

Mille milliards de mille microbes !

Janine KIEVITS

Des moyens de détection de plus en plus sophistiqués permettent aux scientifiques de mieux cerner la flore microbienne qui peuple nos ruches. Virus, bactéries et autres microsporidies se révèlent toujours plus nombreux et variés. Tous pathogènes? Il s'en faut de beaucoup ! Le lien entre un germe et une maladie mérite d'être évalué avec beaucoup d'attention...



Comme bien d'autres domaines de la science, la microbiologie s'est d'abord construite pas à pas. Dès le XVII^e siècle, la mise au point du microscope permet de découvrir les bactéries. Au XIX^e, les travaux de Louis Pasteur d'abord, de Robert Koch ensuite, démontrent le lien existant entre certaines d'entre elles et des maladies redoutables telles l'anthrax et la tuberculose. Le même Pasteur découvre aussi d'autres agents infectieux, capables de passer à travers les filtres les plus fins et invisibles aux microscopes que l'on possède à l'époque : les virus. Ceux de la rage, de la fièvre aphteuse, de la polio sont successivement mis en évidence à la charnière des XIX^e et XX^e siècle. Le savoir ainsi acquis fait progresser considérablement la pathologie et surtout l'hygiène, en permettant de comprendre les mécanismes élémentaires de la transmission par contagion. Au cours des décennies qui suivent, la découverte des mécanismes anticorps-antigène ainsi que le développement de méthodes de plus en plus sophistiquées de culture de germes et de colorimétrie débouchent sur la détection et l'identification d'un nombre toujours croissant de microorganismes, qui se révèlent omniprésents, aussi bien à l'intérieur même des organismes pluricellulaires (nous-mêmes, nos ruches, nos abeilles...) que dans leur environnement. Enfin, ces vingt dernières années, ce n'est plus pas à pas, c'est coudes au corps que le savoir a progressé, grâce à la mise au point de techniques fondées sur la connaissance du génome¹.

Si tous les germes ne disposent pas d'un métabolisme - les virus utilisent le métabolisme de leurs cellules hôtes pour mul-

tiplier leur ADN ou ARN²- tous disposent d'un génome, et le décryptage de ce dernier permet de connaître les séquences d'acides nucléiques qui en sont caractéristiques, qui en constituent en quelque sorte la signature. Ces connaissances nouvelles viennent accroître considérablement les moyens de détection et d'identification des germes, notamment grâce à l'avènement d'une nouvelle technique qu'on désigne habituellement par son acronyme anglais, la PCR (encadré).

Désormais la présence de virus, bactéries ou microsporidies peut être mise en évidence même si ceux-ci sont très peu nombreux; désormais des espèces très voisines mais différentes peuvent être discriminées alors qu'elles paraissaient identiques en microscopie ou par les techniques de coloration ordinaires. Les apiculteurs en savent quelque chose : depuis que les abeilles accusent, dans le monde entier, des mortalités anormales, de nouveaux pathogènes font régulièrement l'objet d'articles de la presse quotidienne aussi bien que de revues apicoles. *Nosema apis* se découvre un petit frère, *Nosema ceranae*; le virus de la paralysie aiguë fait de même avec l'IAPV (Israeli acute paralysis virus)...

Mais tout aussi régulièrement, le soufflé retombe. On sait aujourd'hui, de travaux scientifiques divers, que *Nosema ceranae* est un hôte de notre *Apis mellifera* depuis des décennies déjà : cette microsporidie a été identifiée chez les abeilles de l'île d'Ouessant, pourtant coupées des populations continentales depuis 1980 au moins³; récemment, des chercheurs uruguayens ont montré sa présence dans un échantillon d'abeilles datant de 1950⁴.

¹ Le génome est l'ensemble du patrimoine génétique d'un individu ou d'une espèce. Il est contenu dans l'ADN (l'ARN chez certains virus)

² L'ADN, ou acide désoxyribonucléique, est une molécule qui contient sous forme d'un code la « formule » de toutes les protéines qui composent l'individu ; il est « lu » par une molécule de forme complémentaire qui vient s'y moulurer : l'ARN ou acide ribonucléique, sur lequel les acides aminés, constituants des protéines, viennent se greffer dans l'ordre défini par le code. Chez certains virus il n'y a pas d'ADN, le patrimoine génétique est porté directement par l'ARN. ARN et ADN sont tous deux des acides nucléiques, appelés ainsi car on les trouve dans les noyaux des cellules.

³ Voir Abeilles & Cie n°122, janvier-février 2008 p. 25



Pathogène, le DWV ?

Le « Deformed wings virus » ou virus des ailes déformées est très répandu dans les ruchers, surtout depuis l'arrivée de *Varroa* qui en est un vecteur majeur. Des recherches menées au laboratoire SupAgro de Montpellier et présentées par L. Gauthier à la première journée scientifique apicole de la FNOSAD¹³, il apparaît que le virus est surtout présent dans l'épithélium intestinal et dans les organes reproducteurs¹⁴, tant du faux-bourdon que de la reine - le DWV peut d'ailleurs être transmis lors de l'accouplement. Par contre, il semble n'avoir aucun lien avec la déformation des ailes ! Dans les colonies infestées, la teneur de l'hémolymphe des abeilles en vitellogénine, une protéine qui est un précurseur de la gelée royale et joue un rôle dans la longévité de l'abeille, est notablement réduite; mais il n'est pas certain que cette réduction soit le fait du virus, car les colonies infestées par ce dernier sont aussi celles dont la charge en varroas est la plus importante. Il est donc possible que ce soient les prélèvements effectués par le varroa lui-même dans l'hémolymphe qui causent la diminution du taux de cette protéine dans le sang de l'abeille. En conséquence, concluent les chercheurs, notre travail montre qu'il est difficile d'établir un lien entre les infections à DWV et la santé des colonies, voire la santé de la reine, même s'il est probable que la forte prévalence de ce virus dans les ruchers et les fortes charges virales parfois relevées dans les abeilles concourent à diminuer le potentiel reproductif des colonies...

Plus largement, *Nosema* agit plutôt comme un opportuniste qui vient se greffer sur d'autres facteurs (climatiques ou alimentaires notamment) pour compliquer la dysenterie, celle-ci n'étant pas strictement liée à la sévérité de l'infection⁵, ce dont atteste sa très large distribution tant en Europe qu'aux Etats-Unis⁶.

Tableau similaire pour l'IAPV : identifié en Israël en 2004, ce virus est désigné en 2007 comme cause probable de l'important « Colony collapse disorder » de 2006 aux USA : il aurait été importé à partir de 2004 avec des colonies en provenance d'Australie⁷ et aurait contaminé rapidement les ruchers américains, hypothèse étayée par le fait qu'on le retrouve quasi systématiquement associé au dépérissement des ruches américaines⁸. Le département de recherches de l'USDA a toutefois rapidement démontré que ce virus était largement présent sur le sol américain depuis au moins 2002⁹. Le lien IAPV/CCD, s'il n'est pas invalidé, n'est donc plus certain : il reste à établir si ce virus est vraiment la cause du non-retour des abeilles à la ruche et, si oui, pourquoi il a vu sa virulence augmenter de façon aussi spectaculaire au cours de ces trois dernières années. Aussi les dernières recherches américaines se tournent-elles aujourd'hui vers les causes environnementales susceptibles d'accélérer les infections virales au point de provoquer la mort des colonies, hypothèse déjà évoquée précédemment en France à l'occasion d'une étude épidémiologique menée sur l'ensemble du territoire¹⁰.

Bref, les techniques nouvelles de détection/identification des germes, en faisant « apparaître » régulièrement de nouvelles souches microbiennes, viennent poser avec acuité une question que les anciens avaient déjà soulevée : ces germes que nous trouvons dans nos ruches affaiblies, sont-ils réellement à l'origine des problèmes sanitaires à l'occasion desquels on les a découverts ? Et plus loin : sont-ils réellement pathogènes ? En effet, ces hôtes microscopiques que

nous-mêmes et nos abeilles abritons en quantités surprenantes (on estime ainsi que dans un corps humain il y aurait 10 000 fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines¹¹) sont loin d'être tous néfastes. La plupart des bactéries présentes chez l'être humain par exemple sont commensales (elles vivent de nos déchets, entre autres des cellules mortes que nous éliminons, sans nous porter atteinte) ou symbiotiques (elles sont indispensables au fonctionnement de notre organisme, cas de notre flore intestinale par exemple). Il en va de même chez l'abeille, qui abrite aussi une flore de lactobacilles nécessaires à sa digestion. Par ailleurs, les microorganismes susceptibles d'être pathogènes sans que celui-ci ne déclare de maladie. Les porteurs sains de germes potentiellement pathogènes sont légion chez l'être humain : 15 à 30 % des personnes sont porteuses du staphylocoque doré et 10 à 15 % du streptocoque hémolytique, sans s'en porter plus mal, alors que ces bactéries peuvent l'une et l'autre provoquer des infections importantes et notamment des septicémies. De même, de 15 à 20 % de nos ruches sont porteuses du bacille de la loque sans jamais, bien heureusement, déclarer cette maladie. La présence d'un pathogène ne signifie donc pas qu'il y a ni qu'il y aura maladie; on ne parle de maladie qu'à la condition minimale que se manifestent des signes cliniques (un ensemble de signes cliniques constituant plus exactement un syndrome; la maladie, elle, suppose en outre que ces signes constituent une unité et qu'on puisse y déceler une évolution temporelle).

Il nous faut donc retourner aux sources de la microbiologie et notamment aux postulats établis par Robert Koch avant de faire trop hâtivement le lien entre la présence d'un problème sanitaire dans nos ruches et celle d'un pathogène supposé. Koch établissait ainsi les conditions auxquelles ce lien pouvait être considéré comme établi :

⁴ Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, J.H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J, Katz, H., Gardiol, G. and Mendoza, Y, 2009 : Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay, *Journal of Invertebrate Pathology*, 150-153

⁵ *Abeilles & Cie* n° 122

⁶ voir par exemple Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S., 2008 : *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States, *Journal of Invertebrate Pathology* 97 : 186-188

⁷ Voir notamment l'article *Virus Implicated in Colony Collapse Disorder in Bees*, sur le site du Science Daily : <http://www.sciencedaily.com/releases/2007/09/070906140803.htm>

⁸ voir l'article *Solving the mystery of the vanishing bees*, *Scientific American*, April 2009, disponible sur internet : <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=saving-the-honeybee>; nous en publions un résumé en page 24 de ce numéro

⁹ Source : USDA : <http://www.ars.usda.gov/IS/pr/2007/071119.htm>.

¹⁰ Etude des populations virales dans les ruchers français, in *Abeilles & Cie* n° 101, juillet-août 2004

1. l'agent supposé pathogène doit être présent dans chaque cas de maladie et absent des organismes sains,
2. l'agent supposé pathogène doit pouvoir être extrait d'un individu malade, isolé de tous les autres microorganismes et cultivé isolément au laboratoire,
3. l'agent supposé pathogène, isolé et cultivé, doit créer la même maladie, lorsqu'il est inoculé à des individus de la même espèce, que celle d'où il provient,
4. l'agent supposé pathogène doit être extrait de l'individu inoculé expérimentalement et reconnu comme étant le même que celui inoculé.

Sauf l'exception notoire que constituent les porteurs sains, que Koch a lui-même mise en évidence, ces postulats restent pleinement valables aujourd'hui.

La PCR permet d'ailleurs de les affiner. Cette technique peut en effet être pratiquée in situ, directement sur des coupes histologiques. Elle permet en particulier de voir dans quel tissu un virus se reproduit (les virus parasitent certaines cellules, de façon parfois très spécifique) et si cette multiplication virale est associée aux lésions liées elles-mêmes aux signes cliniques de la maladie. L'établissement de telles relations est nécessaire à celui d'un lien de causalité entre le pathogène et les signes cliniques montrés par l'abeille ou par la colonie.

Elémentaire ? Cela n'a pourtant pas toujours été fait, semble-t-il, ainsi que le montre la récente recherche menée à SupAgro Montpellier sur le virus des ailes déformées (encadré).

La Polymerase Chain Reaction ou amplification en chaîne par polymérase permet d'identifier un brin d'ADN ou d'ARN caractéristique d'un organisme, quel qu'il soit, en réalisant très rapidement un nombre de copies suffisantes pour être mises en évidence par fluorescence.

La technique inclut plusieurs phases. Le préalable est qu'une ou des séquences d'acides nucléiques caractéristiques de l'espèce à détecter aient été identifiées. L'amplification de ces séquences, réaction liée à des phases de températures différentes, se fait dans un thermoréacteur. Les deux brins de l'ADN y sont d'abord séparés. Des amorces, molécules susceptibles de s'accrocher au début des séquences visées, sont mises en présence de l'échantillon (par exemple : du miel susceptible d'être contaminé) préalablement dilué; si l'organisme recherché s'y trouve, les amorces se fixent sur les séquences d'ADN ou d'ARN préalablement identifiées en les coupant du reste du brin d'ADN. Les séquences d'ADN ou d'ARN ainsi découpées sont ensuite copiées un très grand nombre de fois dans le thermoréacteur où ont été ajoutés des réactifs ad hoc, notamment une polymérase (les acides nucléiques sont des chaînes de molécules plus petites, les nucléotides; la polymérase est une enzyme qui permet aux nucléotides de s'accrocher entre eux). L'existence de copies se traduit par l'émission de fluorescence; celle-ci signifie donc que l'espèce visée a bien été détectée.

Astuce : les amorces ne peuvent se fixer qu'au début de la séquence car l'ADN ne se « lit » que dans un sens. Il est donc possible de couper l'ADN au début de la séquence choisie mais pas à la fin. Le jeu des copies successives va pourtant faire en sorte qu'en fin de processus, les copies qu'on pourra déceler dans le milieu sont bien exactement celles de la séquence choisie au départ. Il est à peu près impossible d'expliquer ce mécanisme mais une petite animation visuelle en donne la démonstration convaincante : elle se trouve en fin de l'article consacré à la PCR sur Wikipedia¹². Pratiquée en temps réel, c'est-à-dire avec mesure en continu du nombre de copies, la PCR permet la quantification de l'ADN/ARN recherché dans l'échantillon.

Aussi Marc-Edouard Colin, du même laboratoire, proposait-il lors de la dernière journée apicole de la FNOSAD qu'on débaptise les noms de virus de l'abeille avant d'avoir prouvé leur pathogénicité, ainsi que le proposeraient nos prédécesseurs du XIX^e siècle s'ils étaient présents aujourd'hui !

La mise en évidence de la vie microbienne a été faite dans le contexte de la recherche médicale. Elle a permis d'élaborer les règles élémentaires d'hygiène à une époque où celle-ci était totalement méconnue, au point que les médecins eux-mêmes propageaient allègrement l'infection (la fièvre puerpérale notamment). Il est donc bien normal que dans un premier temps, le public et souvent le monde médical lui-même aient assimilé microbes et maladies. L'apport de techniques plus fines de détection nous montre aujourd'hui l'extraordinaire diversité de la flore microscopique. Mais en matière de santé des abeilles (comme en général d'ailleurs), ces études, pour intéressantes qu'elles soient, soulèvent plus de questions qu'elles n'apportent de réponses. C'est l'épidémiologie qui permettra d'y répondre avec pertinence, et de dire les conditions à réunir (quelles pratiques apicoles, quel environnement ?) pour une meilleure santé de nos abeilles.

Mots clés :

Maladies des abeilles pathogène, virus, bactéries

Résumé : l'évolution récente de la microbiologie s'est caractérisée par la mise au point de méthodes extrêmement performantes issues de la génomique, telle la PCR (Polymérase Chain Reaction). Ces études permettent de mettre en évidence des germes présents en très petites quantités, ou de discriminer des espèces que les méthodes précédentes ne distinguaient pas. Ces progrès dans la connaissance microbienne viennent poser la question, déjà soulevée par nos prédécesseurs, des conditions auxquelles on peut réellement considérer qu'un germe est pathogène.



¹² http://fr.wikipedia.org/wiki/Réaction_en_chaîne_par_polymérase

¹³ Première journée scientifique apicole, 26 février 2009, 39^e congrès de la Fédération nationale des organisations sanitaires apicoles départementales (France)

¹⁴ voir aussi l'article Fiévet 2006 : Localization of DWV viruses infection in queen and drone *Apis mellifera* L, article disponible sur internet : <http://www.virologyj.com/content/3/1/16>