

Développement d'un clone du DWV par recombinaison homologue en levure

Les virus de l'abeille, bien que répandus et de plus en plus étudiés en cagette et *in situ*, ne sont cependant que très peu voire pas du tout étudiés *in vitro*. Approfondir les connaissances encore parcellaires sur les mécanismes d'infection pourrait permettre d'affiner nos études de co-expositions. Les clones moléculaires de virus peuvent être utilisés comme des outils de génétique inverse pour mieux étudier ces mécanismes, leurs génomes et les protéines qu'ils produisent. Le génome du CBPV a été cloné récemment par Ibrahim Youssef lors de sa thèse au laboratoire de l'Anses Sophia Antipolis, ce qui lui a permis d'étudier plus en détails notamment les ORF présents sur ce génome (Youssef, 2016).

De plus, la plupart des infections virales chez l'abeille sont étudiées en utilisant des *inocula* extraits à partir d'échantillons d'abeilles infectées naturellement. Cependant, compte tenu de la relative proximité génétique et structurale des principaux virus qui infectent l'abeille domestique (DWV, BQCV, le complexe AKI, et SBV par exemple sont tous des virus de l'ordre *Picornavirales*) il est extrêmement difficile même en passant par une étape de purification d'être sûr de n'inoculer que le virus étudié. Dès lors, le développement d'un outil permettant une production constante de souches spécifiques à chaque variant, multipliées *in vitro*, peut permettre d'obtenir des inocula purs du virus d'intérêt, de diminuer les biais dûs à des infections multiples, et d'augmenter la répétabilité des expériences.

Dans le cas du DWV, un clone infectieux du DWV-A a déjà été développé par Lamp et al., 2016. Nous avons ici utilisé une autre technique avec une ligation par passage en levures d'après Desbiez et al., 2012, et produit des clones infectieux d'une souche locale de DWV-A, ainsi que d'un recombinant DWV-A/B (Dalmon et al., 2017). De plus, nous avons tenté de fabriquer des clones permettant d'être directement inoculé aux nymphes sans passer par une étape de transcription *in vitro*, ce qui n'est pas le cas des clones cités. Les résultats obtenus lors de ce développement d'un clone et des tests d'infectiosité qui ont suivi sont présentés sous forme d'article en prévision d'une valorisation scientifique. Cependant cet article devra être complété par des expériences ultérieures avant soumission à un journal pour publication. En effet, pour cause de contraintes réglementaires, un délai a été imposé avant de pouvoir effectuer les expériences et tester l'infectivité des clones, ce qui n'a pas permis d'aller

jusqu'au bout de nos essais pour l'instant. Le développement et les premiers tests effectués sont cependant importants, car il n'existe à ce jour qu'un seul clone du DWV décrit dans la littérature(Lamp et al., 2016)(Lamp et al., 2016).

Article 4:

Construction of a cDNA clone of *Deformed wing virus-A* and an A/B recombinant (genus *Iflavirus*, family Iflaviridae)

M. Coulon ^{a, b}, C. Desbiez ^c, B. Moury ^c, C. Alaux ^a, Y. Le Conte ^a, M. Ribière-Chabert ^b, R. Thiéry ^b, E. Dubois ^b, A. Dalmon ^a

^a INRA PACA, UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc, F84914 Avignon, France

^b ANSES Sophia Antipolis, Unit of Honeybee Pathology, 105, route des Chappes, F06902 Sophia Antipolis, France

^c INRA PACA, UR 407 Pathologie végétale, F-84143 Montfavet, France

Corresponding author: anne.dalmon@inra.fr

1. Introduction

Over the last decades, a great decline of pollinators has been recorded (S. G. Potts et al., 2010a; van der Sluijs et al., 2013). These losses are now attributed to diverse factors, of which the most studied are the loss of habitats, global warming, decreasing availability in food resources, pesticide use, and pathogens (Goulson et al., 2015). Domestic honeybee colony losses have been recorded, and can be considered as a bio-indicator of the state of other pollinators species in the world (Goulson and Nicholls, 2016; Laurent et al., 2015), for which losses are harder to evaluate. Among pathogens that are harmful to honeybees, *Deformed wing virus* (DWV) is one of the most prevalent, present in 97% of tested apiaries in France (Tentcheva et al., 2004), 91% in Austria (Berényi et al., 2006) and 72% in Hungary (Forgách

et al., 2008). DWV has been shown to be easily transmitted to wild pollinators such as bumblebees through pollen (Singh et al., 2010) or even wasps (Evison et al., 2012). Spillover of DWV infection from honeybee managed colonies to wild populations have already been observed and are considered an additional risk of stress to these wild pollinators (Fürst et al., 2014; Kojima et al., 2011; Manley et al., 2015; Tehel et al., 2016).

This underlines the importance of studying DWV, not only as a harmful pathogen of the domestic honeybee, but also of a broader range of pollinators, and of understanding its infection mechanisms and cellular processes in diverse species. DWV is a single-strand positive-sense RNA virus, of the genus *Iflavirus* and the family *Iflaviridae* of the *Picornavirales* order. The *Picornavirales* gathers many of the honeybee viruses, such as *Black queen cell virus* (BQCV), which is also an *Iflavirus*, and also *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Kashmir bee virus* (KBV) and *Israeli acute paralysis virus* (IAPV), which are from the family *Dicistroviridae*. DWV gathers a number of viral groups (de Miranda and Genersch, 2010), of which the most widespread are the regular DWV reference DWV-A, and DWV-B, formerly called VDV-1 (for *Varroa destructor virus 1*) (Mordecai et al., 2016, 2015). Both groups include large numbers of variants and recombinants between them have been documented (Dalmon et al., 2017; Moore et al., 2011; Ryabov et al., 2014; Zioni et al., 2011). DWV virions do not possess an envelope and the capsid is icosahedric. DWV genome is about 10 kb long, and possesses a long Untranslated Region (UTR) at the 5' extremity, another one shorter but very conserved at 3', as well as a poly (A) tail. In between, a single large open reading frame codes for only one polyprotein that is later cleaved into 3 major structural proteins at the N-terminal extremity (VP1 44kDa ; VP2 32 kDa ; VP3 28 kDa), and 3 non-structural proteins that are known to take part in viral replication of picorna-like viruses are located in the C-terminal extremity (helicase, chymotrypsin-like 3C protease, RdRp (RNA dependent RNA polymerase) (de Miranda and Genersch, 2010; Lanzi et al., 2006; Škubník et al., 2017).

DWV is strongly associated with overwintering colony losses in honeybees (Dainat et al., 2012a; de Miranda and Genersch, 2010; Desai and Currie, 2016; Francis et al., 2013; VanEngelsdorp et al., 2013). The most visible symptom in the hive is the presence of emerging bees with deformed wings (Aubert et al., 2008; de Miranda and Genersch, 2010; Möckel et al., 2011), which bumblebees can also develop (Genersch et al., 2006; Graystock et al., 2016). DWV at sublethal doses in honeybees is known to impair associative learning and

memory formation (Iqbal and Mueller, 2007), to cause precocious foraging trips (Benaets et al., 2017) and to reduce the workers lifespan drastically (Rueppell et al., 2017). In honeybees, overt infections often occur when the virus is injected directly into the pupae hemolymph by the *Varroa destructor* mite (de Miranda and Genersch, 2010; Möckel et al., 2011). The mite acts as a vector in horizontal transmission, selects virulence (Martin et al., 2012) and transmits different virus species. As a consequence, honeybees (Chen et al., 2004) often carry multiple viruses in co-infection. However, most honeybee viruses being part of the same order, they are also close in size (~30nm) and structure (icosahedric capsids) which does not allow for an easy discrimination between different viruses when carrying out viral purification from field samples. This can cause many problems when attempting to determine the etiology of viral diseases or studying determinants of virulence. As a result, few studies have uncovered the molecular infection mechanisms of this virus or characterised functions associated to its genome regions or to particular mutation or recombination events. Creating DWV clones, including some variants or recombinants, would allow these studies to take place through reverse genetics. It would also allow experiments on honeybees to be carried out with standardized viral strains, and avoid the difficult purification (Lamp et al., 2016).

Contrary to classic (forward) genetics, which observes phenotypic variations and then aims to identify the causative genetic polymorphism, reverse genetics starts by inducing a genetic modification and measures its effects on the phenotype. cDNA clones are versatile tools to perform such reverse genetics studies. The first infectious cDNA clone from a virus to have been developed was another *Picornavirus*, *Poliovirus* (Racaniello and Baltimore, 1981). Only two infectious cDNA clones of honeybee viruses have been obtained, one for DWV (Lamp et al., 2016) and one for BQCV (Benjeddou et al., 2002)).

To develop a reverse genetic tool for DWV, we have set up two DWV clones: one of the reference, DWV-A, strain and one of a recombinant between DWV-A and DWV-B strains. This study is, to our knowledge, the first attempt at producing a clone of a recombinant of DWV-A and B, and the first use of a HandGun to inoculate a plasmid to honeybee pupae in the attempt of reducing injection stresses (notably necrosis).

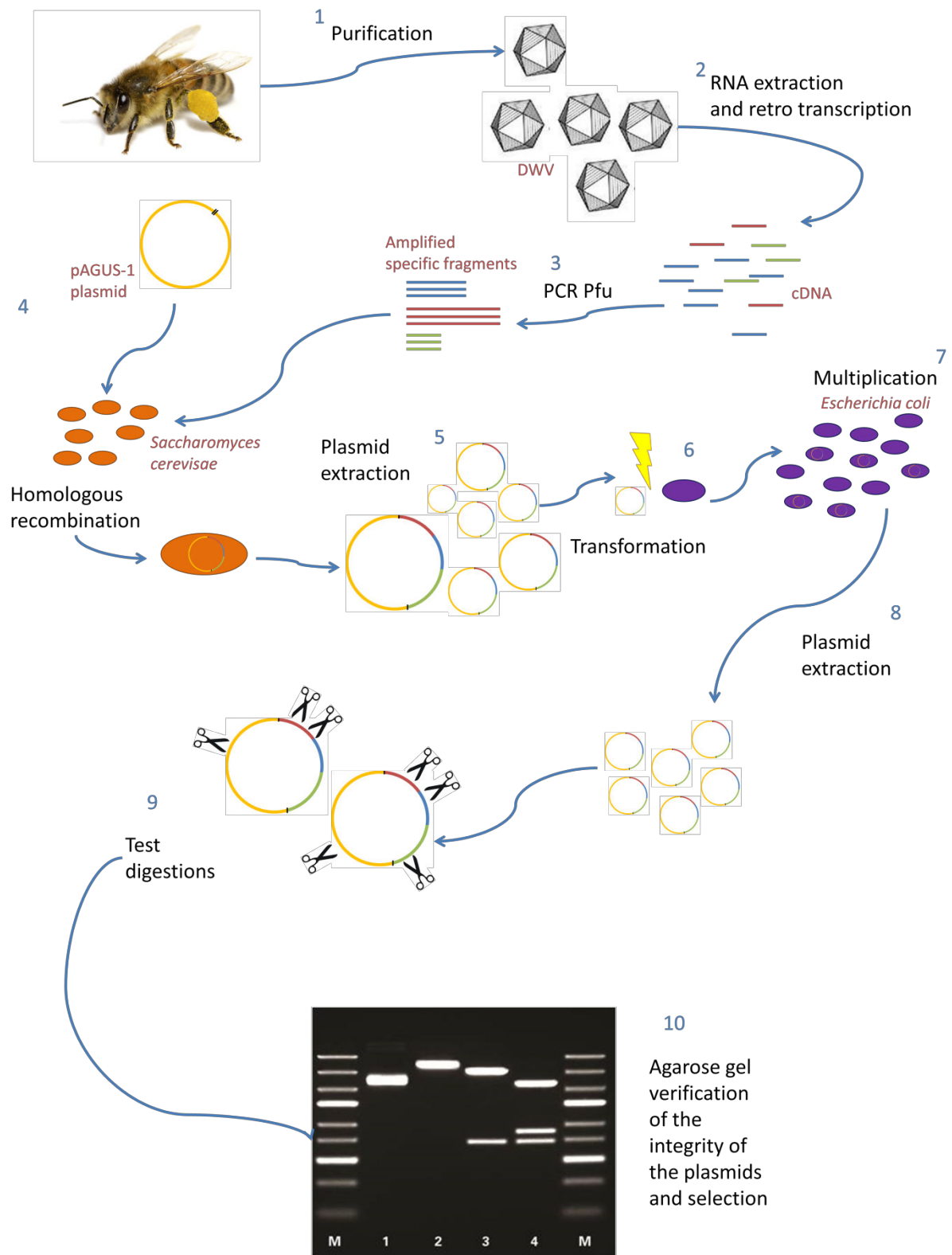


Figure 1: Summary diagram of the steps followed to obtain the two different DWV plasmid clones.

2. Materials and Methods

2.1. [DWV isolates](#)

Two isolates were chosen to be purified and cloned in plasmids, one native DWV-A isolate hereby named DWV-Fr1 from one colony with deformed wing symptoms located in the experimental apiary of INRA Avignon (South-Eastern France) and one DWV-A/DWV-B recombinant isolate named RecVT-Fr1 from a Varroa-tolerant colony (Le Conte et al., 2007), from the same location. Both isolates sequences were published under the numbers KX373899 for isolate DWV-Fr1 and KX373900 for isolate RecVT-Fr1 (Dalmon et al., 2017).

2.2. [Viral purification](#)

DWV was purified from the two different isolates after propagation honeybee pupae. Before propagation DWV-Fr1 was extracted from stored honeybees and RecVT-Fr1 from stored pupae. First, propagation was carried out by serial inoculations, injecting the isolates extracted from honeybees into red-eye pupae, which were kept to multiply the virus for 24 to 48h at 34°C and with saturated humidity. Then purification was carried out using a 30% sucrose cushion followed by a cesium chloride (CsCl) gradient, following the protocol described in (Desbiez and Lecoq, 1997).

a) [Sucrose cushion](#)

First step in sucrose cushion was carried out following protocol from (Ryabov et al., 2009). Briefly, for each isolate, 20 pupae were crushed in 5mL of 0.01 M, pH 7 phosphate buffer (previously prepared by mixing a solution of 0.01 M K_2HPO_4 (0.23 g + 100 mL distilled H_2O) and a solution of 0.01 M KH_2PO_4 (0.137 g +100 mL H_2O)). The sucrose cushion was prepared using a 30% sucrose solution (weight/volume) in distilled water (ΔH_2O). The obtained solution was submitted to low speed centrifugation for 15 min at 15 000 g and around 4mL of supernatant was transferred in specific ultracentrifuge bottles. 2 mL of 30% sucrose solution was deposited at the bottom of the bottle using a syringe, and the bottles were

Isolate	Name	Sequence	F/R	Amplicon length (bp)	Reference
DWV-Fr1	ITRØ	ATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGTTTAAAA TTCGCTATGGGAGG	F	2922	This study (Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP5r_2922	GCATAAACATACTAGATACG	R		
	BTsd	CTGTAGGTTGTGCTCCTGATGAAGA	F	2415	(Gisder et al., 2009)
	DWV-Hel5r_5148	TACCTGATTACTACCTCTAC	R		(Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP3f_4041	CATTG(T/C)ATGTTTACCTTCCC	F	2652	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-6693r	GTTACACGACGCTTACTACAC	R		(Berényi et al., 2007)
	DWV-Hel3f_6558	AGATGAAGAACTTATGGGCG	F	1296	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-Rd5r_7954	CCAATAGCTGAgTATGGtCGCC	R		(Dalmon et al., 2017)
	DWV-Hel3f_7326	GCTGATCATTATGTGAATAGGC	F	2815	(Dalmon et al., 2017)
	END	GCGAATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT GCTATTATGGTTAAAAC	R		This study
RecVT-Fr1	ITRØ	ATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGTTTAAAA TTCGCTATGGGAGG	F	2922	This study (Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP5r_2922	GCATAAACATACTAGATACG	R		
	DWV-Lp5r_1263	TA(T/C)GAGTTAGAGTGTGT(C/T)AC	F	2881	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP3r_4144	TACCCTGACGCTATCAATGG	R		(Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP3f_4021	TACGGATAAGGATATTGATC	F	2672	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-6693r	GTTACACGACGCTTACTACAC	R		(Berényi et al., 2007)
	DWV-5992f	TCCTATTGCTGAATGTAGTC	F	2916	(Berényi et al., 2007)
	DWV-Rd5r_8908	CTAAGTAATACTGTCGAAA(T/C)GG	R		(Dalmon et al., 2017)
	Rd5f_7826	GCTTGTGACTATGCCTAATCG	F	2315	This study
	END	GCGAATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT GCTATTATGGTTAAAAC	R		This study
Sequencing	DWV-ITR5f_43	TTTAGATAGTAGCCATGAAC	F	1795	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-1795r	TACGTTCTTGCTCCAGCGCC	R		(Dalmon et al., 2017)

Table 1: Primers used in this study for each isolate, and references.

equilibrated using phosphate buffer. Samples were centrifuged during 6 h at 4°C, 100 000 g in a Beckman LE-80 ultracentrifuge using a 70.1Ti rotor. The supernatant was eliminated and 4 mL of phosphate buffer was added before agitating on ice overnight to resuspend the pellet.

b) CsCl gradient

5.48 g of CsCl were added to 4 mL of each resuspended pellet (1.37 g/mL). Samples were centrifuged for more than 16h, at 132 000 g at 4°C using the same rotor as above. The thick white strip that could be seen in each sample was collected using a bevelled syringe.

CsCl was eliminated using a protocol adapted from (Ryabov et al., 2009). Samples were diluted to 1/60th in 0.01 M phosphate buffer (0.5 mL of each in 30 mL) and centrifuged for 3 h at 4°C, 30 000 g.

The supernatant was eliminated and pellets were resuspended in 500 µL of phosphate buffer, on ice with gentle agitation. Fifty µL of each sample were used to extract RNA for quantification and amplification.

2.3. RNA extraction

RNA from the two samples was extracted using the Tri-reagent kit. Briefly, 500 µL of Tri-reagent were added to 50 µL of purified virus. The mixture was incubated for 5 min at room temperature, then 100 µL of chloroform were added, and the mixture was incubated again, after vigorous shaking, at room temperature for 5 to 10 min. Samples were centrifuged for 15 min at 12 000 g at 4°C. The upper aqueous phase was collected and the RNAs were precipitated using an equal volume of isopropanol. After centrifugation for 8 min and 12 000 g at 4°C and washing with 70° ethanol, the pellets were resuspended in 50 µL of ΔH₂O. RNA samples were stored at -20°C until use.

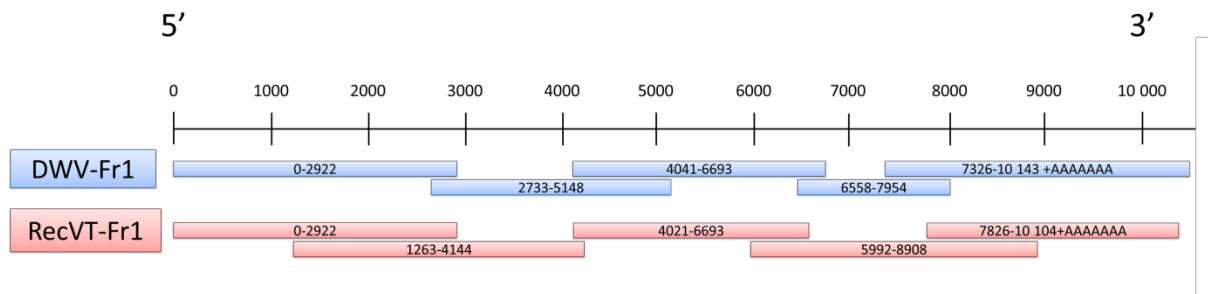


Figure 2: Amplified overlapping genome fragments used to construct DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 cDNA clones.

2.4. [Amplification and purification of genome fragments](#)

Reverse transcription and amplification of cDNAs for DWV-Fr1 and n°RecVT-Fr1 were as described by Desbiez et al., 2012. Amplifications were performed with Pfu DNA polymerase (Promega) according to the manufacturer's recommendations. The complete genome of

DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 were amplified in 5 overlapping fragments using 5 primer pairs (Table 1). The fragments are different between DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 (Fig. 2). The PCR products were purified from 1% agarose gel and used for subsequent cloning.

2.5. [Regulations](#)

Cloning experiments and the following infectivity tests in France fall under the regulation of genetically modified organisms, defined by the High Council for Biotechnology (HCB) (Haut conseil des biotechnologies, 2013) since 2008. Our experiments are classified *C1* for the cloning of DWV genome in bacterial plasmids, and *C2* for the infectivity tests on honeybee nymphs. *C1* asks for a declaration of GMO production and use while *C2* asks for a confined environment in certified laboratories. We carried out all the cloning and infectivity experiment in a certified laboratory, adding a second layer of confinement (confined room) for the *C2* classified part. This is also the reason why we have inoculated pupae instead of adult honeybees. Not only do pupae multiply viruses more easily through their lack of fully formed immune defences (de Miranda et al., 2013; Evans et al., 2006), but they also have the advantage of being totally immobile, diminishing the risk of spillover. A specific authorization from the Ministry of National Education, Higher Education and Research (Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), was required in April 2015. Confirmation of authorization, reviewed by the HCB, for virus cloning into plasmids (*C1*) and subsequent infectivity tests on live honeybee pupae (*C2*) was received on 17/10/2016.

2.6. [Cloning](#)

The complete genomes of DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 were cloned using homologous recombination in yeast (Fig. 1, 2 and 3) as described by Desbiez et al., 2012. Homologous

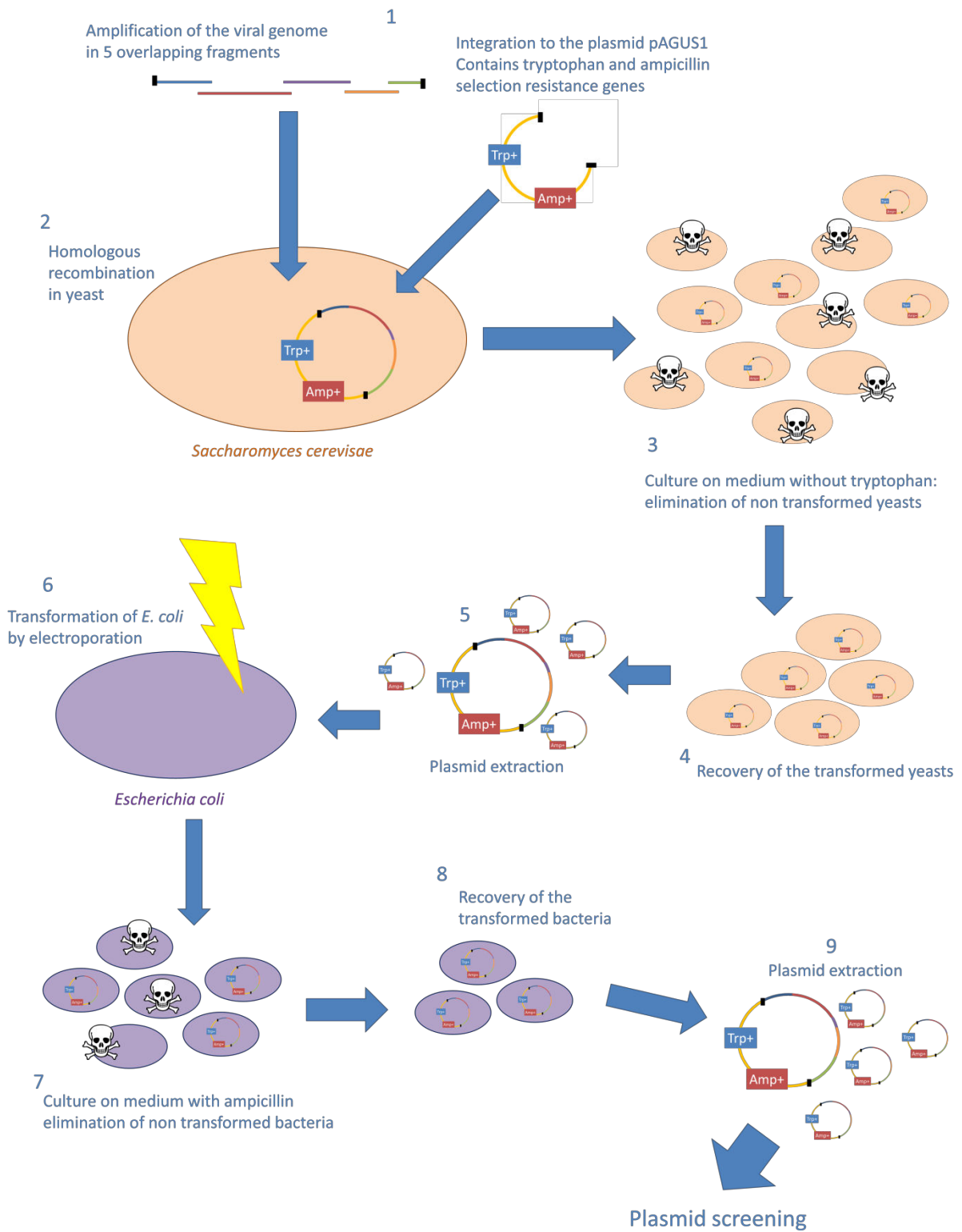


Figure 3: Detailed diagram of the cloning steps.

recombination naturally occurs in *Saccharomyces cerevisiae* when overlapping linear DNA fragments are present in the organism. This mechanism can be used for biotechnology purposes by co-transforming *Saccharomyces cerevisiae* with different linear DNA fragments and works also for large fragments (Raymond et al., 2002). This method is much simpler than *in vitro* ligation of DNA fragments sharing compatible ends, which requires appropriate restriction sites and usually several successive cloning steps to incorporate all genome fragments into a full-length clone.

a) Plasmid vector

To prepare the plasmid vector, an infectious clone of PRSV (*Papaya Ringspot Virus*) in pAGUS (Desbiez et al., 2012) was digested with EcoRI in order to remove most of the viral insert. pAGUS contains the 35S plant promoter which has been found to be very efficient in a number of hosts (Desbiez et al., 2012), and the 2 μ m yeast replication origin. It also contains a tryptophan synthesis gene and an ampicillin resistance gene for selection of recombinants (Fig. 3). The 6kb fragment containing the pAGUS vector and the extremities of the PRSV construct was excised from agarose gel, ligated using T4 DNA ligase and the ligation product was transformed and multiplied in *E. coli*, yielding the PRSV(delta)Eco clone. The empty plasmid clone was linearized with EcoRI before use for yeast transformation.

b) Yeasts transformation

Competent cells of the diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain YPH501, auxotrophic for tryptophan (Sikorski and Hieter, 1989) were obtained as described in Desbiez et al., 2012 and stored at -80°C before use.

Fifteen μ L of insert DNAs and plasmid were added to 40 μ L of the thawed yeasts with an insert/vector ratio of 3:1, with 800 μ L of PEG 4000 (polyethylene glycol 40%, bicine 200mM, pH 8.35) and 7 μ l of sonicated heat-denaturated salmon sperm DNA (10 mg/ml) as a carrier. After 1h30 of incubation at 30°C and under gentle agitation, the yeasts were pelleted by 5 000 g centrifugation for 5 min. The supernatant was discarded, 1 mL of NB buffer (NaCl 0.15 M, bicine 10 mM, pH 8,35) was added and the samples were centrifuged again for 5 min at 5 000 g. 900 μ L of the supernatant were discarded and the

yeasts were resuspended in the remaining 100 μ L and plated on CAU solid selective medium (0.1% casamino acid containing no tryptophan, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.0025% adenine sulfate, 0.0025% uracil, 2% d-glucose) (Desbiez et al., 2012; Sikorski and Hieter, 1989) at 30°C for at least 48h. Our strain of *Saccharomyces cerevisiae* being unable to synthesize tryptophan, only the yeasts which genome is complemented by a recombinant plasmid will be able to grow.

c) Plasmidic DNA extraction from yeasts

Four and 8 yeast colonies (depending on the number of transformed colonies available) were collected respectively from samples DWV-Fr1 and RecVT-Fr1, inoculated in 2 ml of liquid CAU medium and grown overnight at 30°C. Plasmids were extracted following (Desbiez et al., 2012; Hoffman and Winston, 1987). Briefly, the cells were collected by a 5 000 g, 5 min centrifugation and resuspended in 200 μ L of a buffer containing 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA. Two hundred microliters of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (50:49:1 in volume) and 0.3 g of 0.45 mm acid-washed glass beads (Sigma) were added, and the suspension was vortexed for 5 min. Samples were again centrifuged for 5 min at 14 000 g, supernatant recovered, and 200 μ L of a chloroform:isoamyl alcohol (24:1 in volume) added. Plasmidic DNA was recovered, after a new centrifugation for 5 min at 14 000 g, by ethanol precipitation and resuspended in 10 μ l of de-ionized water.

d) *E. coli* transformation and plasmidic DNA extraction

Electrocompetent *E. coli* were transformed following standard protocols. Only 3 of the previously obtained constructs were used for each isolate. Electrocompetent bacteria (40 μ l) were added to a tube with 40 μ L of cold 10% glycerol. Electroporation was carried out on ice using a Bio-Rad electroporator (5 mS). The cells were plated on LB Agar medium with 100 μ g/ml ampicillin.

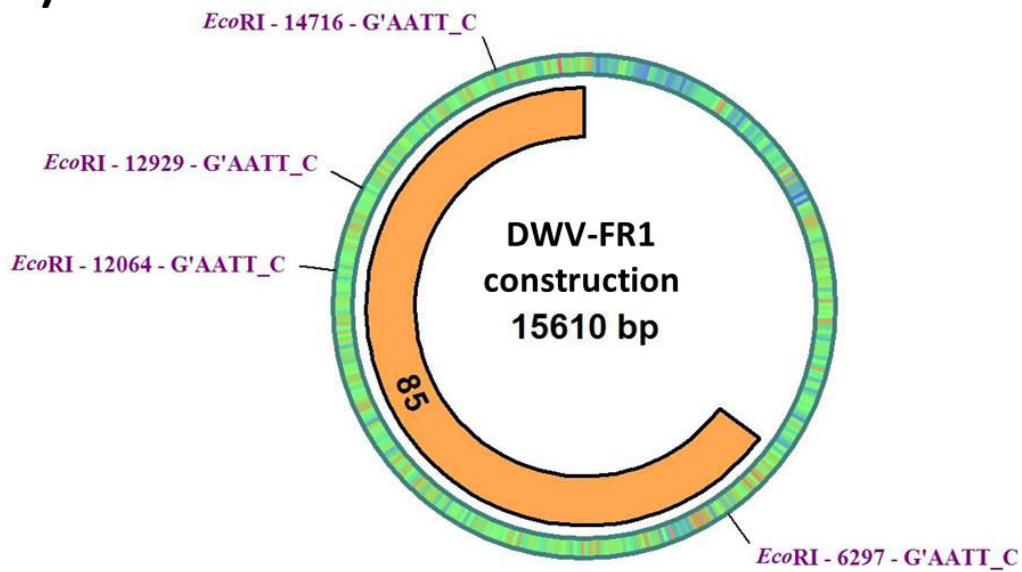
For each isolate, 6 colonies were selected to maximise the chances of getting complete clones, then cultivated overnight in liquid LB medium with 100 μ g/ml ampicillin (as plasmid contains

a resistance gene to ampicillin as a selection tool). Bacterial plasmid DNA was extracted by alkaline lysis (Miniprep).

e) Plasmid control by restriction analysis

Screening was performed by restriction enzyme analysis. Enzymes were chosen using the software p-DRAW32 (AcaClone software) (Fig. 4). Expected products are 7191 pb, 5767 pb, 1787 pb and 865 pb for DWV-Fr1 and 1309 pb, 1413 pb, 1479 pb, 2033 pb, 3259 pb and 6123 pb for RecVT-Fr1.

A)



B)

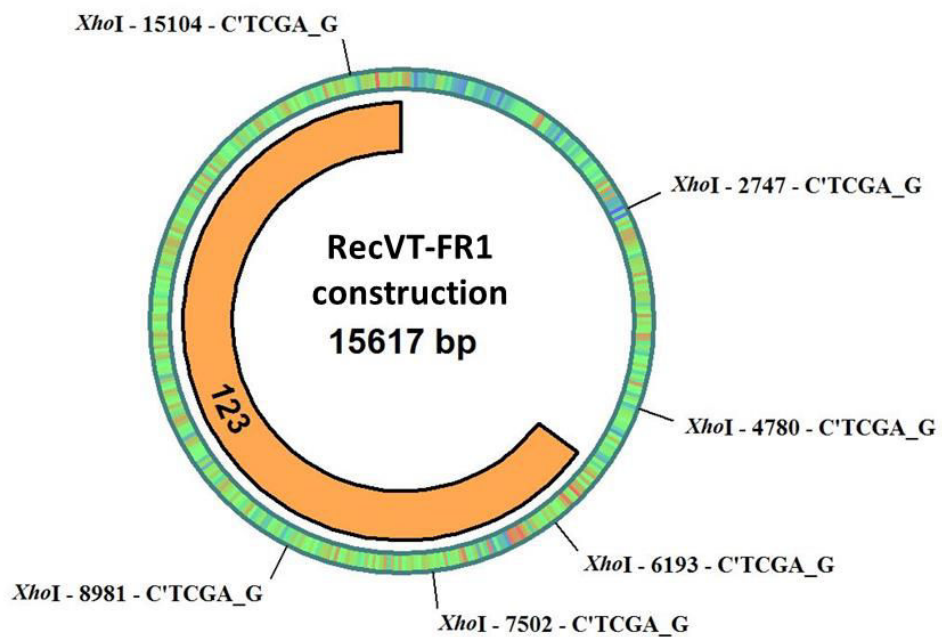


Figure 4: Plasmid constructions and chosen enzyme restriction sites.

A) plasmid construction with isolate DWV-Fr1, showing digestion sites for selected enzyme EcoRI. B) plasmid construction with isolate RecVT-Fr1, showing digestion sites for selected enzyme XhoI.

2.7. Infectivity tests and quantification

Still following protocol from (Desbiez et al., 2012), we decided to use a HandGun that was available and has been shown to be more efficient for plasmid inoculation in plants than injection (Fig. 5). We adapted the protocol from squash zucchinis to honeybee pupae. As this technique had, as far as we know, never been used before on honeybee pupae, we had to carry out some adjustments to determine the right HandGun shooting distance and pressure so as not to harm the pupae, which could cause necrosis. We determined to use 2cm high PVC tubes sections as adjustable and easily sanitized containers for 5 nymphs each, and shot at a pressure of 2 bar, 10 cm away from the pupae.

The same infectivity experiment was repeated once (first in October 2016, repetition in April 2017). A third infectivity test was carried out in May, but separating each obtained clone. They are described below.

The first infectivity test was conducted on honeybee pupae in October 2016 (Fig. 4). It was carried out on white to pink eyed pupae from a honeybee colony that had been tested as “DWV-low” ($<2,5 \times 10^6$ copies/bee) at the beginning of the season. For this first test, we mixed the well-constructed clones that seemed to be in the highest quantity (strongest bands on the restriction gel, Fig. 5). For DWV-Fr1, we used 2.5 μ L of each 85-1-II, 85-2-III, 85-3-II, and 85-3-III (Fig. 5). For RecVT-Fr1 we used 123-1-II, 123-2-II, 123-2-III, and 123-2-IV. The resulting 10 μ L of plasmid solution were added to 10 μ L of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and 10 μ L of M20 tungsten beads (Gal-On et al., 1995). Three μ L of this solution were then placed in the HandGun, to be pulverized 5 times over one batch of 5 pupae. Control conditions included non-inoculated pupae and “mock inoculated” pupae, inoculated with water, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1.25M and tungsten beads (= mock inoculated) (Gal-On et al., 1995). For each condition, 4 batches of 5 pupae were inoculated. After inoculation, pupae were kept at 34°C, with controlled humidity, in a confined incubator for 48h (in a C1 and C2 certified laboratory confinement, (Haut conseil des biotechnologies, 2013)). RNA was extracted from all 4 pools of 5 pupae per condition using a Qiagen RNeasy Universal Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer’s instructions. 50 μ l of the resulting RNA was quantified using a spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo

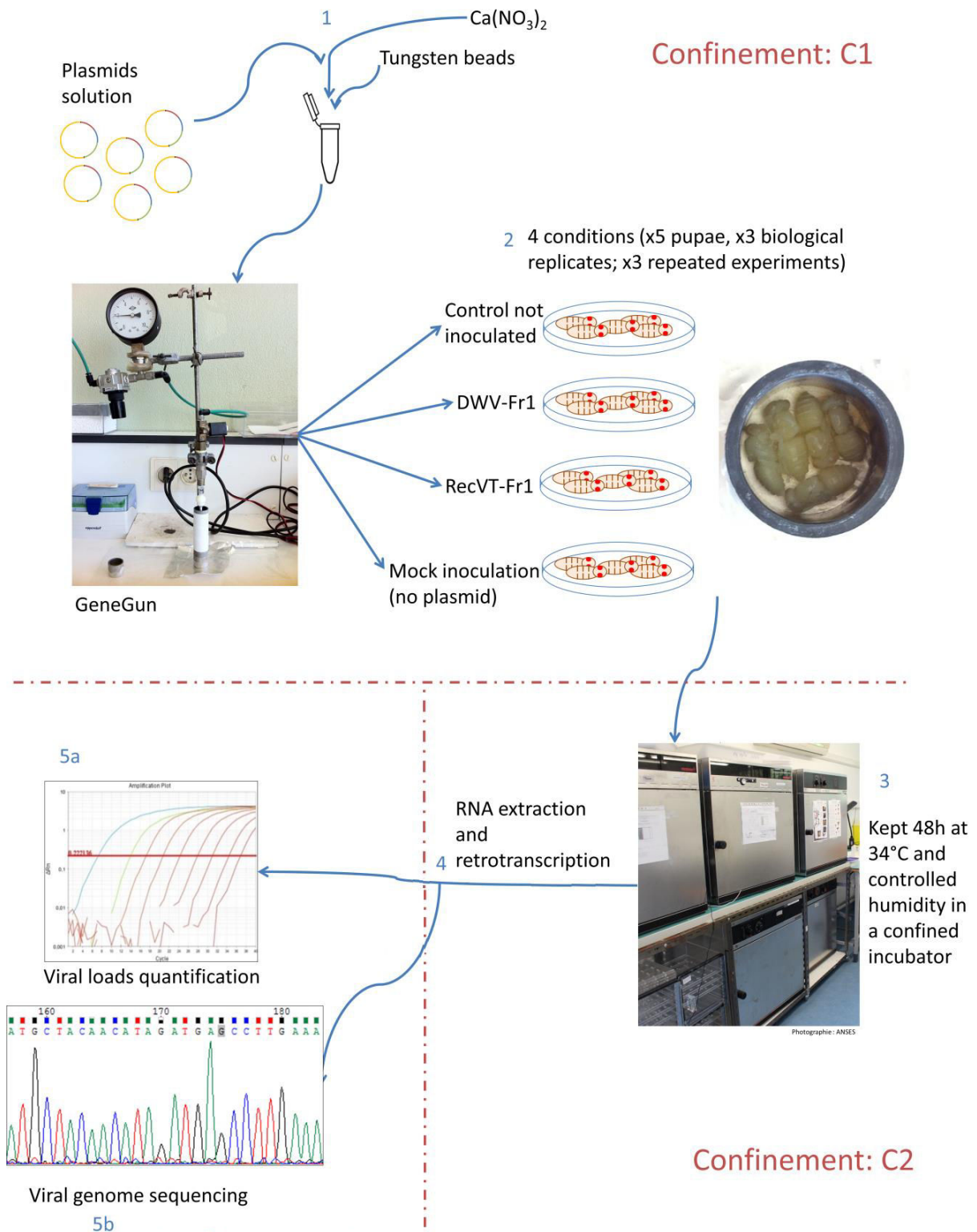


Figure 5: Summary diagram of the steps followed for infectivity tests; photography Anne Dalmon (Anses for the incubators).

Fisher Scientific) then diluted to obtain a 500 ng/μl RNA concentration. Obtained and diluted samples were stored at -80°C.

This infectivity test was carried out a second time following the same steps, in April 2017.

The third infectivity test was carried out using each construction separately to test if some constructions were infectious while others were not. There were 3 replicates for each condition, each containing 5 pupae. Pupae were sampled in one colony that had been tested as “low-DWV” in April. Control was not shot, Mock inoculated was shot with tungsten beads, Ca(NO₃)₂ and water, and the clone containing conditions were a 3 μL mix of each specific clone, tungsten beads, and Ca(NO₃)₂ as described above.

2.8. Control of clone multiplication

a) DWV quantification

DWV loads in all samples were quantified using a SYBR-Green quantitative real-time PCR absolute quantification (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) after a retro-transcription test, as described in Coulon et al (previous article).

Viral loads were converted to log₁₀ and compared using ANOVAs followed by Fisher’s LSD when data allowed for parametric tests or by Kruskal-Wallis tests followed by pairwise Wilcoxon tests with Bonferonni correction when they did not.

b) Sequencing

To control if the multiplied virus originated from the clones and was not a background DWV infection, we amplified by RT-PCR a specific region (Table 1) which is different between isolates DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 (around 5’ ITR region) (Dalmon et al., 2017). The amplicons were then sent for sequencing using the Sanger technology (Genoscreen, France) and sequences were cleaned, aligned using CLUSTAL (EMBL-EBI) to obtain a cleaner sequence and analysed using BLAST (NCBI, USA).

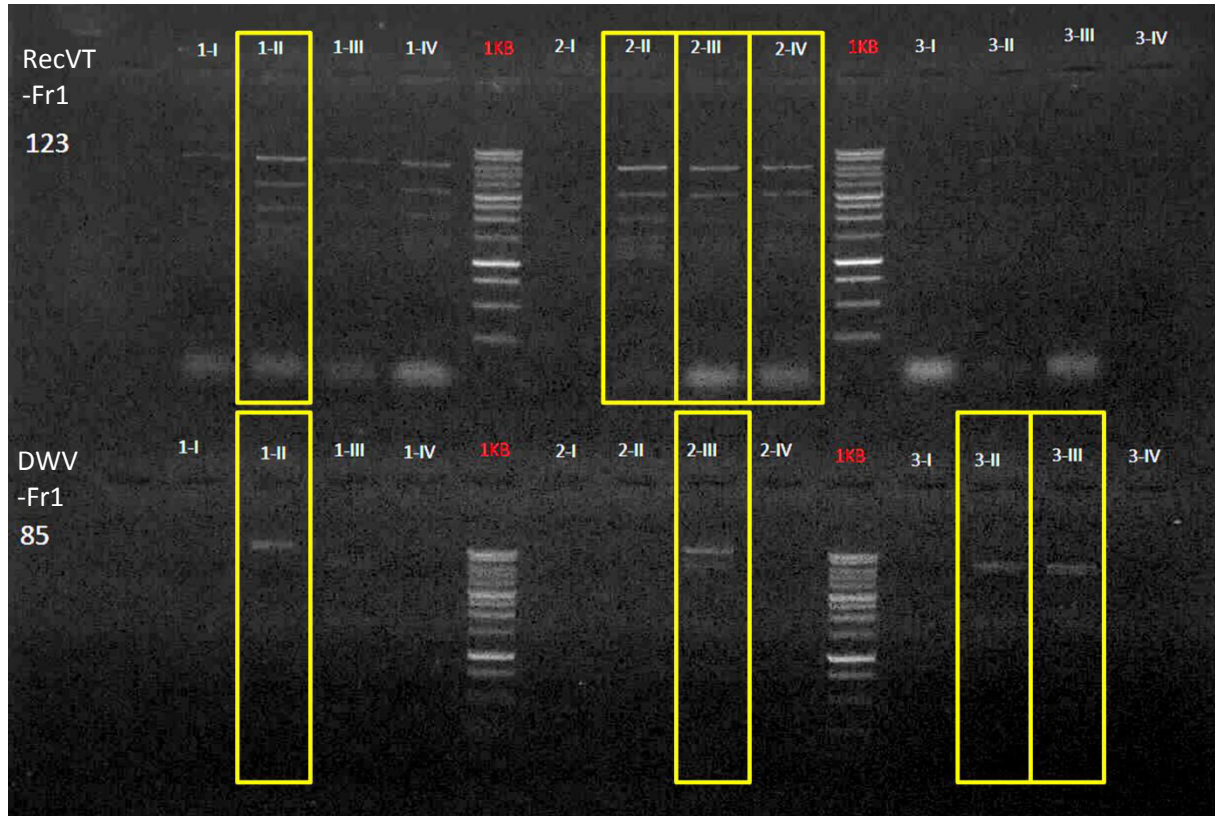


Figure 6: Plasmid constructions digestions.

For each isolate, 3 different samples were retrieved after the yeast ligation step (1, 2, 3), and then 4 different colonies selected after the *E.coli* transformation (I, II, III, IV). Red: 1 KB ladder. Yellow frames : chosen clones to be inoculated in infectivity tests.

c) Direct qPCR

A quantitative PCR was eventually carried out on the samples without the retro-transcription step to determine if the amplified DNA fragments corresponded to the initial inoculated plasmid or to cDNA transcribed from the plasmid.

3. Results and discussion

3.1. Obtained DWV clones

Constructed clones (Fig. 6) contain the whole DWV-Fr1 or RecVT-Fr1 DWV isolate genome (~10 kb), and pAGUS-1 plasmid with the 2 μ yeast replication origin and Trp-1 promoter. RecVT-Fr1-1-II, RecVT-Fr1-1-IV, RecVT-Fr1-2-II, RecVT-Fr1-2-III, and RecVT-Fr1-2-IV show the expected specific bands for a complete clone in the plasmid (1309 pb, 1413 pb, 1479 pb, 2033 pb, 3259 pb and 6123 pb), as well as DWV-Fr1-1II, DWV-Fr1-2-III, with DWV-Fr1-3-II and DWV-Fr1-3-III showing different bands (7191 pb, 5767 pb, 1787 pb and 865 pb). Indeed, some tested clones seemed to yield the expected profiles after digestion (Fig. 6). However, there seemed to be very little DNA as the bands aren't very visible. We have decided to test first with a mixture of clones for each isolates to overcome the lack of DNA.

For the rest of this study, and for each isolate, we have only tested the 4 complete clones that had the thickest bands in the digestion gel verification. For RecVT-Fr1 it was RecVT-Fr1-1-II, RecVT-Fr1-2-II, RecVT-Fr1-2-III, and RecVT-Fr1-2-IV. For DWV-Fr1 it was DWV-Fr1-1II, DWV-Fr1-2-III, with DWV-Fr1-3-II and DWV-Fr1-3-III.

Infectivity test in qRT-PCR (October 2016)

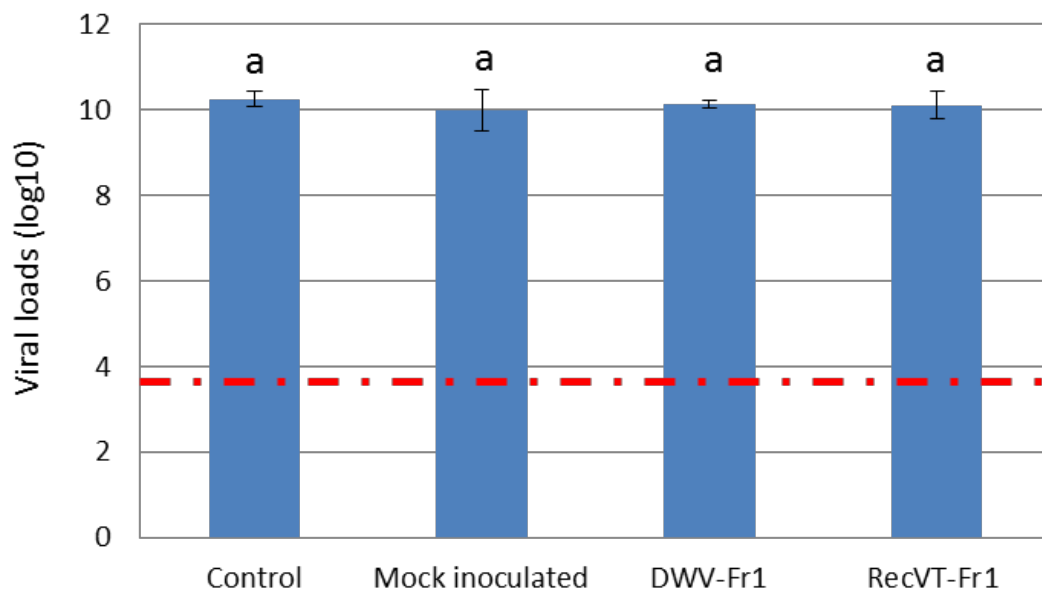


Figure 7: Viral loads in 1 µg RNA of the tested honeybee pupae in October 2016 (1st infectivity test).

Means of log₁₀ of viral loads and standard deviations are shown. Red dotted line shows qPCR limit of quantification for DWV (equivalent to 31Ct (Miranda et al., 2013)). Conditions shown are Control (not treated), Mock inoculated (inoculated with water in place of clones), an equal mix of the selected clones for DWV-Fr1, or an equal mix of the selected clones for RecVT-Fr1. Letters indicate the absence of significant differences ($p>0.05$) between groups.

3.2. Infectivity tests: viral quantification

Due to regulatory constraints, the first infectivity test was carried out in fall when we got the official authorization for such tests. Results are shown as the mean of log₁₀ of viral loads in 1µg RNA per µL of sample, calculated on four samples containing five pupae each.

In this first test (October 2016, Fig.7), we can see that even the control and mock inoculated pupae had high loads of DWV (over 10¹⁰ copies per individual). No treatment was significantly different from control ($p>0.05$). Unfortunately, autumn is the time of year when *Varroa* is at its highest numbers (Dainat et al., 2012a), then the pupae were already highly contaminated by DWV and no difference could be observed between the controls and plasmid inoculated pupae. An eventual infection caused by cDNA clone inoculation could have been masked by this extremely high background infection.

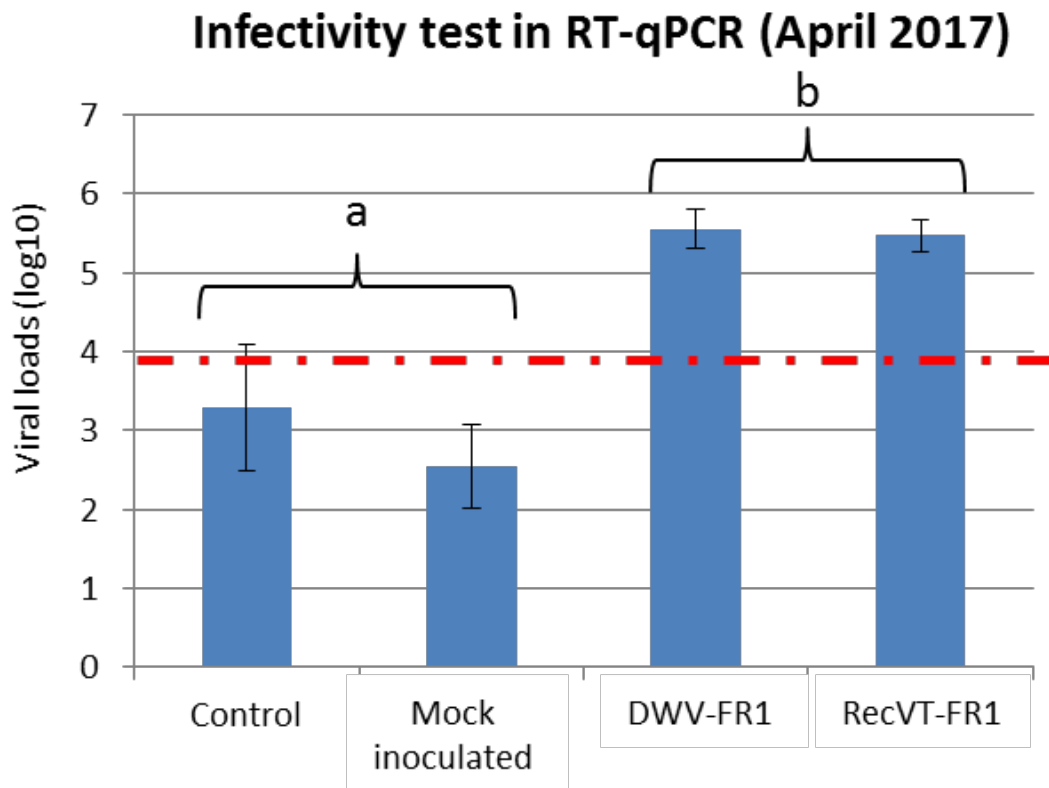


Figure 8: Viral loads in 1 μg RNA of the tested honeybee pupae in April 2017 (2nd infectivity test).

Means of log₁₀ of viral loads and standard deviations are shown. Red dotted line shows qPCR limit of quantification for DWV (equivalent to 31Ct (Miranda et al., 2013)). Conditions shown are Control (not treated), Mock inoculated (inoculated with water in place of clones), an equal mix of the selected clones for DWV-Fr1, or an equal mix of the selected clones for RecVT-Fr1. Letters indicate significant differences ($p > 0.05$) between groups.

The second infectivity test was carried out in April 2017, in the same way as autumn 2016. Results are shown as the mean of log₁₀ of viral loads in 1µg RNA per µL of sample, calculated on this time five samples containing five pupae each. This test shows a significant difference in the viral loads of the honeybees that were inoculated with the plasmids compared to the two controls (Fig. 8). Untreated control was not significantly different from mock inoculated ($p=0.231$), but was different from both DWV-Fr1 ($p<0.001$) and RecVT-Fr1 ($p<0.001$). DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 did not show significant differences in between their viral loads ($p=0.995$).

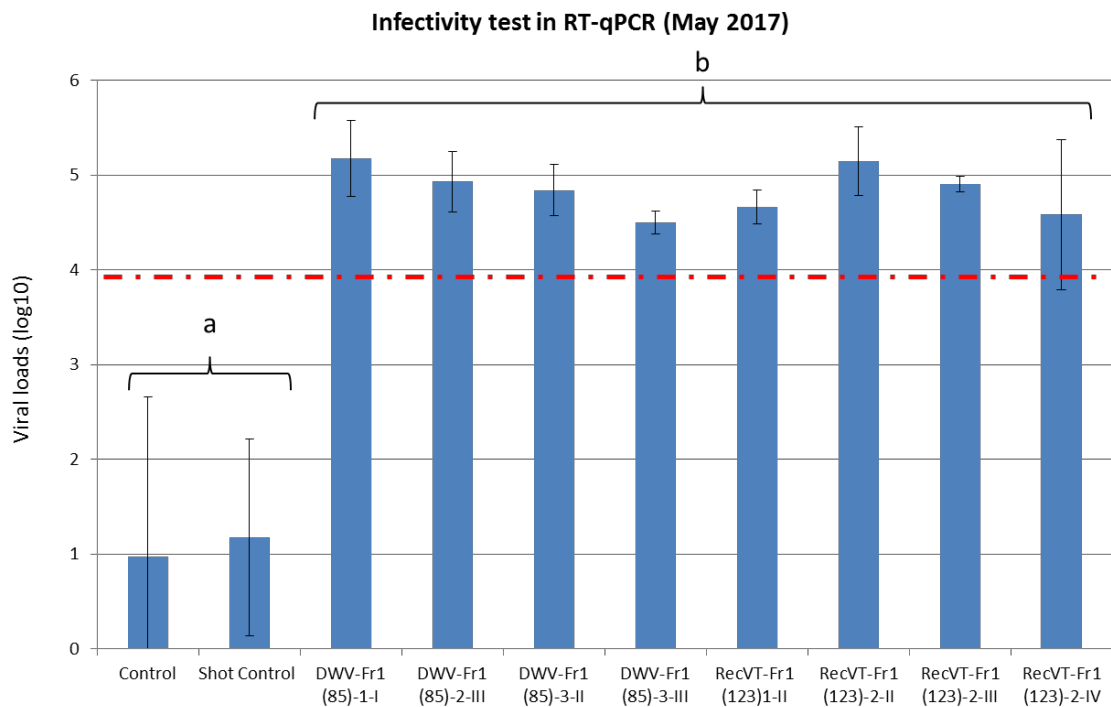


Figure 9: Viral loads in 1 μ g RNA of the tested honeybee pupae in May 2017 (3rd infectivity test).

Means of log₁₀ of viral loads and standard deviations are shown. Control was not inoculated while “Mock inoculated” was inoculated using Ca(NO₃)₂ and tungsten beads without plasmid. Conditions shown are Control (not treated), Mock inoculated (inoculated with water in place of clones), an equal mix of the selected clones for DWV-Fr1, or an equal mix of the selected clones for RecVT-Fr1. Letters indicate significant differences ($p > 0.05$) between groups. Red dotted line shows qPCR limit of quantification for DWV (equivalent to 31Ct (Miranda et al., 2013)).

The third infectivity test was carried out using each construction separately to test if some constructions were infectious while others weren't. Results are shown as the mean of log₁₀ of viral loads in 1µg RNA per µL of sample, calculated on this time five samples containing five pupae each. There was no difference between control and mock inoculated honeybees ($p=0.999$) (Fig. 9). Both control and mock inoculated pupae showed significantly lower DWV loads than every plasmid-inoculated pupae ($p<0.05$), but these conditions inoculated with the plasmids weren't different between each other ($p>>0.05$). Evidence of higher DWV loads in plasmid inoculated pupae suggests all cDNA clones used in this experiment were infectious. However, we had to perform additional verifications for confirmation.

4. [Infectivity tests: sequencing](#)

To verify if the qPCR amplified DNA from the pupae corresponding to the cloned viruses and not to the background DWV infection, 5' UTR region of DWV was amplified in samples obtained from each clone mixtures from the April 2017 experiment. Forward and reverse sequences of this region were obtained by Sanger sequencing, cleaned by hand, then aligned through CLUSTAL (EMBL-EBI) software to obtain a cleaner sequence with better identity (especially on the extremities). BLAST (NCBI) – powered alignments returned 99 % identity of isolate DWV-Fr1 with itself (sequence of uncloned DWV-Fr1, that had been previously entered in the NCBI database (genbank accession KX373899) (Dalmon et al., 2017). The isolate RecVT-Fr1 alignments returned 99 % of identity with the sequence of VDV1/DWVRecVT-Fr1 that was used to obtain the clone (genbank accession KX373900).

This first verification step seemed to confirm that we have amplified a virus genome region corresponding to the inoculated clones and not from the background DWV infection.

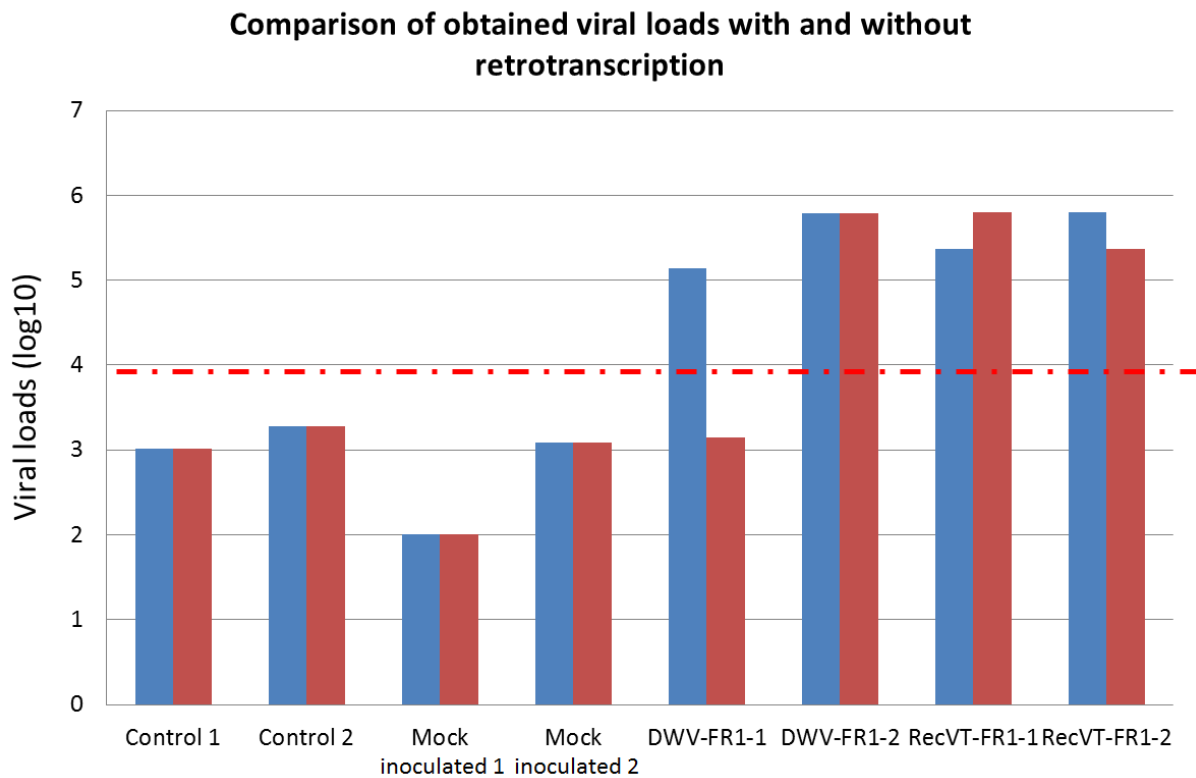


Figure 10: Comparison of the viral loads in 1 μ g RNA obtained from the 2nd infectivity test (April) in qPCR (red) or RT-qPCR (blue).

1 and 2 are technical replicates, control and mock inoculated pupae; DWV-Fr1, RecVT-Fr1: plasmid inoculated pupae. Log₁₀ of viral loads are shown for each of the tested samples, red dotted line shows qPCR limit of quantification for DWV.

5. Infectivity tests: verification

We performed direct qPCR with both RNA samples from the April 2017 infectivity test and cDNA from these samples. Doing qPCR without performing the retro-transcription step may allow to amplify possible residual DNA sequence from the plasmids, extracted with the RNA. As this was just a primary test, we only tested 2 randomly chosen samples out of the 5 tested for each condition. It seems that the viral loads obtained are mostly the same between the two quantifications (Fig. 10). This means that contrary to what we thought after analyzing the RT-qPCR quantification results, what was amplified was probably the viral DNA present in the plasmid constructions.

However, we still cannot rule out that our clones could have been infectious, and more tests are needed to confirm this hypothesis. Indeed we have seen the plasmid yield after extraction from bacteria was quite low and maybe our clones are indeed infectious, but there are few of them, and background DWV infection and residual plasmidic DNA could mask it. One way to confirm a possible infectivity would be by performing a number of successive inoculations in DWV-free pupae. By principle of dilution, after a number of back-inoculations in pupae, we should not be able to amplify the residual plasmidic DNA, and only amplify the cDNA of the retro-transcribed RNA if the clone is infectious.

We have produced two complete new clones of two different DWV strains, including a recombinant. For this we have used a novel technique for the production of honeybee virus cDNA clones by using a protocol developed on plant viruses (Desbiez et al., 2012). The clones that we have produced do not seem infectious at this point of our investigations, but further experimentations are needed before concluding. Our clones could not be infectious for two reasons: i) the promoter could not be functional in honeybees, ii) the promoter may function, but the viral proteins could be toxic to the *E. coli* we used to multiply the clones, hence reducing the yield too drastically for us to observe an amplification in the pupae; iii) lastly, the cloned sequence could correspond to a non-infectious part of the viral population. The promoter we used (35S) was indeed a plant promoter which, albeit very powerful and observed to function in bacteria, yeast (Desbiez et al., 2012), and even other eukaryotes, including mammals (Tepfer et al., 2004), is not specific for insects. In previous clone constructions, bacterial promoters were used (T7 (Lamp et al., 2016) and SP6 (Benjeddou et

al., 2002) promoters), the plasmids multiplied in *E. coli*, then transcribed into RNA *in vitro*, and the RNAs were inoculated. Strategies to overcome this problem would be to either exchange the 35S promoter with a promoter that is functional in honeybees, such as the CMV (cytomegalovirus) promoter (Youssef, 2016) or to perform *in vitro* transcription before inoculating them with RNA.

Another strategy, to obtain better plasmid yields, would simply be to increase the volume of bacterial culture with a new amplification step in *E. coli*. To avoid producing potential toxic proteins during this step, if this doesn't work, we could also return to the previous yeast homologous recombination step to add introns in the protein sequences. This strategy has successfully been used for the production of plant potyvirus clones (Desbiez et al., 2012). For this we should first try to uncover which protein is toxic to the bacteria, and add the introns in their sequences. This would allow the stabilization of the multiplication step, and thus a better clone yield.

In conclusion, we have completed the first step of developing a new technique for constructing cDNA clones of positive sense RNA viruses of the honey bee. Further experiments are needed to conclude on their infectivity.

Discussion générale

Dans un contexte de forts affaiblissements et de pertes de colonies, d'ubiquité des pesticides dans l'environnement, et d'émergences ou de réémergence de maladies virales, il est important de mettre en lumière le rôle que peuvent jouer les interactions entre facteurs de stress sur la santé de l'abeille domestique. L'objectif de cette thèse était d'étudier les interactions entre virus et pesticides afin de compléter les données encore parcellaires sur le sujet (cf Questions de recherche et objectifs de la thèse, p : 79).

Dans un premier temps, au cours d'expériences préliminaires, j'ai précisé les conditions d'exposition à ces facteurs biotique et abiotique. J'ai testé différentes méthodes d'infection expérimentale sur des abeilles émergentes. Une méthode de transmission du CBPV par contact entre abeilles préalablement inoculées par injection et abeilles saines a été développée avec succès au laboratoire (Chapitre 1, 1, p : 87). Elle permet d'éviter efficacement chez les abeilles étudiées en cagette les stress liés à l'injection du virus et donc de diminuer les biais expérimentaux en se rapprochant au plus près de la voie principale de transmission du virus dans les colonies. Ce mode de transmission par contact n'étant pas envisageable pour les expérimentations avec le DWV, nous avons recherché une méthode d'inoculation moins invasive que l'injection, en testant la transmission par voie orale. Même à de fortes doses (environ 10^8 copies de virus ingérées par abeille) nous n'avons pas pu déclencher d'infection par la voie orale, puisque les charges virales n'ont pas augmenté (Chapitre 2, 1, p : 157). Cependant, cela ne signifie pas que cette voie de transmission ne soit pas possible en conditions naturelles. En effet, nous n'avons testé que l'administration d'une seule dose « aigue » de virus donnée aux abeilles âgées d'un jour, et contrôlé les charges virales 24 et 48 h après inoculation, ce qui pourrait s'avérer trop précoce pour observer la multiplication du virus. Une étude précédente avait par exemple conclu qu'une infection par voie orale à 10^7 copies par abeilles était efficace et faisaient augmenter les charges virales sur abeilles adultes 9 jours après l'inoculation (Doublet et al., 2015b). Cependant, nous n'avons pas non plus observé d'effet significatif sur les mortalités, et ce jusqu'à 51 jours post inoculation. Une autre explication à l'absence d'efficacité de la transmission orale du DWV lors de nos essais pourrait être une surestimation de la charge en virus infectieux dans l'inoculum par PCR

quantitative (qui mesure les quantités de génomes viraux mais pas le nombre de particules infectieuses).

Afin de s'approcher des conditions d'exposition dans les colonies, où les abeilles sont en permanence en contact avec le virus *via* les fèces ou la trophallaxie, il pourrait être intéressant d'effectuer des infections de ce type sur une durée plus longue. Cela permettrait de mieux caractériser la transmission horizontale du DWV en l'absence de *Varroa* (Forsgren et al., 2012). Cependant ceci serait difficilement applicable de façon contrôlée en ruche (nécessité de recapturer les abeilles régulièrement ou de les confiner dans la ruche en contrôlant leurs apports alimentaires). Par ailleurs, la propagation et la réplication du DWV dans l'abeille sont mal connus. Suite à une infection orale, il a été observé que le DWV se concentrait dans l'intestin de l'abeille (Doublet et al., 2015b; Möckel et al., 2011). Cependant, dans le cas d'une injection il s'établit également dans la tête (Yue and Genersch, 2005), ce qui corrobore les effets neurologiques déjà observés dans le cadres d'infections expérimentales (Iqbal and Mueller, 2007). Une expérience utilisant par exemple la technique d'hybridation *in situ* d'amorces fluorescentes (FISH), couplée à de la microscopie sur des coupes d'abeille entière ou des dissections d'organes plus spécifiques, pourrait donner des réponses plus définitives sur les sites de la réplication en fonction du type d'infection et des souches virales étudiées.

Le développement d'un clone infectieux du DWV que nous avons amorcé lors de cette thèse (Chapitre 2, 2, p : 191) pourrait être utilisé dans ce type d'expérience. Il permettrait d'étudier avec plus de finesse cette transmission en produisant une quantité importante de la souche virale d'intérêt, non contaminée par d'autres virus ou souches. Ce clone moléculaire permettra également des études sur les mécanismes d'infection du virus au niveau cellulaire, qui sont pour l'instant inconnus. Cependant il est nécessaire pour cela d'avoir des lignées cellulaires d'*Apis mellifera* viables, ce qui n'est pour l'instant pas le cas. Connaître les cellules ciblées par le virus ainsi que son mode d'infection pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions avec les pesticides ; en effet si les deux facteurs ciblent les mêmes cellules cela pourrait expliquer les effets observés en co-exposition.

Si les mécanismes d'action des pesticides sont bien décrits, leur métabolisation voire les effets adverses des métabolites ne restent que partiellement connus. Ainsi, la métabolisation du thiaméthoxam n'avait à notre connaissance encore jamais été suivie en conditions

d'exposition chronique à des doses sublétales. En effet, une exposition chronique des abeilles en conditions naturelles est probable par la concentration des pesticides par les colonies, à travers la constitution des réserves de pollen et nectar, ainsi que les cires (Poquet et al., 2016). Mes travaux ont démontré que le thiaméthoxam est rapidement et efficacement métabolisé en clothianidine par l'abeille domestique (Chapitre 1, 2, p : 93). Il a également été déterminé qu'une grande partie de cette clothianidine se retrouve dans l'ampoule rectale des abeilles même après une exposition continue au thiaméthoxam pendant 18 jours, un temps équivalent environ aux deux tiers de la vie d'adulte de l'abeille (en saison apicole). Cette localisation de la clothianidine dans l'ampoule rectale suggère qu'elle n'est pas re-mobilisable (du Rand et al., 2017), et qu'en conditions naturelles elle serait rapidement excrétée par les abeilles. Ces résultats suggèreraient l'invalidité de l'hypothèse selon laquelle les effets du thiaméthoxam mesurés sont en fait ceux de la clothianidine (Benzidane et al., 2010).

Les réponses à ces premières questions m'ont permis de définir des plans expérimentaux proches de scénarios réels de co-expositions des abeilles dans les colonies. J'ai ainsi suivi deux axes : un premier en exposition chronique et en conditions contrôlées en laboratoire (pour le CBPV), et un deuxième en exposition aigüe et conditions les plus naturelles possibles dans les colonies (pour le DWV). Nous avons choisi d'exposer les abeilles au thiaméthoxam uniquement par voie orale, puisqu'il est principalement utilisé comme pesticide systémique plutôt qu'en vaporisation, et se retrouve donc en priorité dans le pollen et nectar que les butineuses ramènent à la ruche, où les autres ouvrières seront également exposées. Nous avons ainsi pu observer dans les deux cas des interactions (additives ou synergiques) ayant un effet délétère sur différents traits des individus.

En premier lieu, l'effet synergique à forte dose (5 ng de thiaméthoxam par abeille) sur la mortalité, observé ou non en fonction de l'expérience, pourrait refléter des différences de tolérance individuelle chez certaines des abeilles testées (Chapitre 1, 2, p : 93). Certaines abeilles multiplieraient plus efficacement le virus, conduisant à des charges virales plus élevées dans les abeilles ayant succombé à la co-exposition, alors que les charges virales des abeilles survivantes restaient identiques quelque soient les modalités d'exposition ou co-exposition. D'autres tolèreraient une augmentation des charges virales, puisque lors d'une deuxième expérience la mortalité n'a pas été affectée lors de la co-exposition, alors que les charges virales ont augmenté sous l'effet du pesticide (Chapitre 1, 3, p : 123). Notamment, les charges virales dépassaient le seuil de développement des symptômes de la paralysie

chronique, soulignant l'existence d'un effet de déclenchement d'infections apparentes par le pesticide. Certaines abeilles parmi les survivantes présentaient effectivement des symptômes typiques de la paralysie chronique, tels que des tremblements ou un abdomen distendu (signes cliniques observés lors d'expérimentations en cagette - mais non mesurés objectivement).

Les différences observées entre les deux expériences soulignent, bien qu'elles aient été réalisées en laboratoire, l'importance des variations individuelles et des conditions environnementales s'appliquant aux colonies dont proviennent les abeilles. Ainsi toutes les colonies et les individus qui les composent ne sont pas égaux face aux stress. En effet, comme il a été discuté précédemment (Chapitre 1, 3, p : 123) les colonies dont provenaient les abeilles n'étaient pas dans les mêmes conditions pour chaque expérience. Les premières expérimentations avaient utilisé des abeilles issues de colonies « au champ », en été, se nourrissant d'elles-mêmes ; alors que la seconde expérience recourait à des abeilles provenant de colonies conservées à l'intérieur d'un rucher hivernal à température constante, avec un nourrissage contrôlé. Il a en effet été observé des effets de la température sur la physiologie des abeilles (Bordier et al., 2017), et il a été observé une transmission possible de pathogènes à travers la nourriture (Mazzei et al., 2014; Singh et al., 2010). La qualité de la nourriture, contrôlée ou non suivant nos expériences, est également connue pour avoir des effets significatifs sur les colonies et individus (Alaux et al., 2010b; Di Pasquale et al., 2013; Huang, 2012; Mao et al., 2013). Il a également été discuté (Chapitre 1, 2, p : 93) que des différences de fond génétique pourraient influencer sur la tolérance, comme il a été observé chez la drosophile (Corby-Harris et al., 2007).

Cette tolérance plus ou moins forte expliquerait le fait que certaines colonies pourraient être plus susceptibles, après une exposition à un stress tel qu'un pesticide, de déclarer des infections avec symptômes visibles et caractérisés, voire de dépasser un seuil (théorique) de non-retour pouvant conduire à une perte de la colonie (Bryden et al., 2013; Nazzi et al., 2012).

A ces effets observés en laboratoire s'ajoutent des effets sur le comportement observés *in situ*, c'est-à-dire en conditions naturelles directement dans les colonies, cette fois ci avec le thiaméthoxam en exposition aigue et en interaction avec le DWV (Chapitre 2, 1, p : 157). L'effet négatif du thiaméthoxam à faible dose sur les retours à la ruche démontré par (Henry et al., 2012) a été également observé lors de mes travaux. Un effet synergique de la co-

exposition est aussi observé sur l'âge de première sortie de butinage, extrêmement précoce pour les abeilles co-exposées au thiaméthoxam à raison de 1 ng par abeille. Dans les conditions environnementales, ces synergies peuvent être lourdes d'impact. En effet, compte tenu de l'utilisation intensive du thiaméthoxam (Efsa, 2013), les abeilles ont une forte probabilité d'y être exposées au moins une fois dans leur vie. Les doses que nous avons testées, voire des doses plus élevées, ont été décelées dans différentes espèces végétales, dans les conditions environnementales (Botías et al., 2015; Efsa, 2013). Dans un même temps, la présence ubiquitaire de *Varroa* dans le monde et sa capacité à multiplier et ensuite transmettre le virus par injection entraîne une forte prévalence du DWV qui augmente la probabilité d'une co-exposition naturelle au virus et au thiaméthoxam. Les effets négatifs de la co-exposition pourraient ainsi être assez répandus dans les colonies d'abeilles domestiques. De plus, ces effets pourraient impacter la dynamique de développement de la colonie, comme démontré par (Henry et al., 2016).

Comme indiqué dans l'*Introduction générale* (§ 1, p : 19), les abeilles se répartissent les tâches dans la ruche selon un polyéthisme d'âge, où les plus jeunes s'occupent du couvain quand les plus vieilles butinent, en passant par d'autres castes entre ces deux extrêmes (Winston, 1987). Cependant, les âges auxquels elles passent d'une caste à l'autre peuvent changer en fonction des conditions dans laquelle la ruche se trouve, et surtout de la taille de la population. Plus la population est forte, plus elles auront tendance à devenir butineuses tard dans leur vie, tant que le nombre de butineuses est suffisant pour subvenir aux besoins de la colonie (Perry et al., 2016). Si les abeilles quittent la ruche à des âges très précoces, souvent sans revenir (elle ne sont pas adaptées physiologiquement aux tâches d'une butineuse (Vance et al., 2009)), cela peut entraîner un cercle vicieux où un nombre plus important d'abeilles vont devenir à leur tour butineuses afin de les remplacer (Robinson, 1992). Ceci va affaiblir la colonie en poussant des abeilles de plus en plus jeunes et de moins en moins « qualifiées » à aller butiner, diminuant les performances de collecte de nourriture, ce qui diminuera la résilience de la colonie, et pourra à terme entraîner son effondrement (Perry et al., 2016). On retrouve ici la notion d'équilibre des colonies, et d'un seuil spécifique pouvant entraîner son déclin s'il est atteint suite à des conditions défavorables à la colonie (Bryden et al., 2013). Cet équilibre est d'autant plus précaire que les colonies peuvent être infectées par plusieurs virus en même temps (Chen et al., 2004), et bien sûr être exposées à plusieurs pesticides (notamment des fongicides, très présents en agriculture). Par exemple, la co-exposition au

champ à du boscalide et du thiaméthoxam double les effets délétères de ce dernier sur les mortalités, l'immunité sociale et la perte de reines (Tsvetkov et al., 2017)).

Afin de comprendre les processus impliqués dans les effets délétères observés lors de co-exposition, j'ai étudié la transcription de gènes liés à l'immunité et la détoxification dans les deux expériences (co-exposition du thiaméthoxam avec le CBPV ou le DWV). J'ai par exemple confirmé avec le CBPV les observations effectuées par Nazzi et al., 2012 concernant le facteur *dorsal-1a*, facteur de transcription permettant de contrôler les infections virales, qui avait été observé comme régulé négativement en présence de DWV. Ce gène était également régulé négativement par l'exposition au pesticide, ce qui avait été observé précédemment avec la clothianidine par (Di Prisco et al., 2013), et relié, comme lors de mon expérience avec CBPV, avec une augmentation des charges virales. Dans le cas de la co-exposition avec DWV, ces effets n'ont pas été observés ; cependant les abeilles étaient déjà naturellement déjà infectées par le DWV, ce qui peut biaiser ces résultats, le gène pouvant être déjà impacté par cette infection dans toutes les conditions testées. Finalement j'ai mis en évidence que l'infection virale par le CBPV avait un effet négatif sur des gènes liés à la détoxification. Néanmoins, un suivi de la métabolisation du thiaméthoxam dans le cadre d'une co-exposition n'a pas mis en évidence d'effet sur la cinétique de détoxification. Il pourrait exister d'autres voies que nous n'avons pas testées. Dans les deux expériences, j'ai observé une diminution significative de la transcription de la vitéllogénine causée par l'infection virale. Dans le cas de l'expérience utilisant le DWV, j'ai pu relier ce résultat aux sorties précoces précédemment citées, la vitéllogénine. Cette protéine entre en jeu dans la régulation du vieillissement chez l'abeille ; lorsque sa quantité diminue, l'abeille progresse dans les castes de façon plus précoce (Amdam, 2011). L'analyse de ces premiers résultats montre la nécessité d'études plus exhaustives de la transcription de gènes de la détoxification comme de l'immunité. Il faudrait en premier lieu tester d'autres représentants de la famille CYP450 (voir *Introduction générale*, § 6, d, p : 69), ou utiliser la technique du séquençage des ARN transcrits (RNA-seq) sur de nouveaux échantillons, ce qui pourrait nous permettre de mettre en lumière d'autres voies de détoxification.

Enfin, la séquence des co-expositions n'a pas été étudiée. En effet, dans toutes les expériences présentées dans cette thèse, les abeilles étaient exposées simultanément au pesticide et au virus. Dans les colonies, les abeilles pourraient être infectées par le virus d'abord, puis exposées aux pesticides ; l'inverse pourrait aussi être vrai, concernant des pesticides contenus

dans les cires ou dans les pollens. L'étude de ces différentes séquences permettrait d'évaluer de façon exhaustive l'effet des co-expositions. Des études ont précédemment démontré par exemple que des abeilles infectées par *Nosema ceranae*, puis exposées au DWV présentaient, 4 jours plus tard, des charges virales moindres comparées aux abeilles exposées d'abord au DWV puis à *N. ceranae*, et plus faibles encore que celles exposées uniquement au DWV au même âge (Doublet et al., 2015b). En plus de nous renseigner sur les effets de séquence, cette expérience suggère qu'une interaction entre le DWV et *N. ceranae* pourrait être de nature antagoniste, et que les deux pathogènes pourraient partager les mêmes sites d'infection. Une autre étude a démontré que des abeilles infectées par *N. ceranae* et exposées au fipronil présentaient un effet synergique de la co-exposition sur la mortalité, quel que soit l'ordre suivant lequel les stress étaient appliqués (Aufauvre et al., 2012).

Les interactions observées lors de mes expérimentations pourraient être expliquées par les réponses générales mises en place par l'abeille pour résister au stress immunitaire et au stress provenant du thiaméthoxam. En effet, les pesticides représentant un stress relativement récent à l'échelle de l'évolution des espèces, les abeilles n'ont pas encore, à notre connaissance, développé d'adaptations spécifiques à ce stress (Bordier et al., 2017), bien qu'elles possèdent un système de métabolisation des xénobiotiques fonctionnel (Berenbaum and Johnson, 2015). En dépit d'avoir recherché des effets du thiaméthoxam et même de l'infection virale sur certains composants de ce système de métabolisation des xénobiotiques, nous n'avons pas pu mettre en évidence une réponse spécifique répétable au thiaméthoxam. Les réponses aux infections, bien que correspondant à ce qui avait déjà été démontré dans la littérature, semblent relever elles aussi de l'immunité générale, avec par exemple les diminutions de transcription de *vitellogénine* et de *dorsal-1a* qui se retrouvent lors de chaque exposition au virus, mais aussi pour *dorsal-1a* lors de l'exposition chronique au thiaméthoxam. Les virus ont également été observés comme pouvant déclencher la plupart des réponses immunitaires présentes chez l'abeille, sans distinction (Brutscher et al., 2015). La réponse comportementale de sorties précoces que nous avons observée avait également été précédemment rapportée lors d'une exposition au DWV seul (Benaets et al., 2017), mais aussi sous des pressions très fortes d'infestations à *Varroa* (Downey et al., 2000), des infections à *Nosema apis* (Wang and Moeller, 1970), ou une anesthésie au CO₂ au début de leur vie (Woyciechowski and Moron, 2009). L'abeille semble donc présenter des réponses plutôt non spécifiques aux stress testés.

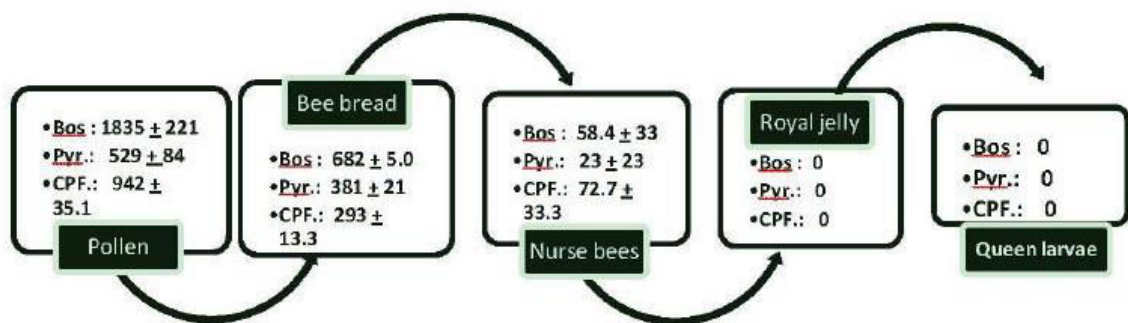


Figure 30 : Dilution des quantités en pesticides dans les colonies d'*Apis mellifera* (Degrandi-hoffman et al., 2013).

Bos = boscalide (fongicide), Pyr=pyraclostrobine (fongicide), CPF= chlorpyrifos (insecticide organophosphoré). Quantités données en ppb (partie par milliard).

Des approfondissements sur les différentes réponses, capacités de résistance ou tolérance aux xénobiotiques de l'abeille domestique sont encore nécessaires, quoique déjà abordées par (Laurino et al., 2013; Rinkevich et al., 2015), mais à notre connaissance pas encore étudiées dans le cas des infections virales. Le génome de l'abeille n'a été séquencé que récemment (2006), et la caractérisation des différentes populations génétiques se développe (Weinstock et al., 2006; Wragg et al., 2016). Des expérimentations sur la sensibilité aux infections virales d'abeilles dont le fond génétique est connu pourront faire avancer les connaissances sur le sujet.

De façon plus large, la question de ces interactions se pose pour tous les pollinisateurs en général, mettant en danger les cultures qui, comme il a été expliqué, ne dépendent pas uniquement du service de pollinisation de l'abeille domestique. En effet, les néonicotinoïdes, dont le thiaméthoxam, et nombre d'autres pesticides sont à ce jour présents et persistants dans plusieurs compartiments écologiques tels que les eaux de surface (Miranda et al., 2011), les eaux profondes (van der Sluijs et al., 2013) ; les sols (Bonmatin et al., 2015), et réincorporés dans les plantes, cultivées ou non, qui y poussent (Botías et al., 2015; Krupke et al., 2012). De ce fait, les abeilles domestiques mais également tous les pollinisateurs ont une très grande probabilité d'entrer en contact ou d'ingérer ces pesticides. Des effets négatifs ont déjà été observés chez le bourdon exposé à l'imidaclopride, qui cause une baisse du taux de développement des colonies et de la production de reines (Whitehorn et al., 2012). Une autre étude, en champs traités avec un mélange de clothianidine et d'un pyréthroïde, a observé sur les bourdons également une baisse du développement des colonies, mais aussi une baisse du taux de nidification d'une espèce d'osmie, ainsi qu'une baisse de la densité d'abeilles sauvages butinant les parcelles (Rundlöf et al., 2015).

Cette ubiquité est en réalité d'autant plus dommageable pour les pollinisateurs sauvages (Rundlöf et al., 2015) que pour l'abeille domestique, car contrairement aux colonies d'*Apis mellifera*, les abeilles sauvages ne possèdent pas de colonie, ou alors des colonies non pérennes (une saison pour une colonie de bourdons (Derveau, 2015)). L'absence d'une organisation sociale en colonie ne permet donc pas aux pollinisateurs sauvages de bénéficier de l'effet tampon du nombre d'individus, ce qui rend la perte d'individus solitaires plus dommageable pour la population, ni de l'effet de dilution des pesticides dans les nectars et pollens observés le long des échanges entre castes chez l'abeille domestique (pollué chez les

Detection and proof of infection or replication of honey bee viruses in managed and wild pollinator insects. (See below-mentioned references for further information.)

	DWV/VDV-1	BQCV	ABPV/KBV/ IAPV	SBV /CSBV	CBPV	SBPV	LSV1/LSV2	AmFV	ALPV	BSRV	BeeMLV	References
<i>A. mellifera</i> *	++	++	+++//++	++	++	++	++	++	++	+	++	Bailey, 1965; Bailey et al., 1963; Bailey et al., 1964; Bailey and Woods, 1974; Bailey and Woods, 1977; Bowen-Walker et al., 1999; Chen et al., 2004; Clark, 1978; Gauthier et al., 2011; Granberg et al., 2013; Maori et al., 2007; Ravoet et al., 2014; Ravoet et al., 2015a; Ravoet et al., 2013; Runckel et al., 2011
<i>A. cerana</i> *	++	++	+//++//+	++	+	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ai et al., 2012; Allen and Ball, 1995; Bailey et al., 1982; Forsgren et al., 2015; Kojima et al., 2011; Wang et al., 2015
<i>B. agrorum</i>	Ø	Ø	++/Ø/Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964
<i>B. atratus</i>	+	+	+/-/-	+	-	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Gamboa et al., 2015; Reynaldi et al., 2013
<i>B. hortorum</i>	Ø	+	++/Ø/Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964
<i>B. huntii</i>	++	++	Ø/Ø/Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Li et al., 2011; Peng et al., 2011
<i>B. ignitus</i> *	+	+	Ø/+//+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Choi et al., 2010
<i>B. impatiens</i> *	+	+	+//+//+	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Levitt et al., 2013; Sachman-Ruiz et al., 2015; Singh et al., 2010
<i>B. lapidarius</i>	+	+	+/Ø/Ø	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	-	+	Fürst et al., 2014; McMahon et al., 2015; Parmentier et al., 2016
<i>B. lucorum</i> *	+	+	++/Ø/Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964; Fürst et al., 2014; McMahon et al., 2015
<i>B. pascuorum</i>	++	+	+/Ø/Ø	Ø	Ø	+	++	Ø	Ø	-	+	Genersch et al., 2006; McMahon et al., 2015; Parmentier et al., 2016
<i>B. pratorum</i>	Ø	Ø	Ø/Ø/Ø	Ø	Ø	-	+	Ø	Ø	-	+	Parmentier et al., 2016
<i>B. ruderarius</i>	Ø	Ø	++/Ø/Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964
<i>B. ternarius</i>	+	+	Ø/-//+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Singh et al., 2010
<i>B. terrestris</i> *	++	+	+++//+++	+	+	++	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964; Choi et al., 2015; Choi et al., 2010; Fürst et al., 2014; Genersch et al., 2006; Meeus et al., 2014; Niu et al., 2016
<i>B. vagans</i>	+	+	Ø/-//+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Singh et al., 2010
<i>M. scutellaris</i> *	-	-	+/-/-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ueira-Vieira et al., 2015
<i>O. cornuta</i> *	++	+	-/-/-	-	-	-	++	+	-	-	+	Mazzei et al., 2014; Ravoet et al., 2014; Ravoet et al., 2015a
<i>O. bicornis</i> *	+	-	-/-/-	-	-	-	+	+	-	-	+	Ravoet et al., 2014

Note: (+), molecular detection of viral genomes; (++) proof of viral replication; (-), not yet detected; (Ø), not yet analyzed; DWV, deformed wing virus; VDV-1, *Varroa destructor* virus-1; ABPV, acute bee paralysis virus; SBV, sacbrood virus; CSBV, Chinese sacbrood virus; IAPV, Israeli acute paralysis virus; CBPV, chronic bee paralysis virus; KBV, Kashmir bee virus; SBPV, slow bee paralysis virus; LSV, Lake Sinai virus strain 1 and strain 2; AmFV: *Apis mellifera* filamentous virus; ALPV, aphid lethal paralysis virus; BSRV, Big Sioux River virus; BeeMLV, Bee Macula-like virus; *A. mellifera*, *Apis mellifera*; *A. cerana*, *Apis cerana*; *B. agrorum*, *Bombus agrorum*; *B. atratus*, *Bombus atratus*; *B. hortorum*, *Bombus hortorum*; *B. huntii*, *Bombus huntii*; *B. ignitus*, *Bombus ignitus*; *B. impatiens*, *Bombus impatiens*; *B. lapidarius*, *Bombus lapidarius*; *B. lucorum*, *Bombus lucorum*; *B. pascuorum*, *Bombus pascuorum*; *B. pratorum*, *Bombus pratorum*; *B. ruderarius*, *Bombus ruderarius*; *B. ternarius*, *Bombus ternarius*; *B. terrestris*: *Bombus terrestris*, *B. vagans*, *Bombus vagans*; *M. scutellaris*, *Melipona scutellaris*; *O. cornuta*, *Osmia cornuta*; *O. bicornis*, *Osmia bicornis*; managed and commercialized species are highlighted by an asterisk.

Figure 31 : Détection et infection par les virus de l'abeille domestique dans des abeilles sauvages et autres pollinisateurs proches testés.

(+) détection, (++) preuve de réplication, (-) non encore détecté, (Ø) non encore analysé (Gisder and Genersch, 2017).

butineuses, puis de moins en moins jusqu'à la reine et les larves (figure 30) (Degrandi-hoffman et al., 2013). Les colonies d'abeilles domestiques seraient donc, par leur organisation, plus tolérantes aux expositions aux pesticides que les abeilles solitaires.

De plus, les virus généralement nommés « virus de l'abeille » ne sont pas forcément spécifiques d'*Apis mellifera*. En effet, le DWV par exemple est à présent reconnu comme étant un virus possédant un large spectre d'hôtes plutôt que comme un virus de l'abeille domestique uniquement (figure 30). Le virus a été retrouvé chez dix espèces de bourdons et deux espèces d'osmies, et pourrait se répliquer chez *Apis mellifera*, mais aussi *A. cerana*, trois espèces de bourdons et une espèce d'osmie (*Osmia cornuta* – figure 31) (Gisder and Genersch, 2017). Ce spectre est d'autant plus potentiellement large que la réplication est également effective chez l'acarien *Varroa destructor*, de la classe des arachnides, bien éloigné des insectes hyménoptères (Yue and Genersch, 2005). Le CBPV a également été découvert dans des fourmis (Celle et al., 2008). De plus, la détection des virus recherchés par PCR ou qPCR pourrait sous-estimer les infections et transmissions à d'autres hôtes compte tenu de l'existence de variants (Mordecai et al., 2015) et de recombinants (Dalmon et al., 2017).

Indépendamment de la notion de réservoir naturel, l'abeille domestique est de plus en plus pointée du doigt, avec d'autres pollinisateurs devenus domestiques (quelques espèces de bourdons, l'abeille *Melipona sp.*, une espèce d'osmie) (Gisder and Genersch, 2017), pour sa capacité à répandre des virus dans l'environnement. En effet la domestication concentre les individus et donc les maladies, augmente leur prévalence et rend plus facile la transmission au sein des populations domestiquées, également par la potentielle baisse de diversité génétique entre les colonies (Colla et al., 2006). Les pollinisateurs domestiques ils pourront ainsi transmettre les virus de façon passive à travers le pollen (Mazzei et al., 2014; Singh et al., 2010) ou le dépôt de fèces sur les fleurs (Rivière et al., 2007), par exemple.

De fait, l'omniprésence des virus et des pesticides dans l'environnement des abeilles sauvages suggère fortement que les co-expositions sont tout aussi probables que comme nous l'avons démontré dans les colonies d'abeilles. Une méta-analyse suggère que la corrélation générale entre les résultats obtenus sur *Apis mellifera* et ceux sur abeilles sauvages est plutôt bonne,

mais il reste nécessaire de développer des protocoles d'études sur d'autres espèces, en commençant tout d'abord par exemple par celles déjà ou en voie de domestication.

En conclusion, les résultats obtenus lors de cette thèse complètent le corpus de preuves sur la dangerosité des néonicotinoïdes pour les abeilles, en ajoutant à la longue liste des effets connus leur capacité à aggraver voire à potentialiser (par des interactions synergiques) des infections virales déjà présentes chez l'abeille, même à des doses environnementales n'ayant que peu voire pas d'effet mesurés seules. Par ailleurs, ces expériences soulignent qu'il est nécessaire de prendre en compte non seulement les facteurs de stress de l'abeille et l'abeille elle-même, mais également sa colonie d'origine et son environnement. Enfin, l'observation d'effets délétères lors des co-expositions renforce la nécessité de tester les effets cocktails de pesticides, puisque beaucoup d'entre eux peuvent se retrouver simultanément dans l'environnement de l'abeille. Il a notamment été démontré des interactions de certains insecticides retrouvés dans les ruches avec des acaricides utilisés pour lutter contre le *Varroa* (Johnson et al., 2009b). Finalement, il est nécessaire de prendre en compte la possibilité que ces interactions observées chez les abeilles domestiques aient des effets délétères également sur les pollinisateurs sauvages compte tenu de leur capacité de résilience réduite due à l'absence de socialité.