

Le virus de la paralysie chronique, ou CBPV

Le CBPV est différent des autres virus des abeilles, par son classement, sa forme, sa taille, ses symptômes et sa répartition. Ses signes cliniques sont connus depuis l'antiquité, avec notamment des abeilles noires et sans poils décrites comme des « voleuses » venues piller la ruche par Aristote (Ribière et al., 2010). Le CBPV est bien connu des apiculteurs sous le nom de maladie noire, ou de mal de mai.

Une partie des symptômes de la paralysie chronique se traduit par des abeilles ayant perdu leurs poils, ce qui leur donne un aspect très différent, et/ou ayant pris une couleur noire et un aspect brillant (Figure 8 B). Cependant les symptômes les plus caractéristiques sont des tremblements, des abeilles incapables de voler, des paralysies, et enfin une accumulation d'abeilles mortes en grande quantité devant les ruches. Ce dernier symptôme peut être confondu avec les symptômes induits par des expositions aigues aux pesticides (Johansen, 1977) (Figure 8 A).

Le CBPV est assez prévalent, notamment en France, mais ne présente qu'un faible taux de maladie déclarée (symptômes visibles communiqués par les apiculteurs) (2% de signes cliniques, EPILOBEE entre 2012 et 2014 (Laurent et al., 2015)). Ce pourcentage restant plus élevé que dans tous les autres pays suivis dans le programme. En France une étude réalisée sur 360 colonies (Tentcheva et al., 2004) a mis en évidence que 28% des ruchers étaient infectés par le CBPV, mais peu de colonies infectées (moins de 4% des colonies échantillonnées en été). En Autriche, seulement 10% des ruchers testés étaient infectés (Berényi et al., 2006) et aucun en Hongrie (Forgách et al., 2008).

Le CBPV n'appartient pas à l'ordre des *Picornavirales* contrairement à la majorité des virus qui infectent l'abeille domestique. Le CBPV n'est pas encore classifié, mais il a pour l'instant été rapproché des familles *Nodaviridae* (une famille de virus à ARN positif simple brin généralement segmentés en 2 segments, de capsidie icosaédrique, non enveloppés, infectant des invertébrés et des vertébrés, notamment des poissons) et *Tombusviridae* (une famille de virus à ARN positif simple brin en général non segmentés, de capsidie icosaédrique, non enveloppés, infectants principalement des plantes) (ICTV, <https://talk.ictvonline.org>,

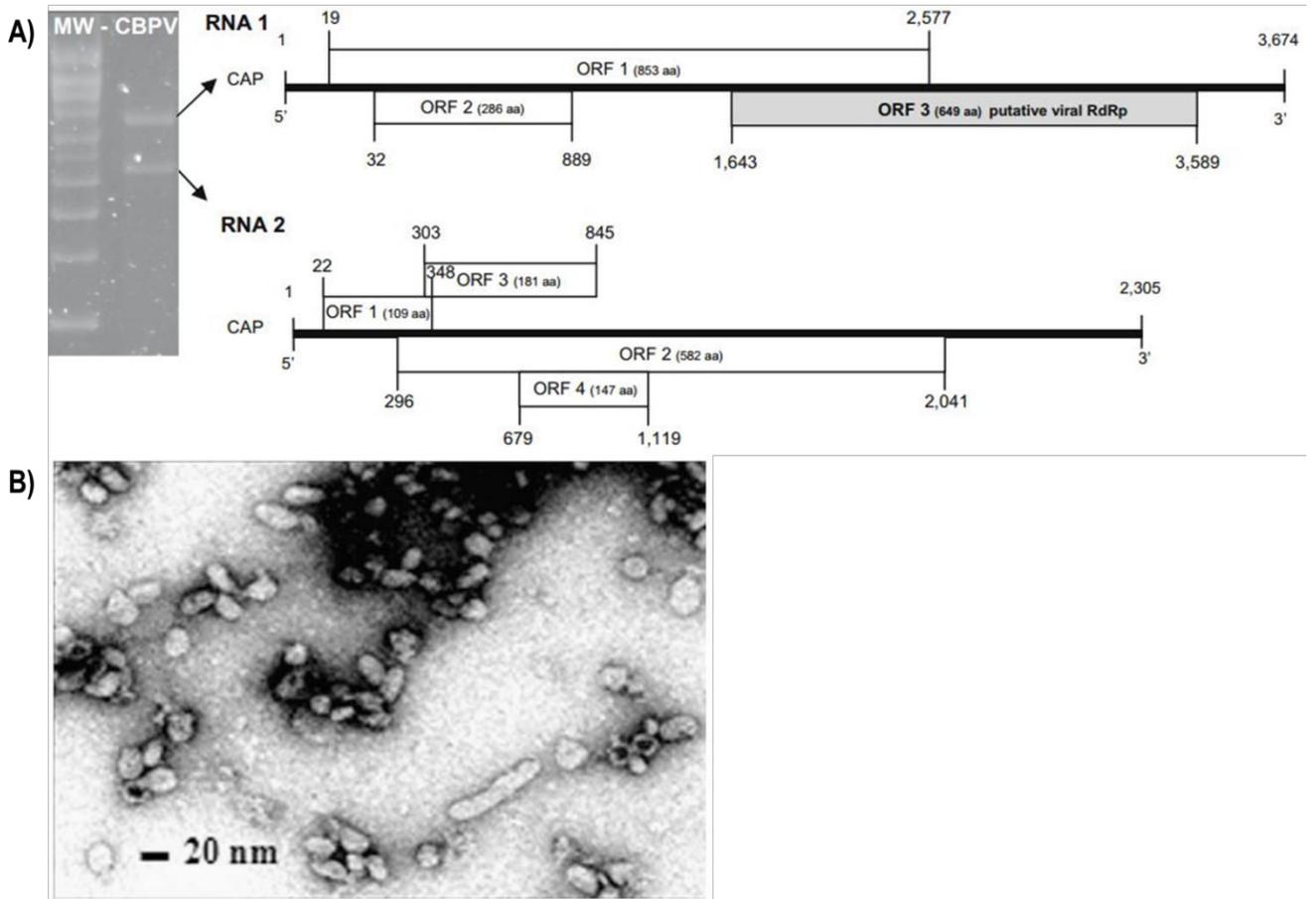


Figure 11 : Structure et génome du CBPV.

A) Structure du génome et B) photographie en microscopie électronique du CBPV (tiré de Ribière et al., 2010)

consulté le 07/08/2017) (Figure 11 B). Il est parfois identifié comme un *Parachrovirus* (pour paralysie chronique, classification créée pour le CBPV) (Blanchard et al., 2007).

i) Structure, classification

Le CBPV possède une capsidie anisométrique (ne présentant pas de géométrie particulière) de 20 à 60 nm. Son génome est composé de deux segments d'ARN positif, simple brin (figure 11 A). Le segment 1, de 3674 bases, possède 3 cadres ouverts de lecture (ORF) chevauchants ; le segment 2, de 2305 bases, présente 4 ORF chevauchants. Ces segments ne possèdent pas de queue poly-A en 3' mais sont coiffés à leur extrémité 5'. Il est prédit que l'ORF3 du segment 1 code pour l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), tandis que les ORF2 et 3 du brin 2 pourraient encoder des protéines structurales (Blanchard et al., 2012; Olivier et al., 2008; Ribière et al., 2010, 2007; Youssef et al., 2015).

Le CBPV démontre un certain neurotropisme, ce qui est cohérent avec les symptômes de paralysie qu'il cause (Chevin et al., 2012; Olivier et al., 2008; Ribière et al., 2007). Les mécanismes d'action spécifiques du CBPV sur les cellules ne sont pas encore connus.

ii) Ecologie

Il n'existe aucune évidence de transmission du CBPV par l'acarien *Varroa destructor* (Celle et al., 2008). Les infections inapparentes (*covert*), identifiées comme étant nombreuses pour ce virus, peuvent cependant évoluer en infections apparentes (*overt*), avec signes cliniques visibles, après que les abeilles de ruches populeuses ont été confinées pour de longues périodes de temps, en général en sortie d'hivernage et dû à un temps médiocre au printemps (Ribière et al., 2010). Ce virus est en effet capable de se transmettre de façon horizontale, outre par trophallaxie ou transmission oro-fécale, seulement par contact, en particulier lorsque les abeilles se frottent les unes contre les autres, abrasant leur cuticule (Ribière et al., 2010).

La plupart des ruches positives pour le CBPV mais sans signes cliniques possèdent des taux de virus par abeille détectables, souvent quantifiables mais relativement bas, aux

alentours de 10^4 copies de génome par abeille (la limite de quantification pour le CBPV se situant à $10^{3.9}$ copies de génome par abeille (Blanchard et al., 2007)). Ce taux est plus élevé chez les individus développant des symptômes, où il dépasse généralement 10^8 copies de génome de CBPV par abeille (Blanchard et al., 2012; Chevin et al., 2012).

L'intérêt porté dans cette thèse au CBPV est lié à plusieurs rapports internes à l'ANSES sur l'observation d'abeilles présentant certains symptômes coïncidant avec ceux du CBPV, comme des abeilles tremblantes et incapables de voler, et/ou des tas d'abeilles mortes, devant des ruches qui auraient été exposées, ou butinant près de champs de colza traités au Cruiser®, un pesticide contenant du thiaméthoxam (ANSES, 2015).

e) Les réponses de l'abeille aux pathogènes

D'autres pathogènes que les virus affectent les abeilles. Cependant à quelques exceptions près, les réponses immunitaires individuelles ou sociales que déploient les abeilles ne sont pas spécifiques et s'appliquent à plusieurs, et peut-être à tous les pathogènes susceptibles de les infecter (Doublet et al., 2017; Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010).

i) Immunité sociale

La vie en colonies de plusieurs milliers d'individus réunis en un seul endroit peut présenter des avantages comme des inconvénients. En effet, la colonie, avec sa relative homéostasie, notamment sa température relativement stable autour du couvain (environ 34°C) (Bruneau et al., 2006), une humidité forte et régulée, une concentration de ressources venant de l'extérieur, ainsi que sa forte densité d'individus génétiquement proches (demi-sœurs), est une cible très attractive pour les parasites et les pathogènes (Evans and Spivak, 2010; Gherman et al., 2014).

Cependant, elle offre également, tout spécifiquement pour l'abeille domestique, une grande variété de barrières et comportements sociaux permettant de diminuer, voire d'éliminer ces pathogènes et parasites.

Les ouvrières de la colonie sont capables de développer des interactions comportementales coordonnées telles que le toilettage (ou épouillage) – de l'abeille elle-même, ou le toilettage mutuel entre abeilles, ou certains comportements hygiéniques spécifiques. Les abeilles détectent et éliminent, par éjection de la ruche ou cannibalisme, le couvain infesté par des parasites (type *Varroa*) et/ou infecté par des pathogènes (virus ou bactéries), et les abeilles malades ou mortes (Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010).

Les abeilles peuvent aussi réguler ou modifier l'environnement interne de leur colonie de plusieurs façons (Evans and Spivak, 2010). L'environnement peut par exemple être modifié par l'apport et l'application de mixtures de résines de plantes appelées propolis, possédant des propriétés antifongiques et antibiotiques. Il a été observé qu'un apport de propolis réduisait l'investissement individuel des abeilles dans leur immunité, notamment en entraînant une baisse des coûts énergétiques pour ces abeilles (Simone et al., 2016). Les abeilles ont également à leur disposition dans leur nourriture (nectar, pollen, miel) des éléments antifongiques et antibiotiques. Elles sont capables de changer d'alimentation pour contrer une infection. Ainsi, des abeilles infectées par *Nosema* choisiraient préférentiellement du miel de tournesol par rapport à d'autres miels : le miel de tournesol contient significativement plus de molécules antibiotiques, et aurait pour effet de diminuer significativement la quantité de microsporidies comparativement à d'autres miels (Gherman et al., 2014). La consommation de miel (en apportant de l'acide para-coumarique) a également été observée comme un déclencheur de certaines réponses immunitaires, telles que la production de peptides antimicrobiens (Mao et al., 2013).

L'essaimage d'une partie de la population peut permettre de diminuer les populations de certains parasites comme le *Varroa*, et de créer une nouvelle colonie moins parasitée (Kurze et al., 2016). En effet, le *Varroa* se reproduisant uniquement dans le couvain operculé, le nouvel essaim constitué d'abeilles adultes aura une pression parasitaire réduite. De plus, la période d'installation du nouvel essaim, sans couvain, va encore ralentir l'infestation (Fries et al., 2003; Kurze et al., 2016). L'essaimage pourrait ainsi permettre de freiner également les virus dont le *Varroa* est un vecteur (particulièrement le DWV et les virus du complexe AKI)(Kurze et al., 2016). Il existe également sur le même principe, particulièrement observé chez les abeilles africanisées, la stratégie de désertion (« absconding ») à des conditions trop défavorables. Toute la colonie quitte subitement la ruche en abandonnant le couvain et les réserves pour créer un nouveau nid (Kurze et al., 2016; Winston, 1987).

L'organisation sociale de la colonie peut aussi être une barrière à l'exposition, à la transmission, et à l'infection aux pathogènes. Elle peut être qualifiée d'« immunité organisationnelle » (Naug and Smith, 2007), l'organisation sociale de la colonie en castes séparées permettant de freiner la propagation des maladies. En effet, les abeilles qui effectuent les tâches hygiéniques telles que les éliminations de larves contaminées ou abeilles mortes sont déjà moins en contact avec la reine ni le couvain (tâches qu'elles effectuent plus jeunes, voir paragraphe 1, et figure 2). Les butineuses, qui sont potentiellement les plus infectées car en contact avec l'environnement extérieur (Mazzei et al., 2014; Singh et al., 2010), ne sont en contact avec les autres abeilles que pour restituer leurs collectes et quittent régulièrement la ruche, ce qui réduit encore les possibilités d'échange direct de pathogènes. Les abeilles infectées, notamment par *Nosema sp.* ou le SBV, sont connues pour avoir tendance à butiner plus tôt, ce qui réduit leurs chances de propager les pathogènes qu'elles portent (Bailey and Fernando, 1972; Hassanein, 1953).

Enfin, une dernière barrière de la colonie à la transmission et l'infection par les parasites et pathogènes peut-être apportée par la multiplication des mâles avec lesquels une reine va s'accoupler : en effet ceci apporte une diversité génétique des individus au sein de la ruche (demi-sœurs), ce qui peut freiner la propagation des maladies (Brutscher et al., 2015; Evans and Spivak, 2010). Mais cet éventuel effet bénéfique peut être contrebalancé par la transmission de pathogènes lors de l'accouplement (Amiri et al., 2016).

La colonie a besoin d'un nombre important d'individus pour maintenir son homéostasie et son développement optimal – il a été observé qu'une trop forte perte de population peut entraîner un effondrement par perte de résilience (Perry et al., 2016). Cependant, une multiplication extrême des individus dans un environnement clos augmentera le risque de transmission des pathogènes (par exemple du CBPV) par multiplication des contacts et relations entre individus (Evans and Spivak, 2010; Ribière et al., 2010).

ii) *Immunité individuelle*

En plus de l'immunité apportée par la colonie, les abeilles déploient des réponses immunitaires individuelles. L'immunité acquise (anticorps) n'ayant à ce jour pas été observée chez les insectes, on ne parlera ici que d'immunité « innée ».

Les abeilles, contrairement aux insectes modèles *Drosophila melanogaster* (mouche drosophile) et *Anopheles gambiae* (moustique anophèle), possèdent une proportion réduite (environ 1/3 seulement) de gènes codant pour des éléments entrant en jeu dans la réponse immunitaire (Evans et al., 2006). Ceci pourrait être expliqué par l'existence de l'immunité sociale et donc un investissement moindre dans l'immunité individuelle. Cependant, la plupart des composants de base des voies de réponse immunitaire connues chez *D. melanogaster* et *An. gambiae* sont présents chez l'abeille domestique.

Les stratégies individuelles généralement développées par les insectes regroupent : la barrière physique et physiologique de l'épithélium et de la cuticule, épaisse, qui peut produire dans certains cas des sécrétions antimicrobiennes, un environnement intestinal hostile aux pathogènes (pH bas), et enfin des réponses cellulaires et humorales. Les réponses cellulaires servent principalement à l'immobilisation des pathogènes, par les hémocytes circulants dans l'hémolymphe (les plasmatocytes et lamellocytes qui phagocytent ou encapsulent les agents pathogènes, et les cellules à cristaux qui permettent la mélanisation, qui va conduire à « l'étouffement » du pathogène en fixant des molécules de mélanine tout autour, puis à la phagocytose). Les réponses cellulaires (ou humorales) utilisant des cascades de signalisation, (conduisant à la production de peptides antimicrobiens (AMP) ou d'autres protéines effectrices et/ou enzymes de dégradation) s'effectuent en général dans le corps gras. On observe également la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'ARN-interférence (RNAi), qui est un des mécanismes majeurs de la réponse antivirale chez les drosophiles et les anophèles (Brutscher et al., 2015; Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010).

Il existe chez l'abeille quatre voies différentes de signalisation : Toll, Imd, Jak/STAT et JNK (figure 12).

Brièvement, la voie Toll, au départ découverte chez les drosophiles, est à la fois une voie impliquée dans l'immunité et le développement de l'insecte, et réagit principalement aux bactéries Gram-positives et aux champignons. Les récepteurs Toll et Toll-like sont des protéines transmembranaires capables de reconnaître certains motifs moléculaires spécifiques. La partie qui se trouve à la surface des membranes cellulaires va réagir à la fixation de molécules « cytokine-likes » (cytokine : molécule de signalisation cellulaire générale) telles

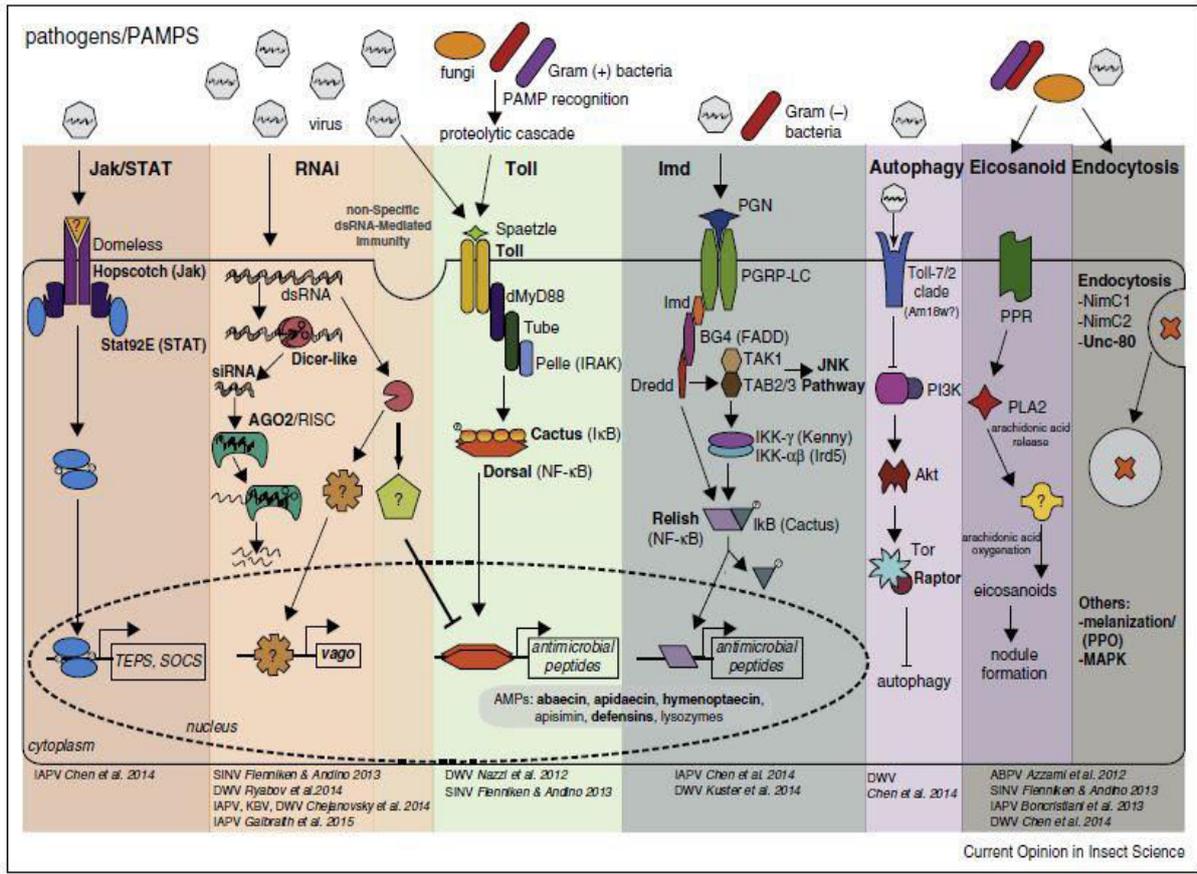


Figure 12 : l'immunité antivirale chez *Apis mellifera* (tiré de Brutscher et al., 2015)

Légende : Jak/STAT = Janus kinase/transducteurs de signaux et activateurs de transcription ; TEPS= protéines contenant des thioester ; SOCS = suppresseurs du signal des cytokines ; RNAi = ARN interférence ; dsRNA = ARN double brin ; siRNA = petits ARN interférents ; Ago2 = protéine Argonaute ; RISC = complexes ribo-protéiques (Agaisse et al., 2004) ; PAMPs = motifs moléculaires associés aux pathogènes ; PGN = protéines reconnaissant le peptidoglycane ; PGRP-LC = protéines reconnaissant le peptidoglycane LC ; JNK = c-Jun N-terminales Kinases ; PPO = Pro-phenoloxydase ; MAPK = protéines kinases activées par la mitose ; NF-κB = facteur nucléaire κB (Brutscher et al., 2015)

que Spätzle, et former un complexe. La formation et l'activation de ce complexe vont entraîner la dégradation de l'inhibiteur de la voie NFκB Cactus (IκB, inhibiteur de κB). La voie NFκB (pour Nuclear Factor κB) ainsi libérée provoquera la transcription, traduction, puis la translocation dans le noyau du facteur de transcription Dorsal, ce qui aboutira à la production d'effecteurs tels que des AMP (Anti-Microbial Peptides ou peptides anti-

microbiens) ou des lysozymes (Brutscher et al., 2015; Evans et al., 2006). L'abeille possède cinq AMP (l'abaecin, apidaecin, hymenoptaecin, apisimin, defensin), qui sont de petites protéines aux propriétés antibiotiques variées selon les pathogènes et les voies de signalisation qu'ils déclenchent. L'abeille possède également des lysozymes ; ce sont des glycosides hydrolases : elles catalysent l'hydrolyse du peptidoglycane des bactéries Gram positives, détruisant ainsi leur paroi (Evans et al., 2006).

Voies de signalisation :

La voie Imd (pour « immune deficiency », déficience immunitaire) est plus spécifique à la défense antimicrobienne et réagit surtout aux champignons et aux bactéries Gram-négatives. Suivant le même type de cascade que la voie Toll, puisque le composant de la voie NFκB libéré par Cactus est ici Relish aboutissant également à la production d'AMP, ou à l'activation d'une mélanisation par l'intermédiaire de la pro-phénoloxydase. Cette voie peut également mener à l'activation de la voie JNK (pour c-Jun N-terminales Kinases), (Evans et al., 2006). La voie JNK est ainsi associée à la voie Imd car elle joue un rôle clé dans le devenir des cellules, leur morphogénèse et les réponses de ces dernières aux stress, et donc peut conduire à l'apoptose de la cellule infectée.

La voie Jak/STAT (pour Janus kinase/transducteurs de signaux et activateurs de transcription) réagit aux bactéries et virus (chez la drosophile). Elle permet l'induction d'une multitude de signaux et de facteurs complémentaires et une prolifération des hémocytes. Chez la drosophile, son activation stimule l'activité phagocytaire des hémocytes (Evans et al., 2006). Elle est communément associée aux infections virales chez les insectes et est probablement une réponse au stress et aux dommages cellulaires dus à l'infection (Brutscher et al., 2015).

Les virus ont été très peu étudiés comme cibles de ces différentes voies de la réponse immunitaire. Les cascades de transduction ont été surtout étudiées dans le cadre d'infections fongiques ou bactériennes d'autres insectes (Brutscher et al., 2015; Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010). Cependant, plusieurs expériences ont observé l'activation de l'une ou de plusieurs de ces voies lors d'une infection virale. Dorsal, effecteur de la voie Toll, codé par le gène *dorsal-1A* chez l'abeille, a été observé comme étant un composant clé permettant de limiter l'infection par le DWV (Nazzi et al., 2012). Les auteurs montrent que si la transcription de *dorsal-1A* est diminuée, les charges en DWV augmentent de façon significative. Une hausse de l'expression de certains composants de la voie Toll (Toll-6, Cactus, et surtout Argonaute-2) a également été observée lors d'une infection par IAPV chez de jeunes abeilles ; cependant cette activation n'a pas été observée dans des abeilles infectées naturellement (Galbraith et al., 2015).

Bien qu'ils soient effectivement produits en réponse aux infections virales, le rôle spécifique des AMP (abaecine, apidaecine, hymenoptaecine, apisimine, defensines, ainsi que des lysosymes) dans la défense contre les virus est inconnu (Brutscher et al., 2015).

RNAi :

Une seule voie est connue pour être spécifique aux virus chez les insectes : la voie de l'ARN interférence. Cette voie est le mécanisme majeur de la défense antivirale chez les modèles drosophile et anophèle. C'est une réponse séquence-spécifique, qui interfère avec l'expression des gènes (gene silencing). Elle est déclenchée par la présence dans la cellule d'ARN double brin (ARNdb), qui est un intermédiaire de la réplication des virus à ARN (Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010). L'ARNdb peut ainsi être considéré comme un motif moléculaire associé aux virus, qui sera ciblé par le RNAi. La présence d'ARNdb dans la cellule va entraîner la production de siRNA (small interfering RNA, ou petits ARN interférents) par découpage de l'ARN double brin par l'endonucléase Dicer. Les petits ARN sont assemblés à un complexe ribo-protéique (Risc) dans lequel ils seront dégradés en ARN simple brin (ARNsb). Ces complexes pourront à leur tour se fixer sur de l'ARN à la séquence correspondante permettant son clivage par la protéine Ago2 (figure 13) ou promouvoir la production de la protéine vago. Vago est connue pour avoir une activité antivirale chez la drosophile et le moustique *Culex quinquefasciatus* (Blair and Olson, 2015). Divers tests

effectués en traitant ou prétraitant des abeilles avec des ARNdb spécifiques de certains virus avant ou pendant une infection par ces virus, ont montré des résultats significatifs, tels qu'une augmentation de la survie, une baisse des charges en IAPV (Maori et al., 2009), ainsi qu'une augmentation de la taille de la colonie et de la récolte de miel après que les colonies aient ingéré de la nourriture contenant des ARNdb spécifique de l'IAPV (Hunter et al., 2010). Un prétraitement avec des ARNdb de larves et d'adultes avant infection au DWV a également résulté en de plus faibles charges et une survie accrue (Desai et al., 2012). Ce mécanisme pourrait ne pas être complètement séquence-spécifique, puisque (Flenniken and Andino, 2013) ont montré une diminution des infection virales qui était indépendante de la séquence d'ARNdb administrée.

La diversité des résultats provenant d'études différentes sur les voies de l'immunité cellulaire souligne la spécificité et l'importance variable de chaque type de réponse dans le cadre de l'interaction entre un virus et l'abeille. Les différences d'observations peuvent également provenir de protocoles différents utilisés dans chacune des études (Brutscher et al., 2015). Par exemple les essais ont pu utiliser différents types d'infections : naturelle, injection, ou infection orale, différents temps post-infection auquel les tests et les dosages sont réalisés, ainsi que des variations plus difficiles à contrôler telles que des variations de souches dans les inocula de virus, des variations entre colonies, dans le microbiote des abeilles et/ou de la ruche elle-même, ou encore la présence préexistante d'autres pathogènes. Ainsi, des abeilles avec des fonds génétiques différents vont avoir des réponses différentes en fonction des infections auxquelles elles seront exposées, ou elles auront par exemple un nombre de cellules immunitaires circulantes plus ou moins élevé avant infection, et cela pourra engendrer des augmentations plus ou moins fortes de ce nombre ; ceci a été observé chez la drosophile (Lazzaro, 2004). Enfin, les interactions avec d'autres stress pourront également avoir un impact : ainsi il a été démontré que la transcription de *dorsal-1a* était diminuée uniquement quand *Varroa* et DWV étaient tous les deux présents (Nazzi et al., 2012).

iii) Tolérance versus résistance

La résistance est la capacité d'un organisme à limiter les quantités de pathogènes ou parasites. Ainsi, les réponses, immunitaires, sociales ou individuelles, aux pathogènes qui viennent d'être décrites font partie des phénomènes de résistance aux pathogènes. Cependant,

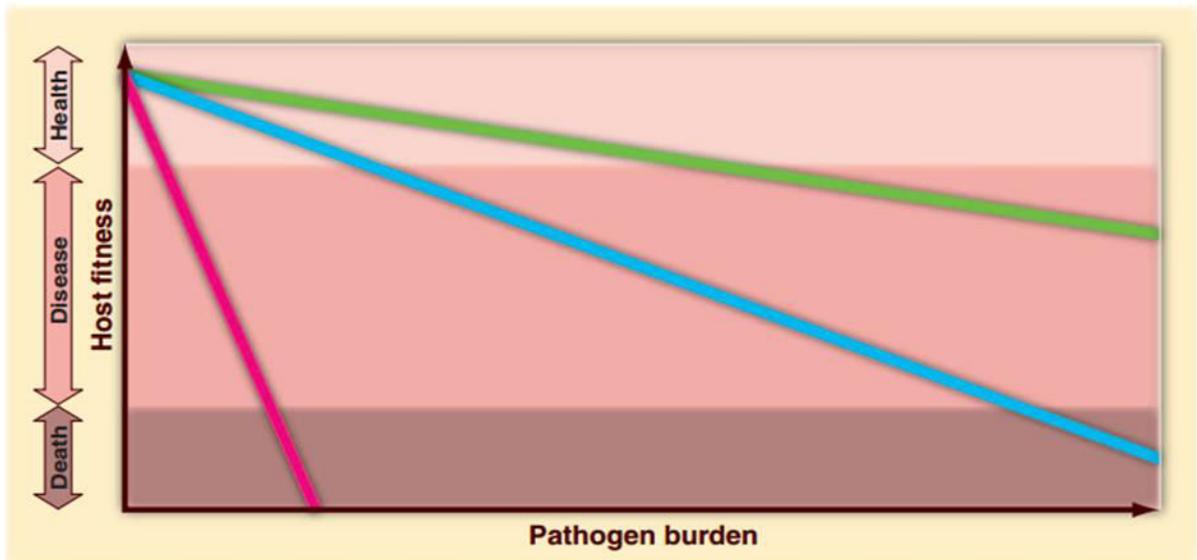


Fig. 2. Different tissues and physiological processes vary in tolerance capacity. Tissues depicted in red have the lowest tolerance to damage, the blue has an intermediate tolerance, and the green has the highest tolerance capacity.

Figure 13 : Variation de la tolérance de différents tissus et/ou processus physiologiques soumis à différentes charges pathogènes (tiré de Medzhitov et al., 2012).

il existe un autre type de réponse aux pathogènes qui peut permettre à l'organisme de conserver ses capacités adaptatives et à se reproduire (« fitness ») lors d'une infection : la tolérance. La tolérance limite l'impact des pathogènes sur l'individu, par des mécanismes n'étant pas en lien direct avec l'immunité (Evans and Spivak, 2010; Medzhitov et al., 2012; Schneider and Ayres, 2008). La tolérance pourrait également être envisagée comme englobant les mécanismes qui permettent de limiter l'impact que les réponses immunitaires peuvent avoir sur l'individu lui-même telles que le cout énergétique ou les détériorations de tissus associés à la résistance.

Ce type de réponse peut intervenir en complément des réponses de type résistance, mais peut également être une stratégie évolutive à part entière. En effet, la tolérance, en ne s'attaquant pas directement au pathogène, aura moins tendance à provoquer une course aux armements évolutive (théorie de la Reine Rouge (Liow et al., 2011)). Notamment, en l'absence de pression de sélection sur les pathogènes, la tolérance pourra permettre d'éviter de sélectionner les pathogènes les plus virulents (Schneider and Ayres, 2008).

Les biologistes des plantes, qui ont les premiers décrit cette notion de tolérance (Medzhitov et al., 2012; Soucha-Machado, 1982), la définissent comme correspondant à la pente d'une droite mettant en relation le phénotype d'un individu (sa santé, sa capacité reproductive, ou sa fitness) en fonction de différents environnements (stress) ou, ce qui nous intéresse ici, de quantités croissantes de parasites/pathogènes. La tolérance est appréciée en comparant les pentes de différentes droites issues de différents essais. Par exemple, les plantes plus tolérantes à une infection auront un meilleur état de santé général comparées à des plantes moins tolérantes ; la pente de la courbe tracée entre leur charge en pathogènes et leur santé sera donc plus faible (Medzhitov et al., 2012; Schneider and Ayres, 2008) (Figure 13).

Ce genre de réponse a été observé chez différentes souches de *Drosophila melanogaster* infectées avec une même souche identique de *Pseudomonas aeruginosa* : certaines des lignées infectées présentaient une quantité élevée de bactéries sans pour autant subir une mortalité aussi élevée que d'autres, et ce sans investir dans une réponse immunitaire coûteuse (Corby-Harris et al., 2007).

Les mécanismes entrant en jeu dans la tolérance sont encore mal connus et n'ont pas encore été décrits comme existant chez l'abeille. Cependant, chez la drosophile, il existe des

variations parfois très marquées entre lignées génétiques infectées par la même maladie, laissant penser que la tolérance pourrait être une stratégie développée aussi chez l'abeille en réponse à des pathogènes et des parasites. Des colonies ont été considérées comme tolérantes à *Varroa* car elle étaient toujours infestées tout en présentant des mortalités moindres ; cependant il a été observé dans certaines des comportements hygiéniques permettant de réduire le succès reproductif des acariens (Barbara Locke et al., 2012), tel que le VSH, pour *Varroa*-sensitive hygiene, où les abeilles désoperculent et éliminent le couvain infesté, bloquant la reproduction (Harbo and Harris, 2005). Il a été montré qu'elles pourraient désoperculer spécifiquement les cellules où le *Varroa* est effectivement en train de se reproduire (Ibrahim and Spivak, 2006). Ceci s'apparente plutôt à un caractère d'immunité sociale et donc à une résistance de la colonie.

La tolérance pourrait être une réponse clé aux stress chez l'abeille domestique. En effet, nous avons pu voir que ses réponses aux infections virales sont peu spécifiques, et nous allons voir dans le chapitre suivant ce qu'il en est pour les réponses aux pesticides. Ces derniers, comme il sera ensuite démontré, sont déjà suspectés d'aggraver certaines maladies des abeilles en ayant un effet sur le système immunitaire (Di Prisco et al., 2013; Sánchez-Bayo et al., 2016). Ainsi la tolérance, par sa demande moindre en investissement de l'individu dans les réponses de résistance immunitaire, pourrait permettre à l'abeille de contourner ce problème, en continuant à tempérer les effets des stress.

6) Les pesticides

Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, la production et l'usage des pesticides sont devenus de plus en plus répandus et de plus en plus intensifs, en France comme dans les autres pays (Stephenson, 2003). En facilitant l'agriculture intensive, et en diminuant de plus en plus les impacts des organismes parasites et pathogènes aux cultures, ils ont permis d'augmenter la productivité.

Le terme « pesticide » englobe différents produits permettant de se débarrasser de nuisibles (« pests » en anglais), qu'ils soient végétaux, animaux ou appartenant à d'autres ordres. Ils contiennent notamment les herbicides (plantes), les insecticides (insectes), les acaricides (acariens), les fongicides (champignons), rodenticides (rongeurs), etc...

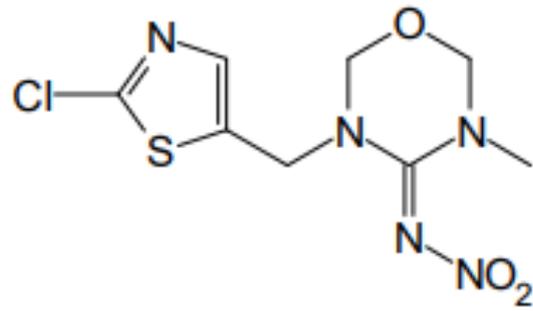
Les insecticides sont donc développés pour éliminer spécifiquement les insectes, qu'ils soient nuisibles ou parasites directement pour l'homme, comme les moustiques, ou ravageurs de cultures, tels que les pyrales, par exemple. Sur la seule année 2014, les insecticides, toutes catégories confondues, ont été utilisés en France à raison de 3483,9 tonnes de substance active (FAOSTATS, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>, consulté le 24/07/17).

Les insecticides sont souvent incriminés comme une des causes du déclin des abeilles (Goulson et al., 2015; S. G. Potts et al., 2010a; Sánchez-Bayo et al., 2016; Sanchez-Bayo and Goka, 2014). Parmi eux, les néonicotinoïdes sont de plus en plus souvent blâmés, notamment car leur utilisation semble avoir coïncidé avec l'émergence de phénomènes récurrents de pertes de colonies dans les années 2000. En effet, ils ont commencé à être commercialisés à grand échelle dans le monde à partir des années 1990 (première commercialisation de l'imidaclopride au Japon en 1991, démocratisation entre le milieu des années 1990 et le début des années 2000, utilisation en constante augmentation depuis (van der Sluijs et al., 2013)).

a) Les néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont une famille d'inhibiteurs des récepteurs acétylcholinergiques. Leur mode d'action est de se fixer avec une grande affinité sur les récepteurs à l'acétylcholine, impliqués dans le signal neuronal. Les molécules de néonicotinoïdes ainsi fixées aux récepteurs vont empêcher la fixation du neurotransmetteur effectif qu'est l'acétylcholine, bloquant le signal et surexcitant les cellules neuronales sur lesquels elles sont fixées, entraînant une paralysie et à plus ou moins long terme la mort (Nauen et al., 2003, Tomiwasa et al., 2003).

Les néonicotinoïdes représentaient en 2010 plus de 25% du marché des insecticides dans le monde (van der Sluijs et al., 2013). On leur attribue de plus en plus souvent de fortes mortalités chez les abeilles et des effets sublétaux aussi bien en laboratoire que sur le terrain, seuls (Aufauvre et al., 2012; Henry et al., 2012; Tison et al., 2016) ou en présence d'autres



thiamethoxam

Figure 14 : Structure chimique du thiaméthoxam (FAO)

facteurs de stress (Alaux et al., 2010a; Doublet et al., 2015a; Nazzi and Pennacchio, 2014; Vidau et al., 2011) ou la reine (Dussaubat et al., 2016).

Sept principales molécules de la classe des néonicotinoïdes sont utilisées dans le monde. Elles se répartissent en deux groupes selon la nature d'un de leurs substituants.

Les cyanoguanidines possèdent un groupement cyano- (CN) sur l'un de leurs cycles, et les deux néonicotinoïdes qui contiennent ce groupement, le thiaclopride et l'acétamipride, sont considérés comme les néonicotinoïdes les moins toxiques pour les abeilles (DL50 thiaclopride orale 17,32 µg/abeille, acétamipride 14,53 µg/abeille, contre thiaméthoxam 0.005 µg/abeille (=5ng/abeille)) (Efsa, 2013; Laurino et al., 2011; AGRITOX, <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php>, consulté le 24/07/2017). La DL50 représente la dose à laquelle 50% de la population testée meurt, généralement observé 48h après exposition.

Les nitroguanidines possèdent eux un groupement nitro- (NO₂). Ils regroupent tous les autres néonicotinoïdes, à savoir : l'imidaclopride, le nitenpyram, le dinotefuran, le thiaméthoxam et la clothianidine. La clothianidine, le nitenpyram et le dinotefuran ne sont pas autorisés en France (<https://ephy.anses.fr/>, consulté le 24/07/2017)(Blacquièrre et al., 2012; van der Sluijs et al., 2013).

Seront développés dans les prochains paragraphes les caractéristiques du thiaméthoxam, mais également de la clothianidine, son métabolite principal dans les plantes et les insectes, y compris les abeilles (Nauen et al., 2003). Le thiaméthoxam (figure 14) a été choisi après les observations faites par l'ANSES sur des abeilles présentant des symptômes proches de paralysie près de champs traités au Cruiser® (ANSES, 2012), et surtout compte tenu de son utilisation extensive en enrobage de semences, dont celles de colza, très attractif pour les abeilles (Simon-Delso et al., 2015). La clothianidine est également décrite plus en détail, car même si le potentiel de dégradation du thiaméthoxam en sa molécule fille est connu, il est peu étudié et il est possible, par la métabolisation, que l'on observe peut-être les effets de la clothianidine plutôt que les effets du thiaméthoxam lorsqu'on expose les insectes au thiaméthoxam.

i) Le thiaméthoxam

Le thiaméthoxam est un des néonicotinoïdes les plus utilisés dans le monde à l'heure actuelle, en tant que pesticide vaporisé sur les cultures (commercialisé en France pour cet usage par Syngenta sous le nom d'Actara®), mais surtout en tant que pesticide systémique en enrobage de semences de maïs et de colza (Cruiser®) (Maienfisch et al., 2001; Nauen et al., 2003; van der Sluijs et al., 2013). Les molécules systémiques ont la particularité de pouvoir circuler dans le système vasculaire de la plante et ainsi de pouvoir migrer dans tous les tissus. Ainsi on peut retrouver du thiaméthoxam et d'autres néonicotinoïdes systémiques dans le nectar ou le pollen produit par la plante alors que seule la graine a été au départ enrobée avec le pesticide.

Le thiaméthoxam est également connu pour être métabolisé assez rapidement en clothianidine par les plantes et les insectes (Benzidane et al., 2010; Nauen et al., 2003). Il existe également 31 autres métabolites du thiaméthoxam, mais ils se retrouvent en quantité négligeable dans les organismes (Benzidane et al., 2010; Casida, 2011; FAO and Hamilton, n.d.; Maienfisch et al., 2001).

Le thiaméthoxam, bien qu'étant un néonicotinoïde, a un mode d'action légèrement différent (principalement de l'imidaclopride) et ne semble pas s'attacher de la même façon aux récepteurs, voire aux mêmes récepteurs, que les autres insecticides de la même famille (Maienfisch et al., 2001). Une partie de ses effets pourraient ainsi être imputés à la clothianidine, puisque la métabolisation est très rapide (Benzidane et al., 2010). Le thiaméthoxam possède une DL50 orale à 48h évaluée entre 4.41ng par abeille (Laurino et al., 2011) et 5ng par abeille (AGRITOX, <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php>, consulté le 24/07/2017).

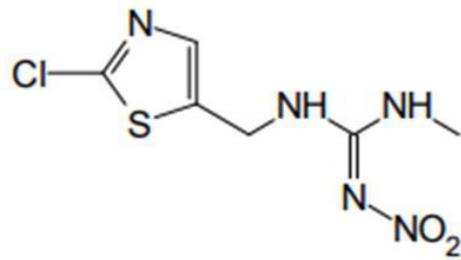
Plusieurs études ont établi qu'il existait des effets délétères du thiaméthoxam sur l'abeille domestique. Ainsi il a été observé une réduction significative de la mémoire olfactive d'ouvrières, ainsi qu'une détérioration des performances d'apprentissages (Y Aliouane et al., 2009). Ont également été observés des effets sublétaux sur les larves, qui prennent une couleur marron, et voient leur période de transformation en nymphe significativement retardée (Grillone et al., 2017). Une exposition continue à des doses sublétales a été

démontrée comme pouvant endommager le cerveau et l'appareil digestif d'abeilles africanisées (Catae et al., 2014; Oliveira et al., 2014). Les performances d'orientation de butineuses dans un labyrinthe complexe sont aussi affectées par le thiaméthoxam (Fourrier et al., 2009). Dans les colonies, de faibles doses de thiaméthoxam en exposition aiguë suffisent à affecter les vols de retour à la ruche (Henry et al., 2012b). Brièvement, des butineuses équipées de puces RFID ont été exposées à 1,34 ng de thiaméthoxam (dose environnementale) puis relâchées loin de leurs colonies. 10,2 à 31,6% de ces abeilles ont ensuite échoué à revenir à leur ruche. Cette étude conclut, en utilisant des modélisations, que la perte de ces butineuses pourrait impacter l'équilibre de la colonie, qui risquerait ainsi l'effondrement si les expositions étaient répétées.

Compte tenu des effets déjà connus du thiaméthoxam, et de son utilisation étendue, nous avons choisi d'étudier ses potentiels effets en interaction avec les deux virus précédemment cités, le DWV et le CBPV, dont la prévalence est elle aussi élevée.

ii) La clothianidine

La clothianidine (figure 15) est obtenue à partir du thiaméthoxam par clivage du composé oxadiazine (Casida, 2011)(figure 16). Cette métabolisation n'a cependant pas encore été étudiée en détail chez l'abeille domestique. La clothianidine est également commercialisée en tant qu'insecticide séparément du thiaméthoxam ; ce dernier peut être considéré comme une molécule précurseur plutôt que comme une molécule mère (Nauen et al., 2003). La clothianidine est commercialisée en France uniquement sous la forme de granules (<https://ephy.anses.fr/>, consulté le 24/07/2017). Elle est considérée comme étant légèrement plus toxique que le thiaméthoxam, possédant une DL50 orale à 48h entre 4 et 2.69 ng par abeille (Laurino et al., 2011) (AGRITOX, <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php>, consulté le 24/07/2017).



CGA 322704 = clothianidine

Figure 15 : Structure chimique de la clothianidine (FAO)

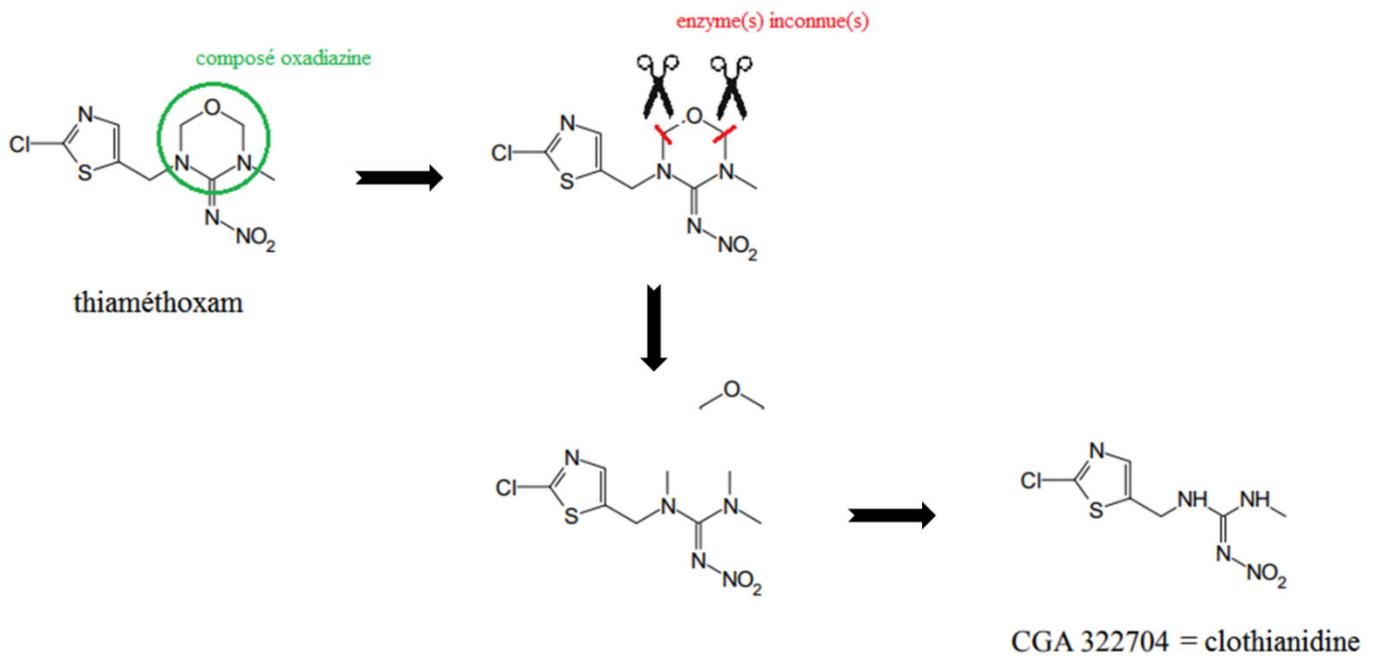


Figure 16 : Métabolisation du thiaméthoxam en clothianidine.

La clothianidine a été démontrée comme ayant un impact négatif sur les réponses cellulaires de l'immunité des abeilles à de fortes concentrations (Brandt et al., 2016). Elle cause également une réduction significative de l'activité de butinage, et un allongement des durées de vol chez des abeilles exposées au minimum à 0,5 ng (Schneider et al., 2012). Di Prisco et al., 2013 ont notamment observé que la clothianidine, dès 3 ng/abeille, inhibait chez l'abeille un facteur immunitaire, empêchant les individus de contrôler les infections de DWV DWV, ce qui entraînait une augmentation de la réplication du virus chez les abeilles exposées.

b) Règlementation

Il existe plusieurs réglementations en France, dans l'Union Européenne, et dans le monde. Les néonicotinoïdes sont déjà depuis quelques années perçus dans le domaine de la recherche sur les pollinisateurs mais également de façon grandissante par l'opinion publique comme étant l'une des causes du déclin des abeilles. Pour cette raison plusieurs réglementations ont vu le jour ces dernières années.

En Europe, un moratoire a suspendu l'utilisation de trois néonicotinoïdes entre 2013 et 2015 : l'imidaclopride, le thiaméthoxam et la clothianidine. Cependant, ce moratoire ne concernait pas tous les usages de ces pesticides (uniquement concentré sur l'utilisation en tant que pesticide systémique en enrobage des semences). Aujourd'hui, en 2017, il n'est pas encore possible à si court terme d'évaluer le bénéfice de cette interdiction sur la santé des colonies d'abeilles (Blacquière and van der Steen, 2017).

En France, la réglementation prend en compte les risques pour les abeilles depuis 2003 avec un arrêté interdisant la pulvérisation d'insecticides en période de floraison :

« En vue de protéger les abeilles et autres insectes pollinisateurs, les traitements réalisés au moyen d'insecticides et d'acaricides sont interdits durant toute la période de floraison, et pendant la période de production d'exsudats, quels que soient les produits et l'appareil applicateur utilisés, sur tous les peuplements forestiers et toutes les cultures visitées par ces insectes. » (Arrêté du 28 novembre 2003 relatif aux conditions d'utilisation des insecticides et acaricides à usage agricole en vue de protéger les abeilles et autres insectes pollinisateurs, article 2) (<https://www.legifrance.gouv.fr> consulté le 27/07/2017).

Il existe également depuis 2006 une « mention abeille » sur les pesticides, attribuée par l'Anses après expérimentations, qui permet aux substances possédant cette mention, jugées d'impact faible pour les pollinisateurs, de déroger au précédent arrêté (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/> consulté le 27/07/2018).

En parallèle, le gouvernement français, sur la base de nouveaux résultats obtenus par la recherche, et des recommandations notamment de l'Anses concernant l'impact des néonicotinoïdes sur les abeilles domestiques et sauvages et autres pollinisateurs, a décidé d'interdire totalement tout usage (sous réserves de dérogations) de pesticides néonicotinoïdes à partir du premier septembre 2018, amendement voté à l'assemblée nationale le 08 août 2016.

I. - La pulvérisation aérienne des produits phytopharmaceutiques est interdite.

En cas de danger sanitaire grave qui ne peut être maîtrisé par d'autres moyens, la pulvérisation aérienne de produits phytopharmaceutiques pour lutter contre ce danger peut être autorisée temporairement par arrêté conjoint des ministres chargés de l'environnement, de l'agriculture et de la santé.

II. - L'utilisation de produits phytopharmaceutiques contenant une ou des substances actives de la famille des néonicotinoïdes et de semences traitées avec ces produits est interdite à compter du 1er septembre 2018.

Des dérogations à l'interdiction mentionnée au premier alinéa du présent II peuvent être accordées jusqu'au 1er juillet 2020 par arrêté conjoint des ministres chargés de l'agriculture, de l'environnement et de la santé (Article L253-8 du Code rural et de la pêche maritime, <https://www.legifrance.gouv.fr>, consulté le 27/07/2017).

L'Anses est en outre l'organisme à présent chargé de délivrer les autorisations de mise sur le marché des produits sanitaires (AMM) depuis le 1^{er} juillet 2015.

c) Dans l'environnement

Lorsque les néonicotinoïdes sont appliqués en enrobage de semences ; seulement 1,6 à 20 % de substance active sera utilisée par la plante (van der Sluijs et al., 2013). Le reste se

retrouvera dans l'environnement. Leurs molécules, surtout l'acétamipride et le thiaméthoxam, étant facilement solubles dans l'eau, pourront être lessivées et contaminer les sols, s'étendre autour de la zone traitée et contaminer à terme les eaux de surfaces et les nappes phréatiques (Miranda et al., 2011; van der Sluijs et al., 2013). Ce lessivage sera d'intensité variable en fonction des types de sols, les néonicotinoïdes s'adsorbant préférentiellement aux sols contenant un fort taux de matières organiques (Selim et al., 2010). Le type d'utilisation des pesticides (enrobages, pulvérisation...) joue également un rôle ; en effet la présence de surfactants dans les préparations pour pulvérisation augmente la solubilité et la stabilité des composés dans l'eau et va donc augmenter leur potentiel de lessivage (Gupta et al., 2002). De plus, les néonicotinoïdes et leurs métabolites sont très persistants dans tous ces compartiments (sol, sédiments et eau). La clothianidine a par exemple une demi-vie dans le sol qui varie selon les estimations de 148 à 6900 jours (soit un peu plus de 18 ans)(van der Sluijs et al., 2013). Ces pesticides présentent donc un risque d'accumulation élevé dans les parcelles, dans les eaux de surface ou par adsorption aux sédiments , particulièrement dans le cas d'usages répétés (Haith, 2010).

Il est important de noter cette contamination de l'eau, puisque l'eau contaminée peut être puisée à nouveau par d'autres plantes (cultures suivantes sur la même parcelle, adventices si lessivage) et donc rendue à nouveau disponible pour les abeilles – ou même récoltée ou bue directement par elles (Botías et al., 2015; Krupke et al., 2012).

Par l'eau, la persistance dans le sol, ou par dérive des pulvérisations, des cultures non cibles ou des plantes non cultivées telle que des plantes adventices aux cultures ou des plantes sauvages poussant non loin des champs, peuvent être contaminées par des quantités plus ou moins fortes de pesticides (Botías et al., 2015; Krupke et al., 2012). Il a été démontré que les abeilles ont tendance à plutôt butiner des plantes sauvages ou adventices que des plantes cultivées (Long and Krupke, 2016). Ainsi, 97 % des néonicotinoïdes ramenés à la ruche par les abeilles dans le pollen ou le nectar ne provenait pas de plantes cultivées et traitées mais de plantes sauvages (Botías et al., 2015). Cela augmente les sources de contamination et rallonge les fenêtres d'exposition possibles par rapport à ce qui est généralement calculé par les agriculteurs et apiculteurs. Il y a donc un risque de sous-estimation de l'exposition aux néonicotinoïdes.

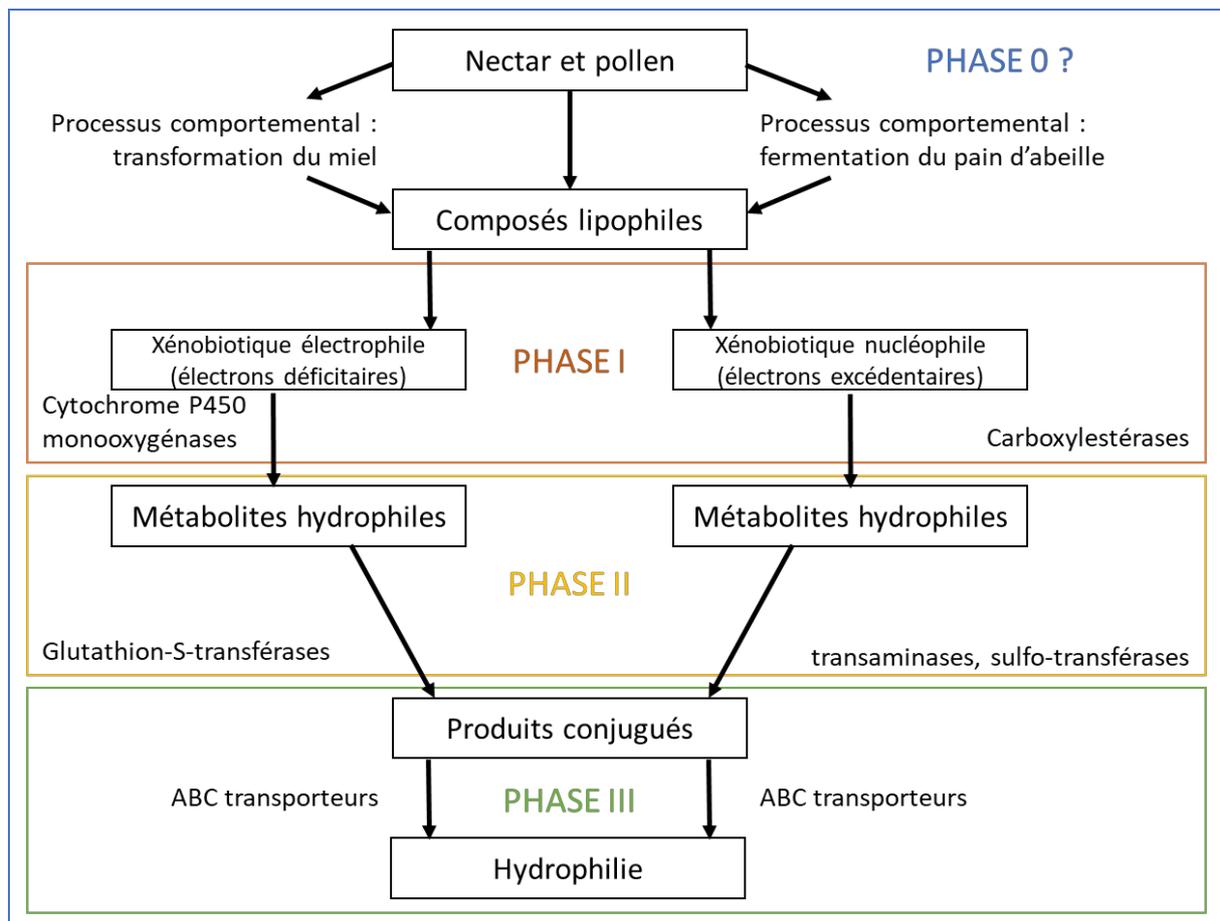


Figure 17 : Les différentes phases de détoxification des xénobiotiques chez l'abeille domestique (d'après Berenbaum and Johnson 2015).

d) La détoxification chez l'abeille

La détoxification des xénobiotiques, chez tous les organismes, se déroule généralement en trois phases successives : la phase 1 de fonctionnalisation du xénobiotique, la phase 2 de conjugaison, et enfin la phase 3 d'excrétion (Berenbaum and Johnson, 2015).

La phase 1 repose sur une altération enzymatique de la structure du xénobiotique qui le rendra incapable d'interagir avec les récepteurs qu'il cible ; elle est effectuée principalement par une famille de complexes protéiques appelés les cytochromes P450 (CYP), qui regroupe elle-même plusieurs sous familles aux fonctions et cibles différentes, et des carboxylestérases (CCE).

La phase 2 permet la conjugaison du xénobiotique avec une molécule qui permettra sa solubilisation et son excrétion ultérieure. Cette conjugaison, dans le cadre de la détoxification, se fait le plus souvent avec du glutathion, un tri-peptide présent en grande quantité dans les cellules, par l'intermédiaire de glutathionne-S-transférases (GST). Les GST peuvent également être considérées comme enzymes de la phase 1, car elles peuvent effectuer les conjugaisons directement et ainsi réduire le potentiel toxique du xénobiotique. Plusieurs autres enzymes peuvent effectuer des conjugaisons, telles que les glycosyltransférases, les phosphotransférases, les sulfotransférases, aminotransférases et glycosidases (Berenbaum and Johnson, 2015).

La phase 3 met en jeu le transport des molécules obtenues après conjugaison à la phase 2 en dehors des cellules, pour être ensuite excrétées hors de l'organisme. La plupart de ces transports sont effectués par les « multidrug resistance proteins » (protéine de résistance multiple) ou ATP-binding cassettes. Ces protéines hydrolysent l'ATP afin de pouvoir transporter des conjugaisons ou des molécules hydrophobes à travers les membranes lipidiques des cellules (Berenbaum and Johnson, 2015).

Tout comme pour les gènes codant pour des facteurs de l'immunité, les abeilles domestiques possèdent significativement moins de gènes associés à la détoxification des xénobiotiques que d'autres espèces d'insectes solitaires. Cela s'observe notamment pour les familles connues codant pour les cytochromes P450 (environ 46 gènes chez *A. mellifera* contre 85 chez *D. melanogaster* et 106 chez *An. gambiae*), les CCE (24 contre 35 et 51,

respectivement). Les abeilles possèdent environ la moitié des gènes codant pour des GST chez les autres insectes modèles. Cependant ces pertes de gènes ne sont pas régulières, et on observe chez l'abeille l'absence de certaines familles (CYP4) (Berenbaum and Johnson, 2015), mais également une augmentation de la proportion d'autres, notamment une plus grande proportion relative de CYP6 et CYP9 (famille CYP3) et des σ GST (Claudianos et al., 2006). Le CYP3A4, que l'on retrouve chez les mammifères, a été observé comme étant très efficace pour convertir le thiaméthoxam en clothianidine (Casida, 2011), les équivalents chez l'abeille se trouveraient dans les familles CYP6 et CYP9 (Claudianos et al., 2006). Ces deux sous-familles ont été observées comme entrant en jeu dans la résistance aux pyréthroïdes, DDT et néonicotinoïdes chez d'autres insectes (Daborn, 2002; Nikou et al., 2003).

Le faible nombre relatif de gènes de détoxification chez les abeilles suggère plus grande sensibilité aux pesticides par rapport à d'autres insectes. Cependant, il a été décrit que les abeilles n'étaient en fait pas significativement plus sensibles à la plupart d'entre eux ; voire parfois moins (Hardstone and Scott, 2010). Les abeilles pourraient paraître plus sensibles aux pesticides parce qu'elles sont en fait exposées à des pesticides multiples, les rendant vulnérables aux interactions entre xénobiotiques (Berenbaum and Johnson, 2015; Claudianos et al., 2006). Par exemple, l'exposition grandissante à des fongicides, qui s'accumulent dans les ruches (principalement les cires car ils sont très lipophiles), peut entraîner une diminution de la résistance à des insecticides par inhibition des cytochromes P450. Une grande partie des fongicides utilisés sont en effet des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols, qui inhibent les P450 des champignons (Berenbaum and Johnson, 2015; Iwasa et al., 2004; Johnson et al., 2013).

Il est intéressant de noter que l'alimentation, tout comme pour l'immunité, joue un rôle dans la détoxification. Tout d'abord parce que la détoxification a un coût énergétique que l'abeille devra compenser, ce qu'elle ne pourra pas faire, ou mal, si son alimentation n'est pas optimale (Berenbaum and Johnson, 2015). Il a été également observé que cette alimentation, en qualité comme en quantité, peut influencer sur la transcription de certains gènes liés à la détoxification. En effet, la présence dans le miel et surtout le pollen de certaines molécules, notamment l'acide para-coumarique (« p-coumaric acid »), augmente la transcription de gènes provenant de toutes les classes de détoxification, ainsi que certains peptides anti-microbiens (Mao et al., 2013). Il a ainsi été observé que des extraits de miel augmentaient la transcription de gènes des sous-familles CYP6AS et CYP9Q, et que de l'acide para-coumarique ajouté à du

sucres candi augmentait notamment le métabolisme de l'acaricide coumaphos de 60% dans l'intestin des abeilles (Mao et al., 2013).

L'alimentation chez les abeilles peut également contribuer à une certaine détoxification sociale. Ainsi, le taux de xénobiotiques dans la nourriture peut être diminué par dilution, après le mélange des nectars pour faire du miel ou celui des pollens pour faire du pain d'abeille. De plus, ces processus de transformations eux-mêmes pourraient diminuer le taux de toxines présents dans le produit fini par rapport au produit initial. Ceci se ferait principalement à cause des conditions physiques de la colonie pour le miel (température, pH), et par dégradation fongique pour le pain d'abeille. Le pain d'abeille contient également un nombre de bactéries commensales, ou symbiotiques de la ruche, qui sont reconnues comme bénéfiques (Anderson et al., 2011; Berenbaum and Johnson, 2015; Mao et al., 2013). Cette « détoxification sociale » ne s'arrête pas là : les abeilles possédant également des comportements spécifiques permettant de diminuer leur exposition : les butineuses sont ainsi capables de détecter et d'éviter certaines toxines, voire de ne plus retourner à une source si elles ont subi des effets indésirables. Les nourrices pourraient également « sceller » les alvéoles où elles détectent trop de fongicides (vanEngelsdorp et al., 2009). Cependant certains composés ne sont pas détectables et certains peuvent également être attractifs, notamment les néonicotinoïdes (Kessler et al., 2015).

Tout ceci souligne encore une fois l'importance de la nutrition pour les abeilles. Il souligne également le besoin de réexaminer les résultats obtenus en laboratoire (où les abeilles sont rarement nourries de pollen et de miel) et d'étendre les expérimentations au champ (Mao et al., 2013).

e) L'effet des pesticides sur l'immunité des abeilles

L'une des pistes possibles pour étudier une interaction potentielle entre le thiaméthoxam et les virus que nous avons choisis comme modèles, le DWV et le CBPV, est l'impact du pesticide sur les défenses immunitaires des abeilles. Il a été fréquemment rapporté qu'une exposition aux pesticides pouvait avoir un effet direct sur certains composants du système immunitaire, voire sur les défenses physiques ou les comportements empêchant les contagions chez les insectes en général et chez les abeilles en particulier (Berenbaum and Johnson, 2015;

Yu et al., 1984). Ainsi, les pesticides peuvent avoir un effet sur les réponses immunitaires humorales des insectes : la toxine *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) induit une augmentation de la production d'AMP chez plusieurs espèces (James and Xu, 2012). Ils peuvent également impacter les réponses cellulaires : les taux d'hémocytes sont connus pour augmenter suivant les réponses non seulement immunitaires mais également aux xénobiotiques. Certains organophosphates entraînent des variations de proportions entre les différents types

d'hémocytes, tandis que des cyclodienes et des organochlorés peuvent faire diminuer le taux d'encapsulation chez *D. melanogaster* (James and Xu, 2012). Finalement, certains pesticides peuvent avoir des effets sur l'immunité sociale : l'imidaclopride, en impactant le comportement de toilettage chez les termites, permet une augmentation des infections de ces organismes par un champignon entomopathogène (Boucias, 1996).

Spécifiquement chez l'abeille domestique, il existe des effets au niveau de l'immunité individuelle, puisque l'on sait qu'une exposition chronique au fipronil ou à l'imidaclopride diminue la transcription de gènes reliés à l'immunité, entraînant une hausse de la mortalité chez des abeilles préalablement infectées par *Nosema sp.* (Aufauvre et al., 2014). De plus, la clothianidine inhibe chez l'abeille un facteur de la voie NFκB, empêchant les individus de contrôler les infections virales, ce qui induit une augmentation de la réplication chez les abeilles exposées (Di Prisco et al., 2013). Il a aussi été observé une corrélation significative entre la présence de fongicides dans les ruches et le taux de virus dans les colonies (Simon-Delso et al., 2014), ainsi qu'une corrélation positive entre les traitements aux néonicotinoïdes, la présence de *Varroa* et celle de virus dans les ruches (Alburaki et al., 2015). Toutefois, on observe également des effets sur l'immunité sociale puisque l'imidaclopride est aussi connu pour diminuer l'activité glucose-oxydase, impliquée dans la production d'antiseptique H₂O₂, d'abeilles infectées par *N. ceranae* (Alaux et al., 2010a).

7) Des interactions ?

Tous les facteurs, virus, pesticides, et autres décrits précédemment sont présents dans l'environnement de l'abeille domestique. Ces stress peuvent s'exercer de façon simultanée ou successive. Le fait que les abeilles vivent en colonies de plusieurs milliers d'individus confinés dans une ruche est à la fois un moyen de protection contre les prédateurs (protection

mécanique de la ruche, présence de gardiennes) et les pathogènes (immunité sociale), mais également un endroit où peuvent se concentrer les facteurs de stress, au plus près du développement des individus (Evans and Spivak, 2010; Poquet et al., 2016). La concentration forte des abeilles au sein d'un espace réduit, de même que la socialité, entraîne une transmission facilitée des pathogènes et parasites, grâce notamment au comportement de trophallaxie. La ruche ne concentre pas que des individus, mais également des réserves de nourriture ramenées par les butineuses de plusieurs kilomètres aux alentours, et qui peuvent contenir d'autres pathogènes, mais également des pesticides de tous types (Poquet et al., 2016). Les pesticides, selon leur constitution chimique, peuvent être retrouvés de façon persistante dans les pollens, le miel et le pain d'abeille stocké, mais aussi dans les cires et autres produits de la ruche ; en effet, la plupart des pesticides ont tendance à s'accumuler dans les substances contenant un fort taux de lipides (Chauzat et al., 2011 ; Mullin et al., 2010). La concentration de pathogènes et de pesticides, est ainsi possible dans une même ruche, et les nombreuses interactions résultantes peuvent être préjudiciables à la santé des individus ou de la colonie tout entière.

Comme son nom l'indique, une interaction est une réaction réciproque de deux (voire plus) phénomènes l'un sur l'autre. Il existe trois types d'interaction (Doublet et al., 2015a; González-Varo et al., 2013; Holmstrup et al., 2010) (Doublet et al., 2014 ; Holmstrup et al., 2010):

- Une interaction antagoniste va résulter d'un effet négatif d'un premier facteur sur l'effet d'un second facteur
- Une interaction additive correspond au cumul des effets de chacun des facteurs
- Enfin, une interaction est synergique lorsque la résultante de l'application des effets de tous les facteurs est significativement plus forte que l'addition des effets individuels de ces facteurs.

Chez l'abeille, plusieurs interactions ont déjà été étudiées et démontrées entre certains facteurs de stress.

Les pesticides eux-mêmes peuvent interagir entre eux. Johnson et al., 2013 ont observé une augmentation synergique de la toxicité de l'acaricide tau-fluvalinate, utilisé dans les traitements contre *Varroa*, sur des abeilles ayant préalablement été exposées à divers fongicides. Ils avaient préalablement démontré une autre interaction synergique entre deux

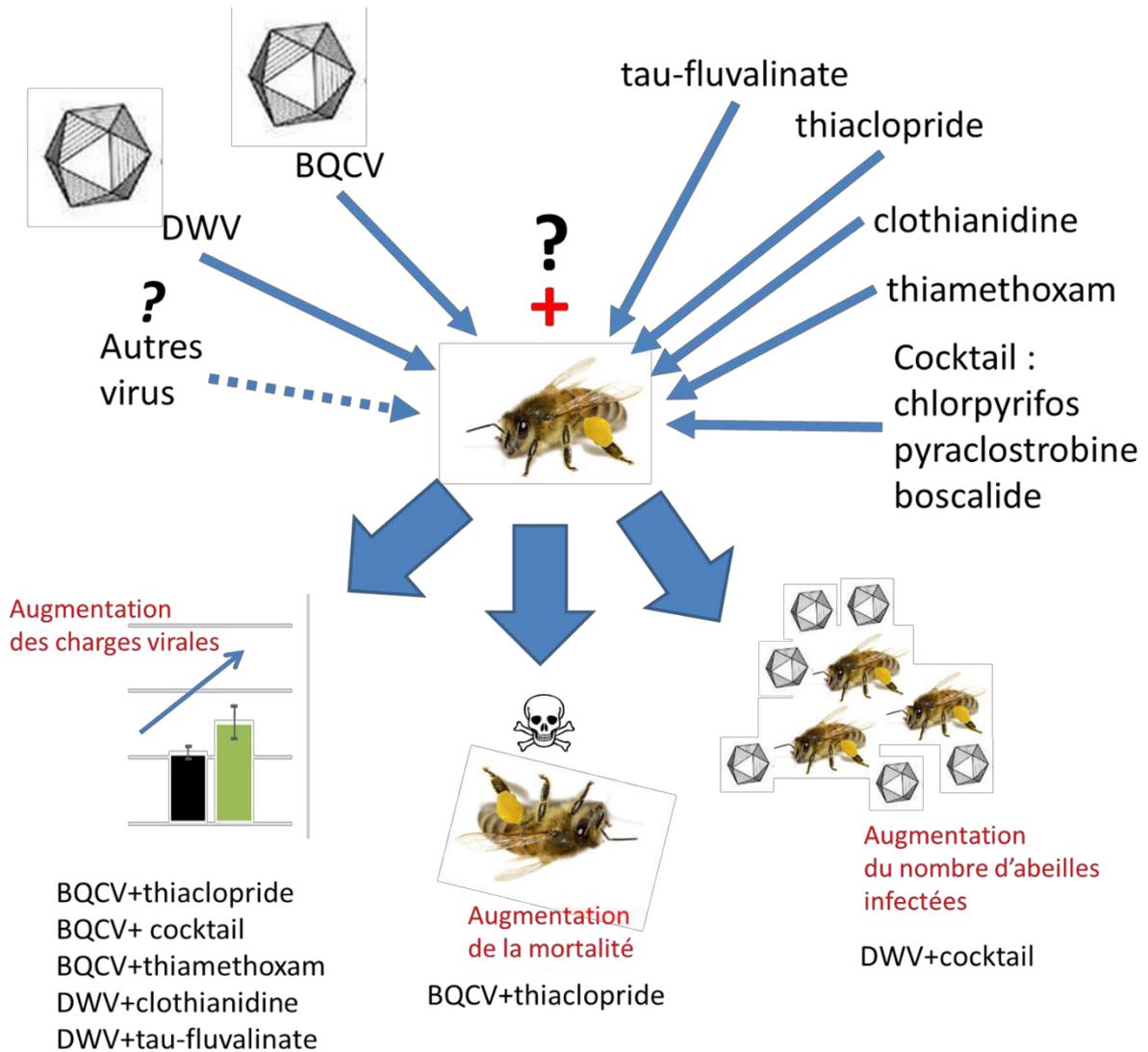


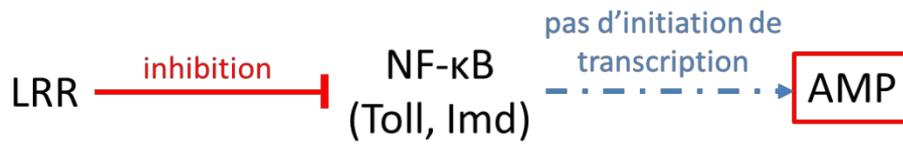
Figure 18 : Résumé des effets observés des interactions virus-pesticides déjà observées chez l'abeille domestique (d'après Alburaki et al., 2015; Degrandi-hoffman et al., 2013; Doublet et al., 2015; B Locke et al., 2012). Des interactions n'ont été observées que pour BQCV et DWV à l'heure actuelle.

acaricides, auxquels la colonie peut être simultanément exposée à cause de la stabilité de ces composants dans la ruche (Johnson et al., 2009a). Des interactions entre pathogènes et/ou parasites ont aussi été observées. En effet, le *Varroa* est considéré comme vecteur de plusieurs virus de l'abeille, dont le DWV, et 3 virus proches, l'ABPV, l'IAPV, et le KBV. Il a été démontré notamment une augmentation des charges en DWV sur des abeilles infestées par *Varroa*, entraînant par un effet synergique de la co-infection *Varroa/DWV* une surmortalité des abeilles pouvant mener à l'effondrement de la colonie (Nazzi et al., 2012). De même les charges virales en DWV ou en virus du complexe AKI sont corrélées avec les charges en *Varroa destructor* des colonies (Francis et al., 2013).

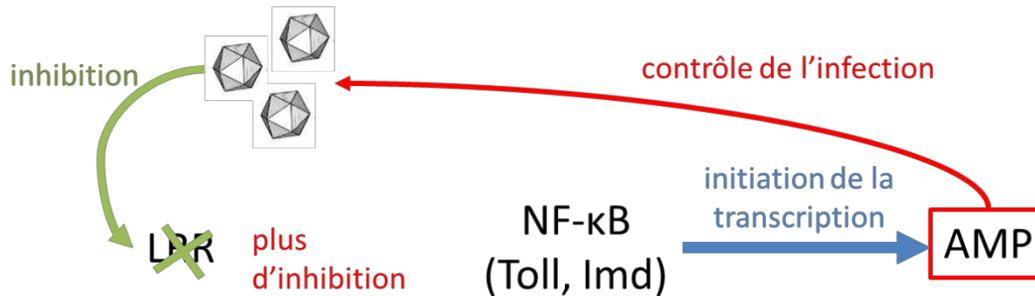
Par ailleurs, les pesticides et pathogènes peuvent interagir. Ainsi, une hausse de la mortalité des abeilles infectées par *Nosema ceranae* ou *spp.* a été observée après exposition de ces abeilles à des doses variables d'imidaclopride (Alaux et al., 2010), ou à des doses sublétales de fipronil et de thiaclopride (néonicotinoïde) (Vidau et al., 2011). Il a été observé que *Nosema spp.* interagit de façon synergique sur la mortalité des abeilles lorsqu'il est associé à une exposition au fipronil (phénylpyrazole)(Aufauvre et al., 2012). Une augmentation de la proportion d'abeilles infectées par *Nosema spp.* a également été démontrée, lorsque ces abeilles proviennent de cadres de couvain à fort taux de résidus de pesticides; ces abeilles étaient également infectées plus précocement par la microsporidie que lorsque les abeilles provenaient de cadres non contaminés (Wu et al., 2012). Enfin, il a été observé que de faibles doses d'imidaclopride augmentent les infections à *N. ceranae* dans les ruches exposées (Pettis et al., 2012a).

Enfin, les pesticides interagissent aussi avec les virus de l'abeille domestique (figure 18). Ainsi le BQCV se multiplie significativement plus dans des abeilles nourries avec un pollen contenant un cocktail de pesticides (chlorpyrifos (insecticide) + boscalide (fongicide) + pyraclostrobine (fongicide)) ; les mêmes auteurs ont également observé un taux d'infection au DWV plus élevé chez les larves de reines élevées dans des ruches contaminées aux pesticides (DeGrandi-Hoffman et al., 2013). Le BQCV, lorsqu'il est associé au thiaclopride, se multiplie significativement plus et provoque une augmentation synergique de la mortalité chez les larves d'abeille et n'a pas montré d'effet chez les adultes)(Doublet et al., 2015a). Une hausse des taux de DWV chez les abeilles a également été observée juste après un traitement au tau-

A: conditions sans stress



B: infection au DWV



C: infection au DWV et exposition à la clothianidine

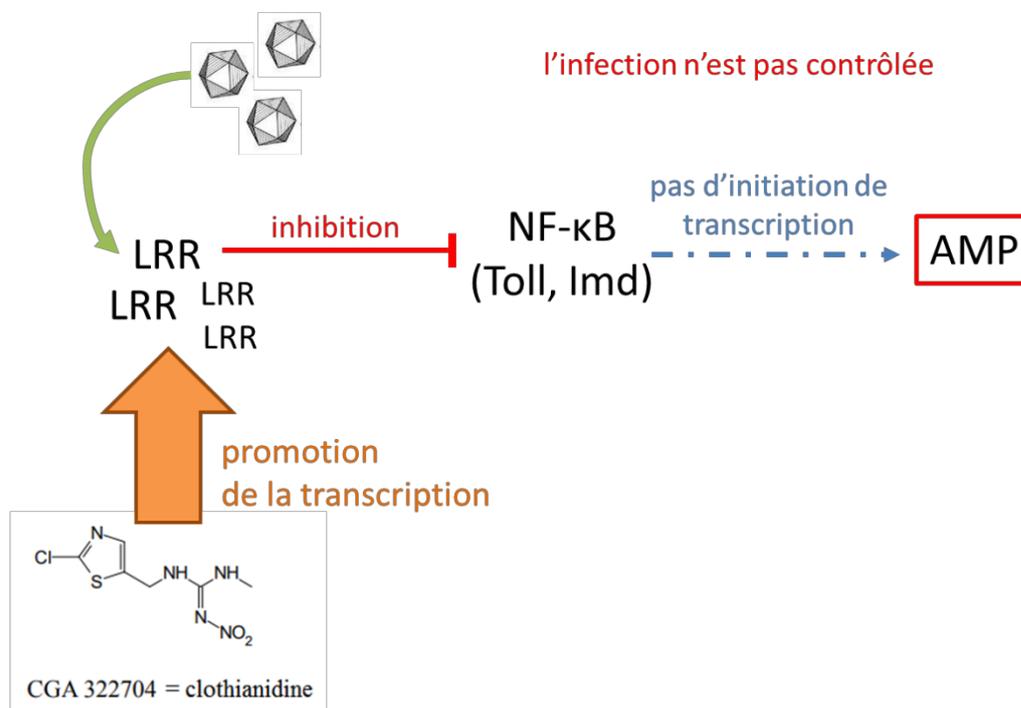


Figure 19: Modulation de la réponse des abeilles à une infection au DWV par la clothianidine (d'après Di Prisco et al., 2013).

A : conditions sans stress, B : infection au DWV, C : co-exposition clothianidine et DWV

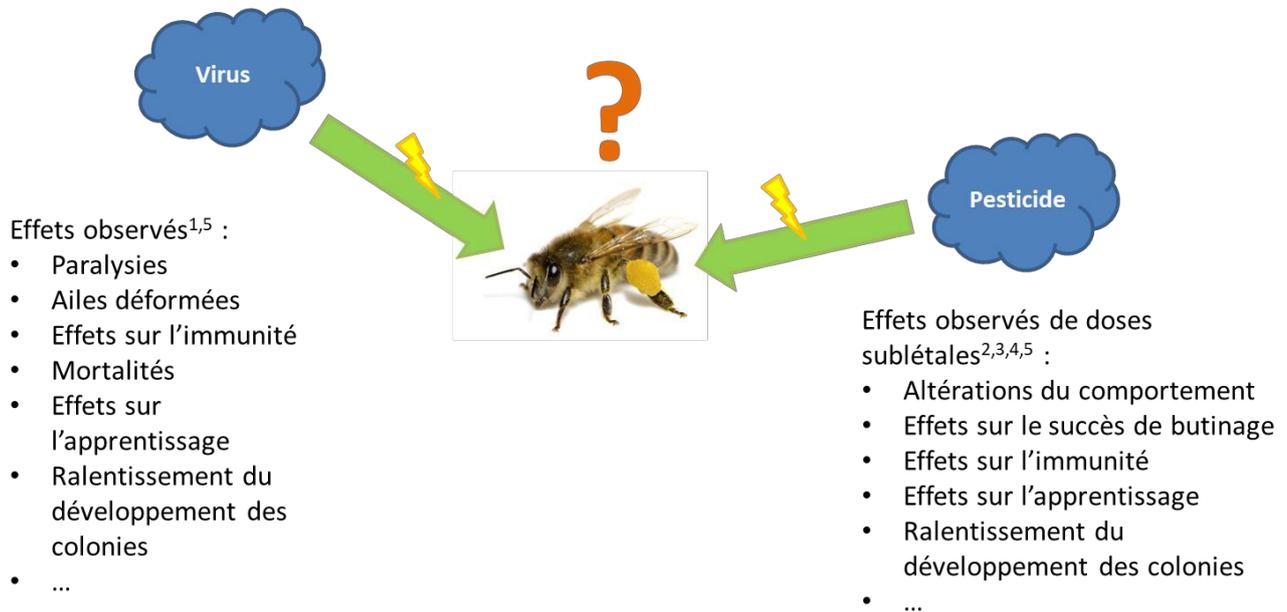
fluvalinate (traitement anti-*Varroa*) (B Locke et al., 2012). Sur le terrain, des charges en

Enfin, (Di Prisco et al., 2013) lors d'une étude précédemment citée, ont observé un effet de la clothianidine sur la régulation d'une infection expérimentale (par injection) par le DWV par les abeilles. En effet, la clothianidine entraîne une surproduction d'un facteur LRR (Leucine Rich Repeat), facteur qui en temps normal inhibe la voie NF- κ B, lorsqu'il n'y a pas d'infection. La production de ce facteur est régulée négativement en présence de pathogènes tels que des virus ou bactéries, ce qui va enclencher la voie NF- κ B, et entraîner par cascade une production d'AMPs. La surproduction de LRR causée par la clothianidine va donc entraîner une forte inhibition de la voie NF- κ B (dont celle de l'effecteur dorsal-1a) ce qui va empêcher l'abeille de contrôler l'infection en DWV, dont les charges sont ensuite observées comme significativement plus élevées que dans des abeilles infectées sans exposition à la clothianidine (figure 18).

Cependant, aucune étude n'a encore pu définir une interaction entre des stress spécifiques comme pouvant être la cause de l'affaiblissement des colonies d'abeilles. Ceci s'explique par le fait que les colonies vivent selon un équilibre fragile, qui peut être plus ou moins affecté en fonction de tous les facteurs, positifs ou négatifs, pesant sur le développement et les productions de la colonie. En effet, l'état de santé de la colonie peut accentuer significativement les effets négatifs de n'importe quel stress supplémentaire (Nazzi and Pennacchio, 2014). Ainsi il existe des niveaux et des seuils de stress critiques spécifiques à chaque colonie. Pour chacune d'entre elles, si elles sont proches d'un de ces seuils, une petite différence dans tel ou tel stress, ou l'apparition ou la disparition d'un nouveau stress, pourra détruire l'équilibre et déterminera l'évolution de la colonie vers un effondrement ou la persistance (Bryden et al., 2013).

Les travaux présentés dans cette thèse se focalisent sur les interactions potentielles entre virus et pesticide. J'ai pour cela choisi un modèle pesticide, le thiaméthoxam, et deux modèles viraux (figure 20).

Deux axes seront développés, un pour chacun de ces virus.



¹Aubert *et al*, 2008, ²Henry *et al* 2015, ³Suchail *et al*, 2001, ⁴Doublet *et al* 2014, Sanchez-Bayo 2016

Figure 20 : Résumé des effets de chaque protagoniste sur l'abeille domestique et question : que se passe-t-il quand l'abeille est confrontée aux deux simultanément ?

Tout d'abord un axe portant sur des expériences en laboratoire avec le modèle CBPV. Dans ce premier chapitre, j'ai voulu répondre à plusieurs questions. Tout d'abord, je me suis demandé ce qu'il advenait du thiaméthoxam dans les abeilles lors d'une exposition chronique à une dose sublétales, et j'ai déterminé pour y répondre une cinétique de métabolisation. J'ai ensuite voulu savoir s'il était possible de transmettre le CBPV expérimentalement aux abeilles en s'affranchissant de l'injection et du stress qu'elle cause. J'ai pour ceci développé une méthode de transmission par contact standardisée, en utilisant la capacité connue du CBPV à se transmettre de cette façon, et des abeilles préalablement injectées avec le virus comme inoculum. Finalement, j'ai utilisé les résultats obtenus pour déterminer s'il existait une interaction entre mon virus et mon pesticide modèles, et j'ai donc effectué des expériences de co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam à plusieurs doses, de sublétales à la DL50 proposée par la littérature. Ces expériences m'ont permis d'étudier l'effet de chacun des facteurs et de leur co-exposition sur les mortalités, les charges virales en CBPV, la consommation de sirop, et enfin la transcription de certains gènes liés à l'immunité ou à la détoxification.

Dans un deuxième axe, j'ai transporté ces études de co-expositions à l'extérieur, dans les colonies, et j'ai pour cela étudié le DWV dont la prévalence est déjà élevée dans les ruchers en temps normal. J'en ai profité pour tester si des doses sublétales de thiaméthoxam pouvaient avoir un effet significatif sur des charges virales naturelles en DWV, sur des abeilles au sein de leur colonie, comme il avait été observé par (Di Prisco et al., 2013) en cage avec la clothianidine. Afin de mettre en lumière d'éventuels effets comportementaux inobservables en laboratoire, j'ai utilisé des compteurs optiques mis au point par l'INRA pour suivre les entrées et sorties des abeilles tout au long de leur vie. Lors de cette expérience j'ai donc observé les effets potentiels des interactions entre le DWV, transmis par voie orale ou par injection, et le thiaméthoxam à des doses sublétales environnementales, sur différents traits de vie mais aussi sur la mortalité, les charges virales en DWV et autres virus potentiellement présents, et enfin encore une fois la transcription de certains gènes liés à l'immunité ou à la détoxification.