



## Les sœurs *Nosema* : détection et microscopie

Traduction des pages web du site [www.scientificbeekeeping.com](http://www.scientificbeekeeping.com) de Randy Oliver, avec son aimable autorisation.

Cet automne, échaudé par *Nosema ceranae*, j'ai collecté méticuleusement quelques abeilles d'une douzaine de ruches de chacun de mes ruchers. J'ai envoyé un échantillon total de 500 abeilles à un laboratoire pour quantifier la présence de spores de *Nosema*. Les résultats faisaient état de moins de un million de spores par abeille. J'en ai déduit que mon exploitation était « clean » et que j'étais en sécurité. Erreur. Quand j'ai appelé le laboratoire cet été pour vérifier leur protocole, ils m'ont répondu qu'ils avaient suivi la « méthode standard » en examinant un sous-échantillon de 10 abeilles du lot complet. J'étais choqué de réaliser que j'avais pris des décisions majeures quant à la conduite de mon exploitation en extrapolant la situation de dix pauvres abeilles !

Cet article n'est nullement une critique d'aucun laboratoire – ils font un boulot extraordinaire en déterminant le niveau d'infestation par *Nosema* selon la « méthode standard » de G.E. Cantwell (publiée dans ce journal en 1970). Rogers (2002) présente un excellent « pas à pas » photographique de cette méthode. Dans ce protocole, les abdomens de dix abeilles sont écrasés puis dilués dans 10 ml d'eau. (dans certaines variantes les abdomens écrasés sont filtrés rincés, la mixture obtenue est ensuite centrifugée à 800 G pendant 8 minutes, le surnageant est retiré et le culot est dilué dans un volume précis d'eau distillée). Une anse stérile est ensuite utilisée pour transférer un sous échantillon minuscule (10 $\mu$ L) dans un hémocytomètre (lame de microscope spécialisée utilisée pour le comptage des cellules sanguines) où une fraction de ce sous échantillon est examinée sur une grille microscopique très précise pour dénombrer les spores. Le nombre de spores est ensuite divisé par le nombre de carrés de la grille où les spores ont été comptées et ensuite multiplié par  $4 \times 10^6$  pour estimer le

nombre moyen de spores par abeilles. La précision de cette méthode est d'environ 50 000 spores par abeille, c'est à dire que chaque spore comptée représente par extrapolation 50 000 spores. Pour arriver au seuil de traitement de un million de spores par abeilles, le technicien n'aura donc avoir compté que 20 spores au total !

Une fois que vous connaissez le nombre exact de spores par abeille, cela signifie... euh, peu de choses. Cela vous donne juste un chiffre approximatif, sans pouvoir se fier à un seuil précis de traitement ! Comme le précise Rogers dans le site ci-dessous [*NDT Wildwood Labs, traduction disponible sur le site du GDSA 27*] : « La charge parasitaire par abeille peut être très variable et il n'y a pas de seuil établi pour mettre en place un traitement. Les infections sont normalement minimales en septembre et en octobre avec des infections de l'ordre de 0 à 1 million de spores par abeille. Des comptages plus importants durant ces mois aboutissent de manière certaine à des problèmes majeurs. Les spores sont normalement les plus abondantes pendant le printemps. Des comptages supérieurs à 12 millions d'abeilles ont été enregistrés. La magnitude des comptages est certainement plus importante que le dénombrement précis des spores. Par exemple, des comptages qui diffèrent de quelques milliers, voire de dizaines de milliers peuvent être considérés comme similaires. Des comptages différents de quelques millions sont plus certainement différents. »

A la fin de cet été, je me demandais pourquoi certains ruchers ne se développaient pas comme prévu, j'ai essayé la méthode décrite par Shimanuki et Knox (2000) : extraire les intestins des abeilles avec des pinces fines et rechercher si les intestins étaient blancs et épaissis. Je vous le dis : éviscérer des abeilles au hasard pour une

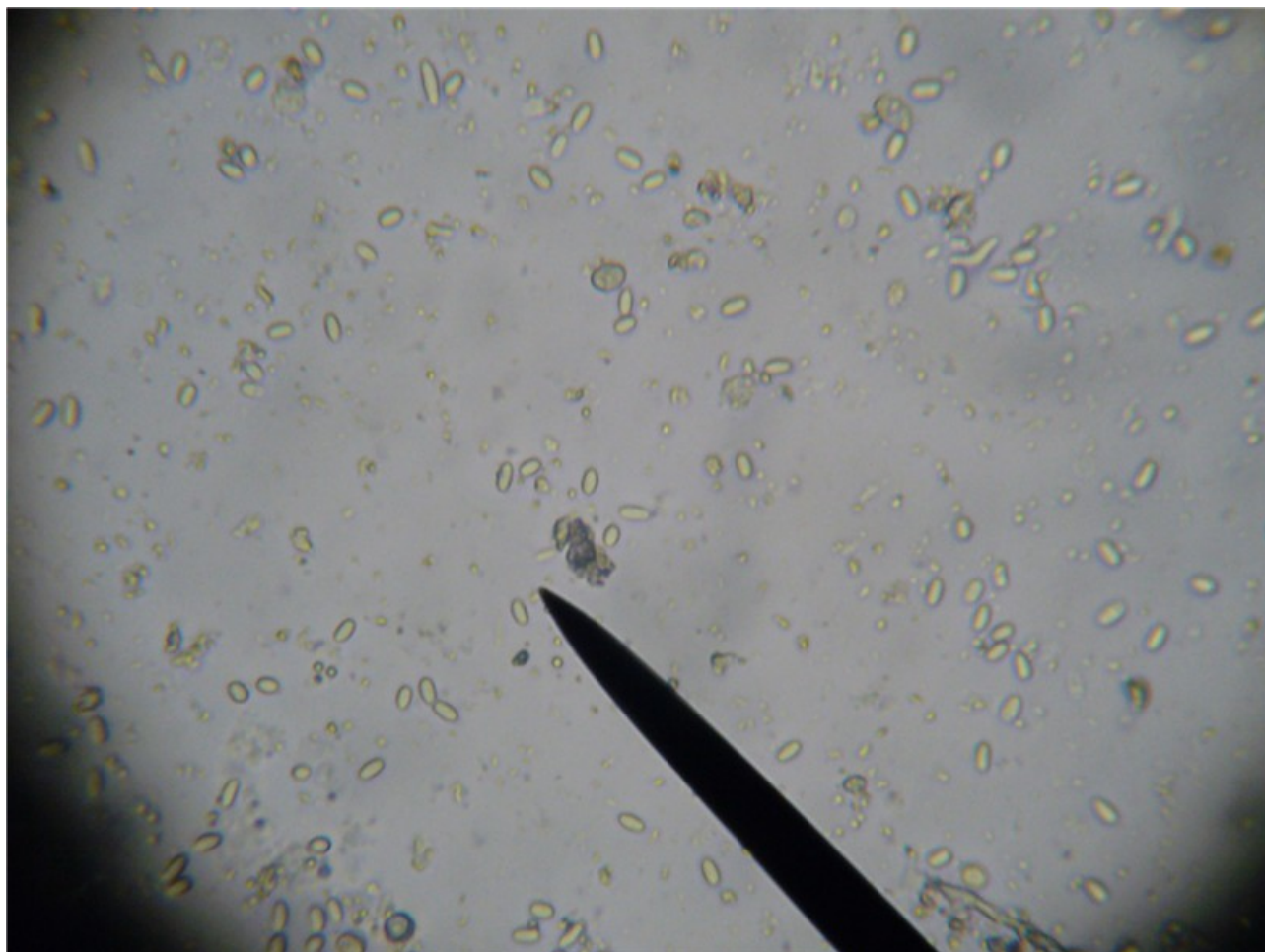
recherche sans résultats d'intestins blancs est rapidement rasoir ! Je ne recommande pas cette méthode. J'en étais donc à soit envoyer de nouveau des échantillons au laboratoire, soit à apprendre à faire des examens microscopiques moi même. Comme je suis radin, j'ai compulsé un certain nombre de variations de la méthode Cantwell (Shimanuki et Knox, et le Dr Eric Mussen, toujours prêt à offrir son aide).

Armé de cette connaissance « théorique », j'ai récupéré un microscope, je suis sorti et j'ai attrapé une abeille traînante devant une ruche. Les abeilles traînantes sont classiquement des abeilles infestées par *Nosema* qui sont trop faibles pour voler. J'ai écrasé son intestin sur une lame et... bingo ! Des spores de *Nosema*, très distinctes même pour un débutant. Avec beaucoup de chance, j'ai ainsi marqué au

premier essai, ce qui était vraiment fortuit : sur la douzaine d'abeilles que j'ai ensuite examiné, je n'ai pas trouvé une seule spore !

**C'est un point important si vous voulez avoir un succès rapide dans l'identification des spores, sinon vous risquez de chercher lame après lame des spores inexistantes et vous vous demanderez si vous ne les ratez pas.**

C'est pour cela que j'ai inclus quelques photos prises avec mon appareil photo numérique bon marché juste maintenu contre les oculaires du microscope. Essayez avec ces photos de vous familiariser avec la forme, la taille relative [NDT : *c.a.d en comparaison avec les autres éléments observés*] et l'aspect caractéristique de « pâleur centrale entourée d'un anneau sombre » des spores de *Nosema*.



*Echantillon d'intestin dilué dans ½ cc d'eau. Le cercle laissant des coins sombres indique qu'il s'agit d'un grossissement de 400 x. Le pointeur n'indique rien.  
Bien, que peux m'indiquer ce niveau d'infection ?*

Bon, j'ai trouvé des spores, mais comment traduire le nombre de spores observé ici en comptage de spores « officiel », sans passer par la méthode standard, rébarbative ?

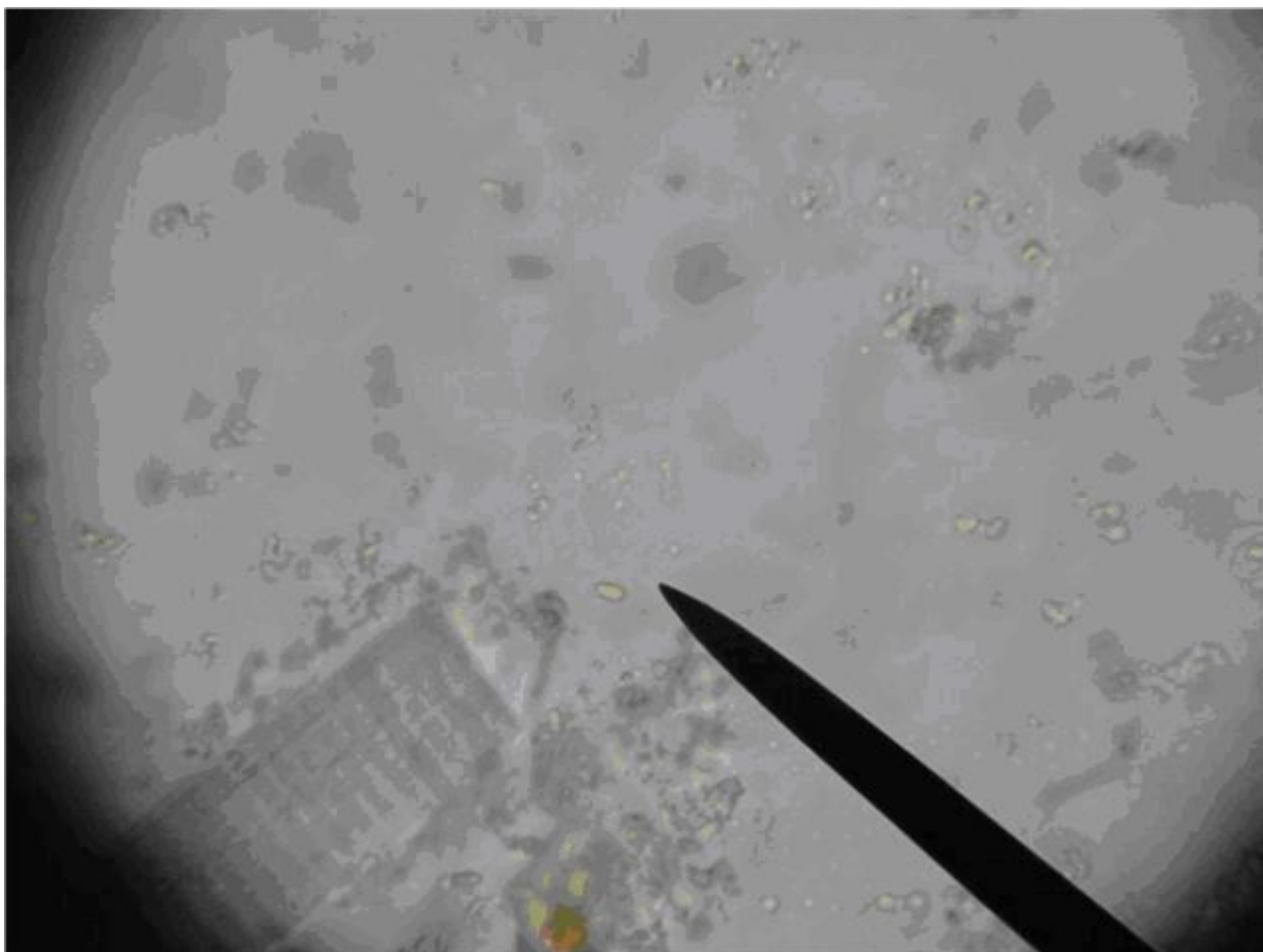
Par chance, je suis tombé sur une publication de bon sens de Topolska et Hartwig (2005). Ces scientifiques ont réalisé que puisque les comptages de spores n'étaient que des fourchettes approximatives, une méthode semi-quantitative (approximation) d'estimation des niveaux de spores devait être suffisante pour prendre des décisions de conduite du rucher.

Eurêka ! J'ai pu modifier leur méthode pour obtenir un tri rapide, similaire à ce que je fais avec les « comptages » de varroa. La seule chose dont j'avais besoin était de calibrer le nombre de spores observé par champ de vision au microscope pour connaître l'équivalence en terme de millions de spores par abeilles.

Topolska et Hartwig considèrent que voir une à quelques spores sur quelques champ de vision (en déplaçant la lame) correspondait à une « infection légère ». Ils qualifient la présence de une à quelques spores sur tous les champs de vision observé comme étant une infestation modérée et la présence de nombreuses spores comme une infestation massive.

Comme vous l'avez deviné, j'ai évidemment cherché à comprendre leurs calculs (et trouver ce qu'ils appellent « nombreuses »).

Le principe d'une méthode quantitative est que vous diluez de manière homogène les spores d'un échantillon d'abeille dans un volume donné d'eau, que vous comptez ensuite les spores d'un échantillon de la suspension obtenue et multipliez le résultat par le volume de suspension.



*Exemple d'une infestation très basse. Une seule spore est présente (au bout du pointeur) dans le champ. L'objet strié à gauche est un fragment de trachée.*

J'ai acheté un hémocytomètre, et compté le nombre de carrés présents par champ (j'ai fait ce comptage sur trois microscopes différents, les résultats étaient similaires). A partir de ce résultat, j'ai pu convertir le comptage standardisé de spores en comptage « par champ », en tenant compte de la double concentration de spores de la méthode Topolska. La conclusion à laquelle je suis parvenu est que si vos abeilles sont infestées à un niveau de 1 million de spores par abeille, cela correspond à 29 spores par champ (ce résultat correspond à l'appellation « nombreuses » de Topolska). Mise à jour : j'ai fait des corrélations plus précises : pour 10 spores vues par champ (en diluant chaque abeille dans 0,5 mL) le résultat de la méthode Cantwell serait de 2,9 millions de spores.

En m'intéressant à mes colonies, je suis sorti et me suis mis à écraser des abeilles dans plusieurs ruchers, abeille par abeille et colonie par colonie, en évaluant leur nombre de spores. J'ai constaté que la plupart des colonies saines tombent en septembre dans la catégorie zéro ou quelques spores par champ. Cependant, en évaluant les colonies faibles, j'avais plus souvent des niveaux de 50-100 spores par champ. Quand j'étudiais les abeilles trainantes, je pouvais avoir jusqu'à 300 spores par champ – l'équivalent de 12 millions de spores par abeille ! (J'ai entendu des rapports récents de plus de 30 millions de spores dans des colonies effondrées) J'ai aussi constaté que le niveau d'infestation varie énormément d'une abeille à l'autre et dans le même rucher d'une colonie à l'autre.

## Acheter un microscope

Quelqu'un écrivait que les apiculteurs pouvaient utiliser des microscopes d'enfants pour rechercher *Nosema*. Ce n'est pas une bonne idée : si les apiculteurs commencent à piquer aux enfants leurs microscopes, ils vont avoir une sale réputation ! De plus, les microscopes pour enfants que l'on vend sont un moyen direct pour vous dégoûter de la microscopie, tellement leur qualité est mauvaise. Avec un microscope, vous en avez en général pour votre argent

**Au final, le mieux que je puisse vous dire c'est qu'avec une dilution de ½ ml d'eau par abeille, si vous ne voyez que une à deux spores dans chaque champ, vous êtes probablement tranquilles. Cependant, si le compte approche les 25 spores par champ, vous feriez mieux de traiter. Avec des niveaux plus élevés, vos abeilles ont un sérieux problème.**

L'avantage, c'est que vous n'avez en fait pas à compter les spores, que vous en voyiez ou non. Après avoir examiné une douzaine d'échantillons, pour pourrez vous faire une idée en un coup d'œil du niveau d'infection.

Alors, pour un apiculteur, quoi faire ? Un seul test en automne ne sera pas à la hauteur avec *Nosema ceranae* actif tout l'été et les grandes variations d'infestation entre ruchers. Souvenez vous que les infestations par *Nosema* sont « invisibles » jusqu'à ce votre colonie soit vraiment malade [NDT comprendre gravement malade]. Pour moi, mesurer l'infestation par *Nosema* va devenir aussi répandu que faire des mesures de varroa sur planchers graissés ou à l'éther, à moins que nous arrivions à sélectionner des abeilles super résistantes à tout. On dirait que nous avons un nouveau truc dangereux à surveiller si nous voulons garder nos abeilles en bonne santé ! On dirait aussi que vous allez devoir dépenser une petite fortune à envoyer des prélèvements aux labos (j'en donnerai une petite liste à la fin de cet article) ou alors vous acheter un microscope.

(particulièrement en ce qui concerne les lentilles des objectifs (lentilles du bas). Il y a peu de chances que vous trouviez quelque chose qui vous satisfasse pour moins de 150 \$, mais vous n'avez inversement pas besoin de dépenser des milliers de dollars pour un microscope professionnel à contraste de phase.

J'ai fait du shopping dans les catalogues de fournitures scientifiques et sur internet. Il est impossible pour un « non-microscopiste » de se faire seulement une idée du nombre d'options possibles !

J'en ai essayé quelques uns. Je ne prétend en aucune façon être un spécialiste de microscopie, mais je peux peut être vous faire quelques suggestions d'achat.

Cherchez un microscope **composé** [NDT : *qui possède deux groupes de lentilles : l'objectif et des oculaires interchangeables*] de niveau « collège » ou « lycée », qui grossisse à 400 x. Recherchez au minimum des oculaires à grand champ (10X W), un condenseur Abbe, un diaphragme d'ouverture (si l'on peut l'ajuster verticalement, c'est un plus) [*le diaphragme permet de moduler la quantité de lumière arrivant sous la lame*], des objectifs 40 x parfocaux [NDT : *en changeant d'objectif, vous n'avez pas ou peu à mettre au point*] et parcentrés [NDT : *idem pour le centrage de l'image*].

Comme options appréciables : lentilles achromatiques, système de mise au point coaxial [NDT : *les deux molette de réglage fin et normal sont au même endroit*], système d'attache des lames d'origine.

Je préfère comme source de lumière des LED, des ampoules fluorescentes ou halogène aux ampoules tungstène qui chauffent.

Tout microscope qui rassemble les conditions ci-dessus vous permettra d'identifier facilement les spores de *Nosema*. Il y a sur internet des milliards de microscopes neufs ou d'occasion (assurez vous que le service après vente est bon), ou alors allez rendre visite au prof de biologie du lycée du coin pour en essayer. Neuf

ou pas, assurez vous que vous obtenez une image nette et que les réglages fonctionnent parfaitement.

J'ai été impressionné par la gamme de microscopes Omano, disponible chez [www.microscope.com](http://www.microscope.com). Ces microscopes ont des optiques et un équipement de très bonne qualité pour leur prix.

Pour 199\$ , le modèle OM136C est un bon microscope monoculaire. Sinon, si vous avez un peu d'argent de côté, une moins bonne vision ou que vous voulez vraiment prendre plaisir avec votre microscope, passez au OM36 à 399\$ : c'est un microscope binoculaire (comme ça vous pouvez regarder avec les deux yeux) avec un système d'attache des lames très pratique. Je recommande fortement le microscope que je viens d'acheter : le OM36L (449\$). L'image est claire et nette et les molettes de réglage sont bien placées et précises. Il utilise des LED comme source de lumière et les batteries sont rechargeables, ce qui permet une utilisation de terrain – un point très appréciable. Une fois que vous l'aurez essayé, vous ne pourrez plus vous en passer.

Je vous conseille par sécurité des couvercles oculaires et une mallette aluminium pour pouvoir le transporter dans la voiture. Avec ces microscopes, vous avez tout ce qu'il faut pour voir des spores. Si vous souhaitez, vous pouvez aussi opter pour de OM100 (459\$) qui a des optiques encore plus performantes (les optiques sont le cœur de l'efficacité des microscopes).

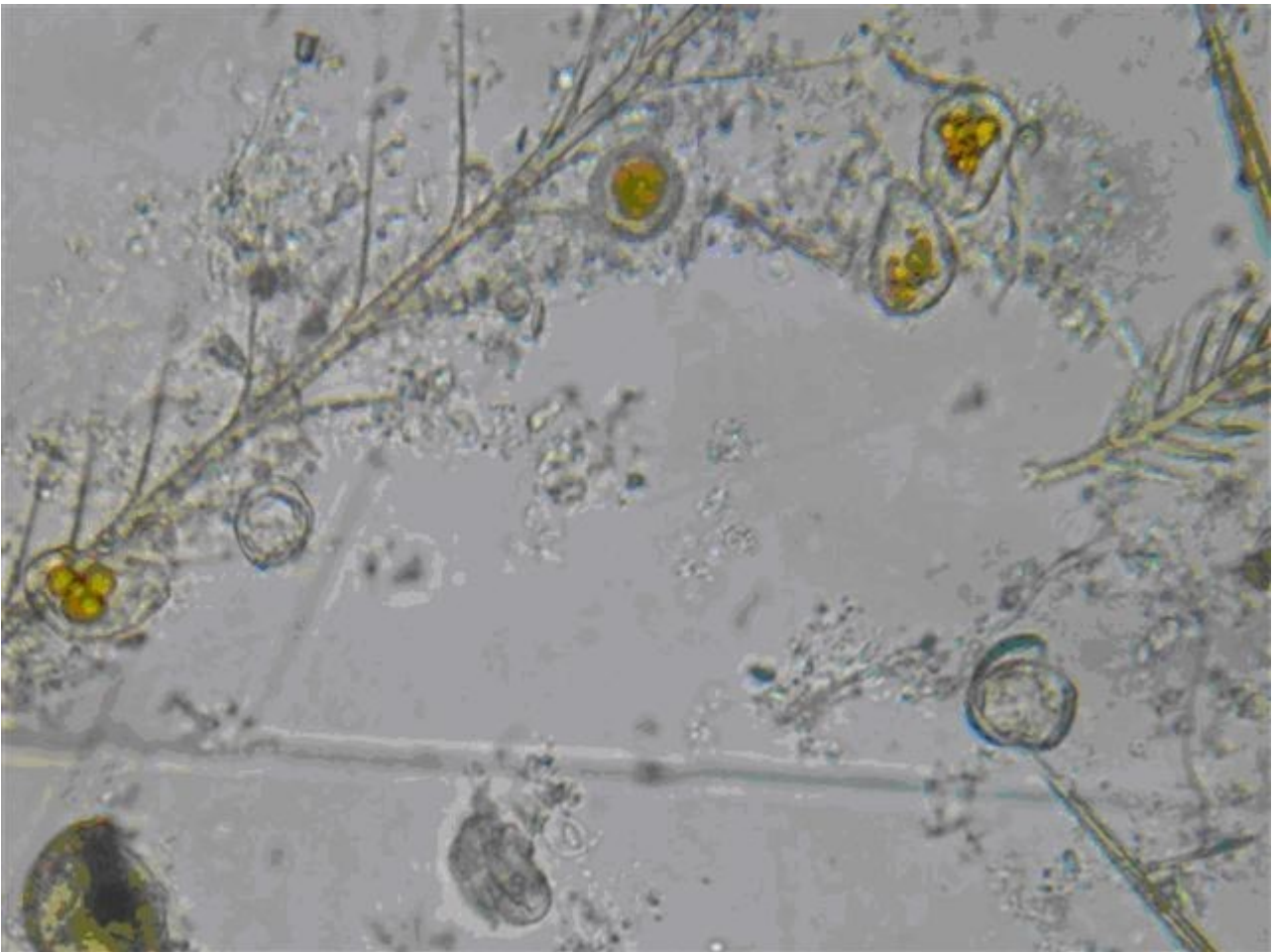
Les professionnels utilisent des sources de lumières dits à contraste de phase, encore plus performantes (il faut compter 600\$). Le monde de la microscopie n'a comme limite que votre budget.



Le Omano 36, microscope binoculaire composé de prix modéré qui transforme la détection de *Nosema* en promenade de santé. La version portable 36 L peut être emportée sur les ruchers pour des test rapides de terrain. Remarquez que les microscopes Omano possèdent un corps situé à l'arrière, ce que l'on ne retrouve en principe que chez les microscopes haut de gamme.

Si vous achetez la mallette aluminium, je vous conseille de la modifier comme le montre la photo : tournez le bloc des oculaires vers l'arrière et placez le sur la mousse. Avec un cutter bien aiguisé, tracez la silhouette du bloc des oculaires sur la mousse. Sortez ensuite la mousse pour la découper sur toute son épaisseur. Profitez en pour élargir un peu toute la mousse pour que le microscope sorte facilement.





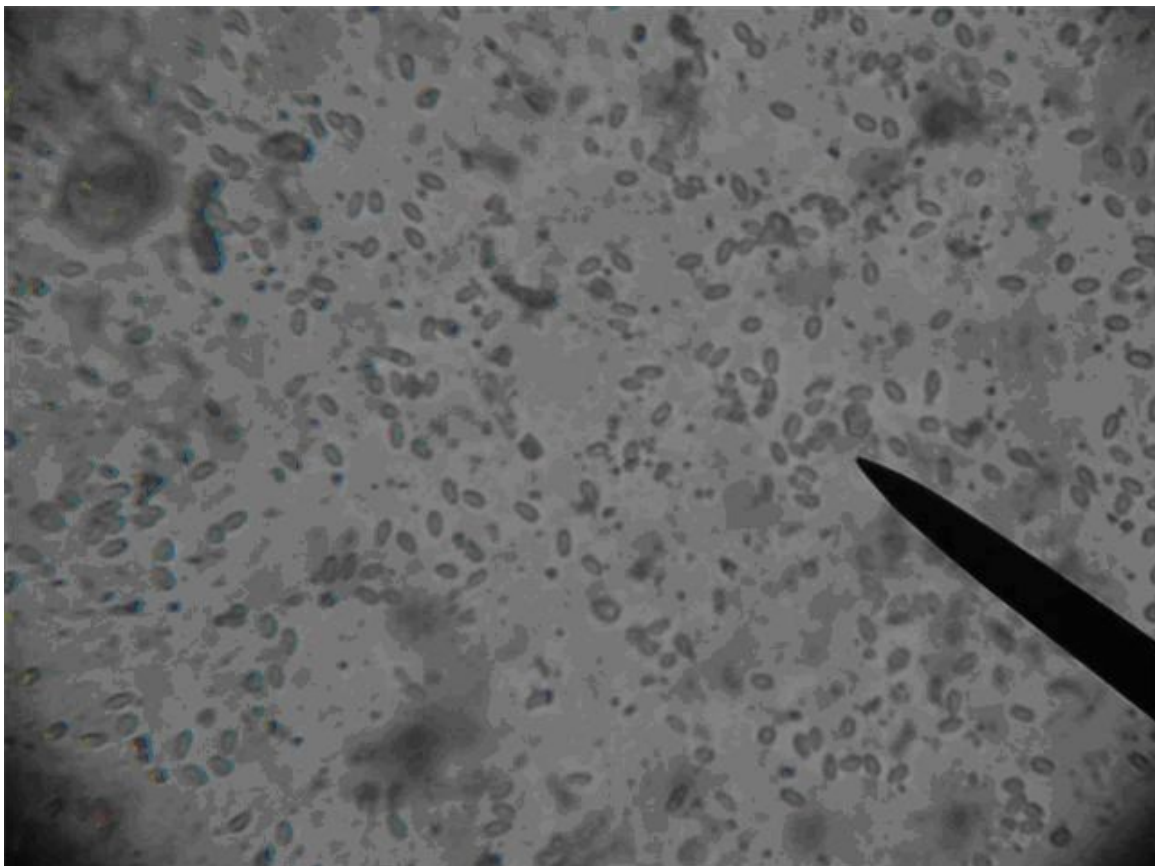
*Bienvenue dans le monde de la microscopie ! Vous allez pouvoir voir toutes sortes de morceaux d'abeilles : des poils (en brosse), des grains de pollen (intacts ou digérés), des gouttelettes lipidiques, des morceaux de tubes de Malpighi, de trachée, etc... Si quelqu'un sait à quoi correspondent les « œufs sur le plat », écrivez moi ! Rapidement vous apprendrez à faire abstraction de tout ce bazar pour ne faire attention qu'aux spores (il y en a une en bas, qui luit et n'est pas nette – pas au point). Microscope Omano, lumière LED, objectif intermédiaire).*

## Trucs de microscopie

Déballez votre microscope, potassez le manuel et tripotez tous les molettes, boutons, réglages pour voir leur effet. Placez le microscope sur une table dans une pièce faiblement éclairée et réglez votre chaise pour être bien installé. Écrasez ensuite une abeille dans un peu d'eau et posez une goutte de la bouillie sur une lame de microscope. Couvrez la ensuite d'une lamelle (un petit carré de verre ou de plastique très fin). Vous venez de faire ce que l'on appelle une préparation. Les lamelles en verre sont les meilleures, mais les lamelles en plastiques sont plus faciles à manipuler, nettoyer et réutiliser. Je peux réutiliser des lamelles plastiques des douzaines de fois avant qu'elles ne soient trop abîmées (elles ne coûtent que 2<sup>1/2</sup> cents mais je suis un apiculteur grippe-sou).

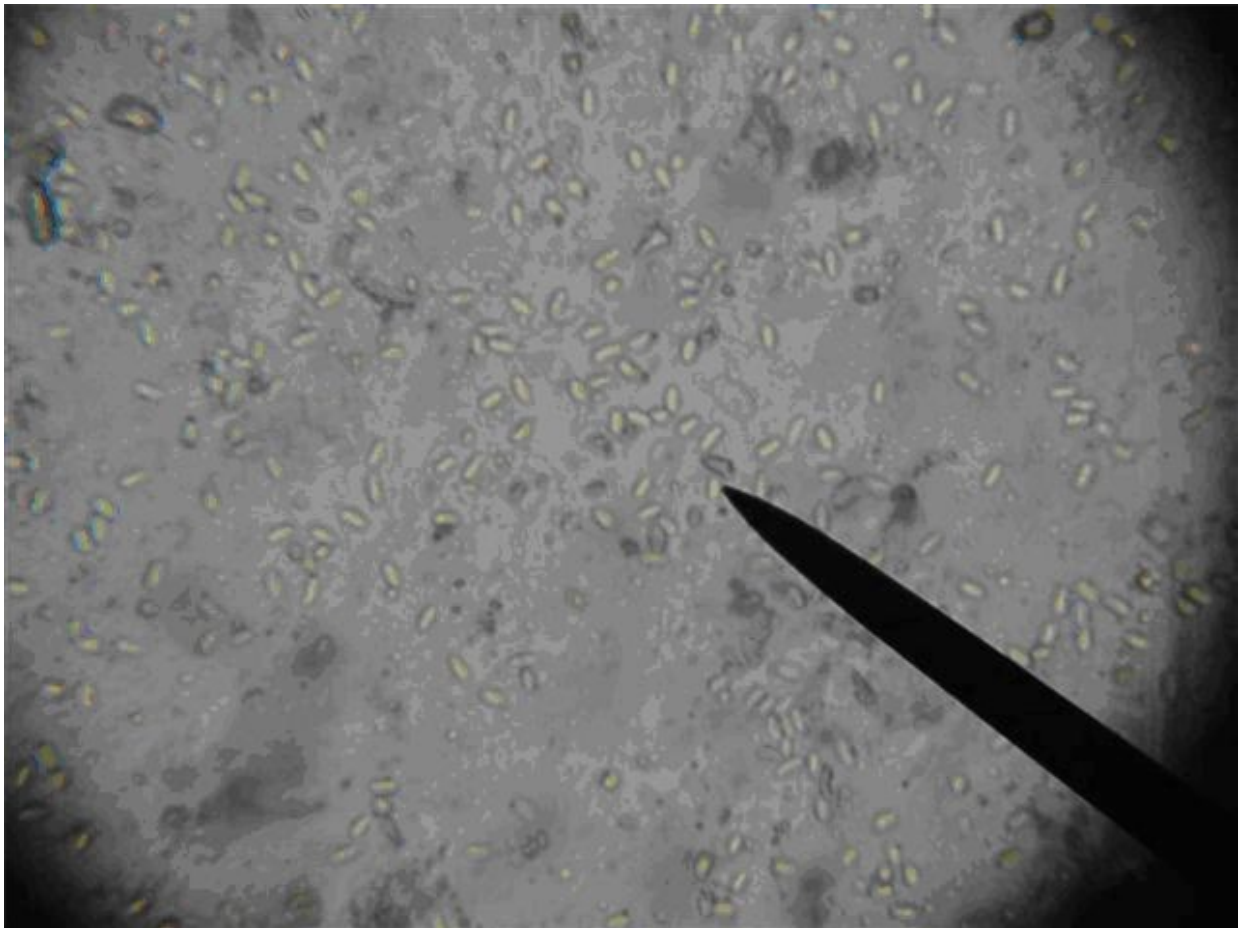
Maintenant tournez la tourelle des objectifs jusqu'à ce que l'objectif 4x (rouge), le plus faible, soit en place. Placez la préparation sur le plateau de façon à ce qu'il y ait sur la préparation des trucs visibles dans la zone de

lumière. Regardez dans les objectifs et faites tourner la vis de réglage principale (pas la vis de réglage fin) pour mettre au point sur du pollen, des poils, des intestins.... Tournez ensuite doucement la tourelle des objectifs pour mettre l'objectif bleu (40x) en place (il n'y a que peu de place entre le haut de la lamelle et l'objectif, assurez vous qu'il n'y a rien sur la lamelle : goutte d'eau...). Tournez la vis de réglage fin si nécessaire pour bien mettre au point. Maintenant amusez vous à régler l'intensité de la lumière, l'ouverture du diaphragme et la hauteur du condenseur (si c'est possible) pour avoir la meilleure lumière pour bien observer : fermez le diaphragme jusqu'à les objets s'assombrissent légèrement et aient des bords plus clairs et nets. Tous ces trucs deviendront vite naturels pour vous. Si vous êtes assez habiles pour manipuler des ruches sur des charge-ruches, vous devez être capables de régler correctement un microscope !



*Forte infestation par Nosema, la lumière doit être réglée pour « illuminer » le centre des spores.*



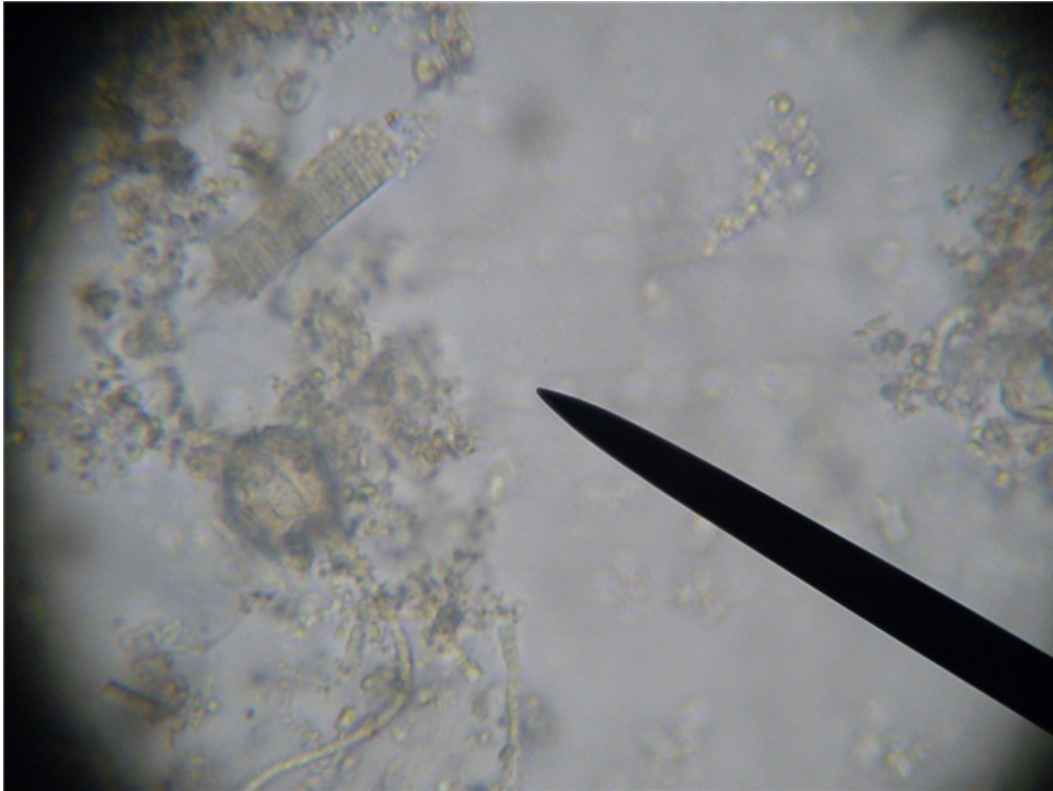


*Même lame, la lumière est ajustée pour faire briller les spores. Combien en comptez vous ?  
Réponse à la fin de l'article.*

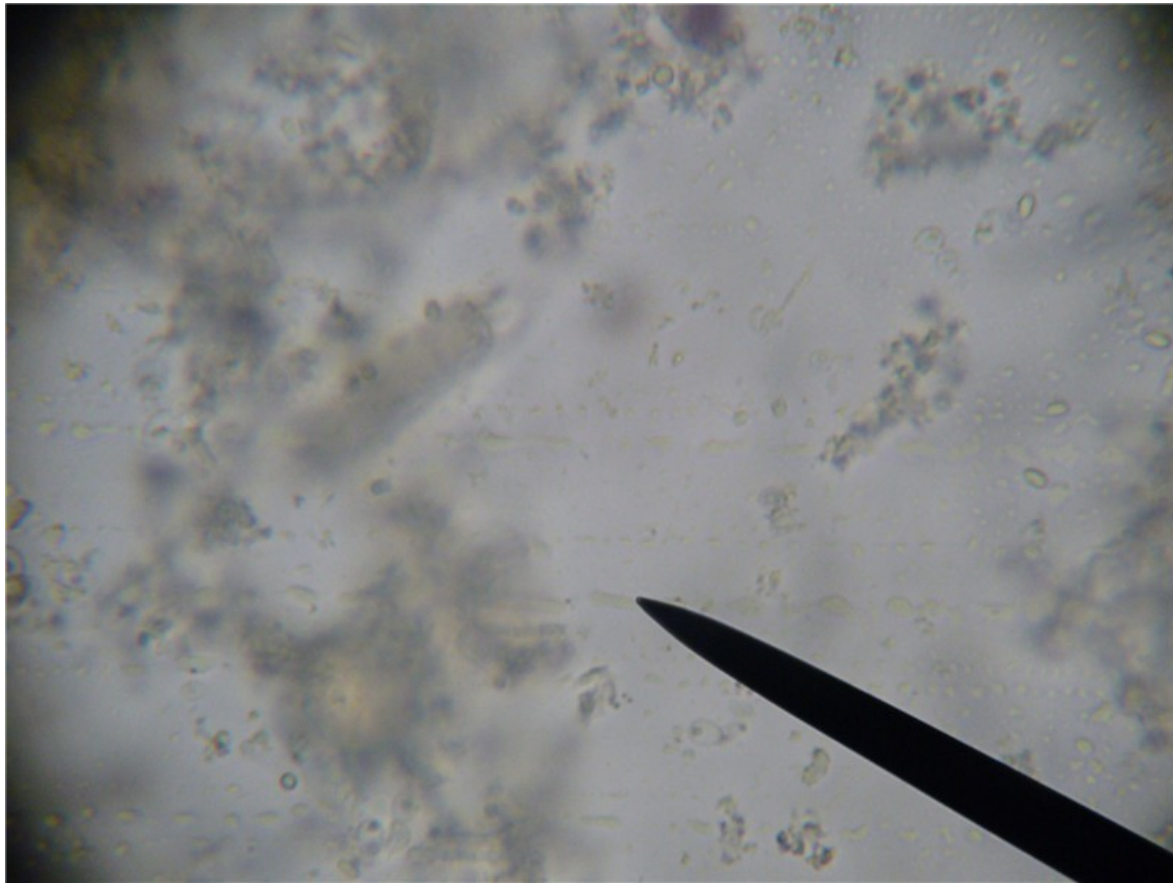
Déplacez ensuite la lame tout autour à la main ou avec le support mécanique si vous en avez un pour rechercher les spores. Elles sont dispersées au hasard sur la préparation mais s'il y a une infestation notable, vous en trouverez sur chaque champ (de vision). Regardez les photos, j'ai essayé d'y inclure des débris d'abeilles pour vous donner une idée de l'échelle. Les spores de *Nosema* ont à peu près toujours la même forme et la même taille. Elles sont nettement ovales avec un bord sombre et un centre clair et lumineux. Cette clarté change lorsque l'on fait tourner la molette fine de mise au point. Une fois que vous en avez repéré une,

ajustez l'ouverture du diaphragme et l'intensité de la lumière pour bien faire « briller » le centre de la spore et repérer les autres plus facilement. Ne touchez à aucun réglage ensuite ! La seule chose dont vous aurez besoin sera de déplacer la lame et tourner éventuellement la molette de réglage fin pour bien remettre au point.

Avec des prélèvements frais entre lame et lamelle, vous verrez de petit protozoaires nager. Les spores de *Nosema* peuvent frémir légèrement (je ne sais pas pourquoi) mais le plus important est de savoir que **les spores de *Nosema* coulent comme des pierres !**



*Illustration de la notion de profondeur de champ. Au grossissement x 400 (objectif bleu 40 x), vous pouvez mettre au point sur chaque couche du film de bouillie. Remarquez le tube trachéal en haut à gauche, j'ai mis au point sur lui. Tout ce qui est plus près ou plus loin de l'objectif n'est pas au point. Il y a une spore de Nosema située au dessus du tube, qui n'est pas visible car la mise au point n'est pas faite sur elle. D'autres spores sont situées à l'extrême droite, à un niveau plus bas que le tube donc pas au point et non visibles également. Sur cette image, vous ne compteriez aucune spore.*



*Même lame, même cadrage, mais la mise au point a été faite plus bas, le tube trachéal n'est donc plus au point. Vous observez que les spores de Nosema sont maintenant visibles à l'extrémité droite. Il est important de laisser reposer la préparation quelques minutes pour que les spores « descendent » au fond du film, puis de mettre ensuite au point sur le fond du film. Cette lame indique un niveau d'infestation léger.*

Vous aurez plus de chance d'observer des spores si vous laissez la préparation reposer une minute ou deux. Utilisez ensuite la molette de réglage fin pour mettre au point sur le fond de la préparation. La plupart des spores sédimentent au fond et reposent sur la surface supérieure de la lame. La recherche des spores est comme la recherche des reines : l'efficacité vient avec la pratique. Après quelques lames, elle vous sauteront littéralement au visage en une fraction de seconde. Après quelques douzaines de lames, vous n'aurez qu'à jeter un œil à vos lames quelques seconde pour faire une estimation du nombre de spores.

Après l'avoir utilisé, rincez la lame et la lamelle, séchez les avec un chiffon sec et doux et réutilisez les encore et encore. Utilisez ainsi quelques lames que vous faites tourner, comme cela vous ne mouillerez pas le plateau du microscope.

## Entretien du microscope

Vous avez dépensé votre argent durement gagné pour vous offrir un beau microscope flambant neuf : traitez le bien pour qu'il dure toute votre vie. C'est un outil de précision qui contient une foule d'éléments précis et fragiles. Ne le heurtez pas, ne le laissez pas tomber : il contient 15 à 20 lentilles qui peuvent être désolidarisées ! La règle chez les étudiants est de toujours porter un microscope avec les DEUX mains. Lorsqu'il n'est pas utilisé, couvrez-le ou placez le dans une mallette. La poussière, les moisissures, le sébum ou les intestins d'abeilles sont ses ennemis ! Retirez tout liquide

avec un chiffon doux imbibé d'alcool isopropylique. Ne touchez jamais les lentilles avec vos doigts ou un tissu normal. N'utilisez que des chiffons pour nettoyage de microscope ou un coton tige imbibé de solution de nettoyage pour lentille ou d'alcool. Utilisez des bombes d'air comprimé pour nettoyage d'appareil photo pour nettoyer les parties difficiles d'accès ou l'intérieur du microscope si nécessaire.

### A suivre :

Où collecter les meilleurs échantillons d'abeilles dans la ruche ?

Prélèvements et mathématiques : combien d'abeilles, combien d'échantillons ?

Ah, la réponse à la question : « combien de spores ? ». Allez soyez réalistes ! Vous croyez que j'ai vraiment le temps de compter toutes les spores. Cette abeille était malade, c'est tout ce que vous avez besoin de savoir !