



Recherche pour la référence

Détection des principaux agents pathogènes de l'abeille domestique par PCR Multiplex

J. Carletto, A. Gauthier, J. Regnault, P. Blanchard, F. Schurr, M. Ribière-Chabert, Anses, Sophia-Antipolis, France

J. Carletto, A. Gauthier, J. Regnault, P. Blanchard, F. Schurr, M. Ribière-Chabert (2010). Détection des principaux agents pathogènes de l'abeille domestique par PCR Multiplex, EuroReference, No. 4, ER04-10R01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero4/PN6001.htm>



Depuis ces dernières années, l'affaiblissement généralisé du cheptel apicole mondial, conséquence de pertes et d'affaiblissements inexpliqués de colonies d'abeilles, met en avant une diversité d'infections fongiques, bactériennes et virales potentiellement impliquées. Ces infections, qui ne sont pas systématiquement diagnostiquées, entraînent des incertitudes quant aux causes du phénomène. L'objectif du projet était de disposer d'outils de discrimination rapide des agents pathogènes majeurs de l'abeille domestique potentiellement impliqués. Il s'est concrétisé par la mise au point de PCR Multiplex permettant la détection de 14 pathogènes (7 virus, 4 bactéries, 3 champignons), ainsi que par la mise au point d'outils de quantification.

Ces dernières années, des affaiblissements du cheptel apicole ont été recensés dans de nombreux pays. Ces affaiblissements peuvent se caractériser par une mortalité hivernale de colonies d'abeilles supérieure à la normale ainsi que des pertes de population en saison. L'absence d'observation de signes précurseurs et d'identification de symptômes caractéristiques entraîne un désarroi et une incompréhension de la profession apicole face à ces cas de plus en plus récurrents. Néanmoins, des études ponctuelles menées sur les causes de ces affaiblissements montrent régulièrement une diversité d'agents pathogènes (Afssa 2008)⁽¹⁾. Récemment, la coinfection par deux agents pathogènes a été associée, aux USA, au syndrome d'affaiblissement des colonies (Bromenshenk *et al.* 2010). En effet, l'abeille domestique est la cible de nombreux macro-pathogènes tel que des acariens (*Varroa destructor*, *Tropilaelaps clareae*), des coléoptères (*Aethina tumida*), des hyménoptères (*Vespa velutina*), des lépidoptères (*Galleria mellonella*) mais

aussi de nombreux micro-pathogènes caractérisés par une multitude d'infections fongiques, bactériennes et virales (Morse & Flottum 1997). Cependant, ces derniers ne sont jamais tous recherchés ce qui entraîne des incertitudes quant aux causes de ces phénomènes. Il est donc devenu indispensable de disposer d'outils de diagnostic permettant de discriminer, parmi ces micro-pathogènes majeurs de l'abeille, les causes de ces affaiblissements. C'est dans ce contexte que l'équipe Virologie et diagnostic moléculaire de l'Unité Pathologie de l'abeille du laboratoire de l'Anses de Sophia-Antipolis (LNR pour les Maladies de l'abeille) a démarré, dans le cadre d'un post doctorat, le projet Multi-Path en avril 2009. Ce projet avait pour objectif de développer des outils de détection moléculaire de l'ensemble de ces micro-pathogènes de l'abeille. Les agents pathogènes ciblés sont au nombre de quatorze et correspondent à sept virus ARN, quatre bactéries et trois champignons (Tableau 1). Ce projet s'articule autour

Tableau 1. Liste des agents pathogènes viraux, bactériens et fongiques de l'abeille domestique considérés dans le projet Multi-Path

Agents viraux (virus à ARN)	Agents bactériens	Agents fongiques
Virus de la paralysie aiguë (ABPV, Acute bee paralysis virus)	<i>Paenibacillus larvae</i> (agent responsable de la loque américaine)	<i>Ascosphaera apis</i> (agent responsable du couvain plâtré)
Virus de la cellule royale noire (BQCV, Black queen cell virus)	<i>Melissococcus plutonius</i> (agent principal de la loque européenne)	<i>Nosema apis</i> (agent responsable de la Nosémosé)
Virus de la paralysie chronique (CBPV, Chronic bee paralysis virus)	<i>Paenibacillus alvei</i> * (agent associé ou secondaire de la loque européenne)	<i>Nosema ceranae</i>
Virus des ailes déformées (DWV, Deformed wing virus)	<i>Enterrococcus faecalis</i> * (agent associé ou secondaire de la loque européenne)	
Virus israélien de la paralysie aiguë (IAPV, Israeli acute paralysis virus)		
Virus du Cachemire (KBV, Kashmir bee virus)		
Virus du couvain sacciforme (SBV, Sacbrood virus)		

* Les deux agents secondaires de la loque européenne ne sont pas inclus dans les 3 PCR Multiplex ciblant les principaux micro-pathogènes de l'abeille mais font l'objet d'une PCR Multiplex supplémentaire.

(1) L'Afssa est devenue Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) en juillet 2010 par fusion avec l'Afsset.

Recherche pour la référence

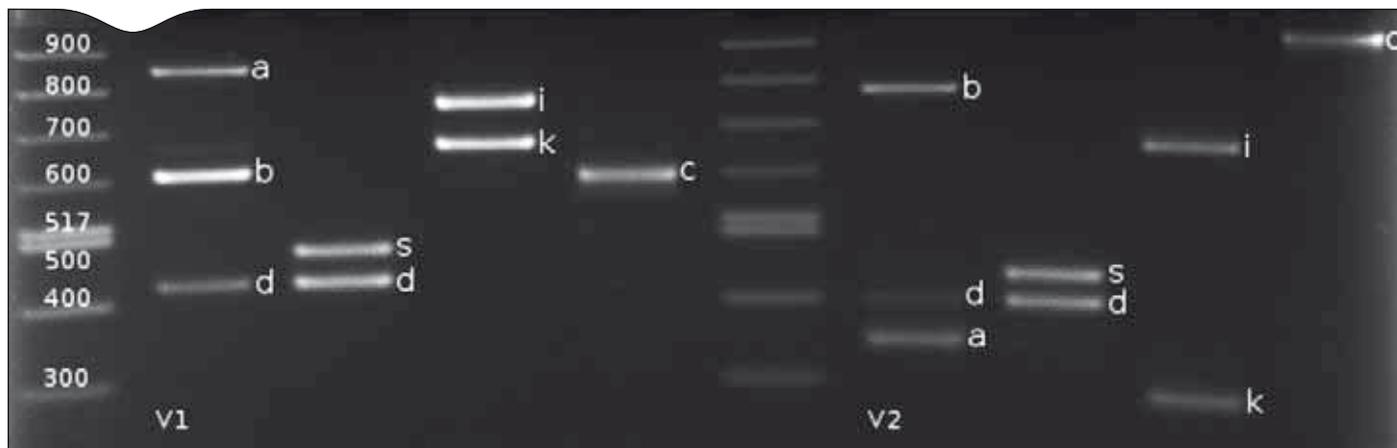


Figure 1. Photographie illustrant un gel d'agarose après migration de deux PCR Multiplex (V1, VIRUS-1 et V2, VIRUS-2) ciblant la détection des 7 virus. Le résultat de quatre individus est présenté (a, ABPV ; b, BQCV ; c, CBPV ; d, DWV ; i, IPAV ; k, KBV ; s, SBV). Le marqueur de taille est exprimé en paire de base.

de deux axes avec le développement d'outils de diagnostic moléculaire composé de plusieurs PCR multiplex permettant la détection de l'ensemble des micro-pathogènes, complété par le développement de PCR en temps réel permettant la quantification de ces derniers. La première partie de ce projet a débouché sur la mise en place de trois PCR multiplex qui permettent la discrimination des douze micro-pathogènes majeurs ainsi qu'une quatrième PCR Multiplex réservée à la détection des agents bactériens responsables des loques de l'abeille (Tableau 1). Les trois PCR multiplex principales se déclinent en deux PCR dédiées spécifiquement à la détection des sept virus ARN de l'abeille, assurant ainsi une détection plus fiable en cas de variabilité génétique, et une troisième PCR qui permet la détection des agents pathogènes à génome ADN, à savoir les deux agents bactériens principaux responsables des loques américaine et européenne, et trois champignons. La 4^e PCR Multiplex permet, en plus des deux agents bactériens principaux responsables des loques, la détection simultanée des deux agents bactériens secondaires de la loque européenne (*Paenibacillus alvei* et *Enterococcus faecalis*). Pour cela, un inventaire préalable des différentes amorces publiées et spécifiques de chaque pathogène a été réalisé. Pour les agents ne possédant pas de PCR déjà publiée ou dont les tailles d'amplification n'étaient pas compatibles avec la détection d'autres agents pathogènes, des amorces spécifiques ont été déterminées grâce à des outils de bioinformatique et le séquençage des différents génomes.

Ces outils ont été testés et validés sur des échantillons d'abeilles adultes et de couvains précédemment caractérisés au laboratoire (voir Figure 1 pour l'illustration de deux PCR Multiplex). De plus, ces outils ont été testés sur près de 400 échantillons d'abeilles collectés en France entre 2008 et 2009 provenant aussi bien de ruchers ayant présentés des problèmes que de ruchers sans problème apparent. Les 3 PCR Multiplex ont également été testées sur de la gelée royale ainsi que sur des vecteurs potentiels de micro-pathogènes tel que des macro-pathogènes d'abeille (acariens *Varroa destructor* et *Tropilaelaps clareae*, le petit coléoptère de la ruche *Aethina tumida*, et le frelon asiatique *Vespa velutina*) mais aussi sur d'autres insectes présents de manière récurrente dans l'environnement des abeilles, à savoir des fourmis et des

guêpes. Sur cette dernière catégorie d'échantillon, les résultats ont montré la présence de plusieurs virus ce qui indique que ces outils pourront être utilisés afin de mieux caractériser la répartition de ces pathogènes dans différentes populations d'insectes.

En complément de ces travaux, des mises au point de PCR Multiplex ciblant des pathogènes qui induisent des symptômes proches ou similaires sont en cours de développement ou de finalisation. C'est l'objet de la 4^e PCR Multiplex développée au laboratoire qui permet la détection simultanée des agents bactériens des loques américaine et européenne. Ces deux maladies du couvain, qui peuvent se développer en même temps dans la colonie, présentent des symptômes communs tels que la présence de couvain en mosaïque, de cadavres de larves de couleur jaune clair à brun et d'écailles loqueuses. Au cours du développement de cet outil, la répétabilité et la sensibilité analytique ont été établies par la détermination du seuil de détection à partir de gammes plasmidiques de référence mises au point au laboratoire. Sur le même principe, une PCR Multiplex sera développée pour détecter des agents responsables de pathologies larvaires (SBV, BQCV et *Ascosphaera apis*), ainsi qu'un protocole permettant la détection simultanée du CBPV, de *N. apis* et *N. ceranae* et de l'agent responsable de l'Acariose (*Acarapis woodii*) utilisable lors de mortalités de butineuses en saison.

L'ensemble de ces travaux a permis d'acquérir une solide expérience dans le développement d'outils de détection multipathogènes et cette expérience a été mise en application, notamment pour la PCR discriminant *N. apis* et *N. ceranae* lors du diagnostic de la Nosémosse. Seul *N. apis* est en France considéré comme responsable de la Nosémosse. Cette maladie touche les abeilles adultes en provoquant un dépeuplement, une diminution de la force de la colonie et une mortalité de colonie élevée. Suite au dénombrement des spores réalisé par microscopie optique, l'espèce de *Nosema* spp. est identifiée par PCR Multiplex. Cette PCR est basée sur la détection d'une séquence de l'ARNr16S du parasite spécifique de chacune des deux espèces (*N. apis* et *N. ceranae*). Le protocole publié par Martin-Hernandez *et al.* (2007) et repris dans le manuel OIE (OIE, 2008) a été adapté et sa sensibilité a été améliorée au laboratoire. En effet, le protocole initial a été modifié pour



Recherche pour la référence

permettre la détection de chacune des espèces y compris lorsque l'autre espèce est présente en plus forte quantité. L'exacte discrimination de ces deux pathogènes débouche sur d'importantes implications en termes d'épidémiologie et de compréhension de la maladie.

En complément à ces outils qualitatifs, des outils de quantification des six virus ABPV, BQCV, DWV, IAPV, KBV et SBV, non encore disponibles au laboratoire, ont été développés par PCR quantitative⁽²⁾. L'adaptation des protocoles de PCR quantitatives déjà publiés pour la quantification des agents principaux des loques Américaine (Han *et al.* 2008) et Européenne (Roetschi *et al.* 2008) a également été réalisée.

Ces travaux dotent le laboratoire de tests de diagnostics moléculaires multi-pathogènes permettant la détection ou l'identification rapide de l'ensemble des agents pathogènes majeurs au sein d'échantillons d'abeilles ou de couvains. Ces outils sont utilisables notamment lors d'épisodes de mortalités et d'affaiblissements de colonies d'abeilles sans symptôme caractéristique indiquant une pathologie donnée. Ils sont complétés par des outils moléculaires quantitatifs qui permettent de définir plus précisément le degré d'implication d'un pathogène donné lors de ces épisodes.

Références bibliographiques

Afssa. Weakening, collapse and mortality of bee colonies. 1-218. 2008. Ref Type: Report

Blanchard, P., M. Ribière, O. Celle, P. Lallemand, F. Schurr, V. Olivier, A. L. Iscache and J. P. Faucon. 2007. Evaluation of a real-time two step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J. Virol. Methods*, 141: 7-13.

JJ Bromenshenk, CB Henderson, CH Wick, MF Stanford, AW Zulich, RE Jabbour, SV Deshpande, PE McCubbin, RA Seccomb, PM Welch, T Williams, DR Firth, E Skowronski, MM Lehmann, SL Bilimoria, J Gress, KW Wanner, RA Cramer Jr. Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *PlosOne*, 2010, 5(10): e13181. doi:10.1371/journal.pone.0013181.

Han, S. H., D. B. Lee, D. W. Lee, E. H. Kim and B. S. Yoon. 2008. Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB). *J. Invert. Pathol.*, 99: 8-13.

OIE 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal, ed. 2008

Martin-Hernandez, R., A. Meana, L. Prieto, A. M. Salvador, E. Garrido-Bailon and M. Higes. 2007. The outcome of the colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 6331-6338.

Morse, R. A. and K. Flottum. 1997. *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, A.I. Root Company edn. A.I. Root Company, Medina.

Roetschi, A., H. Berthoud, R. Kuhn and A. Imdorf. 2008. Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*, 39: 362-371.

(2) Une PCR quantitative ciblant CBPV a précédemment été développée en 2007 (Blanchard *et al.* 2007).