Reut. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6), 594-596.

**Berbee, M. L., & Taylor, J. W. (1992).**Two ascomycete classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA sequence. *Molecular Biology and Evolution*, 9(2), 278-284.

**Begrow, F., Engelbertz, J., Feistel, B., Lehnfeld, R., Bauer, K., Verspohl, E.J.**, 2010. Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. *Planta Med.* 76 (4), 311–318.

**Belyagoubi, N., & Benhammou, N. (2011).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. *Doctorat Thesis*.

## Référence bibliographique

---

**Belaqziz, R., Bahri, F., Romane, A., Antoniotti, S., Fernandez, X., & Duñach, E. (2013).**Essential oil composition and antibacterial activity of the different parts of *Thymus maroccanus* Ball: an endemic species in Morocco. *Natural product research*, 27(18), 1700-1704.

**Bhaskara Reddy, M.V., Angers, P., Gosselin, A., Arul, J., 1998.** Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry* 47 (8), 1515–1520.

**Boskabady, M.H., Aslani, M.R., Kiani, S., 2006.** Relaxant effect of *Thymus vulgaris* on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *Phytother. Res.* 20 (1), 28–33.

**Bukvicki, D., Giweli, A., Stojkovic, D., Vujisic, L., Tesevic, V., Nikolic, M., ...& Marin, P. D.(2018).** Cheese supplemented with *Thymus algeriensis* oil, a potential natural food preservative. *Journal of dairy science*, 101(5), 3859-3865.

**Boughrara, B.(2016).** *Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêts thérapeutique et nutritif du Parc national El-kala* (Doctoral dissertation, thèse de doctorat en science, Université Badji Mokhtar ANNABA, ANNABA).

**Bouharb, H., El Badaoui, K., Zair, T., Chakir, S., & Alaoui, T. (2014).** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences*, 78, 6685-6693.

**Boulaghmen, F., Chaouia, C., Hazzit, M., Nouas, M., & Saidi, F. (2018).** Chemical composition and microbial activity of essential oil extract from *Thymus guyonii* de Noé from Aflou Algeria. *AgroBiologia*, 8(1), 853-862.

**Boudegga, H., Boughalleb, N., Barbouche, N., Ben Hamouda, M. H., & Mahjoub, M. E. (2010).** In vitro inhibitory actions of some essential oils on *Ascosphaera apis*, a fungus responsible for honey bee chalkbrood. *Journal of apicultural research*, 49(3), 236-242.

**Boussen, H., Mellek-Maalej, E., Asr, N.Z., Ben Mechlia, N., 2005.** Efficience d'utilisation de l'eau et de l'azote chez le blé dur : Etude comparative de deux variétés à haut potentiel de production. In: International conference on: water, land and food security in arid and semi-arid regions, 1–11p.

## Référence bibliographique

---

**Bradbear, N. (1988).**World distribution of major honeybee diseases and pests.*Bee world*, 69(1), 15-39.

**Bruneton, J. (1999).** Huiles essentielles. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Doc et Tec*.

**Breeze, T. D., Bailey, A. P., Balcombe, K. G., & Potts, S. G. (2011).**Pollination services in the UK: How important are honeybees?. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 142(3-4), 137-143.

**Brodschneider, R., & Crailsheim, K. (2010).**Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294.

**Chaimanee, V., Thongtue, U., Sornmai, N., Songsri, S., & Pettis, J. S. (2017).**Antimicrobial activity of plant extracts against the

**CHAHBAR, N., & HAMADI, K.2020** Les abeilles domestiques locales et l'environnement. Un modèle parfait pour la sensibilisation environnementale.

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

**Cayrol, C., Dubois, D., & Touazi, F. (2018).** Symbolic possibilistic logic: completeness and inference methods. *Journal of Logic and Computation*, 28(1), 219-244.

**Chen, D., Guo, R., Xu, X., Xiong, C., Liang, Q., Zheng, Y., ...& Liu, M. (2017).** Uncovering the immune responses of *Apis mellifera ligustica* larval gut to *Ascospaera apis* infection utilizing transcriptome sequencing. *Gene*, 621, 40-50.

**Chenni, M. (2016).** Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic "*Ocimum basilicum L.*" extraite par hydro-distillation et par micro-ondes. *Mémoire de doctorat, université d'Oran, 1*.

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

**Colin, M. E., Marchand, P., & Bonmatin, J. M. (2007).** L'apiculture écologique. *L'Écologiste*, 21, 41-43.

**DSA., 2021.** Données statistiques de la wilaya de Tissemsilt (Services SOPAT et Statistiques).

## Référence bibliographique

---

**De Jong, D. (1976).** Experimental enhancement of chalk brood infections. *Bee World*, 57(3), 114-115.

**Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., & Chelghoum, C. (2006).** Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss.et Reut. *International Journal of Aromatherapy*, 16(2), 95-100.

**Dobre, A., Gagi, V., Petru, N.,** 2011. Antimicrobial activity of essential oils against food-borne bacteria evaluated by two preliminary methods. *Rom. Biotechnol.Lett.* 16, 119–125.

**DPAT., 2019.** La monographie de la Wilaya de Tissemsilt. pp 90

**Dreher, K. (1938).** Auftreten von Bienenkrankheiten in Niedersachsen und Braunschweig im Jahre 1937. *Niedersächsische Imker*, 73(12), 282-284.

**Donadieu, Y (2003).** Qu'est ce que le miel. *Faculté de médecine de Paris.* 10(4):213-219.

**El Mehdi, A. A., El KHETABI, A., BELMALHA, S., & LAHLALI, R. (2021).** Utilisation des extraits de plantes contre les maladies de post-récolte des fruits. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 9(2).

**El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A.,** 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicon* 57 (7–8), 984–991.

**El-Guendouz, S., Aazza, S., Anahi Dandlen, S., Majdoub, N., Lyoussi, B., Raposo, S., ...& Graça Miguel, M. (2019).** Antioxidant activity of thyme waste extract in O/W emulsions. *Antioxidants*, 8(8), 243.

**Ekoh, S., Akubugwo, E., Chibueze Ude, V., Edwin, N.,** 2014. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effect of spices (*Thymus vulgaris*, *Murraya koenigii*, *Ocimum gratissimum* and *Piper guineense*) in alloxan-induced diabetic rats. *Int. J. Biosci.* 4 (2), 179–187.

**Elisabeth, N. (2020).** L'intérêt de la propolis dans la prévention bucco-dentaire: propriétés bactéricides et cariostatiques d'un produit naturel. *Revue systématique de la littérature.*

**Emmanouilidis, A.,** 2001. Use of the extract of *Thymus vulgaris* for the preparation of a medicament for the treatment of ulcerative colitis and Crohn's

## Référence bibliographique

---

**Engelbertz, J., Schwenk, T., Kinzinger, U., Schierstedt, D., Verspohl, E.J., 2008.** Thyme extract, but not thymol, inhibits endothelin-induced contractions of isolated rat trachea. *Planta Med.* 74 (12), 1436–1440.

**Esmaeili, D., Mobarez, A.M., Tohidpour, A., 2012.** Anti-*Helicobacter pylori* activities of shoya powder and essential oils of *Thymus vulgaris* and *Eucalyptus globulus*. *Open Microbiol. J.* 6, 65–69.

**Fernández, N. A., & Coineau, Y. (2002).** *Varroa, tueur d'abeilles*. Atlantica.

**Flores, J. M., Ruiz, J. A., Ruz, J. M., Puerta, F., Bustos, M., Padilla, F., & Campano, F. (1996).** Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie*, 27(4), 185-192.

**Flores, J. M., Spivak, M., & Gutiérrez, I. (2005).** Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. *Veterinary microbiology*, 108(1-2), 141-144.

**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).

**Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.

**Ghasemi Pirbalouti, A., Emami Bistghani, Z., & Malekpoor, F. (2015).** An overview on genus *Thymus*. *Journal of Medicinal Herbs*, 6(2), 93-100.

**Gilliam, M., Taber, S., & Bray, R. (1978).** Chalkbrood disease of honey bees, *Apis mellifera* L.: a progress report [*Ascosphaera apis*]. *Apidologie* (France).

**Gilliam, M., Lorenz, B. J., Wenner, A. M., & Thorp, R. W. (1997).** Occurrence and distribution of *Ascosphaera apis* in North America: chalkbrood in feral honey bee colonies that had been in isolation on Santa Cruz Island, California for over 110 years. *Apidologie*, 28(6), 329-338.

**Gilliam, M., & Taber, S. (1991).** Diseases, pests, and normal microflora of honeybees, *Apis mellifera*, from feral colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(2), 286-289.

## Référence bibliographique

---

**Gilliam, M. (1986).** Infectivity and survival of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, in colonies of honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 17(2), 93-100.

**Gilliam, M., Taber, S., & Bray, R. (1978).** Chalkbrood disease of honey bees, *Apis mellifera* L.: a progress report [*Ascosphaera apis*]. *Apidologie (France)*.

**Gliński, Z., & Buczek, K. (2003).** Response of the Apoidea to fungal infections. *Apiacta*, 38, 183-189.

**Haubruge, E., Nguyen, B. K., Widart, J., Thomé, J. P., Fickers, P., & De Pauw, E. (2006).** Le dépérissement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae): faits et causes probables. *Notes fauniques de Gembloux*, 59(1).

**Habouche, M. (2018).** Étude de l'activité antifongique de quelques extraits végétaux (Doctoral dissertation, Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila).

**Hornitzky, M. (2001).** PMB 8 CAMDEN 2570 Phone: 02 4640 6311 Fax: 02 4640 6400 Email: michael.hornitzky@agric.nsw.gov.au.

**Hemmerlé J., 2015.** Le point sur l'*ascosphérose*. *Santé des abeilles, Abeille de France*, 22 (1025),4p.

**Heath, L. A. F. (1982).** Development of chalk brood in a honeybee colony: a review. *Bee World*, 63(3), 119-130.

**Heath, L. A. F. (1985).** Occurrence and distribution of chalk brood disease of honeybees. *Bee World*, 66(1), 9-15.

**Heath, L. A. F., & Gaze, B. M. (1987).** Carbon dioxide activation of spores of the chalkbrood fungus *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 26(4), 243-246.

**Hitchcock, J. D., & Christensen, M. (1972).** Occurrence of chalk brood (*Ascosphaera apis*) in honey bees in the United States. *Mycologia*, 64(5), 1193-1198.

**Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ...& Zhang, N. (2007).** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.

**Hussein, H. J., Hadi, M. Y., & Hameed, I. H. (2018).** Cytotoxic Activity of *Thymus vulgaris*: Antibacterial and Antifungal Activity. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 9(02), 166-169.

## Référence bibliographique

---

**Hosseinzadeh, S., Kukhdan, A., Hosseini, A., Armand, R.,** 2015. The application of *Thymus vulgaris* in traditional and modern medicine: a review. *Glob. J. Pharmacol.* 9 (3), 260–266.

**Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2006).**Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(17), 6314-6321.

**Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2009).**Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food chemistry*, 116(3), 714-721.

**James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., ...& Vilgalys, R. (2006).**Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113), 818-822.

**Jager, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M.N., Scheffler, A.,** 2009. Pentacyclic triterpene distribution in various plants—rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* 14 (6), 2016–2031.

**Jensen, A. B., Aronstein, K., Flores, J. M., Vojvodic, S., Palacio, M. A., & Spivak, M. (2013).**Standard methods for fungal brood disease research. *Journal of apicultural research*, 52(1), 1-20.

**Kader, M. M. M. A.** Evaluation du pouvoir antifongique des huiles essentielles et l'hydrolat de *Thymus capitatus* et *Laurus nobilis* à l'égard d'une moisissure des olives.

**Kevan, P. G. (1999).** Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. In *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes* (pp. 373-393). Elsevier.

**Kalemba, D., Kunicka, A.,** 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10 (10), 813–829.

**Kalashnikov, A. E., & Udina, I. G. (2014).**Epidemiological state of apiaries during infection of bee colonies with RNA viruses. *Farm animals*, 1, 80-4.

## Référence bibliographique

---

**Kayode, J., Ogunleye, T.,** 2008. Checklist and status of plant species used as spices in kaduna state of Nigeria. *Afr. J. Gen. Agric.* 4 (1), 13–18.

**Kalashnikov, A. E., & Udina, I. G. (2014).** Epidemiological state of apiaries during infection of bee colonies with RNA viruses. *Farm animals*, 1, 80-4.

**KEINSCHMIDT G. and KANDOS J., 1976** - The influence of crude protein levels on colony production. *Australasian Beekeeper*, 2: 36 - 39.

**Khadir, A., Bendahou, M., Benbelaid, F., Abdoune, M. A., & Abdelouahid, D. E.** (2013). Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf., récolté en Algérie. *Phytothérapie*, 11(6), 353-358.

**Kivilompolo, M., Hyotylainen, T.,** 2007. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of *Lamiaceae* herbs: characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J. Chromatogr. A* 1145 (1–2), 155–164.

**KHOLKHAL, F. (2014).** *Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de Thymus ciliatus ssp coloratus et ssp euciliatus* (Doctoral dissertation).

**Kluser, S., & Peduzzi, P. (2007).** Global pollinator decline: a literature review. *Environment Alert Bulletin*, 8.

**Kouch .M. 2014.** Etude phytochimique et biologique d'une espèce végétale endémique algérienne « *Thymus numidicus* Poiret ». Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba.

**Kohiyama, C.Y., Yamamoto Ribeiro, M.M., Mossini, S.A.G., Bando, E., Bomfim, N.d.S., Nerilo, S.B.,** 2015. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chem.* 173, 1006–1010.

**Kolbina, L. M., Nepeivoda, S. N., Maslennikov, I. V., Vorobeva, S. L., Sannikova, N. A., Kozlovskaja, N. V., & Pankov, E. V. (2015).** Most common bee diseases in the Udmurt Republic. *Regulatory issues in veterinary medicine*, 1, 29-32.

**Krivtsov, N. I. (2011).** Apicultural in Russia: State and place in the world. *Achiev. Sci. Technol. AIC*, 9, 15-16.

## Référence bibliographique

---

**Kristiawan, M., Sobolik, V., Allaf, K.,** 2008. Isolation of Indonesian cananga oil using multi-cycle pressure drop process. *J. Chromatogr. A* 1192, 306–318.

**Krutmuang, P., Rajula, J., Pittarate, S., Chatima, C., Thungrabeab, M., Mekchay, S., & Senthil-Nathan, S. (2022).** The inhibitory action of plant extracts on the mycelial growth of *Ascosphaera apis*, the causative agent of chalkbrood disease in Honey bee. *Toxicology Reports*, 9, 713-719.

**Labiad, M. H., Harhar, H., Ghanimi, A., & Tabyaoui, M. (2017).** Phytochemical screening and antioxidant activity of Moroccan *Thymus saturoioides* extracts. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(6), 2132-2139.

**Lang, Q.Y., Wai, C.M.,** 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta* 53, 771–782.

**Lang, G., & Buchbauer, G. (2012).** A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13-39.

**Leal, F., Taghouti, M., Nunes, F., Silva, A., Coelho, A. C., & Matos, M. (2017).** *Thymus* plants: A review—Micropropagation, molecular and antifungal activity. *Active ingredients from aromatic and medicinal plants*, 1(7), 107-126.

**Lee, K.G., Shibamoto, T.,** 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.* 50 (17), 4947–4952.

**Leonelli, C., Maso, T.J.,** 2010. Microwave and ultrasonic processing: now a realistic option for industry. *Chem. Eng. Process.* 49, 885–900.

**Liubimov, A. I., Vorobeva, S. L., Kisliakova, E. M., Berezkina, G. I., & Mushtaleva, E. D. (2020).** Use of environmentally safe preventive remedy against ascospheiosis. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 17, p. 00032). EDP Sciences.

**Li, X., He, T., Wang, X., Shen, M., Yan, X., Fan, S., ...& She, G. (2019).** Traditional uses, chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Thymus*. *Chemistry & biodiversity*, 16(9), e1900254.

**Lira Mota, K.S., de Oliveira Pereira, F., de Oliveira, W.A., Lima, I.O., de Oliveira Lima, E.,** 2012. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent

## Référence bibliographique

---

phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules* 17 (12), 14418–14433.

**Lucchesi, M.E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W., Chemat, F., 2007.** Solvent free microwave extraction of *Eletaria cardamomum* L.: a multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Eng.* 79, 1079–1086.

**Liubimov, A. I., Vorobeva, S. L., Kisliakova, E. M., Berezkina, G. I., & Mushtaleva, E. D. (2020).** Use of environmentally safe preventive remedy against ascospherosis. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 17, p. 00032). EDP Sciences.

**Lumbsch, H. T., & Huhndorf, S. M. (2007).** Outline of ascomycota–2007. *Myconet*, 13, 1–58.

**Mandal, S., Deb Mandal, M., 2016.** Chapter 94—thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, San Dieg

o, pp. 825–834.

**Masango, P., 2005.** Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean. Prod.* 13, 833–839.

**Maassen, A. (1913).** Weitere Mitteilungen über die seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen [Further communication on the epidemic brood disease of bees]. *Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft*, 14, 48–58.

**Maurizio, A. (1934).** Über die Kalkbrut (Pericystis-Mykose) der Bienen. Verlag des Archiv für Bienenkunde.

**Matus, F., & Sarbak, I. (1974).** Occurrence of chalkbrood disease in Hungary. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 29, 250–255.

**Medina-Flores, C. A., Medina Medina, L. A., & Guzmán-Novoa, E. (2022).** Effect of hygienic behavior on resistance to chalkbrood disease (*Ascosphaera apis*) in Africanized bee colonies (*Apis mellifera*). *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 13(1), 225–239.\*

**Meister, A., Bernhardt, G., Christoffel, V., Buschauer, A., 1999.** Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *PlantaMed.* 65 (6), 512–516.

**Mellouk, H., Naji, G., Allaf, K., 2004.** Etude de l'extraction des huiles essentielles de baies de Genievre par Détente Instantanée Contrôlée DIC comparée à l'entraînement à la vapeur.

## Référence bibliographique

---

In: Proceedings de 16es Rencontres Scientifiques et Technologiques des Industries Alimentaires (Agoral), Nantes, France, pp. 265–269.

**Mahdavi, S., & Karimzadeh, G.** (2010). Karyological and nuclear DNA content variation in some Iranian endemic *Thymus* species (Lamiaceae).

**Miladi, H., Slama, R., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., Ammar, E.,** 2013. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Nat. Sci.* 5, 729–739.

**Modey, W.K., Mulholland, D.A., Raynor, M.W.,** 1996. Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochem. Anal* 7, 1–15.

**Moussaoui, S., & Lahouel, M.** (2019). *Effet de la propolis sur les bactéries résistantes aux antibiotiques par inhibition des pompes à efflux* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).

**Nadjet, M., & Naima, M. E. H. A. R. Z. I.** (2019). Potentialités fongicides des huiles essentielles de *Géranium rosat* (Famille des Géraniacée) agent de la moisissure noire contre *Aspergillus niger* (Famille des Trichocomaceae).

**Nabavi, S.M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., Nabavi, S.F.,** 2015. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. *Food Chem.* 173, 339–347.

**Naves, Y.R.,** 1974. *Technologie et Chimie des Parfums Naturels*. Masson, Paris.

**Ninkov, D.,** 1996. Pharmaceutical compositions, based on etheric oils obtained from plants for use in the human and veterinary medical field: Google Patents.

**Naili N, Kesraoui EP.** (2013). Activité antibactérienne du Cumin velu *Ammodaucus leucotrichus*, Mémoire d'études médicales Spécialisées (DEMS) en Botanique médicale et Cryptogamie. 156 p.

**Nieto, G.** (2017). Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. *Medicines*, 4(3), 63.

## Référence bibliographique

---

**Nkouaya Mbanjo, E., Tchoumboungang, M., Jazet Dongmo, P., Sameza, M., Amvam Zollo, P., Menut, C., 2007.** Mosquito larvicidal activity of essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Thymus vulgaris* grown in Cameroon. *Planta Med.* 73 (9), P\_329.

**Nouasri .A., Dob .T., Toumi .M., Dahmane .D., Krimat .S., Lamari .L., & Chelgoume .CH. 2015.** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus lanceolatus* Desf., an endemic Thyme from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, pp (1248-1249).

**Nolkemper, S., Reichling, J., Stintzing, F.C., Carle, R., Schnitzler, P., 2006.** Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Planta Med.* 72 (15), 1378–1382.

**Ocana, A., Reglero, G., 2012.** Effects of Thyme extract oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on cytokine production and gene expression of oxLDL-stimulated THP-1-macrophages. *J. Obes.* 2012, 104706.

**Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., Afolayan, A.J., 2010.** Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chem.* 308–312.

**Otterbach, A., Wenclawiak, B.W., 1999.** Ultrasonic/Soxhlet/supercritical fluid extraction kinetics of pyrethrins from flowers and allethrin from paper strips. *Fresenius J. Anal. Chem.* 365, 472–474.

**Ouattara, L., Ouoba, P., Bonzi, S., & Somda, I.** Évaluation de l'activité antifongique et de la phytotoxicité de *Isoperlinia doka* Craib & staff.

**Pariante, L. (2001).** Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2<sup>ème</sup> Edition.

**Pornpukdeewattana, S., Kerdpiboon, S., Jindaprasert, A., Pandee, P., Teerarak, M., & Krusong, W. (2017).** Upland rice vinegar vapor inhibits spore germination, hyphal growth and aflatoxin formation in *Aspergillus flavus* on maize grains. *Food Control*, 71, 88-93.

**Périno-Issartier, S., Ginies, C., Cravotto, G., Chemat, F., 2013.** A comparison of essential oils obtained from lavender via different extraction processes: ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *J. Chromatogr. A* 1305, 41–47.

## Référence bibliographique

---

- Piggott, M.J., Ghisalberti, E.L., Trengove, R.D.,** 1997. West Australian sandalwood oil: extraction by different techniques and variations of the major components in different sections of the same tree. *Fl. Frag. J.* 12, 43–46.
- Puerta, F., Flores, J. M., Bustos, M., Padilla, F., & Campano, F. (1994).** Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. *Apidologie*, 25(6), 540-546.
- Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S.,** 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A* 1163, 2–24.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J., Komaitis, M.,** 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53 (4), 1190–1195.
- Quezel, P., & Santa, S. (1963).** *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* (No. 581.965 Q8).
- Rabiei, Z., Mokhtari, S., Asgharzade, S., Gholami, M., Rahnama, S., Rafeian-kopaei, M.,** 2015. Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extract on memory impairment induced by scopolamine in rat. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5 (10), 845–851.
- Reid, M. (1988).** Diseases of honey bees in New Zealand. *Surveillance*, 15(5), 15-17.
- Reddy, P., Kandisa, R., Varsha, P., Satyam, S.,** 2014. Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med. Aromat. Plants* 3, 164.
- Reynaldi, F. J., López, A. C., Albo, G. N., & Alippi, A. M. (2003).** Genome finger-Genome fingerprinting. *J Apicul Res*, 42(4), 68-76.
- Reynaldi, F. J., Lucia, M., & Garcia, M. L. G. (2015).** *Ascospaera apis*, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees (*Xylocopa augusti*): First report in South America. *Revista iberoamericana de micologia*, 32(4), 261-264.
- Rezatofighi, S.E., Seydabadi, A., Seyyed Nejad, S.M.,** 2014. Evaluating the efficacy of *Achillea millefolium* and *Thymus vulgaris* extracts against Newcastle Disease Virus *in vivo*. *Jundishapur J. Microbiol.* 7 (2), e9016.

## Référence bibliographique

---

**Rezzoug, S.A., Boutekedjiret, C., Allaf, K.,** 2005. Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. *J. Food Eng.* 71, 9–17.

**Reid, M. (1993).** Chalkbrood disease: the NZ experience. *Aust. Beekeeper*, 497-508.

**Riera, E., Golas, Y., Blanco, A., Gallego, J.A., Blasco, M., Mulet, A.,** 2004. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrason.Sonochem.* 11, 241–244.

**Richard, F. (1992).** Manuel des corps gras. *Paris, Ed: Lavoisier, Tec. &Doc*, 1228-1242.

**Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C.M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S.,** 2010. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int. J. Food Microbiol.* 139 (1–2), 70–78.

**Roberts, J., & Armstrong, J. (2021).** Investigating factors that influence chalkbrood outbreaks in Australia.

**Rose, J. B., Christensen, M., & Wilson, W. T. (1984).** *Ascospaera* species inciting chalkbrood in North America and a taxonomic key [Fungus disease of honeybees, *Apis mellifera* and other bees, description of taxa]. *Mycotaxon (USA)*.

**Sahraoui, N., Vian, M.A., Bornard, I., Boutekedjiret, C., Chemat, F.,** 2008. Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils. Comparison with conventional steam distillation. *J. Chromatogr. A* 1210, 229–233.

**Segvic Klaric, M., Kosalec, I., Mastelic, J., Pieckova, E., Pepeljnak, S.,** 2007. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Lett. Appl. Microbiol.* 44 (1), 36–42.

**Seal, D. W. A. (1957).** Chalkbrood disease of bees. *New Zealand Journal of Agriculture*, 95(6), 562.

**Selmi, S., Sadok, S.,** 2008. The effect of natural antioxidant (*Thymus vulgaris* Linnaeus) on flesh quality of tuna *Thunnus thynnus* (Linnaeus) during chilled storage. *Pan-Am. J. Aquat. Sci.* 3 (1), 36–45.

## Référence bibliographique

---

**Sfeir, J., Lefrancois, C., Baudoux, D., Derbre, S., Licznar, P.,** 2013. *In vitro* antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 269161.

**Shah, S., Sharma, A., Gupta, N.,** 2005. Extraction of oil from *Jatropha curcas* (L) seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction. *Bioresour. Technol.* 96, 21–123.

**Sharma, A., Gupta, N.,** 2006. Ultrasonic pre-irradiation effect upon aqueous enzymatic oil extraction from almond and apricot seeds. *Ultrason. Sonochem.* 13, 529–534.

**Shahidi, F., & Naczk, M.** (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press.

**Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Cieciewicz, J., Denys, P., Kowalczyk, E.,** 2011. Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Med. Chem.* 7 (6), 674–689.

**Sidali, L., Brada, M., Fauconnier, M. L., Lognay, G., & Heuskin, S.** (2017). Chemical composition, acute toxicity, antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Thymus fontanesii* essential oil from Algeria. *PhytoChem and BioSub Journal*, 11(1).

**Skou, J. P. (1972).** *Ascospaerales*. *Friesia* 10: 1-24.. 1975. Two new species of *Ascospaera* and notes on the conidial state of *Bettsia alvei*. *Friesia* 11: 62-74.. 1982. *Ascospaera asterophora* species nova. *Mycotaxon*, 14, 149-159.

**Skou, J. P. (1988).** More details in support of the class *Ascospaeromycetes*. *Mycotaxon*, 31(1), 191-198.

**Soliman, K.M., Badeaa, R.I.,** 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40 (11), 1669–1675.

**Sobeh, M., Rezq, S., Cheurfa, M., Abdelfattah, M. A., Rashied, R. M., El-Shazly, A. M., ...&Mahmoud, M. F.** (2020). *Thymus algeriensis* and *Thymus fontanesii*: chemical composition, *in vivo* antiinflammatory, pain killing and antipyretic activities: a comprehensive comparison. *Biomolecules*, 10(4), 599.

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

## Référence bibliographique

---

**Spiltoir, C. F. (1955).** Life cycle of *Ascospaera apis* (*Pericystis apis*). *American Journal of Botany*, 501-508.

**Stace, P. (1994).** Chalkbrood—learning to live with it. *The Australasian Beekeeper*, 95, 319-322.

**Stahl-Biskup, E., Saez, F. (Eds.), 2002.** Thyme—The Genus *Thymus*. Taylor & Francis, London.

**Stahl-Biskup, E., Venskutonis, R.P., 2012.** 27—Thyme. In: Peter, K.V. (Ed.), *Handbook of Herbs and Spices*. second ed. Woodhead Publishing, Abington, Cambridge, UK, pp. 499–525.

**Starý, J. 2013.** *The solvent extraction of metal chelates*. Elsevier.

**SWART D.J., 2003** - The occurrence of *Nosema apis* (Zander), *Acarapis woodi* (Rennie) and the cape problem bee in the summer rainfall region of South Africa. Master Sci. Euden Gradum, Rhodes Univ., 50 p.

**TAHAR ARIBI, I., & ZERADNA, N. E. (2022).** Test de l'Activité antifongique d'huile essentielle commercialisée.

**Taherian, A.A., Babaei, M., Vafaei, A.A., Jarrahi, M., Jadidi, M., Sadeghi, H., 2009.** Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Thymus vulgaris*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22 (1), 83–89.

**Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., Nazemi, J., 2010.** Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine* 17 (2), 142–145.

**Tutkun, E., Maden, S., Inci, A., & Yilmaz, B. (1993).** General situation of chalkbrood disease in honeybees in Turkey. *Turk. entomol. derg.*, 17(2), 65-68.

**Ulukanli, Z., Cigremis, Y., & Ilcim, A. (2011).** In vitro antimicrobial and antioxidant activity of acetone and methanol extracts from *Thymus leucotrichus* (Lamiaceae). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15(6), 649-657.

**Usai, M., Foddai, M., Sechi, B., Juliano, C., & Marchetti, M. (2010).** Comparison of antibacterial activity of natural and hydroformylated essential oil of *Thymus capitatus*

## Référence bibliographique

---

growing wild in north Sardinia with commercial *Thymus* essential oils. *Natural Product Communications*, 5(12), 1934578X1000501233.

**Van den Broucke, C., Lemli, J.,** 1983. Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*. *Pharm. Weekbl.* 5, 9–14.

**Verbeke, N.** 2006. L'aromathérapie comme alternative crédible à l'antibiothérapie. *Préparatrice en pharmacie*, 20.

**Vigo, E., Cepeda, A., Gualillo, O., Perez-Fernandez, R.,** 2004. In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2), 257–263.

**Vila, R.,** 2002. Flavonoids and further polyphenols in the genus *Thymus*. In: Stahl-Biskup, E., Saez, F. (Eds.), *Thyme—The Genus Thymus*. Taylor & Francis, London, pp. 144–176.

**Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D.,** 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—a review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 161–169.

**VillarRodríguez, J., Pérez-Pico, A. M., Mingorance-Álvarez, E., & Mayordomo Acevedo, R. (2022).** Meta-analysis of the antifungal activities of three essential oils as alternative therapies in dermatophytosis infections. *Journal of Applied Microbiology*.

**Vaissiere B., (2002)** - Abeilles et pollinisation. *Le courrier de la Nature, Spécial Abeilles*, 196 : 24-27.

**Vorobeva, S. L., & Sannikova, N. A. (2013).** Humidity adsorption in the nest of bees in winter. *Agrarian science of Euro-North-East*, 1(32), 48-50.

**Wallberg, A., Bunikis, I., Pettersson, O. V., Mosbech, M. B., Childers, A. K., Evans, J. D., ... & Webster, M. T. (2019).** A hybrid de novo genome assembly of the honeybee, *Apis mellifera*, with chromosome-length scaffolds. *BMC genomics*, 20, 1-19.

**Wang, X. R. (2000).** The progress of study on the physiology and histopathology of insect midgut. *J. Zhongkai Agrotechnical College*, 13(1), 58-68.

**Wang, L., Weller, C.L.,** 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* 17, 300–312.

## Référence bibliographique

---

**Wang, M., Li, J., Ho, G., Peng, X., Ho, C.,** 1998. Isolation and identification of antioxidative flavonoid glycosides from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J. Food Lipids* 5, 313–321.

**Wang, Z., Ding, L., Li, T., Zhou, X., Wang, L., Zhang, H., et al.,** 2006. Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *J. Chromatogr. A* 1102, 11–17.

**Wienkotter, N., Begrow, F., Kinzinger, U., Schierstedt, D., Verspohl, E.J.,** 2007. The effect of thyme extract on beta2-receptors and mucociliary clearance. *Planta Med.* 73 (7), 629–635.

**Wilson, W. T., Nunamaker, R. A., & Maki, D. (1984).** The occurrence of brood diseases and the absence of the Varroa mite in honey bees from Mexico.

**Wood, M. (1998).** Microbes help bees battle chalkbrood. *Agricultural Research*, 16-16.

**Yacobson, B. A., Elad, D., Rosenthal, K., Kmer, I., Slovecky, I., & Efrat, H. (1991).** A recent chalkbrood outbreak in Israel: attempts at therapeutic intervention. *Am. Bee J*, 131, 786.

**Yilmaz, E., & Erden, A. K. (2019).** Purification of degummed crude sunflower oil with selected metal-organic frameworks as adsorbents. *Grasas y Aceites*, 70(4), e323-e323.

**Zaghloul, O. A., Mourad, A. K., El Kady, M. B., Nemat, F. M., & Morsy, M. E. (2005).** Assessment of losses in honey yield due to the chalkbrood disease, with reference to the determination of its economic injury levels in Egypt. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 70(4), 703-714.

**Zienab, A. E. Hassanein 2022.** Efficiency of some essential oils on *Ascosphaera apis* the pathogen chalkbrood disease.

**Zhang, H.-F., Yang, X.-H., Wang, Y.,** 2011. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future application. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 672–688.

**Zhu, Z., Wang, J., Fan, X., Long, Q., Chen, H., Ye, Y., ...& Guo, R. (2022).** CircRNA-regulated immune response of Asian honey bee workers to microsporidian infection. *bioRxiv*, 2022-06.

## Référence bibliographique

---

Zhou, E., Fu, Y., Wei, Z., Yu, Y., Zhang, X., Yang, Z., 2014. Thymol attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced mouse asthma. *Fitoterapia* 96, 131–137.

**Annexe A**

**Tableau A1** : Appareillages, Les solutions, les verreries, Autre matériels.

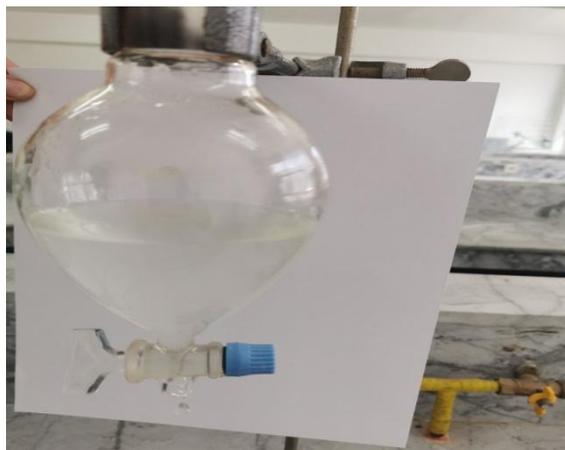
<b>Les verreries</b>	<b>Les appareillages</b>	<b>Les solutions</b>	<b>Autre matériels</b>
Les boîtes de pétri Pipette pasteur La Lames Tube à essai en verre Pissette d'eau distillée Ballon en verre 2000ml Réfrigérant simple Réfrigérant de type clewenger	Étuveréglée à 28°C Bain mari 2 Bec benzène Chauffe ballon Microscope optique	Le bleu de méthylène Eau distillé Ethanol à 90 degré Le milieu de culture Sabouraud	Micropipette réglable Les embouts Scotche Pince Seringue de 0,25ml Tubes eppendorfs Para filme Pied à coulisse

**Annexe B**

	
<p><b>Figure B1</b> : Montage d' hydro distillation (clewenger)</p>	<p><b>Figure B2</b> : Montage d' hydro distillation (Simple)</p>



**Figure B3** :condensation d'huile essentielle de thym



**Figure B4** :Décantation

Annexe C



**C1** : mileu culture sabouraud



**C2** : Bain mari



**Figure C3 :** Préparation des concentrations



**Figure C4:** traitement d'huile essentielle de thym



**Figure C5:** traitement d'hydrolat de thym



**Figure C6:** teste de l'activité antifongique



Figure C7: examen microscopique

Annexe D



Figure D1 : résultat de traitement d'huile essentielle de thym



Figure D2 : résultat de traitement d'hydrolat de thym

## Annex

**Tableau D3 :** Les diamètres de la croissance mycélienne *A. niger* à la présence d'huile essentielle

HE	Diamètre A	Diamètre B	La somme	La moyenne	Taux inhibition
Témoin	45	53	49	46,33333333	100
T	44	50	47		
T	42	44	43		
0,005	19	21	20	17,66666667	38,1294964
0,005	15	17	16		
0,005	16	18	17		
0,01	11	10	10,5	11	23,7410072
0,01	9	12	10,5		
0,01	11	13	12		
0,015	0	0	0	0	0
0,015	0	0	0		
0,015	0	0	0		
0,02	0	0	0	0	0
0,02	0	0	0		
0,02	0	0	0		
0,025	0	0	0	0	0
0,025	0	0	0		
0,025	0	0	0		
0,03	0	0	0	0	0
0,03	0	0	0		
0,03	0	0	0		
0,035	0	0	0	0	0
0,035	0	0	0		
0,035	0	0	0		
0,04	0	0	0	0	0
0,04	0	0	0		
0,04	0	0	0		
0,045	0	0	0	0	0
0,045	0	0	0		
0,045	0	0	0		
0,05	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0		
0,05	0	0	0		
0,1	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0		
0,1	0	0	0		
0,2	0	0	0	0	0
0,2	0	0	0		
0,2	0	0	0		
0,4	0	0	0	0	0
0,4	0	0	0		
0,4	0	0	0		
0,8	0	0	0	0	0
0,8	0	0	0		
0,8	0	0	0		

## Annex

**Tableau D4** : Les diamètres de la croissance mycélienne *A .pis* à la présence d'hydrolat

Hydrolat	Diametre 1 (mm)	Diametre 2 (mm)	somme	moyenne	taux h
T	45	53	49	46,3333333	100
T	44	50	47		
T	42	44	43		
1	39	40	39,5	38,5	83,0935252
1	37	38	37,5		
1	37	40	38,5		
2	37	38	37,5	36,6666667	79,1366906
2	36	36	36		
2	34	39	36,5		
3	29	33	31	29,5	63,6690647
3	29	31	30		
3	27	28	27,5		
4	24	25	24,5	23,1666667	50
4	23	24	23,5		
4	21	22	21,5		
5	14	21	17,5	17	36,6906475
5	16	19	17,5		
5	14	18	16		
6	16	17	16,5	17,6666667	38,1294964
6	20	22	21		
6	15	16	15,5		
7	7	9	8	12,3333333	26,618705
7	15	17	16		
7	12	14	13		
8	15	16	15,5	11,3333333	24,4604317
8	9	10	9,5		
8	8	10	9		
9	6	7	6,5	9,8333333	21,2230216
9	9	14	11,5		
9	11	12	11,5		
10	0	0	0	0	0
10	0	0	0		
10	0	0	0		

*ascosphaera apis* هو أحد أخطر الأمراض التي تصيب نحل العسل المنزلي *apis mellifera*. تركز الجزء الأول من هذه الدراسة على حالة ماشية النحل في منطقة تيسمسيلت. يتم جمع البيانات من خلال التواصل مع مديرية المصالح الفلاحية في تيسمسيلت. تكشف نتائج هذا الجزء الأول أن عدد مربى النحل وعدم الخلايا وإنتاج العسل يختلفان بشكل كبير من عام إلى آخر، من 2010 إلى 2022. يهدف الجزء الثاني من هذه الدراسة إلى استبدال المضادات الحيوية المستخدمة لعلاج *ascosphaerose* بمعالجة أخرى طبيعية تستند إلى زيت الزعتر العطري ومائه. تظهر النتائج المتحصل عليها أن هذه المواد الطبيعية لديها فعالية ملحوظة ضد الفطر. لوحظت اختلافات كبيرة بين المنتجين. لدراسة تأثير التراكيز المختلفة المختبرة، استخدمنا اختبار ويلكوكسون غير البارامترى في برنامج SAS 9. للزيت العطري. تشير هذه النتائج إلى وجود نشاط قوي لزيت الزعتر العطري ومائه ضد فطر *Ascosphaera apis* مما يؤدي إلى تثبيط نمو الميسيل. تم تقدير الجرعة القاتلة (DL100) لزيت الزعتر العطري بنسبة 0.036٪، مع نطاق ثقة مقبول يتراوح بين 0.08 و 0.023. أما بالنسبة للمائي، فقد تم تقدير الجرعة القاتلة (DL100) بحوالي 16.21 مل، مع نطاق ثقة مقبول يتراوح بين 11.80 و 24.70. تظهر نتائج هذه الدراسة أن زيت الزعتر العطري ومائه لديهما نشاط مضاد للفطريات مهم جداً في مكافحة *ascosphaerose*

**كلمات مفتاحية:** النشاط المضاد للفطريات؛ الجرعة القاتلة

DL100؛ الزيوت العطرية؛ الزعتر البري (*Thymus lanceolatus.Desf*)؛ *Ascosphaera apis*؛ *Apis mellifera*.

### Résumé

*Ascosphaerose apis* est l'une des maladies les plus dangereuses affectant l'abeille domestique *Apis mellifère*. La première partie de cette étude porte sur l'état de lieu de cheptel apicole dans la région de Tissemsilt. Les données sont collectées en s'adressant à la DSA de Tissemsilt. Les résultats de cette première partie révèlent que le nombre des apiculteurs, le nombre des ruches et la production de miel se diffèrent considérablement d'une année à une autre, allant de 2010 jusqu'à 2022. La deuxième partie de cette étude vise à remplacer les antibiotiques utilisés pour traiter l'ascosphérose par d'autre traitement étant naturel à base de l'huile essentielle de thym ainsi que son hydrolat. Les résultats obtenus montrent que ces substances naturelles possèdent une efficacité remarquable contre le champignon. Des différences significatives ont été observées entre les deux produits. Pour étudier l'effet de différentes concentrations testées, nous avons utilisé le test non paramétrique de Wilcoxon dans SAS 9. Ces résultats indiquent une forte activité de l'huile essentielle et de l'hydrolat de thym vis-à-vis du champignon *Ascosphaera apis*, se traduisant par une inhibition de la croissance mycélienne. La dose létale (DL100) de l'huile essentielle était estimée à 0,036 %, avec un intervalle de confiance acceptable oscillant entre 0,08 et 0,023. En ce qui concerne l'hydrolat, la dose létale (DL100) était estimée à 16,21 ml, avec un intervalle de confiance acceptable oscillant entre 11,80 et 24,70. Les résultats de cette étude montrent que l'huile essentielle de thym ainsi que son hydrolat possèdent une activité antifongique très importante pour lutter contre l'ascosphérose.

**Mots clés :** l'activité antifongique; Dose létale DL100; huiles essentielles; *thymus lanceolatus.Desf*; *Ascosphaera apis*; *Apis mellifera*.

### Summary

Chalkbrood is one of the most dangerous diseases affecting the domestic honeybee *Apis mellifera*. The first part of this study focuses on the status of the beekeeping stock in the Tissemsilt region. The data is collected by contacting the DSA (Department of Agricultural Services) in Tissemsilt. The results of this first part reveal that the number of beekeepers, the number of beehives, and honey production vary considerably from year to year, ranging from 2010 to 2022. The second part of this study aims to replace antibiotics used to treat chalkbrood with other natural treatments based on thyme essential oil and its hydrosol. The results obtained show that these natural substances have remarkable efficacy against the fungus. Significant differences have been observed between the two products. To study the effect of different tested concentrations, we used the non-parametric Wilcoxon test in SAS 9. These results indicate a strong activity of thyme essential oil and hydrosol against the fungus chalkbrood, resulting in inhibition of mycelial growth. The lethal dose (LD100) of the essential oil was estimated at 0.036%, with an acceptable confidence interval ranging between 0.08 and 0.023. As for the hydrosol, the lethal dose (LD100) was estimated at 16.21 ml, with an acceptable confidence interval ranging between 11.80 and 24.70. The results of this study demonstrate that thyme essential oil and its hydrosol possess a highly significant antifungal activity to combat chalkbrood.

**Keywords:** antifungal activity; lethal dose (LD100); essential oils; *Thymus lanceolatus.Desf*; chalkbrood; *Apis mellifera*