
La perte de colonies d'abeilles (*Apis mellifera*) à grande échelle

L'augmentation de la pression environnementale et anthropique à laquelle sont exposées les populations d'abeilles domestiques (*Apis mellifera*) et sauvages est soupçonnée d'être à la base de leur déclin à l'échelle mondiale (Beisemeijer *et al.*, 2006 ; Gixti *et al.*, 2009 ; National Research Council, 2007 ; Oldroyd, 2007 ; Paxton, 2010 ; Ratnieks et Carreck, 2010 ; Stokstad, 2007 ; vanEngelsdorp *et al.*, 2009 ; Whitehorn *et al.*, 2012). Des recensements récents ont estimé les pertes d'abeilles domestiques à environ 30 % aux Etats Unis et entre 1,8 à 53 % en Europe (Neumann et Carreck, 2010), alors que le niveau acceptable de mortalité aux Etats Unis est estimé à 15 % (vanEngelsdorp *et al.*, 2012).

Cependant, la perte importante d'abeilles domestiques n'est pas un phénomène récent comme des données historiques du début du XX^{ème} siècle le montrent (Neumann et Carreck, 2010). Le développement de l'apiculture au niveau mondial associé à leur rôle clé dans l'agriculture par la pollinisation, ont fait de l'abeille un animal d'importance stratégique et donc d'intérêt public. En effet, 35 % de la production globale des aliments provient de cultures qui ont besoin de pollinisation entomophile et 70 % des 124 cultures majeures utilisées directement dans l'alimentation humaine au monde, dépendent de la pollinisation (Klein *et al.*, 2007). En Europe la production de 84 % des espèces cultivées dépend aussi de la pollinisation des abeilles (Williams, 1994). En 2005, l'activité des abeilles domestiques représentait 9,5 % de la valeur de la production agricole mondiale destinée à la nourriture humaine, ce qui était estimé à 153 milliards d'euros (Gallai *et al.*, 2009).

Mono et multiples causes

Pendant la première décennie des années 2000, le déclin des abeilles était déjà évident dans quelques régions du monde (Klein *et al.*, 2007). Plusieurs causes étaient soupçonnées d'être à la base du déclin comme la propagation mondiale (i) de l'acarien ectoparasite *Varroa destructor* débutée il y a environ 40 ans (Anderson et Trueman, 2000), (ii) de l'acarien des trachées, *Acarapis woodi* (Downey et Winston, 2001 ; Chen *et al.*, 2004), (iii) du coléoptère *Aethina tumida* (Evans *et al.*, 2003) et (iv)

celle de la microsporidie *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2006). L'utilisation abusive de pesticides et d'herbicides était également suspectée d'influencer la diminution des abeilles (James et Xu, 2012). D'autres facteurs ont été considérés comme contributeurs au déclin des abeilles comme le changement climatique (Le Conte et Navajas, 2008) et les altérations du paysage. Ce dernier peut avoir comme conséquences la fragmentation des écosystèmes, la réduction de la biodiversité et la diminution de la quantité et qualité des ressources mellifères, entre autres (Lautenbach *et al.*, 2012 ; Vandame et Palacio, 2010). On peut aussi mentionner des causes éloignées du système écologique des abeilles comme la baisse des prix des produits et services apicoles (Klein *et al.*, 2007).

En 2009 vanEngelsdorp *et al.* ont défini les caractéristiques du syndrome d'effondrement des colonies (CCD, colony collapse disorder) aux USA comme : (i) l'absence d'abeilles mortes dans la ruche et dans le rucher, (ii) la diminution rapide de la population d'abeilles adultes qui laisse le couvain sans soin, (iii) l'absence de signes de pillage, (iv) le fait qu'au moment du collapse les niveaux de populations de *V. destructor* ou *Nosema* ne sont pas suffisants pour provoquer un impact économique ou le déclin de la population. Il a été proposé que le CCD possède un caractère contagieux ou bien qu'il soit le résultat de l'exposition à un facteur de risque commun. Dans ce scénario les pathogènes sont suspectés d'avoir un rôle indirect en interagissant avec d'autres facteurs. Les pathogènes seraient à la base des symptômes du CCD lorsque le syndrome est installé dans les colonies déjà affaiblies par d'autres facteurs ou par la combinaison de plusieurs stress qui réduisent la capacité des abeilles à lutter contre l'infection.

D'autres études ont montré l'implication d'un pathogène dans des cas de colonies ayant succombé au CCD, comme le virus israélien de la paralysie aiguë (IAPV, Israeli acute paralysis virus of bees) (Cox-Foster *et al.*, 2007) et *N. ceranae* (Borneck *et al.*, 2010 ; Higes *et al.*, 2008a). Mais ces parasites peuvent être également présents de façon asymptomatique dans les colonies (Blanchard *et al.*, 2008 ; Fernández *et al.*, 2012 ; Garrido-Bailón *et al.*, 2010 ; Gisder *et al.*, 2010 ; Reynaldi *et al.*, 2011). D'une façon similaire, les pesticides peuvent provoquer directement la mortalité des abeilles (Henry *et al.*, 2012), ou malgré leur présence dans l'environnement ne pas jouer un rôle prépondérant dans les mortalités d'abeilles (Creswell *et al.*, 2011).

Le rôle des interactions multiples est devenu une des hypothèses majeures pour expliquer la perte de colonies. Les différents facteurs de risque peuvent avoir des effets additifs ou synergiques, augmentant ainsi les effets individuels de chaque facteur (Le Conte *et al.*, 2012). Parmi les interactions pathogène - pathogène il a été mis en évidence l'effet conjoint de *V. destructor* et du virus des ailes déformées (DWV, deformed wing virus) (Dainat *et al.*, 2012a) et encore de *N. ceranae* et d'un

Iridovirus (Bromenshenk *et al.*, 2010). Des interactions pesticide - pathogène ont été également décrites entre *N. ceranae* et des pesticides neocotinoïdes (Alaux *et al.*, 2010a ; Aufauvre *et al.*, 2012 ; Pettis *et al.*, 2011 ; Vidau *et al.*, 2011). Des effets de l'interaction entre la nutrition (pollen) et *N. ceranae* ont été aussi montrées sur la survie des abeilles (Porrini *et al.*, 2011).

II) Le rôle de *Nosema ceranae* dans les pertes de colonies

Dans le scénario si complexe des pertes de colonies d'abeilles, la compréhension des mécanismes d'interaction de plusieurs facteurs, pathogènes – pesticides – environnement, ne peut pas être atteinte sans d'abord connaître les mécanismes d'action des facteurs individuels. C'est pourquoi nous avons voulu approfondir et nous concentrer sur l'étude de l'interaction hôte - parasite : *A. mellifera* et *N. ceranae*. A présent ce parasite émergent est largement distribué dans le monde. Il exprime des niveaux de pathogénie différents qui vont d'une présence asymptomatique à la mort de la colonie.

Distribution géographique

En 1996, une nouvelle espèce de *Nosema* a été découverte chez l'abeille asiatique *Apis cerana* (Fries *et al.*, 1996). La présence de *N. ceranae* chez *A. mellifera* était inconnue jusqu'en 2005, année au cours de laquelle elle a été isolée chez les abeilles européennes (Higes *et al.*, 2006 ; Huang *et al.*, 2007). Cependant, le transfert de *N. ceranae* d'*A. cerana* vers *A. mellifera* remonte à plus de 15 ans avant la première détection chez *A. mellifera*, comme le démontre l'analyse d'échantillons des années 1990 en Uruguay et 1995 aux Etats-Unis (Chen *et al.*, 2008 ; Invernizzi *et al.* 2009). Actuellement *N. ceranae* présente une distribution géographique mondiale (Fig. 1). La présence d'échantillons positifs à *N. ceranae* dans des régions aussi éloignées que l'Uruguay et la Finlande suggère un transfert par différentes voies probablement suivant les échanges commerciaux.

Dans de nombreuses régions *N. ceranae* semble avoir remplacé ou être en train de remplacer *N. apis*, une autre espèce de *Nosema*. Cela soutient l'idée de l'origine récente de *N. ceranae* chez *A. mellifera* (Carreck 2012). Or, il y a des régions, comme en Allemagne, où les deux espèces coexistent sans la prédominance de l'une sur l'autre (Gisder *et al.*, 2010).

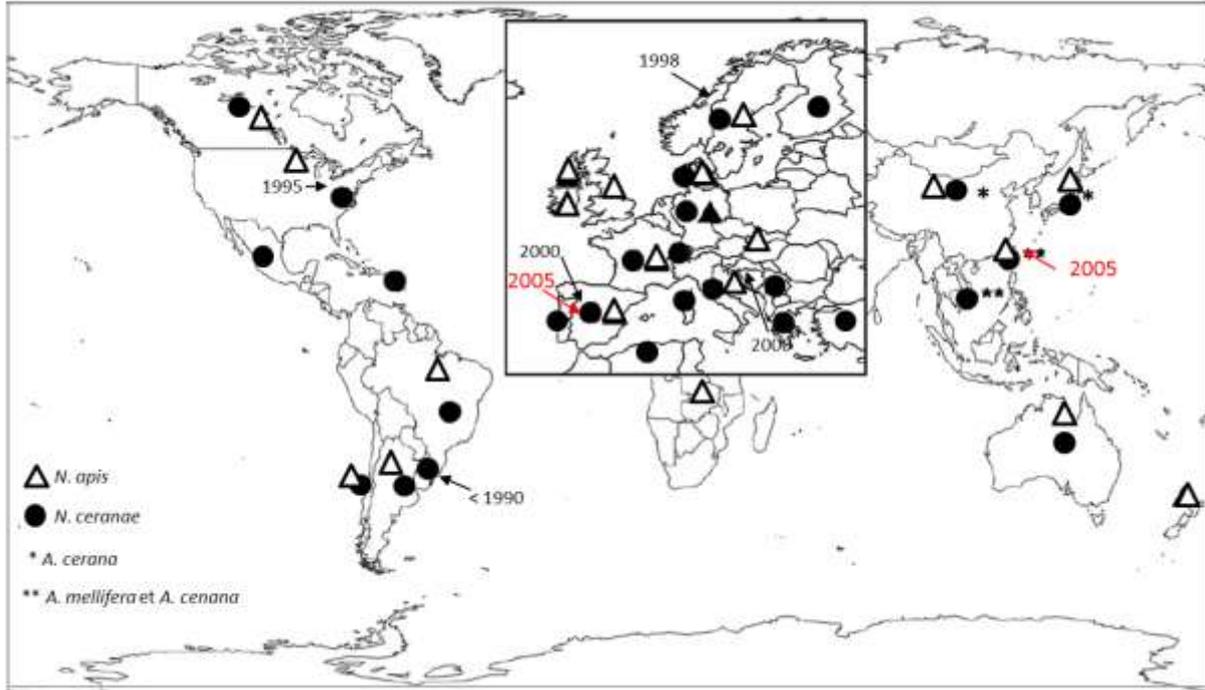


Figure 1. Distribution géographique de *N. ceranae* et *N. apis*. Les flèches rouges indiquent l'année et l'endroit de la première détection de *N. ceranae* chez *A. mellifera*; les flèches noires indiquent l'année et l'endroit des détections datées avant la première détection de *N. ceranae*. D'autres pays non indiqués sur la carte où *N. ceranae* est présent sont : Israël, Indonésie, Vietnam, les Iles Salomon (adapté de : Botías *et al.*, 2012a ; Chen *et al.*, 2008, 2009 ; Giersch *et al* 2009 ; Invernizzi *et al.*, 2009 ; Klee *et al.*, 2007 ; Martínez *et al.*, 2012 ; Paxton *et al.*, 2007 ; Soroker *et al.*, 2011 ; Williams *et al.*, 2008).

Classement taxonomique

Nosema ceranae appartient à la classe des Microsporidia (phylum Microspora) qui est un groupe très diversifié de parasites obligatoires intracellulaires eucaryotes. Environ 1 200 espèces ont été décrites dans 160 genres, ce qui certainement représente une petite fraction de la diversité réelle (Wittner and Weiss, 1999). Presque toutes les microsporidies sont parasites des animaux, une partie notamment sont responsables de maladies humaines associées à la suppression de l'immunité. Chez l'homme ces pathogènes émergents opportunistes (tel que *Encephalitozoon cuniculi*) sont devenus un problème de santé publique lors de la pandémie de l'AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome : Syndrome de l'immunodéficience acquise) (Texier *et al.*, 2010). Egalement, ces pathogènes infectent des nombreuses espèces d'importance commerciale comme l'abeille, le ver à soie (*Nosema bombycis*), le saumon (*Loma salmonae*), et des mammifères domestiques (Keeling, 2009 ; Williams, 2009).

L'histoire taxonomique des microsporidies semble avoir atteint une stabilité avec l'arrivée de la biologie moléculaire. Lors de leur découverte en 1857, les microsporidies étaient considérées comme des champignons (schizomycète) puis ils ont été reclassés deux fois (en 1882 Sporozoa et en

1983 Archezoa) avant que la phylogénie moléculaire démontre leur origine fongique en 1996 (Keeling, 2009). Le séquençage de leur génome et la découverte de la présence de « mitosomes » (une forme simplifiée de mitochondrie) ont soutenu leur classement dans le règne Mycota, ce qui continue à être vérifié par de nouvelles recherches moléculaires (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2012).

L'absence de mitochondrie a été à la base de l'hypothèse d'une origine primitive (Archezoa) des microporidia, aujourd'hui nous savons que l'absence de cette organite fait partie d'une réduction adaptative au niveau moléculaire, biochimique et cellulaire de ce groupe de parasites (Burri *et al.*, 2006). La présence du mitosome sans la capacité de production d'ATP via la phosphorylation oxydative, rend les microsporidies fortement dépendant es de leurs hôtes pour l'obtention d'énergie, cela correspond à un des effets les plus connus de *N. ceranae* chez l'abeille (Aliferis *et al.*, 2012).

Nosema apis fut isolé à partir d'*A. mellifera* en 1909 (Zander) mais le diagnostic moléculaire a été mis au point récemment (Webster *et al.*, 2004). Il est probable que dans le passé les diagnostics des spores *N. apis* basés sur microscopie optique ne différenciaient pas les spores de *N. ceranae* (Fries *et al.*, 2006). *N. apis* a une demande énergétique plus basse que *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2011) et en général ne cause pas de mortalités élevées (Forsgren et Fries, *et al.*, 2010 ; Martín-Hernández *et al.*, 2011). La maladie causée par *N. apis* se dénomme « nosemosis de type A ». Dans les cas aigües, cette maladie se caractérise par des abeilles qui tremblent, des abdomens dilatés, des tâches de fèces sur les cadres et la façade des ruches, une baisse de la quantité du couvain et de la taille de la population d'abeilles, spécialement au printemps (Higes *et al.*, 2010). La maladie due à *N. ceranae* « nosémoses de type C » ne présente pas les symptômes évidents rencontrés par l'infection par *N. apis*. La nosémosis de type C se caractérise par une période d'incubation asymptomatique longue pendant laquelle la colonie présente une production intensive de couvain, des réserves de miel et de pollen, et l'effondrement de la colonie se déclenche lorsque le taux de ponte de la reine n'est pas suffisant pour remplacer la mort d'abeilles adultes (Higes *et al.*, 2008a).

Morphologie

Le stade infectieux de *N. ceranae* correspond à une spore de paroi épaisse, seul stade à survivre en dehors les cellules hôtes (Keeling, 2009) (Fig. 2a). Sa forme extérieure ovo-cylindrique mesure 4,7 x 2,7 µm (fixée et colorée 3,6 x 1,7 µm) (Fries *et al.*, 1996). La spore possède une paroi fine avec une première couche « exospore » protéinique qui mesure entre 14 – 17 nm qui la protège des facteurs environnementaux et une deuxième couche chitineuse interne l'« endospore » (Fries *et al.*, 1996). La structure interne de la spore qui sert à l'infection est constituée essentiellement de trois parties :

- un filament polaire qui contient des protéines dans sa structure et qui est caractéristique du phylum Microspora,
- des membranes lamellaires et tubulaires « polaroplast »,
- et une vacuole postérieure (Fries *et al.*, 1996 ; Vavra et Larsson, 1999 ; Williams, 2009).

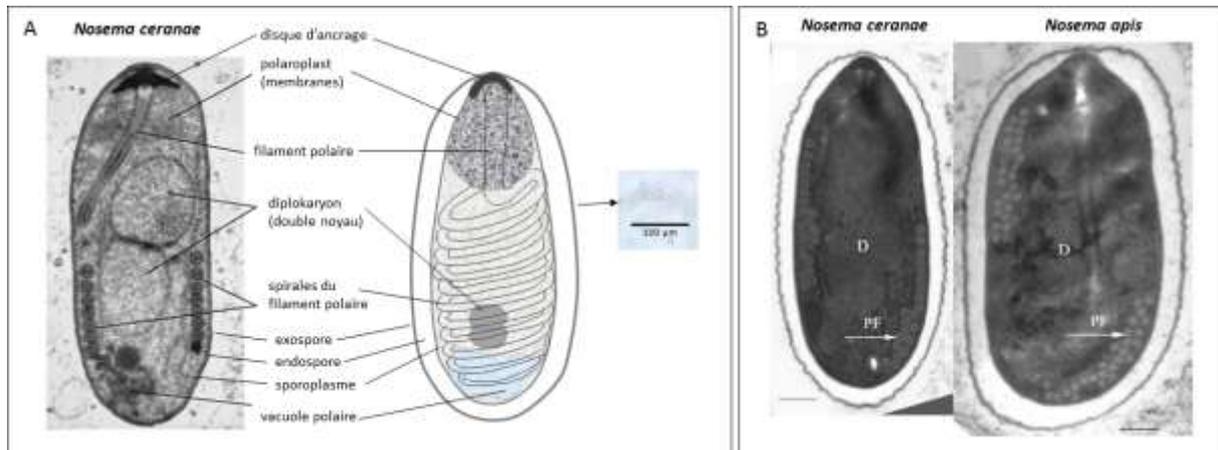


Figure 2. (A) Structure d'une spore de *N. ceranae* (adapté de Soroker *et al.*, 2011) et (B) comparaison avec une spore de *N. apis*, D : diplokarya ; PF : spiraux du filament polaire ; bar = 0,5 µm (Fries *et al.*, 2006).

L'extrémité antérieure de la spore contient le disque d'ancrage qui joint le filament polaire à la cellule pendant la germination; le filament est arrangé dans la partie centre-postérieure de la spore en formant des spirales dans la périphérie et entourant le sporoplasme. Le nombre des spires est caractéristique de l'espèce qui dans le cas de *N. ceranae* correspond à 18 – 23 spires (Chen *et al.*, 2009 ; Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2010). Au centre de la spore, entourés par les spirales du filament polaire et le sporoplasme, se trouvent deux noyaux apposés (diplokaryon) structurellement identiques qui sont également visibles dans les stades végétatifs (Fries *et al.*, 1996 ; Vavra et Larsson 1999).

Le diagnostic différentiel de *N. ceranae* se base sur la PCR car les différences structurelles avec *N. apis* ne sont pas évidentes par microscopie optique. Les spores de *N. ceranae* sont en moyenne légèrement plus petites en taille et en nombre de spires du filament polaire que celles de *N. apis* (Fig. 2b). Les cycles de vie suivent des étapes similaires dans les deux espèces (Wittner et Weiss, 1999).

Le cycle de vie

Le cycle de vie de *N. ceranae* commence lorsque l'abeille adulte ingère la spore. Nous distinguons deux étapes essentielles : la germination de la spore et la multiplication de la microsporidie (Fig. 3).

(i) *Germination:*

Dans le lumen, la spore extrude son filament polaire qui pénètre les cellules épithéliales de l'intestin. Une fois dans le cytoplasme de la cellule hôte, le parasite injecte son sporoplasme qui contient le matériel génétique (Wittner et Weiss, 1999). Les voies de signalisation qui gèrent la germination de la spore restent à présent inconnues. La vision actuelle considère que la germination est le résultat de l'augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de la spore suivi par un influx rapide d'eau à travers la membrane cellulaire qui provoque l'éjection du filament polaire et le passage du sporoplasme vers l'extérieur de la spore à travers le filament. La recherche aujourd'hui vise à comprendre (i) l'interaction de protéines et glycoprotéines présentes dans le filament polaire et la paroi de la spore qui sont importants pour la fonctionnalité du filament, et (ii) la présence des autres composants impliqués dans la reconnaissance des tissus cibles et l'initiation de l'invasion de la cellule hôte (Texier *et al.*, 2010).

(ii) *Multiplication intracellulaire :*

- Mérogonie (phase proliférative). Dans cette étape le microorganisme se multiplie en contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte. Le sporoplasme se développe en méronte lorsque la multiplication commence à avoir lieu par fission cytoplasmique ayant comme résultat la formation de mérontes appariés qui vont continuer à se diviser. Le nombre de cycles de division n'a pas été encore déterminé (Fries *et al.*, 1996 ; Higes *et al.* 2010 ; Vavra et Larsson, 1999). Dans cette étape, la multiplication du parasite élargit les cellules hôtes et déplace les noyaux en position apicale; de nombreuses mitochondries sont placées autour des mérontes, ce qui facilite probablement l'obtention d'ATP dont le parasite a besoin (Higes *et al.* 2010).
- Sporogonie (phase de formation des spores). Une fois que la multiplication a eu lieu, les mérontes appariés vont se séparer et transformer en sporontes et sporoblastes par condensation et la formation d'une paroi épaisse (Gisder *et al.* 2010). Par la suite, deux types de spores peuvent se former, des spores « primaires » caractérisées par une forme ronde et les spores de « résistance » de forme ovale. La spore primaire a une paroi cellulaire plus fine que la spore de résistance et est capable de réinfecter des cellules hôtes voisines (Higes *et al.* 2010). La spore de résistance, de paroi plus épaisse, est libérée dans le lumen de l'intestin lorsque la cellule hôte se lyse, et est finalement dispersée dans l'environnement portée par les fèces des abeilles (Gisder *et al.*, 2010 ; Wittner et Weiss, 1999).

Après trois jours d'infection, des états végétatifs sont visibles dans quelques cellules épithéliales. A 6 jours la plupart des cellules contiennent des états végétatifs et des spores mûres (Higes *et al.*, 2007). L'infection se développe en totalité dans l'intestin au bout de 10 – 12 jours après l'inoculation (Forsgren et Fries, 2010).

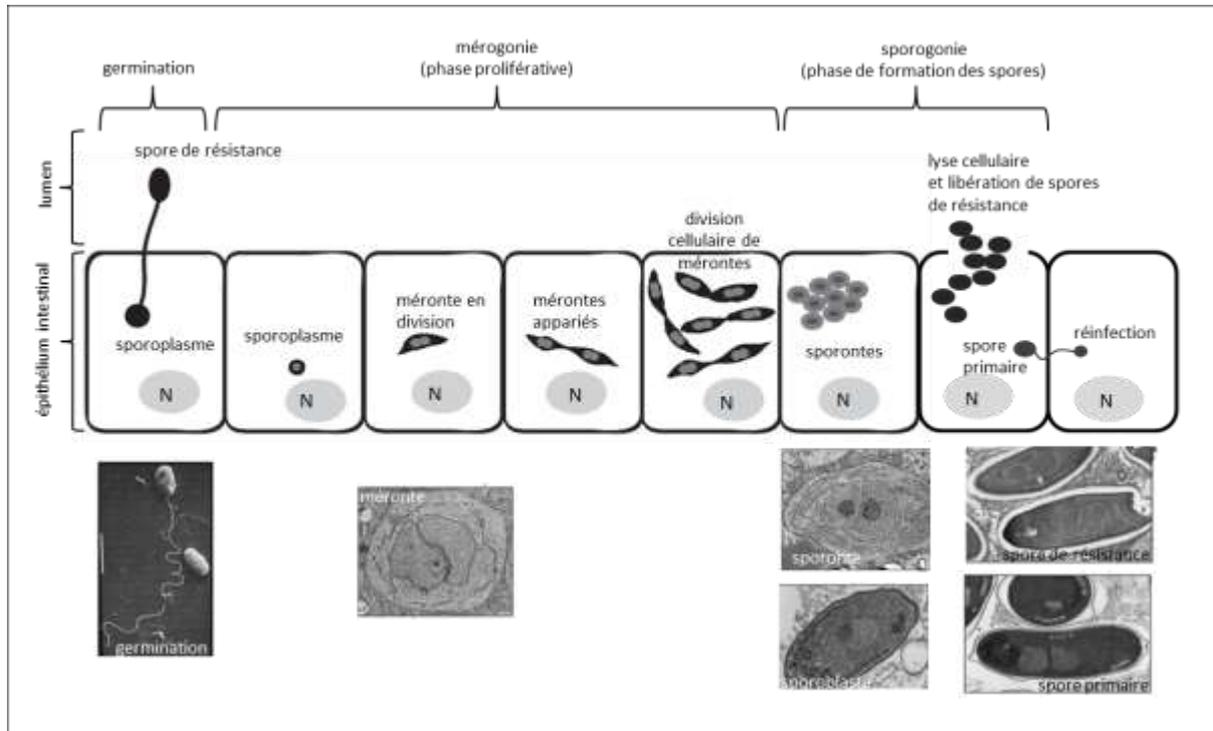


Figure 3. Cycle de vie de *N. ceranae* dans les cellules épithéliales de l'intestin de l'abeille (adapté de Gisder *et al.*, 2010 ; Solter, 2010).

Nosema ceranae est considéré comme un organisme tissu – spécifique qui se développe et se multiplie uniquement dans les cellules épithéliales de l'intestin (Fries *et al.*, 1996 ; Higes *et al.*, 2007). Or, la présence d'un signal de PCR dans d'autres tissus, comme les glandes hypopharyngiennes, salivaires et mandibulaires, les tubes de Malpighi, le corps gras et le sac à venin, la spermathèque et les ovaires des reines (Chen *et al.*, 2009 ; Copley et Jabaji, 2011 ; Traver et Fell, 2012), remet en question la spécificité et la forme de transmission du parasite (voir plus bas les voies de transmission). Ces observations restent à être confirmées par microscopie électronique ce qui permettra de mieux comprendre la présence inattendue du parasite dans ces tissus et la relation avec son cycle de vie.

Caractéristiques du génome

Avant 2009 la connaissance du génome de *N. ceranae* était limitée à certaines séquences de l'ARN ribosomal. La plupart des recherches sur les microsporidies correspondait à des séquences d'espèces

d'intérêt pour la santé humaine comme l'*Encephalitozoon cuniculi* et l'*Enterocytozoon bieneusi*. L'arrivée du pyroséquençage a permis la caractérisation rapide du génome de *N. ceranae* à un coût moins élevé que celui des techniques antérieures (Cornman *et al.* 2009).

En général, les microsporidies possèdent des petits génomes dont la taille ressemble plus à celle des procaryotes qu'à celle des eucaryotes (Cornman *et al.* 2009). La condensation et la réduction du génome sont liées à la dépendance qui caractérise les microsporidies de leurs hôtes étant parasites obligatoires intracellulaires (Texier *et al.*, 2010).

N. ceranae possède un génome biaisé AT (74%) extrêmement réduit (7.86 MB, 2614 gènes). Le génome contient des gènes conservés qui n'ont pas été détectés en dehors de ce phylum et qui pourraient être éventuellement associés à des facteurs de virulence, ce qui mérite des études complémentaires (Cornman *et al.*, 2009). Une partie importante du génome est dédiée aux différents niveaux de développement alors qu'une partie minime sert au transport et aux réponses aux stimuli chimiques. Cette caractéristique les éloignent des autres champignons et levures et reflète des adaptations suivies pendant leur évolution vers un cycle de vie à l'écart des variations environnementales et qui demandent une reproduction rapide. Une autre caractéristique liée à la forme de vie parasitaire est l'existence d'un groupe de gènes qui codifient des signaux peptidiques associés à des protéines sécrétoires qui peuvent interagir avec le tissu hôte. Actuellement, des recherches sont en cours de réalisation pour la description du génome de *N. apis*, ce qui révélera des caractéristiques corrélées au transfert d'hôte de *N. ceranae* et sa distribution rapide entre les colonies d'*A. mellifera* (Cornman *et al.*, 2009). Les microsporidies sont un modèle unique pour l'étude des effets hôte-parasite, comme pour la manipulation cellulaire, les interactions au niveau moléculaire et l'adaptation extrême à l'environnement intracellulaire. Cependant, une haute capacité de transformations génétiques d'origine inconnue (la transfection ou la reproduction sexuelle ont été proposées) c'est une contrainte pour leur utilisation comme modèles biologiques (Sagastume *et al.*, 2009 ; Williams, 2009).

Voies de transmission de *N. ceranae* chez *A. mellifera*

Des infections naturelles de *N. ceranae* ont été détectées dans les trois castes d'*A. mellifera*, les reines (Traver et Fell, 2012), les ouvrières (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007) et les mâles (Traver et Fell, 2011).

Il existe deux grands modes de transmission des pathogènes : la transmission horizontale et la transmission verticale. La transmission horizontale a lieu entre les individus d'une même génération, alors que la transmission verticale passe vers la descendance. Comparée avec la transmission

horizontale, la transmission verticale est sensée produire une sélection vers la diminution de la virulence du pathogène (Fries et Camazine, 2001). Dans ce cas, pour assurer sa transmission le parasite a besoin que son hôte se reproduise sans contrainte, donc le parasite a intérêt à ne pas affecter fortement la santé de son hôte ni sa capacité reproductive (Fries et Camazine, 2001). *Nosema ceranae* a une forme de transmission horizontale qui favoriserait le développement de la virulence du parasite. Cependant, des recherches récentes ont suggéré également la possibilité d'une transmission verticale (Traver et Fell, 2012).

L'infection se transmet lors des activités de nettoyage des fèces qui contiennent les spores de résistance (Higes *et al.*, 2010). Ce comportement est caractéristique des abeilles jeunes dédiées à maintenir un environnement propre en utilisant leurs structures buccales pour nettoyer le matériel à l'intérieur de la colonie (Winston, 1987) et qui ingèrent ainsi les spores. La trophallaxie est également un autre vecteur de transmission (Smith, 2012). Ce comportement correspond à l'échange de nourriture entre les abeilles et est probablement la voie d'infection des reines (Higes *et al.*, 2009) et des mâles qui sont essentiellement nourris par les ouvrières (Winston, 1987). Le miel, le pollen et la cire deviennent probablement contaminés pendant leur manipulation par les ouvrières lors de la récolte ou du stockage, ils constituent un réservoir de spores qui peut contribuer à leur transmission (Botías *et al.*, 2012b ; Higes *et al.*, 2008b) (Fig. 4).

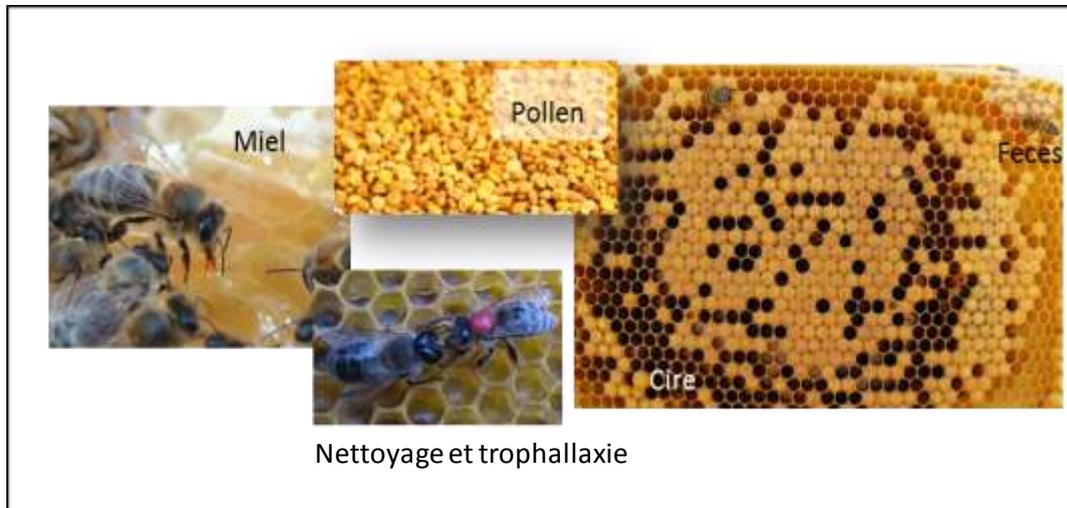


Figure 4. Sources et vois de transmission de spores de *N. ceranae* à l'intérieur de la colonie.

Dans le cas des insectes sociaux, les modes de transmission horizontale et verticale peuvent être divisés dans deux sous-groupes : « intra colonie » entre les individus d'une colonie, et « inter colonie » entre les individus des différentes colonies (Fig. 5). La transmission des spores entre colonies peut avoir lieu à travers la dérive, pillage ou essaimage.

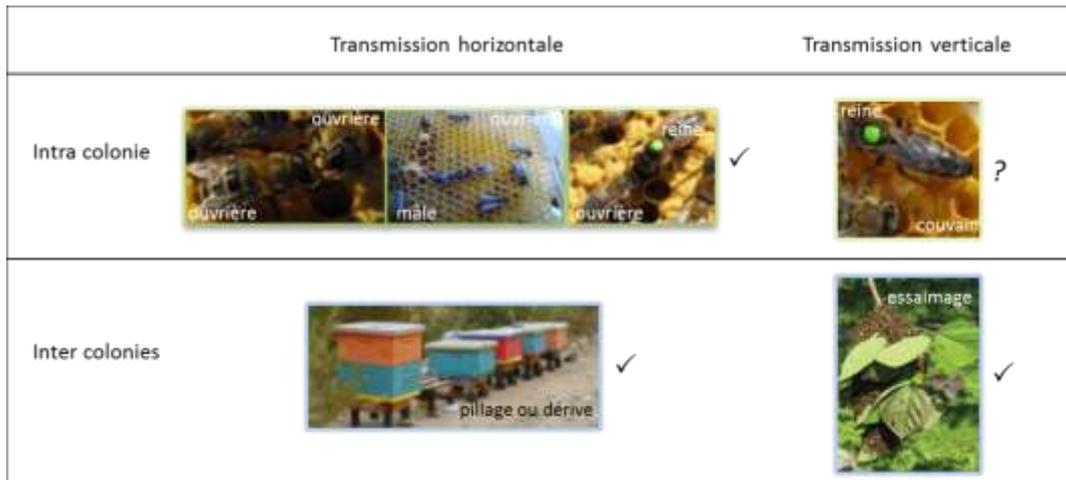


Figure 5. Différents modes de transmissions horizontales et verticales de *N. ceranae* dans des colonies d'*Apis mellifera* (basé sur Fries et Camazine, 2001).

La dérive est un comportement typique des ouvrières butineuses ou des mâles qui rentrent dans une colonie différente de celle d'origine, probablement dû à des problèmes d'orientation lorsque la densité des colonies dans un rucher est très élevée. Les mâles ont la tendance naturelle à dériver plus que les ouvrières pendant la recherche des endroits d'accouplement (Traver et Fell, 2011 ; Winston, 1987). Le pillage est déclenché par le manque de ressources mellifères qui stimule les ouvrières à voler le miel, qui peut contenir des spores (Botías *et al.*, 2012b), stocké dans des colonies étrangères (Winston, 1987). Les essaims sont formés par des abeilles ouvrières qui accompagnent une nouvelle reine lorsque la colonie d'origine est trop peuplée (Winston, 1987), avant de partir les ouvrières ont le réflexe de remplir leurs estomacs avec du miel, apportant ainsi les spores de *Nosema* avec elles.

Les mécanismes de défense de l'abeille à l'infection par *N. ceranae* au niveau individuel

Les mécanismes de défense des abeilles aux pathogènes, comme en général chez les animaux, comprennent deux stratégies principales : la résistance et la tolérance. La résistance s'exprime par la construction de barrières qui empêchent l'infection ou par l'activation de réponses de défense lorsque l'infection a eu lieu, alors que la tolérance vise à compenser le coût énergétique ou le dommage tissulaire provoqués par le pathogène ou par l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte (Evans et Spivak, 2010). Chez les insectes, les barrières sont la cuticule et les membranes épithéliales qui dans de nombreux cas évitent l'adhérence et l'entrée des microbes dans le corps. L'invasion par les microorganismes peut être également inhibée par des changements physiologiques de pH ou d'autres conditions chimiques de l'intestin de l'insecte (Evans et Spivak, 2010).

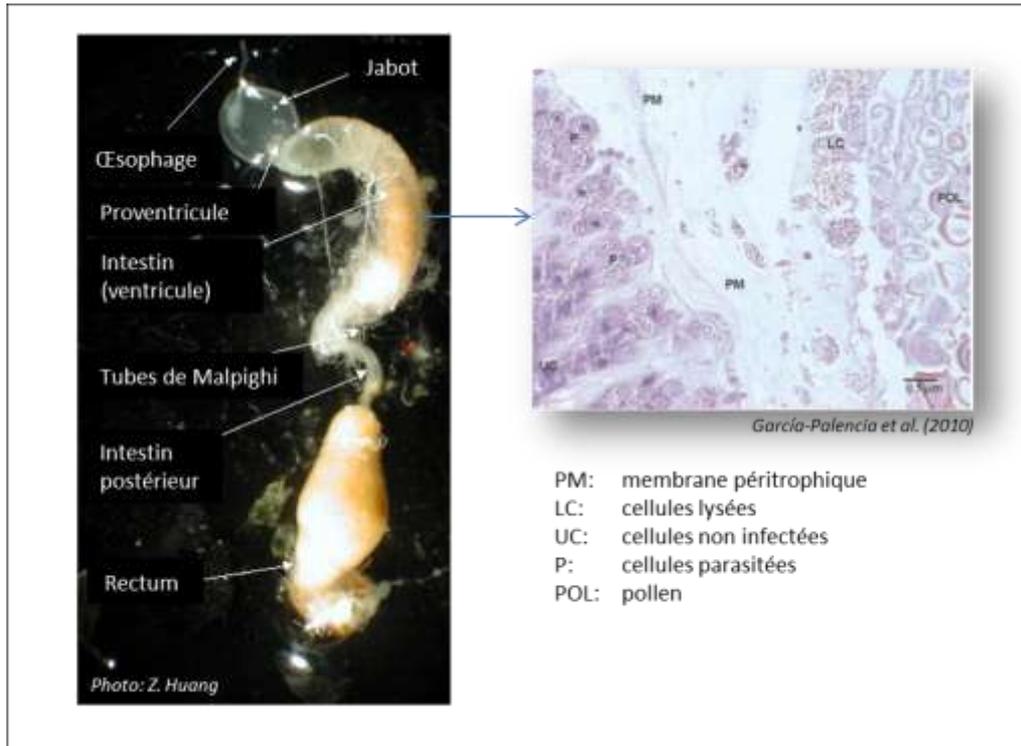


Figure 6. Système digestif de l'abeille et détails sur l'épithélium de l'intestin parasité par *N. ceranae*.

(i) Effets sur l'épithélium de l'intestin

Après la germination de la spore et l'introduction de son sporoplasme dans le cytoplasme de la cellule hôte, une série d'altérations morphologiques et physiologiques sont visibles dans les cellules de l'épithélium de l'intestin (Fig. 6). García-Palencia *et al* (2010) décrivent les lésions les plus importantes durant le développement et la multiplication du parasite :

- L'altération des membranes cellulaires, observée occasionnellement en dessous de la couche superficielle de l'épithélium de l'intestin.
- La lyse de cellules épithéliales, caractérisée par la présence de vacuoles dans le cytoplasme et par des agrégats de ribosomes et lysosomes.
- Le déplacement apical du noyau des cellules épithéliales, avec la présence de stades végétatifs ou de spores matures de *N. ceranae* dans des invaginations de la membrane nucléaire.
- La condensation ou réduction du noyau cellulaire, souvent associée à l'hyperchromatosis (la condensation irréversible de la chromatine dans le noyau des cellules qui suivent un processus de nécrose ou apoptose).

- L'absence de la membrane péritrophique, ou bien d'une structure fragmentée de celle-ci. Cette membrane est considérée analogue au mucus qui recouvre le lumen de l'estomac des vertébrés. Son rôle principal est de protéger les cellules épithéliales des lésions mécaniques dues à l'action abrasive des particules de nourriture. Son origine serait le délaminage des couches de cellules épithéliales de la partie apicale de l'intestin (Da Cruz Landim, 1985).

La préservation de la fonctionnalité de l'intestin semble être un facteur clé dans la capacité de l'abeille à contrebalancer l'augmentation des demandes énergétiques induites par le parasite (Aliferis *et al.*, 2012 ; Mayack et Naug, 2009), d'où l'intérêt d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes pathologiques de *N. ceranae* notamment les effets sur l'intestin.

(ii) La réponse du système immunitaire de l'abeille

Le système immunitaire des abeilles est activé lors de l'exposition à des blessures ou à des pathogènes. Evans *et al.* (2006) ont proposé que l'abeille, comme d'autres insectes, possède quatre voies moléculaires majeures interconnectées entre elles qui peuvent s'activer face à l'exposition à un parasite : Toll, Imd, Jak/STAT et Jnk. En général, ces voies consistent à (i) des protéines qui reconnaissent des signaux des parasites envahisseurs, (ii) des protéines qui modulent et amplifient le signal de reconnaissance, et (iii) des protéines ou métabolites qui sont impliqués directement dans l'inhibition du parasite. Ces voies moléculaires sont à la base des réponses immunitaires de type cellulaire et humorale (James et Xu, 2012). L'immunité humorale commence avec la reconnaissance d'un antigène tel qu'un parasite, ce qui déclenche la synthèse des différentes protéines antimicrobiennes (AMPs, antimicrobial peptides). Une réponse immunitaire localisée peut avoir lieu dans l'intestin des insectes par la production d'AMPs ou également par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species), molécules très réactives ayant une action antimicrobienne. La production de ROS (H_2O_2 , O_2^- , ou OH^\bullet entre d'autres molécules) a lieu dans les cellules par différentes voies comme par exemple la respiration cellulaire. Ces molécules assez réactives peuvent aussi endommager les cellules, c'est pourquoi l'organisme possède des mécanismes antioxydant (Cadet *et al.*, 2005). La production de ROS dans l'intestin est extrêmement rapide ce qui lui confère une fonction de première barrière contre l'invasion microbienne. Au contraire, pour la plus parts des insectes les AMPs ne sont pas efficaces dans le contrôle des champignons entomopathogènes. L'immunité cellulaire implique la reconnaissance du pathogène suivie par la phagocytose (virus et bactéries), la nodulation (champignons et quelques bactéries) et l'encapsulation (parasites multicellulaires). La phagocytose est accompagnée par la production de mélanine et la mélanisation de nodules ou capsules. La voie de mélanisation est activée par les hémocytes et

déclenche la cascade de phénoloxydase (enzyme terminal du processus de mélanisation); la mélanisation peut induire également la production de ROS (James et Xu, 2012).

Il a été observé au niveau moléculaire (Antúnez *et al.*, 2009) et biochimique (Alaux *et al.*, 2010a) que l'infection par *N. ceranae* n'active pas la voie de mélanisation, et inhibe l'expression des gènes d'AMPs (hymenoptaecin et abaecin) (Antúnez *et al.*, 2009, Chaimanee *et al.*, 2012), au contraire de *N. apis* (Antúnez *et al.*, 2009). En revanche, d'autres études ont montré l'activation du système immunitaire par la surexpression des gènes des voies moléculaires Toll, IMD et Jak/STAT chez des abeilles sélectionnées pendant longtemps pour leur tolérance à *N. apis* (Huang *et al.*, 2012).

L'abeille possède un nombre réduit de gènes d'immunité individuelle comparé à d'autres insectes non-sociaux. Une des hypothèses qui pourrait expliquer une telle diminution est liée à l'efficacité des barrières sociales que possèdent les abeilles domestiques pour se défendre des pathogènes, alors que les insectes non sociaux comptent uniquement sur l'immunité individuelle (Evans *et al.* (2006).

La connaissance des mécanismes qui sont à la base du système de défense de l'abeille est actuellement très limitée. Cette carence est particulièrement évidente lorsque nous voulons expliquer les effets de *N. ceranae* sur la survie et les comportements des abeilles.

Les mécanismes de défense de l'abeille à l'infection par *N. ceranae* au niveau social

En plus des mécanismes de défense individuels, les abeilles possèdent également des mécanismes collectifs pour limiter les impacts des microorganismes pathogènes. Les réponses d'immunité individuelle sont renforcées lorsque les comportements de la communauté sont coordonnés, ce qui a comme résultat une réponse immune au niveau colonial. Le mécanisme de défense collective contre les parasites qui résulte de la coopération entre les individus se dénomme « immunité sociale » (Evans et Spivak, 2010).

Parmi les comportements d'immunité sociale le transport des abeilles adultes mortes hors de la colonie contribue à réduire le contact des autres individus avec de potentiels pathogènes (Evans et Spivak, 2010). Egalement l'auto-expulsion altruiste des individus malades est sensée être un comportement des abeilles face aux infections comme celle de *N. ceranae* qui permettrait la diminution de l'inoculum dans la colonie (Rueppell *et al.*, 2010). Le polyéthisme d'âge (division des tâches selon l'âge), peut rendre plus vulnérable à une maladie des groupes spécialisés dans certaines

tâches plus risquées comme le butinage. Cependant la concentration de la maladie dans ce groupe servirait de barrière à la transmission du parasite lorsque ce groupe meurt à l'extérieur de la colonie (Evans et Spivak, 2010). Par exemple, les butineuses infectées par *N. apis* butinent plus précocement que les abeilles saines, ce qui aiderait à réduire la transmission de l'infection au sein de la colonie puisque les butineuses meurent à l'extérieur du nid (Wang and Möeller, 1970).

Cependant, certains mécanismes d'immunité sociale qui aident à la diminution de parasites comme *Varroa destructor* (acararien macro parasite), *Acarapis woodi* (acararien des trachées) et de maladies du couvain (Evans et Spivak, 2010), ont été signalés comme des comportements qui peuvent augmenter la transmission d'autres parasites (Schmid-Hempel, 1998). Par exemple, le comportement de toilettage, par lequel les abeilles éliminent des particules et parasites en se nettoyant leur surfaces individuellement ou les unes aux autres, est efficace pour l'élimination de *V. destructor* et *A. woodi*, mais lorsque le toilettage implique l'utilisation des parties buccales (Evans et Spivak, 2010), il pourrait entraîner l'échange de sécrétions entre les abeilles avec un effet similaire à la trophallaxie. Smith (2012) récemment a démontré le potentiel de la trophallaxie comme voie de transmission de *N. ceranae*. Un autre comportement social dénommé «fièvre comportementale» observé chez des abeilles infectées par *N. ceranae* semble également favoriser le parasite (Campbell *et al.*, 2010). La fièvre comportementale est une réponse commune des animaux face à une infection qui dans presque tous les cas sert à la défense de l'hôte et qui consiste à élever la température corporelle de l'individu. Cependant, l'augmentation de la température à l'intérieur de la colonie dans le cas de *N. ceranae* favorise son développement au lieu de le restreindre (Martín-Hernández *et al.*, 2009).

Les connaissances actuelles sur l'immunité sociale des abeilles face à l'infection par *N. ceranae* laissent plusieurs questions ouvertes. Notamment, les mécanismes physiologiques à la base de l'immunité sociale, probablement manipulés par le parasite, sont très peu connus. De même, les interactions entre les individus des différents castes et âges, qui dans des conditions normales régulent l'organisation de la colonie, sont probablement modifiées par le parasite. L'influence de l'environnement est également très importante dans le scénario d'une colonie malade, car c'est la source de nutriments dont la qualité est fondamentale pour renforcer le système immunitaire (Alaux *et al.*, 2010b) et pour contrebalancer le stress énergétique dû par exemple à *N. ceranae* (Mayack and Naug, 2009). Le pollen représente aussi une source de microbes avec des effets protecteurs bénéfiques pour l'abeille (Mattila *et al.*, 2012). Dans le même sens, Porrini *et al* (2011) ont démontré que la réponse à l'infection dépend de l'état nutritionnel et physiologique de l'hôte, qui dépend à la fois non pas de la quantité mais de la qualité des nutriments.

Dans le chapitre 2 (article n°1 et 2) nous revenons sur la compréhension du rôle de l'immunité sociale dans la prévention de la transmission de *N. ceranae* et décrivons les mécanismes phéromonaux qui sont à la base de ces comportements, dans le but d'expliquer la relation entre le parasitisme de *N. ceranae* et la disparition des abeilles lors du phénomène d'effondrement des colonies (vanEngelsdorp *et al.*, 2009).

Effets de *N. ceranae* sur le comportement de l'abeille

La dépendance énergétique de *N. ceranae* à son hôte est associée à des changements de comportements observés chez l'abeille. Une consommation élevée de ressources sucrées a été mise en évidence par Alaux *et al.* (2010a) et Vidau *et al.* (2011) chez les abeilles parasitées par *N. ceranae*. Mayack et Naug (2009) ont montré que les abeilles infectées avec un accès *ad libitum* au sucrose avaient une survie similaire aux abeilles non infectées, ce qui révélait la capacité des abeilles de contrebalancer le stress énergétique par la surconsommation des carbohydrates. Naug et Gibbs (2009) ont observé que les abeilles parasitées présentent une altération du comportement de trophallaxie car elles reçoivent de la nourriture mais, par contre, elles sont moins disposées à en donner aux autres, ce qui serait dû à l'état de faim des abeilles infectées. D'autres comportements liés également au stress énergétique ont été décrits par Karlj et Fusch (2010) tels que des problèmes d'orientation et de réduction de la capacité de vol.

Un butinage précoce et plus intense a été décrit chez les abeilles infectés par *N. apis* (Hasein, 1953 ; Lin *et al.*, 2009 ; Wang and Möeller, 1970 ; Woyciechowski et Kozlowski, 1998 ; Woyciechowski et Moron, 2009), à l'exception de l'étude de Mattila et Ottis (2006) mais ces auteurs n'ont pas vérifié le succès de l'infection des abeilles. D'autres effets sur les comportements des abeilles, notamment la perte des capacités d'orientation, de vol, et d'apprentissage, ont été observés lors du macro-parasitisme de l'acarien *V. destructor* (Kralj et Fuchs, 2006), du virus du couvain en sac «SBV, sacbrood virus », (Bailey et Fernando, 1972) ou du virus des ailes déformées «DWV, deformed wing virus » (Iqbal et Mueller, 2007).

Le comportement de butinage, et en général tous les comportements qui font partie du polyéthisme d'âge (division temporelle de tâches selon l'âge) qui caractérise les abeilles, sont sous le contrôle de facteurs génétiques et de l'environnement. Ainsi, les abeilles adaptent la répartition de tâches en réponse aux conditions de la colonie et de l'environnement (Winston, 1987). Le passage d'une tâche à l'autre comprend un changement physiologique, qui est lié au processus de maturation de l'abeille. Cependant il existe une plasticité importante qui permet aux abeilles de reprendre une tâche malgré son âge (Winston, 1987).

Les changements physiologiques à la base du polyéthisme d'âge sont gérés au niveau individuel par des hormones et au niveau social par des phéromones. C'est le cas de la répartition des tâches réalisées à l'intérieur de la ruche par les abeilles jeunes « nourrices » et les activités développées à l'extérieur de la ruche par des abeilles âgées « butineuses » (Winston, 1987). Parmi les hormones, l'hormone juvénile III (JH: juvenile hormone) et la vitéllogénine (Vg) sont impliquées dans la transition de nourrice à butineuse (Winston, 1987). La JH est produite par les *corpora allata*, une paire de glandes sécrétrices localisées à proximité du cerveau (Sullivan *et al.*, 2000). Le taux de JH augmente avec l'âge des abeilles, mais aussi au fur et à mesure qu'elles mûrissent (Robinson, 1987). La Vg est une hormone produite dans le *corps gras* des abeilles, qui correspond à un tissu lâche localisé le long du corps principalement en dessous du tégument des abeilles. Le corps gras possède une fonction endocrine en plus d'autres fonctions, comme le stockage et l'utilisation de nutriments (Arrese et Soulages, 2010). La Vg participe à l'inhibition de la maturation des abeilles ouvrières, et est sensée interagir avec la JH en s'inhibant réciproquement (Page et Adam, 2007). Ainsi, au fur et à mesure que les ouvrières mûrissent, les taux de Vg diminuent et ceux de la JH augmentent. Également l'octopamine, une neuro-hormone qui se trouve en plus forte quantité dans les lobes antennaires des butineuses que dans ceux des nourrices, participe aux mécanismes de maturation comportementale (Schulz et Robinson, 2001). La perturbation des taux d'hormones pourrait être à la base des changements de comportements observés lors de l'infection avec *N. ceranae*. En effet, chez les abeilles parasitées Antúnez *et al.* (2009) ont observé la sous-expression du gène de la Vg et Ares *et al.* (2012) ont constaté un niveau plus bas de JH. De façon similaire, Huang et Lin (2004) ont montré que des abeilles infectées par *N. apis* présentaient un niveau de JH moins élevé associé à un comportement de butinage précoce comparé aux abeilles non infectées.

La transition de nourrice à butineuse est régulée également par quatre phéromones : la phéromone du couvain (BEP : brood ester pheromone) produite par le couvain âgé (Le Conte *et al.*, 2001, 2006 ; Pankiw, 2004), la (E)- β -ocimène produite par le couvain jeune (Maisonnasse *et al.*, 2010a, b), la phéromone mandibulaire de la reine (QMP : queen mandibular pheromone) (Pankiw, 1998) et l'oléate d'éthyle (EO : ethyl oleate) produite par les butineuses (Leoncini *et al.*, 2004). Alaux *et al.* (2011) ont montré des modifications dans le taux des composés de la QMP chez des reines infectées par *N. ceranae*. Par exemple, un taux de QMP plus élevé pourrait être associé à la qualité reproductive de la reine. En effet, il a été observé que des reines inséminées avec le sperme d'un seul mâle avaient des niveaux plus élevés de QMP, comparé à des reines inséminées avec le sperme de plusieurs mâles. Ce dernier cas est plus proche de ce qui se passe dans la nature. De plus, les reines avec un taux plus important de QMP sont moins attractives pour les ouvrières (Richard *et al.*, 2007).

Effets de *N. ceranae* sur l'état nutritionnel et énergétique de l'abeille

Les microsporidies capturent l'ATP de l'environnement cellulaire de leurs hôtes. Elles ne possèdent pas de mitochondries mais un organe réduit dénommé « mitosome » qui au cours de l'évolution a perdu la fonction de respiration cellulaire (Williams, 2009). C'est pourquoi, pendant leur développement et la multiplication intracellulaire, *N. ceranae*, comme d'autres parasites du même groupe, sont entourés par des mitochondries de la cellule hôte ce qui faciliterait l'acquisition d'ATP (Higes *et al.*, 2007) (Fig. 7). Pour d'autres microsporidies, il a été suggéré un libre passage d'ATP de la cellule hôte vers la surface du parasite où des transporteurs amèneraient l'ATP à l'intérieur du parasite. Ce mécanisme a été observé grâce au séquençage du génome d'*E. cuniculi* (microsporidie parasite de l'homme) qui code pour des protéines qui se placent sur la membrane cellulaire et transportent l'ATP présent dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il a été proposé que la proximité nécessaire pour le passage d'ATP entre le parasite et la mitochondrie est basée sur un lien protéinique. Un mécanisme similaire est aussi peut-être responsable du rapprochement du parasite aux mitochondries (Williams, 2009). Les microsporidies ont conservé la voie glycolytique pour la production d'énergie à partir des carbohydrates qui doit être complémentaire à l'acquisition d'ATP (Weidner *et al.*, 1999). La glycolyse est sensée être la source d'énergie permettant la germination de la spore qui n'a pas de nutriments stockés. Des concentrations très élevées de tréhalose et l'activité de l'enzyme tréhalase qui transforme le tréhalose en glucose ont été détectées dans les spores de *N. apis* (Weidner *et al.*, 1999).

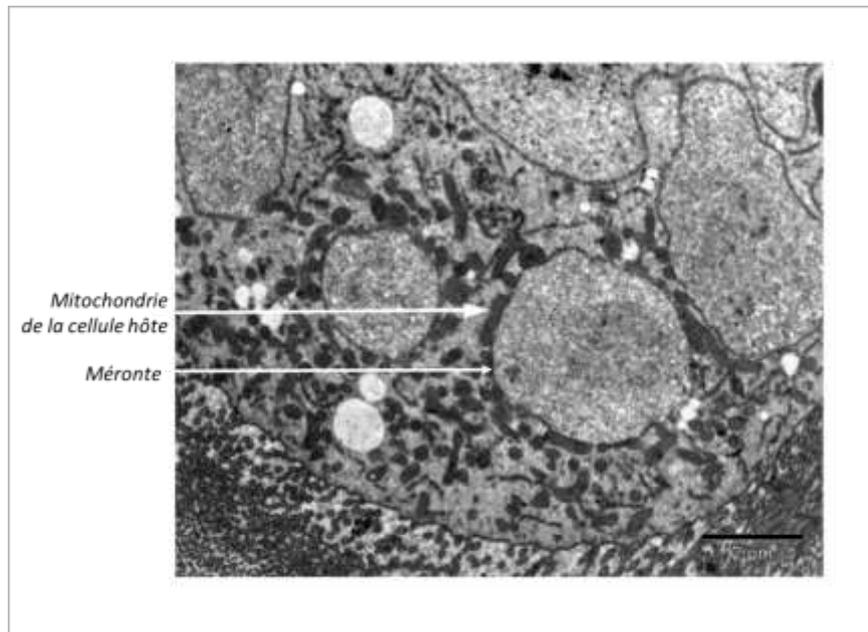


Figure 7. Emplacement de *N. ceranae* « méronte » entouré par des mitochondries dans le cytoplasme de la cellule hôte, d'où il tire l'énergie sous forme d'ATP (basé sur Higes *et al.*, 2007).

Les perturbations de la composition biochimique des tissus par les parasites intracellulaires sont de grande importance car souvent ces derniers altèrent le contenu cellulaire en électrolytes, carbohydrates, protéines et acides aminés libres. Egalement, les changements dans l'environnement cellulaire de l'hôte dus au parasitisme peuvent influencer à leur tour les activités métaboliques du parasite (Weidner *et al.*, 1999). Récemment Aliferis *et al.* (2012) ont étudié le profil métabolique dans l'hémolymphe des abeilles infectées par *N. ceranae*. Ils ont observé une diminution générale des réserves d'acides aminés dans l'hémolymphe peut-être due à un compromis avec les mécanismes de défense (production d'AMPs, augmentation du stress oxydatif). Il pourrait s'agir également de la réduction de la biosynthèse d'acides aminés dans le corps gras de l'abeille dû à des changements physiologiques ou à l'utilisation des acides aminés par *N. ceranae* dans son métabolisme. Egalement, il a été suggéré que la perte de l'homéostasie des carbohydrates présents à des niveaux très faibles dans l'hémolymphe, pourrait être à la base de la perte des capacités de vols des abeilles parasitées. Dans l'étude d'Aliferis *et al.* (2012), un des carbohydrates dont la concentration était la plus élevée était le glucose. Cette concentration élevée a été attribuée au fait d'avoir analysé des abeilles au repos. Mayack et Naug (2010), ont observé des niveaux de glucose faibles chez des abeilles qui revenaient de butiner et donc avaient dépensé le glucose comme énergie pour le vol.

Mortalités d'abeilles liées à *N. ceranae*

La virulence d'un parasite peut être définie comme le degré auquel l'infection fait diminuer la reproduction et la survie de son hôte (Fries et Camazine, 2001). Dans le cas de *N. ceranae*, des études montrent des degrés opposés de virulence chez l'abeille (Carreck, 2012). Ces différences ont été observées dans des conditions de laboratoire (Alaux *et al.*, 2010a; Forsgren et Fries, 2010; Higes *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2009; Suwannapong *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011) tout comme dans des conditions naturelles (Chauzat *et al.*, 2010 ; Borneck *et al.*, 2010 ; Gisder *et al.*, 2010 ; Higes *et al.*, 2008a ; vanEgelsdorp *et al.*, 2009). D'une part la préférence de *N. ceranae* pour les conditions climatiques de certaines régions pourrait expliquer la diversité des résultats (Fenoy *et al.*, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2009), d'autre part, des facteurs génétiques du parasite et de l'hôte pourraient aussi être à la base de ces différences (Chen *et al.*, 2009 ; Genersch, 2010 ; Huang *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2008). Des interactions avec d'autres facteurs pourraient également conduire à des différences de mortalité, par exemple, l'interaction de *N. ceranae* avec des pesticides présents dans l'environnement (Alaux *et al.*, 2010a, Pettis *et al.*, 2012) ou l'interaction entre *N. ceranae* et le paysage qui apporte aux abeilles un régime moins riche en ressources mellifères qui peut rendre les abeilles plus susceptibles au parasite (Porrini *et al.*, 2011). Dans ce contexte, le chapitre 4 contribue à mieux comprendre la diversité d'effets de *N. ceranae* chez l'abeille.

Tableau 1. Mortalité des abeilles infectées expérimentalement avec des spores de *N. ceranae*, et élevées au laboratoire.

Type d'abeille	% mortalité	Jours à la mortalité	Dose infectieuse (spores par abeille)	Âge à l'infection	Alimentation	Référence
<i>A. mellifera</i>	< 22	14	100 1 000 10 000	Adultes	Sirop du sucre	Forsgren et Fries (2010)
<i>A. m. ligustica</i> x <i>A. m. mellifera</i>	30	10	200 000	1 jour	Pollen Candy (sucre et miel) Sirop	Alaux <i>et al.</i> (2010a)
<i>A. mellifera</i>	44	15	100 000	Adultes du nid	Sirop du sucre	Paxton <i>et al.</i> (2007)
<i>A. florea</i>	50	16	10 000	2 jours	Sirop Pollen	Suwannapong <i>et al.</i> (2010)
	50	14	20 000			
	50	14	40 000			
<i>A. ceranae</i>	50	14	10 000	2 jours	Sirop Pollen	Suwannapong <i>et al.</i> (2011)
	65	14	20 000			
	65	14	40 000			
<i>A. m. iberiensis</i>	11	7	1 000	5 jours	Sirop Promotor L ^{®2}	Martín-Hernández <i>et al.</i> (2011a)
	20		10 000			
	67		50 000			
	93		100 000			
<i>A. mellifera</i>	25	10 à 12	(46 000 230 000 1 150 000) ¹	7 jours	Sirop + pain de pollen Sirop+Apipromotor ^{®3}	Porrini <i>et al.</i> (2011)
	65					
	70					
Buckfast x <i>A. m. mellifera</i>	50	20	125 000	5 jours	Sirop Pollen Candy (Apifonda ^{®4}) Sirop	Vidau <i>et al.</i> (2011)
<i>A. m. iberiensis</i>	100	7	125 000	5 jours	Promotor L [®]	Higes <i>et al.</i> (2007)
<i>A. m. iberiensis</i>	100	21	100 000 ⁵	1 jour	Promotor L [®]	Higes <i>et al.</i> (2008b)

n.d.: no data; ¹ pas d'effet de la dose infectieuse ; ^{2,3} vitamines et acides aminés ; ⁴ sucre ; ⁵ infection en groupe.

Dans des conditions de laboratoires, les différents protocoles utilisés rendent difficile l'interprétation des résultats sur la mortalité des abeilles infectées avec *N. ceranae* (Tab. 1). *A priori* trois facteurs pourraient jouer sur la mortalité. La dose de spores pour l'infection dans le cas de Martín-Hernández *et al.* (2011) cause des différences de mortalité. Egalement, Forsgren et Fries (2010) ont observé que des doses plus faibles que 10 000 spores par abeille n'affectent pas la totalité des abeilles (à 14 jours après l'infection). Au contraire Porrini *et al.* (2011) n'ont pas observé d'effet dose. L'âge des abeilles (Malone *et al.*, 1996 ; Woyciechowski and Moron, 2009) et l'alimentation (Alaux *et al.*, 2010b) sont deux facteurs qui peuvent rendre les abeilles plus au moins susceptibles à l'infection.

Le développement de l'infection par *N. ceranae* au niveau de la colonie

Les pics d'infection de *N. ceranae* sont sensés varier selon les climats (Fig. 8). Sous des climats tropicaux et sub-tropicaux, il a été identifié un seul pic de *N. ceranae* pendant l'hiver (Chen *et al.* 2012). Tandis que sous des climats tempérés le pic apparaît entre le printemps et le début de l'été et parfois à l'automne (Oliver, 2011). En Allemagne *N. ceranae* présente deux pics d'infection, au printemps et en automne (Gisder *et al.*, 2010). En Espagne *N. ceranae* est présent pendant toute l'année (Martín-Hernández *et al.*, 2012), et les colonies infectées ont des niveaux d'infection qui évoluent avec la progression de la maladie. Ainsi, les colonies qui vont succomber ont un pic d'infection pendant l'automne (Higes *et al.*, 2008a). Sous des climats tropicaux et sub-tropicaux, la charge de spores est corrélée négativement avec la température moyenne (Chen *et al.* 2012). Cette adaptation de *N. ceranae* à la température a été également observée par Martín-Hernández *et al.* (2009). En Suisse le niveau d'infection de *N. ceranae* permet de prédire la survie des colonies. En effet, les colonies avec des niveaux plus élevés de *N. ceranae* en automne ont une de probabilité de survie plus élevée au cours de la saison suivante (Dainat *et al.*, 2012b). De façon similaire, une survie plus élevée accompagnée par un plus fort taux de spores *N. ceranae* ont été observés par Porrini *et al.* (2011) chez des abeilles infectées nourries avec un régime riche en pollen.

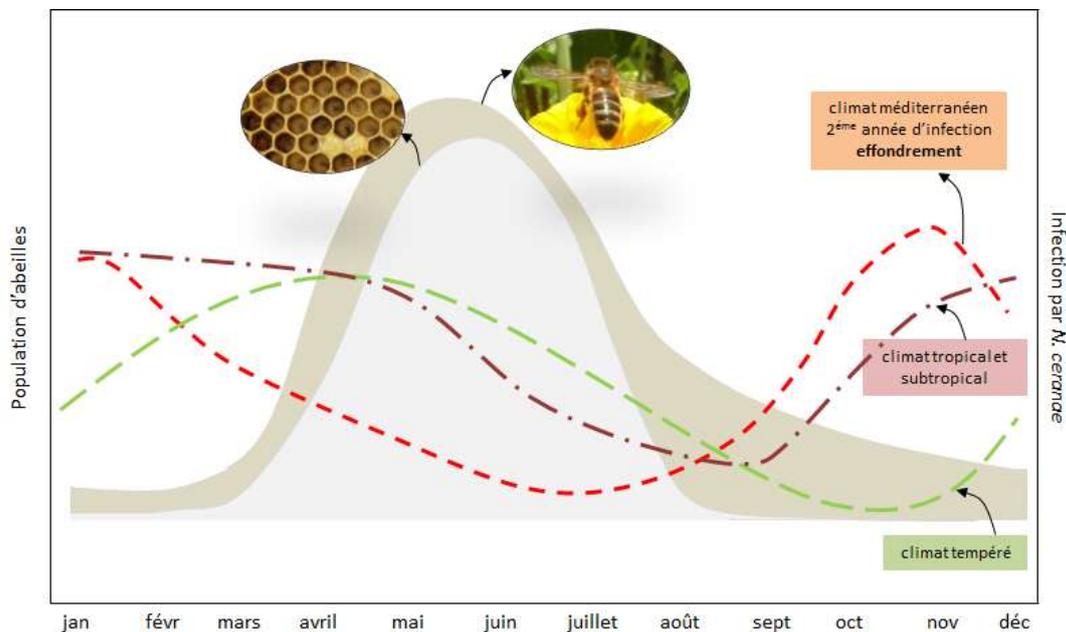


Figure 8. Variations régionales du développement de l'infection de *N. ceranae* chez *A. mellifera* au cours du temps. Trois courbes de développement de *N. ceranae* en fonction de la date sont représentées : en rouge la courbe d'une colonie en voie d'effondrement typique en Espagne (climat de type méditerranéen) ; en vert la courbe d'une colonie sans risque d'effondrement en Allemagne (climat de type tempéré) ; en marron la courbe d'une colonie sans risque d'effondrement à Taiwan (climat de type tropical – subtropical). En fond, un exemple de la dynamique de la population des abeilles d'une colonie pour un climat avec des hivers froids, abeilles adultes (aire en gris foncé) et couvain (aire en gris clair) (adapté de Higes *et al.*, 2008a ; Chen *et al.*, 2012 ; Gisder *et al.*, 2010).

La variation de température n'est sûrement pas la seule explication des différences dans les pics de *N. ceranae* (Chen *et al.* 2012). Les changements physiologiques et comportementaux pendant les saisons notamment avant l'hiver (Winston, 1987), ainsi que la dynamique de la population d'abeilles adultes et du couvain, doivent probablement influencer le développement de l'infection et la capacité de la colonie de contrebalancer l'infection (Khouri *et al.*, 2011).

Hypothèse générale et objectifs

Notre **hypothèse générale** place *N. ceranae* comme un pathogène capable d'induire des changements comportementaux chez *A. mellifera* dus à des altérations physiologiques, ce qui pourrait perturber l'organisation sociale des abeilles et aboutir à la mort de la colonie.

Pour répondre à cette hypothèse, trois **objectifs principaux** ont été définis correspondant aux axes principaux de cette thèse. D'abord, nous avons **cherché des effets de *N. ceranae*** sur la perturbation de l'organisation sociale de la colonie. L'approche choisie a été l'étude des taux de la phéromone oléate d'éthyle (EO) dans des abeilles parasitées, couplée à l'observation du comportement de butinage.

Ensuite, nous avons poursuivi nos recherches à travers l'**exploration des mécanismes physiologiques** à la base des effets observés chez les abeilles parasitées. Nous avons abordé cette étude à deux niveaux : transcriptomique et biochimique, focalisés sur l'intestin qui est l'organe cible du parasite.

Le dernier objectif était la **mise en évidence de différences entre deux isolats de *N. ceranae*** provenant d'origines géographiques variées, pouvant être à la base de différents degrés de virulence, et donc, de la variation des effets du parasite. Pour atteindre cet objectif nous avons conduit une étude de la variabilité génétique de deux isolats de *N. ceranae* et nous avons observé le développement de l'infection.