



HAL
open science

Diagnostic et éco-dynamique des virus de l'abeille mellifère (*Apis mellifera*)

Eric Dubois

► **To cite this version:**

Eric Dubois. Diagnostic et éco-dynamique des virus de l'abeille mellifère (*Apis mellifera*). Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé (SVS/ED85) - Faculté des Sciences - Université Côte d'Azur, 2021. tel-04479416

HAL Id: tel-04479416

<https://hal.science/tel-04479416>

Submitted on 27 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



Habilitation à diriger des recherches

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
(SVS/ED85) - Faculté des Sciences - Université Côte d'Azur

Section CNU : 67 - Biologie des populations et écologie

Mémoire

Diagnostic et éco-dynamique des virus de l'abeille mellifère (*Apis mellifera*)

Soutenu le 26 novembre 2021

par

Eric Dubois

Chargé de projet en virologie de l'abeille,
Unité pathologie de l'abeille, Laboratoire de Sophia Antipolis,
Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Devant le jury composé de :

Dr. Armel Gallet

Président

Dr. David Biron

Rapporteur

Dr. Marie-Pierre Chauzat

Rapporteur

Dr. Hélène Delatte

Rapporteur

Dr. Richard Thiéry

Examineur

Table des matières

Résumé.....	1
Avant-propos : la référence.....	2
A. De la recherche à la référence : le lien permanent d'une carrière.....	3
1. Etude de la contamination virale des aliments et de l'eau	4
1.1. Sécurité sanitaire des coquillages consommés crus	4
1.2. Contamination virale de l'eau et des denrées végétales consommées crue	7
2. Etude de virus de ruminants	10
2.1. Pestivirus des ruminants domestiques et sauvages	10
2.2. Diagnostic de la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine	13
2.3. Efficacité et innocuité chez le mouton des nouveaux vaccins contre la fièvre catarrhale ovine.....	15
3. Etude de virus de l'abeille	17
3.1. Diagnostic des principales maladies virales de l'abeille	17
3.2. Eco-dynamique des virus de l'abeille	19
B. Diagnostic et éco-dynamique des virus de l'abeille mellifère (<i>Apis mellifera</i>).....	21
4. Le paradoxe des maladies virales de l'abeille.....	21
5. Le diagnostic des maladies virales de l'abeille mellifère	23
5.1. Le choix des maladies virales ciblées pour le diagnostic.....	23
5.1.1. La paralysie chronique.....	24
5.1.2. Les autres principaux virus d'abeille.....	27
5.1.2.1. Virus de la famille <i>Dicistroviridae</i>	27
5.1.2.2. Virus de la famille <i>Iflaviridae</i>	29
5.2. Cibles moléculaires du diagnostic des principales maladies virales	32
5.2.1. Le génome du CBPV.....	33
5.2.2. Le génome des picornavirus de l'abeille	37
5.3. Détection et quantification des virus d'abeilles	42

5.3.1.	Exactitude des mesures de charges virales	42
5.3.1.1.	Validation de la quantification du CBPV.....	42
5.3.1.2.	Validation de la quantification de l'ABPV, du BQCV, du DWV et du SBV	45
5.3.1.3.	Cohérence des résultats inter-laboratoires.....	48
5.3.1.3.1.	Adoption des méthodes	48
5.3.1.3.2.	Essais inter-laboratoires d'aptitude.....	48
6.	Virus et abeilles un équilibre précaire mesurable.....	49
6.1.	Le mécanisme d'interférence des petits ARN double brins	51
6.2.	Les mécanismes complémentaires de résistance aux virus.....	52
6.2.1.	Immunité individuelle des abeilles mellifères	52
6.2.2.	Les mécanismes de tolérance	54
6.3.	La charge virale : un indicateur de résistance et de tolérance	55
7.	Les facteurs de stress pouvant moduler la résistance ou la tolérance aux virus	59
7.1.	Les trappes à pollen	59
7.2.	L'acarien <i>Varroa destructor</i>	61
7.3.	Les interactions entre les virus	65
7.4.	Facteurs de stress liés aux thiaméthoxam	66
8.	Conclusion et perspectives	71
8.1.	Les enjeux de la référence.....	71
8.2.	L'étude des interactions entre les virus et de nouveaux facteurs de stress	75
8.3.	Vers la résilience des colonies d'abeilles.....	77
9.	Références bibliographiques	78
C.	Annexe : <i>curriculum vitae</i>	88

Résumé

Les risques d'infections virales chez l'homme ou les animaux dépendent de nombreux facteurs. Mes travaux ont contribué à caractériser ces facteurs qui portent sur l'hôte, le virus (parasite obligatoire), l'environnement, les vecteurs animés ou inanimés, les stress biotiques ou abiotiques, ou encore les moyens de contrôle (mesures de prophylaxie) qui peuvent moduler les conséquences chez un individu ou une population. Au sein de l'agence française chargée de l'évaluation du risque sanitaire (Anses), j'ai travaillé successivement sur les virus entériques transmissibles à l'homme par l'eau ou l'alimentation (virus de l'hépatite A et virus des gastroentérites, particulièrement les norovirus), les virus de ruminants domestiques voire d'espèces sauvages (virus de la fièvre catarrhale ovine [FCO], virus de la maladie des frontières, virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine [IBR]) et plus récemment sur les principaux virus de l'abeille mellifère (virus de la paralysie chronique, virus de la paralysie aiguë, virus du couvain sacciforme, virus des ailes déformées et virus de la cellule royale noire). Le développement et la validation de méthodes fiables de diagnostic ont permis l'exercice des missions de référence au plan national comme international. Des collaborations ont favorisé l'investigation de toxi-infections alimentaires collectives impliquant des coquillages et les norovirus ; elles ont participé à définir l'étiologie de mortalités massives d'isards dans les Pyrénées ; elles ont contribué à réduire la prévalence de l'IBR par la qualification des cheptels bovins indemnes ; elles ont évalué l'efficacité de nouvelles générations de vaccins contre la FCO. Plus particulièrement pour les maladies virales de l'abeille, mes travaux ont mesuré l'effet d'une pratique apicole (pose de trappes à pollen) et de pratiques agricoles (usage de pesticides) sur l'immunité, la réplication virale et le comportement des abeilles. Les expérimentations réalisées en laboratoire sur des nymphes d'abeilles reproduisant la transmission du virus des ailes déformées par l'acarien *Varroa destructor* suggèrent enfin des interactions entre virus pouvant contribuer à altérer la santé des colonies d'abeilles. Ces travaux sont présentés au regard des connaissances sur les maladies virales des abeilles et ouvrent de nouvelles perspectives de recherche tant chez l'abeille mellifère que chez les abeilles sauvages (bourdons et osmies).

Avant-propos : la référence

Si je ne prends pas la peine de définir le sens du mot « Recherche », présenter le sens accordé au nom, féminin « Référence », que j'utiliserai largement dans ce document, me semble nécessaire comme avant-propos à ce mémoire car le milieu académique est moins familiarisé aux activités de référence qu'à celles de recherche. Le sens que j'accorde à l'expression « Laboratoire de référence » est comparable à celui d'« Ouvrage de référence » qui selon le Larousse (www.larousse.fr) est défini comme : « Ouvrage que l'on consulte pour **trouver une information précise**, en particulier dans le domaine de la langue (dictionnaire, grammaire) ou dans un domaine technique, scientifique ». Produire une information précise implique pour un laboratoire, une équipe, un scientifique, un technicien, un agent administratif une rigueur constante. Car c'est ensemble qu'ils participent à atteindre cet objectif. Aussi, je tiens à remercier mes encadrants, mes collègues pour avoir contribué à la création de cet environnement propice à mes activités de recherche et de référence. Toutefois, la précision de nos résultats n'exclue pas l'existence des incertitudes techniques et scientifiques. Aussi, mes travaux ont également visé à évaluer et à réduire celles-ci afin que les décisions publiques qui pouvaient s'appuyer sur nos données soient toujours prise de façon éclairée.

A. De la recherche à la référence : le lien permanent d'une carrière

Dès 1997, mes travaux scientifiques ont été réalisés dans le contexte des missions d'expertise de l'agence chargée de la sécurité sanitaire des aliments et de la santé des animaux de rente (Figure 1). Durant ces 24 années, au centre d'études vétérinaires et alimentaire (Cneva), devenu l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), puis l'Agence de sécurité sanitaire pour l'alimentation, l'environnement et le travail (Anses), mes domaines d'implication ont évolué, passant de la sécurité des aliments à la santé des animaux impliqués dans la filière agro-alimentaire (successivement : la santé des ruminants et celle de l'abeille domestique). Le dénominateur commun à ces travaux était de développer des activités de référence sur les maladies virales. Ces activités de référence se sont exercées au sein de deux laboratoires et de trois unités, dans le cadre de mandats de laboratoire de référence soutenu par la filière professionnelle ou de laboratoires officiellement reconnu au plan national (Laboratoire national de référence, LNR) comme au plan international (Laboratoire de référence de l'union européenne, LRUE ou de l'Office internationale des épizooties, OIE).

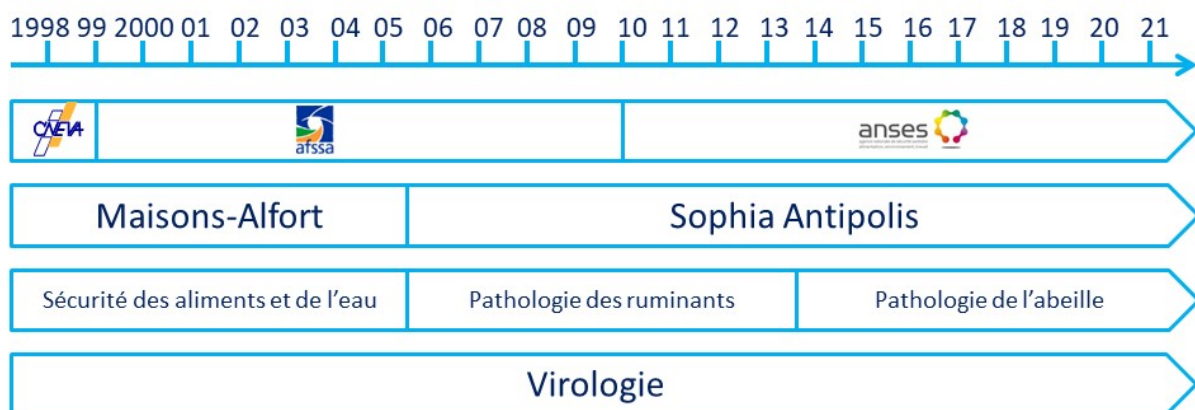


Figure 1 : Contexte professionnel des travaux de recherche exercés entre 1997 et 2021.

L'exercice de ces missions de référence s'est constamment appuyé sur des travaux de recherche. Le transfert des résultats de la recherche vers les missions de référence s'est fait en puisant dans les connaissances disponibles mais aussi en conduisant de nouveaux projets. Toutefois, le lien entre la recherche et la référence n'est pas unidirectionnel. Mes activités de référence se sont nourries des connaissances développées en recherche mais elles ont aussi été une source de questionnement qui ouvrait vers de nouvelles perspectives de recherche. Cette relation étroite entre mes activités de recherche et de référence a été le fil directeur de mes travaux.

Dans les chapitres suivants, je vais présenter, de façon résumée, l'ensemble de mes travaux dans leur contexte professionnel. Puis je développerai et mettrai en perspective mes récents travaux de recherche sur l'éco-dynamique des virus d'abeille (*Apis mellifera*).

1. Etude de la contamination virale des aliments et de l'eau

Le Cneva de Maisons-Alfort (Val-de-Marne) exerçait des activités de référence dans les domaines de la santé animale et de l'hygiène des aliments. Après ma formation doctorale et mon expérience postdoctorale, j'ai été recruté en 1997 par le Dr. Cécile Lahelec comme ingénieur de recherche dans l'Unité de virologie animale de ce laboratoire pour y développer de nouvelles activités d'expertise en virologie des aliments.

1.1. Sécurité sanitaire des coquillages consommés crus

Mes premiers travaux avaient pour objectif de mettre en place un ensemble de méthodes de PCR conventionnelle pour la détection des principaux virus entériques responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Ces outils devaient permettre plus particulièrement d'identifier le virus de l'hépatite A (VHA) et les norovirus impliqués dans des hépatites ou des gastro-entérites virales liés à la consommation de coquillages crus. Ces travaux étaient soutenus par une convention de recherche avec la Direction générale de l'alimentation (DGAI ; Convention S97/21) et reposaient sur un partenariat avec l'Ifremer (Dr. Soizick Le Guyader qui m'avait encadré pour mes études doctorales et référente sur la sécurité sanitaire des coquillages), avec le centre national de référence (CNR) sur les entérovirus (Dr. Jean-Jacques Chomel), avec les CNR sur les virus entériques (Dr. Pierre Pothier) et avec les acteurs impliqués dans l'épidémiologie des maladies humaines, coordonnés par l'Institut de veille sanitaire (InVS, devenu Agence nationale de santé publique ; Dr. Véronique Vaillant). Ensemble nous avons investigué des TIAC liées à la consommation de coquillage

et montré par des analyses moléculaires la similitude des virus contaminant les coquillages et ceux infectant les consommateurs malades. Nos travaux ont également montré que non seulement les populations humaines étaient à l'origine de contaminations virales des coquillages (par le rejet d'eaux usées insuffisamment traitées dans le littoral marin) mais aussi que les animaux d'élevage contribuaient à diffuser dans l'environnement des virus entériques potentiellement transmissibles à l'homme (zoonoses) (Figure 2).

Trois publications ont découlé de ces travaux :

- Gilles C., de Casanove J.-N., **Dubois E.**, Bon F., Pothier P., Kohli E., Vaillant V. 2003. Epidémie de gastro-entérites à norovirus liée à la consommation d'huîtres, Somme, janvier 2001. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 08:47-48.
- Le Guyader F. S., Neill F. H., **Dubois E.**, Bon F., Loisy F., Kohli E., Pommepeuy M., and Atmar R. L. 2003. A semi quantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. International Journal of Food Microbiology 87(1-2):107-112.
- **Dubois E.**, Merle G., Roquier C., Trompette A., Le Guyader F., Crucière C., Chomel J.-J. 2004. Diversity of enterovirus sequences detected in oysters by RT-nested PCR. International Journal of Food Microbiology 92(1):35-43.

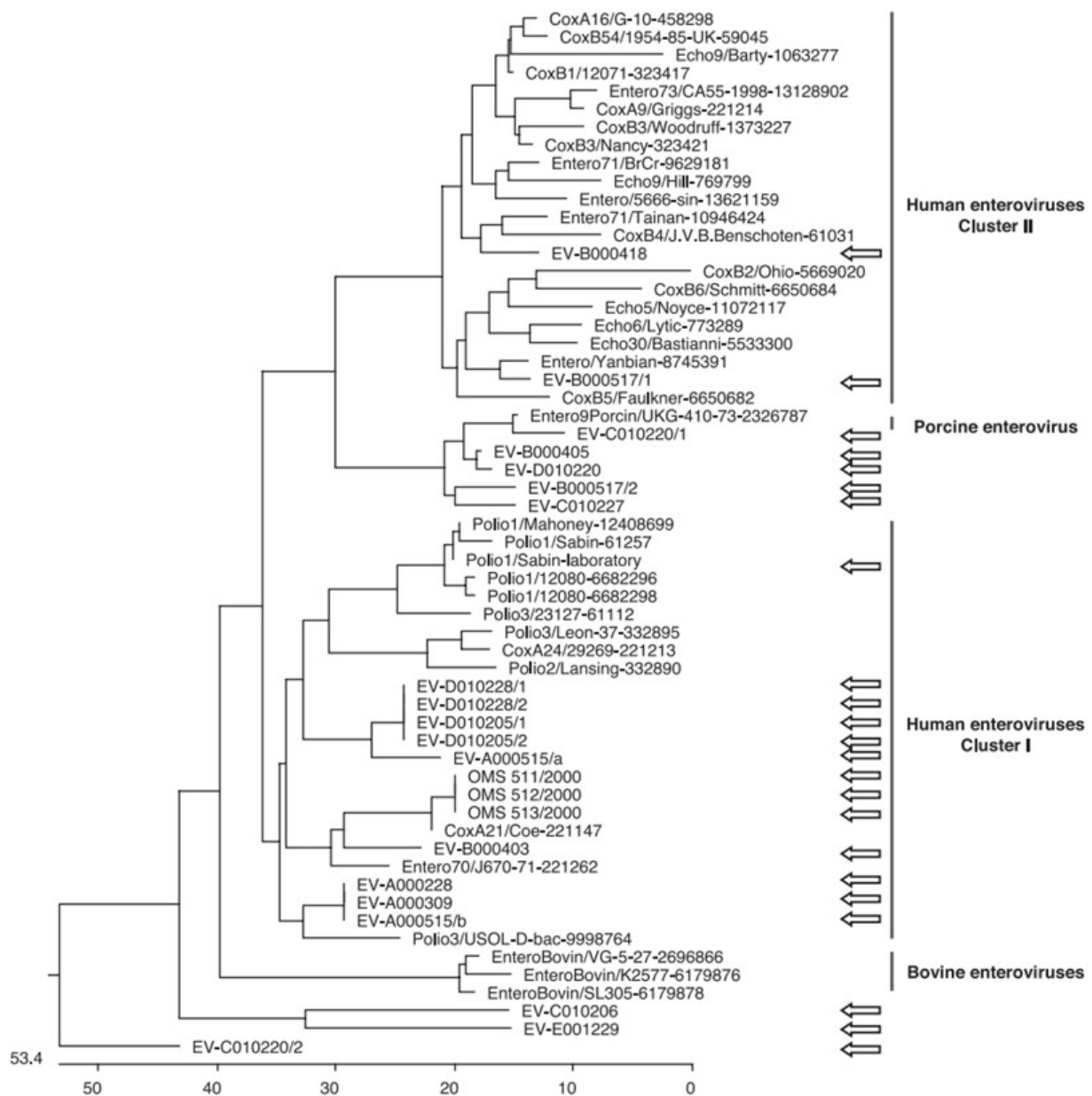


Figure 2 : Analyse phylogénétique des séquences d'entérovirus obtenues à partir d'échantillons de coquillages (Dubois et al., 2004). L'analyse phylogénétique a été réalisée sur des séquences nucléotidiques de 65 bases de la région non codante 5V du génome des entérovirus (séquence entre l'amorce 3 et l'amorce A1), avec le logiciel Lasergene (DNASStar) en utilisant la méthode clustale. Pour les souches de référence, le dernier chiffre indique le numéro d'identification dans GenBank. L'échelle représente le nombre de substitution nucléotidique entre les séquences. Les flèches localisent les séquences virales identifiées dans les coquillages prélevés en Bretagne et Normandie dans les années 2000 à 2001.

1.2. Contamination virale de l'eau et des denrées végétales consommées crues

Au début des années 2000, la nouvelle agence de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) était confrontée à des alertes sanitaires sur des fruits importés, surgelés. Ces fruits, destinés à être consommés crus ou peu cuits, avaient été irrigués avec des eaux de surfaces souillées par des germes fécaux. Peu de références étaient alors disponibles sur la contamination des denrées végétales par les virus entériques. Un an après mon arrivée au Cneva, j'ai donc réorienté les travaux scientifiques de mon équipe vers l'étude de la contamination virale de l'eau et des denrées végétales.

J'ai recherché de nouveaux partenaires scientifiques et industriels ainsi qu'élaboré et coordonné deux projets :

- Le premier projet était financé par un appel à projet Aliment-Qualité-Sécurité du ministère en charge de l'agriculture (R98/18 "Bases méthodologiques de la surveillance des virus entériques contaminant les denrées végétales"). Il avait pour objectif le développement de méthodes de détection des virus entériques à partir des denrées végétales. Ce projet a été réalisé avec la participation de la Faculté de médecine et pharmacie de Clermont-Ferrand (Dr. Ousman Traoré) et deux industriels, les sociétés d'importation et de transformation de fruits Descours et Spab.
- Le second projet était également financé par l'appel à projet Aliment-Qualité-Sécurité (R01/04 "Contamination virale des denrées végétales : Evaluation du procédé de lavage des salades destinées à la fabrication des produits de 4ème gamme"). Il visait, d'une part, à améliorer les outils de quantification des virus infectieux contaminant l'eau et les salades prêtes à la consommation et, d'autre part, à évaluer l'effet des lavages des salades en eau chlorée, sur la survie des virus. Ce projet a été réalisé avec la participation de l'Institut Pasteur de Lille (Dr. Odile Legeay), le CHU de Nantes (Dr. Virginie Ferré) et un industriel (Société Descours).

Ainsi soutenu par les financements de nos recherches, nous avons développé de nouvelles méthodes moléculaires de détection des virus entériques (méthodes de PCR quantitatives et multiplication des virus en culture de cellules eucaryotes). Elles complétaient l'arsenal d'outils d'investigations épidémiologiques des TIAC et permettaient également l'analyse d'eau de consommation, des fruits et des légumes consommés crus (Figure 3). Nous avons enfin développé des méthodes de dénombrement des bactériophages d'*Escherichia coli* infectieux qui, en co-contaminant l'environnement hydrique et les denrées végétales avec les virus entériques pathogènes, pouvaient indiquer la présence potentielle de virus infectieux

pour les consommateurs. Ces outils ouvraient, par ailleurs, des perspectives d'évaluation des processus industriels de lavage des denrées végétales ou de traitement des eaux destinées à la consommation. Ces travaux ont également contribué aux réflexions du Comité européen de normalisation (CEN ; Dr. David Lees) qui avait initié un groupe de travail dans la perspective de normalisation des méthodes de recherche des virus entériques dans l'alimentation.

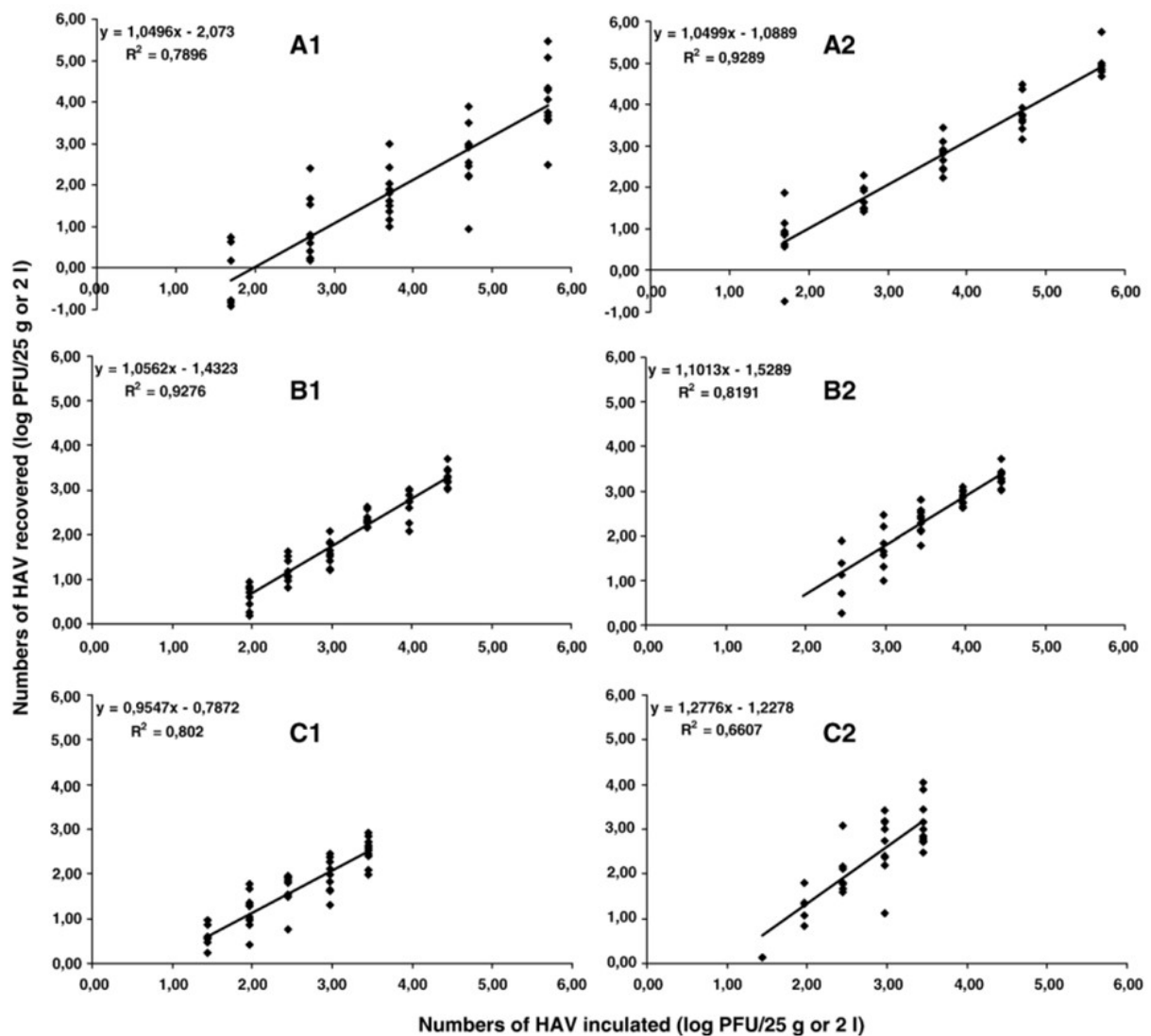


Figure 3 : Évaluation de la linéarité de la méthode de quantification du virus de l'hépatite A par RT-PCR en temps réel (Dubois et al., 2007). Comparaison des nombres de virus de l'hépatite A inoculés et mesurés dans de l'eau du robinet (A), des fruits (B) ou des légumes à salade (C) par RT-PCR en temps réel. A1, B1 et C1 présentent les données d'expériences réalisées avec des extraits d'ARN non dilués. A2, B2 et C2 présentent les données d'expériences réalisées avec des extraits d'ARN dilué au 1/10.

Quatre publications ont découlé de ces projets :

- **Dubois E.**, Agier C., Traoré O., Hennechart C., Merle G., Crucièrè C., and Laveran H. 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *Journal of Food Protection*. 65(12):1962-1969.
- **Dubois E.**, C. Hennechart, N. Deboosère, G. Merle, O. Legeay, C. Burger, M. Le Calvé, B. Lombard, V. Ferré, and O. Traoré. 2006. Intra-Laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphages, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 108(2):164-171.
- **Dubois E.**, C. Hennechart, G. Merle, C. Burger, N. Hmila, S. Ruelle, S. Perelle, V. Ferré, 2007. Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: Characterization of the method performances. *International Journal of Food Microbiology* 117(2):141-149.
- Croci L., **Dubois E.**, Cook N., de Medici D., Schultz A.C., China B., Rutjes S.A., Hoorfar J., Van der Poel W. 2008. Current Methods for extraction and concentration of enteric viruses from fresh fruit and vegetables: Towards international standards. *Food Analytical Methods* 1:73–84

L'ensemble de ces connaissances acquises sur la contamination virale de l'environnement et de l'alimentation a notamment contribué à deux expertises scientifiques, collectives :

- Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique, juillet 2003, éditeur Afssa. <https://www.Anses.fr/fr/system/files/NUT-Ra-AgriBio.pdf>
- Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale, février 2007, éditeur Afssa. <https://www.Anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-VirusOral.pdf>

La première évaluation documentait les dangers de l'usage des engrais organiques dans la production de denrées végétales consommées crues. La seconde a abouti à l'édition d'un document de référence pour l'évaluation du risque de transmission des virus entériques par l'alimentation. Ce document a notamment permis de structurer les liens entre les différents acteurs impliqués dans la sécurité des aliments, depuis les étapes de production jusqu'à la consommation (« de la fourche à la fourchette »).

2. Etude de virus de ruminants

En 2005, un premier changement important intervenait dans ma carrière à l'agence. Pour bénéficier d'un rapprochement familial, je quittais le laboratoire de Maisons-Alfort et exerçais de nouvelles missions au laboratoire de Sophia Antipolis (Alpes-Maritimes). Ce laboratoire se consacrait aux maladies abortives des ruminants domestiques et à la santé de l'abeille. Mes missions étaient alors de développer des travaux de recherche et d'appui scientifique et technique en virologie des ruminants.

2.1. Pestivirus des ruminants domestiques et sauvages

L'Unité de pathologie des ruminants dirigée par le Dr. Richard Thiéry avait, depuis 1985, une reconnaissance scientifique et technique sur la maladie des frontières, une maladie virale des petits ruminants associée au *Border disease virus* (BDV). Avec mon arrivée, l'équipe du Dr. Pierre Russo se voyait étendre son implication sur une maladie homologue chez les grands ruminants : la diarrhée virale bovine (associée au *Bovine viral diarrhoea virus* – BVDV). Ces deux virus appartiennent au même genre viral : *Pestivirus*. Les maladies présentent des similitudes tant dans l'expression des signes cliniques (avortements ou naissance d'animaux infectés persistants, immunotolérants), que dans les caractéristiques épidémiologiques. Aussi mes travaux ont considéré comme indissociables l'étude de ces deux pestiviroses et montré les nombreuses similitudes génétiques entre les deux espèces virales DVD et DB (Figure 4). De plus, j'ai conduit les missions d'un laboratoire national de référence pour le contrôle de ces deux pestiviroses chez les ruminants domestiques en relation étroite avec l'Association pour la certification en santé animale (ACERSA), la Fédération nationale de groupement de défense sanitaire (FN-GDS) et ses structures régionales, et le bureau de la Santé animale de la DGAI.

Cette stratégie globale d'étude des pestivirus chez les ruminants a été étendue aux échanges qui pouvaient se créer avec les ruminants de la faune sauvage. A ce titre, j'ai encadré sur le plan scientifique, les travaux doctoraux du Dr. Claire Martin sur les pestivirus des ruminants sauvages et domestiques des alpages. Une étroite collaboration avec l'Office national de la chasse et de la faune sauvage (Dr. Philippe Gibert) et les Parc nationaux (Dr. Dominique Gauthier), l'Université de Lyon I (Dr. Emmanuelle Gilot-Fromont), l'Université autonome de Barcelone (Dr. Ignasi Marco), a abouti à la reproduction expérimentale des infections à pestivirus chez l'isard. Ces travaux ont contribué à établir le lien éthologique entre les pestivirus et les mortalités massives d'isards dans les Pyrénées (Figure 5). Enfin,

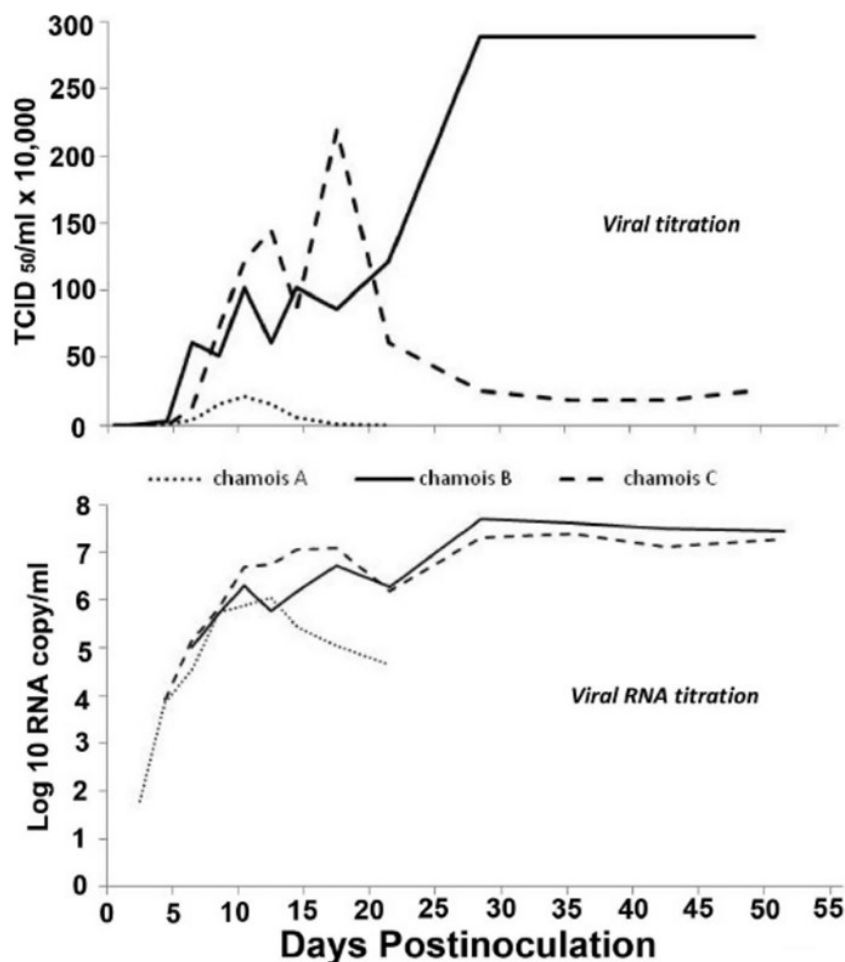


Figure 5 : Cinétique d'infection des isards inoculés avec la souche CADI-6 du virus de la maladie des frontières (Martin et al., 2013). Les titres viraux ont été mesurés dans le sang de trois isards des Pyrénées (*Rupicapra pyrenaica*) en culture de cellules (Dose infectieuse à 50% en culture de cellules : TCID₅₀/ml) et par RT-PCR en temps réel (log₁₀ copies d'ARN/ ml). La différence de cinétique était en lien avec la réponse immunitaire des animaux contre le virus ; notamment les animaux A et C avaient développés une forte réponse en anticorps neutralisants alors que l'animal B présentait une très faible immunité contre le pestivirus.

Trois publications ont découlé de ces travaux :

- **Dubois E.**, Russo P., Prigent M., Thiéry R., 2008. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Veterinary Microbiology*, 130:69-79.
- Martin C., Duquesne V., Guibert J.M., Pulido C., Gilot-Fromont E., Gibert P., Velarde R., Thiéry R., Marco I., **Dubois E.** 2013. Experimental infection of pregnant pyrenean chamois (*rupicapra pyrenaica*) with border disease virus subtype 4. *Journal of Wildlife Diseases* Jan; 49(1):55-68.

- Martin C., Duquesne V., Adam G., Belleau E., Gauthier D., Champion J.L., Saegerman C., Thiéry R., **Dubois E.** 2015. Pestiviruses infections at the wild and domestic ruminants interface in the French Southern Alps. *Veterinary Microbiology* 175:341–348.

2.2. Diagnostic de la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine

En 2006 dans le cadre d'une réorganisation de la virologie des ruminants à l'Afssa, il m'a été confié la mission de responsable du Laboratoire National de Référence (LNR) pour la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR). La thématique était nouvelle au laboratoire de Sophia Antipolis. Toutefois, nous avons profité de l'expérience du laboratoire de Lyon (Madame Myriam Perrin) et de l'Université de Liège (Dr. Etienne Thiry) pour développer des activités de référence. Nos activités ont été organisées pour permettre de confirmer les diagnostics de première intention (réalisés par les laboratoires départementaux) avec des méthodes accréditées par le Comité français d'accréditation (Cofrac), de contrôler et agréer les réactifs commerciaux de diagnostic (Figure 6), d'élaborer des matériaux de référence (notamment la production de sérums positifs par des expérimentations sur bovin avec la collaboration de la plate-forme d'infectiologie expérimentale du site INRA de Tours) et d'organiser des essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA). Avec la collaboration de l'ACERSA de la FN-GDS, de la DGAI (Dr. Anne Bronner), du Groupement des techniciens vétérinaires (GTV) et l'Association française des directeurs et cadres de laboratoires vétérinaires publics d'analyses (Adilva), nous avons fiabilisé le diagnostic de cette maladie qui était réalisé par un réseau de plus de 90 laboratoires de terrain.

Quatre publications ont découlé de ces travaux :

- **Dubois E.**, Gastaldi C., Adam G., Suavet F., Del Cont A. Duquesne V. 2011. Les méthodes de diagnostic sérologique dans l'application de la réglementation IBR. *Le Nouveau praticien vétérinaire* vol 4 n°19 page 31 à 38.
- Mémeteau S., Mézi F., **Dubois E.**, Bronner A. 2011. Bilan des mesures de surveillance réglementaire et volontaire de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) en 2010 : vers un objectif d'éradication. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* N°46/Sécial MRC – Bilan 2010, pages 18 à 20.
- Bronner A., Guerrier-Chatellet M.-C., Languille J., Petit E., Duquesne V., **Dubois E.** 2010. La lutte contre la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) en France: un dispositif original. Présentation, bilan et perspectives. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* Décembre 41:12-15.

- Makoschey B., Franken P., Mars J.M., **Dubois E.**, Schroeder C., Thiry J., Alvarez M., Rypuła K., Cvirani S., Arnaiz I., Houtain J.Y., Bartak P., Brownlie J., Wolf G., Meyer G., Klees W., Beer M., Moennig V., Thiry E. 2010. IBR and BVD control: the key to successful herd management. Berl Munch Tierarztl Wochenschr Nov-Dec; 123(11-12):519-21, 516-8. English, German.

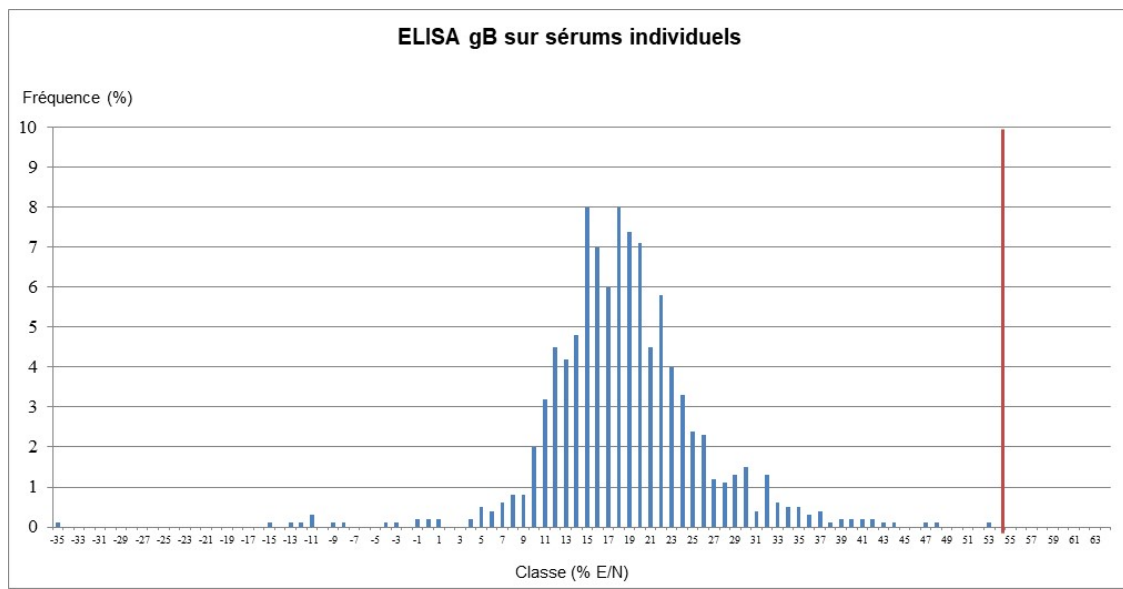


Figure 6 : Evaluation de la spécificité d'un kit ELISA de détection des anticorps dirigés contre la glycoprotéine B du virus IBR (Dubois et al., 2011). Mille sérums de bovins indemnes d'IBR ont été testés. Représentation de la fréquence des sérums en fonction du résultat du test (rapport entre la réponse de l'échantillon et celle du témoin : % E/N). Le trait vertical rouge indique le seuil de positivité. Pour cet ELISA, tous les sérums étaient trouvés négatifs (100% de spécificité).

Mon expérience dans le développement et la validation de méthodes de diagnostic moléculaire des maladies virales m'a également amené à participer à l'élaboration ou à la révision de normes françaises sur les méthodes sérologiques ou moléculaires de diagnostic, sur le contrôle des réactifs de diagnostic, sur l'organisation des EILA en santé animale. Ces actions de normalisation étaient conduites sous l'égide de l'Association française pour la normalisation (Afnor) et de sa commission U47 « Santé animale ».

2.3. Efficacité et innocuité chez le mouton des nouveaux vaccins contre la fièvre catarrhale ovine

En 2008, je reprenais la gestion technique et scientifique de la station expérimentale sur les petits ruminants de l'Anses Sophia Antipolis, portée jusqu'alors par le Dr. Pierre Russo qui partait en retraite. Ces deux années ont été riches en collaborations dont l'objectif principal était l'étude de l'efficacité et de l'innocuité de nouvelles générations de vaccins contre la fièvre catarrhale ovine (Figure 7). Ces projets étaient coordonnés par le Dr. Stéphan Zientara de l'Afssa de Maisons-Alfort. Mon rôle était de mettre en place les protocoles expérimentaux (en coordination avec les scientifiques chargés des projets) et de piloter les expérimentations (déclarations aux services de l'Etat, recrutements des animaux, vérifications du statut sanitaire, confinements, inoculations, suivis cliniques, prélèvements, analyses sérologiques et virologiques, euthanasies, équarrissages et rédaction de rapports d'expérimentation).

Six publications ont découlé de ces collaborations :

- Bouet-Cararo C., Contreras V., Caruso A., Top S., Szelechowski M., Bergeron C., Viarouge C., Desprat A., Relmy A., Guibert J.M., **Dubois E.**, Thiéry R., Bréard E., Bertagnoli S., Richardson J., Foucras G., Meyer G., Schwartz-Cornil I., Zientara S., Klonjowski B. 2014. Expression of VP7, a bluetongue virus group specific antigen by viral vectors: analysis of the induced immune responses and evaluation of protective potential in sheep. PLoS One 2014 Nov 3;9(11):e111605.
- Stewart M., **Dubois E.**, Sailleau C., Bréard E., Viarouge C., Desprat A., Thiéry R., Zientara S., Roy P. 2013. Bluetongue virus serotype 8 virus-like particles protect sheep against virulent virus infection as a single or multi-serotype cocktail immunogen. Vaccine Jan 7; 31(3):553-8.
- Matsuo E., Celma C.C., Boyce M., Viarouge C., Sailleau C., **Dubois E.**, Bréard E., Thiéry R., Zientara S., Roy P. 2011. Generation of Replication-Defective Virus-Based Vaccines That Confer Full Protection in Sheep against Virulent Bluetongue Virus Challenge. Journal of Virology Oct;85(19):10213-21.
- Bouet-Cararo C., Contreras V., Fournier A., Jallet C., Guibert J.M., **Dubois E.**, Thiéry R., Bréard E., Tordo N., Richardson J., Schwartz-Cornil I., Zientara S., Klonjowski B. 2011. Canine adenoviruses elicit both humoral and cell-mediated immune responses against rabies following immunisation of sheep. Vaccine Feb 1;29(6):1304-10.
- Stewart M., Bhatia Y., Athmaran T.N., Noad R., Gastaldi C., **Dubois E.**, Russo P., Thiéry R., Sailleau C., Bréard E., Zientara S., Roy P. 2010. Validation of a novel approach for the rapid production of immunogenic virus-like particles for bluetongue virus. Vaccine 28:3047-3054.

- De Clercq K., Mertens P., De Leeuw I., Oura C., Houdart P., Potgieter A.C., Maan S., Hooyberghs J., Batten C., Vandemeulebroucke E., Wright I.M., Maan N., Riocreux F., Sanders A., Vanderstede Y., Nomikou K., Raemaekers M., Bin-Tarif A., Shaw A., Henstock M., Bréard E., **Dubois E.**, Gastaldi-Thiéry C., Zientara S., Verheyden B., Vandebussche F. 2009. Emergence of bluetongue serotypes in Europe, part 2: the occurrence of a BTV-11 strain in Belgium. *Transbound Emerg Dis.* 56(9-10):355-61.

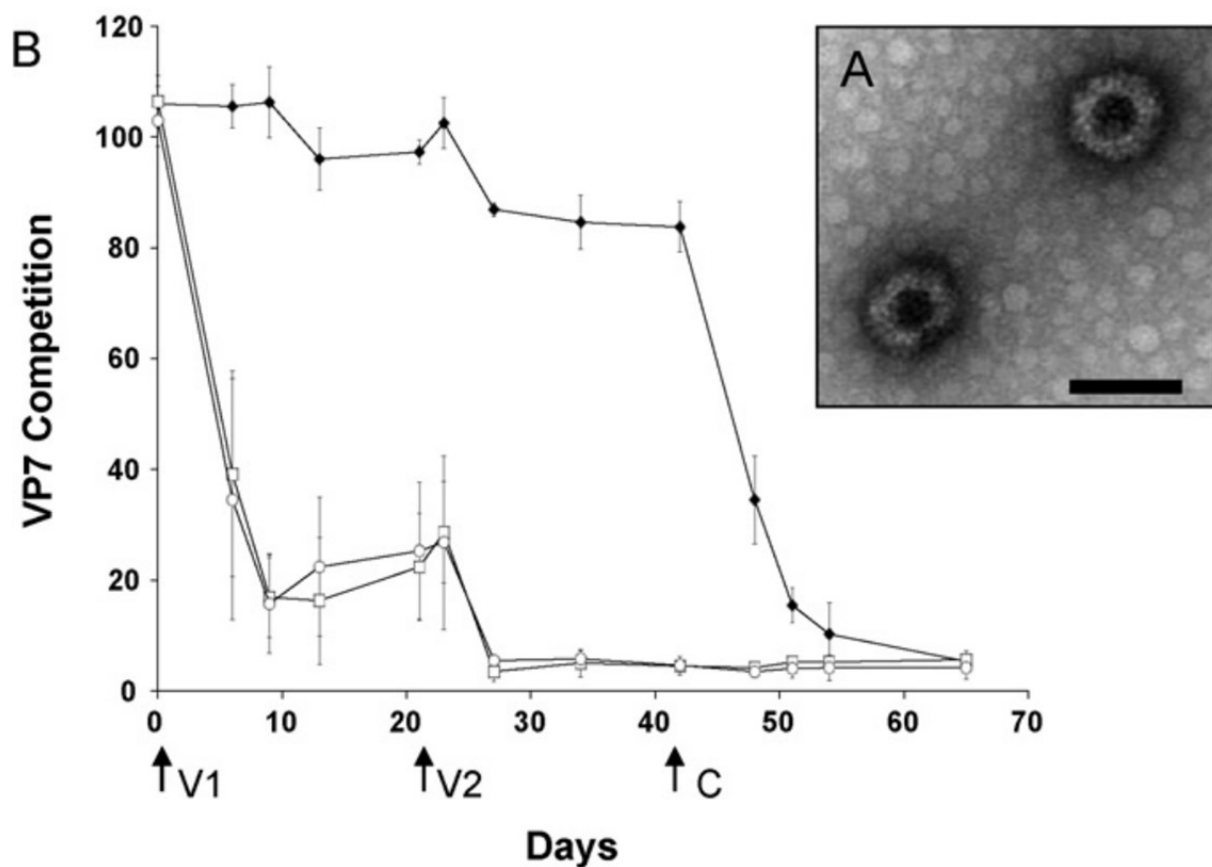


Figure 7 : Evaluation de l'efficacité de vaccins contre la fièvre catarrhale ovine (Stewart et al., 2013). (A) Micrographie électronique de pseudo particules virales (VLP) composées de VP2, VP3, VP5 et VP7 de BTV-8. La barre indique 100 nm. (B). Séroconversion de moutons vaccinés avec les VLP. Réponse d'anticorps contre la protéine VP7 spécifique au groupe BTV en utilisant un ELISA compétitif. V1 et V2 indiquent le jour où les moutons ont été vaccinés. C indique le jour où les moutons ont été éprouvés avec du BTV-8 virulent. Les différents groupes sont indiqués: Groupe contrôle (losanges noirs); Groupe 3, vaccinés avec des VLP (carrés et ronds blancs). Les deux injections de VLP induisaient une réponse immunitaire identique à celle de l'infection naturelle.

3. Etude de virus de l'abeille

En 2013, une nouvelle réorganisation des activités de référence sur les maladies virales des ruminants à l'agence conduisait le laboratoire de Sophia Antipolis à recentrer ses missions sur la fièvre Q animale et la santé des abeilles. J'ai donc accompagné le transfert des activités de référence et de recherche sur l'IBR vers le laboratoire Anses de Niort et je me suis rapproché de l'Unité de pathologie des abeilles, dirigée par le Dr. Magali Ribière-Chabert, pour soutenir les missions de référence sur la santé de l'abeille, exercées au plan national et international (Laboratoire National de référence, Laboratoire européen de référence et Laboratoire de OIE). D'une part, j'ai proposé de renforcer les ressources affectées au diagnostic moléculaire des maladies de l'abeille. D'autre part, j'ai acquis des compétences nouvelles en épidémiologie des maladies animales (ENVA, Maisons-Alfort) pour accroître les capacités d'investigations épidémiologiques de l'unité en lien avec la plateforme d'épidémiologie-surveillance de l'Anses. Toutefois, le décès de l'agent chargé du diagnostic moléculaire des maladies de l'abeille (Monsieur Philippe Blanchard) a bouleversé cette organisation qui se décline depuis en plusieurs thématiques : bactériologie, parasitologie, virologie (Figure 8).

3.1. Diagnostic des principales maladies virales de l'abeille

Je suis alors devenu, fin 2013, responsable de la thématique « Virologie de l'abeille ». Cette thématique ne m'était pas étrangère puisque, dès 2005, j'avais contribué à l'encadrement scientifique de travaux d'une thèse sur la caractérisation du génome du virus de la paralysie chronique de l'abeille (Chronic bee paralysis virus, CBPV) puis à la validation de la méthode de PCR permettant la quantification de ce génome chez les abeilles. Mes premières actions ont été de poursuivre ces travaux de développement et de validation de méthodes de diagnostic des principales maladies virales de l'abeille. Après le CBPV, je me suis intéressé à développer et valider des méthodes de détection et de quantification de l'*Acute bee paralysis virus* (ABPV), du *Black queen cell virus* (BQCV), du *Deformed wing virus* (DWV) et du *Sacbrood virus* (SBV). Mes activités dans le domaine de la référence m'ont également conduit à évaluer, par l'organisation d'EILA, la fiabilité du réseau de laboratoires (français et internationaux) qui réalise le diagnostic de la paralysie chronique. Les résultats de l'ensemble des participants définissaient des valeurs de référence de l'exactitude des quantifications virales et permettaient d'estimer l'incertitude de mesure en condition de reproductibilité. Cette estimation de la variabilité des résultats est importante pour le

diagnostic des maladies virales de l'abeille qui repose sur l'interprétation des quantifications de virus dans l'abeille par rapport à un seuil diagnostique que nous avons défini pour chaque maladie.

Quatre publications ont découlé de ces collaborations :

- Schurr F., Tison A., Militano L., Cheviron N., Sircoulomb F., Rivière M.P., Ribière-Chabert M., Thiéry R., **Dubois E.** 2019. Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses. *Journal of Virological Methods* 270:70-78.
- Schurr F., Cougoule N., Rivière M.P., Ribière-Chabert M., Achour H., Ádám D., Castillo C., de Graaf D.C., Forsgren E., Granato A., Heinikainen S., Jurovčíková J., Kryger P., Manson C., Ménard M.F., Perennes S., Schäfer M.O., San Miguel Ibañez E., Silva J., Tlak Gajger I., Tomkies V., Toplak I., Viry A., Zdańska D., and **Dubois E.** 2017. Trueness and precision of the real-time RT-PCR method for quantifying the chronic bee paralysis virus genome in bee homogenates evaluated by a comparative inter-laboratory study. *Journal of Virological Methods* 248:217-225.
- Blanchard P., Regnault J., Schurr F., **Dubois E.**, Ribière M. 2012. Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. *Journal of Virological Methods* 180(1-2):26-31.
- Olivier V., Blanchard P., Chaouch S., Lallemand P., Schurr F., Celle O., **Dubois E.**, Tordo N., Thiéry R., Houlgatte R., Ribière M. 2008. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Research* 132:59-68.

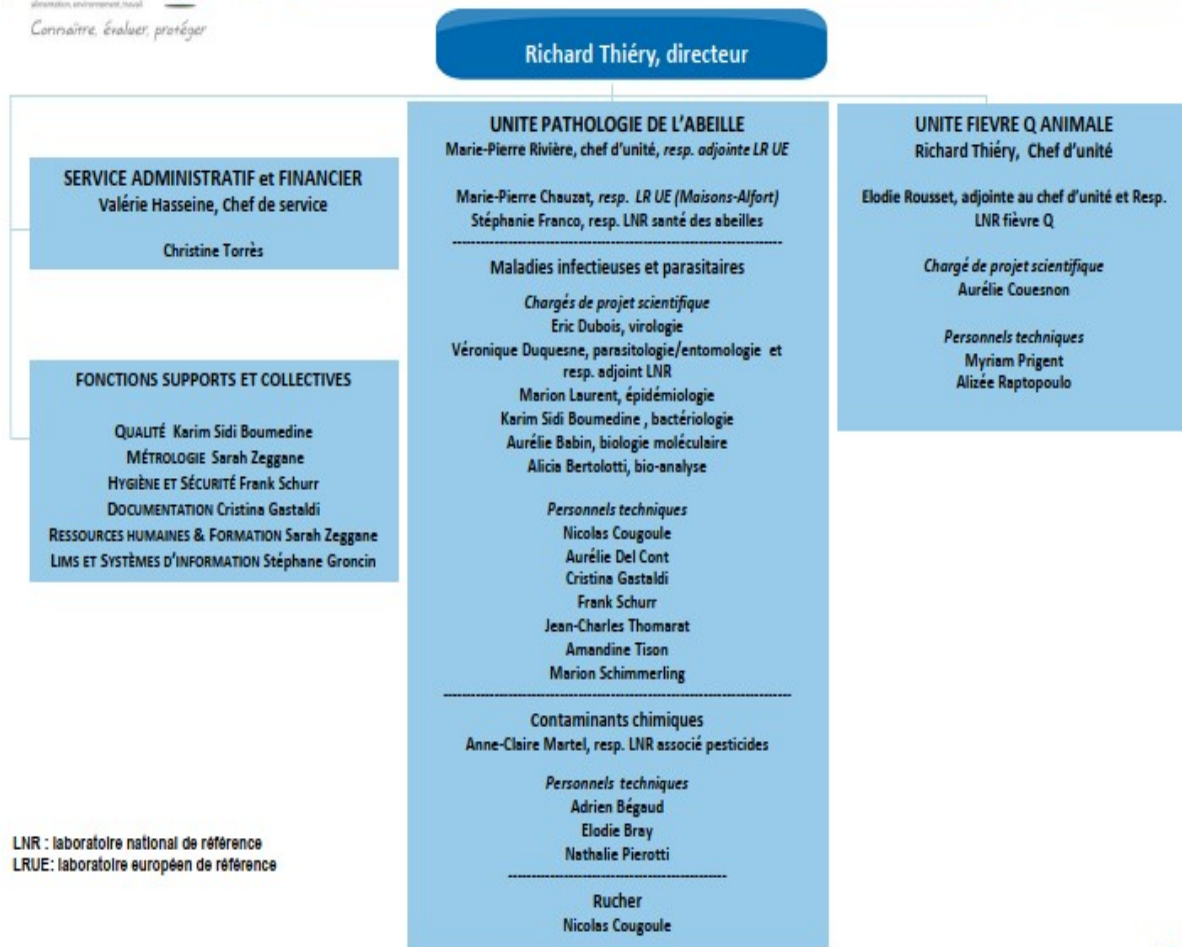


Figure 8 : Organigramme nominatif et fonctionnel du laboratoire Anses Sophia Antipolis. Dans cette organisation, j'occupe la fonction de Chargé de projets scientifiques et responsable de la thématique « Virologie des abeilles ». Cette fonction recouvre des missions d'appui scientifique et technique, d'expertise et de recherche.

3.2. Eco-dynamique des virus de l'abeille

En complément des activités de référence conduites dans l'unité pathologie de l'abeille, je me suis intéressé au devenir des virus de l'abeille en fonction de l'évolution de différents facteurs : temporels (prévalence de détection des variants viraux en fonction du temps), spatiaux (diversité des variants viraux en fonction des pays), ou de différents facteurs de stress comme les pratiques apicoles (effet des trappes à pollen sur les charges virales de l'abeille), les pesticides (effet d'un néonicotinoïde, thiamétoxam, sur les infections virales de l'abeille), ou pour comprendre l'effet d'autres agents pathogènes comme l'acarien *Varroa*

destructor sur les virus de l'abeille. Ces travaux se sont appuyés notamment sur un contexte collaboratif fort avec un projet financé par l'Union européenne (FP7 : « Smartbees » : <https://www.smartbees-fp7.eu/>) et les travaux de deux doctorants dont j'ai assuré l'encadrement scientifique (Dr. Ibrahim Youssef) ou le co-encadrement (Dr. Marianne Coulon) avec le Dr. Anne Dalmon (INRAE, Provence-Alpes-Côte d'Azur).

Sept publications ont découlé de ces collaborations :

- **Dubois E.**, Dalmon A. Relations entre le virus des ailes déformées, l'acarien *Varroa destructor*, l'abeille mellifère et leurs conséquences sur la santé des colonies. *La santé de l'abeille* 297:181-194.
- Coulon M., Dalmon A., Di Prisco G., Prado A., Arban F., **Dubois E.**, Ribière-Chabert M., Alaux C., Thiéry R., Le-Conte Y. 2020. Interactions between thiamethoxam and Deformed wing virus can drastically impair flight behaviour of honey bees. *Frontiers in Microbiology* 11:766.
- **Dubois E.**, Dardouri M., Schurr F., Cougoule N., Sircoulomb F., Thiéry R. 2018. Outcomes of honeybee pupae inoculated with Deformed wing virus genotypes A and B. *Apidologie* 51:18-34.
- Coulon M., Schurr F., Martel A.-C., Cougoule N., Bégaud A., Mangoni P., Di Prisco G., Dalmon A., Alaux C., Ribière-Chabert M., Le Conte Y., Thiéry R., **Dubois E.** 2019. Influence of chronic exposure to thiamethoxam and chronic bee paralysis virus on winter honey bees. *Plos One* 14(8): e0220703.
- **Dubois E.**, Reis C., Schurr F., Cougoule N., and Ribière-Chabert M. 2018. Effect of pollen traps on the relapse of chronic bee paralysis in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 49:235-242.
- Coulon M., Schurr F., Martel A.C., Cougoule N., Bégaud A., Mangoni P., Dalmon A., Alaux C., Le Conte Y., Thiéry R., Ribière-Chabert M., **Dubois E.** 2018. Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the chronic bee paralysis virus in honeybees. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 144:10-18.
- Youssef I., Schurr F., Goulet A., Cougoule N., Ribière-Chabert M., Darbon H., Thiéry R., **Dubois E.** 2015. RNA 1 and RNA 2 Genomic Segments of Chronic Bee Paralysis Virus Are Infectious and Induce Chronic Bee Paralysis Disease. *Journal of Immunology Research* Volume 2015, Article ID 423493.

Ces travaux scientifiques sur les virus de l'abeille sont détaillés et mis en perspective dans le chapitre suivant.

B. Diagnostic et éco-dynamique des virus de l'abeille mellifère (*Apis mellifera*)

4. Le paradoxe des maladies virales de l'abeille

L'organisation mondiale de santé animale (OIE, 2018) récence, dans son manuel des principales maladies des espèces animales de rente, 48% d'entre elles comme ayant une étiologie virale (Figure 9). Pour l'abeille, 7 maladies (bactériennes, fongiques ou parasitaires) sont décrites mais aucune virose. Pourtant, des maladies impactant lourdement la santé des colonies d'abeilles, que l'on sait aujourd'hui comme étant d'étiologie virale, sont connues depuis des millénaires (Bailey and Ball, 1991). De plus, les principaux virus de l'abeille ont été largement identifiés et caractérisés dès les années 1970 (Allen and Ball, 1996). Depuis, jusqu'à 15 espèces virales ont été rapportées comme infectant les abeilles dont les plus récentes ont été découvertes grâce au séquençage de nouvelle génération (de Miranda et al., 2015).

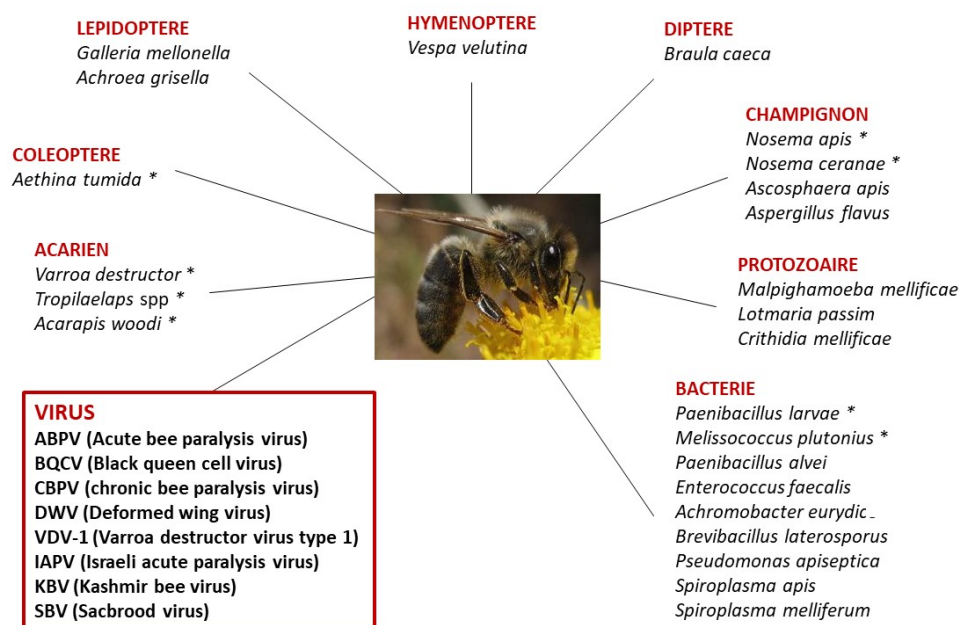


Figure 9 : Principaux dangers biotiques de l'abeille. Les dangers sanitaires, référencés par l'OIE sont suivis de *. Les principaux virus étudiés à l'Anses sont en gras.

Cette lacune dans la reconnaissance de l'importance des virus, par l'organisme de référence en santé animale, trouve son explication, d'une part, dans la capacité des colonies à tolérer les infections virales, d'autre part, dans la difficulté à diagnostiquer les maladies virales de l'abeille. Même dans cette situation où l'apiculteur (voire le vétérinaire sanitaire) est face à une colonie qui présente des troubles de santé, les signes cliniques observés ne sont généralement pas spécifiques des maladies virales et peuvent également être décrits pour des infections bactériennes, parasitaires ou même lors d'intoxications des abeilles. Par ailleurs, la population d'une colonie peut s'être effondrée sans signe avant-coureur (Figure 10). Le développement d'outils de diagnostic de laboratoire fiables revêt alors une importance particulière.



Figure 10 : Photo d'un cadre de ruche qui présente les signes d'un effondrement de colonie (colony collapse disorder : CCD). A la sortie de l'hiver une poignée d'abeilles est regroupée autour de la reine. Pourtant des réserves restent visibles. Cette colonie trop faible dépérira. Crédit photographique : Anses.

Quelle que soit l'espèce animale considérée, le diagnostic virologique a énormément progressé dans sa rapidité, sa fiabilité et également dans son coût ; ce qui aujourd'hui le rend accessible pour de nombreuses enquêtes de santé ou études d'écologie microbienne. Le diagnostic des maladies virales de l'abeille a suivi cette évolution, passant de l'examen direct par microscopie électronique (Bailey et al., 1963), au diagnostic sérologique (Ribière et al., 2000), puis au diagnostic moléculaire (Ribière et al., 2002). Toutefois, l'interprétation des premiers résultats des PCR conventionnelles, permettant la détection de façon sensible des génomes viraux chez l'abeille, s'est heurtée à la prévalence importante des infections virales même dans des colonies apparemment saines (Tentcheva et al., 2004).

Mes travaux en virologie de l'abeille ont donc débuté par l'amélioration de la spécificité du diagnostic des maladies virales. Ce diagnostic est aujourd'hui réalisé avec des méthodes validées permettant une estimation des charges virales. L'interprétation des résultats repose sur l'interprétation des charges au regard de seuils qui séparent les cas d'infections inapparentes (covert-infections), des infections associées à des troubles chez les abeilles ou aux colonies entières (overt-infections). Mes travaux ont ensuite évolué vers la compréhension des facteurs pouvant contribuer à rompre l'équilibre précaire entre les virus et leur hôte.

5. Le diagnostic des maladies virales de l'abeille mellifère

5.1. Le choix des maladies virales ciblées pour le diagnostic

Il est clairement établi aujourd'hui que pratiquement toutes les colonies d'abeilles mellifères sont infectées par des virus (Amiri et al., 2015; Tentcheva et al., 2004). Cependant, le rôle de certains virus sur la santé des abeilles n'est pas complètement connu (McMenamin and Flenniken, 2018). D'une part, la très forte prévalence de virus n'est pas associée à une forte prévalence des troubles de santé. Il semblerait même que l'abeille puisse résister à l'infection (via son système immunitaire) ou tolérer l'infection (via des mécanismes de compensation) (Locke et al., 2014). Toutefois, cet équilibre entre l'hôte et son parasite est précaire et il peut être rompu par des facteurs de stress supplémentaires. D'autre part, les conséquences de l'infection ne sont pas connues pour les virus les plus récemment identifiés chez l'abeille. Le plus caractéristique est le Lake Sinai virus 2 (LSV 2) dont la prévalence et la charge virale par abeille peuvent être très importantes, sans qu'aucun impact n'ait pu être décrit sur la santé des colonies voir même sur celle des individus infectés (Daughenbaugh et al., 2015; Runckel et al., 2011). Le choix de développer des méthodes de diagnostic des maladies virales s'est donc orienté en priorité vers celles qui étaient connues comme pouvant altérer la santé des abeilles. Néanmoins, il est prudent de rester vigilant avec ces virus nouveaux. Même s'ils semblent apparemment bien tolérés par l'abeille, les conséquences de ces infections virales sur la santé de l'abeille ou d'une colonie pourraient être moins facilement observables (effets sub-cliniques) comme par exemple : réduire l'activité de butinage ou la durée de vie. Les nouveaux outils (comme le marquage des butineuses avec des puces RFID ; (Henry et al., 2012)) sont disponibles pour étudier ces effets subtils mais ils ne sont pas encore disponibles dans tous les laboratoires et demandent une quantité importante de données pour fournir des résultats significatifs.

5.1.1. La paralysie chronique

Le premier virus auquel je me suis intéressé est le virus de la paralysie chronique de l'abeille (chronic bee paralysis virus – CBPV). Le laboratoire avait apporté une contribution importante à l'étude de ce virus (Ribiere et al., 2010) responsable d'une maladie de l'abeille adulte : la paralysie chronique. Bailey et al. (1963) sont les premiers à établir l'étiologie virale de cette maladie dont certains symptômes seraient décrits depuis l'antiquité (Bailey and Ball, 1991). L'infection naturelle se transmet principalement par contact soit avec des fèces infectés soit entre abeilles (Ribiere et al., 2007). Nous avons également montré expérimentalement que la cinétique de contamination entre individus infectés et sains était rapide (Figure 11 ; (Coulon et al., 2018)). De plus, l'inoculation du virus à des abeilles saines conduit après cinq jours à l'apparition de divers signes cliniques tels que des abeilles tremblantes, incapables de voler, à des abeilles noires et dépilées (Youssef et al., 2015). Ces troubles identiques à ceux observés sur le terrain (Figure 12) sont suivis de mortalités importantes également représentatives des mortalités massives de butineuses observées devant les colonies (formant des tapis d'abeilles mortes).

Pourtant, cette maladie présente dans de nombreux pays (Blanchard et al., 2009) ne constitue pas une menace pour l'apiculture. Bien qu'elle conduit à la chute de productivité, liée à la perte brutale de l'ensemble des butineuses, la colonie compense rapidement ce déséquilibre par le recrutement de nouvelles butineuses chez les nourrices. Toutefois, il peut en résulter un déficit transitoire d'entretien du couvain et contribuer à l'expression clinique de maladies intercurrentes du couvain, retardant la capacité de la colonie à récupérer une population et une activité normale. La reine (la seule reproductrice de la colonie) est sensible à l'infection mais l'immunité sociale lui permettrait de résister à l'infection (Amiri et al., 2014). De plus, les cas cliniques rapportés sont peu fréquents (moins de 4% des troubles de l'abeille ; (Laurent et al., 2015)) au regard de la prévalence plus importante du virus (détecté dans 28% des ruchers (Tentcheva et al., 2004)). Les pertes de colonies consécutivement à des cas de paralysie chronique sont donc encore plus rares. En fait, les infections par le CBPV sont le plus souvent asymptomatiques et se caractérisent également par de faibles charges virales (Amiri et al., 2015).

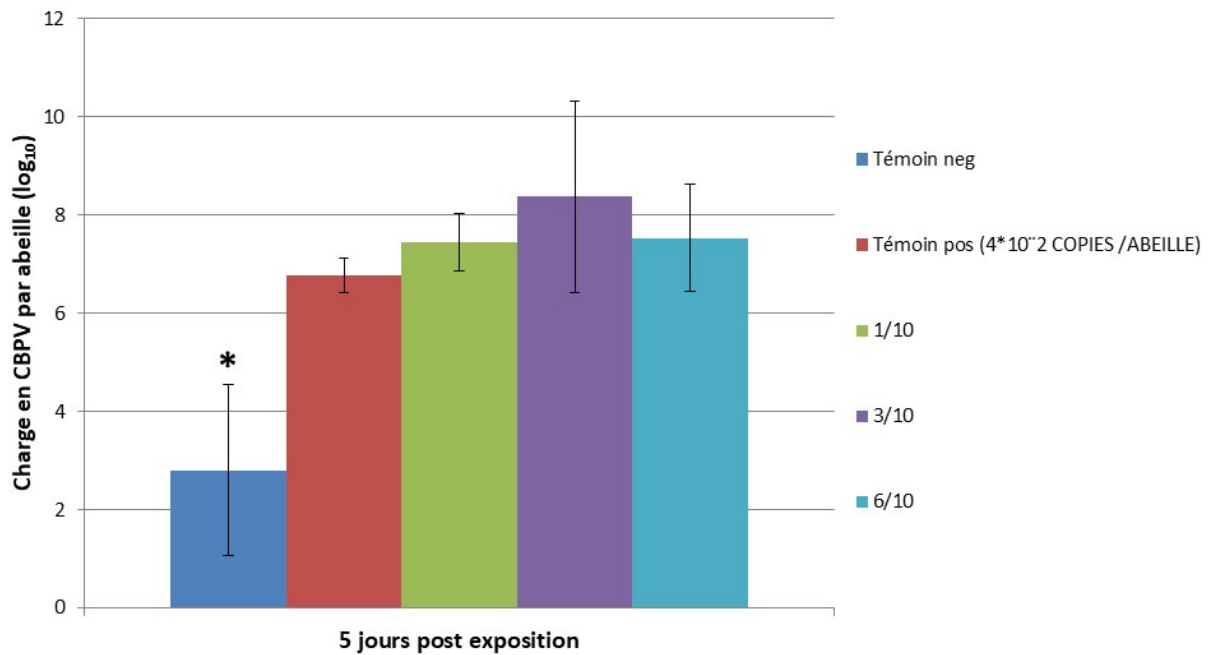


Figure 11 : Charges virales en CBPV d'abeilles infectées par contact (Coulon et al., 2018). Des abeilles émergentes faiblement contaminées en CBPV (Témoigneg) ont été mises au contact d'abeilles préalablement inoculées avec 400 CBPV (Témoins pos) selon des ratios variant de (de 1 à 6 abeilles inoculées pour 10 abeilles seines : 1/10 à 6/10, respectivement). Les charges virales des abeilles (5 jours après mise en contact) sont mesurées par RT-PCR quantitatives et exprimées en logarithme décimal. La barre d'erreur correspond à l'écart-type des mesures. Teste ANOVA : * correspond à $p < 0,05$. Toutes les abeilles saines au contact des abeilles inoculées sont infectées après 5 jours à des charges significativement différentes des abeilles témoins. Leurs charges virales ne varient pas significativement de celle des abeilles infectées par inoculation, ni en fonction de la proportion d'abeilles exposées.

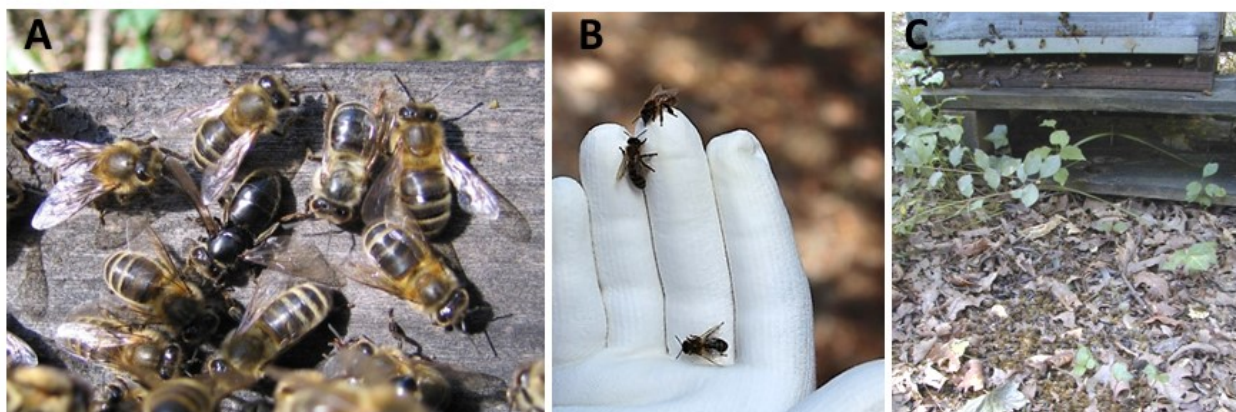


Figure 12 : Principaux signes cliniques de la paralysie chronique. **A.** Le signe clinique le plus visible est l'abeille noire, dépilée. Toutefois, cette mélanisation, parfois consécutive à l'infection, n'est pas systématique, ni spécifique de la paralysie chronique. **B.** Des abeilles tremblantes, incapables de voler que l'on retrouve parfois accrochées aux brins d'herbe sont plus symptomatiques de la maladie. **C.** Les cas sévères conduisent à de mortalités massives devant les colonies. Crédit photographique : Anses.

L'incidence de cette maladie ne semble pas être impactée par l'acarien *Varroa destructor* (Mondet et al., 2014), bien que son expansion mondiale ait durablement dégradé la santé de millions de colonies notamment en étant le vecteur d'autres virus (principalement du virus des ailes déformées - DWV). Car si le génome du CBPV ainsi que des intermédiaires de réplication virale (ARN négatifs ou anti-sens) ont été détectés chez cet acarien (Celle et al., 2008), il est probable que la présence de ces ARN négatifs soit liés à la consommation de cellules d'abeilles infectées et non à la réplication du virus chez *V. destructor* comme cela l'a été suggéré pour le DWV de type A (Ryabov et al., 2019). De plus, l'abeille adulte (particulièrement l'abeille butineuse) apparaît plus sensible à l'infection (Blanchard et al., 2007), limitant l'impact d'une potentielle transmission du virus par l'acarien qui se nourrit préférentiellement sur les larves et les abeilles émergentes (Ramsey et al., 2019). Pourtant et depuis la fin du XX^{ème} siècle, les brutales mortalités d'abeilles, observées devant les ruches infectées par le CBPV, quand elles se produisent, inquiètent particulièrement les apiculteurs. En effet, la maladie peut être confondue avec les troubles associés aux pesticides (plus largement utilisés en agriculture depuis cette période). L'unité de pathologie de l'abeille avait donc défini des enjeux importants sur le diagnostic de cette maladie afin d'élucider les causes de mortalités massives d'abeilles observées par les apiculteurs en saison apicole.

5.1.2. Les autres principaux virus d'abeille

Parmi les virus qui affectent principalement les abeilles en Europe, quatre sont associés à des troubles du couvain d'abeille. Ces virus appartiennent à l'ordre *Picornavirales* (Tableau 1 ; petits virus nus à symétrie icosaédrique renfermant un ARN simple brin polyadénylé dont le virus humain *Poliovirus* est le modèle), regroupant deux principales familles de virus : *Dicistroviridae* et *Iflaviridae* (<https://www.ictvonline.org/>).

Tableau 1 : Classification des principaux virus d'abeille de l'ordre *Picornavirales*.

Ordre	Famille	Genre	Espèce
<i>Picornavirales</i>	<i>Dicistroviridae</i>	<i>Cripavirus</i>	<i>Black queen cell virus</i>
		<i>Aparavirus</i>	<i>Acute bee paralysis</i> <i>Kashmir bee virus</i> <i>Israeli acute paralysis virus</i>
	<i>Iflaviridae</i>	<i>Iflavirus</i>	<i>Sacbrood virus</i> <i>Deformed wing virus</i> <i>Varroa destructor virus 1</i>

5.1.2.1. Virus de la famille *Dicistroviridae*

Parmi les virus de la famille *Dicistroviridae*, le virus de la cellule royale noire (*Black queen cell virus* – BQCV) du genre *Cripavirus* est certainement le virus le plus fréquemment détecté dans les colonies d'abeilles mellifères. Une prévalence de 84% a récemment été mesurée en Allemagne (D'Alvise et al., 2019). Comme vraisemblablement l'ensemble des picornavirus, le BQCV se transmet horizontalement par la voie féco-orale ou par la contamination du pollen contaminé par les butineuses déjà infectées (Alger et al., 2019). La voie de transmission verticale n'est pas exclue (Chen et al., 2006; Singh et al., 2010). Ce virus atteint plus particulièrement les larves de reines, en développement, qui meurent dans leur cellule royale aux parois noircies (Figure 13). Ce virus pose particulièrement des problèmes sanitaires dans les élevages de reines (Rivière et al., 2008). L'infection même inapparente des reines par ce virus serait également corrélée à une moindre fertilité (McAfee

et al., 2021). Sa pathologie sur le couvain d'abeilles semble étroitement liée aux co-infections avec les microsporidies *Nosema apis* et *Nosema ceranae* (Bailey et al., 1983; Doublet et al., 2015). Ce virus diminuerait également la durée de vie des abeilles adultes et induirait des dérives de butineuses favorisant aussi sa dissémination dans les ruchers (Retschnig et al., 2019). Enfin, les ouvrières, butinant des cultures traitées par les néonicotinoïdes, seraient plus sensibles aux infections par le BQCV (Alburaki et al., 2015).

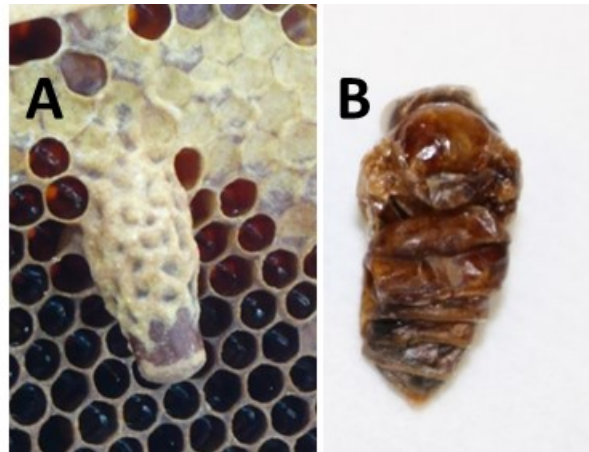


Figure 13 : Principaux signes de la maladie de la cellule royale noire. Les élevages de reines, frappés par cette maladie montrent des cellules royales aux parois sombres (A) dans lesquels les nymphes de reines sont mortes (B). Sur du couvain d'abeilles une coloration inhabituelle des opercules peut également être observée. Crédit photographique : Anses.

Au sein des dicistrovirus et du genre *Aparavirus*, trois espèces virales très proches ont été regroupées en un complexe viral incluant le virus de la paralysie aiguë de l'abeille (*Acute bee paralysis virus* - ABPV), le virus d'abeille du Cachemire (*Kashmir bee virus* – KBV) et le virus israélien de la paralysie aiguë (*Israeli acute paralysis virus* – IAPV). La prévalence de l'ABPV est globalement plus importante dans les colonies en Europe que celle du KBV ou de l'IAPV mais bien moindre que celle du BQCV. Des prévalences de 16 % a été récemment rapportée en Allemagne contre moins de 2% pour KBV ou IAPV (D'Alvise et al., 2019). Toutefois, une étude conduite entre 2009 et 2010 dans la région Bretagne avait rapporté une prévalence plus importante du KBV et de l'IAPV par rapport à l'ABPV (Mouret et al., 2013). La prévalence de ces trois virus varie en fonction des zones géographiques. Habituellement, le KBV est plus fréquent en Amérique du nord et l'IAPV en Asie et Australie (de Miranda et al., 2010). Néanmoins, les échanges d'abeilles entre pays (notamment *via* l'exportation de reines) pourraient bouleverser cette distribution virale (Bhatia et al., 2021). Ces virus et notamment l'ABPV persistent normalement à de faibles charges virales sans symptômes

évidents. Cependant, dans certaines conditions, ils peuvent devenir extrêmement virulent, réduisant drastiquement les populations d'abeilles et de couvain sans qu'aucun signe clinique ne soit observé sur le terrain (Azzami et al., 2012; de Miranda et al., 2010). En revanche, lorsque des abeilles adultes sont inoculées expérimentalement avec l'ABPV, la paralysie apparaît dès le premier jour post-inoculation et la mort des abeilles est presque totale dans les quatre jours qui suivent (Bailey et al., 1963). Dans les colonies, les pertes peuvent être plus importantes si elles sont infestées par *V. destructor* ; cet acarien d'abeille serait un vecteur de l'ABPV, bien qu'il n'y ait aucune preuve de réplication virale chez l'acarien (de Miranda et al., 2010).

5.1.2.2. Virus de la famille *Iflaviridae*

Au sein de la famille *Iflaviridae*, le genre viral (genre *Iflavirus*) est composé de deux espèces virales importantes : le virus du couvain sacciforme (*Sacbrood virus* – SBV) et le virus des ailes déformées (*Deformed wing virus* - DWV). Les larves infectées par le virus SBV cessent leur nymphose et le liquide de mue s'accumule entre les téguments, formant un saccule. Ce signe clinique est facilement reconnu par l'apiculteur et fait très certainement de cette maladie virale celle qui est la plus fréquemment rapportée (Figure 14). Le SBV est plus virulent chez les larves que le BQCV. La mortalité importante de larves se caractérise généralement par un couvain en mosaïque. Le SBV peut aussi réduire la durée de vie des butineuses infectées (Bailey and Fernando, 1972). Toutefois, comme pour l'ABPV ou le BQCV, les larves mortes seraient cannibalisées par d'autres abeilles et la mort des adultes infectés se produirait pendant la recherche de nourriture, expliquant ainsi une absence de cadavres d'abeilles ou de larves devant les colonies affaiblies par le SBV (de Miranda et al., 2010).

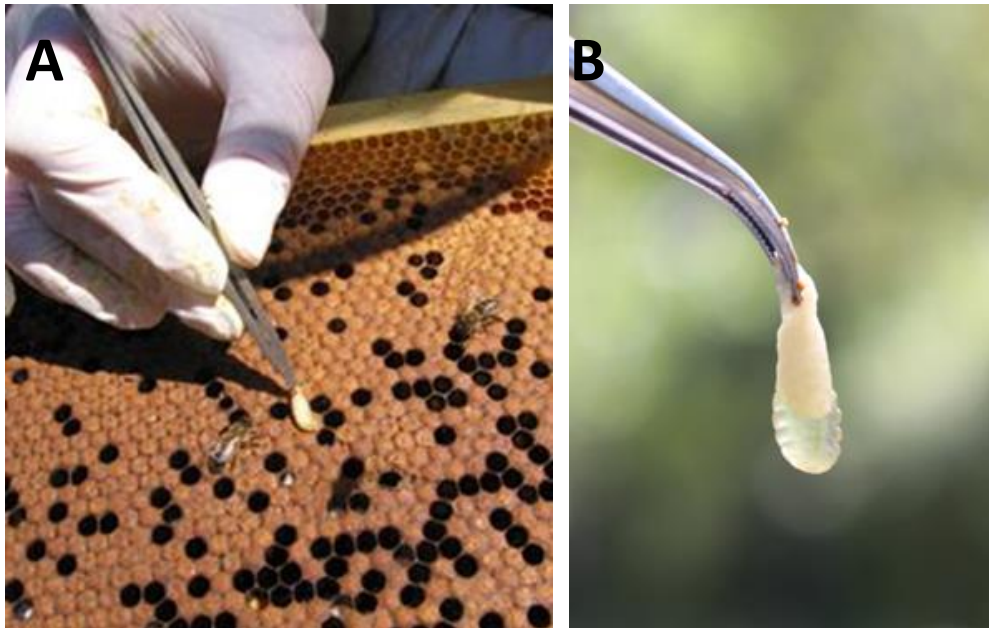


Figure 14 : Principaux signes cliniques du couvain sacciforme. Les cas de couvain sacciforme sont facilement identifiables par l'apiculteur. **A.** Un couvain en mosaïque (alvéoles désoperculées nombreuses et éparées dans du couvain operculé) est le premier indice qui conduit à rechercher des larves avec saccule. **B.** Chez ces larves, le liquide interstitiel qui s'accumule sous le tégument des larves infectées est très riche en SBV. Crédit photographique : Anses.

L'espèce virale *Deformed wing virus* regroupe des virus génétiquement proches et classés dans trois types viraux. Le génotype A (DWV-A) se compose des souches de DWV qui infectaient l'abeille avant les années 2000 en Europe et aux Etats Unis. A partir de cette période, un nouveau variant génétique (génotype B – DWV-B) a émergé. Ce virus avait initialement été isolé chez *V. destructor* dont il tirait son nom *Varroa destructor virus 1* (VDV1) (Ongus et al., 2004). Ces deux types viraux ont la capacité de se recombiner et aujourd'hui le DWV-A semble dans certaines régions avoir été remplacé par le DWV-B et/ou des DWV-recombinants. Pour la France, nos analyses indiqueraient que le changement de prévalence se serait effectué dans les années 2014 (Schurr et al., 2019). A l'échelle des Etats-Unis, le changement de virus se serait produit entre les années 2000, quand le DWV-A dominait, et 2006, quand le DWV-B le supplantait. Bien qu'il serait un variant plus ancien que le DWV-A, le génotype C (DWV-C) a été plus récemment identifié en Angleterre (Mordecai et al., 2016b). Tout ou partie de son génome serait encore présent dans certaines colonies de régions du monde (Brettell et al., 2017; Kevill et al., 2017). En France, des séquences de DWV-C ont été détectées à partir du tube digestif de frelons asiatiques suggérant la présence de ce variant chez les abeilles qui auraient été consommées (Dalmon et al., 2019). Toutefois, la prévalence et l'incidence du DWV-C sur la santé de l'abeille restent à clarifier.

Les DWV provoquent des déformations des ailes lors du développement des nymphes qui meurent peu de temps après leur émergence (Figure 15).



Figure 15 : Principal signe clinique de la maladie des ailes déformées. Des abeilles naissant avec des ailes atrophiées est caractéristique de la transmission aux larves du DWV par l'acarien *Varroa destructor*. Crédit photographique : Anses.

Nous avons montré expérimentalement que les deux génotypes de DWV (A et B) ne présentaient pas de différence de virulence évidente lorsqu'ils étaient inoculés à des nymphes d'abeilles (Figure 16). Les deux génotypes produisent peu de mortalités de nymphes et des taux d'abeilles émergentes aux ailes déformées comparables. Une légère différence de proportion des déformations en fonction des charges virales a été observée en faveur d'un effet plus important du DWV-A (Dubois et al., 2020). Néanmoins, un plan d'expérimentation plus conséquent serait nécessaire pour étayer statistiquement cette observation. Ces virus réduisent également la durée de vie et l'activité de butinage des abeilles adultes infectées (Benaets et al., 2017; Brettell et al., 2017; de Miranda and Genersch, 2010; Wells et al., 2016). Le DWV-B induirait chez l'abeille adulte des mortalités plus précoces que le DWV-A (McMahon et al., 2016). Pourtant, ces DWV n'avaient pas un impact majeur avant l'introduction de *V. destructor* dans les colonies d'*Apis mellifera*. Aujourd'hui, les DWV, combinés à une infestation non contrôlée de cet acarien, sont des marqueurs prédictifs des pertes de colonies (Barroso-Arevalo et al., 2019; Dainat and Neumann, 2013; Francis et al., 2013). L'association du variant DWV-B et de *V. destructor* conduirait à un risque important de perte hivernal de colonies (Natsopoulou et al., 2017). Récemment, avec le Dr. Anne Dalmon (INRAE, Avignon), nous avons publié un article de vulgarisation afin d'informer les apiculteurs et agents chargés de la santé de l'abeille

mellifère des enjeux importants pour l'apiculture, de l'association des DWV et de l'acarien *V. destructor* (Dubois and Dalmon, 2020).

Après le CBPV, ces quatre virus (ABPV, BQCV, DWV et SBV) ont constitué le nouvel enjeu de mes travaux de validation de méthodes de diagnostic.

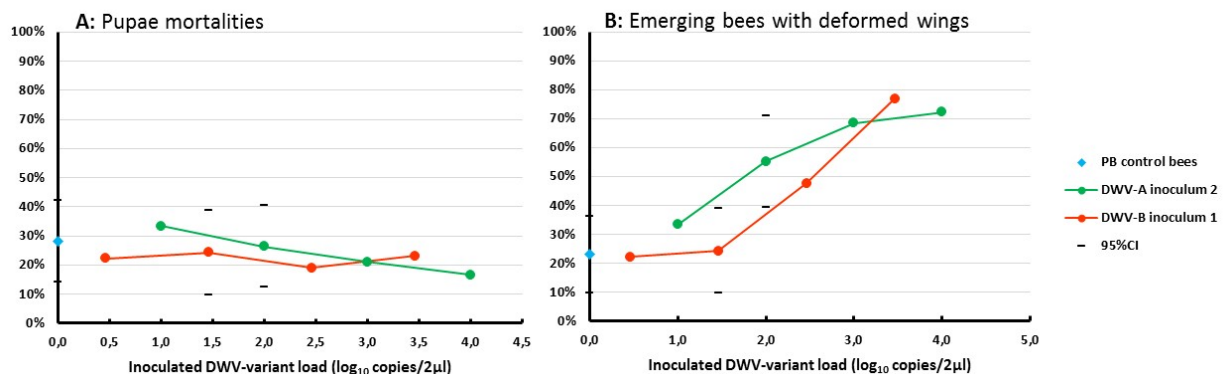


Figure 16 : Pathogénicité comparable des différents génotypes de DWV (Dubois et al., 2020). Les pourcentages de mortalités des pupes (**A**) et d'abeilles émergentes aux ailes déformées (**B**) ont été calculés après inoculation de nymphes avec des dilutions croissantes de DWV-A ou de l'inoculum DWV-B. PB: 39 nymphes (2 essais) ont été inoculées avec du tampon phosphate. Les nymphes ont été inoculées avec des dilutions en série de DWV-A contenant 10, 100, 1 000 et 10 000 copies de génome par 2 µl (n = 18, 38 [2 essais], 19 et 18 nymphes, respectivement) ou avec des dilutions en série de DWV-B contenant 3, 30, 300 et 3 000 copies de génome par 2 µl (n = 18, 33 [2 essais], 21 et 13 pupes respectivement). Les tirés indiquent l'intervalle de confiance à 95% (95%IC) des taux calculés pour les expérimentations dupliquées.

5.2. Cibles moléculaires du diagnostic des principales maladies virales

Le diagnostic moléculaire, par transcription inverse, couplée à une amplification enzymatique (RT-PCR) du génome viral, reste le moyen le plus sensible et le plus spécifique de détection des virus à ARN. De plus, le principe de suivi en temps réel de l'amplification par la chimie d'hydrolyse de la sonde (TaqMan®) permet d'accroître la spécificité de la réaction et également de quantifier précisément le nombre de séquences virales présentes dans l'échantillon. Plusieurs cibles moléculaires ont été décrites dans la littérature. Le Beebook fournit une revue des amorces et sondes qui peuvent être utilisées (de Miranda et al., 2013). Notre choix des cibles moléculaires répondant aux exigences de spécificité du diagnostic (d'inclusivité : capacité à cibler toutes les séquences génomiques des virus du même genre ; et d'exclusivité : capacité à ne pas cibler des séquences génomiques autres que celles du

genre viral) a reposé sur la connaissance du génome et de la représentativité des séquences nucléotidiques parmi les virus du même genre. Cette analyse a été conduite informatiquement (*in silico*) et expérimentalement (*in vitro*).

5.2.1. Le génome du CBPV

Le CBPV est un virus non enveloppé à capsid anisométrique de 20 à 60 nm (Figure 17), renfermant un génome d'ARN monocaténaire, segmenté, de polarité positive. Nous avons séquencé les deux ARN majeurs. L'ARN 1 est composé de 3.674 nucléotides [nt] code pour les protéines non structurales (3 cadres ouverts de lecture ; open reading frame, ORF) et l'ARN 2, de 2.305 nucléotides, code pour les protéines de la capsid (4 ORF). Ces ARN génomiques ne sont pas polyadénylés à leur extrémité 3' et ont une structure CAP à la leur extrémité 5' (Figure 18).

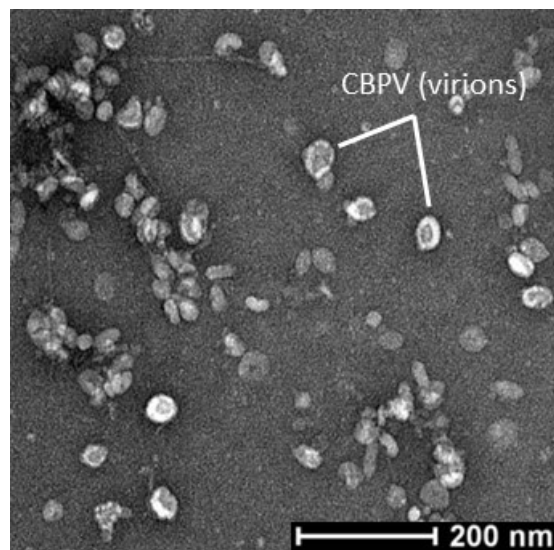


Figure 17 : Photographie en microscopie électronique de particules virales (virions) de CBPV (Youssef et al., 2015). Le CBPV présente une forme an-isométrique d'environ 30 à 60 nm de long et 20 nm de large.

En plus des deux ARN majeurs, trois ARN mineurs avaient été décrits dans les premières études du génome du CBPV. Cependant, ces ARN mineurs n'avaient pas été observés dans aucune étude ultérieure (Olivier et al., 2008a). Nous avons pu utiliser les propriétés infectieuses du génome viral, purifié par inoculation directe d'abeille (Chevin et al., 2012), pour démontrer que les ARN 1 et 2 permettaient à eux seuls de réaliser un cycle complet de

réplication virale (Youssef et al., 2015). Le pouvoir infectieux de ces ARN s'accompagne également de l'observation des signes cliniques de la paralysie chronique de l'abeille (Figure 19). Nous avons ainsi établi que ces deux ARN constituent la base génétique du CBPV. Les ARN « minoritaires » seraient un artefact d'expérimentation, associés à un virus satellite du CBPV qui aurait pu co-infecter les abeilles précédemment étudiées.

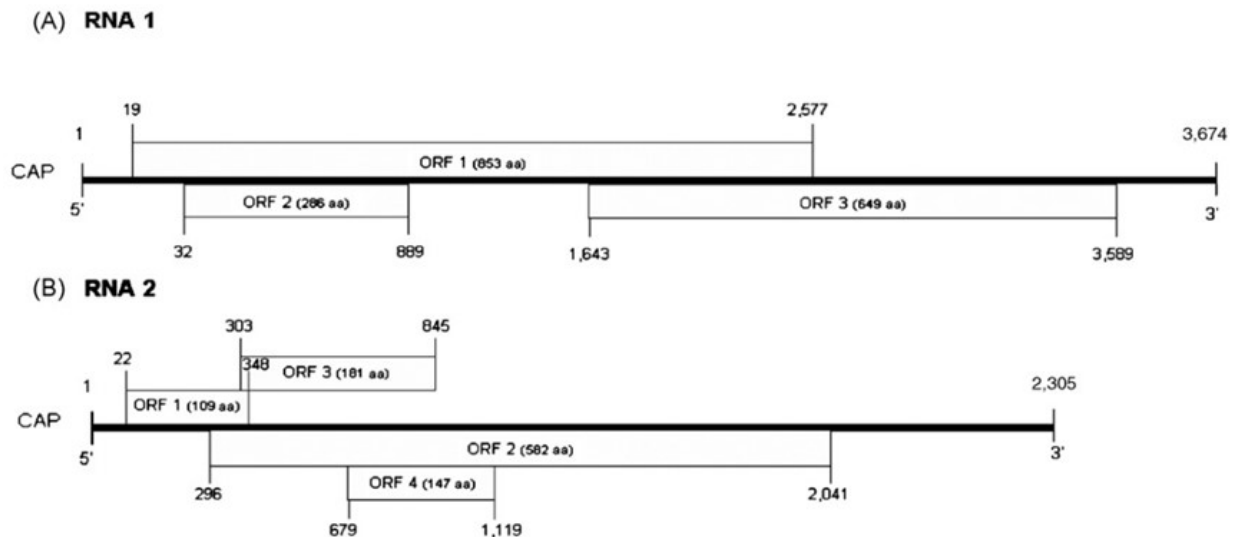


Figure 18 : Le génome du CBPV (Olivier et al., 2008a). Deux ARN simple brin (coiffé non polyadénylé) constituent le génome du CBPV. **A.** L'ARN 1 (de 3674 bases de long) possède trois cadres ouverts de lecture (open reading frame : ORF), chevauchants. Cet ARN coderait pour les protéines non structurales du virus. A noter, l'ARN polymérase RNA dépendante est codée par l'ORF 3. **B.** L'ARN 2 (de 2305 base de long) possède quatre ORF chevauchants. Cet ARN 2 coderait pour les protéines de la capsid. Des mécanismes d'initiation alternative de traduction et de changement de cadre de lecture (frame-shift) permettent de produire des protéines utilisant tout ou partie de ces ORF (Chevin et al., 2015).

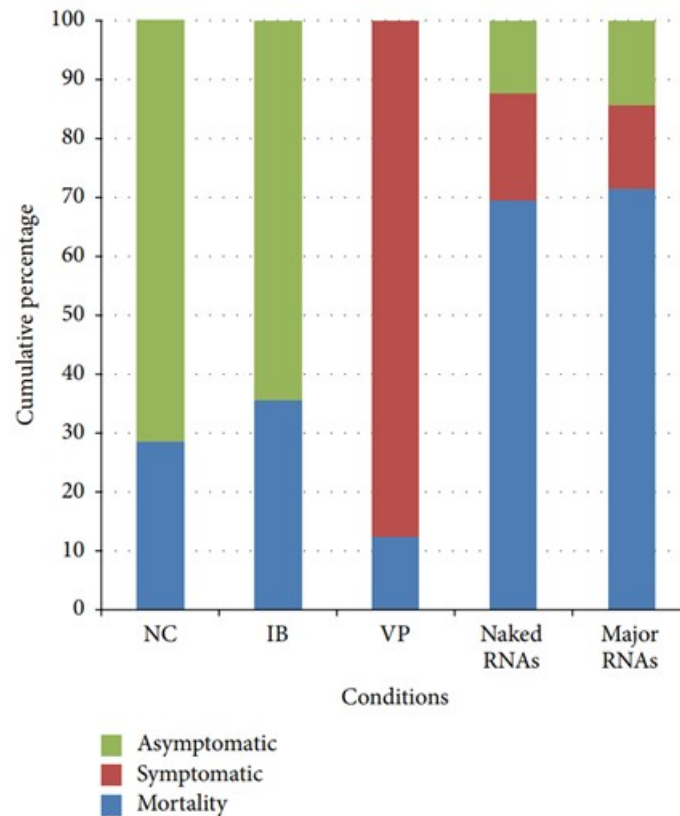


Figure 19 : Reproduction expérimentale de la paralysie chronique par inoculation à des abeilles, des ARN 1 et 2 (purifiés) du CBPV (Youssef et al., 2015). Les abeilles témoins non inoculées (NC) ou inoculées avec du tampon (IB) présentaient peu de mortalités, 6 jour après inoculation. Celles inoculées avec le CBPV (VP) présentaient des tremblements caractéristiques de la maladie. Les abeilles inoculées avec les ARN totaux de CBPV (Naked RNAs) ou avec seulement les ARN 1 et 2 (purifiés sur gel d'agarose : Major RNAs) présentent des signes de la maladie mais aussi des mortalités importantes.

La caractérisation de ce génome nous a procuré les bases pour l'étude des relations phylogénétiques du CBPV avec d'autres virus. À ce jour, le CBPV est non classé par le Comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) (<http://www.ictvonline.org/>). Toutefois, nous avons montré que la séquence de l'ORF 3 de l'ARN 1, qui code pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), montre des similitudes avec les gènes homologues de virus de la famille des *Nodaviridae* et *Tombusviridae* (Olivier et al., 2008a). Par ailleurs, Runckel et al. (2011) ont découvert de nouvelles séquences virales (virus Lake Sinaï 1 et virus Lake Sinaï 2) fortement apparentées au CBPV. En outre, Schuster et al. (2014) décrivent un nouveau virus appelé mosinovirus présentant des liens phylogénétiques avec le LSV et le CBPV. Les auteurs suggèrent que ces virus pourraient appartenir à une nouvelle famille virale.

Le laboratoire avait sélectionné comme cible de la RT-PCR l'ORF 3 de l'ARN 1 en raison de la présence de domaines conservés entre les souches CBPV (Blanchard et al., 2007). Toutefois, les premières amorces utilisées sur la base des séquences virales connues s'étaient avérées ne pas s'hybrider avec l'ensemble génomes des isolats de CBPV (défaut d'inclusivité). La conséquence était l'obtention de résultats faux négatifs lors de diagnostics alors que les abeilles présentaient des signes évidents de paralysie chronique. D'une part, l'analyse de la diversité génétique des séquences virales dans cette région a été étayée (Figure 20) afin de définir les séquences des amorces et d'une sonde plus ubiquitaire aux différentes souches (Blanchard et al., 2008; Blanchard et al., 2009).

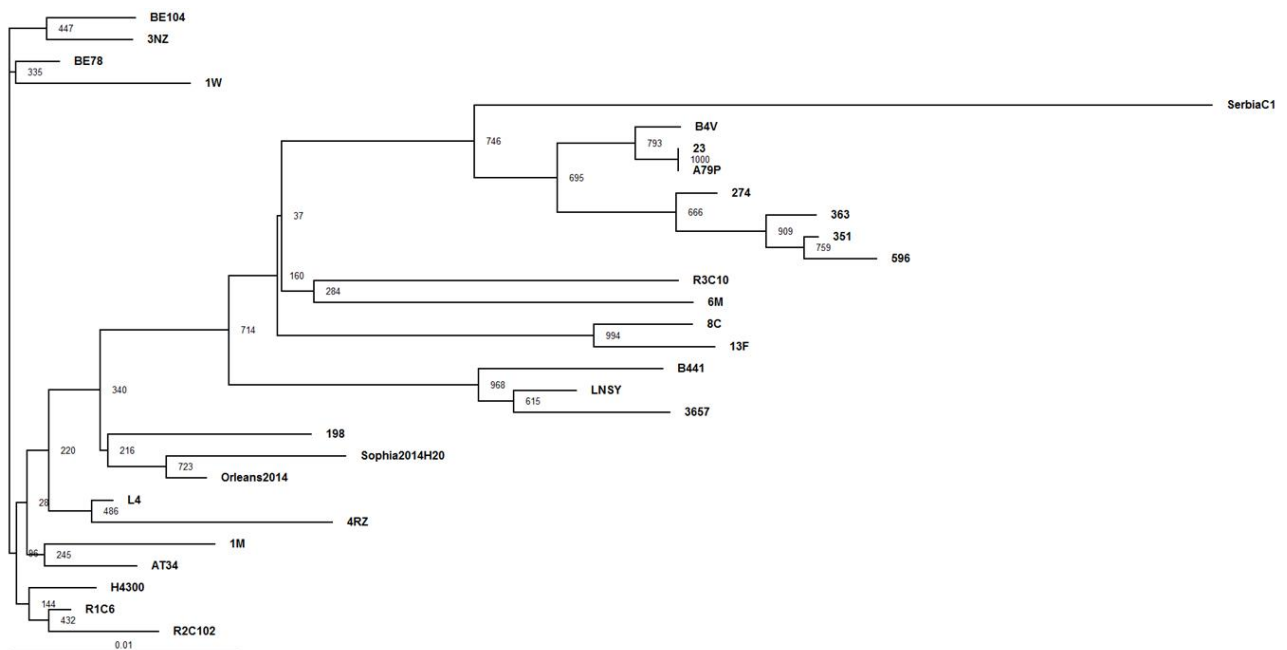


Figure 20 : Arbre phylogénétique des souches de CBPV (Schurr et al., 2017). Une région de 523 nucléotides dans le gène de l'ARN polymérase ARN dépendante de CBPV a été sélectionnée pour comparer les séquences virales décrites dans la base de donnée Blast. Les séquences sont identifiées par le nom de l'isolat. L'arbre phylogénétique a été enraciné en utilisant les isolats CBPV BE104 et 3NZ comme groupe externe. Les nombres proches des nœuds indiquent les valeurs de bootstrap (1000 réitération). L'échelle donne le nombre de substitutions par site.

D'autre part, nous avons sélectionné une nouvelle région cible de l'amplification sur l'ARN 2 (Youssef et al., 2015). Cette seconde RT-PCR en temps réel n'avait pas pour finalité d'être utilisée directement en diagnostic mais de vérifier l'exactitude des résultats notamment si les données cliniques faisaient suspecter l'émergence d'une souche de CBPV qui échapperait à la RT-PCR ciblant l'ARN 1. En effet, les ARN polymérases virales sont connues pour

répliquer les génomes avec des taux importants d'erreurs et sont la source de la diversité virale aboutissant, à chaque réplication, à générer des quasi-espèces. Ces mutations peuvent être sélectionnées pour aboutir à de nouvelles souches virales échappant par exemple à une réponse spécifique de l'hôte contre l'infection (principalement les ARN interférents [ARNi]). Néanmoins et dans l'hypothèse que l'évolution du CBPV puisse se faire sur les deux ARN de son génome, nous prévoyons, si les deux RT-PCR devaient être pris en défaut, de réaliser des analyses complémentaires afin d'amplifier le virus par des RT-PCR conventionnelles et de séquencer les amplicons obtenus (Blanchard et al., 2008).

5.2.2. Le génome des picornavirus de l'abeille

Les virus de l'ordre *Picornavirales* et des familles virales *Dicistroviridae* et *Iflaviridae* se distinguent par une organisation génétique différente (Figure 21). Les iflavirus ont un seul cadre de lecture qui code pour une polyprotéine clivée en protéines structurales du virus et en protéines non structurales impliquées dans la réplication virale. Les dicistrovirus ont un génome scindé en deux séquences codantes pour deux poly-protéines (une clivée en protéines non structurales, l'autre clivée en protéines structurales) sous le contrôle de deux sites d'entrée des ribosomes (internal ribosom entry site - IRES).

Pour l'amplification de ces virus de l'abeille par RT-PCR en temps réel, soit des amorces et des sondes ont été sélectionnées de la littérature après avoir confirmé *in vitro* qu'elles satisfaisaient aux exigences de spécificité (cas pour la RT-PCR ciblant l'ABPV décrite par (Jamnikar Ciglenecki and Toplak, 2012), et celle ciblant le BQCV décrite par (Chantawannakul et al., 2006)), soit le laboratoire a développé de nouvelles conditions plus appropriées au contexte des infections virales en Europe (cas de la RT-PCR ciblant le SBV (Blanchard et al., 2014) et de celles ciblant les DWV de génotype A ou B (Schurr et al., 2019)).

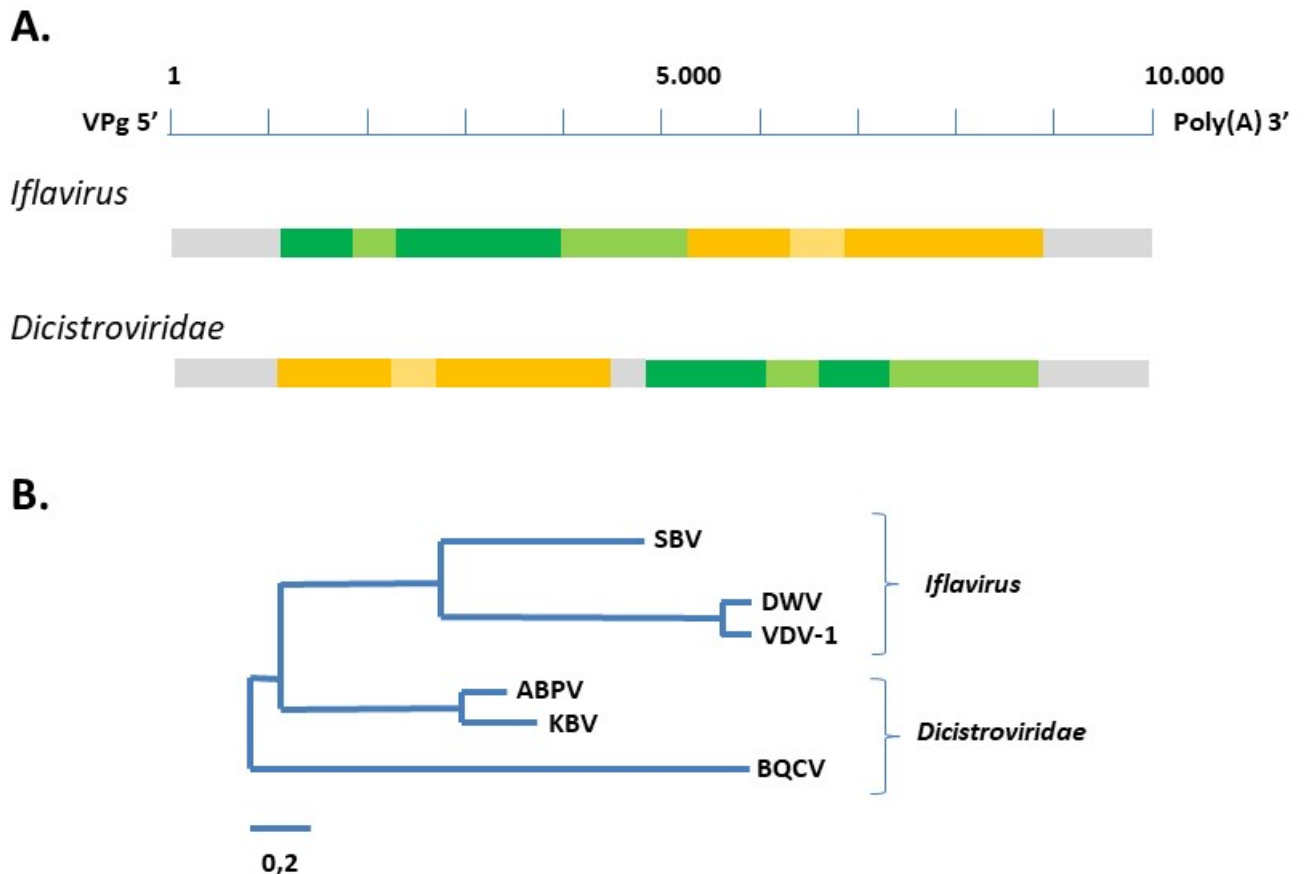


Figure 21 : Différences d'organisation génomique et liens phylogénétiques entre les *Iflavirus* et les *Dicistroviridae* (adapté de (Choe et al., 2012; Ongus et al., 2004)). **A.** Organisation génomique : le génome des virus est composé d'un RNA de polarité positive, d'environ 10.000 bases. L'extrémité 5' est coiffée et une queue poly(A) est présente en 3'. Le génome des *Iflavirus* code pour une seule polyprotéine clivée en protéines structurales (formant la capsid : en vert) et non structurales (nécessaires à la réplication du virus : en orange). Le génome des *Dicistroviridae* code pour deux protéines (deux sites d'entrée des ribosomes : IRES). La première sera clivée en protéines non structurales et la seconde en protéines structurales. **B.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences codant pour l'ARN polymérase RNA dépendante. L'échelle indique le nombre de substitutions par site.

Pour le BQCV, l'inclusivité (capacité à détecter toutes les souches de BQCV) de la RT-qPCR est très bonne. Aucune base des amorces ou de la sonde ne diffère avec celles des séquences de 101 souches isolées dans le monde. En revanche, les récentes souches de SBV identifiées en Asie sur l'abeille *Apis ceranae* pourraient ne pas être détectées par notre réaction d'amplification (Figure 22). Le risque d'émergence en Europe de telles souches est faible. Néanmoins, nous devons rester attentif à l'absence de discordance entre les signes cliniques de couvains sacciformes et les résultats des analyses. Si les investigations complémentaires (par séquençage notamment) devaient confirmer qu'une nouvelle souche

de SBV échappe à notre diagnostic, nous devrions (comme le laboratoire l'avait fait pour le CBPV) redévelopper de nouvelles amorces et sonde. Notre RT-qPCR ciblant l'ABPV ne permettrait pas la détection des virus apparentés : IAPV et KBV. La très faible prévalence de ces virus en Europe n'impose pas de reconsidérer notre stratégie. Néanmoins, il nous faut être attentif à des changements épidémiologiques. La difficulté pour ces virus sera, en l'absence de signe clinique spécifique, de remettre en cause le diagnostic. Nos récents travaux de séquençage non ciblé par la nouvelle technologie (NGS) Illumina des ARN viraux purifiées d'abeilles prélevées dans 8 pays européens n'ont pas détecté ces deux virus (Sircoulomb et al., en préparation). Cette stratégie pourrait, en complément de la veille scientifique, être renouvelée périodiquement.

Pour la détection et la quantification des principaux variants de DWV circulant en Europe, nous avons réalisé un important travail de développement méthodologique. Dans le cadre d'un projet européen (Smartbees), nous avons notamment élaboré deux RT-PCR en temps réel qui sont spécifiques des deux principaux variants : le DWV-A d'une part et le DWV-B d'autre part (Schurr et al., 2019). Ce choix, de distinguer les deux génotypes au détriment d'une méthode ubiquitaire, a été fait afin de mesurer la prévalence des variants génétiques dans les différents pays européens. La région ciblée est la séquence codante pour la VP3. Cette région génomique est distincte entre les DWV-A et DWV-B (Figure 23 et 24). De plus, elle est en amont de points majeurs de recombinaison entre les variants de DWV.

Ainsi l'analyse *in silico* comme *in vitro* montre que la RT-PCR ciblant le DWV-B amplifie également la majorité des DWV recombinants. En effet, les virus recombinants intègrent souvent les séquences des protéines structurales du DWV-B (Dalmon et al., 2017; Ryabov et al., 2014). Avec ces outils, nous avons également suivi dans le temps l'incidence de chaque génotype sur la santé des colonies en France et ainsi montré que le DWV-B domine en France, depuis 2014, le DWV-A, en charge virale et en prévalence (Schurr et al., 2019). Ces amorces et sondes ont été utilisées dans des réactions de RT-PCR en temps réel permettant non seulement de détecter les virus mais aussi de les quantifier.

SBV-qPCR	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGA	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AcSBV-Kor4	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>HYNor	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AcSBV-Viet5	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AmSBV-Viet4	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AcSBV-Viet3	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AcSBV-Viet2	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AcSBV-Viet1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YNCB-1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>CQ	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>CQ1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AcSBV-Kor3	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>LDst	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AmSBV-Viet6	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>2	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>1	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Jhr7	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YNCB-5	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YNCB-4	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YNCB-3	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YNCB-2	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Thail	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YN08	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YN03	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YN01	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>CQ2	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>CQ1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Korean	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>13	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>5	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AF469603.1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Nepal 1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AH012540.2	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>JLChina2014	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AmSBV-Kor2	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AmSBV-Kor1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Serbia S1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>SXnor1	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>1003	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>1006	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>155110301253	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>12024	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>20100020/1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>20100203/24	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>D122024S1861	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>KA2	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>JR6	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>yak-3-s	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>CQ	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>16.11.10	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YN07	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>YN06	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>SBM2	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>CQ4	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>CQ3	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AmSBV-Kor21	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>11	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>4	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>T73/05A	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AFSSAP122002	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Nepal 4	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Germany 8	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Germany 2	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Germany 1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AF092924	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>ub-77-s	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AY626247.1	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>AH012541.2	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>SXYLChina2015	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>CSBV-FZ	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>Oksapmin	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>BJ 2012	AAAGTCCACTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>BOX	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>D122024/S1859	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>S2	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>K3A	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT
>K1A	AACGTCCTACACCGAAATGTC	TGATGAGAGTGGACGAAGAATCT	GGAATGTTAGACCGCCAGTGT

Figure 22 : Alignement des séquences des amorces et de la sonde avec les séquences d'isolats de SBV, décrites dans la base de données Blast. Les encadrés bleus délimitent les séquences homologues des amorces et de la sonde. Les nucléotides hétérologues sont en rouge. Les séquences de couleur bleu sont celles des virus qui pourraient ne pas être détecter par notre RT-PCR (notamment en raison d'une base hétérologue sur le premier nucléotide à l'extrémité 5' de la sonde).

```

DWV RT-qPCR      GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  TAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>ChilensisA1    GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>js1             GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>SerbiaD9        GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>SerbiaD8        GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>SerbiaD7        GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>SerbiaD6        GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>SerbiaD4        GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>SerbiaD3        GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>SerbiaD2        GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>SerbiaD1        GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>Warwick2009    GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>PA              GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>DWV             GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>Kakugo         GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>Korea2         GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>Korea-1        GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>AUSTRIA-1      GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>VDV1 Zriffin   GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>VDV1 DJE202    GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC
>VDV1           GCGGCTAAGATTGTA AATTG  GATGCTGTGCTACTGGTCAAGG  GGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCAC

```

Figure 23 : Alignement des séquences des amorces et de la sonde avec les séquences d'isolats de DWV-A, décrites dans la base de données Blast. Les encadrés bleus délimitent les séquences homologues des amorces et de la sonde. Les nucléotides hétérologues sont en rouge. Trois séquences de DWV-B sont représentées (hors cadre) montrant les principales différences entre génotypes.

```

>VDV1 RT-qPCR    GGTCTGAAGCGAAAATAG  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>VDV1            GGTCTGAAGCGAAAATAG  TAAAC  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>VDV1 Zriffin    GGTCTGAAGCGAAAATAG  TAAAC  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>VDV1 DJE202     GGTCTGAAGCGAAAATAG  TAAAC  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>VDV1 No3 Warwick  GGTCTGAAGCGAAAATAG  TAAAC  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>VDV1 No4 Warwick  GGTCTGAAGCGAAAATAG  TAAAC  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>VDV1 5end Warwick  GGTCTGAAGCGAAAATAG  TAAAC  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>VDV1 Recomb 4 Zrif  GGTCTGAAGCGAAAATAG  TAAAC  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>VDV1 No9        GGTCTGAAGCGAAAATAG  TAAAC  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>VDV1 No5        GGTCTGAAGCGAAAATAG  TAAAC  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>ChilensisA1    GGTCTGCGGCTAAGATTGTA AATTG  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG
>Kakugo         GGTCTGCGGCTAAGATTGTA AATTG  TGTGATGCTGTATCTACTGGACAAGG  GTTTATAATCATGGATATGCTAG

```

Figure 24 : Alignement des séquences des amorces et de la sonde avec les séquences d'isolats de DWV-B, décrites dans la base de données Blast. Les encadrés bleus délimitent les séquences homologues des amorces et de la sonde. Les nucléotides hétérologues sont en rouge. Deux séquences de DWV-A sont représentées (hors cadre) montrant les principales différences entre génotypes.

5.3. Détection et quantification des virus d'abeilles

Les premières enquêtes sur les virus de l'abeille ont tenté d'établir un lien entre la prévalence des infections virales et l'état sanitaire des colonies. Cependant, les virus des abeilles infectent fréquemment les colonies sans induire de signes cliniques visibles (covert-infection) et de multiples infections virales sont souvent rapportées (Amiri et al., 2015; Gauthier et al., 2007). Aussi, l'étiologique des troubles observés pourrait être établie en estimant les charges virales des abeilles par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) (Amiri et al., 2015; Blanchard et al., 2007). Une augmentation de la charge virale indiquerait une rupture de l'équilibre hôte/virus, conduisant à des signes cliniques perceptibles et parfois à la mort des abeilles, suivie, dans le pire des cas, par la perte de la colonie. Le laboratoire a été le premier à définir pour le CBPV un seuil à $8 \log_{10}$ copies/abeille pour établir le lien étiologique avec l'observation de mortalités de butineuses ou de signes cliniques notamment des abeilles tremblantes (Blanchard et al., 2007).

Notre objectif a été de caractériser et de valider les RT-PCR en temps réel dans leur capacité à mesurer des variations de charges virales pour être utilisées comme méthodes officielles de diagnostic par la quantification des principaux virus de l'abeille. L'attente par les autorités sanitaires de méthodes, dont les performances ont été démontrées par un processus documenté et reconnu (tel que le processus de validation décrit par l'Afnor dans la norme française NF U47-600, partie 2 (AFNOR, 2015a), est relativement récent. Aujourd'hui, il s'impose au laboratoire de référence et au réseau de laboratoires réalisant des diagnostics officiels à travers les exigences du règlement de l'Union européenne 2017/625 (European Union, 2017).

5.3.1. Exactitude des mesures de charges virales

5.3.1.1. Validation de la quantification du CBPV

La première RT-qPCR que nous avons validée ciblait le CBPV (Blanchard et al., 2012). L'enjeu principal était de montrer l'exactitude (justesse et précision) des mesures des charges virales. A noter que ces travaux m'ont permis d'éprouver et de proposer la stratégie de validation décrite par l'Afnor dans la partie 2 de la norme NF U47-600 (AFNOR, 2015a). Selon les exigences de cette norme, l'exactitude des résultats est établie si la réaction de qPCR est capable, d'une part, de distinguer des variations de moins de $0,25 \log_{10}$ de copies génomiques et, d'autre part, de mesurer par une analyse complète (de la purification des

ARN à partir des abeilles jusqu'au résultat de RT-qPCR) des charges virales avec une exactitude attendue de $0,5 \log_{10}$.

La première exigence a été évaluée à partir d'analyses de dilutions dosées d'un plasmide intégrant la région génomique du CBPV cible de l'amplification. Nous n'avons pas retenu l'option d'analyser des ARN (naturels ou produits *in vitro*) en raison de l'instabilité de ces molécules et du risque de pénaliser à tort les performances de la méthode. Le plasmide était alors représentatif des ADN complémentaires (ADNc) synthétisés à l'issue de la réaction de transcription inverse et matrice de la qPCR. Les résultats indiquent la capacité de la réaction de qPCR à mesurer avec fiabilité des quantités de d'ADNc dans une gamme allant de $2,0 \log_{10}$ à $10,0 \log_{10}$ copies/PCR (Figure 25).

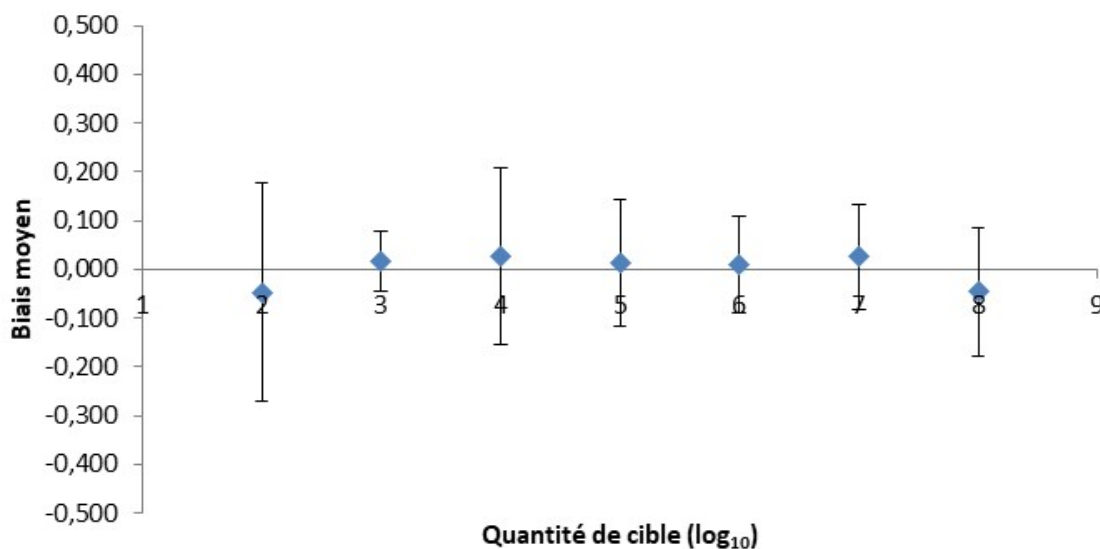


Figure 25 : Exactitude des résultats de la PCR quantitative ciblant le CBPV (Blanchard et al., 2012). L'axe des abscisses représente les quantités du plasmide recombinant (portant la cible d'amplification) sur une échelle logarithmique de base 10. L'axe des ordonnées représente le biais (différence entre la valeur mesurée et celle attendue). Les losanges bleus indiquent la valeur moyenne de biais à chaque niveau de concentration. Les barres d'erreur représentent l'incertitude de ces valeurs (2 fois l'écart-type).

Pour montrer l'exactitude des quantifications avec la méthode complète, nous avons utilisé une purification virale (sur gradient de chlorure de césium) de CBPV dont les ARN ont été quantifiés par spectrophotométrie (méthode indépendante de celle évaluée). Des ajouts de CBPV dosés dans des broyas d'abeilles ont été réalisés et les échantillons ont été analysés. La charge virale mesurée a été comparée à la charge virale attendue. Les résultats sont

représentés par un profil d'exactitude (Figure 26). Cette représentation avait été choisie en concertation avec le statisticien qui l'avait publiée (Feinberg, 2007) car elle combine les informations de justesse (représentées par la valeur moyenne des mesures à chaque niveau) et de fidélité (représentée avec les limites de dispersion des résultats avec un niveau de confiance à 95%) qui sont contenus entre les limites attendues que nous avons fixées pour le CBPV à plus ou moins $0,5 \log_{10}$ copies/abeille.

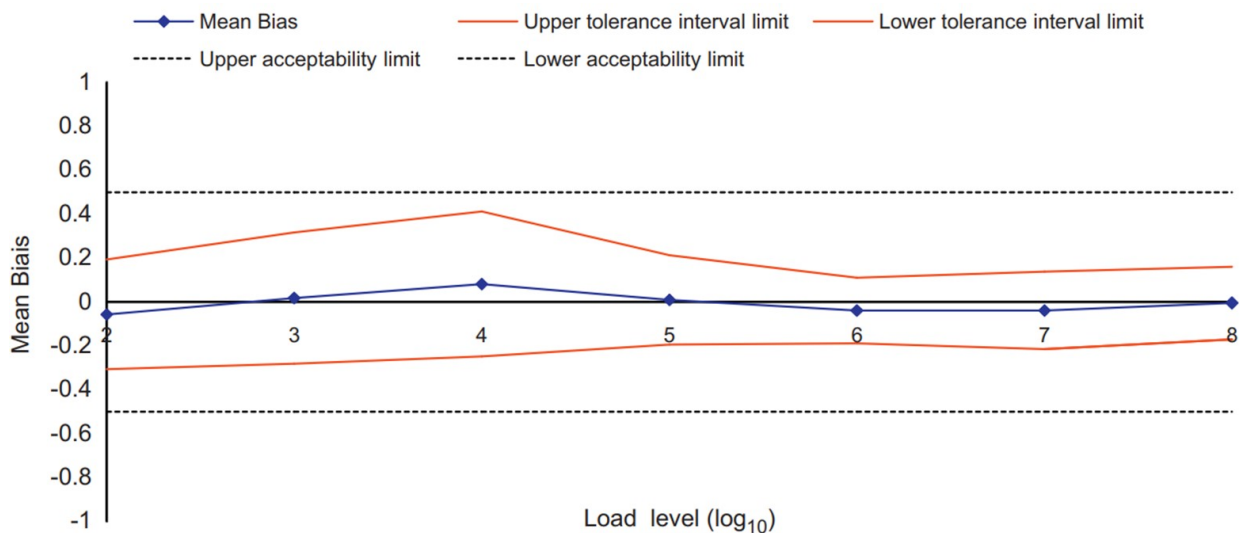


Figure 26 : Profil d'exactitude de la méthode de quantification du CBPV par PCR en temps réel (Blanchard et al., 2012). L'exactitude de la méthode a été évaluée selon la norme NF U47-600, partie 2 (AFNOR, 2015a). L'intervalle de tolérance est limité à une incertitude maximale de $\pm 0,5 \log_{10}$ autour de la valeur de référence déterminée à chaque niveau entre 2,0 et 8,0 \log_{10} de copies de génome de CBPV par réaction de PCR.

Le processus de validation de cette méthode de diagnostic a été reconnu par le Cofrac (Comité français pour l'accréditation ; organisme de certification français). Ainsi, le laboratoire est accrédité pour le diagnostic du CBPV par RT-qPCR depuis 15/05/2011. Cette accréditation, selon la norme internationale NF ISO/CEI 17025 (AFNOR, 2017), s'accompagne d'autres exigences qui couvrent les dispositions relatives aux échantillons soumis à l'essai, aux réactifs de diagnostic, aux locaux, aux équipements et au personnel. Le respect des procédures et de notre organisation est réévalué par un audit tous les 12 à 18 mois. Cette reconnaissance est un élément supplémentaire, pour les autorités sanitaires, de fiabilité de notre expertise. Celles-ci peuvent être amenées à prendre de décisions sur la base de nos résultats.

De plus, cette méthode a été mise en œuvre dans les laboratoires officiels français et dans les LNR au niveau européen. Notamment, elle a été utilisée pour évaluer la prévalence de la paralysie chronique des abeilles France et en Europe (Laurent et al., 2015).

5.3.1.2. Validation de la quantification de l'ABPV, du BQCV, du DWV et du SBV

Les RT-qPCR mesurant les charges des virus ABPV, BQCV et SBV ont également été validées selon la même approche que celle mise en œuvre pour le CBPV. Cependant, il n'avait pas été possible de purifier chacun de ces virus. D'une part, nous ne disposions pas d'abeilles infectées uniquement par l'un de ces virus, ni d'abeilles indemnes d'infections virales qui auraient pu être utilisées pour des inoculations expérimentales afin de préparer les purifications virales. D'autre part, les propriétés de sédimentation ou de densité des particules virales (appartenant au même ordre viral) sont très proches et ne permettaient pas de les séparer à partir de mélanges. Afin de produire *in vitro* des suspensions de virus pur, nous avons essayé de mettre en œuvre une culture de cellules embryonnaires d'abeilles récemment développée (Goblirsch et al., 2013) sans réussir à maintenir en vie les cellules qui, par ailleurs, se sont avérées être contaminées par un DWV (virus qui aurait été copurifié avec les virus mis en culture si nous avions abouti dans ce projet) (Carrillo-Tripp et al., 2016). Aussi, nous avons réalisé la validation des méthodes complètes à partir des plasmides (également utilisés pour la caractérisation des réactions de PCR). Cette alternative est prévue dans le document de référence pour la validation ; document qui précise les limites d'interprétation (AFNOR, 2015a). Les conséquences de ce choix de matrice plasmidique sont, en particulier, l'absence de contrôle de la phase de décapsidation du génome viral lors de l'étape de purification des acides nucléique et l'absence d'évaluation des performances de transcription inverse des ARN en ADNc.

Les critères d'exactitude de la PCR étaient inchangés par rapport au CBPV (fixé selon la norme NF U47-600 à 0,25 log₁₀ copies/PCR (AFNOR, 2015a)). En revanche, ils ont été adaptés en fonction des attentes moins contraignantes sur les méthodes complètes de quantification de ces virus et fixés à une exactitude de plus ou moins 1,0 log₁₀ copies/abeille. Cette tolérance plus grande nous a permis aussi de réduire le coût analytique en ne réalisant qu'une seule réaction de PCR (contre deux pour le CBPV).

Les résultats de la validation de la PCR montrent l'exactitude des cinq réactions de PCR (Figure 27).

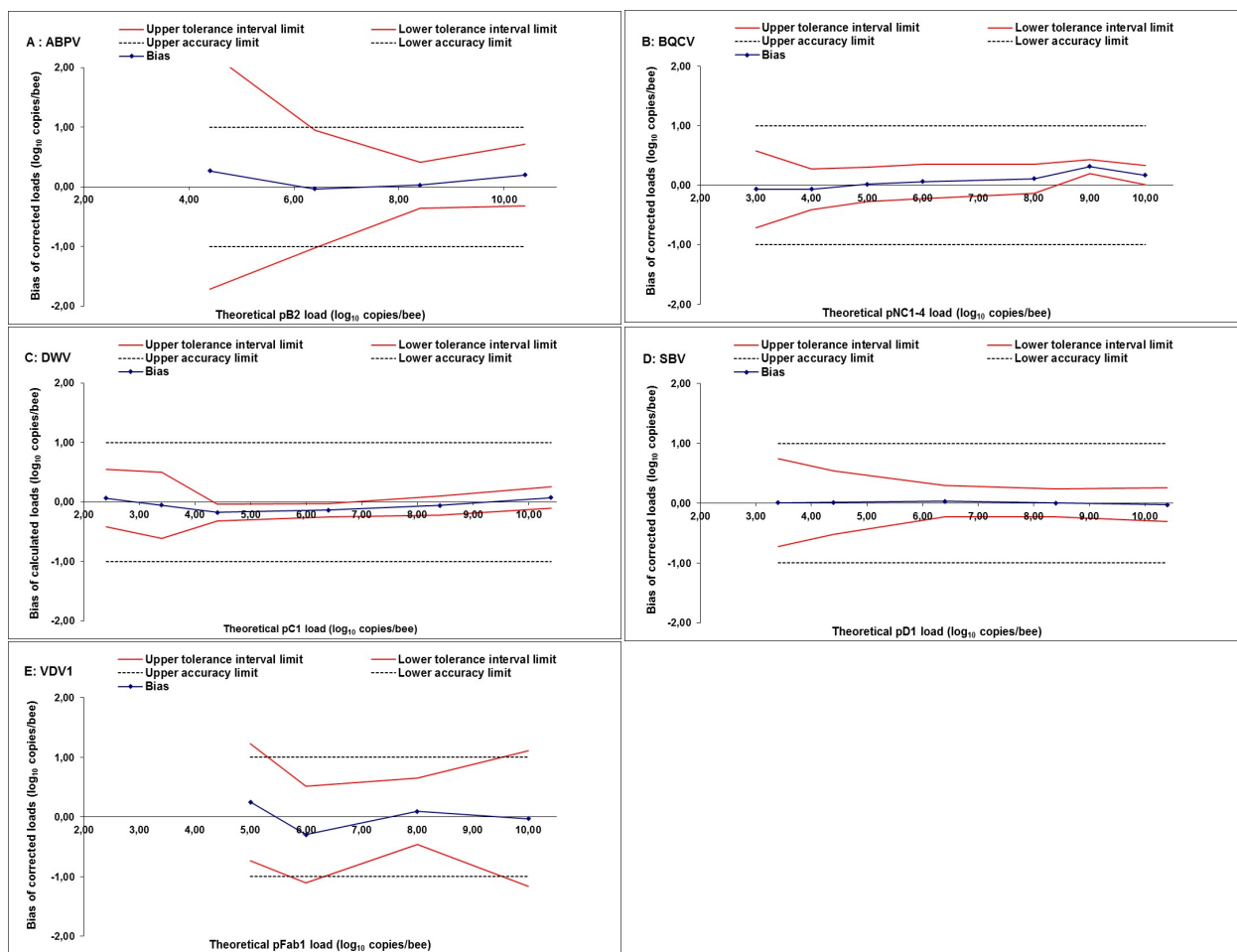


Figure 27 : Profil d'exactitude des méthodes de quantification de l'ABPV (**A**), du BQCV (**B**), du DWV (**C**), du SBV (**D**) et du VDV-1 (**E**) par PCR en temps réel (Schurr et al., 2019). L'exactitude de la méthode a été évaluée selon la norme NF U47-600, partie 2 (AFNOR, 2015a). L'intervalle de tolérance est limité à une incertitude maximale de +/- 1,0 \log_{10} autour de la valeur de référence déterminée à chaque niveau entre 2,0 et 8,0 \log_{10} de copies de génome de CBPV par réaction de PCR.

En revanche, des biais systématiques (différence entre la valeur attendue et celle mesurée) ont été observés pour les méthodes complètes de quantification des virus ABPV, BQCV, DWV-B et SBV. La correction de ces biais a permis de rétablir la justesse des résultats. Les méthodes de quantification des virus BQCV, DWV-A et SBV présentent également une bonne fidélité (inférieure à 1,0 \log_{10} copies/abeille). Néanmoins, les mesures de charge en ABPV et DWV-B présentent une dispersion plus importante des valeurs. Des essais complémentaires réalisés à partir d'abeilles naturellement infectées, nous ont permis d'affiner ces défauts de fidélité en calculant l'incertitude de mesure (égale à 2 fois l'écart-type

de fidélité intermédiaire) pour chaque méthode. Les incertitudes de mesure (U) ont été évaluées à $0,7 \log_{10}$ copies/ml pour l'ABPV et $1,0 \log_{10}$ copies/ml pour le DWV-B à partir de 27 essais (Figure 28).

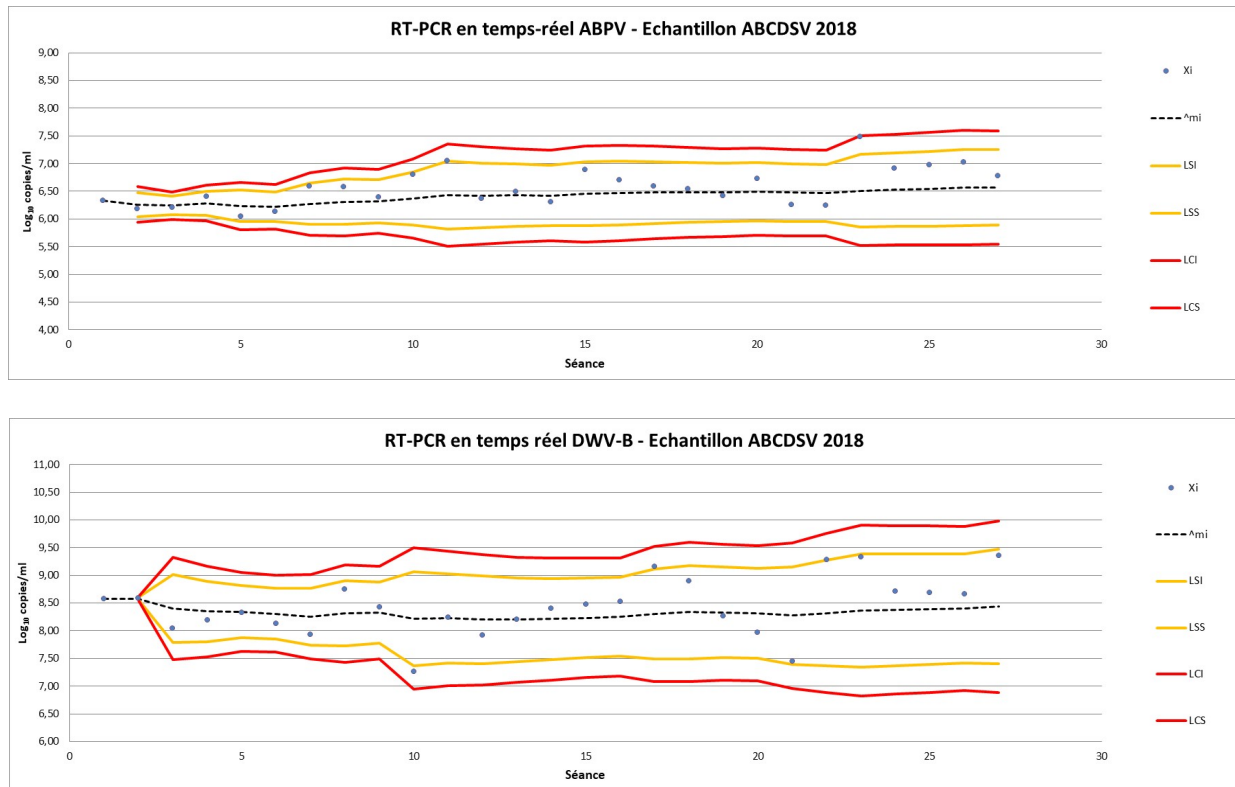


Figure 28 : Carte de contrôle des méthodes de quantification de l'ABPV et du DWV-B par RT-PCR en temps réel. Un échantillon d'abeilles (ABCDSV) naturellement infectées par l'ABPV et le DWV-B a été broyé et clarifié. Cet échantillon a été analysé en conditions de reproductibilité intra-laboratoire (fidélité intermédiaire ; $n=27$). Les graphiques représentent les points de mesure de la charge virale par ml d'échantillon (x_i), la moyenne générale (\bar{m}_i), les limites supérieures et inférieures de surveillance à deux fois l'écart-type (LSS et LIS) et les limites de contrôle à trois fois l'écart-type (LSC et LIC).

Ces méthodes de quantification des principaux virus d'abeilles ont été rendues disponibles non seulement en les publiant dans des revues scientifiques mais aussi en les décrivant de manière très précise dans des modes opératoires standardisés et accessibles sur le site internet de l'agence (www.anses.fr). Elles constituent un panel de méthodes officielles mises en œuvre lors de demandes de diagnostic ou lors d'enquêtes de terrain coordonnées par les autorités sanitaires. Toutefois, la portée principale de ces activités de référence n'est pas seulement d'harmoniser le diagnostic des maladies virales de l'abeille selon des méthodes validées, il est aussi de garantir leur bonne utilisation et l'interprétation correcte des résultats.

5.3.1.3. Cohérence des résultats inter-laboratoires

5.3.1.3.1. Adoption des méthodes

Lors des travaux de normalisation, j'ai également contribué à définir les principes de vérification du bon processus d'adoption par les laboratoires, des méthodes officielles selon la norme française NF U47-600, partie 1 (AFNOR, 2015a).

Ce principe a été appliqué avec les laboratoires nationaux de référence (LNR) pour la santé de l'abeille de l'Union européenne qui souhaitent adopter ces méthodes de quantification des virus. Chacun a reçu un échantillon des broyas d'abeilles dont les charges virales (en ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A et B et SBV) étaient connues. Les résultats ont montré que le biais systématique que nous avons observé lors de la validation était spécifique à chaque méthode d'extraction des acides nucléiques et/ou kits de RT-qPCR (Figure 29). Ce biais devait être pris en compte pour réduire la variabilité des résultats obtenus par différents laboratoires. Néanmoins, le plan d'échantillonnage du processus d'adoption était limité et des essais complémentaires impliquant plus d'échantillons à différents niveaux de charges virales sont nécessaires pour consolider ces résultats.

5.3.1.3.2. Essais inter-laboratoires d'aptitude

Nous avons évalué la reproductibilité des quantifications du CBPV obtenues par le réseau de laboratoires (21 participants, dont 16 LNR) à travers un essai inter-laboratoires (EILA) (Figure 30). Cet essai a été organisé selon les exigences de la norme internationale NF ISO/CEI 17043 (AFNOR, 2010). Chaque participant a reçu un panel d'échantillons (13 homogénats d'abeilles infectées par CBPV ajustés aux trois niveaux de charge) et nous a restitué leurs résultats. Les données quantitatives ($n = 270$) ont été analysées au plan statistique selon les normes internationales NF ISO 13528 (AFNOR, 2015b). Les écarts types de reproductibilité de mesure (SR) étaient de 0,83, 1,06 et 1,16 à des charges virales 5, 8 et 9 \log_{10} CBPV / abeille, respectivement. La confiance inter-laboratoires de la quantification virale ($\pm 1.96 SR$) au seuil de diagnostic (8 \log_{10} CBPV / abeille) était $\pm 2,08 \log_{10}$ CBPV / abeille. Ces résultats soulignent la nécessité de tenir compte de la confiance des mesures dans les études épidémiologiques en utilisant les résultats de différents laboratoires. Compte tenu de cette confiance, les charges virales supérieures à 6 \log_{10} CBPV / abeille peuvent être considérées comme indiquant des cas probables de paralysie chronique.

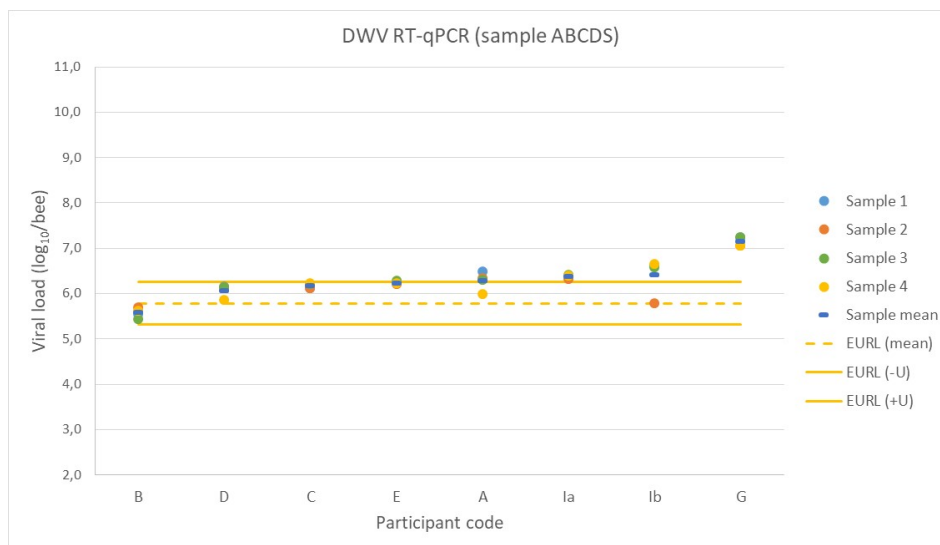


Figure 29 : Vérification de l'adoption de la méthode de quantification du DWV-A, par les LNR européens. Sept LNR ont rendu des mesures de charge en DWV-B, réalisées sur un échantillon d'abeilles naturellement infectées (sample ABCDS). Un participant (I) a rendu deux séries de résultats (obtenus en conditions de fidélité intermédiaire). Les limites en jaune indiquent les valeurs attendues, moyenne (mean) plus ou moins deux écart-types de fidélité intermédiaire, mesurées par notre laboratoire (EURL). Certaines séries montrent une dispersion des points plus importante que d'autres (défaut de fidélité) ainsi qu'un biais systématique (défaut de justesse).

6. Virus et abeilles un équilibre précaire mesurable

Comme tous les êtres vivants, les abeilles sont confrontées à des virus. Ces parasites obligatoires, bien que très simple dans leur structure, entretiennent des relations complexes avec leur hôte afin de faire face aux moyens de défense développés contre eux et de pouvoir se multiplier. Différentes voies de l'immunité et moyens physiologiques des abeilles sont impliqués dans la résistance aux infections virales (Brutscher and Flenniken, 2015). Toutefois, le principal et spécifique moyen de défense contre les virus à ARN de l'abeille est l'interférence des petits ARN doubles brins (ARNi) (Figure 31).

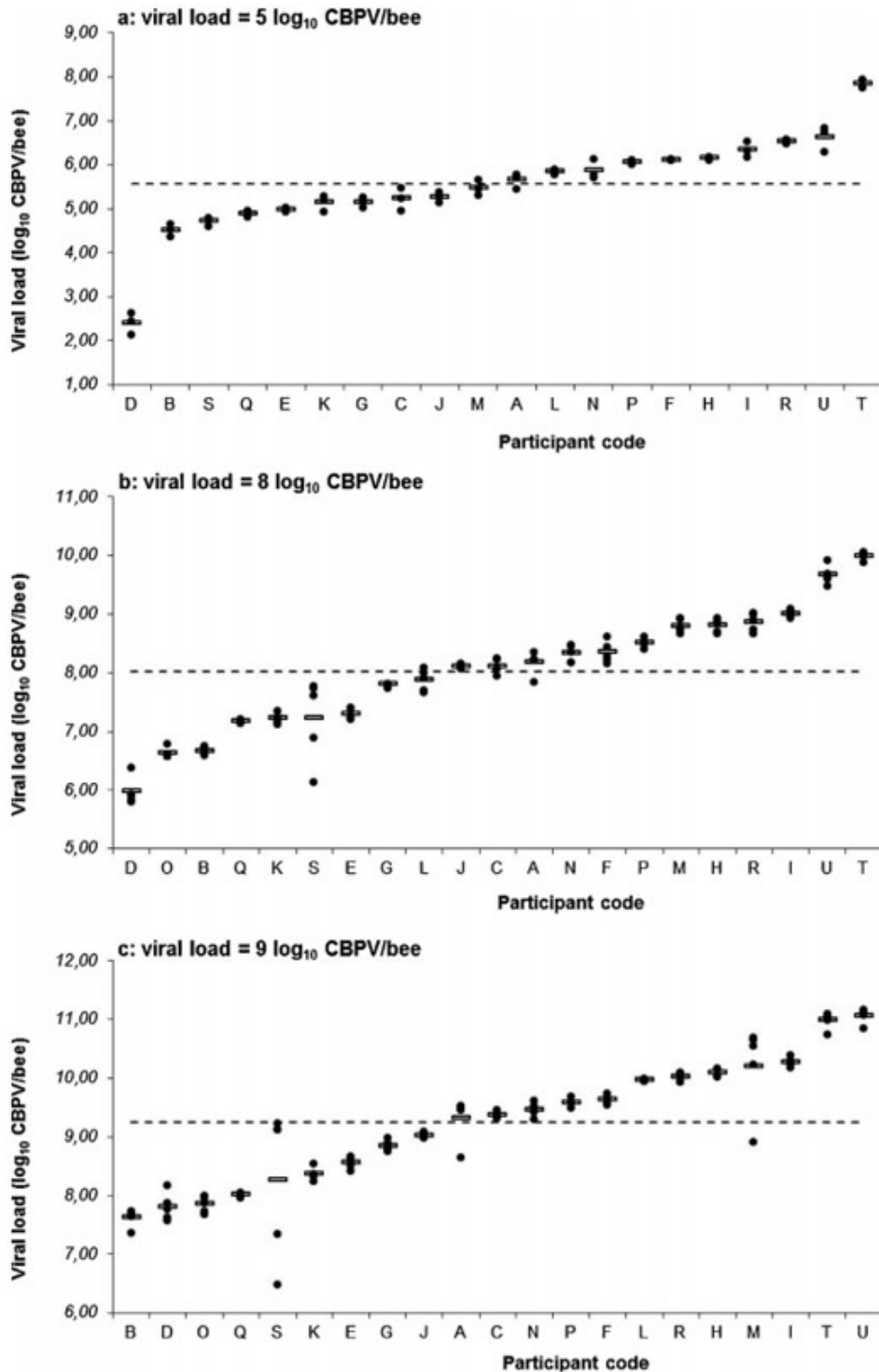


Figure 30 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats d'un essai inter-laboratoires de quantification du CBPV (Schurr et al., 2017). Résultats expérimentaux obtenus par les participants (codés A à U) quantifiant le CBPV dans les échantillons de comparaison inter-laboratoires. Trois répliques contenant 5 log₁₀ CBPV / abeille (**a**) et cinq répliques contenant 8 ou 9 log₁₀ CBPV / abeille (**b** et **c**, respectivement) ont été testées par chaque participant. Les points indiquent le nombre de copies du génome CBPV par abeille (log₁₀ CBPV / abeille) quantifiées par RT-qPCR. Le trait représente la valeur moyenne du participant. Les lignes pointillées indiquent la moyenne robuste.

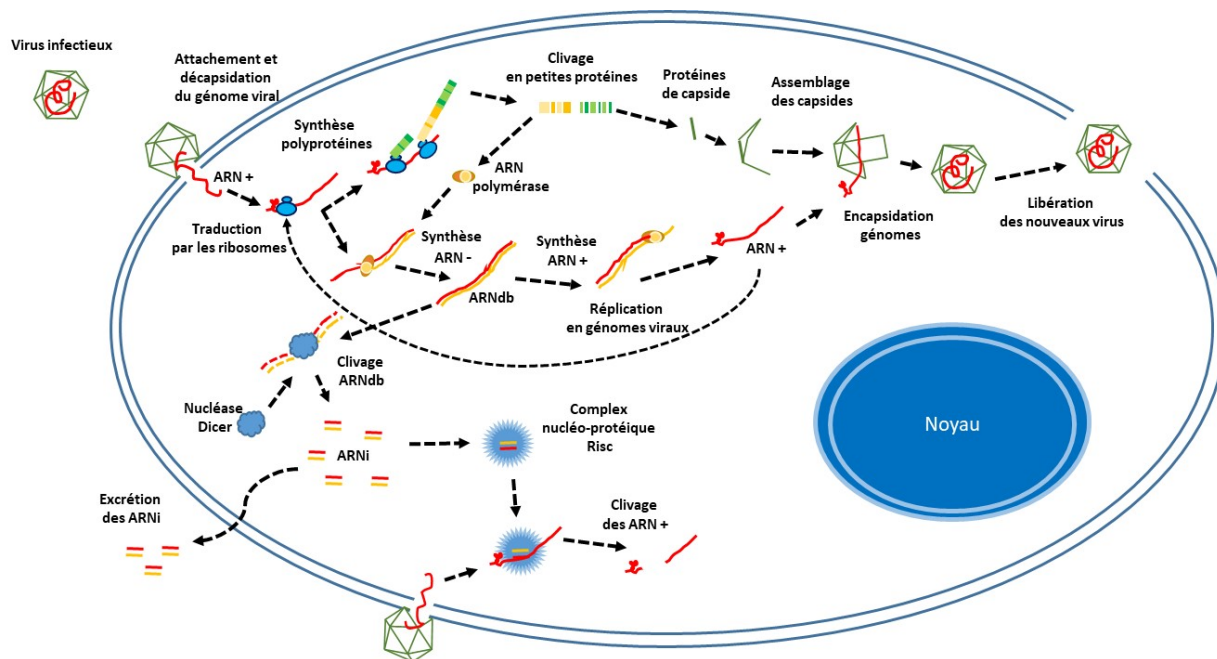


Figure 31 : Schéma du mécanisme d'interférence des petits ARN doubles brins (ARNi) sur la réplication virale (Dubois and Dalmon, 2020).

6.1. Le mécanisme d'interférence des petits ARN double brins

Le système de défense des abeilles contre les virus repose principalement sur le mécanisme impliquant des petits ARN double brin, dits ARN interférents (ARNi). Ces ARNi sont à la base d'une cascade de réactions qui protègent l'individu de nouvelles infections. Ainsi, la réplication des virus ARN conduit à générer des ARN doubles brins. Ces molécules n'existent normalement pas dans la cellule de l'abeille. Elles constituent alors un signal. Ce signal va stimuler la transcription du gène de la protéine Dicer-2 (ribonucléase III) qui va cliver les ARN doubles brins en petits ARN d'une vingtaine de paires de bases : les ARNi. Ces ARNi vont être pris en charge par un complexe protéique impliquant la protéine Ago-2 (protéine de la famille Argonaut) qui va dissocier les ARNi en ARN simple brin susceptible de reconnaître alors une séquence complémentaire. Lorsque cette complémentarité, notamment avec un virus homologue est établie, le complexe nucléo-protéique va cliver l'ARN viral avant qu'il ne se réplique.

Ce mécanisme contribue à contrôler une infection établie mais aussi à prévenir d'une nouvelle infection vis-à-vis de virus homologues. Notamment, des études *in vitro* ont montré

que les ARNi sont transmissibles par la nourriture et peuvent agir en bloquant la réplication virale. Dans la nature, il est suggéré que les larves nourries par trophallaxie acquièrent les petits ARNi produits chez les nourrices qui ont préalablement mis en place ce mécanisme de défense virale. Une récente étude a identifié dans les glandes salivaires de l'abeille une protéine à très forte affinité pour les petits ARN doubles brins (Maori et al., 2019). Cette protéine pourrait jouer un rôle de cargo des ARNi qui seraient transmis efficacement aux larves par trophallaxie. La reine, qui entretient de nombreux échanges par trophallaxie avec ses filles, pourrait aussi bénéficier de ce moyen de protection contre l'infection. L'immunité individuelle serait ainsi renforcée par l'immunité sociale.

Néanmoins, l'efficacité de ces ARNi est très spécifique de certaines souches et la variabilité génétique des virus à ARN serait un moyen de contourner ce mécanisme de défense (Brutscher and Flenniken, 2015). Ainsi, si l'abeille est confrontée à un nouveau virus (nouvelle souche ou quasi espèce virale, c'est-à-dire un variant génétique issue des erreurs de réplication d'une souche initiale) et que la multiplication virale est suffisamment rapide et forte pour ne pas initier un nouveau mécanisme d'interférence par des ARNi, la réplication virale ne sera plus contrôlée et atteindra chez l'abeille des charges virales supérieures à $10 \log_{10}$ de copies virales. Les mécanismes normaux de fonctionnement de la cellule seront irrémédiablement bouleversés entraînant la mort cellulaire et hypothéquant la survie de l'hôte si d'autres mécanisme non spécifiques ne sont pas mis en place.

Enfin, l'étude du génome de l'IAPV suggère que ce dicistrovirus (voire les virus apparentés ABPV et KBV) code pour une protéine suppresseur du mécanisme de défense associé aux ARNi (Chen et al., 2014).

6.2. Les mécanismes complémentaires de résistance aux virus

6.2.1. Immunité individuelle des abeilles mellifères

Brutscher et al. (2015) ont publié une revue des mécanismes complémentaires de lutte contre les virus présents chez l'abeille mellifère. Parmi eux, l'endocytose des virus peut conduire à la mélanisation des cellules permettant d'isoler le site d'infection en l'entourant de cellules réfractaires à l'infection et sénescents avec notamment la production de polyphenoloxydase. Le virus est alors piégé. Toutefois les virus pourraient interférer avec ce mécanisme comme le DWV qui, en infectant les larves, réprime la transcription du gène *Ame1102*, impliqué dans la mélanisation (Di Prisco et al., 2016).

Le génome des abeilles code aussi pour de nombreux facteurs orthologues à la réponse immunitaire des insectes, qui sont aussi conservés chez les mammifères ou les plantes. De plus, des mécanismes impliquent la transduction de signaux des voies de la réponse immunitaire innée comme JNK (c-Jun N-terminal kinase), Jak/STAT (Janus kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription) et les voies Imd (Immune Deficiency) et Toll (Figure 32) qui entraînent la production de peptides antimicrobiens (l'abaecin, l'hymenoptaecin, l'apidaecin et la défensine) et d'autres protéines effectrices. Notamment, le facteur de transcription codé par le gène *dorsal-1A* de la famille de gènes NF-kB (voie Toll) serait capable de limiter l'infection par le DWV (Nazzi et al., 2012). Néanmoins, cette ultime barrière de défense (après l'interférence des ARNi) pourrait être débordée. Les travaux de Di Prisco et al. (Di Prisco et al., 2016) montrent qu'une active multiplication du DWV conduit à la répression du facteur NF-kB par stimulation d'une protéine répresseur Amel/LRR (Leucine reach repeat protein).

L'activation préférentielle de voies de l'immunité dépendrait des virus, des modes d'administration et des phases de développement des abeilles voire du tissu examiné. Par exemple, de jeunes abeilles infectées par l'IAPV par voie orale présenteraient une activation de la voie Toll (Galbraith et al., 2015), tandis que des abeilles naturellement infectées par l'IAPV n'ont pas d'activation de la transcription de gènes de cette voie ni de la voie Imd (Chen et al., 2014). Néanmoins, les mécanismes de contrôle des infections virales ne sont pas clairement définis pour les peptides antimicrobiens, induits par l'activation des voies Imd et Toll (Brutscher and Flenniken, 2015). Les infections virales de l'abeille conduisent aussi à l'altération des mécanismes épigénétiques de méthylation des ADN sans que les conséquences sur l'inhibition ou l'activation de la transcription de gènes impliqués dans l'immunité soient clairement établies (Galbraith et al., 2015).

Dans la colonie, les mécanismes cellulaires de résistance aux infections virales sont complétés par des mécanismes de tolérance.

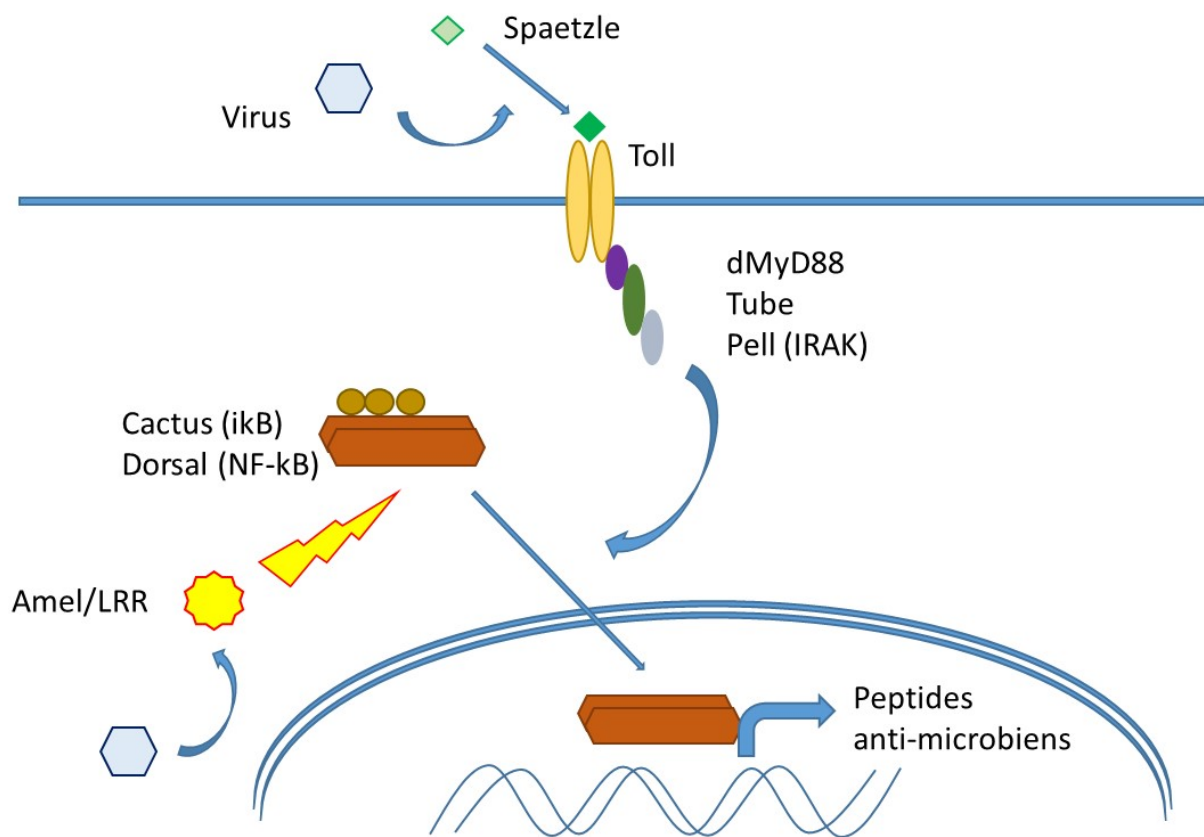


Figure 32 : Voie de l'immunité Toll (adapté de Brutscher et al. 2015). Les virus comme le DWV et notamment leur intermédiaire de réplication que sont les ARN double-brins induiraient par un mécanisme inconnu la fixation de la protéine Spaetzle au récepteur membranaire Toll qui va se dimériser et recruter les facteurs dMy88, Tube et Pelle. Ce dernier serait impliqué dans la dégradation d'inhibiteurs (Cactus-1, Cactus-2 et Cactus-3) des facteurs de transcription NF-kB, résultant dans la translocation de Dorsal-1A et 1B vers le noyau. Ces facteurs activent alors la transcription des peptides antimicrobiens. Les travaux de Di Prisco et al., 2016 suggèrent qu'une forte multiplication du DWV induirait la synthèse d'un inhibiteur (codé par le gène *Amel/LRR*) d'expression du gène *dorsal-1A*, permettant au virus d'interférer avec cette voie de l'immunité.

6.2.2. Les mécanismes de tolérance

Si la résistance des abeilles aux infections virales implique les mécanismes de l'immunité pour limiter la multiplication des virus, la tolérance est la capacité de l'abeille à limiter l'impact d'une infection. La tolérance pourrait également être considérée comme englobant les mécanismes qui permettent de réduire l'impact énergétique ou de détérioration de tissus (exemple de la mélanisation) lié à la réponse immunitaire de l'abeille. Cependant, pour l'abeille qui est un insecte social, la tolérance peut aussi se considérer à l'échelle de la colonie. Ainsi, des défenses comportementales freinant la contagiosité ont été suggérées

(Evans and Spivak, 2010)). Par exemple, les abeilles infectées par le SBV auraient moins d'appétence pour le pollen ; ceci réduirait leur capacité à transmettre par trophallaxie le virus aux larves fortes consommatrices de pollen (Bailey and Fernando, 1972). L'étude des molécules volatiles émises par les larves suggèrent que certaines infections (notamment au KBV) seraient décelées par les nourrices qui retireraient les larves infectées du couvain, limitant encore le risque de contagion (Mondet et al., 2016). Les apports nutritionnels de certains pollens plus riches en acides organiques ont été suggérés comme favorisant la santé des colonies (Antunez et al., 2015; Branchiccela et al., 2019; DeGrandi-Hoffman et al., 2010; DeGrandi-Hoffman et al., 2020).

Cependant, les virus modifieraient aussi les comportements des abeilles en faveur de leur contagiosité. La réplication du CBPV dans le cerveau des abeilles expliquerait non seulement les tremblements caractéristiques de la paralysie chronique mais aussi la dérive des abeilles infectées d'une colonie à une autre ; contribuant ainsi à la diffusion du virus dans le rucher (Olivier et al., 2008b). La dérive des abeilles infectées par le BQCV a également été montrée (Retschnig et al., 2019). La forte réplication du DWV dans les lobes antennaires des abeilles réduirait le caractère hygiénique (varroa sensitive hygiene : VSH) contribuant à maintenir un taux d'infestation par l'acarien (vecteur de ce virus) à des niveaux importants (Mondet et al., 2015).

Si la seule charge virale peut être un indicateur de rupture de la résistance, c'est la combinaison des mesures de charges virales et d'observations d'éventuels troubles qui peut montrer des variations de tolérance de l'abeille aux infections virales.

6.3. La charge virale : un indicateur de résistance et de tolérance

Les précédents travaux du laboratoire, réalisés sur des abeilles naturellement infectées, avaient suggéré une forte corrélation entre l'expression clinique de la paralysie chronique et des charges en CBPV élevées (supérieures à $8 \log_{10}$ de copies/abeille). La réplication du virus notamment dans les centres sensoriels explique les troubles nerveux observés chez les abeilles malades (Olivier et al., 2008b). Les mortalités anormales d'abeilles étaient, quant à elle, corrélées avec des charges virales supérieures à $10 \log_{10}$ copies/abeille (Ribiere et al., 2010). Nous avons confirmé cette corrélation en infectant avec le CBPV des abeilles adultes faiblement infectées (Youssef et al., 2015). Les symptômes visibles tels que des tremblements et des abeilles rampantes étaient observés 5 jours après l'infection et les abeilles infectées mouraient dans les 2 jours suivant. Toutes les abeilles étudiées étaient positives avec une charge virale élevée (plus de $12 \log_{10}$ CBPV / abeille). La charge virale

des abeilles infectées par le CBPV et le taux de mortalité apparaissent être en relation avec la dose virale inoculée. Inoculée à de faibles doses $4,6 \log_{10}$ copies/abeille ou exposées au virus par contact avec des abeilles malades, les abeilles semblaient résister à cette l'infection qui restait à un niveau inférieur au seuil de $8 \log_{10}$ copies/abeilles (Coulon et al., 2018).

En caractérisant la charge virale de centaines de prélèvements d'abeilles naturellement infectées par le CBPV (Figure 33.C), nous avons également montré l'existence d'une distribution bimodale de ces charges virales (Schurr et al., 2019). Une première population était constituée d'abeilles avec des charges virales faibles ($< 8 \log_{10}$ CBPV/abeille) et sans signe clinique. La seconde population était plus fortement infectée ($> 8 \log_{10}$ CBPV/abeille) et les abeilles exprimaient fréquemment les signes de la paralysie chronique.

La même analyse de la distribution des charges virales, couplée à l'observation des signes cliniques, a été conduite avec des abeilles naturellement infectées par les autres virus d'abeille (Figure 33). Une distribution bimodale est également observable avec l'ABPV, le DWV-A, le DWV-B, et le SBV. Cependant, le seuil séparant les deux populations (à charge virale faible et à charge virale élevée) varie en fonction des virus. Le seuil est le plus bas (fixé à $5 \log_{10}$ copies/abeille) pour l'ABPV. Inversement, la distribution des charges en SBV indique un seuil à $9 \log_{10}$ copies/abeille. Les seuils pour le DWV-A et B sont distincts mais à un niveau intermédiaire (6 et $7 \log_{10}$ copies/abeille, respectivement).

Ces seuils sont probablement en corrélation avec la tolérance de l'abeille pour ces virus. Des expérimentations sur abeilles en cagettes ont montré que l'ABPV est un pathogène très virulent et faiblement toléré par les abeilles qui meurent rapidement de l'infection (Bailey et al., 1963; de Miranda et al., 2010). En revanche, de précédentes études suggèrent que les DWV sont moins virulents que l'ABPV (Mondet et al., 2014; Yanez et al., 2020). Notamment ils conduiraient à une plus longue survie des larves qui peuvent conduire à des nymphes aux ailes atrophiées (Dubois et al., 2020; Mockel et al., 2011). Peu de signes cliniques sont associés à l'infection de l'abeille adulte par le SBV (Bailey, 1968; Lee and Furgala, 1967). Les signes du couvain sacciforme ne concernent que des larves présentant des charges virales très élevées (Bailey et al., 1964).

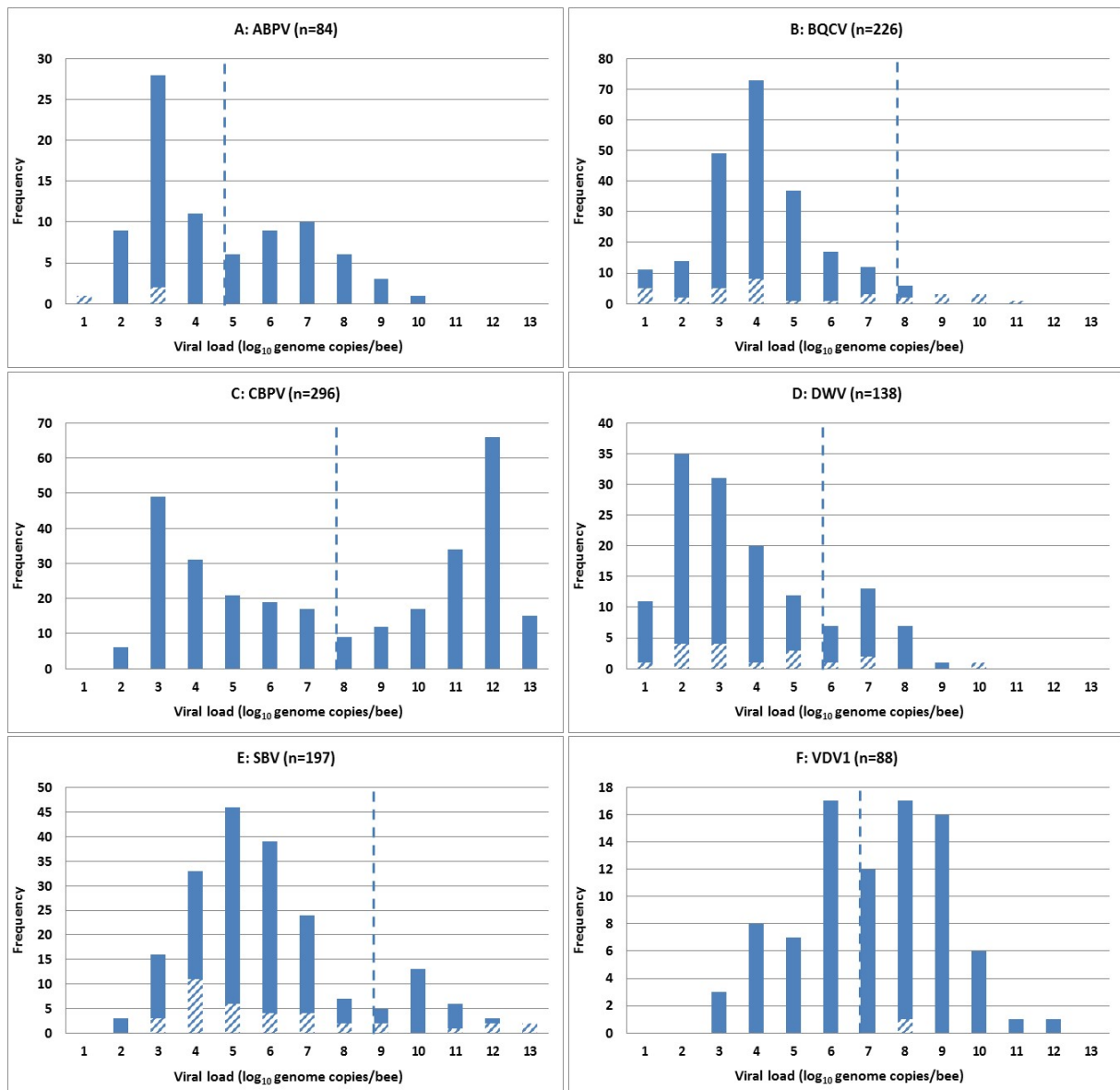


Figure 33 : Fréquence de détection de la charge virale dans des échantillons d'abeilles naturellement infectées (Schurr et al., 2019). Les charges virales quantifiées dans les abeilles adultes (colonnes bleues pleines) et dans les échantillons de couvain (colonnes bleues hachurées) par les méthodes de quantification ABPV, BQCV, SBV et VDV1 (ou DWV-B) ; (graphiques A, B, E et F, respectivement). La ligne bleue en pointillés sur chaque graphique indique les seuils entre les groupes avec des charges virales faibles et élevées.

Pour le BQCV, la distribution des charges virales correspond globalement une distribution normale (Figure 33.B). Toutefois, nous avons considéré que les charges virales, supérieures à une distribution qui engloberait 97,5% des mesures, seraient atypique et pourraient être associées à un déséquilibre entre l'hôte (l'abeille) et son parasite (le virus). Comme pour le

SBV, ce seuil est élevé (9 log₁₀ copies/abeille) et concorde avec l'absence de signe clinique clairement observé notamment chez l'abeille adulte.

Ces seuils sont actuellement utilisés dans le cadre du diagnostic des maladies virales (Tableau 2). Les signes cliniques sont mis en cohérence avec les charges virales mesurées. Une charge virale supérieure au seuil, pour un ou plusieurs virus associés à des signes cliniques connus comme pouvant être liés à l'infection, oriente vers l'étiologie des troubles observés.

Tableau 2 : Seuils d'interprétation des charges virales mesurées chez l'abeille.

Virus détecté	Seuil (log₁₀ copies/abeille)	Virus non détecté	Charge virale < Seuil-U	Seuil-U ≤ Charge virale ≤ Seuil+U	Seuil+U < Charge virale
ABPV	5,0	Virus non détecté dans l'échantillon	Virus détecté à une charge virale non significative	Virus détecté à une charge virale proche du seuil associé à une infection déclarée	Virus détecté à une charge virale évocatrice d'une infection déclarée
BQCV	8,0				
CBPV	8,0				
DWV-A	6,0				
DWV-B	7,0				
SBV	9,0				

U : incertitude de mesure (égale à deux fois l'écart-type de fidélité intermédiaire) du laboratoire qui effectue les quantifications virales par RT-PCR quantitative.

Il n'est néanmoins pas exclu que des facteurs puissent agir à la fois sur la résistance et sur la tolérance. La question qui a guidé nos premiers travaux sur l'éco-dynamique des virus d'abeille était alors posée de façon plus globale : quels sont les facteurs de stress de l'abeilles qui sont susceptibles de rompre l'équilibre fragile entre les virus et l'abeille ?

7. Les facteurs de stress pouvant moduler la résistance ou la tolérance aux virus

L'élevage des abeilles conduit inévitablement à des facteurs de stress supplémentaires à ceux qu'elles pourraient rencontrer dans leur environnement naturel. Ces facteurs sont nombreux et les apiculteurs savent bien que même l'opération la plus élémentaire comme l'ouverture d'une ruche, doit être réalisée avec d'importantes précautions afin de perturber le moins possible la colonie, voire même en fonction de la météorologie (basse température, pluie ou vent) elle doit être proscrite. Le guide des bonnes pratiques en apiculture de l'ITSAP prend en compte ces facteurs dans ses recommandations pour la bonne conduite des colonies (ITSAP, 2014). Il évoque notamment un lien entre les cas de paralysie chronique et l'usage abusif des trappes à pollen. Cette relation est la première que nous ayons investiguée à l'occasion de la conduite du rucher du laboratoire pour la collecte des pelotes de pollen, nécessaires au nourrissage des larves de nos expérimentations (Dubois et al., 2018).

7.1. Les trappes à pollen

Expérimentalement, le laboratoire avait montré que l'abrasion de la cuticule des abeilles favorisait la pénétration des virus et l'expression clinique de la maladie (Ribiere et al., 2010). Un tel mécanisme pourrait également expliquer la récurrence de la paralysie chronique après des périodes de mauvais temps contraignant des colonies avec une forte population à être claustrée dans la ruche et à augmenter les contacts entre individus. Pour les trappes à pollen, l'hypothèse était que la grille, qui permet de faire tomber les pelotes de pollen portées par les butineuses, favorise l'échange des virus entre abeilles et, par l'action abrasive qu'elles exercent sur les butineuses, faciliter l'entrée du virus à travers la cuticule. Nous avons suivi les signes cliniques et les charges virales de ruches naturellement infectées par le CBPV équipées (n=3) ou non de trappes à pollen (n=2) (Figure 34).

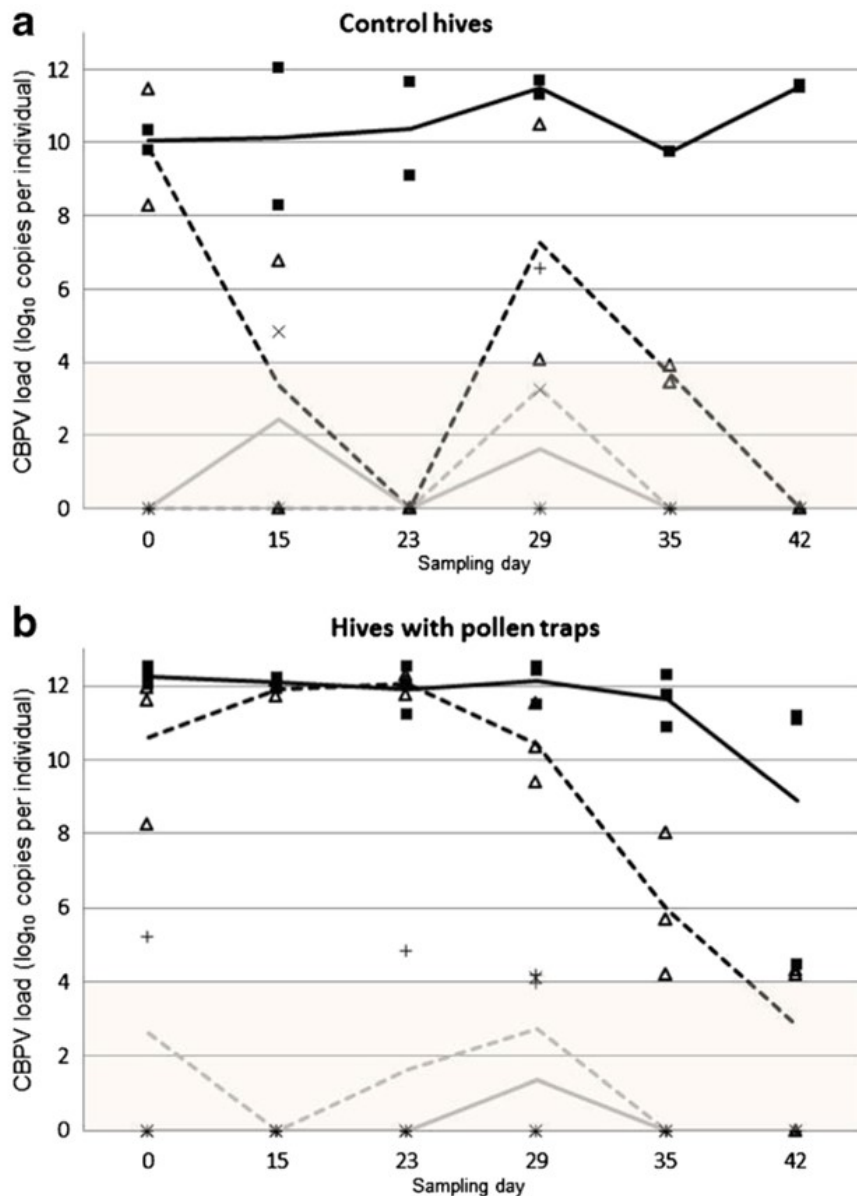


Figure 34 : Effet des trappes à pollen sur le maintien des charges virales dans les colonies (Dubois et al., 2018). Les charges en CBPV ont été quantifiées dans des échantillons d'abeilles collectées dans deux ruches témoins (a) et trois ruches équipées de pièges à pollen (b). Des abeilles mortes (charges individuelles: ■; charge moyenne: ligne noire) ont été collectées à l'extérieur des ruches au sol. Les butineuses (charges individuelles: Δ; charge moyenne: ligne pointillée noire) ont été collectées sur le tableau de bord. Des abeilles émergentes (charges individuelles: ×; charge moyenne: ligne grise) et du couvain scellé (charges individuelles: +; charge moyenne: ligne grise en pointillés) ont été échantillonnées à l'intérieur des ruches. La charge de CBPV a été quantifiée dans un groupe de dix insectes par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en \log_{10} de copies d'ARN CBPV détectées par individu. Les pièges à pollen ont été installés entre le jour 0 et le jour 29. La zone ombrée (entre 0 et 4 \log_{10} CBPV par individu) indique la limite de quantification de la méthode (avec une incertitude de mesure supérieure à 0,5 \log_{10} CBPV par individu).

Alors que les charges virales des butineuses diminuées durant l'étude et qu'aucun signe clinique n'était observable chez les ruches témoins, des tremblements d'abeilles et des mortalités massives en lien avec le maintien de charges virales élevées (supérieure à 10 log₁₀ copies/abeille) étaient observées chez les ruches équipées de trappes à pollen. Lorsque les trappes étaient retirées les signes cliniques cessaient rapidement et les charges virales réduisaient également. L'effet des trappes sur le maintien des signes cliniques de la paralysie chronique pouvaient également être expliqué par la difficulté des abeilles mortes à l'intérieur de la ruche à être évacuées. Cette accumulation d'abeilles mortes de paralysie chronique était indéniablement un facteur de contagions supplémentaires. Le suivi clinique des ruches de cette expérimentation suggérait également que d'autres maladies virales, comme le couvain sacciforme, étaient plus fréquemment observé chez les ruches équipées de trappes. En présence des trappes à pollen, les abeilles internes avaient vraisemblablement des difficultés à accomplir leur activité hygiénique d'expulsion des larves mortes de SBV (qui sont très contagieuses) ; voire, la colonie, en essayant de compenser la perte de butineuses par le recrutement de jeunes abeilles, conduisait à négliger l'entretien du couvain et donc à l'émergence de maladies sur celui-ci.

Bien que cette étude mesure les effets d'un facteur de stress sur la charge virale des abeilles, cette combinaison de dangers n'est pas la plus critique pour l'apiculture. Depuis les années 1980, l'apiculture européenne (puis mondiale) a connue un bouleversement majeur avec l'arrivée de l'acarien *V. destructor* qui entretient des relations étroites avec certains virus.

7.2. L'acarien *Varroa destructor*

L'acarien *V. destructor* est un facteur de stress lié aux pratiques apicoles. Bien qu'il soit probable que l'acarien infecte aussi les abeilles mellifères à l'état sauvage, son origine en Europe est très vraisemblablement liée à l'importation d'essaims infestés en provenance d'Asie (Wilfert et al., 2016). Le parasite colonise actuellement tous les continents et seule l'Australie réussit à maintenir son statut indemne grâce à des mesures d'interdiction d'importation d'abeilles (Roberts et al., 2017).

L'arrivée de l'acarien s'est accompagnée dans les pays, où elle a pu être scientifiquement suivie, d'une augmentation des mortalités de colonies corrélée à une progression et au maintien à des niveaux élevés de la prévalence des infections et des charges virales, particulièrement de DWV (Martin et al., 2012; Mondet et al., 2014). Si l'acarien affaiblit les larves en consommant leur corps gras (tissu impliqué dans de nombreux mécanismes de

défense, de détoxination et métabolismes de l'abeille) (Ramsey et al., 2019), la cause des mortalités des colonies d'abeilles est due aux virus qu'il transmet. Les principaux virus de l'abeilles sont un million de fois plus efficacement transmis par injection que par voie orale (de Miranda et al., 2013). Ceci explique l'augmentation de la prévalence des infections virales chez les colonies parasitées (Mondet et al., 2014). Toutefois deux complexes viraux ont eu leur pathogénicité modifiée par l'introduction de l'acararien : les complexes ABPV et DWV. Néanmoins, la dynamique de ces deux virus est très différente.

L'acararien *V. destructor* associé aux virus du complexe ABPV ne créerait pas durablement des mortalités de colonies. Dès l'introduction de *V. destructor* en Europe, les mortalités de colonies ont été largement attribuées à l'exacerbation de la pathogénicité de l'ABPV (Ribière et al., 2008). Depuis, l'importance de ce virus est discutée du fait la faible prévalence de colonies infectées (Amiri et al., 2015; D'Alvise et al., 2019). En fait, l'association de *V. destructor* et de l'ABPV conduit à des mortalités rapides et massives de larves ne permettant pas à l'acararien d'effectuer un cycle de reproduction complet (Mondet et al., 2014). Il y a alors une pression de sélection négative sur cette association au profit d'associations de l'acararien avec des virus moins virulents chez les larves d'abeilles comme les DWV.

Nous avons évalué le taux de mortalité des nymphes expérimentalement infectées avec un DWV-A ou un DWV-B compris entre 20% à 30% (Dubois et al., 2020). Ces taux n'étaient pas significativement différents du taux de mortalité des nymphes témoins (Figure 16). Ces résultats confirment la faible virulence des DWV sur les nymphes en développement (Remnant et al., 2019; Tehel et al., 2019). Cependant, les colonies frappées fortement à la fois par l'acararien et ce virus ont peu de chance de survivre alors qu'en l'absence de DWV les colonies toléreraient mieux les acariens. Ceci a été montré dans les îles Salomon indemnes de DWV où les abeilles tolèrent l'acararien *Varroa jacobsoni* (espèce très proche de *V. destructor*) (Roberts et al., 2020).

Historiquement, le DWV ne posait pas de problème de santé pour les colonies avant l'arrivée de l'acararien. Les virus devaient alors se transmettre par la voie féco-orale et verticale comme la plupart des picornavirus (Amiri et al., 2018; Amiri et al., 2017). L'efficacité de cette voie d'infection est freinée par la barrière intestinale des abeilles (Mockel et al., 2011). Avec l'acararien, l'infection n'est plus limitée au tube digestif de l'abeille mais elle est généralisée. Les charges virales dans le cerveau des abeilles sont alors particulièrement élevées et des abeilles émergent avec des ailes déformées (Yue and Genersch, 2005; Zioni et al., 2011).

Nous avons confirmé les résultats de Brettell et al. (Brettell et al., 2017) rapportant la capacité des deux génotypes de DWV (DWV-A et DWV-B) à induire de telles déformations et nous avons montré que les taux d'abeilles émergentes aux ailes déformées étaient

corrélés avec les charges virales inoculées aux nymphes (Figure 16) (Dubois et al., 2020). La mort rapide de ces abeilles symptomatiques n'est pas la seule cause des effondrements de colonies. Les troubles comportementaux associés à la multiplication virale dans la tête des abeilles mêmes asymptomatiques impactent lourdement la dynamique des colonies. L'atteinte des lobes antennaires modifierait la capacité des abeilles à exprimer le caractère hygiénique (*Varroa sensitive hygiene*, VSH) ; la réduction de l'expression de la vitellogénine conduirait les jeunes abeilles à aller butiner plus précocement, moins efficacement et auraient une durée de vie réduite (Benaets et al., 2017). Ces effets sub-cliniques constituent aussi des caractéristiques de la virulence des DWV.

Comme d'autres équipes nous avons recherché des différences entre les génotypes de DWV permettant d'expliquer la progressive émergence du DWV-B. Les deux génotypes de DWV avaient la capacité d'infecter l'abeille à partir d'inoculum contenant très peu de virus, mais le variant DWV-B atteignait chez l'abeille des charges virales 10 à 100 fois supérieures à celles du DWV-A (Figure 35). Ces résultats soutenaient l'hypothèse d'une transmission par l'acarien du virus le plus abondant (Norton et al., 2020).

Cependant, des travaux sur la réplication du DWV chez l'acarien apportent un éclairage nouveau sur cette synergie. Les premières études suggéraient que les DWV se multiplieraient chez l'acarien et étaient acheminés vers ses glandes salivaires permettant ainsi de transmettre des charges virales importantes aux abeilles parasitées, accentuant l'expression clinique de la maladie notamment l'émergence d'abeilles aux ailes déformées (Campbell et al., 2016; Yue and Genersch, 2005). Toutefois, cette capacité de réplication chez l'acarien et l'abeille n'était pas montrée pour toutes les génotypes de DWV. Le DWV-A ne se multipliait pas chez l'acarien ; la charge en DWV-A chez *V. destructor* était en étroite corrélation avec celle des nymphes qu'il parasitait et les marqueurs de réplication virale (ARN négatifs) détectés chez l'acarien étaient en fait apportés par des cellules d'abeilles infectées par le virus et consommées par *V. destructor* (Posada-Florez et al., 2019). En revanche, la capacité à se multiplier à la fois chez l'abeille et chez l'acarien serait un caractère de virulence du DWV-B et de certains recombinants qui émergent depuis plus d'une décennie. Deux équipes ont récemment montré soit en nourrissant artificiellement des acariens avec un virus produit par génétique inverse (Gusachenko et al., 2020), soit en visualisant la réplication virale directement dans les cellules de l'acarien (Gisder and Genersch, 2020), que les DWV-B et DWV-recombinants se multipliaient chez *V. destructor*.

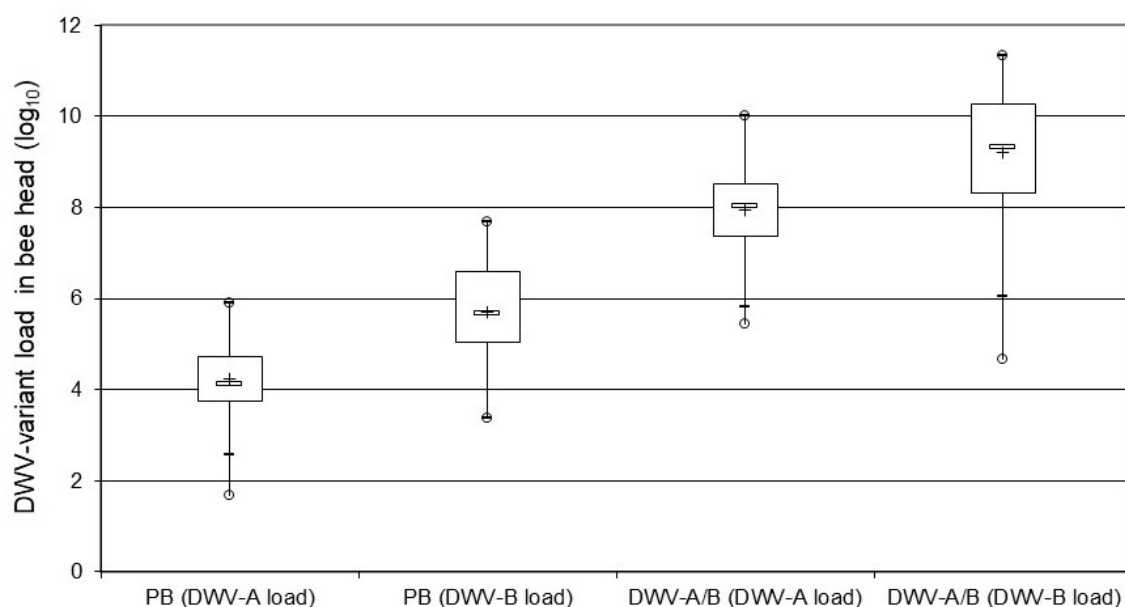


Figure 35 : Différence de niveau de charge virale après inoculation expérimentale d'abeilles avec les différents génotypes de DWV (Dubois et al., 2020). Les charges en DWV-A ou DWV-B (en \log_{10}) ont été quantifiées chez les abeilles témoins (indemnes de *V. destructor*) inoculées avec du tampon phosphate (PB; n = 64) ou chez les abeilles inoculées avec une variante DWV (DWV-A / B; n = 86). Les boîtes à moustaches montrent la répartition des populations, avec le premier quartile (25%) et le troisième quartile (75%) (encadré), la médiane (50%, tiret blanc), la moyenne (croix), les valeurs minimale et maximale (moustaches) et les valeurs aberrantes (cercle).

Cette nouvelle voie de transmission serait favorable à la stabilité de certaines souches virales transmises à l'abeille (Brettell and Martin, 2017; Yanez et al., 2020). L'acarien *V. destructor* créerait un goulot d'étranglement à la diversité des DWV. Il ne transmettrait que certaines souches virales, adaptées aux conditions du parasitisme impliquant aussi l'abeille. Néanmoins et afin d'échapper aux mécanismes de résistance de l'abeille, une diversité virale se restaurerait. Cependant, cette diversité découlerait phylo-génétiquement d'un nombre beaucoup plus réduits de virus (Ryabov et al., 2019; Yanez et al., 2020).

Les études sur les interactions entre l'acarien, le virus et l'abeille suggèrent aussi que *V. destructor* pourrait diminuer l'immunité de l'abeille et favoriser la multiplication du DWV (Yang and Cox-Foster, 2005). Toutefois, de récents travaux indiquent que le simple prélèvement d'hémolymphe chez l'abeille est un facteur de stress suffisant pour conduire à une augmentation de la charge virale (Annoscia et al., 2019). Néanmoins, la complexité des interactions entre l'abeille et *V. destructor* laisse supposer que des mécanismes plus fins d'altération de la résistance des abeilles aux virus pourraient être encore suggérés (Abbo et

al., 2017; McDonnell et al., 2013; Zhao et al., 2019). De plus, *V. destructor*, en multipliant certaines souches de DWV et inoculant ces virus par une voie très efficace, favoriserait une réplication virale extrêmement active de DWV qui pourraient réprimer les gènes de l'immunité comme la voie Toll (Di Prisco et al., 2016). Ces travaux soulignent, une fois de plus, l'association de *V. destructor* avec les DWV comme particulièrement néfaste pour la santé de l'abeille.

7.3. Les interactions entre les virus

Les colonies comme les abeilles, considérées individuellement, sont fréquemment infectées par plusieurs virus. Les conséquences de ces multiples infections et notamment les interactions entre ces virus sur la santé de l'abeille restent méconnues. Nos expérimentations d'inoculation des DWV aux nymphes, conduites pour étudier la virulence de différents isolats, ont révélé des relations inattendues entre virus de la même famille virale (Dubois et al., 2020). Pour cette étude, nous avons utilisé des nymphes qui présentaient des charges virales très faibles pour les DWV-A et DWV-B. Lorsque nous avons inoculé des suspensions pures de DWV d'un génotype (A ou B), nous observions la multiplication des deux génotypes (A et B). Cette augmentation était dépendante de la dose inoculée (Figure 36). Toutefois, si la quantité de virus inoculée était faible (environ $2 \log_{10}$ par abeille voir moins) seul le virus inoculé se multipliait ; les virus de génotype différent restaient à des charges non significativement différentes des témoins. L'hypothèse était que la réplication active d'un virus (celui inoculé) favorise la réplication des virus initialement présents chez la nymphe qui étaient jusque-là sous le contrôle du système immunitaire.

De plus, nous avons observé que certaines souches de DWV (indépendamment de leur génotype A ou B) pouvaient conduire à des mortalités plus importantes (Dubois et al., 2020). Ces mortalités étaient systématiquement corrélées avec une augmentation de la charge en SBV (un virus de la famille *Flavivirus* comme le DWV). L'hypothèse que nous pouvions formuler était un phénomène de coopération entre virus permettant d'échapper aux mécanismes de l'immunité. Des études antérieures sur la co-infection suggèrent que la suppression de la mélanisation par SBV pourrait réduire la survie des nymphes au DWV (Ryabov et al. 2016). La réplication active du DWV affecte aussi le niveau de transcription du gène Amel102 impliqué dans la mélanisation et l'encapsulation en modifiant la signalisation NF- κ B (Di Prisco et al., 2016; Nazi et al., 2012). Une autre voie possible d'interaction serait la suppression par les virus inoculés du mécanisme d'interférence des ARNi. Chen et al. (Chen et al., 2014) ont identifié dans le génome de l'IAPV des motifs homologues de

suppresseurs de l'interférence des ARNi. Des supresseurs ont également été identifiés chez d'autres virus d'insectes (Yang et al., 2018). La question est de savoir si de tels supresseurs sont présents chez les iflavirus. L'opportunité pour un virus serait alors de profiter de la réplication active d'un virus apparenté pour échapper au ARNi qui bloquait sa réplication.

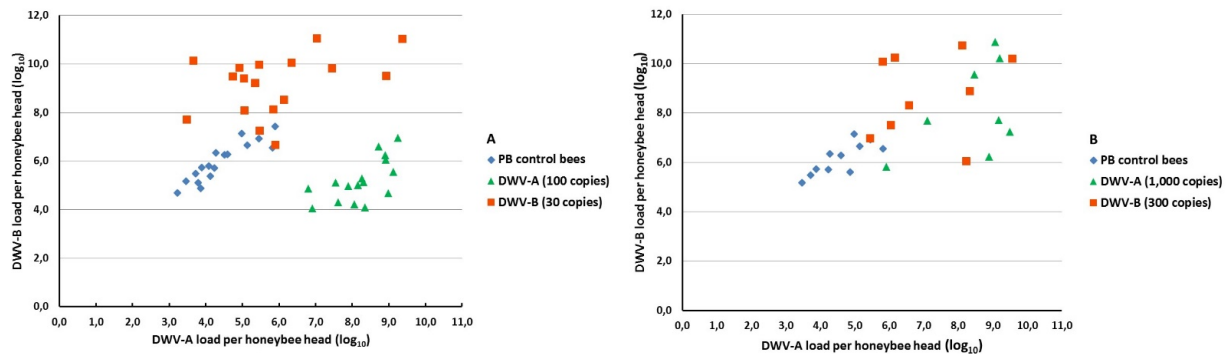


Figure 36 : Co-évolution des DWV-A et DWV-B chez des nymphes après inoculation à une forte charge d'un des deux génotype viraux (Dubois et al., 2020). Les charges en DWV-A et DWV-B (en log₁₀) ont été mesurés par RT-PCR quantitative chez les abeilles inoculées avec soit le DWV-A (triangles verts) soit le DWV-B (carrés rouges), ou encore chez des abeilles témoins inoculées avec du tampon phosphate (PB ; losanges bleus). **A** : inoculum DWV-A (100 copies pour 2 µl), inoculum DWV-B (30 copies pour 2 µl). **B** : inoculum DWV-A (1 000 copies pour 2 µl), inoculum DWV-B (300 copies pour 2 µl).

7.4. Facteurs de stress liés aux thiaméthoxam

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Anne Dalmon (INRAE, Avignon) et le Dr Anne-Claire Martel (Anses, Sophia Antipolis) au projet de thèse du Dr. Marianne Coulon, nous avons caractérisé les effets sur la résistance et la tolérance virale d'un pesticide de la famille des néonicotinoïdes, le thiaméthoxam.

Le thiaméthoxam est le principe actif de produits phytosanitaires destinés à lutter contre des ravageurs de plantes cultivées. Il était utilisé sous forme d'enrobage de semences ou par pulvérisation. L'action du thiaméthoxam comme des néonicotinoïdes est de bloquer les récepteurs acétyl-cholinergiques des insectes ravageurs. Toutefois, l'abeille est également sensible à ce pesticide. Même si elle n'est pas directement visée par les traitements, les doses environnementales retrouvées dans le nectar ou le pollen des plantes traitées ont une incidence discrète mais certaine sur leur santé (Abbo et al., 2017; Alburaki et al., 2015).

Notamment, le marquage des abeilles avec des puces RFID montre que leur durée de vie est réduite par le butinage de cultures traitées au thiaméthoxam et à l'imidaclopride (Henry et al., 2012). Nous avons montré que le pesticide était très rapidement métabolisé chez l'abeille en clothianidine (également utilisé comme produit phytosanitaire et toxique pour l'abeille) et que la co-infection avec le CBPV n'altérait pas la capacité de détoxification des abeilles (Figure 37) (Coulon et al., 2018; Coulon et al., 2019). Des études avaient déjà suggéré des interactions entre la clothianidine et les virus notamment en accroissant la charge de DWV (Di Prisco et al., 2013). Toutefois, ces doses étaient plus importantes que celles auxquelles les abeilles sont normalement exposées.

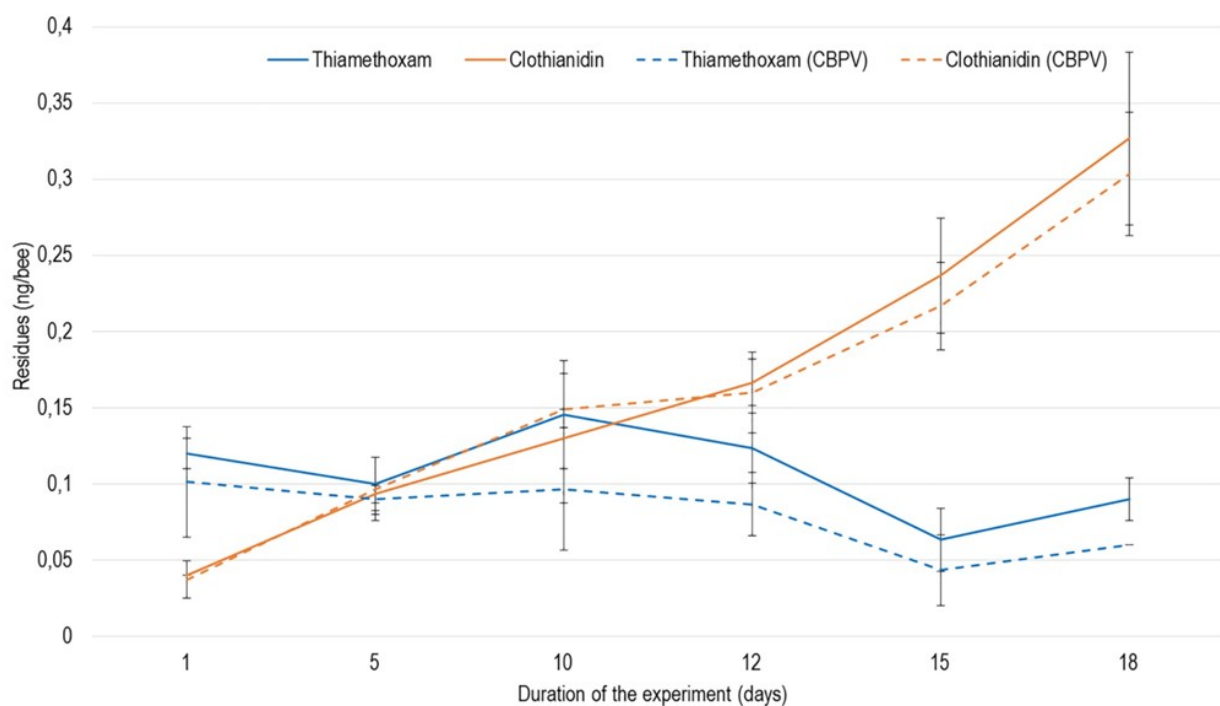


Figure 37 : Non altération de la cinétique de métabolisation du thiaméthoxame chez les abeilles co-exposées au CBPV (Coulon et al., 2019). La métabolisation du thiaméthoxame en clothianidine est montrée au fil du temps chez les abeilles exposées au thiaméthoxame (0,25 ng / abeille / jour) et infectées ou non par le CBPV (n = 3 fois 20 abeilles par condition). Les barres d'erreur indiquent les écart-types autour des valeurs moyennes.

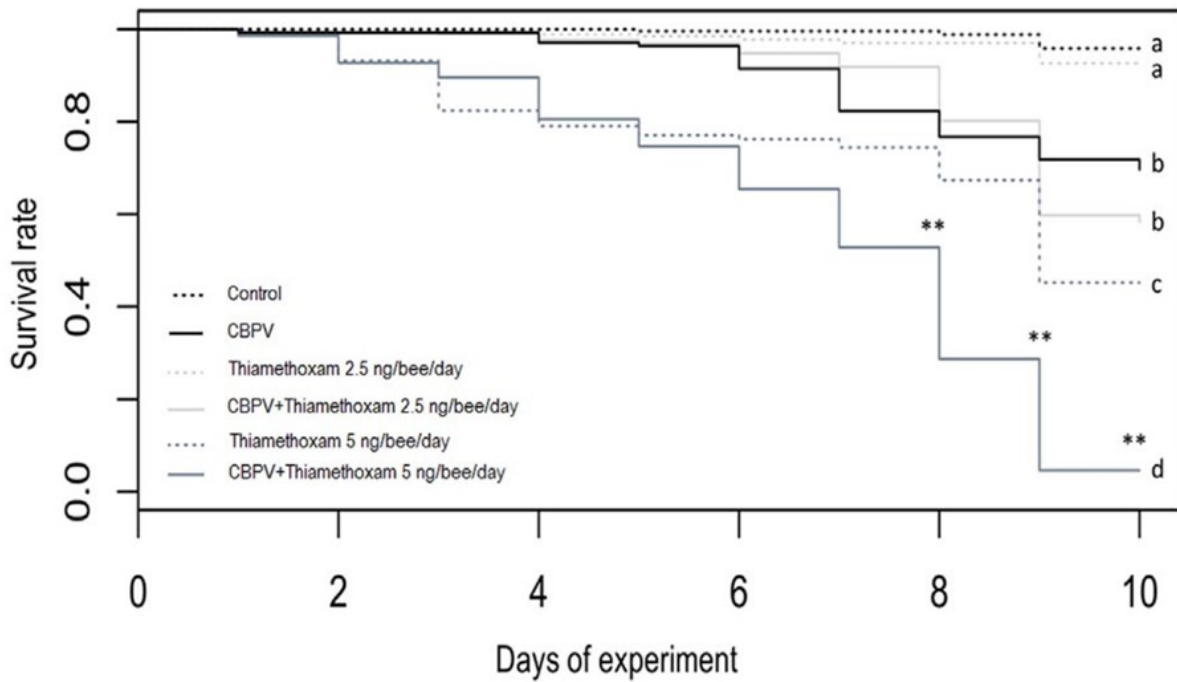
Nous avons donc réalisé des co-expositions d'abeilles émergentes aux virus et au pesticide fin de reproduire les conditions environnementales. Ces expérimentations ont été réalisées en cagettes de 30 individus. L'exposition au CBPV reproduisait les échanges de virus par contacts entre abeilles et le thiaméthoxam était administré par voie orale à des doses maximales de 5 ng/abeille/jour. Nous avons ainsi montré que les deux facteurs de stress

agissaient en synergie sur les mortalités et sur la charge virale des abeilles d'été (Coulon et al., 2018). Sur les abeilles d'hiver (naturellement plus résistantes) les effets étaient toujours présents mais atténués (Coulon et al., 2019) (Figure 38), concordant avec de précédentes études suggérant une plus grande résistance des abeilles d'hiver (Alkassab and Kirchner, 2016).

Ces travaux ont été complétés par une étude de l'interaction entre le thiaméthoxam avec le DWV *in situ* (Coulon et al., 2020). Des abeilles émergentes ont été marquées avec des digicodes et leur devenir, en fonction de leur exposition au virus et au pesticide, a été suivi avec des caméras placées à l'entrée des ruches. La co-exposition n'est pas associée à une modification de la charge virale, mais à des sorties plus précoces d'âge des abeilles, des durées de butinages et de vie plus réduites (Figure 39). Des altérations comportementales ont également été rapportées par de précédentes études (Benaets et al., 2017; Charreton et al., 2015). Toutefois, le comportement altruiste ou la mort plus précoce des abeilles pourrait contribuer aussi à réduire la prévalence des individus infectés par le DWV dans la colonie (Coulon et al., 2020). Notre étude confirme aussi que les virus ont, en plus des effets aigus sur la santé de l'abeille, une action insidieuse sur le devenir des colonies.

L'étude de l'expression de gènes de l'immunité que nous avons réalisé chez ces abeilles (avec la collaboration du Dr Génaro Di Prisco) confirme la répression du gène *dorsal-1a* (impliqué dans la voie d'immunité Toll) par le thiaméthoxam et le CBPV en exposition simple comme en co-expositions (Coulon et al., 2019) (Figure 40). Cette altération de l'immunité expliquerait l'accroissement de charge virale que nous avons observé dans le cas des co-expositions virus-pesticide. Pour la co-exposition au DWV et au thiméthoxam, nous avons plus particulièrement observé une sous expression du gène de la vitellogénine (Coulon et al., 2020). La sous production de cette protéine expliquerait la transition plus rapide des jeunes abeilles à des fonctions de butineuses.

A.



B.

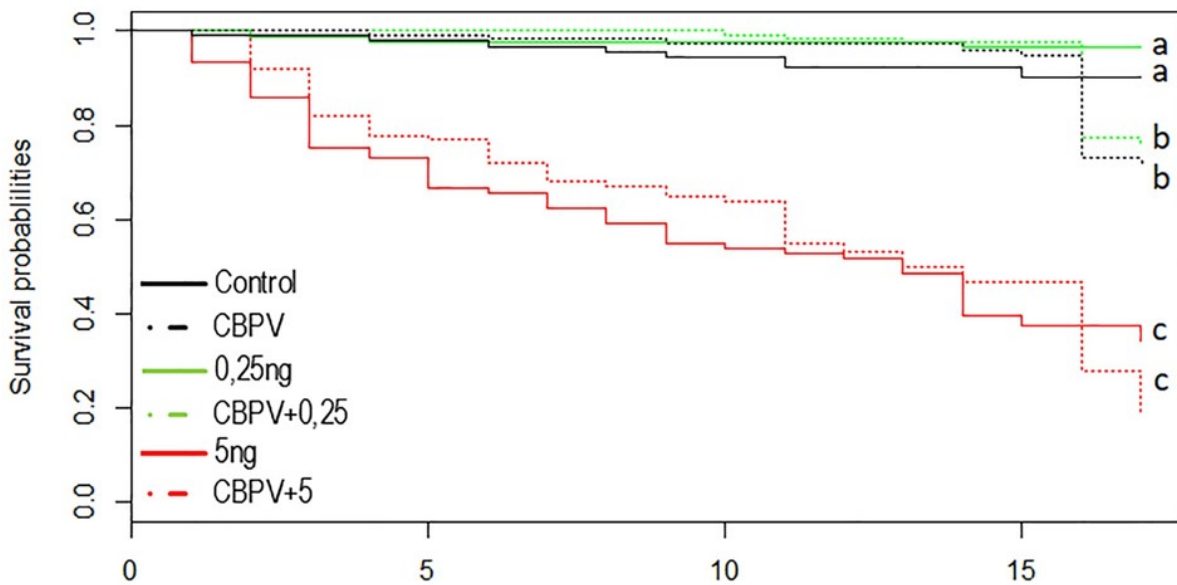


Figure 38 : Effets accrus de la co-exposition au thiaméthoxam et au CBPV sur les mortalités des abeilles d'été par rapport aux abeilles d'hiver (Coulon et al., 2018; Coulon et al., 2019). **A.** Co-exposition d'abeilles d'été. **B.** Co-exposition d'abeilles d'hiver. Les abeilles ont été infectées par le CBPV par contact avec des abeilles infectées. L'exposition au thiaméthoxam était chronique par voie orale. Les doses rapportées dans les graphiques correspondent aux doses (en ng) journalières, consommées par abeille. Les lettres (a, b, c et d) représentent des groupes statistiques (probabilité intra-groupe $p > 0,05$). Les ** indiquent des différences significatives de mortalité ($p < 0,01$) entre abeilles d'été, co-exposées aux deux facteurs (CBPV et 5 ng de thiaméthoxam) par rapport à celles exposées uniquement au pesticide.

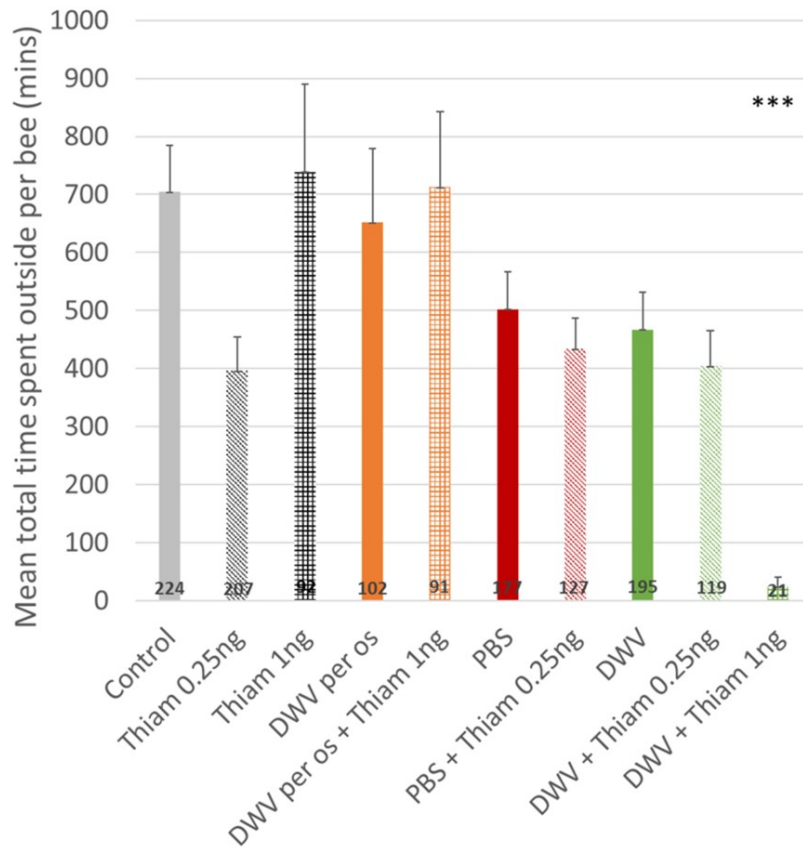


Figure 39 : Altération du temps total passé à l'extérieur par les butineuses co-exposées au DWV et au thiaméthoxam (Coulon et al., 2020). Le temps total passé à l'extérieur pour les abeilles mellifères co-exposées au DWV (injection) et au thiaméthoxame 1,00 ng était considérablement inférieur (***: $p < 0,001$, test de somme de rang de Wilcoxon). Le nombre d'abeilles par traitement est indiqué en bas des barres. Les traitements correspondent à une exposition orale au thiaméthoxame à 0,25 ng / abeille (Thiam 0,25 ng), au thiaméthoxame à 1,00 ng / abeille (Thiam 1 ng); abeilles injectées de PBS (PBS, utilisé comme contrôle), injectées de PBS co-exposées avec 0,25 ng de thiaméthoxame (PBS + Thiam 0,25 ng), injectées de DWV (DWV), injectées de DWV co-exposées avec du thiaméthoxame à 0,25 ng / abeille (DWV + Thiam 0,25 ng), injection de DWV co-exposées avec du thiaméthoxame à 1,00 ng / abeille (DWV + Thiam 1 ng).

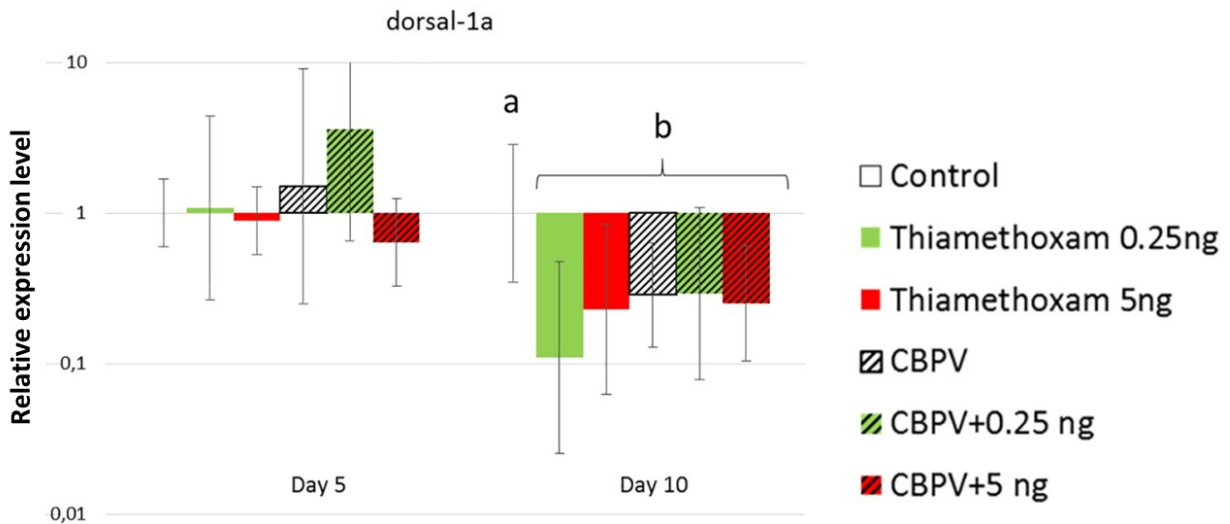


Figure 40 : Réduction de l'expression du gène dorsal-1a chez des abeilles co-exposées au thiaméthoxam et au CBPV (Coulon et al., 2019). Huit abeilles ont été échantillonnées au hasard dans chaque condition. Les données ont été construites en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ pour le 5^{ème} et le 10^{ème} jour post-exposition. Les lettres montrent des groupes statistiquement différents.

8. Conclusion et perspectives

8.1. Les enjeux de la référence

Avec le règlement européen (European Union, 2017), les Laboratoires européens de référence ont un rôle important pour proposer des méthodes reconnues. Ils ont l'autorité pour développer, valider et utiliser des méthodes quand des organismes internationaux porteurs de normes de diagnostic (comme l'OIE) ne peuvent pas trouver un consensus sur celles-ci. En effet, les enjeux sanitaires, les moyens analytiques et/ou les ressources financières peuvent être différents au niveau international de ceux évalués au niveau européen. Aussi, si le diagnostic des infections virales reste absent dans les normes OIE qui régulent les échanges internationaux, nous avons la capacité en tant que Laboratoire de référence de l'Union européenne pour la santé des abeilles de proposer la RT-PCR quantitative comme méthode officielle pour le diagnostic en laboratoire des infections virales.

Depuis mon recrutement à l'agence, je me suis efforcé de renforcer la justesse et la fidélité des résultats de quantification des virus par RT-PCR en temps réel (Blanchard et al., 2012; Schurr et al., 2019). Cette fiabilité des méthodes et des conditions de leur mise en œuvre est reconnue par l'accréditation de nos essais CBPV. Non seulement l'exactitude des mesures

de charges virales est assurée pour notre laboratoire de référence mais aussi pour les laboratoires français et européens qui utilisent nos méthodes de diagnostic des maladies virales de l'abeille (Schurr et al., 2017). Je renforce particulièrement le déploiement dans le réseau de laboratoires nationaux et internationaux d'un diagnostic des maladies virales de l'abeilles reposant sur l'interprétation des charges virales et je soutiens aussi ces partenaires dans leur démarche de reconnaissance officielle. Toutefois, les performances de justesse et de fidélité devront être évaluées avec précision en organisant de nouveaux essais inter-laboratoires d'aptitude sur l'ensemble des méthodes de quantification des principaux virus d'abeilles. Ces essais permettront peut-être d'identifier également des pratiques ou des réactifs différents de ceux que nous recommandons qui augmenteraient la fiabilité des quantifications. Ainsi, il sera envisageable d'évaluer la reproductibilité des mesures issues de plusieurs laboratoires et de mieux comparer, entre pays, les problématiques liées aux infections virales.

Mes travaux se sont initialement focalisés sur les principaux virus de l'abeille (ABPV, BQCV, CBPV, DWV et SBV). Toutefois, il ne faut pas considérer ces méthodes comme figées dans le temps. D'une part, les virus évoluent (plus particulièrement les virus à ARN comme ceux que nous étudions). Ceci implique d'être attentif à tout changement par exemple : l'absence de détection d'un virus alors que les signes cliniques, caractéristiques de la maladie qu'il cause habituellement restent présents (une telle situation avait été rencontrée avec la RT-PCR ciblant le CBPV (Blanchard et al., 2008)) ou la diminution de la prévalence d'une infection virale (ce à quoi nous avons été confrontés avec l'émergence puis la dominance du DWV-B sur le DWV-A (Schurr et al., 2019)). Nous devons donc renforcer nos capacités à séquencer les souches virales en utilisant des amorces encadrant celles utilisées par nos PCR en temps réel afin de vérifier que des mutations n'altèrent pas la sensibilité ni la spécificité (notamment l'inclusivité) de notre diagnostic. Pour ce faire, le laboratoire a acquis un séquenceur de pailleuse (Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer, Thermofisher). D'autre part, les méthodes évoluent, les réactifs sont de plus en plus performants et les technologies changent. Dans le contexte de notre accréditation en portée fixe (c'est-à-dire que le laboratoire est accrédité par rapport à une méthode donnée) nos capacités à suivre cette évolution sont freinées par l'évaluation du coût-bénéfice. Le bénéfice serait de renforcer l'exactitude de nos résultats, de faciliter les manipulations, d'accroître nos capacités analytiques, de diminuer le prix des analyses... Le coût comprendrait : le prix, le temps et l'énergie que l'on doit consacrer à une validation de méthode, au changement des documents qualité, à l'habilitation des agents, à l'élaboration du dossier d'accréditation et à l'évaluation par l'organisme d'accréditation de la pertinence et de la bonne mise en œuvre de l'ensemble de ces actions. Faire évoluer notre accréditation vers une portée flexible (basée

sur la reconnaissance de ce processus de développement, de validation et de mise en œuvre d'une méthode) pourrait diminuer certains de ces coûts. Néanmoins, modifier ou élaborer une méthode de diagnostic en suivant ces exigences reste un travail important. Aussi, l'évolution des méthodes est essentiellement guidée par l'évaluation du principal risque de ne pas identifier l'agent responsable d'une maladie. Le séquençage à haut débit (New Generation Sequencing - NGS) offre des perspectives d'investigations non ciblées. Par la mesure de profondeur de lecture, il est possible d'avoir aussi une estimation de la quantité relative (par exemple par rapport à une séquence de référence) de chaque séquence. La précision ne serait pas celle des méthodes de quantification par PCR en temps réel. Aussi, la combinaison d'analyses NGS et en PCR quantitative serait de nature à couvrir les enjeux du diagnostic des maladies virales de l'abeille. Nous avons initié cette combinaison d'analyses dans le cadre du projet FP7 « Smartbees ». Les résultats sont en cours de valorisation.

Les analyses NGS permettent également d'identifier de nouveaux virus (Galbraith et al., 2018). La prévalence de ces infections n'est pas forcément corrélée avec des troubles de santé des abeilles. Nos travaux sur l'équilibre entre l'hôte et le parasite, notamment décrivant la distribution des charges virales chez des abeilles naturellement infectées, sont complémentaires des études de reproduction expérimentale des infections.

Les expérimentations sur abeilles apportent des informations indispensables sur la cinétique de l'infection, sur l'évolution des signes cliniques (parfois comme pour l'ABPV plus facilement observable en cagette que dans la colonie *in situ*), sur la capacité ou non à survivre à l'infection. Néanmoins, ces études requièrent de réduire certains biais qui peuvent être associés, par exemple au statut sanitaire des abeilles ou à la pureté des inocula viraux. Nous avons, par la sélection d'abeilles faiblement contaminées par des virus et indemnes de *V. destructor*, et par leur élevage en conditions contrôlées (colonies mises en rucher hivernal et nourries avec du pollen irradié), montré la capacité d'obtenir des abeilles avec des statuts sanitaires intéressants mais qui restent néanmoins fragiles (Coulon et al., 2019; Dubois et al., 2020). A l'occasion de journées ensoleillées, les abeilles quittent les colonies et rapportent des virus, soit de colonies affaiblies dans le voisinage de notre rucher soit en visitant des aires de co-butinage, partagés avec d'autres colonies non contrôlées. Le recours au confinement de colonies dans des insectariums suffisamment grands pour assurer la croissance et l'activité d'une colonie pourrait être une alternative garantissant de façon plus pérenne le maintien du statut sanitaire. Une autre alternative sera l'utilisation de cultures de cellules d'abeilles. Nous avons développé des collaborations avec les créateurs de la lignée AmE-711 (Goblirsch et al., 2013) pour adopter cette culture au laboratoire de Sophia Antipolis. Hélas, la lignée n'était pas stable et présentait une contamination par des virus

d'abeilles (Carrillo-Tripp et al., 2016), réduisant nos efforts à néant (Youssef, 2016). Cette équipe a ré-initié la production d'une nouvelle lignée qui pourrait être le support à de futurs travaux sur la réplication des virus d'abeilles.

Nous avons aussi essayé d'améliorer la qualité des inocula viraux notamment en purifiant les virus sur des coussins de saccharose et en gradient de césium par ultracentrifugation (Youssef et al., 2015). Si pour le CBPV les caractéristiques de sédimentation et de densité sont très différentes des autres virus de l'abeille, les iflavirus (DWV et SBV) et les dicistrovirus (ABPV et BQCV) ont des propriétés physiques très proches ne permettant pas les séparer par ces méthodes. Un moyen de palier à ces co-purifications virales serait de produire des virus à partir de clone infectieux. Nous avons élaboré des plasmides recombinants, portant le génome du CBPV encadré par des promoteurs et terminateurs afin soit de produire *in vitro* des ARN génomiques purifiés et coiffés avec l'analogue m⁷G(5')ppp(5')G), soit d'être inoculés directement aux abeilles ou de transfecter des cellules d'abeilles (Youssef, 2016). Nous avons associé l'échec de nos essais de génétique inverse à des erreurs dans les séquences que nous avons utilisées comme références et/ou à des erreurs de construction. Des études récentes nous font suggérer que les quantités que nous utilisons pour inoculer les abeilles étaient trop faibles (Seitz et al., 2019; Yang et al., 2020). L'efficacité de ces plasmides infectieux ou des ARN produits *in vitro* est très faible pour initier la réplication virale et encore plus pour reproduire expérimentalement la maladie. Des essais pourraient donc être reconduits avec nos plasmides. Ces outils permettraient d'envisager des études fonctionnelles : comme de clarifier le rôle des protéines prédites par le séquençage du génome et d'identifier les éventuels partenaires protéiques dans la cellule d'abeille. A terme, ces travaux pourraient déboucher sur la caractérisation de facteurs de virulence du CBPV. De plus, les outils de génétique inverse sont transposables aux autres virus à ARN comme le DWV (Lamp et al., 2016; Ryabov et al., 2019; Ryabov et al., 2020). Ils permettront de rechercher le déterminisme génétique des DWV-B et de certains DWV-recombinants à se multiplier à la fois chez l'abeille et l'acarien *V. destructor*.

Nous avons établi des seuils diagnostiques selon une approche basée sur la distribution des charges virales issues d'abeilles saines et d'abeilles malades, avec l'hypothèse qu'un déséquilibre de la charge virale des abeilles reflète une altération de la résistance. De plus, le niveau plus ou moins haut des seuils reflète la tolérance des abeilles aux infections virales. Je pense que cette évaluation pourrait s'appliquer à de nombreux virus et notamment elle pourrait être réalisée sur des virus récemment identifiés par analyses NGS comme les LSV-1 et LSV-2. Bien que la prévalence de ces virus puisse être importante et que les charges virales mesurées puissent être conséquentes, leur impact sur la santé des abeilles reste inconnu (Daughenbaugh et al., 2015). Des questions émergent aussi sur le

risque pour la santé des abeilles des virus véhiculés par d'autres insectes en interaction avec elles (Celle et al., 2008; Dalmon et al., 2019; Mazzei et al., 2019; Mordecai et al., 2016a) voire de leur impact sur la santé des abeilles sauvages car il est établi que des échanges existent entre espèces sur les aires de co-butinage (Alger et al., 2019; Brettell et al., 2019; Gisder and Genersch, 2017; Meeus et al., 2014). Je participe actuellement à un projet financé par l'UE (H2020) « Poshbee » dans lequel nous mettons en œuvre les outils de diagnostic virologique à l'étude de l'impact des pesticides non pas uniquement sur les abeilles mellifères mais aussi sur des abeilles sauvages (*Bombus terrestris* et *Osmia bicornis*).

Aujourd'hui, l'interprétation des charges virales au regard de seuils séparant les infections déclarées (overt-infections) des infections non déclarées (covert-infections) repose sur l'analyse de pools d'abeilles (Schurr et al., 2019). Néanmoins, cette analyse en pool nous prive d'une information : celle de la charge virale de chaque abeille qui constitue le pool. Cette information pourrait être importante quand on considère non pas l'abeille mais la colonie. Pour deux prélèvements d'abeilles donnant des résultats comparables en analyse par pool, on peut formuler l'hypothèse qu'une infection généralisée à l'ensemble des abeilles testées, avec une forte charge virale mesurée à chaque fois (avec donc une variance des résultats plus faible), serait plus en lien avec les troubles observés au niveau de la colonie, qu'une infection atteignant seulement quelques individus parmi d'autres qui auraient des charges faibles (avec donc une variance forte des résultats). L'enjeu serait alors d'avoir la capacité de multiplier le nombre d'analyses. Dans le cadre du projet « Poshbee » et en collaboration avec la plateforme « Identypath » de l'Anses de Maisons-Alfort, nous développons cette approche d'analyse PCR à haut débit pour les principaux virus (ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A et B, et SBV), bactéries (*Peenibacillus larvae*, *Melisococcus plutonius*) et parasites de l'abeille (*Nosema apis*, *Nosema ceranae* et *Nosema bombi*), en réalisant des purifications d'acides nucléiques sur automate (TECAN) et en les amplifiant par PCR en temps réel sur des thermocycleurs à haut débit. Pour l'instant, ce processus est appliqué à des analyses d'un grand nombre de pools d'abeilles mais il sera facilement adaptable à des analyses individuelles. L'intérêt de cette analyse plus fine est évident pour la recherche. Néanmoins, son coût/bénéfice devra être évalué pour le diagnostic.

8.2.L'étude des interactions entre les virus et de nouveaux facteurs de stress

Les outils que nous développons pour le diagnostic des maladies virales découlent de nos travaux de recherche. Toutefois, le management de la qualité exigée pour l'accréditation de

nos essais (protocoles standardisés, conformité des réactifs, des instruments de mesures, des enceintes thermostats, procédure de collecte et de conservation des échantillons, habilitation des agents à la réalisation des essais...) contribue à la qualité des données que nous générons par la recherche.

Ainsi, nous avons utilisé les méthodes de RT-PCR en temps réel pour quantifier les virus dans des études sur leur interaction avec d'autres facteurs de stress (notamment, les trappes à pollen, les pesticides et d'autres virus). Les combinaisons de facteurs de stress incluant les virus sont probablement très nombreuses et il est illusoire d'envisager de tous les étudier. Aujourd'hui, le facteur de stress qui a le plus d'influence sur l'expression clinique des infections virales est *V. destructor*. Bien que déjà très étudié, la triple relation entre l'abeille, les virus et l'acarien conserve des zones d'ombre qui nourrissent des débats passionnés et passionnants entre scientifiques. Si la capacité de certains DWV à se multiplier chez *V. destructor* a été démontrée, le déterminisme génétique de ce caractère reste encore à préciser. Par ailleurs et en collaboration avec le Dr. Angélique Vétillard et le Dr. Vincent Piou (Université Champollion à Albi), nous avons initié une étude exploratoire sur la transmission du DWV de la femelle d'acarien (fondatrice) à ses descendances. La valorisation des résultats en cours pourrait soutenir des projets d'études plus complètes visant à comprendre la dynamique virale dans les colonies d'abeilles en présence de *V. destructor*.

Nos travaux soulignent aussi les besoins de mieux comprendre les mécanismes de l'immunité chez l'abeille. L'effet des co-expositions sur les mortalités d'abeilles pourraient trouver des explications dans la modulation de l'expression des gènes de l'immunité notamment de la voie Toll. Néanmoins, on peut formuler l'hypothèse que des facteurs qui altèreraient la principale réponse contre l'infection virale, l'interférence des ARNi, auraient des conséquences importantes sur le déséquilibre des relations hôte/parasite (abeille/virus). Des motifs protéiques de suppresseur du mécanisme d'interférence des ARNi ont été identifiés chez certains dicistrovirus (Chen et al., 2014). Il serait intéressant de rechercher de tels facteurs chez les iflavirus également ; car nos expérimentations suggèrent que des coopérations pourraient exister entre DWV et entre les DWV et le SBV.

Les progrès de la biotechnologie (séquençage à haut débit à des coûts de plus en plus réduits) et la capacité des ARNi à être facilement produits *in vitro* et administrés par voie orale (en tenant compte de la découverte récente de protéines qui pourraient jouer le rôle de transporteurs (Maori et al., 2019)), nous permettent d'envisager des protocoles de traitement spécifiquement dirigés contre les virus qui infecteraient les colonies. Ainsi, on pourrait, peut-être avec beaucoup d'espoir, voir émerger des médicaments pour lutter contre les infections

virales. Aujourd'hui les moyens pour lutter contre les virus sont limités. Le moyen le plus efficace est de lutter contre *V. destructor* qui potentialise les principales infections virales (ABPV et DWV). Cependant, les méthodes de lutte contre l'acarien se trouvent parfois pris en défaut d'efficacité avec le développement de résistances aux acaricides actuellement sur le marché.

8.3. Vers la résilience des colonies d'abeilles

L'idée se renforce que la résilience des colonies d'abeilles ne peut reposer que sur de simples (voire simplistes) questions de traitements médicamenteux. Les colonies sont des méta-organisme complexes où l'immunité individuelle se combine à l'immunité sociale et à la tolérance. Des facteurs génétiques réduisant les stress environnementaux, la susceptibilité aux maladies virales doivent aussi être pris en compte. Je suis convaincu que l'abeille a dans ses gènes toutes les ressources nécessaires à sa survie aux bouleversements environnementaux, peut-être même plus que l'homme lui-même n'en possède, pour perdurer à travers les temps. Notre contribution scientifique est d'identifier ces facteurs de résilience, naturels de l'abeille pour palier voire corriger plus rapidement des évolutions créées par l'homme qui affectent la santé des abeilles : l'introduction de *V. destructor*, du frelon asiatique *Vespa velutina*, du petit coléoptère de la ruche *Aethina tumida*, l'usage de pesticides, les échanges de reines source de maladies et de génétique parfois inappropriées, l'exploitation excessive des colonies d'abeilles dans des environnements de plus en plus appauvris. Car si l'abeille a le temps avec elle, nous devons rapidement accompagner les développements d'une apiculture durable.

9. Références bibliographiques

- Abbo, P.M., Kawasaki, J.K., Hamilton, M., Cook, S.C., DeGrandi-Hoffman, G., Li, W.F., Liu, J., Chen, Y.P., 2017. Effects of Imidacloprid and *Varroa destructor* on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Sci* 24, 467-477.
- AFNOR, 2010. General requirements for proficiency testing, NF EN ISO/CEI 17043. Agence française de normalisation, La Plaine Saint-Denis, France.
- AFNOR, 2015a. Animal health analysis methods - PCR - Part 1: Requirement and recommendations for the implementation of veterinary PCR - Part2: Requirements and recommendations for the development and the validation of veterinary PCR, U 47-600-1/2. Agence française de normalisation, La Plaine Saint-Denis, France.
- AFNOR, 2015b. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison, NF ISO 13528. Agence française de normalisation, La Plaine Saint-Denis, France.
- AFNOR, 2017. General requirements for the completeness of testing and calibration laboratories, NF EN ISO/IEC 17025, AFNOR ed. Agence française de normalisation, La Plaine Saint-Denis, France.
- Alburaki, M., Boutin, S., Mercier, P.L., Loubliey, Y., Chagnon, M., Derome, N., 2015. Neonicotinoid-Coated Zea mays Seeds Indirectly Affect Honeybee Performance and Pathogen Susceptibility in Field Trials. *PLoS One* 10, e0125790.
- Alger, S.A., Burnham, P.A., Brody, A.K., 2019. Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. *PLoS One* 14, e0221800.
- Alkassab, A.T., Kirchner, W.H., 2016. Impacts of chronic sublethal exposure to clothianidin on winter honeybees. *Ecotoxicology* 25, 1000-1010.
- Allen, M., Ball, B., 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77, 141-162.
- Amiri, E., Kryger, P., Meixner, M.D., Strand, M.K., Tarp, D.R., Rueppell, O., 2018. Quantitative patterns of vertical transmission of deformed wing virus in honey bees. *PLoS One* 13, e0195283.
- Amiri, E., Meixner, M., Buchler, R., Kryger, P., 2014. Chronic bee paralysis virus in honeybee queens: evaluating susceptibility and infection routes. *Viruses* 6, 1188-1201.
- Amiri, E., Meixner, M., Nielsen, S.L., Kryger, P., 2015. Four Categories of Viral Infection Describe the Health Status of Honey Bee Colonies. *PLoS One* 10, e0140272.
- Amiri, E., Strand, M.K., Rueppell, O., Tarp, D.R., 2017. Queen Quality and the Impact of Honey Bee Diseases on Queen Health: Potential for Interactions between Two Major Threats to Colony Health. *Insects* 8.
- Annoscia, D., Brown, S.P., Di Prisco, G., De Paoli, E., Del Fabbro, S., Frizzera, D., Zanni, V., Galbraith, D.A., Caprio, E., Grozinger, C.M., Pennacchio, F., Nazzi, F., 2019. Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proc Biol Sci* 286, 20190331.

- Antunez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., Santos, E., Higes, M., Martin-Hernandez, R., Zunino, P., 2015. Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay. *Microb Ecol* 70, 522-533.
- Azzami, K., Ritter, W., Tautz, J., Beier, H., 2012. Infection of honey bees with acute bee paralysis virus does not trigger humoral or cellular immune responses. *Arch Virol* 157, 689-702.
- Bailey, L., 1968. The multiplication of sacbrood virus in the adult honeybee. *Virology* 36, 312-313.
- Bailey, L., Ball, B.V., 1991. *Honey Bee Pathology*. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, London NW1 7DX.
- Bailey, L., Brenda, V.B., Perry, J.N., 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann Appl Biol* 103, 13-20.
- Bailey, L., Fernando, E.F.W., 1972. Effects of sacbrood virus on adult honey-bees. *Ann. appl. Biol.* 72, 27-35.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D., 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 21, 390-395.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D., 1964. Sacbrood Virus of the Larval Honey Bee (*Apis Mellifera* Linnaeus). *Virology* 23, 425-429.
- Barroso-Arevalo, S., Fernandez-Carrion, E., Goyache, J., Molero, F., Puerta, F., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2019. High Load of Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Infestation Are Related to Weakness of Honey Bee Colonies in Southern Spain. *Front Microbiol* 10, 1331.
- Benaets, K., Van Geystelen, A., Cardoen, D., De Smet, L., de Graaf, D.C., Schoofs, L., Larmuseau, M.H., Brettell, L.E., Martin, S.J., Wenseleers, T., 2017. Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proc Biol Sci* 284.
- Bhatia, S., Baral, S.S., Vega Melendez, C., Amiri, E., Rueppell, O., 2021. Comparing Survival of Israeli Acute Paralysis Virus Infection among Stocks of U.S. Honey Bees. *Insects* 12.
- Blanchard, P., Guillot, S., Antunez, K., Kogelberger, H., Kryger, P., de Miranda, J.R., Franco, S., Chauzat, M.P., Thiery, R., Ribiere, M., 2014. Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan((R)) assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *J Virol Methods* 197, 7-13.
- Blanchard, P., Olivier, V., Iscache, A.L., Celle, O., Schurr, F., Lallemand, P., Ribiere, M., 2008. Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates. *J Invertebr Pathol* 97, 182-185.
- Blanchard, P., Regnault, J., Schurr, F., Dubois, E., Ribiere, M., 2012. Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. *J Virol Methods* 180, 26-31.
- Blanchard, P., Ribiere, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A.L., Faucon, J.P., 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.

- Blanchard, P., Schurr, F., Olivier, V., Celle, O., Antunez, K., Bakonyi, T., Berthoud, H., Haubruge, E., Higes, M., Kasprzak, S., Koeglberger, H., Kryger, P., Thiery, R., Ribiere, M., 2009. Phylogenetic analysis of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the Chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographic regions. *Virus Res* 144, 334-338.
- Branchiccela, B., Castelli, L., Corona, M., Diaz-Cetti, S., Invernizzi, C., Martinez de la Escalera, G., Mendoza, Y., Santos, E., Silva, C., Zunino, P., Antunez, K., 2019. Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Sci Rep* 9, 10156.
- Brettell, L.E., Martin, S.J., 2017. Oldest Varroa tolerant honey bee population provides insight into the origins of the global decline of honey bees. *Sci Rep* 7, 45953.
- Brettell, L.E., Mordecai, G.J., Schroeder, D.C., Jones, I.M., da Silva, J.R., Vicente-Rubiano, M., Martin, S.J., 2017. A Comparison of Deformed Wing Virus in Deformed and Asymptomatic Honey Bees. *Insects* 8.
- Brettell, L.E., Schroeder, D.C., Martin, S.J., 2019. RNAseq Analysis Reveals Virus Diversity within Hawaiian Apiary Insect Communities. *Viruses* 11.
- Brutscher, L.M., Flenniken, M.L., 2015. RNAi and Antiviral Defense in the Honey Bee. *J Immunol Res* 2015, 941897.
- Campbell, E.M., Budge, G.E., Watkins, M., Bowman, A.S., 2016. Transcriptome analysis of the synganglion from the honey bee mite, *Varroa destructor* and RNAi knockdown of neural peptide targets. *Insect Biochem Mol Biol* 70, 116-126.
- Carrillo-Tripp, J., Dolezal, A.G., Goblirsch, M.J., Miller, W.A., Toth, A.L., Bonning, B.C., 2016. In vivo and in vitro infection dynamics of honey bee viruses. *Sci Rep* 6, 22265.
- Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Schurr, F., Cougoule, N., Faucon, J.P., Ribiere, M., 2008. Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Res* 133, 280-284.
- Chantawannakul, P., Ward, L., Boonham, N., Brown, M., 2006. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J Invertebr Pathol* 91, 69-73.
- Charreton, M., Decourtye, A., Henry, M., Rodet, G., Sandoz, J.C., Charnet, P., Collet, C., 2015. A Locomotor Deficit Induced by Sublethal Doses of Pyrethroid and Neonicotinoid Insecticides in the Honeybee *Apis mellifera*. *PLoS One* 10, e0144879.
- Chen, Y., Evans, J., Feldlaufer, M., 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 92, 152-159.
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Corona, M., Chen, W.P., Li, C.J., Spivak, M., Visscher, P.K., DeGrandi-Hoffman, G., Boncristiani, H., Zhao, Y., vanEngelsdorp, D., Delaplane, K., Solter, L., Drummond, F., Kramer, M., Lipkin, W.I., Palacios, G., Hamilton, M.C., Smith, B., Huang, S.K., Zheng, H.Q., Li, J.L., Zhang, X., Zhou, A.F., Wu, L.Y., Zhou, J.Z., Lee, M.L., Teixeira, E.W., Li, Z.G., Evans, J.D., 2014. Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. *PLoS Pathog* 10, e1004261.
- Chevin, A., Coutard, B., Blanchard, P., Dabert-Gay, A.S., Ribiere-Chabert, M., Thiery, R., 2015. Characterisation of Structural Proteins from Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) Using Mass Spectrometry. *Viruses* 7, 3329-3344.
- Chevin, A., Schurr, F., Blanchard, P., Thiery, R., Ribiere, M., 2012. Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. *Virus Res* 167, 173-178.

- Choe, S.E., Nguyen, L.T., Noh, J.H., Koh, H.B., Jean, Y.H., Kweon, C.H., Kang, S.W., 2012. Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean *Apis cerana* populations. *J Invertebr Pathol* 109, 330-333.
- Coulon, M., Dalmon, A., Di Prisco, G., Prado, A., Arban, F., Dubois, E., Ribière-Chabert, M., Alaux, C., Thiéry, R., Le Conte, Y., 2020. Interactions between thiamethoxam and Deformed wing virus can drastically impair flight behaviour of honey bees. *Frontiers in Microbiology* 11, 766.
- Coulon, M., Schurr, F., Martel, A.C., Cougoule, N., Begaud, A., Mangoni, P., Dalmon, A., Alaux, C., Le Conte, Y., Thiery, R., Ribiere-Chabert, M., Dubois, E., 2018. Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the Chronic bee paralysis virus in honeybees. *Pestic Biochem Physiol* 144, 10-18.
- Coulon, M., Schurr, F., Martel, A.C., Cougoule, N., Begaud, A., Mangoni, P., Di Prisco, G., Dalmon, A., Alaux, C., Ribiere-Chabert, M., Le Conte, Y., Thiery, R., Dubois, E., 2019. Influence of chronic exposure to thiamethoxam and chronic bee paralysis virus on winter honey bees. *PLoS One* 14, e0220703.
- D'Alvise, P., Seeburger, V., Gihring, K., Kieboom, M., Hasselmann, M., 2019. Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. *Ecol Evol* 9, 10241-10252.
- Dainat, B., Neumann, P., 2013. Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. *J Invertebr Pathol* 112, 278-280.
- Dalmon, A., Desbiez, C., Coulon, M., Thomasson, M., Le Conte, Y., Alaux, C., Vallon, J., Moury, B., 2017. Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Sci Rep* 7, 41045.
- Dalmon, A., Gayral, P., Decante, D., Klopp, C., Bigot, D., Thomasson, M., Herniou, E.A., Alaux, C., Le Conte, Y., 2019. Viruses in the Invasive Hornet *Vespa velutina*. *Viruses* 11.
- Daughenbaugh, K.F., Martin, M., Brutscher, L.M., Cavigli, I., Garcia, E., Lavin, M., Flenniken, M.L., 2015. Honey Bee Infecting Lake Sinai Viruses. *Viruses* 7, 3285-3309.
- de Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., Chen, Y.P., Gauthier, L., Genersch, E., De Graaf, D.C., Ribière, M., Ryabov, E., De Smet, L., Van Der Steen, J.J.M., 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 52.
- de Miranda, J.R., Cordini, G., Budge, G., 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol* 103 Suppl 1, S30-47.
- de Miranda, J.R., Cornman, R.S., Evans, J.D., Semberg, E., Haddad, N., Neumann, P., Gauthier, L., 2015. Genome Characterization, Prevalence and Distribution of a Macula-Like Virus from *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Viruses* 7, 3586-3602.
- de Miranda, J.R., Genersch, E., 2010. Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* 103 Suppl 1, S48-61.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E., Huang, M.H., 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol* 56, 1184-1191.
- DeGrandi-Hoffman, G., Corby-Harris, V., Chen, Y., Graham, H., Chambers, M., Watkins deJong, E., Ziolkowski, N., Kang, Y., Gage, S., Deeter, M., Simone-Finstrom, M., de Guzman, L., 2020. Can supplementary pollen feeding reduce varroa mite and virus levels and improve honey bee colony survival? *Exp Appl Acarol* 82, 455-473.

- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., Pennacchio, F., 2016. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3203-3208.
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., Pennacchio, F., 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18466-18471.
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J.R., Moritz, R.F., Paxton, R.J., 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ Microbiol* 17, 969-983.
- Dubois, E., Dalmon, A., 2020. Relations entre le virus des ailes déformées, l'acarien *Varroa destructor*, l'abeille mellifère et leurs conséquences sur la santé des colonies. *La Santé de l'Abeille* 297, 181-194.
- Dubois, E., Dardouri, M., Schurr, F., Cougoule, N., Sircoulomb, F., Thiéry, R., 2020. Outcomes of honeybee pupae inoculated with deformed wing virus genotypes A and B. *Apidologie* 51, 18-34.
- Dubois, E., Reis, C., Schurr, F., Cougoule, N., Ribière-Chabert, M., 2018. Effect of pollen traps on the relapse of chronic bee paralysis virus in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 49, 235-242.
- European Union, 2017. Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products. *Official Journal of the European Union*, L95/91-142.
- Evans, J.D., Spivak, M., 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J Invertebr Pathol* 103 Suppl 1, S62-72.
- Feinberg, M., 2007. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *J Chromatogr A* 1158, 174-183.
- Francis, R.M., Nielsen, S.L., Kryger, P., 2013. *Varroa*-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* 8, e57540.
- Galbraith, D.A., Fuller, Z.L., Ray, A.M., Brockmann, A., Frazier, M., Gikungu, M.W., Martinez, J.F.I., Kapheim, K.M., Kerby, J.T., Kocher, S.D., Losyev, O., Muli, E., Patch, H.M., Rosa, C., Sakamoto, J.M., Stanley, S., Vaudo, A.D., Grozinger, C.M., 2018. Investigating the viral ecology of global bee communities with high-throughput metagenomics. *Sci Rep* 8, 8879.
- Galbraith, D.A., Yang, X., Nino, E.L., Yi, S., Grozinger, C., 2015. Parallel epigenomic and transcriptomic responses to viral infection in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS Pathog* 11, e1004713.
- Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2007. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 38, 226-235.
- Gisder, S., Genersch, E., 2017. Viruses of commercialized insect pollinators. *J Invertebr Pathol* 147, 51-59.

- Gisder, S., Genersch, E., 2020. Direct Evidence for Infection of *Varroa destructor* Mites with the Bee-Pathogenic Deformed Wing Virus Variant B - but Not Variant A - via Fluorescence-in situ-Hybridization Analysis. *J Virol*.
- Goblirsch, M.J., Spivak, M.S., Kurtti, T.J., 2013. A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues. *PLoS One* 8, e69831.
- Gusachenko, O.N., Woodford, L., Balbirnie-Cumming, K., Campbell, E.M., Christie, C.R., Bowman, A.S., Evans, D.J., 2020. Green Bees: Reverse Genetic Analysis of Deformed Wing Virus Transmission, Replication, and Tropism. *Viruses* 12.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348-350.
- ITSAP, 2014. La maladie noire (paralysie chronique de l'abeille, mal des forêts, petites noires, Chronic bee paralysis virus, CBPV) in Guide des bonnes pratiques apicoles, Institut de l'abeille, Paris, France.
- Jamnikar Ciglenecki, U., Toplak, I., 2012. Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus. *J Virol Methods* 184, 63-68.
- Kevill, J.L., Highfield, A., Mordecai, G.J., Martin, S.J., Schroeder, D.C., 2017. ABC Assay: Method Development and Application to Quantify the Role of Three DWV Master Variants in Overwinter Colony Losses of European Honey Bees. *Viruses* 9.
- Lamp, B., Url, A., Seitz, K., Eichhorn, J., Riedel, C., Sinn, L.J., Indik, S., Koglbberger, H., Rumenapf, T., 2016. Construction and Rescue of a Molecular Clone of Deformed Wing Virus (DWV). *PLoS One* 11, e0164639.
- Laurent, M., Hendrikx, P., Ribière-Chabert, M., Chauzat, M.P., 2015. A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2014, in: Commission, E. (Ed.), EPILOBEE - 2012-2014 Version 2 (13th. January 2016), www.ec.europa.eu.
- Lee, P.E., Furgala, B., 1967. Viruslike particles in adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus) following injection with sacbrood virus. *Virology* 32, 11-17.
- Locke, B., Forsgren, E., de Miranda, J.R., 2014. Increased tolerance and resistance to virus infections: a possible factor in the survival of *Varroa destructor*-resistant honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 9, e99998.
- Maori, E., Navarro, I.C., Boncristiani, H., Seilly, D.J., Rudolph, K.L.M., Sapetschnig, A., Lin, C.C., Ladbury, J.E., Evans, J.D., Heeney, J.L., Miska, E.A., 2019. A Secreted RNA Binding Protein Forms RNA-Stabilizing Granules in the Honeybee Royal Jelly. *Mol Cell* 74, 598-608 e596.
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S., Schroeder, D.C., 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336, 1304-1306.
- Mazzei, M., Cilia, G., Forzan, M., Lavazza, A., Mutinelli, F., Felicioli, A., 2019. Detection of replicative Kashmir Bee Virus and Black Queen Cell Virus in Asian hornet *Vespa velutina* (Lepelletier 1836) in Italy. *Sci Rep* 9, 10091.
- McAfee, A., Chapman, A., Pettis, J.S., Foster, L.J., Tarpy, D.R., 2021. Trade-offs between sperm viability and immune protein expression in honey bee queens (*Apis mellifera*). *Commun Biol* 4, 48.

- McDonnell, C.M., Alaux, C., Parrinello, H., Desvignes, J.P., Crauser, D., Durbesson, E., Beslay, D., Le Conte, Y., 2013. Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Ecol* 13, 25.
- McMahon, D.P., Natsopoulou, M.E., Doublet, V., Furst, M., Weging, S., Brown, M.J., Gogol-Doring, A., Paxton, R.J., 2016. Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proc Biol Sci* 283.
- McMenamin, A.J., Flenniken, M.L., 2018. Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Curr Opin Insect Sci* 26, 120-129.
- Meeus, I., de Miranda, J.R., de Graaf, D.C., Wackers, F., Smagghe, G., 2014. Effect of oral infection with Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus on bumblebee (*Bombus terrestris*) reproductive success. *J Invertebr Pathol* 121, 64-69.
- Mockel, N., Gisder, S., Genersch, E., 2011. Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *J Gen Virol* 92, 370-377.
- Mondet, F., Alaux, C., Severac, D., Rohmer, M., Mercer, A.R., Le Conte, Y., 2015. Antennae hold a key to *Varroa*-sensitive hygiene behaviour in honey bees. *Sci Rep* 5, 10454.
- Mondet, F., de Miranda, J.R., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., Mercer, A.R., 2014. On the front line: quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite *Varroa destructor*. *PLoS Pathog* 10, e1004323.
- Mondet, F., Kim, S.H., de Miranda, J.R., Beslay, D., Le Conte, Y., Mercer, A.R., 2016. Specific Cues Associated With Honey Bee Social Defence against *Varroa destructor* Infested Brood. *Sci Rep* 6, 25444.
- Mordecai, G.J., Brettell, L.E., Pachori, P., Villalobos, E.M., Martin, S.J., Jones, I.M., Schroeder, D.C., 2016a. Moku virus; a new Iflavivirus found in wasps, honey bees and *Varroa*. *Sci Rep* 6, 34983.
- Mordecai, G.J., Wilfert, L., Martin, S.J., Jones, I.M., Schroeder, D.C., 2016b. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *ISME J* 10, 1264-1273.
- Mouret, C., Lambert, O., Piroux, M., Beaudeau, F., Provost, B., Benet, P., Colin, M.E., L'Hostis, M., 2013. Prevalence of 12 infectious agents in field colonies of 18 apiaries in western France. *Revue de Médecine Vétérinaire* 164, 577-582.
- Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P., Doublet, V., Frey, E., Rosenkranz, P., Paxton, R.J., 2017. The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss. *Sci Rep* 7, 5242.
- Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Della Vedova, G., Cattonaro, F., Caprio, E., Pennacchio, F., 2012. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog* 8, e1002735.
- Norton, A.M., Remnant, E.J., Buchmann, G., Beekman, M., 2020. Accumulation and Competition Amongst Deformed Wing Virus Genotypes in Naive Australian Honeybees Provides Insight Into the Increasing Global Prevalence of Genotype B. *Front Microbiol* 11, 620.
- OIE, 2018. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organisation for Animal Health (www.oie.int).

- Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., Dubois, E., Tordo, N., Thiery, R., Houlgatte, R., Ribiere, M., 2008a. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Res* 132, 59-68.
- Olivier, V., Massou, I., Celle, O., Blanchard, P., Schurr, F., Ribiere, M., Gauthier, M., 2008b. In situ hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *J Virol Methods* 153, 232-237.
- Ongus, J.R., Peters, D., Bonmatin, J.M., Bengsch, E., Vlak, J.M., van Oers, M.M., 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor*. *J Gen Virol* 85, 3747-3755.
- Posada-Florez, F., Childers, A.K., Heerman, M.C., Egekwu, N.I., Cook, S.C., Chen, Y., Evans, J.D., Ryabov, E.V., 2019. Deformed wing virus type A, a major honey bee pathogen, is vectored by the mite *Varroa destructor* in a non-propagative manner. *Sci Rep* 9, 12445.
- Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis, J.D., Hawthorne, D., vanEngelsdorp, D., 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 1792-1801.
- Remnant, E.J., Mather, N., Gillard, T.L., Yagound, B., Beekman, M., 2019. Direct transmission by injection affects competition among RNA viruses in honeybees. *Proc Biol Sci* 286, 20182452.
- Retschnig, G., Kellermann, L.A., Mehmman, M.M., Yañez, O., Winiger, P., Williams, G.R., Neumann, P., 2019. Black queen cell virus and drifting of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 58, 754-755.
- Ribière, M., Ball, B., Aubert, M.F.A., 2008. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses, European Commission, B-1049 Brussels ed.
- Ribière, M., Faucon, J.P., Pépin, M., 2000. Detection of chronic honey bee (*Apis mellifera* L.) paralysis virus infection: application to a field survey. *Apidologie* 31, 567-577.
- Ribiere, M., Lallemand, P., Iscache, A.L., Schurr, F., Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Faucon, J.P., 2007. Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Appl Environ Microbiol* 73, 7711-7716.
- Ribiere, M., Olivier, V., Blanchard, P., 2010. Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *J Invertebr Pathol* 103 Suppl 1, S120-131.
- Ribière, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Aurières, C., Faucon, J.P., Pépin, M., 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 33, 339-351.
- Roberts, J.M.K., Anderson, D.L., Durr, P.A., 2017. Absence of deformed wing virus and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses. *Sci Rep* 7, 6925.
- Roberts, J.M.K., Simbiken, N., Dale, C., Armstrong, J., Anderson, D.L., 2020. Tolerance of Honey Bees to *Varroa* Mite in the Absence of Deformed Wing Virus. *Viruses* 12.
- Runckel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G., Ganem, D., Andino, R., DeRisi, J.L., 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* 6, e20656.
- Ryabov, E.V., Childers, A.K., Lopez, D., Grubbs, K., Posada-Florez, F., Weaver, D., Girtten, W., vanEngelsdorp, D., Chen, Y., Evans, J.D., 2019. Dynamic evolution in the key

honey bee pathogen deformed wing virus: Novel insights into virulence and competition using reverse genetics. *PLoS Biol* 17, e3000502.

- Ryabov, E.V., Christmon, K., Heerman, M.C., Posada-Florez, F., Harrison, R.L., Chen, Y., Evans, J.D., 2020. Development of a Honey Bee RNA Virus Vector Based on the Genome of a Deformed Wing Virus. *Viruses* 12.
- Ryabov, E.V., Wood, G.R., Fannon, J.M., Moore, J.D., Bull, J.C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N., Evans, D.J., 2014. A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. *PLoS Pathog* 10, e1004230.
- Schurr, F., Cougoule, N., Riviere, M.P., Ribiere-Chabert, M., Achour, H., Adam, D., Castillo, C., de Graaf, D.C., Forsgren, E., Granato, A., Heinikainen, S., Jurovcikova, J., Kryger, P., Manson, C., Menard, M.F., Perennes, S., Schafer, M.O., Ibanez, E.S.M., Silva, J., Gajger, I.T., Tomkies, V., Toplak, I., Viry, A., Zdanska, D., Dubois, E., 2017. Trueness and precision of the real-time RT-PCR method for quantifying the chronic bee paralysis virus genome in bee homogenates evaluated by a comparative inter-laboratory study. *J Virol Methods* 248, 217-225.
- Schurr, F., Tison, A., Militano, L., Cheviron, N., Sircoulomb, F., Riviere, M.P., Ribiere-Chabert, M., Thiery, R., Dubois, E., 2019. Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses. *J Virol Methods* 270, 70-78.
- Schuster, S., Zirkel, F., Kurth, A., van Cleef, K.W., Drosten, C., van Rij, R.P., Junglen, S., 2014. A unique nodavirus with novel features: mosinivirus expresses two subgenomic RNAs, a capsid gene of unknown origin, and a suppressor of the antiviral RNA interference pathway. *J Virol* 88, 13447-13459.
- Seitz, K., Buczolic, K., Dikunova, A., Plevka, P., Power, K., Rumenapf, T., Lamp, B., 2019. A molecular clone of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes mortality in honey bee pupae (*Apis mellifera*). *Sci Rep* 9, 16274.
- Singh, R., Levitt, A.L., Rajotte, E.G., Holmes, E.C., Ostiguy, N., Vanengelsdorp, D., Lipkin, W.I., Depamphilis, C.W., Toth, A.L., Cox-Foster, D.L., 2010. RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-Taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS One* 5, e14357.
- Tehel, A., Vu, Q., Bigot, D., Gogol-Döring, A., Koch, P., Jenkins, C., Doublet, V., Theodorou, P., Paxton, R., 2019. The two prevalent genotypes of an emerging infectious disease, Deformed wing virus, cause equally low pupal mortality and equally high wing deformities in host honey bees. *Viruses* 11, 114.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* 70, 7185-7191.
- Wells, T., Wolf, S., Nicholls, E., Groll, H., Lim, K.S., Clark, S.J., Swain, J., Osborne, J.L., Haughton, A.J., 2016. Flight performance of actively foraging honey bees is reduced by a common pathogen. *Environ Microbiol Rep* 8, 728-737.
- Wilfert, L., Long, G., Leggett, H.C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S.J., Boots, M., 2016. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science* 351, 594-597.
- Yanez, O., Chavez-Galarza, J., Tellgren-Roth, C., Pinto, M.A., Neumann, P., de Miranda, J.R., 2020. The honeybee (*Apis mellifera*) developmental state shapes the genetic composition of the deformed wing virus-A quasispecies during serial transmission. *Sci Rep* 10, 5956.

- Yang, D., Xu, X., Zhao, H., Yang, S., Wang, X., Zhao, D., Diao, Q., Hou, C., 2018. Diverse Factors Affecting Efficiency of RNAi in Honey Bee Viruses. *Front Genet* 9, 384.
- Yang, S., Zhao, H., Deng, Y., Deng, S., Wang, X., Diao, Q., Hou, C., 2020. A Reverse Genetics System for the Israeli Acute Paralysis Virus and Chronic Bee Paralysis Virus. *Int J Mol Sci* 21.
- Yang, X., Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7470-7475.
- Youssef, I., 2016. Contribution à la mise en place d'un système de génétique inverse pour le virus de la paralysie chronique de l'abeille.
- Youssef, I., Schurr, F., Goulet, A., Cougoule, N., Ribiere-Chabert, M., Darbon, H., Thiery, R., Dubois, E., 2015. RNA 1 and RNA 2 Genomic Segments of Chronic Bee Paralysis Virus Are Infectious and Induce Chronic Bee Paralysis Disease. *J Immunol Res* 2015, 423493.
- Yue, C., Genersch, E., 2005. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol* 86, 3419-3424.
- Zhao, Y., Heerman, M., Peng, W., Evans, J.D., Rose, R., DeGrandi-Hoffman, G., Simone-Finstrom, M., Li, J., Li, Z., Cook, S.C., Su, S., Rodriguez-Garcia, C., Banmeke, O., Hamilton, M., Chen, Y., 2019. The Dynamics of Deformed Wing Virus Concentration and Host Defensive Gene Expression after *Varroa* Mite Parasitism in Honey Bees, *Apis mellifera*. *Insects* 10.
- Zioni, N., Soroker, V., Chejanovsky, N., 2011. Replication of *Varroa destructor* virus 1 (VDV-1) and a *Varroa destructor* virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. *Virology* 417, 106-112.

C. Annexe : curriculum vitae

Eric DUBOIS

Né le 30 avril 1966 à Blaye, Gironde, France

Situation professionnelle

Ingénieur de recherche, hors classe (titulaire depuis 1997)

Unité pathologie de l'abeille

Laboratoire de Sophia Antipolis

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

(Anses, www.anses.fr)

105 route des Chappes – CS 20111– 06902 Sophia Antipolis cedex

Tél. : 04.92.94.37.07 – email : eric.dubois@Anses.fr

Formation académique

1995, Doctorat d'Université, mention Sciences Biologiques et Santé, obtenu avec les félicitations du jury, Université de Rennes I

1991, Diplôme d'Etudes Approfondies d'Ecologie Microbienne, mention assez bien, Université de Lyon I

1989, Maîtrise de Biologie Cellulaire, Université de Bordeaux II

Formation professionnelle

2007, Certificat d'aptitude à l'expérimentation animale de niveau 1, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

1992, Certificat d'Etudes Supérieures en Management de la Qualité, ENSA.M. – SUP' de CO de Montpellier (Formexa)

Recherche et référence en virologie des abeilles

Depuis avril 2013, Chargé de projets scientifiques, Responsable de la thématique virologie dans l'Unité pathologie de l'abeille à l'Anses - Laboratoire de Sophia Antipolis :

- Missions de référence dans le cadre des mandats de Laboratoire de référence de l'union européenne et Laboratoire national de référence :
 - Développement et validation de tests de diagnostic
 - Diagnostic de première intention et de confirmation, sous accréditation Cofrac (norme ISO 17025)
 - Organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude selon la norme ISO 17043
 - Elaboration et distribution de matériaux de référence
- Missions de recherche :
 - Eco-dynamique des virus de l'abeille
 - 2018-2023 : Collaboration au projet européen H2020 « PoshBee » (Pan-european assessment, monitoring, and mitigation of stressors on the health of bees)
 - 2014-2019 : Collaboration au projet européen FP7 « SmartBees » (Sustainable management of resilient bee populations)
- Encadrement scientifique de thèses d'université :
 - 2014 à 2017, projet de thèse du Dr. Marianne Coulon (co-encadrement avec le Dr. Anne Dalmon ; Directeurs de thèse : Dr. R. Thiéry et Dr. Yves Le Conte), cofinancé Anses/INRA, de l'Université d'Avignon et soutenue le 21/12/2017 à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse : « *Rôle des interactions virus/pesticides dans le déclin des abeilles* »
 - 2013 à 2016, thèse du Dr. Ibrahim Youssef (Directeurs de thèse : Dr. R. Thiéry et Professeur H. Darbon), cofinancée Anses/Région PACA et soutenue le 15/09/2016 à l'Université Aix Marseille : « *Contribution à la mise en place d'un système de génétique inverse pour le virus de la paralysie chronique de l'abeille* »
- Maître de stage :
 - 2018, encadrant de Madame Marine Dardouri, Licence professionnelle biotechnologie : Génie biologique, histologie, qualité, Université Nice Sophia Antipolis : « *Evaluation de la virulence du virus des ailes déformées chez l'abeille domestique (*Apis mellifera*)* »

- 2014, encadrant de Madame Caroline Reis, Licence Biologie-Environnement, Université Paul Sabatier, Toulouse III : « Distribution du virus de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV) dans la ruche »
 - 2014, encadrant de Monsieur Nicolas Cheviron, BTS Biotechnologies, Lycée Jules Ferry à Cannes : « Validation d'une méthode PCR de détection et de quantification du virus de la cellule royale noire (BQCV) »
- Actions d'enseignement :
- 2018 et 2020, Oniris, Nantes, DIE Apiculture – pathologie apicole : « Les virus et viroses de l'abeille mellifère *Apis mellifera* » (2 h)
 - 2018 et 2020, Oniris, Nantes, Formations supérieures et techniques en apidologie : « Les virus et viroses de l'abeille mellifère *Apis mellifera* » (2 h)
 - Formation de membres du réseau européen de laboratoires nationaux de référence :
 - 2017, PCR diagnosis methods for detection, identification and/or quantification of honey bee pathogens (1 jour)
 - 2019, Honeybee viruses quantification by real-time PCR (5 jours)
- Expertise :
- Depuis 2020, membre des groupes de suivi abeille de la Plateforme Epidémiosurveillance Santé Animale (ESA) :
 - Varroa et virus associés
 - Surveillance en toxicologie et co-facteurs
 - Depuis 2013, membre de la commission U47a « Santé animale » de l'Afnor
 - Depuis 2014, coordinateur du groupe de travail « Méthodes d'analyse en santé animale - Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre de la PCR en biologie vétérinaire », Afnor :
 - Norme publiée <http://www.afnor.org/>: NF U47-600-1 et 2 (7 février 2015)
 - 2016, membre de la commission d'évaluation de l'Unité expérimentale Entomologie, Station du Magneraud, Département Santé des plantes et environnement, INRA Poitou-Charentes, Surgères.

- Membre de jury :
 - 2015, vice-président titulaire du jury pour l'examen professionnel d'avancement au grade de technicien de formation et de recherche de classe supérieure, Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt

- Soutien scientifique en transversalité :
 - Depuis 2017, coordinateur du groupe de travail interne pour préparer la demande d'accréditation du laboratoire comme organisateur d'essais inter-laboratoires d'aptitudes selon la norme internationale ISO 17043
 - 2014 à 2015, coordinateur du groupe de travail interne pour la rédaction du plan qualité d'organisation des essais inter-laboratoires d'aptitude selon la norme internationale ISO 17043

Recherche et référence en virologie des ruminants

2005 à 2013, Virologue dans l'Unité de pathologie des ruminants à l'Agence française de sécurité sanitaire de aliments (Afssa) devenue l'Anses - Laboratoire de Sophia Antipolis :

- 2007 à 2013, Responsable du Laboratoire national de référence sur la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) :
 - Missions de référence :
 - Contrôles libérateurs des réactifs de diagnostic sérologique
 - Organisation du suivi de l'exactitude des tests de diagnostic
 - Diagnostic sérologique de confirmation sous accréditation Cofrac (norme ISO 17025)
 - Organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude
 - Elaboration et distribution de matériaux de référence
 - Missions de recherche :
 - 2011 à 2013, co-coordonateur du projet transversal « Interférence du caprine herpesvirus dans le diagnostic de l'IBR » en collaboration Anses Niort

- 2008 à 2010, Responsable de la station expérimentale (Anses, Sclos-de-Contes) et des projets d'expérimentation sur les petits ruminants :
 - Collaboration avec la Faculty of Infectious and Tropical Diseases (Grande-Bretagne) et UMR 1161 (Anses/INRA/ENVA) pour évaluer l'innocuité et l'efficacité

- de nouveaux vaccins FCO par l'utilisation de VLP : 27 ovins (4 lots séparés) pendant 3 mois d'expérimentation
- Collaboration avec le CODA-CERVA (Belgique) et l'UMR 1161 (Anses/INRA/ENVA) pour une tentative d'isolement sur « espèce cible » de la souche BTV-11 du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO), identifiée en Belgique : 2 ovins (1 lot), pendant 2 mois d'expérimentation
 - Collaboration avec la Faculty of Infectious and Tropical Diseases (Grande-Bretagne) et UMR 1161 (Anses/INRA/ENVA) pour évaluer l'innocuité et l'efficacité de nouveaux vaccins FCO constitués de virus délétés : 14 ovins (3 lots séparés) pendant 3 mois d'expérimentation
 - Collaboration au projet de thèse d'université du Docteur vétérinaire Coraline Bouet (UMR 1161) pour évaluer l'innocuité et l'efficacité d'une nouvelle approche vaccinale contre la FCO par l'utilisation de Cav-2 : 40 ovins (4 lots séparés) pendant 4 mois d'expérimentation
 - Collaboration avec la Faculty of Infectious and Tropical Diseases (Grande-Bretagne) et UMR 1161 (Anses/INRA/ENVA) pour évaluer l'innocuité et l'efficacité de nouveaux vaccins FCO par l'utilisation de VLP : 17 ovins (3 lots séparés) pendant 2 mois d'expérimentation
- 2008 à 2010, Chef d'unité pathologie des ruminants (10 agents) :
 - 3 équipes : Fièvre Q, Virologie des ruminants et Bactériologie de la mamelle
 - 2005 à 2007, Chargé des projets de recherche et d'appui scientifique sur les pestivirus de ruminants :
 - Etude de la diversité moléculaire des pestivirus de ruminants
 - Diagnostic et organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude
 - Encadrement scientifique d'une thèse d'université :
 - 2008 à 2011, thèse du Docteur vétérinaire Claire Martin (Directeurs de thèse : Dr. R. Thiéry, Professeur A. Cupo et Professeur C. Saegerman), cofinancée Afssa/Région PACA et soutenue le 20/12/2011 à l'Université de Nice Sophia-Antipolis - ED85 en cotutelle avec l'Université de Liège : "*Pestivirus des ruminants sauvages et domestiques des alpages*"

- Maître de stage :
 - 2013, encadrant de Monsieur Johnny Boisset, Licence professionnelle Génie Biologique, Université de Nice-Sophia-A : "*Validation de la neutralisation virale croisée pour l'étude des infections à alphaherpesvirus chez la chèvre et le bovin*"
 - 2012, encadrant du Dr. vétérinaire Abdenour Kaddour de l'Université Saad Sahlab de Blida (Algérie) : "*Epidémiologie de l'IBR en Kabylie*"
 - 2012, encadrant de Madame Laura Militano, Licence professionnelle Génie Biologique, Université de Nice-Sophia-A : "*Développement et évaluation de la performance d'outils moléculaires de détection de l'herpesvirus caprin de type 1*"
 - 2011, co-encadrant de Madame Précilla Nativel, Master 2 professionnel, Université Paul Sabatier, Toulouse III : "*Développement d'outils moléculaires pour la caractérisation du virus de l'herpès bovin de type 1 en phase de latence*"
 - 2007, encadrant de Madame Léa Carrère, BTSA en productions animales, Lycée agricole de Rodez : "*Etude de deux souches de pestivirus (AV et Orlu) chez la brebis*"

- Expertise :
 - 2010 à 2013, membre du Groupe de travail « Essais de contrôle des réactifs – Santé animale » de l'Association française pour la normalisation (Afnor)
 - Normes publiées : NF U47-310 et 311
 - 2007 à 2013, membre du Comité de suivi et d'évaluation de l'Association pour la certification en santé animale (ACERSA)
 - Participation au groupe de travail pour la rédaction du cahier des charges pour la qualification « BVD : bovin non IPI », de 2008 à 2011
 - Co-animateur du groupe de travail sur les réactifs de diagnostic de l'IBR de 2007 à 2010
 - 2007 à 2014, membre du groupe de travail « Méthodes d'analyse en santé animale - Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre de la PCR en biologie vétérinaire », AFNOR
 - Norme publiée : NF U47-600-1 et 2 (juin 2011)

- Membre de jury :
 - 2012, rapporteur de la thèse de doctorat « Epidemiology of pestivirus infection in pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) and other wild and domestic ruminants » de Laura Fernández Siera, Facultat de Veterinària – Universitat Autònoma de Barcelona.
 - 2007, jury du BTS Biotechnologies dans le cadre de la validation des acquis de l'expérience, Lycée Jules Ferry Cannes

- Soutien scientifique en transversalité :
 - 2005 à 2007, caractérisation moléculaire du virus de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV)
 - 2001, caractérisation moléculaire du virus de la FCO, isolé en Corse

Recherche en virologie des aliments, de l'eau et de l'environnement

1997 à 2005 : Virologue dans l'Unité de virologie des aliments et de l'eau au Centre national d'études vétérinaires et alimentaires (Cneva) devenu l'Afssa - Laboratoire de Maisons-Alfort :

- 2003 à 2005, Chef d'unité, fondateur de l'unité de virologie des aliments et de l'eau (7 agents)

- 1997 à 2005, Chargé des projets de recherche en virologie des aliments et de l'eau :
 - Projets sous convention avec la Direction Générale de l'Alimentation (S97/21), Détection par PCR et caractérisation des virus entériques contaminant les coquillages
 - Projet internes PR-2005-16, Evaluation d'une méthode alternative par filtration pour la recherche des entérovirus dans les eaux de consommation
 - Coordinateur de projets scientifiques nationaux dans le cadre du programme «Aliment-Qualité-Sécurité» du ministère chargé de l'agriculture et de la pêche :
 - Projet R98/18 "Bases méthodologiques de la surveillance des virus entériques contaminant les denrées végétales"
 - Projet R01/04 "Contamination virale des denrées végétales : Evaluation du procédé de lavage des salades destinées à la fabrication des produits de 4ème gamme"

- Participation au projet européen Med-Vet-Net (network on foodborne zoonosis), Food-PCR 2

- Maître de stage :
 - Elèves Ingénieurs (2^{ème} année ENSBANA de Dijon) :
 - 2005, Madame Stéphanie Deruelle : " Caractérisation du protocole de détection par RT-PCR en temps réel, du virus de l'hépatite A (VHA), artificiellement inoculé sur des fruits frais ou congelés"
 - 2004, Madame Nadia Hmila : "Caractérisation d'une méthode de détection et de quantification du génome de virus de l'hépatite A à partir d'eaux de consommation artificiellement contaminées"
 - 2003, Madame Marie Le Calvé : "Evaluation d'une méthode d'élu-tion-concentration par filtration des virus à partir de salades"
 - Maîtrise de l'Université de Caen :
 - 2001, Madame Catherine Roquier : "Etude comparative de deux méthodes de purification des virus entériques humains contaminant des huîtres"
 - DUT de l'Université Paris XII, IUT génie biologique de Créteil/Vitry :
 - 2004, Monsieur Sébastien Dolphin : "Recherche de contaminations virales sur les salades de 4^{ème} gamme"
 - 2003, Monsieur Jonathan Aboiron : "Recherche de prévalence des marqueurs viraux dans l'eau industrielle de lavage de salades de 4^{ème} gamme"

- Actions d'enseignement :
 - 2005, Université de Nantes, Diplôme Inter-Universitaire "Les techniques de génétique moléculaire appliquées à la détection et au typage des microorganismes" : « *Biologie moléculaire et virologie des aliments* » (3 h)
 - 2004, Institut Pasteur de Lille, Journée d'actualité en sécurité sanitaire des aliments, le point sur la virologie alimentaire : « *Les méthodes de détection des virus dans les aliments* » (45 min) et « *Vers une réglementation et une normalisation* » (45 min)
 - 1999 à 2004, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Certificat d'études approfondies vétérinaires de Gestion de la sécurité et de la qualité des denrées alimentaires, module microbiologie : « *Les virus transmissibles par les aliments* » (3 h/an)

- 2000 et 2002, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Cours supérieur d'alimentation et nutrition humaine "Microbiologie et sécurité des aliments" : « *Virus et aliments* » (2 h/an)
 - 2000, formation continue destiné aux agents des services vétérinaires "Harmonisation des procédures d'inspection des produits de la pêche et des coquillages" : « *Virologie des aliments* » (45 min)
 - 1998, Commission Internationale des Industries Agricoles et Alimentaires, formation continue "Produits de la pêche, maîtrise de l'hygiène et de la sécurité" : « *Les rotavirus et le risque de transmission par les coquillages* » (45 min)
- Expertise :
- 2007 à 2009, membre du Comité scientifique d'organisation des Journées Francophones de Virologie
 - 2004 à 2007, participation aux travaux du Comité européen de normalisation (Detection of viruses in food) et co-animation d'un Groupe de travail miroir à l'AFNOR
 - 2003 à 2006, membre du groupe d'investigation des toxi-infections alimentaires collectives associées à la contamination virale des denrées et de l'eau de l'Institut de Veille Sanitaire
 - 2000 à 2006, membre du Comité d'experts spécialisé « Microbiologie » de l'Afssa (2 mandats de 3 ans)
 - 2003 à 2006, membre du groupe de travail "Virus transmissibles à l'homme par voie orale". Rapport d'expertise : « Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale », février 2007, éditeur Afssa.
 - 2002 à 2003, participation au groupe de travail "Agriculture biologique" Rapport d'expertise « Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique », juillet 2003, éditeur Afssa.
 - 2001 à 2005, membre du groupe de travail « Mise en œuvre des mesures de confinement des poliovirus en France, en application de la résolution WHA.52.22 de l'OMS »

1996, Ingénieur contractuel au Laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique, Université de Rennes I (post-doctorant) :

- Impact des rejets continentaux sur les gisements de coquillages
- Efficacité du traitement UV sur la contamination virale des eaux épurées

1992 à 1995, Doctorant au Laboratoire de Microbiologie, IFREMER de Nantes :

- Sujet de thèse « Contamination de l'environnement littoral par les rotavirus du groupe A »
(encadrante : Dr. Soizick Le Guyader)

Recherche en microbiologie de la viande

1991, Stagiaire DEA dans l'Unité de Recherches de Microbiologie, INRA Saint-Genes-de-Champanelle :

- Sujet de stage « Effet de la croissance à basse température sur la composition protéique de *Pseudomonas fragi* K1 » (encadrant : Dr. Michel Hébraud)

Dr. Eric Dubois
Anses, Laboratoire de Sophia Antipolis
105 route des Chappes - CS 20111
06902 Sophia Antipolis
Tél. : 04.92.94.37.00 ; email : eric.dubois@anses.fr

