

# **Abeilles et agents infectieux**

## **Aspects immunologiques**

Coralie MOURET

15 janvier 2012, cours de perfectionnement, CARI



# La colonie = un super-organisme sensible

---

## Une colonie d'abeilles

- 50.000 individus dans un milieu restreint → contacts étroits (nettoyage, trophallaxie,...)
- Milieu humide et chaud
- Présence de réserves alimentaires
- Dérive, pillage

→ Milieu favorable à la contamination, au développement d'agents infectieux et/ou infestants

# Agression et défense

---

## Nombreux agents infectieux et parasitaires

- bactéries (agents de loque : *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* et autres...)
- virus
- microsporidies (*Nosema* spp.), *Ascospaera apis*
- acariens parasites (*Acarapis woodi*, *Varroa destructor*, *Tropilaelaps*)
- protozoaires

+ prédateurs (*Vespa velutina*)

→ Développement de mécanismes de défense (immunité) à différentes échelles : immunité individuelle / sociétale

→ Mécanismes efficaces car 1/3 gènes d'immunité en moins prp aux Drosophiles ou Anophèles ([Evans et al., 2006](#))

# Immunités individuelle et sociétale

---

## Immunité individuelle

### Constituant de l'immunité

- Barrières immunologiques
- Enzymes circulantes
- Cellules hémolymphales

### Déclenchement du système immunitaire

### Réponse immunitaire

## Immunité sociétale

### Comportement face à la maladie

- Augmentation de température
- Comportement hygiénique

### Prévention des maladies

Nettoyage de la ruche et  
« propreté » des abeilles

Butinage de la propolis et autres  
facteurs anti-microbiens

Sélection naturelle

Immunité individuelle

# Immunité individuelle

## Constituant de l'immunité

### **Barrières immunologiques**

Enzymes circulantes

Cellules hémolympheales

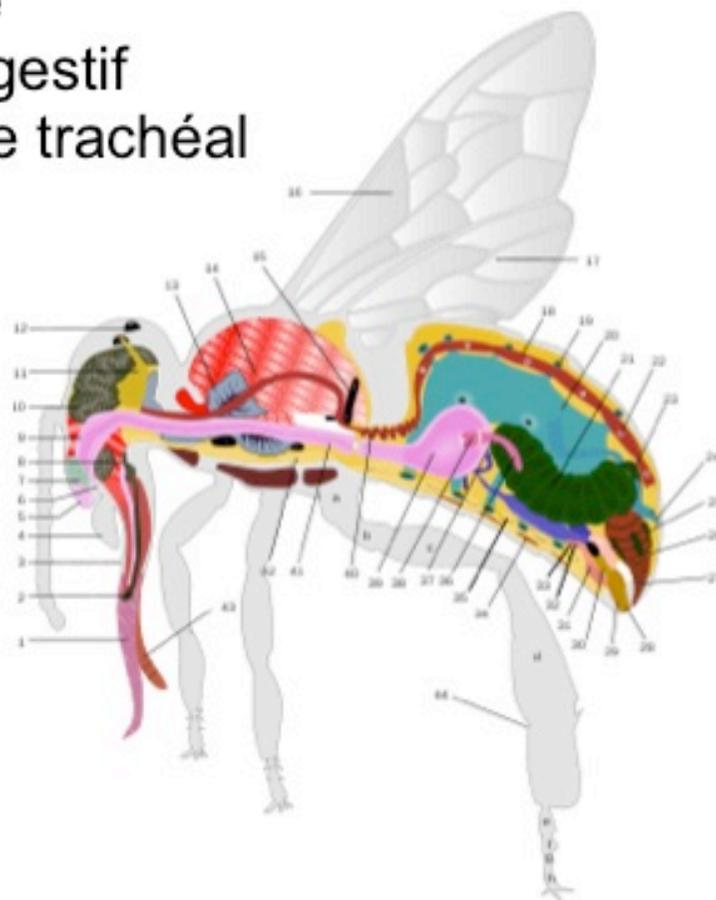
Déclenchement du système immunitaire

Réponse immunitaire

Cuticule

Tube digestif

Système trachéal



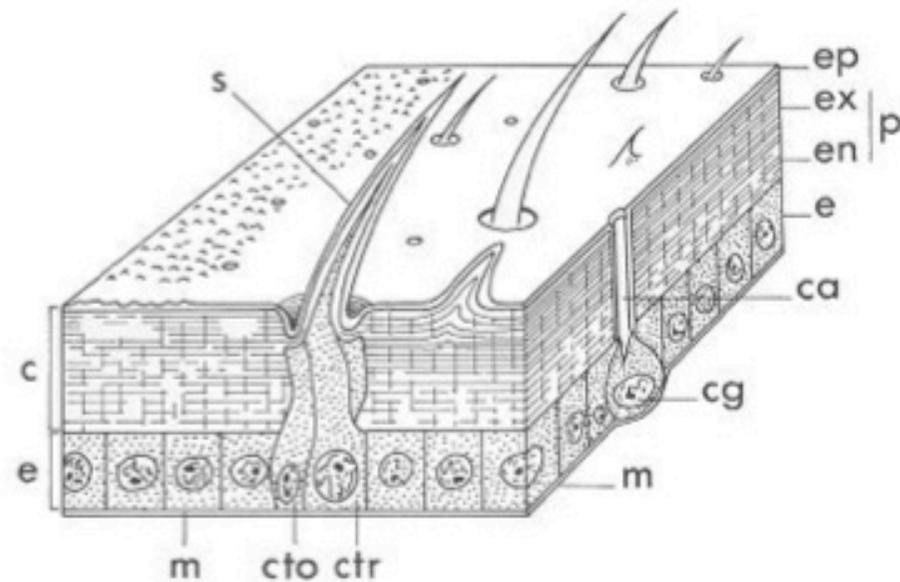
# Barrière cuticulo-épidermique

Résistance aux abrasions  
Desquamation → élimination

Résistance aux substances  
chimiques et agents infectieux  
(champignons++), sauf si blessure  
(chitinase)

Incomplète à l'état larvaire ou  
nymphal

Activité anti-microbienne :  
dihydrophenols, enzymes, cires et  
acides gras insaturés



Reconstitution schématique du tégument en trois dimensions.

(d'après A.G. RICHARDS, 1951)

**c** : cuticule,  
**ca** : canal glandulaire,  
**cg** : cellule glandulaire,  
**cto** : cellule tormogène,  
**ctr** : cellule trichogène  
**e** : épiderme

**en** : endocuticule,  
**ép** : épicuticule,  
**ex** : exocuticule,  
**m** : membrane basale,  
**p** : procuticule,  
**s** : soie.

# Systeme trachéal

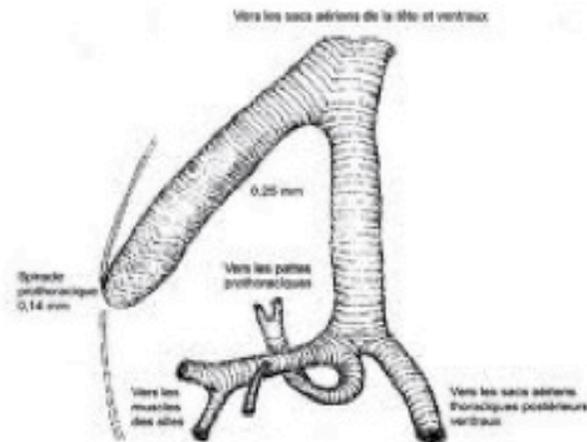
Structure : barrière mécanique

Mécanisme d'ouverture/fermeture des spiracles

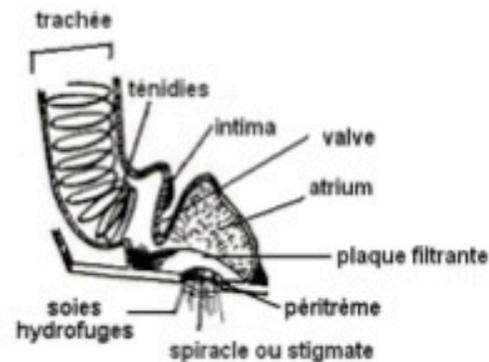
Faible humidité relative

Manque de substrats pour la croissance bactérienne

Guérison efficace des plaies trachéales et action antibactérienne des quinones (mélanisation)



Trachées thoraciques principales d'abeille ou *Acarapis woodi* est généralement trouvé : les d'infestations légères, les parasites sont situés près de l'ouverture des spiracles.



SYSTEME RESPIRATOIRE DE L'ABEILLE  
autour du spiracle  
D'après Zender et Snodgrass



# Barrière intestinale

Chitine dans les intestins antérieur et postérieur mais pas dans l'intestin moyen

Environnement biochimique

Enzymes digestives → prévention sporulation et multiplication

Acidité

Oxygène → potentiel d'oxydoréduction

Microflore → antibiose et compétition pour les nutriments

Activité anti-microbienne du miel, nectar et pollen

→ Défavorable à la germination des spores bact. ou fongiques (ex : LA, Evans & Armstrong, 2006)



# Barrière intestinale

Membrane péritrophique de l'intestin moyen

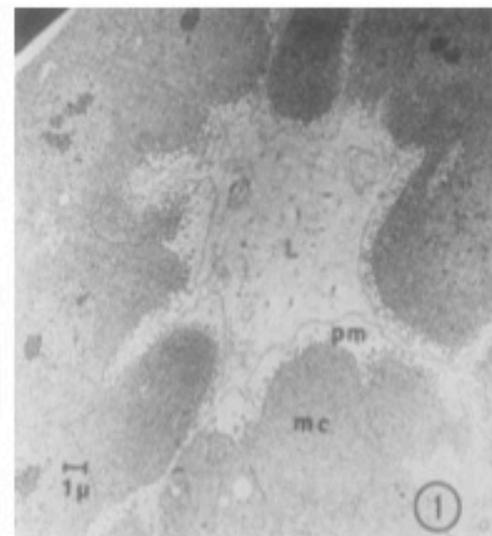
Entoure le contenu alimentaire

Constituée de chitine, de protéines glycosylées (protéoglycanes) et de nombreuses protéines (dont péritrophines)

Développement sous l'action de chymosine

Filtre à bactéries et virus

Davidson, 1970 - Ultrastructure of peritrophic membrane development in larvae of the worker honey bee (*Apis mellifera*)



Cellules épithéliales de l'intestin

Desquamation périodique

Interférence et inhibition de réplication des virus par libération d'interférons (glycoprotéines de 30 kDa)

→ principale porte d'entrée pour les virus, bactéries et champignons

# Immunité individuelle

## Constituant de l'immunité

Barrières immunologiques

**Enzymes circulantes**

Cellules hémolymphales



Déclenchement du système immunitaire

Réponse immunitaire

# Enzymes circulantes

---

## Lysozyme

Chez l'abeille 15kDa

Concentration dans l'hémolymphe (larve, nymphe, adulte) : de 5 µg/ml à 25 µg/ml

Augmentation suite à une infection :

maximum de 40 µg/ml chez l'adulte

jusqu'à 1300 µg/ml dans les larves subissant une infection (vraisemblablement car ne possèdent pas d'apidaecines)

Lyse du peptidoglycane

→ action sur bactéries Gram + voire Gram -

## Glucose-oxydase (GOX)

Produite par les glandes hypopharyngiennes ([Ohashi et al., 1999](#))

Catalyse la formation de peroxyde d'hydrogène

→ action sur bactéries et champignons

# Enzymes circulantes

---

## **Phénoloxydase (PO)**

Produit par activation de la prophénoloxydase zymogène (proPO) en réponse à un élément déclencheur (agents infectieux / infestants, blessure, produits chimiques)

Enzyme catalysant l'oxydation de phénols en quinones toxiques, qui sont ensuite polymérisés en mélanine

→ Intervention dans l'encapsulation mélanotique et la cicatrisation des blessures (Cerenius & Söderhäll, 2004)

→ Intervention dans phagocytose ? (Cerenius *et al.*, 2008)

→ Voie de la phénoloxydase = élément central de la réaction immunitaire qui se produit dans l'hémolymphe

# Enzymes circulantes

---

## Phénoloxydase (PO)

Activité héréditaire (Cotter & Wilson, 2002)

Relation entre activité de PO et résistance aux :

- virus (Wilson *et al.*, 2001; Beck & Strand, 2007)
- bactéries (Pye, 1978)
- champignons (Ochiai & Ashida, 1988)
- parasites (Leonard *et al.*, 1985; Paskewitz & Riehle, 1994 ; Gorman *et al.*, 1996)
- et parasitoïdes (Wilson *et al.*, 2001)

# Immunité individuelle

---

## Constituant de l'immunité

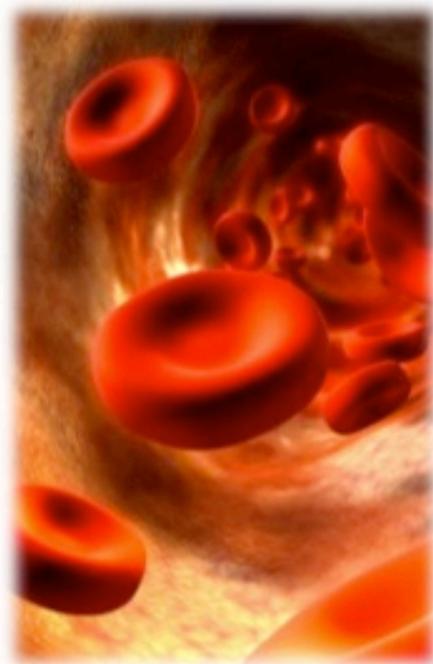
Barrières immunologiques

Enzymes circulantes

**Cellules hémolympheales (hémocytes)**

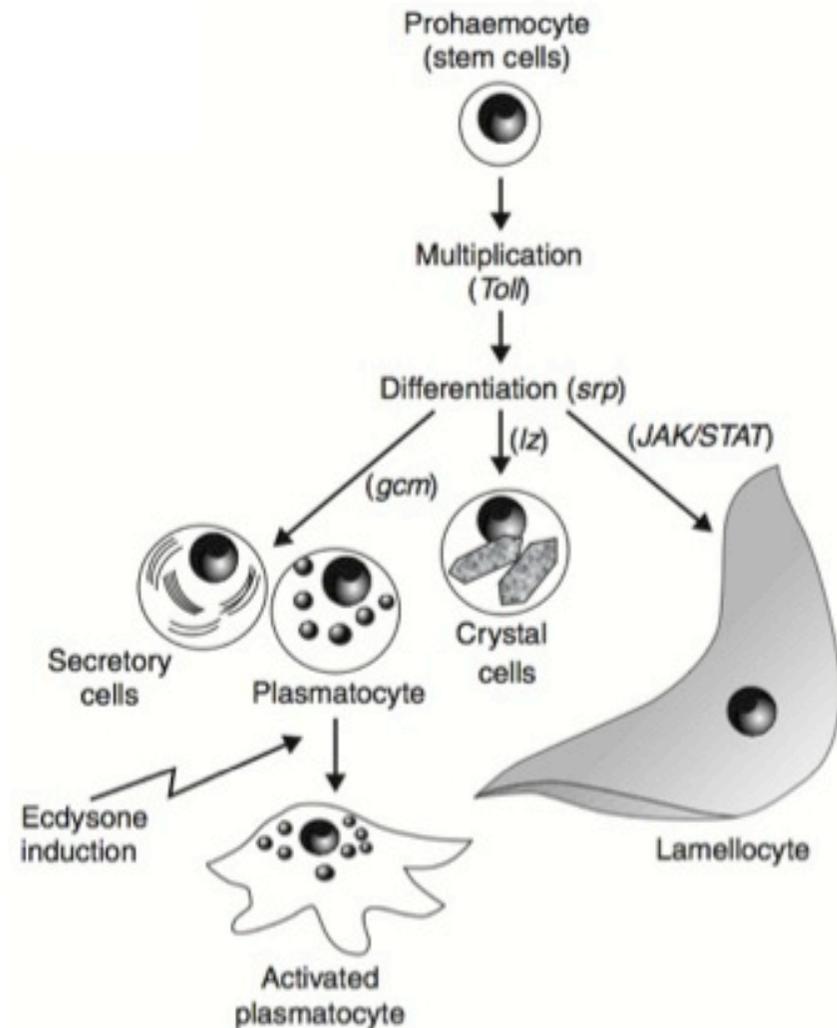
Déclenchement du système immunitaire

Réponse immunitaire



# Cellules hémolymphales

- Granulocytes
- Plasmatocytes
- Oenocytoïdes
- Cellules à sphérules
- Cellules en aiguille



Tzou *et al.*, 2002 - How *Drosophila* combats microbial infection - a model to study innate immunity and host-pathogen interactions

# Cellules hémolymphales

## Granulocytes

Comparables aux macrophages des mammifères

Contiennent des granules en pelote de laine formés d'opsonine

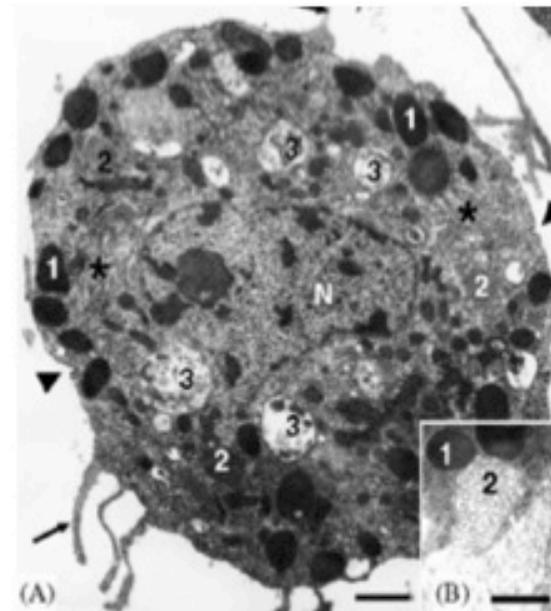
Pseudopodes, fillopodes

Appelés plasmatocytes chez la drosophile

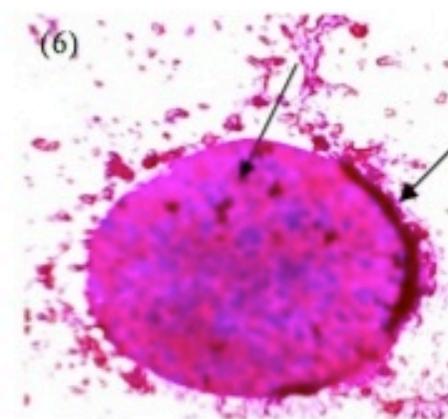
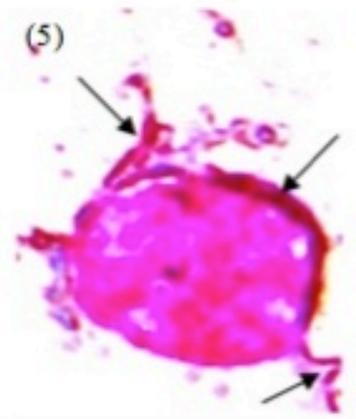
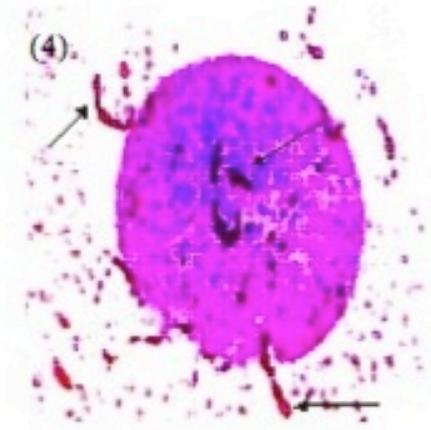
→ phagocytose

→ première phase de la formation  
de nodules et de capsules

Ribeiro & Bréhélin, 2006 - Insect haemocytes-  
What type of cell is that ?



# Cellules hémolymphales



Zakaria, 2007 - The Cellular Immunity Responses In The Haemolymph Of Honey Bee Workers Infected By American Foulbrood Disease (AFB)

# Cellules hémolympheales

## Plasmatocytes

Rare chez l'insecte sain

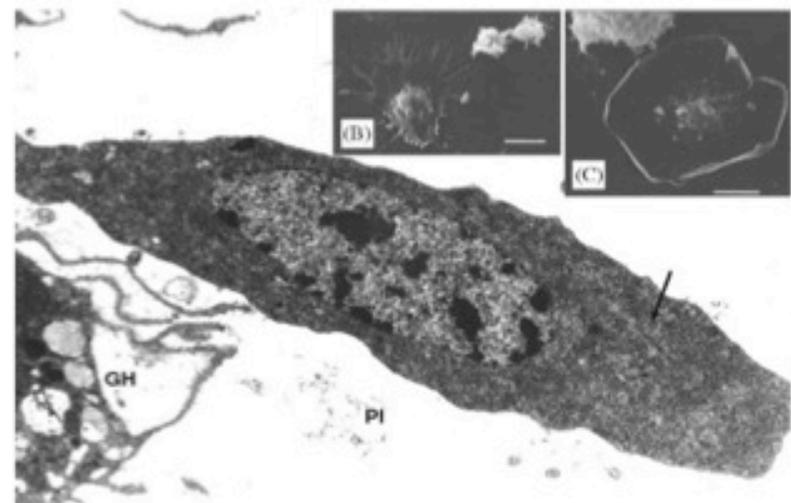
« œuf sur le plat » sans inclusions

Se transforme en lamellocyte après réception d'un signal

Appelé lamellocyte chez la drosophile

- encapsulation des corps étrangers trop grands pour être phagocytés
- formation de nodules autour d'amas bactériens et de matériel mélanisé nécrotique
- phagocytose ?

Ribeiro & Bréhélin, 2006 - Insect haemocytes-  
What type of cell is that ?



# Cellules hémolymphales

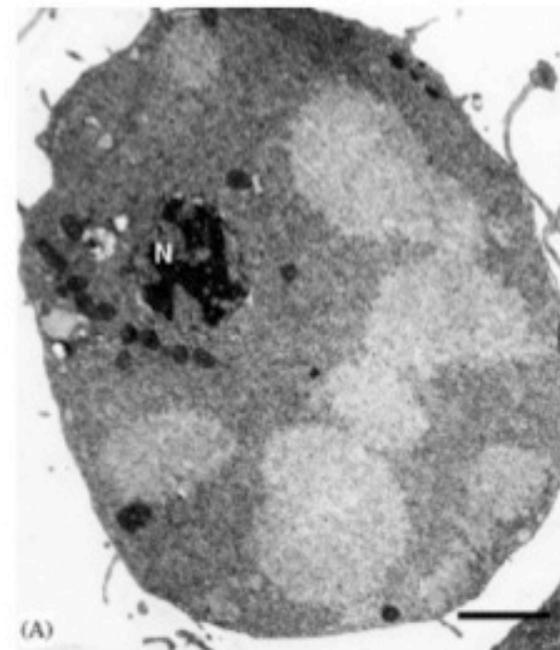
## Oenocytoïdes

Cellule de grande taille à noyau décentré

Cellules très fragiles, lysée en 15 mn *in vitro*

- synthèse et stockage de prophénoloxydase formant des cristaux si concentration importante
- participation à la mélanisation

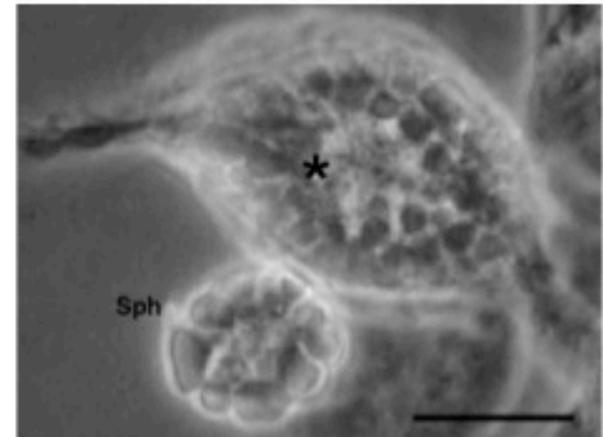
Ribeiro & Bréhélin, 2006 - Insect haemocytes-  
What type of cell is that ?



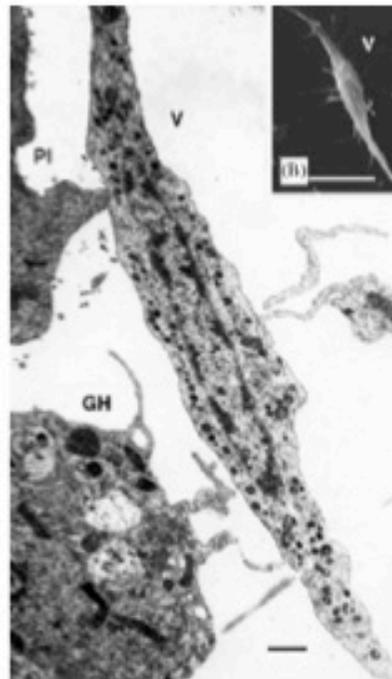
# Cellules hémolymphales

## Autres cellules

- Sphérulocytes  
Ressemblent à des granulocytes de grande taille  
Fonction inconnue



- Cellules en aiguille  
Plasmatocytes ?  
Fonction inconnue



Ribeiro & Bréhélin, 2006 -  
Insect haemocytes- What  
type of cell is that ?

# Variation de l'activité de la PO au cours de l'ontogenèse

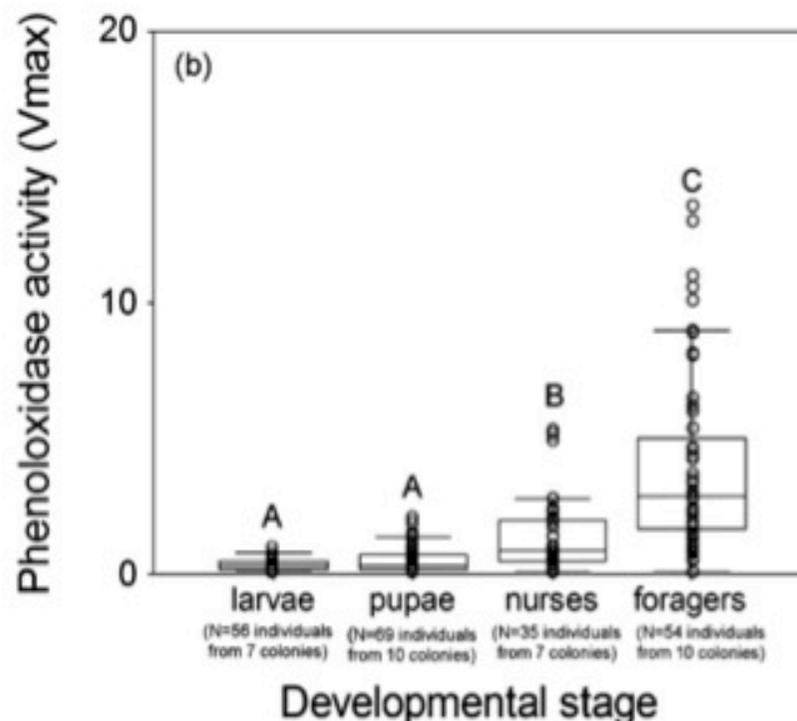
## Phénoloxydase (PO)

Activité la plus forte chez les butineuses

Activité augmente avec l'ontogenèse

Activité stable pendant le développement larvaire (avant éclosion)

Très faible variation en fonction de la race d'abeille (Italienne, Carnolienne, Italienne-Carnolienne)



Wilson-Rich *et al.*, 2008 - The ontogeny of immunity- Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*)

# Variation de l'activité de la PO au cours de l'ontogenèse

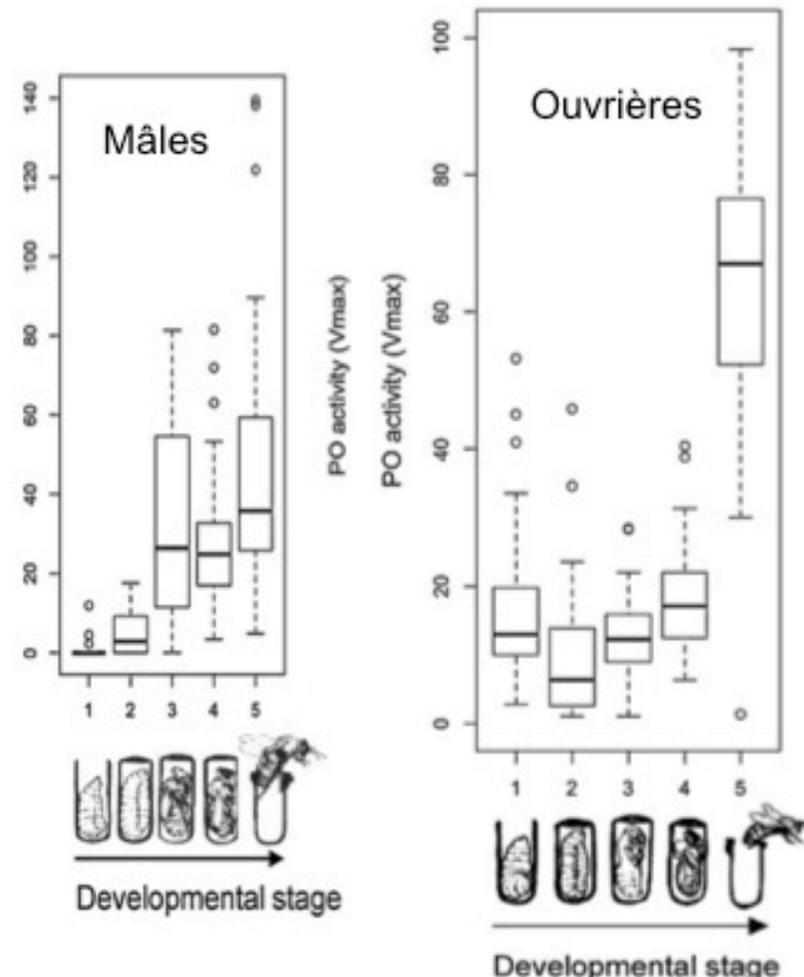
## Phénoloxydase (PO)

Activité la plus forte chez les butineuses

Activité augmente avec l'ontogenèse

Activité stable pendant le développement larvaire (avant éclosion)

Très faible variation en fonction de la race d'abeille (Italienne, Carnolienne, Italienne-Carnolienne)

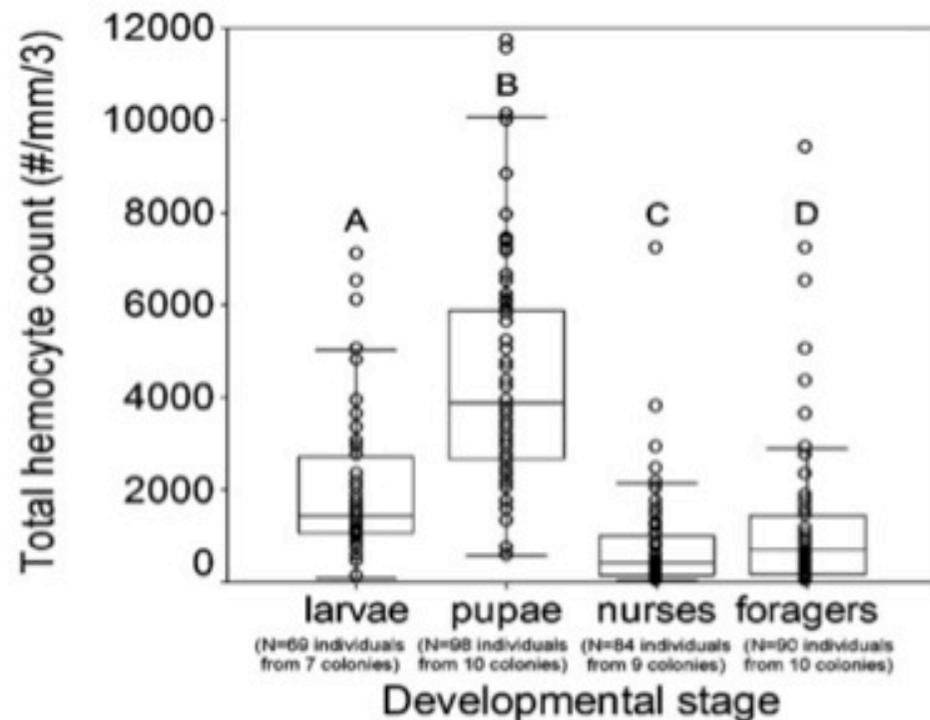


Laughton *et al.*, 2011 - The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera*  
L. following an immune challenge

# Variation du nombre d'hémocytes au cours de l'ontogenèse

En règle générale, les stades larvaires et pupaux ont un taux d'hémocytes supérieur aux adultes.

Les stades pupaux ont significativement une plus forte densité d'hémocytes que tous les autres stades de développement.



Wilson-Rich *et al.*, 2008 - The ontogeny of immunity- Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*)

# Influence de la fonction sociale sur l'immunité

La réversion effectuée consiste à contraindre des butineuses à élever du couvain ouvert

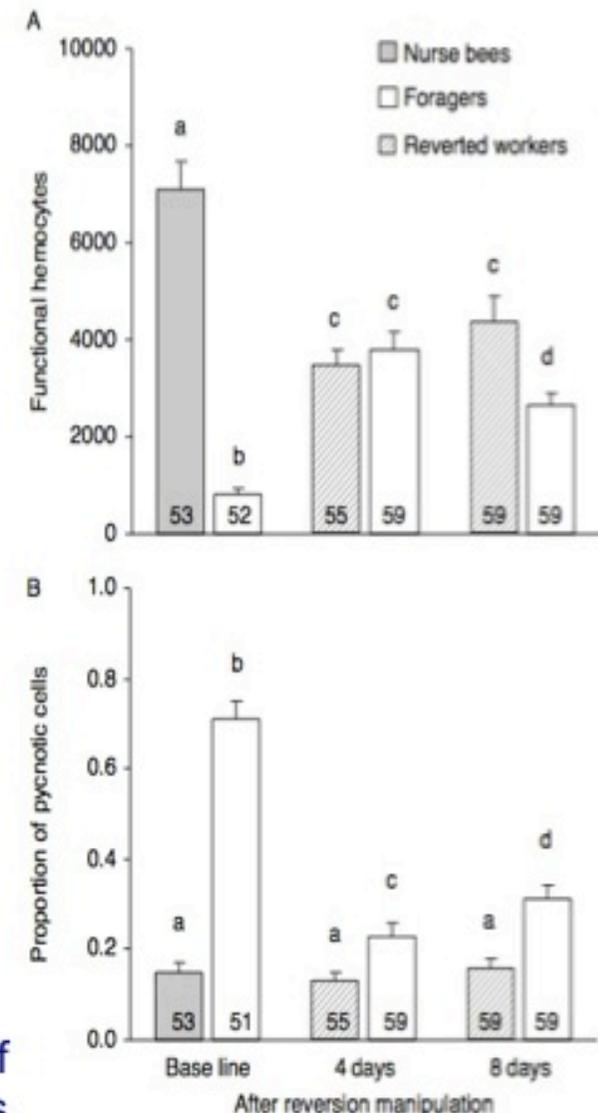
Phénotype comportemental et âge influent significativement sur le nombre d'hémocytes fonctionnels

4 jours après réversion, augmentation du nombre d'hémocytes chez ouvrières réversées et butineuses

8 jours après, diminution par rapport à 4 jours pour les butineuses, pas de différence pour les réversées

→ les ouvrières forcées à passer du statut de butineuses au statut de nourrices ont montré un renversement d'immunosénescence, i.e. une reprise de l'immunité avec l'âge

Amdam *et al.*, 2005 - Social reversal of immunosenescence in honey bee workers



# Influence de l'alimentation sur l'immunité

## Alimentation avec du pollen

- Diminution de la concentration en hémocytes quand nourrissement avec pollen
- Augmentation de l'activité de phénoloxydase (cas du pollen polyfloral le plus riche)
- Augmentation du taux de corps gras (notamment lors de pollen polyfloral)
- Augmentation de l'activité GOX (notamment pollen polyfloral)
- Aucune différence entre les pollens monofloraux

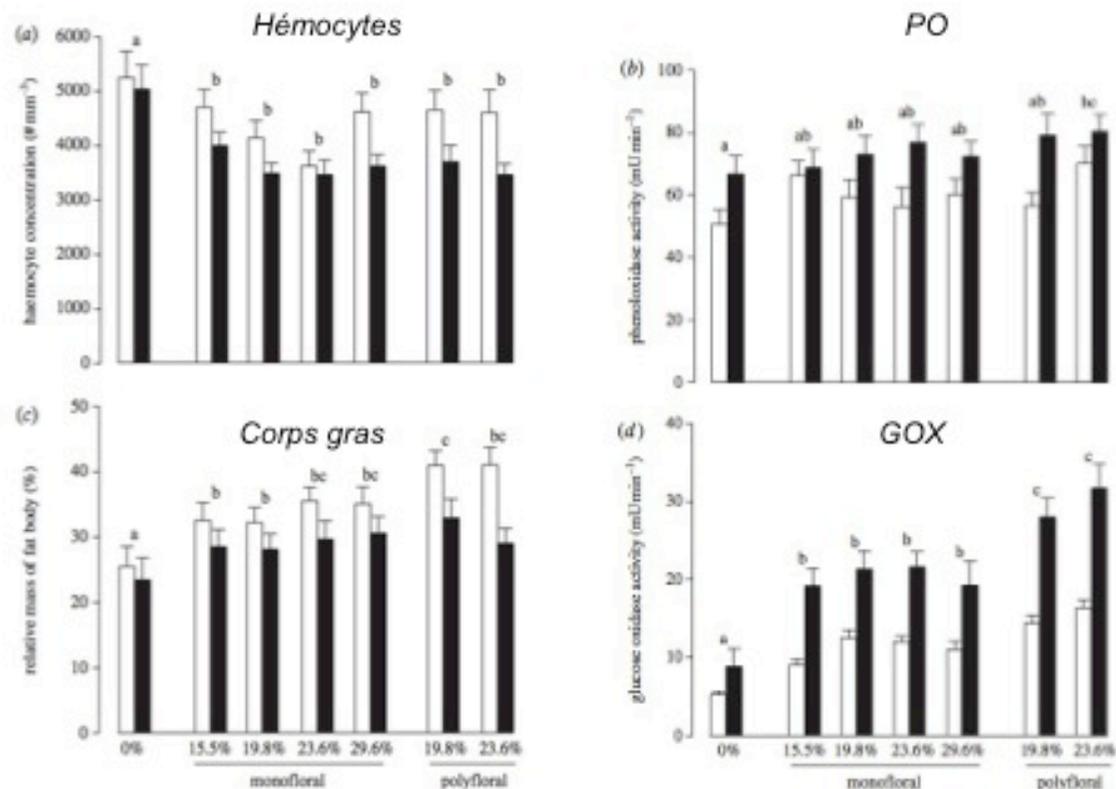
## Effet significatif de l'âge

- Concentration en hémocytes et taux de corps gras diminuent avec l'âge
- Activité de PO et GOX augmentent avec l'âge

→ malnutrition = immunodéficience

Alaux *et al.*, 2010 - Diet effects on honeybee immunocompetence

□ Ab de 5 jours    ■ Ab de 10 jours



# Immunité individuelle

---

Constituant de l'immunité

Barrières immunologiques

Enzymes circulantes

Cellules hémolymphales

Déclenchement du système immunitaire

Réponse immunitaire



# Déclenchement du système immunitaire

---

## Reconnaissance et initiation de la réaction immunitaire

Les facteurs humoraux « étrangers »...

LipoPolySaccharide (LPS) bactérien (Gram -)

Peptidoglycane (Gram + et Gram -)

$\beta$ -1,3 glucan (levures, champignons)

... sont reconnus par des protéines hémolympheales

LPS Binding Proteins ou Gram-negative Binding Proteins (GNBPs) →

Gram - (ex : hémoline ([Schmidt et al., 1993](#)))

PeptidoGlycan Recognition Proteins (PGRPs) → Gram + et -

$\beta$ -Glucan Recognition Protein ( $\beta$ -GRP) → levures, champignons

→ déclenchement de la réponse immunitaire

# Immunité individuelle

---

Constituant de l'immunité

Barrières immunologiques

Enzymes circulantes

Cellules hémolymphales

Déclenchement du système immunitaire

Réponse immunitaire



# Réponse immunitaire cellulaire

---

Conséquence immédiate et locale de la présence du « non-soi » :  
réaction immunitaire cellulaire : **immédiate** et **non-spécifique**

## Granulocytes

→ phagocytose (virus, bactéries, spores fongiques) et  
opsonisation (opsonines induites par la voie JAK/STAT) (*Levashina et al., 2001 ; Evans et al., 2006, Lemaitre & Hoffmann, 2007*)

## Plasmatocytes

→ formation de nodules / encapsulation

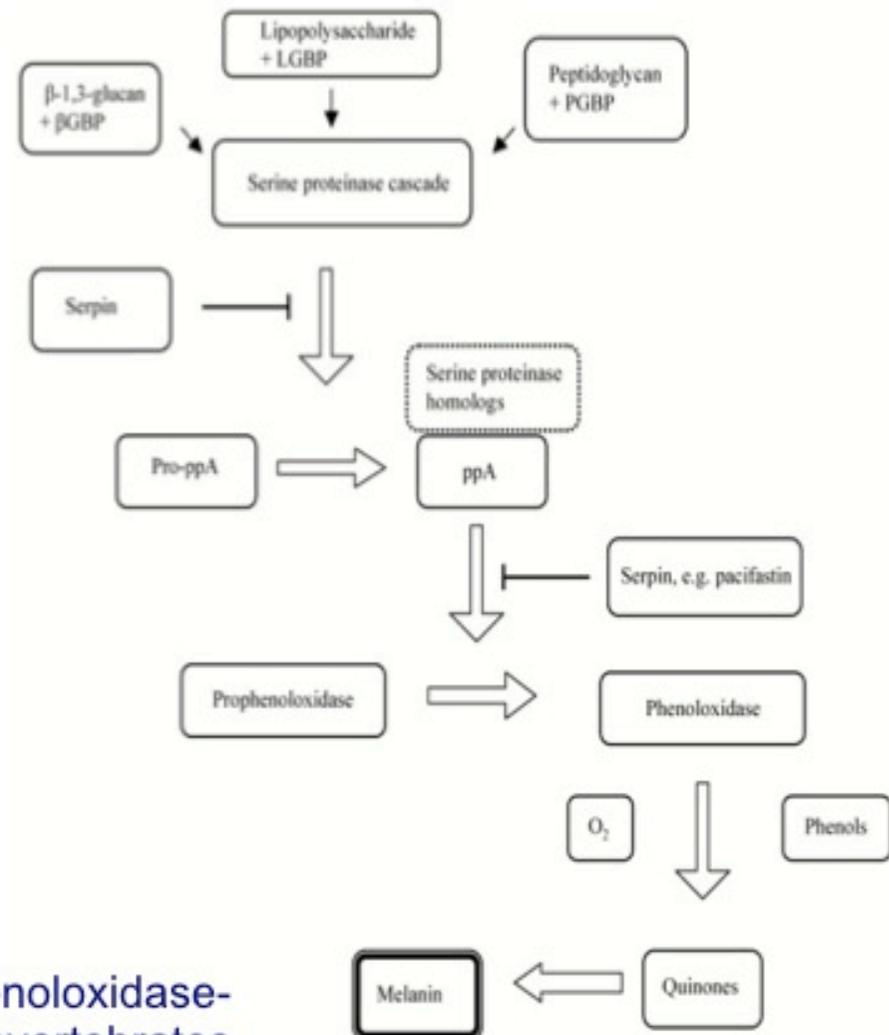
## Oenocytoïdes

→ mélanisation (libération de prophénoloxydase)

# Réponse immunitaire cellulaire

## Déclenchement de la cascade sérine protéinase (au niveau des nodules ou de façon plus diffuse)

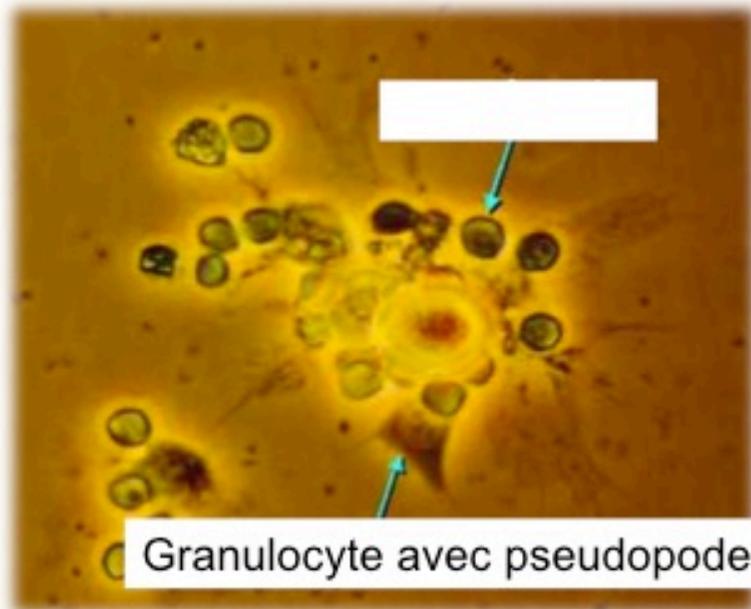
→ production finale de  
mélanine, toxique pour les  
micro-organismes



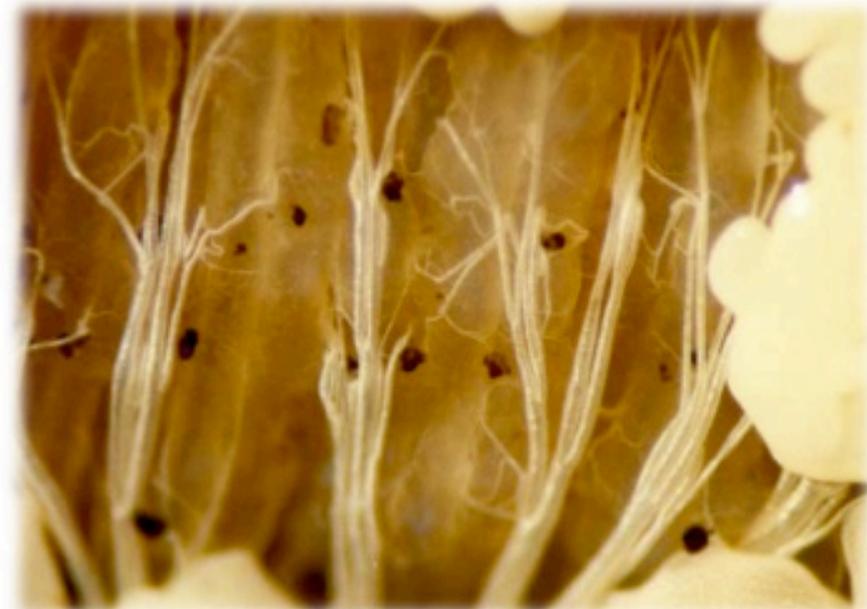
Cerenius & Söderhäll, 2004 - The prophenoloxidase-activating system in invertebrates

# Réponse immunitaire cellulaire

Microaggrégat



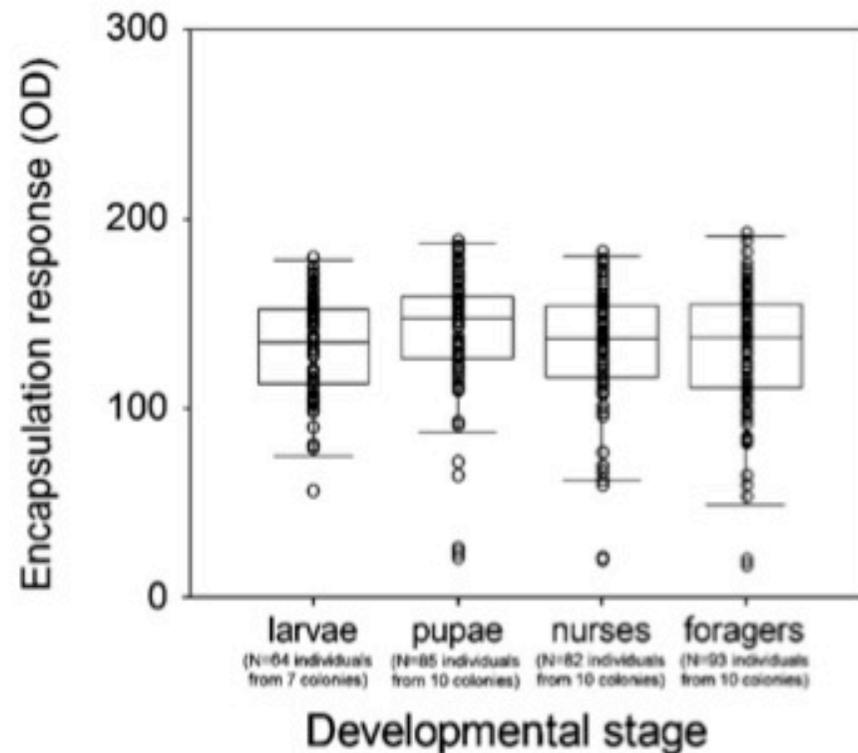
Nodules



*Drosophile*

# Variation de la réponse d'encapsulation au cours de l'ontogenèse

Aucune différence de capacité d'encapsulation selon le stade de développement



Wilson-Rich *et al.*, 2008 - The ontogeny of immunity- Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*)

## Variation de la réponse de nodulation avec l'âge

---

**Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers**

Jon C. Bedick<sup>a</sup>, Hasan Tunaz<sup>a</sup>, A.R. Nor Aliza<sup>a</sup>, Sean M. Putnam<sup>a</sup>,  
Marion D. Ellis<sup>b</sup>, David W. Stanley<sup>a,\*</sup>

Comparative Biochemistry and Physiology Part C 130 (2001) 107–117

Abeilles émergentes (< 24h) produisent davantage de nodules que des abeilles âgées (butineuses) après une même contamination bactérienne (injection) : 130 nodules par abeille contre aucun nodule...

→ Sénescence immunitaire

# Réponse immunitaire humorale tardive

---

Les facteurs humoraux « étrangers »...

... sont reconnus par des protéines hémolympiales...

... et déclenchent une défense humorale induite

→ synthèse de polypeptides antimicrobiens (PAM)

Voie d'activation Toll (peptide signal = polypeptide Spaetzle)

→ Gram + et champignons

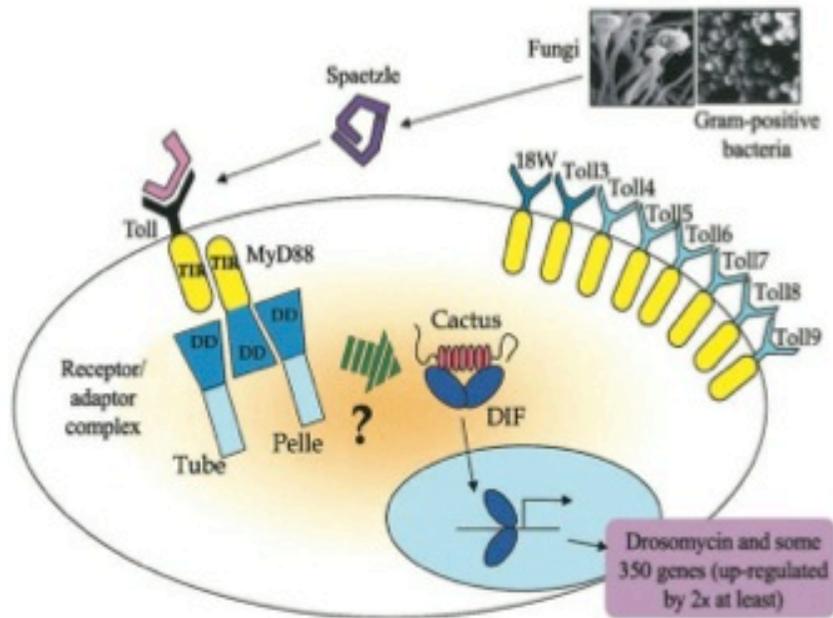
Voie d'activation Imd (Immune deficiency)

→ Gram -

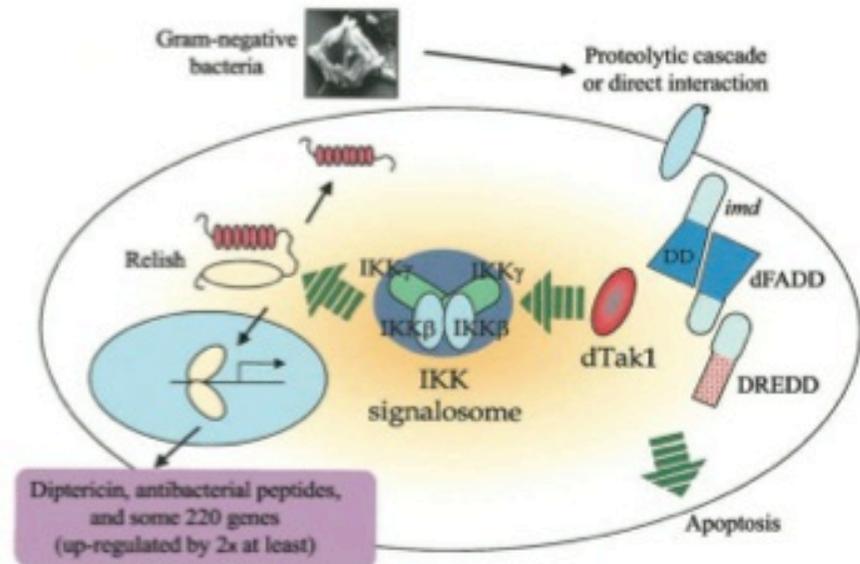
Autres voie d'activation : JAK/STAT, JNK (Lemaitre & Hoffmann, 2007)

→ réaction immunitaire humorale induite : retardée et spécifique

# Réponse immunitaire humorale



Induction de gènes immunitaires par la voie Toll, après infection fongique ou par des bactéries Gram positives.



Induction de gènes immunitaires par la voie Imd, après infection par des bactéries Gram négatives.

# Réponse immunitaire humorale

## Peptides anti-microbiens (PAM)

Peptides ou polypeptides de moins de 100 Aa

Induits par la présence de micro-organismes / blessure septique

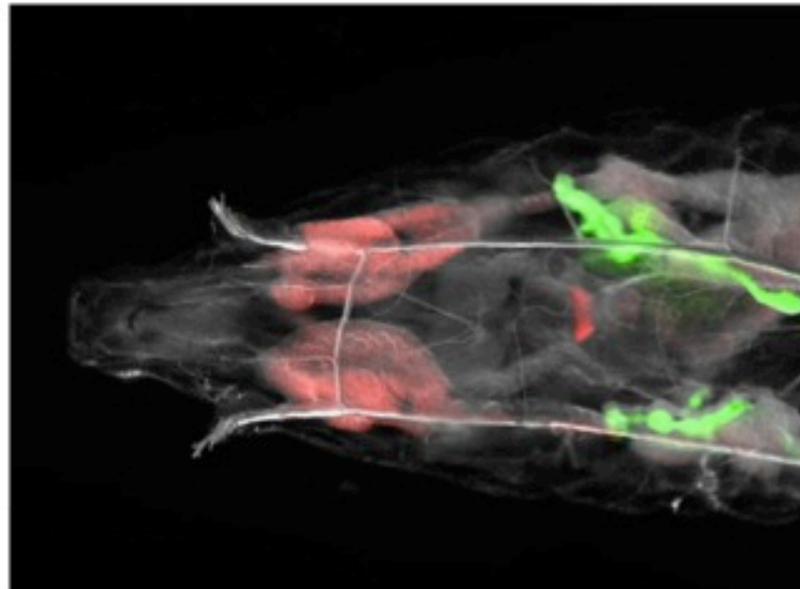
Produits par les corps gras, parfois par les cellules hémolymphales et certaines cellules épithéliales, puis secrétés dans l'hémolymphe

Généralement cationiques (+), souvent amphiphiles (pôles hydrophobe et hydrophile)

- Caractères favorisant leur insertion dans membranes microbiennes chargées négativement : modification de perméabilité membranaire
- Spectre d'activité large mais souvent préférentiel : bactéries à Gram + et -, protozoaires, champignons filamenteux, certains virus ([Tzou et al., 2002](#))
- Non cytotoxiques aux concentrations présentes dans l'hémolymphe

# Réponse immunitaire humorale

---



Infection d'une larve de drosophile par des bactéries (fluorescence verte) et déclenchement de la synthèse de peptides anti-microbiens (fluorescence rouge) dans les cellules du corps gras.  
(d'après <http://www.cnrs.fr/insb/recherche/parutions/articles08/j.royer.htm>)

# Réponse immunitaire humorale

---

## **PAM chez l'abeille**

α Hélices alpha, riches en proline

Activité surtout contre les bactéries Gram -

Destruction en plusieurs heures

α Peptides stabilisés par cystéine, à structure en hélice alpha et feuillet bêta : défensines

Forte activité contre les bactéries Gram +

Destruction en une minute

# Réponse immunitaire humorale

## ▣ Hélices alpha, riches en proline

- *Apidaecines* (Casteels *et al.*, 1989)

pm = 2 000, 18 Aa

Active contre bactéries Gram – voire Gram +  
Proapidaecine dans le dernier stade larvaire

Apidaecines (4 formes) chez l'adulte

Action rapide : induction visible 3-4 heures  
après l'infection ; pic d'apidaecines 36  
heures après l'infection

- *Abaecines* (Casteels *et al.*, 1990)

pm = 4 000, 34 Aa

Spectre anti-bactérien restreint prp  
apidaecines

Favoriserait l'action du lysozyme et des  
apidaecines

Action retardée

- *Méllittine du venin* (Fennell *et al.*, 1968)

Chez d'autres insectes, activités anti-  
protozoaire ou anti-fongiques

Activité anti-virale (Wachinger *et al.*, 1998)

## ▣ Peptides stabilisés par cystéine, à structure en hélice alpha et feuillet bêta : défensines

- *Hymenoptaecine* (Casteels *et al.*, 2003)

pm = 10 000, 93 Aa

Active contre bactéries Gram + et -

Apparition tardive et à fort taux de bactéries  
dans l'hémolymphe

- *Royalisine* (Fujiwara *et al.*, 1990)

51 Aa, dans la gelée royale

Active contre bactéries Gram + : inhibe la  
multiplication de *P. larvae* (Bilikova *et al.*,  
2001)

- *Jelleines* (Fontana *et al.*, 2004 ; Romanelli *et al.*, 2010)

9 Aa, dans la gelée royale

Active contre bactéries Gram +, Gram – et  
levures



## Immunité individuelle - Conclusion

---

Barrières externes (intestin+++)

→ empêcher le contact avec le SI interne

Réponse immunitaire cellulaire et cascade protéolytique rapides :  
phagocytose, nodulation/encapsulation et mélanisation

→ isolement et destruction non spécifique

Induction de molécules effectrices (PAM)

→ action spécifique

Sénescence immunitaire mais renversement d'immunosénescence possible

Réponse immunitaire à spectre plus large chez les abeilles adultes que chez les larves ([Randolt \*et al.\*, 2008](#))

## Immunité individuelle - Conclusion

---

Agents infectieux en général détruits par les mécanismes de défense de l'abeille

→ individus survivent à l'infection

Si agents atteignent la cavité corporelle (par échappement au contrôle immunitaire ou par destruction active des mécanismes de l'immunité)

→ développement, multiplication dans l'hémolymphe, maladie voire mort

Efficacité des mécanismes de défense individuels en lien avec l'eusocialité des abeilles (*Stow et al., 2007*)

Immunité sociale

# Immunité sociale

---

## Comportement face à la maladie

### **Augmentation de température**

Comportement hygiénique

## Prévention des maladies

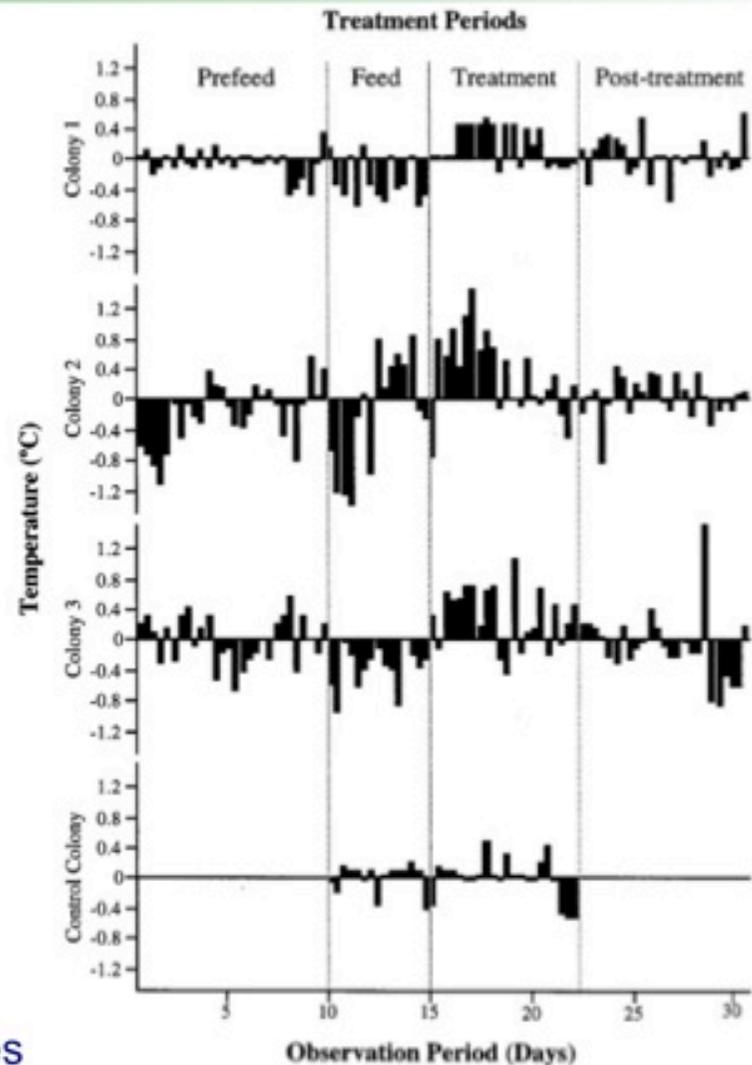
Nettoyage de la ruche et « propreté » des abeilles

Butinage de la propolis et autres facteurs anti-microbiens

Sélection naturelle

# Augmentation de température

« Fièvre » du couvain lors d'infection par *Ascosphaera apis* (mycose)  
Augmentation de température dans le nid à couvain après inoculation



Starks *et al.*, 2000 - Fever in honeybee colonies

# Augmentation de température

« Fièvre » autour de *Vespa velutina* :  
jusqu'à 45 °C en 5 minutes chez *A. cerana* !

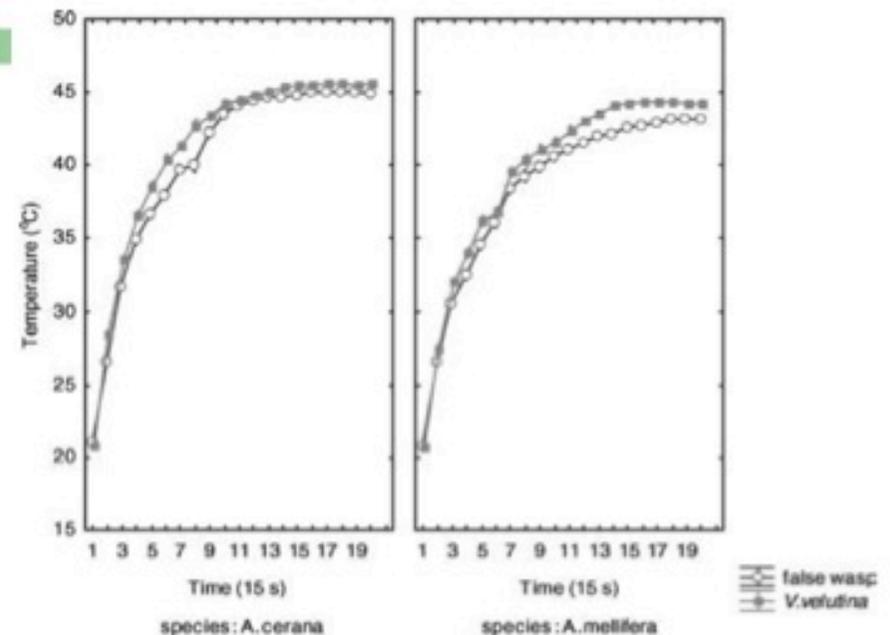
Ken *et al.*, 2005 - Heat-balling wasps by honeybees

« Fièvre » autour de *Vespa simillina xanthoptera* par *Apis cerana japonica* :  
jusqu'à plus de 46°C pendant 20  
minutes !

Ono *et al.*, 1987 - Heat production by bailing in the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* as a defensive behavior against the hornet, *Vespa simillima xanthoptera*

Effet majeur : l'étouffement du prédateur (asphyxie)

Papachristoforou *et al.*, 2007 - Smothered to death- Hornets asphyxiated by honeybees



# Immunité sociale

---

## Comportement face à la maladie

Augmentation de température

## **Comportement hygiénique**

## Prévention des maladies

Nettoyage de la ruche et « propreté » des abeilles

Butinage de la propolis et autres facteurs anti-microbiens

Sélection naturelle

# Comportement hygiénique

Coopération d'individus pour limiter l'extension de la contagion à d'autres individus : apprentissage, mémoire, transmission de l'information

Se décompose en : (*in Park, 1936 ; 1937*)

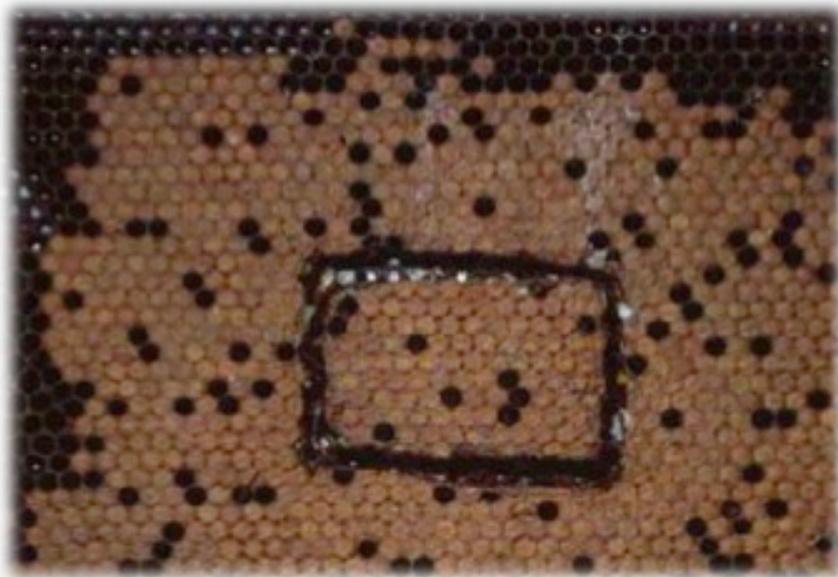
- détection rapide de l'individu malade ou mort par les abeilles ouvrières,
- élimination de l'individu contaminé ou parasité,
- nettoyage minutieux de la cellule concernée.

Repris par *Rothenbuhler* et *Spivak*

- Résistance à la LA (*Rothenbuhler, 1964 ; Spivak & Gilliam, 1998 ; Spivak & Reuter, 2001a*)
- Diminution d'infestation par *Varroa destructor* (*Spivak, 1996 ; Spivak & Reuter, 2001b*)
- Aide au contrôle de la mycose (*A. apis*) (*Gilliam & Taber, 1983*)

# Comportement hygiénique

Test du couvain congelé (Spivak & Reuter, 2005) : sélection d'abeilles résistantes  
→ diminution de l'utilisation d'antibiotiques et de pesticides



# Comportement hygiénique

---

Comportement inné, d'origine génétique

Gène récessif (*in Rothenbuhler, 1964*) → la reine et la majorité des mâles doivent porter le gène pour que le comportement s'exprime dans la colonie

Expression complexe, sous la dépendance de plusieurs gènes (*Lapidge et al., 2002 ; Oxley et al., 2010*)

Phénologiquement se traduit par un seuil de discrimination olfactive plus bas (*Masterman et al., 2000*)

Source de contagion potentielle : augmentation de l'exposition aux agents et facilitation de l'émergence des maladies (*Fefferman et al., 2007*)

→ comportement apparaît en fonction

- quantitativement du nombre d'individus contagieux
- qualitativement de l'organisme pathogène (pathogénicité, virulence)

# Immunité sociale

---

Comportement face à la maladie

Augmentation de température

Comportement hygiénique

Prévention des maladies

**Nettoyage de la ruche et « propreté » des abeilles**

Butinage de la propolis et autres facteurs anti-microbiens

Sélection naturelle

# Nettoyage de la ruche et « propreté » des abeilles

---

Nettoyage permanent des cavités internes de la ruche et stérilisation des surfaces

Evacuation des larves momifiées à l'extérieur de la ruche

Nettoyage précautionneux du corps des abeilles (elle-même et entre elles)

ex : retrait des *Varroa* chez *A. cerana*

Si nettoyage insuffisant : re-contamination par contact (soies), alimentation du couvain ou trophallaxie

# Immunité sociale

---

Comportement face à la maladie

Augmentation de température

Comportement hygiénique

Prévention des maladies

Nettoyage de la ruche et « propreté » des abeilles

**Butinage de la propolis et autres facteurs anti-microbiens**

Sélection naturelle

# Butinage de la propolis

## Propolis

Composé du système immunitaire des plantes

Mélange très complexe de

résines et baumes – cire (50 à 55 %),

pollen (30 à 40 %),

huiles essentielles (5 %),

composés volatils (5 à 10 %),

acides organiques, flavonoïdes, vitamines, oligo-éléments, etc ...



Fort pouvoir anti-microbien (bactéries, fungi, virus) par flavonoïdes, acides aromatiques et esters (Greenaway *et al.*, 1990 ; Marcucci, 1995 ; Christe *et al.*, 2003 ; Muli & Maingi, 2007)

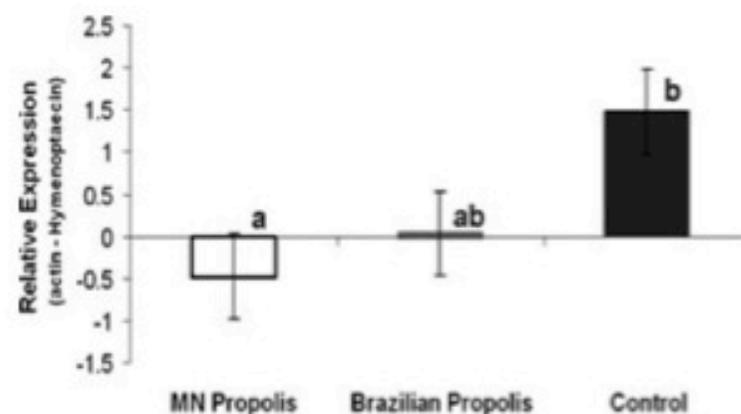
e.g. LA (Antunez *et al.*, 2008)

## Butinage de la propolis

- Formation d'une enveloppe anti-microbienne autour de la colonie (autour de l'entrée, sur les surfaces internes de la ruche, sur les cadres et pour combler les crevasses)
- Diminution de l'investissement immunitaire nécessaire à la lutte contre les agents

Simone *et al.*, 2009 - Resin collection and social immunity in honey bees

MN : Minnesota



- En sélectionnant des souches peu propolisantes, on a peut-être limiter les chances de lutter contre les pathogènes !

## Autres facteurs anti-microbiens

---

**Miel, (nectar), (pollen), (gelée royale)** : activité anti-microbienne (Molan, 1992)

Acidité

Forte pression osmotique

Production et accumulation de peroxyde d'hydrogène provenant de l'activité de GOX (White & Subers, 1963; White *et al.*, 1963)

→ Inhibition ou retardement du développement de bactéries et champignons saprophytes (Taormina *et al.*, 2001; *in* Brudzynski, 2006) dans les réserves stockées (*Ascosphaera apis*)

→ Destruction de certains micro-organismes pathogènes (*in* Burgett, 1978)

→ Stérilisation de l'alimentation larvaire et des réserves alimentaires de la colonie

# Immunité sociale

---

Comportement face à la maladie

Augmentation de température

Comportement hygiénique

Prévention des maladies

Nettoyage de la ruche et « propreté » des abeilles

Butinage de la propolis et autres facteurs anti-microbiens

**Sélection naturelle**

## Sélection naturelle

---

Transfert de traits immunitaires (*Traniello et al.*, 2002 ; *Sadd et al.*, 2005)

e.g. activité de phénoloxidase, comportement hygiénique

Variations génétiques importantes en termes de réponse immunitaire d'une colonie à l'autre (*Evans & Pettis*, 2005)

Prise de risque accrue par les individus déjà infectés (*Schmid-Hempel*, 2005)

## Immunité de l'Abeille - conclusion

---

Colonie = super-organisme complexe

Défenses physiques, chimiques et comportementales à différents niveaux (individuel et sociétal)

→ Système immunitaire robuste mais certaines failles...  
e.g. nouveaux agresseurs et actions combinées d'agents

Rôle de la reine et des faux-bourçons dans les défenses

Rôle dans la transmission verticale de la résistance ou de la sensibilité

Rôle particulier sur le plan sociétal ?

Comment permettre l'expression entière du potentiel génétique ?

Vivre sans microbes ou être continuellement en contact avec les germes pas ou peu pathogènes?

Limite = coup métabolique élevé

# Immunité - synthèse

Cellules hémolymphales (hémocytes)

Réponse cellulaire

Enzymes circulantes

- Lysozyme (LYS)
- Glucose-oxydase (GOX)
- Phénoloxidase (PO)

innée

Peptides anti-microbiens

- Apidaecines
- Abaecines
- Hymenoptaecines  
(∈ défensines)

induite

Réponse humorale

Merci de votre attention



# Immunité - synthèse

Cellules hémolymphales (hémocytes)

Réponse cellulaire

Enzymes circulantes

- Lysozyme (LYS)
- Glucose-oxydase (GOX)
- Phénoloxidase (PO)

innée

Peptides anti-microbiens

- Apidaecines
- Abaecines
- Hymenoptaecines  
(∈ défensines)

induite

Réponse humorale

Agents infectieux / infestants :

état des lieux

# *Varroa destructor*

Acarien ectoparasite térébrant, initialement d'*A. ceranae*

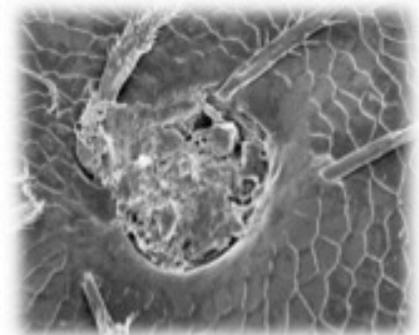
Facteur favorisant (blessures) : agents de loques (LE Kanbar & Engels 2003), infections fongiques

→ réaction locale de défense

Vecteur mécanique de virus (ABPV, DWV, KBV, SBV) (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004 ; Brødsgaard *et al.*, 2000 ; Tentcheva *et al.*, 2004a., 2006 ; Chen *et al.*, 2006 ; Shen *et al.*, 2005a ; Santillán-Galicia *et al.*, 2010)

Réplicateur de virus (DWV, KBV) (Bowen-Walker *et al.*, 1999 ; Ongus *et al.*, 2004 ; Tentcheva *et al.*, 2004b ; Yue & Genersch, 2005 ; Gisder *et al.*, 2009 ; Shen *et al.*, 2005b)

*Varroa destructor* = agent immunosuppresseur favorisant l'action d'autres agents (virus) (Gregory *et al.*, 2005; Yang & Cox-Foster, 2005)



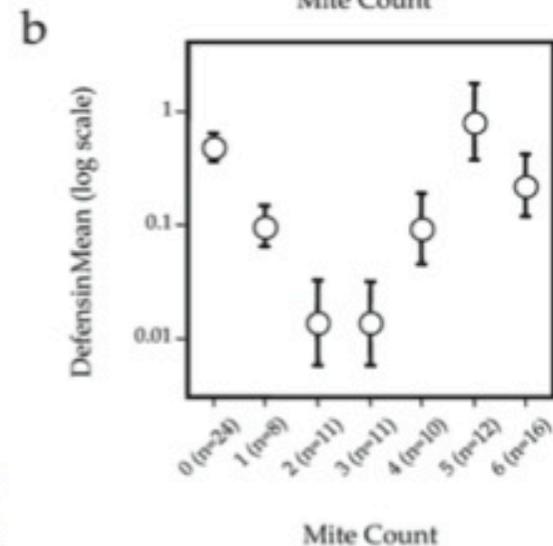
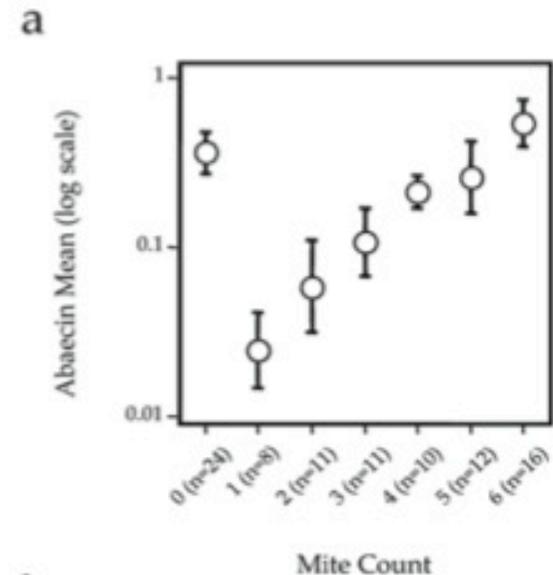
# Varroa destructor

## Défensine et abaecine

Pupes infestées par 1-4 *Varroa* (adultes/immatures) : niveaux d'expression plus bas que pupes non infestées ou fort infestées (5-6 *Varroa*)

→ Inhibition de la RI par infestation modérée de *Varroa*

→ *V. destructor* = agent immunosuppresseur



Gregory *et al.*, 2005 - Conditional immune-gene suppression of honey- bees parasitized by *Varroa* mites

# Varroa destructor

DW = Mite-Infested and Deformed-Wing  
NW = Mite-Infested and Normal-Wing  
MF = Mite-Free

## Hymenoptaecine

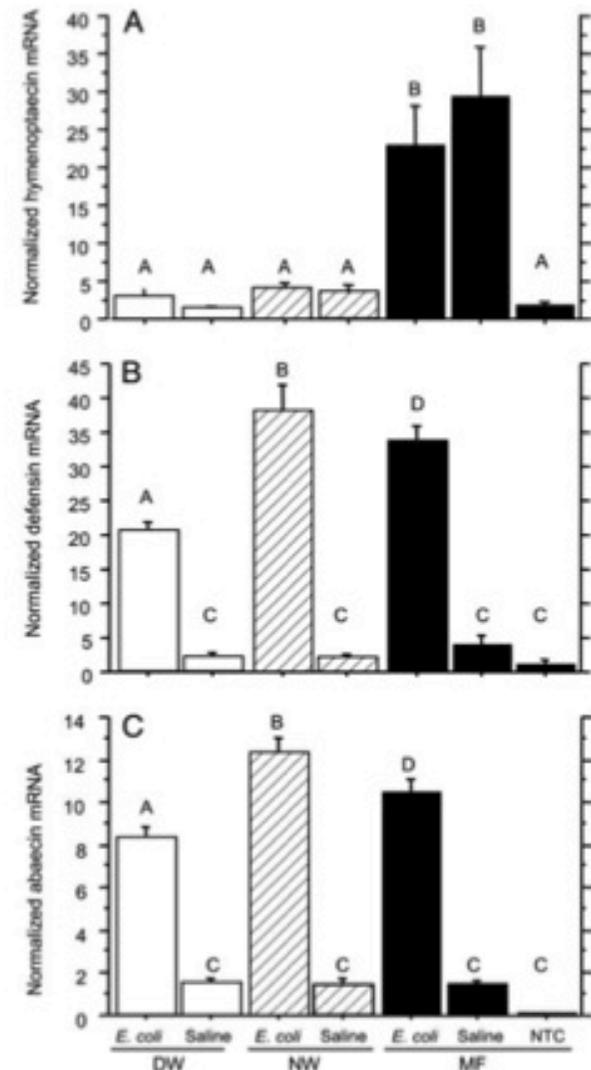
Niveau d'expression plus bas chez les abeilles infestées par *Varroa*

## Défensine et abaecine

Niveau d'expression plus bas chez les abeilles infestées par *Varroa* et aux ailes déformées

→ Diminution de l'expression de protéines anti-microbiennes par *Varroa*

Yang & Cox-Foster, 2005 - Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate - evidence for host immunosuppression and viral amplification



# Varroa destructor

DW = Mite-Infested and Deformed-Wing  
NW = Mite-Infested and Normal-Wing  
MF = Mite-Free

## GOX

Diminution d'expression quand infestation par *Varroa*

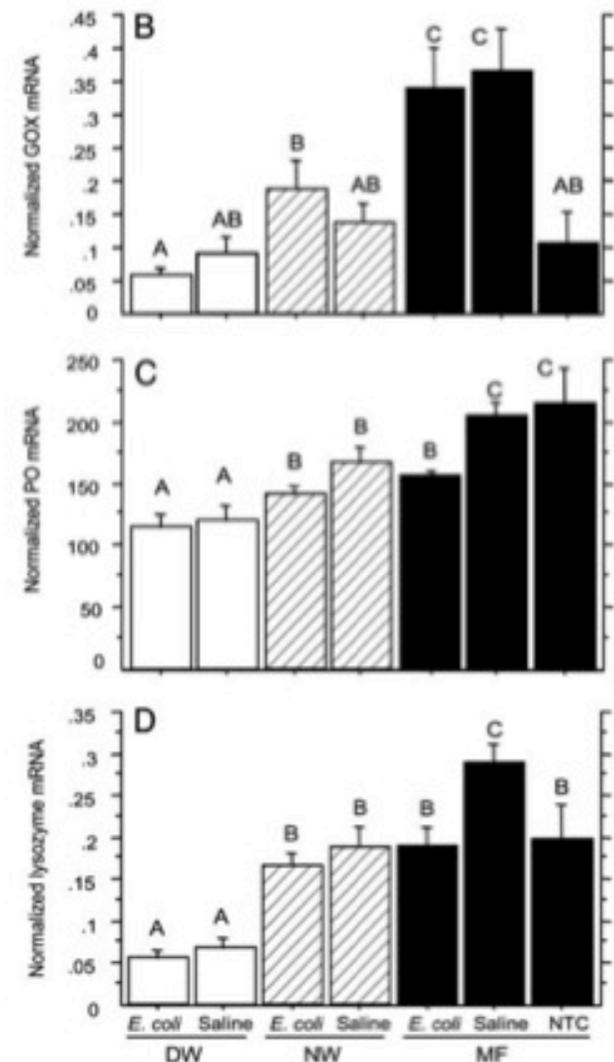
## PO, LYS

Niveau d'expression plus bas chez les abeilles infestées par *Varroa* et aux ailes déformées

→ Diminution de l'expression des gènes immuns par *Varroa*

→ *V. destructor* = agent immunosuppresseur

Yang & Cox-Foster, 2005 - Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate - evidence for host immunosuppression and viral amplification



## *Nosema* spp.

---

Parasites opportunistes intracellulaires obligatoires formant des spores  
(*Microsporidia*)

*Nosema apis* : connu depuis plusieurs dizaines d'années

*Nosema ceranae* : connu depuis 2006 (Higes *et al.*, 2006 – PCR)

→ Incertitude sur l'identité du *Nosema* identifié avant 2006

*N. ceranae*

Plus prévalent et virulent que *N. apis* (Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007)

Résistant à une gamme plus large de températures (Martín-Hernández *et al.*, 2009)

*Apocephalus borealis* : agent vectoriel ou réservoir ? (Core *et al.*, 2012)

## *Nosema* spp.

---

### Facteurs de stress importants

Conditions climatiques

Pollution chimique (insecticides)

Infections concomitantes : amibiase, BQCV

Génétique : certaines souches ou races d'abeilles plus sensibles ?

Conditions d'élevage : hivernage sur miellat

*Nosema* spp. diminue l'efficacité du traitement contre *Varroa* (troubles comportementaux) (Botias *et al.*, 2011)

Action sur la fonction immunitaire (Antunez *et al.*, 2009 )

# Nosema spp.

## Abaecine

Augmentation à 4 jours (*N. apis*)  
Diminution à 7 jours (*N. ceranae*)

## Défensine

Augmentation à 4 et 7 jours (*N. apis*)  
Aucune modification (*N. ceranae*)

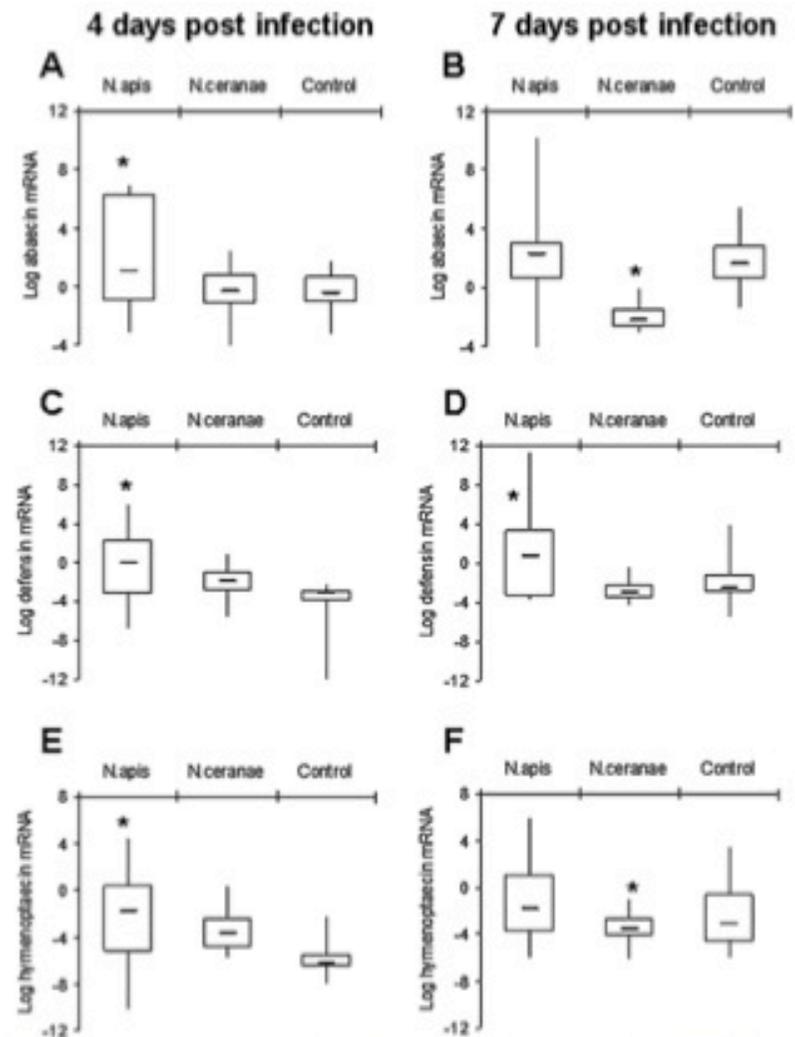
## Hymenoptaecine

Augmentation à 4 jours (*N. apis*)  
Diminution à 7 jours (*N. ceranae*)

## Expression génique de PO

Augmentation à 7 jours (*N. apis*)  
Aucune modification (*N. ceranae*)

- Activation du SI par *N. apis*
- Suppression de la RI par *N. ceranae*
- *N. ceranae* : agent immunosuppresseur, favorisant l'action d'autres agents (virus à l'état latent, pesticides,...)



Antunez *et al*, 2009 - Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*)

# Loques

---

## **Loque américaine (à *Paenibacillus larvae*)**

Concentration en spores nécessaire à l'émergence de la maladie est variable d'une colonie à l'autre (de Graaf *et al.*, 2001 ; Genersch *et al.*, 2005 ; Ashiralieva & Genersch, 2006)

Maladie peut apparaître plus de 3 ans après la contamination (von der Ohe, 2003)

Sensibilité à l'infection variable : larves > adultes

Larves : facteur antimicrobien de l'alimentation

Adultes : valve proventriculaire, substances inhibitrices de spores dans l'intestin, barrière intestinale complète

*Varroa destructor* = agent inducteur ? (Gliński & Jarosz, 1992)

Production de protéases inhibitrices des PAM (Jarosz & Glinsky, 1990)

# Loques

---

## **Loque européenne** (à *Melissococcus plutonius*)

Facteurs de stress : importance majeure (carences en protéines ++)  
(Albisetti & Brizard, 1982)

*Varroa destructor* : agent favorisant par blessure ? (Kanbar & Engels, 2003)

# Virus

## Parasites intracellulaires obligatoires

Au moins 14 virus connus chez *A. mellifera* : « apivirus »

ABPV (Acute Bee Paralysis Virus)

BQCV (Black Queen Cell Virus)

CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus)

CWV (Cloudy Wing Virus)

DWV (Deformed Wing Virus)

IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus)

KBV (Kashmir Bee Virus)

KV (Kakugo Virus)

SBV (Sacbrood Bee Virus)

SPV (Slow Paralysis Virus)

BVX (Bee Virus X)

BVY (Bee Virus Y)

FV (Filamentous virus)

VdV-1 (Varroa destructor Virus 1)

Infections virales multiples fréquentes chez l'Abeille : co-infections doubles voire triples ou quadruples (Anderson & Gibbs , 1988 ; Hung *et al.*, 1996 ; Nordström *et al.*, 1999 ; Benjeddou *et al.*, 2001 ; Evans, 2001 ; Chen *et al.*, 2004b ; Tentcheva *et al.*, 2004a ; Shen *et al.*, 2005b ; Topley *et al.*, 2005 ; Berényi *et al.*, 2006 ; Ongus, 2006 ; Nielsen *et al.*, 2008)

# Virus

---

Transmission vectorielle par *Varroa destructor* : ABPV, DWV, KBV et SBV (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004 ; Brødsgaard *et al.*, 2000 ; Tentcheva *et al.*, 2004a,, 2006 ; Chen *et al.*, 2006 ; Shen *et al.*, 2005a ; Santillán-Galicia *et al.*, 2010)

Réplication virale chez *Varroa* : DWV, KBV (Bowen-Walker *et al.*, 1999 ; Ongus *et al.*, 2004 ; Tentcheva *et al.*, 2004b ; Yue & Genersch, 2005 ; Gisder *et al.*, 2009 ; Shen *et al.*, 2005b)

*Varroa destructor* : agent immunosuppresseur favorisant l'action de virus (Gregory *et al.*, 2005; Yang & Cox-Foster, 2005)

→ Les liens entre les abeilles, *Varroa destructor* et les virus sont très complexes et encore ni expliqués ni compris...

# Virus

---

Autres agents vectoriels ou favorisant ou réservoirs :

*Nosema* spp. (ABPV, CBPV, BQCV) (Allen & Ball., 1996 ; Bakonyi, *et al.*, 2002b ; Otteni *et al.*, 2004 ; Topley *et al.*, 2005 ; Higes *et al.*, 2007 ; Ribière *et al.*, 2007 ; Faucon *et al.*, 2010)

*Aethina tumida* (DWV et SBV) (Eyer *et al.*, 2009a,b)

*Tropilaelaps mercedesae* (DWV) (Forsgren *et al.*, 2009)

*Apocephalus borealis* (DWV) (Core *et al.*, 2012)

Transmission par voie horizontale (voie orale *via* alimentation, fèces, cadavres ; contact) et par voie verticale pour beaucoup

→ Propagation rapide dans la colonie : forte pression d'infection

# Virus

---

Infection latente, déclenchement de la maladie à la faveur de facteurs favorisants ([Highfield \*et al.\*, 2009](#))

Pathogénie connue pour CBPV et SBV mais encore floue pour les autres virus

Mécanisme de résistance possible à IAPV par intégration naturelle des séquences virales dans les génomes de l'hôte ([Gundersen-Rindal & Lynn, 2003](#) ; [Crochu \*et al.\*, 2004](#) ; [Doucet \*et al.\*, 2007](#) ; [Maori \*et al.\*, 2007b](#))

→ Encore beaucoup de travail dans le domaine viral...

# Synergies

---

Synergie médicamenteuse = interaction de deux ou plusieurs médicaments utilisés dans le traitement de la même pathologie, et dont l'effet thérapeutique est égal ou supérieur aux effets additionnés de chacun d'eux pris isolément.

Utilisation dans le cadre de la lutte anti-parasitaire intégrée (IPM)

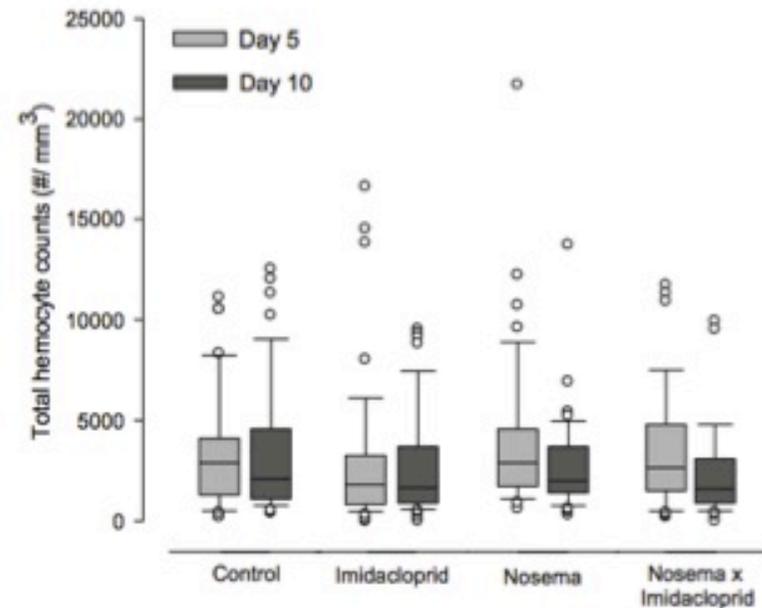
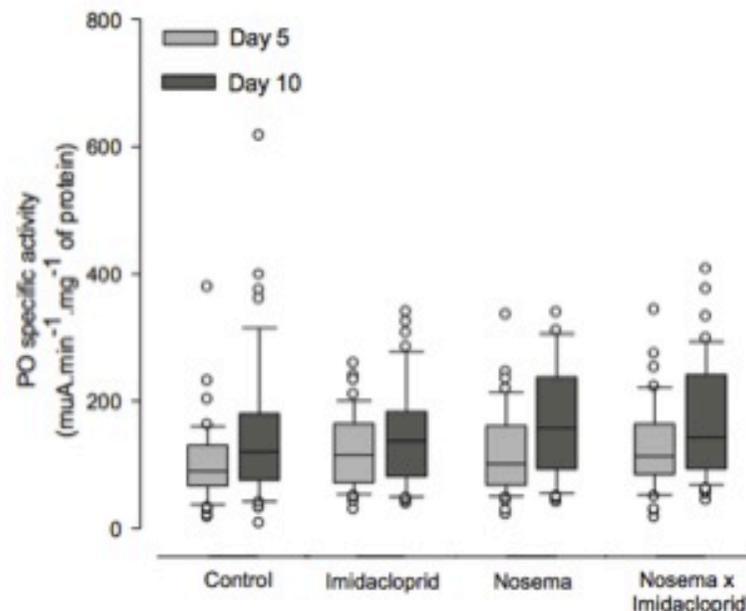
Pesticides – Champignons ([Purwar & Sachan, 2006](#))

De plus en plus mises en évidence (de plus en plus étudiée)

# Synergies

## Nombre total d'hémocytes

Aucune modification après infection par *Nosema* ou exposition à une dose subléthale d'Imidaclopride



## Activité de PO

Aucune modification

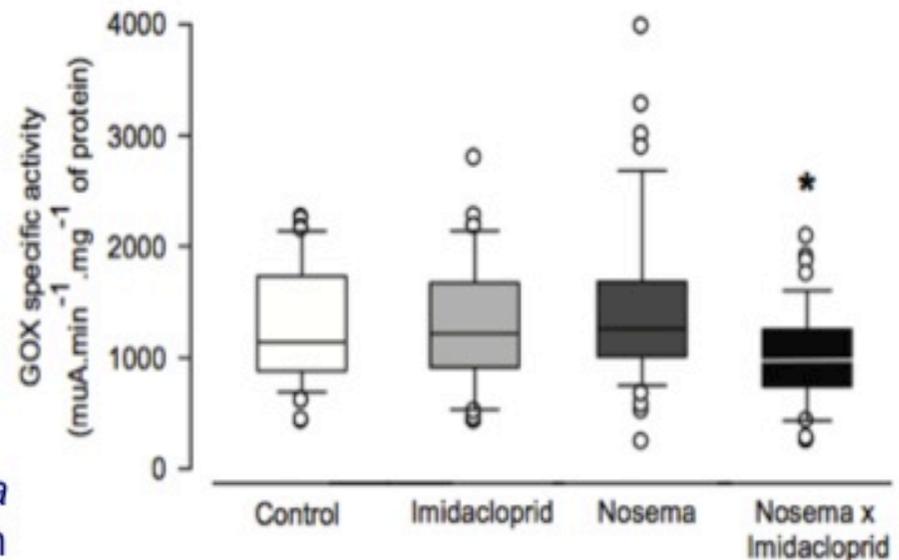
Alaux *et al.*, 2009 - Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*)

# Synergies

## Activité de GOX

Diminution après infection par *Nosema* et exposition à une dose subléthale d'Imidaclopride

Alaux *et al.*, 2009 - Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*)



## Mortalité

Augmentation après infection par *Nosema* et exposition à une dose subléthale d'Imidaclopride

→ Effet synergique de *Nosema* et Imidaclopride

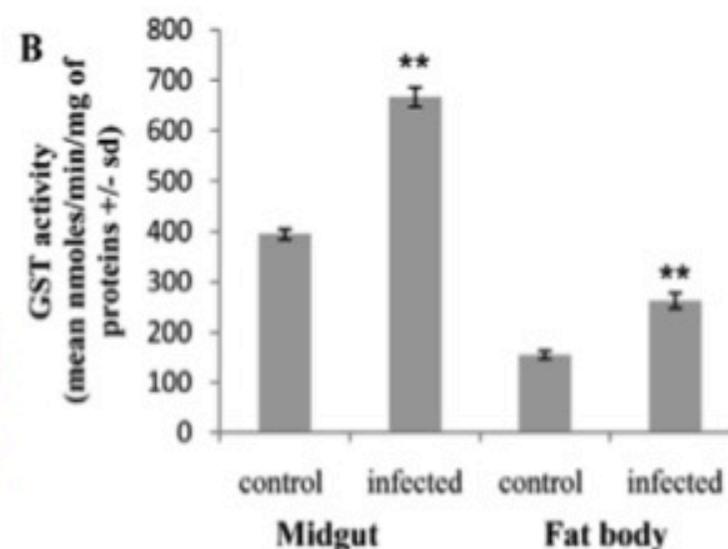
# Synergies

## Activité d'enzymes de détoxification (7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) et Glutathione-S-Transferase (GST))

Aucune modification de l'activité de ECOD après infection par *N. ceranae*

Diminution de l'activité de GST

Vidau *et al.*, 2011 - Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*



## Mortalité

Augmentation après infection par *N. ceranae* et exposition à des doses subléthales de Fipronil et Thiaclopride

→ Effet synergique de *N. ceranae*, Fipronil et Thiaclopride

# Synergies

---

Mécanisme(s) des synergies toujours non connu(s)

Immunodépression

Perturbation du système de désintoxication

Influence d'agents chimiques sur la virulence d'agents biologiques

→ Renforce l'idée d'une étiologie multifactorielle des pertes de colonies

Approche  
diagnostique,  
thérapeutique  
et prophylactique

# Approche diagnostique, thérapeutique et préventive

---

## Diagnostic

Suspicion : signes cliniques, tests simples de terrain

Certitude : tests diagnostics de laboratoire

## Traitement / Prophylaxie

Ciblé

Efficace

Sûr

→ Diagnostic précis, traitement efficace, prophylaxie adaptée

# Approche diagnostique

---

Suspicion : signes cliniques, tests simples de terrain (allumette, ELISA)

- Identifier les signes cliniques
- Détecter les facteurs favorisants

Certitude : tests diagnostics de laboratoire

- Seuils de tolérance / pathogénicité ?
- Synergies

→ Manque de données sur la pathogénie des agents : présence  $\neq$  maladie

→ Action combinée des agents (synergies)

→ Méthodes indirectes : marqueurs (Brunet *et al.*, 2011)

# Approche thérapeutique et prophylactique

---

Traitement : manque de traitements adaptés, sûrs, harmonisés

- Varroose, Nosémose
- Loques : utilisation de PAM...
- Virus : utilisation de techniques RNAi... 

Prophylaxie : à améliorer pour limiter / éviter le traitement

- Gestion des facteurs favorisants 
- Renforcement de la sélection naturelle
- Sélection de souches hygiéniques ([Wilkes & Oldroyd, 2002](#))
- Renforcement du SI de l'abeille (vaccins ?) 

# Technologie RNAi

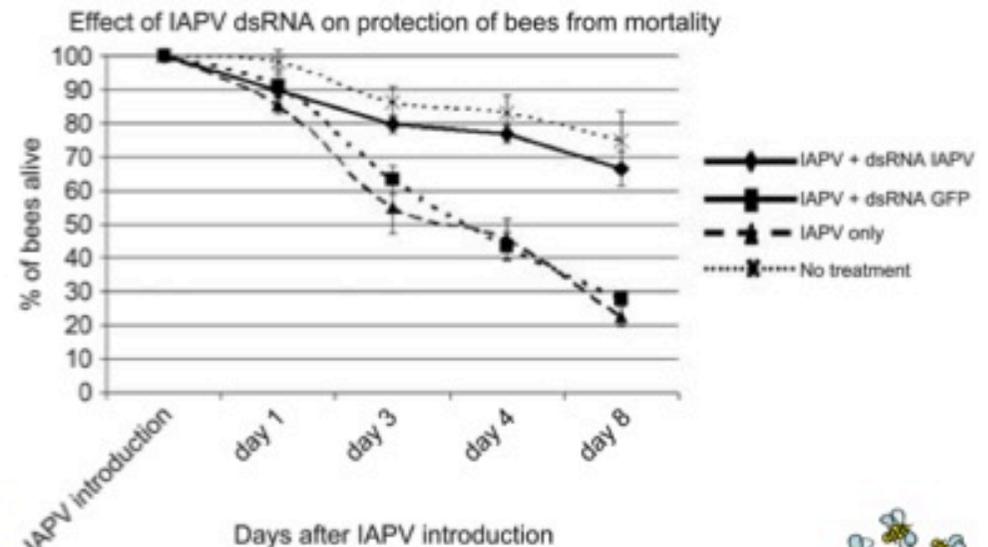
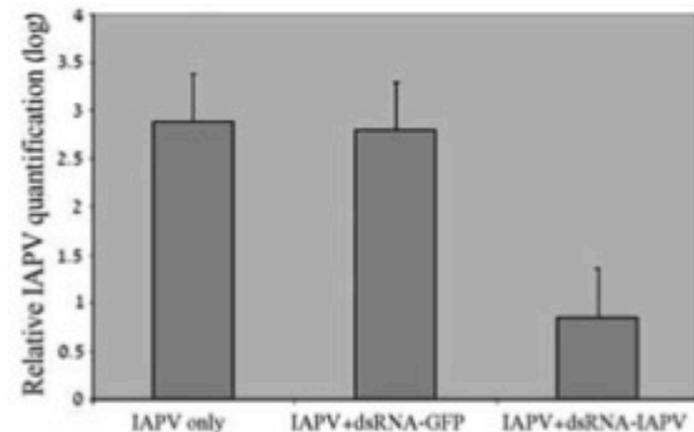
Diminution des titres viraux  
d'IAPV quatre jours après  
traitement avec un IAPV-  
dsRNA

Associée à une dégradation  
de l'ARN viral

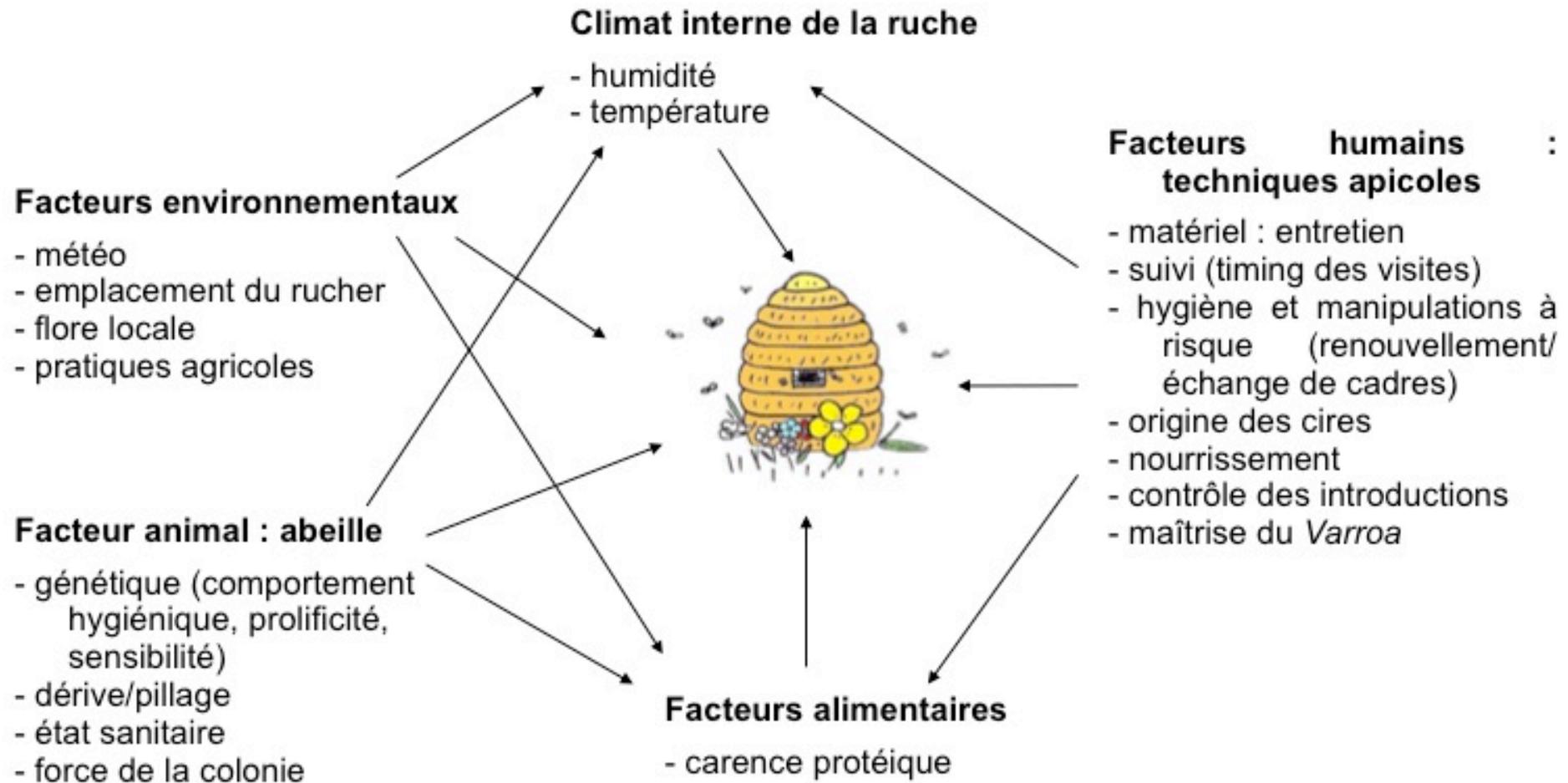
Diminution de la mortalité  
des abeilles infectées par  
IAPV après traitement  
avec un IAPV-dsRNA

→ laisse espérer une méthode de  
lutte contre les infections virales

Maori *et al.*, 2009 - IAPV, a bee-affecting virus  
associated with Colony Collapse Disorder can  
be silenced by dsRNA ingestion



# Facteurs favorisants



# Vaccins

---

**ADN-vaccin** (Heidelberg-based Institute for Molecular Vaccines)

Nouvelle génération de vaccins : structure circulaire plasmide  
ingérée par l'abeille et par *Varroa* via l'hémolymphe

Renforce le système immunitaire de l'abeille pour lutter contre  
*Varroa* (stimulus clé) ou code pour une substance toxique  
spécifique de l'acarien

**Apivax** (<http://www.bestbees.com/apivax/>)



Vaccin anti-fongique en cours de recherche (Best Bees Company)

Merci de votre attention

