

*Communauté française de Belgique*

**FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE  
GEMBLoux**

**Contribution à l'étude de l'expression protéique  
différentielle dans l'hémolymphe de *A. mellifera*  
L. suite à une infection par le virus de la  
paralysie chronique**

Travail de fin d'études

Année académique 2008-2009

Présenté par : Julien Bauwens

Promoteur(s) : Pr. Eric Haubruge

En vue de l'obtention du grade de Bioingénieur en: Biotechnologies et Protection des  
Végétaux

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	2
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	4
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	5
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	5
<b>INTRODUCTION</b> .....	8
<b>OBJECTIFS</b> .....	10
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	11
<b>1 GÉNÉRALITÉS RELATIVES À L'ABEILLE DOMESTIQUE</b> .....	11
<b>1.1 ORGANISATION DE LA COLONIE</b> .....	11
<b>1.2 ANATOMIE</b> .....	12
1.2.1 GÉNÉRALITÉS.....	12
1.2.2 SYSTÈME NERVEUX.....	12
1.2.3 SYSTÈME DIGESTIF .....	12
1.2.4 SYSTÈME CIRCULATOIRE.....	13
1.2.5 SYSTÈME ENDOCRINIEN.....	13
1.2.6 TISSU ADIPEUX.....	13
<b>2 VIRUS DE L'ABEILLE DOMESTIQUE</b> .....	14
<b>2.1 CLASSIFICATION</b> .....	15
<b>2.2 VIRUS DE LA PARALYSIE CHRONIQUE (CBPV)</b> .....	16
2.2.1 SYMPTOMATOLOGIE.....	16
2.2.2 LOCALISATION .....	17
2.2.3 EPIDÉMIOLOGIE.....	17
2.2.4 VOIES DE TRANSMISSION.....	17
2.2.5 VIRUS ASSOCIÉ DE LA PARALYSIE CHRONIQUE.....	19
<b>3 MÉCANISMES DE DÉFENSES DES INSECTES</b> .....	20
<b>3.1 DÉFENSES MÉCANIQUES</b> .....	20
3.1.1 LA CUTICULE.....	20
3.1.2 LA MEMBRANE PÉRITROPHIQUE DU VENTRICULE.....	20
3.1.3 LA TUNIQUE CHITINEUSE DE LA TRACHÉE.....	21
<b>3.2 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE</b> .....	21
3.2.1 L'IMMUNITÉ CELLULAIRE .....	21
3.2.2 L'IMMUNITÉ HUMORALE.....	23
3.2.3 VOIES DE SIGNALISATION .....	24
<b>3.3 LES DÉFENSES CONTRE LES VIRUS</b> .....	25
3.3.1 MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE.....	25
3.3.2 HÉMOCYTES .....	26
3.3.3 PHÉNOLOXYDASES.....	26
3.3.4 INTERFÉRENCE ARN .....	26
3.3.5 PHÉROKINES.....	26
<b>4 LUTTE CONTRE LES VIRUS : SÉLECTION ET AMÉLIORATION</b> .....	26
<b>5 PROTÉOMIQUE</b> .....	29
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	30
<b>1 OPTIMISATION DES MÉTHODES DE PRÉLÈVEMENT ET D'EXTRACTION DES PROTÉINES DE L'HÉMOLYPHE</b> .....	30
1.1 PRÉLÈVEMENT.....	30
1.2 EXTRACTION DES PROTÉINES.....	30
1.3 PRÉCIPITATION DES PROTÉINES.....	31
1.4 QUANTIFICATION DES PROTÉINES .....	31
1.5 SÉPARATION DES PROTÉINES.....	31

1.5.1	ELECTROPHORÈSE 1D SDS-PAGE .....	32
1.5.2	ELECTROPHORÈSE 2D.....	33
1.6	RÉVÉLATION DES SPOTS PROTÉIQUES .....	36
1.6.1	COLORATION AU NITRATE D'ARGENT.....	36
1.6.2	COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE R-250 .....	37
1.6.3	COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE COLLOÏDAL G-250.....	38
1.6.4	PRÉSENTATION DES GELS 2D.....	38
2	EXPRESSION PROTÉIQUE DIFFÉRENTIELLE DANS L'HÉMOLYMPHE DE A. MELLIFERA SUITE À UNE INFECTION PAR LE CBPV.....	39
2.1	PLAN EXPÉRIMENTAL .....	40
2.2	MATÉRIEL BIOLOGIQUE .....	41
2.3	EXTRACTION DES PROTÉINES.....	41
2.4	PRÉCIPITATION DES PROTÉINES.....	41
2.5	MARQUAGE AUX CYDYES™ .....	41
2.6	SÉPARATION DES PROTÉINES.....	42
2.7	RÉVÉLATION DES SPOTS PROTÉIQUES .....	42
2.8	ANALYSE D'IMAGE .....	43
2.9	SPOT PICKING.....	43
2.10	DIGESTION DES PROTÉINES .....	43
2.11	IDENTIFICATION DES PROTÉINES.....	44
3	APPROCHE PRÉLIMINAIRE À L'ÉTUDE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE DIFFÉRENTIELLE DES SEGMENTS CORPORELS MAJEURS DE A. MELLIFERA SUITE À UNE INFECTION PAR LE CBPV.....	45
3.1	PRÉLÈVEMENT.....	45
3.2	EXTRACTION DES PROTÉINES.....	45
4	ANALYSE STATISTIQUE.....	46
	RÉSULTATS.....	47
1	OPTIMISATION DE LA MÉTHODE DE PRÉLÈVEMENT ET D'EXTRACTION DES PROTÉINES DE L'HÉMOLYMPHE .....	47
1.1	QUANTITÉ D'HÉMOLYMPHE PRÉLEVÉE.....	47
1.2	ASPECT DE L'HÉMOLYMPHE PRÉLEVÉE.....	48
1.3	DOSAGE DES PROTÉINES.....	48
1.4	CONSERVATION DES SOLUTIONS D'EXTRACTION.....	49
1.5	SÉPARATION DES PROTÉINES SUR GEL 1D.....	50
1.6	SÉPARATION DES PROTÉINES PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE ..	51
1.7	CONCLUSIONS RELATIVES À LA MISE AU POINT.....	51
2	EXPRESSION PROTÉIQUE DIFFÉRENTIELLE DANS L'HÉMOLYMPHE DE A. MELLIFERA SUITE À UNE INFECTION PAR LE CBPV.....	53
2.1	MATÉRIEL BIOLOGIQUE .....	53
2.2	PRÉLÈVEMENT D'HÉMOLYMPHE.....	53
2.3	EXTRACTION .....	53
2.4	ANALYSE D'IMAGE .....	53
2.5	IDENTIFICATION DE PROTÉINES.....	54
3	APPROCHE PRÉLIMINAIRE À L'ÉTUDE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE DIFFÉRENTIELLE DES SEGMENTS CORPORELS MAJEURS DE A. MELLIFERA SUITE À UNE INFECTION PAR LE CBPV.....	55
3.1	ASPECT DES ÉCHANTILLONS DE SEGMENTS CORPORELS.....	55
	DISCUSSION .....	56
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	60
	ANNEXES.....	69
	ANNEXE I : SCANS DE GELS 2D RÉALISÉS DANS LE CADRE DE LA MISE AU POINT .....	69

## **Table des Figures**

Figure 1: particules virales de CBPV (Olivier et Ribière, 2006).....	16
Figure 2: Protéine dénaturée entourée de SDS .....	32
Figure 3: Représentation des gels 2D .....	38
Figure 4: Echantillons chargés dans un gel 2D-DIGE.....	39
Figure 5 : Comparaison des échantillons intra-gel (à gauche) et inter-gels (à droite).....	40
Figure 6: Spectres des longueurs d'onde d'excitation (courbe noire), d'émission (courbe bleue: Cy2; courbe verte: Cy3; courbe rouge: Cy5), et filtres d'émission correspondants...	40
Figure 7: Réaction de marquage aux fluorophores .....	42
Figure 8: Volume prélevé par abeille en fonction du mode de conservation .....	48
Figure 9: Dosage des protéines selon la conservation des échantillons et le tampon d'extraction.....	49
Figure 10: Gels 1D n°3 et n°4. Tous les échantillons du gel n°3 ont été récoltés dans du tampon PBS, et tout ceux du gel n°4 dans du tampon UTC.....	50
Figure 11: gels 2D réalisés lors de l'optimisation de la méthode, colorés au nitrate d'argent .....	51

## **Table des tableaux**

Tableau 1: Composition des gels 1D SDS-PAGE .....	33
Tableau 2: programme de focalisation isoélectrique .....	35
Tableau 3: Préparation des gels 2D SDS-PAGE .....	35
Tableau 4: Protocole de coloration au nitrate d'argent .....	37
Tableau 5: Longueurs d'onde des filtres d'émission et caractéristiques des trois CyDyes..	40

## Liste des abréviations

1D (électrophorèse) : électrophorèse monodimensionnelle  
2D (électrophorèse) : électrophorèse bidimensionnelle  
2D-DIGE : 2 Dimensions-Differential In Gel Electrophoresis  
Ab : échantillon d'abdomen d'abeille  
ABPV : virus de la paralysie aiguë de l'abeille  
ACN: acétonitrile  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AMP : peptides antimicrobiens  
APS: persulfate d'ammonium  
ARN : acide ribonucléique  
ASB14: l'amidosulfo-betaïne-14  
BLAST: basic local alignment sequence tool  
BQCV : virus de la cellule royale noire  
BVX: bee virus X  
BYY : bee virus Y  
C20 : échantillon récolté à partir d'abeilles congelées à -20°C  
C80 : échantillon récoltée à partir d'abeilles congelées à -80°C  
CBPSV : virus satellite  
CBPV- : échantillon récolté à partir d'abeilles saine (témoin négatif)  
CBPV : virus de la paralysie chronique de l'abeille  
CBPV+ : échantillon récolté à partir d'abeilles inoculées avec le CBPV  
CBPVA : virus de la paralysie chronique  
CHAPS : 3- [(3 -Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate  
CHAPS: 3- [(3 -Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate  
CWV : Cloudy Wing Virus  
DCV: Drosophila C virus  
DTT: dithiothreitol  
DWV: deformed wing virus  
F : hémolymphe récoltée à partir d'abeilles fraîches  
FV : virus filamenteux  
IAA : iodoacétamide  
IEF: focalisation isoélectrique  
IFV : Infectious Flacherie Virus

IPG: immobilized pH gradient  
JAK: just another kinase  
KBV: Kashmir bee virus  
KV : virus Kakugo  
NL : non linéaire  
PBS : tampon phosphate (extraction de protéines)  
Phk: phérokines  
pI: point isoélectrique  
PM : marqueur de poids moléculaire  
PMT : PhotoMultiplierTubes  
PO : Phénoloxydase  
proPO : prophénoloxydase  
PRR : Pattern Recognition Receptor  
rpm : rotation par minute  
SBV: sacbrood virus  
SDS: sodium dodecylsulfate  
SDS-PAGE : sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis  
STAT: signal transducer and activator of transcription  
Tê : échantillon de tête d'abeille  
TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminomethane  
Th : échantillon de thorax d'abeille  
TLR: Toll-like receptor  
Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane  
Upd : ligand unpaired  
UTC : tampon d'extraction de protéines composé d'urée, de Tris , et de CHAPS

## **Introduction**

L'abeille domestique, *Apis mellifera* L., est indéniablement une composante importante de la biodiversité, au même titre que les autres insectes pollinisateurs. Au fil d'une longue coévolution, leur intervention est devenue indispensable à la reproduction de nombreuses plantes sauvages et agricoles dont la pollinisation est qualifiée d'entomophile. Le rendement de beaucoup de plantes cultivées dépend également de ce type de pollinisation.

Le mode de vie social et organisé de l'abeille en fait également un sujet d'études comportementales particulièrement intéressant. En effet, bien que les conditions régnant dans une colonie soient propices au développement de pathogènes, les ouvrières ont notamment su développer un comportement hygiénique au bénéfice de la colonie et des stratégies immunitaires particulièrement efficaces ont été sélectionnées.

Plus de 75% des gènes reliés à des pathologies chez l'homme sont retrouvés chez *Drosophila melanogaster* en tant que gènes orthologues (Reiter et al., 2001). Il est probable que l'abeille présente davantage de similitudes avec l'homme étant donné l'aspect social de son mode de vie.

De plus, certaines molécules contenues dans leur venin, ou dans la propolis qu'elles récoltent, possèdent des propriétés pharmacologiques (Tu et al., 2008 ; Han et al., 2007 ; Sforcin, 2007). Plusieurs peptides antimicrobiens sont synthétisés par *A. mellifera*, dans l'hémolymph ou dans la gelée royale, connue pour ses vertus thérapeutiques.

Ces insectes se révèlent ainsi être d'intérêts écologique, économique et médical.

Tous ces attributs sont autant d'exemples pour lesquels *A. mellifera* est actuellement considérée comme un modèle d'étude. Son génome a par ailleurs été intégralement séquencé, ce qui représente un atout considérable.

Depuis quelques années, la santé de l'abeille fait l'objet de certaines préoccupations. Entre 1999 et 2007, près de 30 % des ruches wallonnes ont fait l'objet d'un dépérissement. D'autres régions du monde sont touchées, dont notamment les Etats-Unis. Plusieurs études ont montré que ce phénomène s'avérait multifactoriel (Haubruge et al., 2006), et que certains virus constituaient des facteurs de risque à prendre en considération. Parmi ces virus, le virus de la paralysie chronique (Chronic Bee Paralysis Virus, CBPV) est largement

répandu (Ribière et al., 2008). Il est très virulent et est un des rares virus provoquant l'apparition de symptômes chez *A. mellifera*.

Bien que les virus représentent la forme de vie la plus élémentaire, tous les règnes du vivant sont touchés par leur parasitisme. Certains mécanismes de défenses mis en place contre ces pathogènes sont communs chez les plantes supérieures et chez les mammifères. Ces mécanismes se retrouvent aussi chez les insectes. Ceux-ci possèdent un système immunitaire apparemment moins complexe que celui des mammifères. Ils ne possèderaient qu'une immunité innée, alors que l'immunité des mammifères est innée et adaptative. Les insectes constituent dès lors un modèle moins complexe pour l'étude de certaines réponses immunitaires (Kavanagh & Reeves, 2004).

L'hémolymphe des insectes est en quelque sorte l'analogue du sang des mammifères, si ce n'est qu'elle ne transporte pas l'oxygène. Elle est le lieu de réponses immunitaires importantes. Elle contient des cellules, les hémocytes, spécialisées dans l'immunité. L'hémolymphe contient aussi des enzymes et des peptides impliqués dans les défenses de l'organisme contre les pathogènes. Elle constitue donc une matrice de premier choix pour une étude des réponses immunitaires.

## **Objectifs**

Dans un premier temps, ce travail a pour objectif la mise au point d'une méthode d'extraction des protéines de l'hémolymphe, afin d'obtenir une vision représentative de son protéome. Ensuite il vise à comparer quantitativement l'expression des protéines dans l'hémolymphe d'abeilles saines et infectées par le CBPV.

Les principaux paramètres mis au point sont la méthode de prélèvement, le type de matériel biologique, et le tampon d'extraction. Pour cela, divers critères relatifs au prélèvement et à la séparation de protéines sur gel, ainsi que la teneur en protéines et la conservation des échantillons ont été évalués. Les techniques de séparations sur gel sont de type SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), à une ou deux dimensions.

La méthode utilisée pour la comparaison des expressions protéiques entre abeilles saines et infectées est le 2D-DIGE (2 Dimensions-Differential In Gel Electrophoresis). L'identification des protéines a été réalisée en spectrométrie de masse en tandem.

# **Bibliographie**

## **1 Généralités relatives à l'abeille domestique**

L'abeille domestique, *Apis mellifera* L., est un Hyménoptère de la superfamille des Apoidea, et de la famille des Apidae. Cet insecte social vit en colonies composées de 20 à 50 000 individus (Jean-Prost & Le Conte, 2005). Si la consommation de miel par l'homme remonte à plus de dix-mille ans, l'abeille est restée relativement sauvage jusqu'au XVIII<sup>ème</sup> siècle, et sa domestication débuta véritablement lorsque Janscha découvrit que l'accouplement s'effectuait en vol. Cet insecte existe à l'état de colonies sauvages sur tous les continents, excepté l'Antarctique (Moritz et al., 2005).

### **1.1 Organisation de la colonie**

La colonie comporte trois types d'individus : la reine, les mâles (ou faux-bourdons), et les ouvrières. Ces différentes castes possèdent leurs propres caractéristiques morphologiques ainsi que des rôles spécifiques dans la structure de la colonie.

La reine est élevée dans une cellule morphologiquement différente de celles des autres castes. Elle se distingue des ouvrières par son abdomen plus développé. La reine est aussi la seule abeille de la colonie à pouvoir être fécondée. Cette fécondation se déroule en vol au niveau de sites de rassemblement de centaines ou milliers de mâles (Koning, 1994). Six à vingt faux-bourdons fécondent la reine, qui accumule leur semence dans sa spermathèque. Lors de cet unique vol nuptial, elle emmagasine une réserve de spermatozoïdes qui lui permettra de pondre durant toute sa vie.

Les mâles sont légèrement plus grands que les ouvrières, leurs yeux caractéristiques sont bien plus développés. Leurs pièces buccales, notamment leur langue plus courte, ne leur permettent pas de se nourrir eux-mêmes, et cette tâche revient aux ouvrières. Ils ne possèdent pas non plus les organes nécessaires à la collecte du pollen. Le rôle des mâles se limite donc à la reproduction.

Les ouvrières forment la caste majoritairement représentée dans la colonie. Leurs rôles sont fort variés et évoluent au cours de leur vie. Dans un premier temps, elles restent cantonnées au nid, où elles participent notamment à sa construction et son entretien, à l'alimentation des larves, de la reine et des mâles et à la défense contre les intrus. Elles

deviennent ensuite butineuses, et sortent récolter le pollen, le nectar ou la propolis (Koning, 1994).

## **1.2 Anatomie**

### **1.2.1 Généralités**

Le corps de l'abeille est composé de la tête, du thorax, et de l'abdomen. La tête de l'abeille contient notamment le cerveau, le ganglion suboesophagien, et les centres neurosécrétoires. Elle porte aussi la plupart des organes sensoriels de l'abeille : les yeux composés, ou ommatidies, les ocelles (yeux simples), les antennes, et des soies. Enfin la tête porte les pièces buccales intervenant dans la manipulation du pollen, mais aussi dans l'ingestion et la digestion partielle du nectar et du pollen. Le thorax de l'abeille porte ses trois paires de pattes et ses deux paires d'ailes. L'abdomen contient l'essentiel du système excréteur et de l'appareil digestif.

### **1.2.2 Système nerveux**

Plusieurs lobes forment le cerveau de l'abeille : les lobes protocérébraux dorsaux, les lobes optiques, le protocérébron, le deutocérébron et le stomodaeum. Ce cerveau est constitué de cellules associées et de neurones interconnectés dans lesquels s'opèrent les liaisons synaptiques des fibres motrices du ganglion suboesophagien et de la corde nerveuse avec les fibres sensorielles des yeux et des antennes.

Le ganglion suboesophagien se situe dans le bas de la tête à proximité du cerveau, auquel il est relié par des connexions circumoesophagiennes. Il est également connecté au premier ganglion thoracique.

La corde nerveuse ventrale est la composante du système nerveux situé au niveau du thorax et de l'abdomen. Elle est formée de sept ganglions reliés un à un, à l'image d'un chapelet.

### **1.2.3 Système digestif**

Le tube digestif des insectes est composé de trois parties. Chez l'abeille adulte, la partie antérieure, ou stomodaeum, comprend le pharynx, l'œsophage, le jabot, et le proventricule, ou gésier. La partie centrale, ou ventricule, est l'analogue de l'estomac. Le ventricule s'ouvre directement sur la partie terminale du tube digestif, ou proctodaeum, qui est composé de l'intestin antérieur et de l'intestin postérieur, ou rectum (Snodgrass, 1956).

#### **1.2.4 Système circulatoire**

Le système circulatoire des insectes est ouvert : les organes baignent dans un fluide appelé hémolymphe, circulant dans un compartiment appelé hémocœle. L'hémolymphe peut être considérée comme l'analogue du sang, bien qu'elle n'assure pas le transport de l'oxygène (Gullan & Cranston, 2004). La fonction circulatoire est assurée par le cœur, situé dans la partie dorsale de l'abdomen. Le cœur est de forme tubulaire, présente plusieurs ouvertures, et se prolonge à l'avant par l'aorte dorsale qui remonte irriguer la tête. L'hémolymphe est également une composante importante du système immunitaire, mais cette fonction sera décrite plus loin.

#### **1.2.5 Système endocrinien**

Les hormones interviennent dans la régulation de la physiologie de l'insecte à de multiples niveaux. L'hormone juvénile intervient notamment dans l'évolution du système immunitaire chez l'abeille (Amdam et al., 2005). La tête comporte plusieurs centres neurosécrétoires : les corpora cardiaca, les corpora allata, ainsi que des cellules neurosécrétrices situées dans le cerveau et le ganglion suboesophagien.

#### **1.2.6 Tissu adipeux**

La masse du tissu adipeux est plus importante chez les jeunes ouvrières que chez les butineuses (Wilson-Rich et al., 2008). Elle est située dans l'abdomen et tapisse essentiellement l'exosquelette dorso-ventralement. Les cellules qui composent le tissu adipeux sont disposées en fines couches superposées.

En dehors du rôle de réserves nutritionnelles et énergétiques, les tissus adipeux sont associés à des fonctions analogues à celles remplies par le foie des mammifères. Ce tissu est également impliqué dans la synthèse de peptides antimicrobiens (Scharlaken, 2008).

## **2 Virus de l'abeille domestique**

Les virus sont des entités biologiques uniquement composées d'acides nucléiques entourés par une capsidie protéique. La diversité des virus provient du type d'acide nucléique qu'ils contiennent, de la structure de leur capsidie, et de la présence éventuelle d'une enveloppe. Les acides nucléiques (ARN ou ADN) peuvent se présenter sous forme d'un ou plusieurs brins monocaténaux ou bicaténaux. Dans le cas des virus à ARN monocaténaire, la distinction est également faite entre les virus à brins positifs et ceux à brins négatifs.

Les virus sont des parasites cellulaires obligatoires. Ils ne peuvent se multiplier sans utiliser les mécanismes cellulaires d'un hôte. Tous les organismes, unicellulaires ou pluricellulaires, procaryotes ou eucaryotes, sont susceptibles d'être infectés par les virus.

Actuellement, dix-neuf virus infectant *A. mellifera* ont été découverts (Rivière et al., 2008). Parmi ceux-ci, certains attirent plus particulièrement l'attention en raison de la mortalité qu'ils sont suspectés d'entraîner dans les colonies, leur association avec des symptômes ou encore leur association avec d'autres parasites de l'abeille (Olivier & Rivière, 2006). Il s'agit du virus de la paralysie aiguë (acute bee paralysis virus, ABPV), du virus de la cellule royale noire (black queen cell virus, BQCV), du virus de la paralysie chronique (chronic bee paralysis virus, CBPV), du virus des ailes déformées (deformed wing virus, DWV), du virus du couvain sacciforme (sacbrood virus, SBV), du virus du Cachemire (Kashmir bee virus, KBV), du virus X de l'abeille (bee virus X, BVX) et du virus Y de l'abeille (bee virus Y, BVY).

Concernant les pertes occasionnées, le CBPV, de même que le SBV entraînent des mortalités pouvant être importantes, (Olivier & Rivière, 2006). Attribuer des pertes à une cause bien précise, comme une infection virale, n'est pas aisé à réaliser, étant donné le nombre de facteurs pouvant influencer la mortalité au sein d'une colonie d'abeilles (Haubruge et al., 2006).

Les virus de l'abeille entraînant l'apparition de symptômes sont peu nombreux. Les ailes des individus atteints par le DWV à un stade précoce, sont généralement déformées ou atrophiées (Bowen-Walker et al, 1999 ; Chen et al., 2005b ; Tentcheva et al., 2006). Le SBV est responsable de la malformation des larves, en forme de sacs suite à l'accumulation de liquide entre les téguments et les organes internes (Bailey et al., 1964).

L'acarien parasite *Varroa destructor*, se nourrissant de l'hémolymphe d'abeilles, participe à la transmission du virus DWV. Les symptômes de l'infection virale ont par ailleurs été attribués à l'acarien dans le passé (Akratanakul & Burgett, 1975 ; Koch &

Ritter, 1991). *V. destructor* est un hôte alternatif du DWV. En effet, la forme négative de l'ARN viral a été détectée dans des échantillons d'acariens, indiquant la multiplication virale (Ongus et al., 2004 ; Yue & Genersch, 2006). Il a également été démontré que l'acarien est capable de transmettre l'ABPV, au moins de façon passive (Ball, 1983 ; Wiegers, 1986). Chen et al. (2004a) ont montré que la transmission du KBV par la salive de *V. destructor* était possible.

Le BQCV, le BVY, et le FV quant à eux sont associés au pathogène fongique *Nosema apis* Zander, et le BVX est associé au protozoaire *Malpighamoeba mellificae* Prell. La multiplication du BQCV est dépendante de la présence de *N. apis*, ce qui n'est pas le cas pour les autres associations avec ce champignon ou entre le BVX et *M. mellificae* (Bailey & Woods, 1974).

## **2.1 Classification**

Tous les virus de l'abeille domestique sont des virus à ARN simple brin positif, hormis le virus filamenteux (FV) dont le génome est composé d'ADN (Olivier et Ribière, 2006). Ils sont actuellement classés dans trois catégories : les Iflavirus, les Dicistroviridae et les non-classés.

Les virus réunis sous le genre Iflavirus sont apparentés à l'Infectious Flacherie Virus (IFV), un virus touchant *Bombyx mori* L.. Ce genre n'est encore attribué à aucune famille et comprend le virus des ailes déformées (Deformed Wing Virus, DWV), le virus du couvain sacciforme (Sacbrood Virus, SBV) et le virus Kakugo (KV) (Olivier et Ribière, 2006).

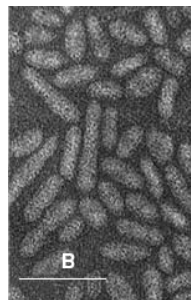
La famille des Dicistroviridae a été créée en même temps que le genre Iflavirus. Elle comporte des virus plus ou moins apparentés au virus de la paralysie du criquet, ayant donné son nom au genre Cripavirus. Le virus de la cellule royale noire (Black Queen Cell Virus, BQCV) appartient au genre Cripavirus, alors que le virus de la paralysie aiguë (Acute Bee Paralysis Virus, ABPV) et le virus du Cachemire (Kashmir Bee virus, KBV) sont des Dicistroviridae auxquels aucun genre n'a encore été attribué.

De même, aucun genre ou famille ne sont actuellement attribués au virus de la paralysie chronique (Chronic Bee Paralysis Virus, CBPV), ainsi qu'au virus des ailes nuageuses (Cloudy Wing Virus, CWV) (Olivier et Ribière, 2006).

## **2.2 Virus de la paralysie chronique (CBPV)**

Les virus de la paralysie aiguë (ABPV) et de la paralysie chronique (CBPV) sont les premiers virus infectant *A. mellifera* à avoir été isolés (Bailey et al., 1963). Les particules virales du CBPV sont anisométriques, généralement ellipsoïdales, et présentent souvent une protubérance irrégulière à une extrémité. Elles mesurent 20 nm de large, et se répartissent en quatre classes selon leur longueur : 30, 40, 55, ou 65 nm de long (Figure 1). D'autres formes sont également décrites par Overton et al. (1982), les particules en anneaux, en « 8 », et en bâtonnets simples ou ramifiés. Les protéines de la capsid du CBPV ont une masse moléculaire de 23,5 kDa. Quatre polypeptides associés au virus ont été mis en évidence par Ribière et collègues (2000). Leurs masses respectives sont de 75 kDa, 50 kDa, 30 kDa, et 20 kDa.

Le génome du virus de la paralysie chronique est composé de cinq brins d'ARN monocaténaire. Les tailles respectives des brins 1, 2, 3a, 3b, et 3c sont de 4,2 kb, 2,8 kb et 1,1 kb pour chacun des trois derniers (Overton et al., 1982).



**Figure 1: particules virales de CBPV (Olivier et Ribière, 2006).**

### **2.2.1 Symptomatologie**

La maladie de la paralysie chronique touche exclusivement les abeilles adultes. Contrairement à la plupart des virus infectant les abeilles, le CBPV peut entraîner l'apparition de symptômes observables lors de fortes infestations (Blanchard et al, 2008). Les individus atteints meurent quelques jours après avoir développé les symptômes (Ball, 1999). Ces derniers peuvent être répartis en deux groupes, appelés respectivement syndromes 1 et 2. Le syndrome de type 1 fait référence aux tremblements, à l'incapacité de voler et aux mouvements anormaux des ailes et du corps (ataxie), c'est-à-dire aux symptômes de paralysie. Le syndrome de type 2 concerne les symptômes caractéristiques de la « maladie noire », ou « hairless black syndrome » aux Etats-Unis. Ce syndrome n'a

été associé au CBPV qu'en 1976 par Rinderer et Rothenbuhler. Les abeilles touchées ont une pilosité fortement réduite suite aux attaques qu'elles subissent de la part des abeilles saines de la même colonie. De ce fait, elles apparaissent plus petites, plus sombres, voire noires. Cette agressivité a comme conséquence l'exclusion des abeilles virosées. Kulinčević et al. (1973) ont observé que la présence d'une reine retarde, voire inhibe ces attaques.

Les deux syndromes laissent apparaître un abdomen gonflé, suite à la distension du jabot (Ribière et al., 2007) dans lequel s'accumulent des particules virales.

### **2.2.2 Localisation**

Le CBPV présente un certain neurotropisme : il se multiplie de façon très active au niveau des cellules nerveuses (Bailey & Milne, 1969 ; Olivier et al., 2008). Le système digestif, notamment les glandes mandibulaires et hypopharyngiennes ainsi que le jabot et les fèces, peuvent contenir de nombreuses particules virales, de même que l'hémolymphe (Chen et al., 2006b ; Blanchard et al., 2008 ; Ribière et al., 2007).

### **2.2.3 Epidémiologie**

La paralysie chronique de l'abeille est présente sur tous les continents, (Ball, 1999 ; Antunez et al., 2005) et sa distribution serait principalement attribuable aux échanges commerciaux des reines.

L'émergence de cette maladie semble être favorisée par la haute densité d'abeilles et de colonies, ainsi que par le manque en ressources nutritives. L'impact du virus sur la mortalité des abeilles est également à mettre en relation avec la sévérité de l'hiver, ou les mauvaises conditions climatiques estivales (Allen et Ball, 1996; Bailey et al., 1983b).

### **2.2.4 Voies de transmission**

#### **2.2.4.1 Transmission horizontale directe**

La transmission d'un pathogène entre deux individus est dite directe lorsque le pathogène passe de l'un à l'autre sans intermédiaire. Ce type de contamination peut par exemple survenir par contact cutané ou par les fluides corporels. Les abeilles peuvent transmettre le CBPV par contact, notamment au niveau de blessures. Deux facteurs

soulignent l'importance de cette voie *in vivo*. Tout d'abord, les abeilles domestiques sont fréquemment confinée dans le nid et cette promiscuité couplée avec l'apparition du pathogène accélère sa dissémination au sein de la colonie. En effet, les frottements entre les individus cassent les poils ou endommagent la cuticule, exposant les tissus et permettant ainsi la transmission par voie cytoplasmique. Ensuite, Blanchard et al. (2006) ont montré que les abeilles situées à l'entrée de la colonie, notamment les gardes, possédaient une charge virale plus importante que les abeilles échantillonnées dans la colonie. En repoussant les abeilles infectées, ces gardes provoquent leur propre contamination (Kulincevic et al., 1969). C'est aussi à l'entrée de la colonie que se concentrent beaucoup d'individus infectés et repoussés, ainsi que des individus morts. L'unique trou de vol par lequel passent toutes les butineuses est un point critique en terme de contamination.

#### 2.2.4.2 Transmission horizontale indirecte

La contamination est dite indirecte lorsque qu'elle se fait via un intermédiaire. Il peut s'agir de matières excrétées par un individu infecté, d'un aliment, ou d'un hôte alternatif. Les particules virales excrétées via les fèces d'abeilles touchées par le CBPV peuvent contaminer les individus en contact avec celles-ci (Rivière et al., 2007). D'autre part les poils des abeilles attaquées peuvent se retrouver dans la nourriture et ce virus a d'ailleurs été détecté dans des échantillons de nourriture (Celle et al, 2007). Le CBPV a récemment été détecté pour la première fois dans deux espèces de fourmis et chez *Varroa destructor* (Celle et al, 2007). Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de *V. destructor* dans la transmission horizontale indirecte de virus infectant *A. mellifera*. À l'heure actuelle, la transmission du CBPV via ces hôtes alternatifs n'a pas encore été démontrée.

#### 2.2.4.3 Transmission verticale

La transmission verticale désigne la transmission d'un pathogène d'un individu à sa descendance. L'inoculation de la reine ou des mâles avec le CBPV entraîne la propagation du virus dans la colonie (Ball et al., 1985). De même, la détection systématique du virus dans la descendance d'une reine infectée suggère la possibilité d'une transmission verticale du virus. Celle-ci n'a pas encore été démontrée étant donné que le CBPV n'a pas été détecté dans les ovaires ou la spermathèque (Chen et al., 2006b). La charge virale pourrait y être plus faible que le seuil de détection de cette étude.

### **2.2.5 Virus associé de la paralysie chronique**

Des particules virales appartenant à un autre virus que le CBPV ont été observées lors d'infections par ce dernier. Bien que la multiplication de cet autre virus nécessite l'infection de l'hôte par le CBPV, et que les génomes des deux virus présentent certaines similarités, ces particules n'ont pas été reconnues comme appartenant au CBPV. Il s'agit probablement d'un virus associé au virus de la paralysie chronique (CBPVA) aussi appelé virus satellite (CBPSV) (Bailey, 1976), ou d'une modification subséquente à l'infection par le virus (Giauffret et al., 1970). Son génome est constitué de trois brin d'ARN monocaténaire, appelés A, B, et C, et dont les caractéristiques sont semblables aux brins 3a, 3b, et 3c du CBPV (Overton et al., 1982). Les particules de CBPVA ont été observées au niveau de l'intestin, à proximité de l'insertion des tubes de Malpighi, des ganglions nerveux thoraciques et abdominaux et des glandes hypopharyngiennes et mandibulaires (Lee, 1967; Lee and Furgala, 1965a).

### **3 Mécanismes de défenses des insectes**

Les insectes évoluent dans des milieux variés et s'exposent donc à une large gamme de pathogènes. Les insectes sociaux, comme *Apis mellifera*, sont d'autant plus susceptibles qu'ils combinent l'exposition au milieu extérieur avec la grande promiscuité qui règne au sein de la colonie. De plus, les conditions de température et la disponibilité des ressources nutritives emmagasinées au niveau de la colonie sont également favorables au développement d'autres organismes.

Afin de lutter contre la pléiade d'organismes nuisibles dont ils sont la cible, les insectes sociaux ont développé d'une part des mécanismes de défense individuelles, et d'autre part des traits comportementaux comme par exemple l'hygiène.

#### **3.1 Défenses mécaniques**

Tout comme chez la plupart des organismes, les premières défenses sont des barrières mécaniques qui ont pour but d'éviter le contact avec les pathogènes.

##### **3.1.1 La cuticule**

La cuticule représente la partie externe de l'exosquelette. Cette matrice de carbohydrates et de protéines est produite par un épithélium sous-jacent sur la quasi-totalité de l'insecte. En plus de son effet mécanique, elle contient des substances, comme des dihydrophénols, des enzymes, des cires et des acides gras insaturés, qui possèdent une activité antimicrobienne.

##### **3.1.2 La membrane péritrophique du ventricule**

Au niveau du ventricule de l'abeille adulte, une membrane chitineuse limite le contact des cellules épithéliales avec le bol alimentaire et les pathogènes qu'il peut contenir. Cette membrane peut être multiple. De plus, une épaisse couche gélatineuse sépare l'épithélium de la membrane péritrophique.

### **3.1.3 La tunique chitineuse de la trachée**

La trachée présente plusieurs adaptations contre l'infection par les pathogènes. Ses parois sont couvertes d'une tunique chitineuse, caractérisée par une faible humidité et offrant peu de ressources nutritives qu'elle offre limitent les possibilités de prolifération bactérienne (Glinski & Jarosz, 1995).

## **3.2 Le système immunitaire**

L'abeille possède un système immunitaire vrai, c'est-à-dire lui permettant de reconnaître et combattre, voire éliminer un certain spectre de pathogènes, tout en épargnant ses propres tissus (Beutler, 2004).

Lorsque les barrières mécaniques sont franchies, la reconnaissance du pathogène induit des cascades de réponses coordonnées au niveau des différents types d'hémocytes, ainsi que la production de peptides antimicrobiens (AMP) via le tissu adipeux et les hémocytes (Gillespie et al., 1997).

Chez les insectes, les réponses immunitaires cellulaires ou humorales sont rapides et peu spécifiques. Leur immunité est principalement innée, car déficiente en mécanismes de réarrangements géniques nécessaires à la production de récepteurs spécifiques. Or ces mécanismes sont à la base du développement de la mémoire immune (Fearon, 1997 ; Mendoza & Faye, 1999). Certains auteurs montrent toutefois l'établissement de réponses immunitaire adaptatives chez la drosophile (Agaisse, 2007).

Le système immunitaire de *A. mellifera* évolue selon l'âge chez les ouvrières, les mâles et la reine (Schmid et al., 2008) : le nombre d'hémocytes diminue progressivement, tandis que l'activité phénoloxydase augmente. Cette évolution est également liée avec la répartition des tâches, du moins chez les ouvrières. En effet, Amdam et collègues (2005) ont montré un rétablissement du nombre d'hémocytes chez des butineuses forcées à remplir les tâches de nourrices. Cette nouvelle prolifération d'hémocytes est accompagnée d'une chute du taux d'hormone juvénile et d'une augmentation du taux de vitellogénine.

### **3.2.1 L'immunité cellulaire**

Cette composante de l'immunité concerne les réponses immunitaires induites par les hémocytes suite à leurs interactions avec des éléments pathogènes.

### 3.2.1.1 Les hémocytes

Les cellules « sanguines » des insectes sont appelées hémocytes. Chez *A. mellifera*, elles ont été identifiées et caractérisées par van Steenkiste (1988). Certaines sont ciliées et mobiles tandis que d'autres sont sessiles. Quatre types d'hémocytes sont plus fréquemment rencontrés dans l'hémolymphe de l'abeille : les plasmocytes, les prohémocytes, les granulocytes, et les coagulocytes. Les proportions représentées par les différents types d'hémocytes évoluent avec l'âge de l'abeille, de même que nombre total d'hémocytes, qui est maximum chez les larves et les nymphes, et diminue avec l'âge de l'abeille (Wilson-Rich et al., 2008).

Les plasmocytes, qui représentent 90 % des hémocytes, sont majoritairement mobiles et sont impliqués dans la phagocytose. Quatre types de plasmocytes peuvent être distingués sur base de critères morphologiques.

Les prohémocytes sont de plus petites cellules possédant un réticulum endoplasmique granuleux particulièrement développé. Elles représentent environ 5 % des hémocytes chez l'adulte âgé d'un jour.

Les granulocytes doivent leur nom aux divers granules pouvant être observés dans leur cytoplasme. Chez certaines abeilles, plus âgées, le cytoplasme contient également des vacuoles renfermant des lipides. Les filipodia et les lamellipodia des granulocytes leur permettent de s'arrimer fermement. Ces cellules sont impliquées dans la formation de nodules. Les granulocytes représentent 10 % des hémocytes chez l'adulte d'un jour mais cette proportion diminue jusqu'à atteindre environ 1 % chez les plus vieilles abeilles.

Les coagulocytes sont impliqués dans la formation de nodules ainsi que dans la coagulation. La proportion d'hémocytes qu'ils représentent est estimée selon les noyaux libres observés dans l'hémolymphe, considérés comme les reliquats des coagulocytes.

### 3.2.1.2 Phagocytose

Ce processus consiste en un confinement dans un compartiment cellulaire, ou phagosome, de petites particules cibles, détectées par liaison à un récepteur. Ces particules sont ensuite digérées par l'introduction d'effecteurs dans le phagosome.

### 3.2.1.3 Microaggrégation et formation de nodules

Les hémocytes peuvent progressivement former un agrégat en s'attachant aux pathogènes (bactéries) rencontrés. Cet agrégat grandit ensuite jusqu'à former un nodule, dont la dernière couche d'hémocytes induit la mélanisation.

### 3.2.1.4 Encapsulation

Lorsque la taille du « pathogène » ne permet pas la phagocytose, comme un œuf de parasitoïde, des hémocytes différenciés en lamellocytes peuvent former plusieurs couches autour de lui (Gillespie et al., 1997). L'encapsulation conduit à la mélanisation du pathogène.

## 3.2.2 *L'immunité humorale*

### 3.2.2.1 Mélanisation et (pro)phénoloxydases

La réaction de mélanisation est une réponse immunitaire importante chez les arthropodes (Cerenius, 2008). La mélanine est un pigment noir utilisée par l'organisme pour confiner un corps reconnu comme exogène, et retarder ou empêcher sa croissance dans le cas des pathogènes (Cerenius & Söderhäll, 2004). Ce pigment est synthétisé suite à une réaction produisant des intermédiaires très toxiques, notamment des quinones, par oxydation de phénols via une enzyme. Celle-ci est appelée Phénoloxydase (PO) et est conservée sous forme d'un précurseur (ou zymogène) inactif : la prophénoloxydase (proPO). La proPO est produite par les hémocytes circulants, et une synthèse par les cellules épidermiques est également suggérée (Colonello, 2003 ; Zufelato 2004). La proPO est activée dans l'hémolymphe suite à une cascade protéolytique faisant intervenir une protéase à sérine. Ashida et Brey (1995) ont montré la présence de cette cascade enzymatique dans la cuticule. Outre son activité immunitaire, cette enzyme intervient dans la sclérotisation de la cuticule et dans la pigmentation de tissus (Lourenço et al., 2005). La phénoloxydase peut être détectée à tous les stades de développement et son activité augmente avec l'âge de l'abeille (Schmid et al., 2008 ; Wilson-Rich et al., 2008).

### 3.2.2.2 Coagulation

Le mécanisme de coagulation est induit suite à une blessure, même en l'absence d'éliciteurs microbiens. Son rôle est double : limiter la perte d'hémolymphe ainsi que l'entrée et la dispersion de pathogènes. L'intervention de composantes des immunités humorale et cellulaire est nécessaire pour le déroulement complet de ce mécanisme.

### 3.2.2.3 Peptides antimicrobiens

Différents peptides antimicrobiens sont synthétisés par le tissu adipeux et les hémocytes dans l'hémolymphe. On y distingue ainsi les apidaecines, les abaecines, les defensines et les hymenoptaecines.

Dans la gelée royale, trois types de peptides antimicrobiens ont été identifiés : une défensine (la royalisine), les jelleines, et l'apisimine. Ce dernier peptide ne possède pas d'activité antimicrobienne mais forme un complexe avec l'apalbumine, et serait impliqué dans l'activation de mécanismes cellulaires (Bilikova et al., 2002).

### 3.2.2.4 Lysozyme

Le lysozyme, présent dans l'hémolymphe, agit contre les bactéries en brisant certaines liaisons dans les peptidoglycanes des bactéries Gram-positives (Adamo, 2004).

## 3.2.3 Voies de signalisation

### 3.2.3.1 JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT est impliquée dans la réponse d'encapsulation et dans la prolifération des hémocytes. Les facteurs auxquels aboutit cette voie de signalisation n'auraient pas d'activité antimicrobienne directe, mais interagiraient avec l'immunité cellulaire. Chez *D. melanogaster*, cette voie est activée via une protéine glycosylée extracellulaire apparentée aux cytokines, Upd, lorsqu'elle forme un complexe avec le récepteur transmembranaire à cytokine Domeless. Le ligand n'a pas été décelé chez *A. mellifera* bien que se soit le cas du récepteur. Le complexe formé active une janus kinase (just another kinase, JAK) associée au récepteur, qui phosphoryle ensuite un résidu tyrosine du récepteur. Le transducteur de signal et activateur de transcription (signal transducer and activator of transcription, STAT) STAT92E reconnaît ce résidu phosphotyrosine. Une fois lié, STAT est lui-même phosphorylé par la JAK au niveau d'un résidu tyrosine. Des dimères de STAT se forment ensuite et pénètrent dans le noyau où ils influencent la transcription de gènes cibles. Parmi les facteurs dont l'expression est induite par cette voie

chez la drosophile (Agaisse et Perrimon, 2004), aucun facteur tot n'est présent chez *A. mellifera* (Evans et al., 2006).

Chez *D. melanogaster*, Dostert et collègues (2005) ont mis en évidence un gène, baptisé *vir-1*, fortement sollicité suite à une infection par le virus C de la drosophile (Drosophila C Virus, DCV). Un fragment du promoteur de ce gène possède une région de liaison pour le facteur de transcription STAT92E (Hou et al., 1996 ; Yan et al., 1996), indiquant l'implication de cette voie de transduction chez *D. melanogaster* en réaction au DCV.

### 3.2.3.2 Toll

Les récepteurs Toll et apparentés (Toll-like receptor, TLR) sont des protéines transmembranaires de transduction de signal impliqués dans l'immunité et le développement chez les insectes (Evans et al., 2006 ; Beckage, 2008). Ce type de récepteur ne reconnaît pas lui-même les motifs moléculaires des pathogènes. Cette reconnaissance du non-soi s'effectue en amont par des récepteurs de l'immunité innée (Pattern Recognition Receptor, PRR). Le ligand extracellulaire des récepteurs Toll, *spaetzle*, apparenté aux cytokines, forme alors un complexe avec son récepteur, entraînant une cascade enzymatique aboutissant à l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la défense. Le génome de *Apis mellifera* possède au moins cinq TLR (Aronstein & Saldivar, 2005) et deux orthologues plausibles de *Spaetzle* (Evans et al., 2006).

### 3.2.3.3 Imd et JNK

La voie de signalisation Imd est activée par PRR, qui reconnaît principalement les bactéries Gram-négatives. Elle conduit à l'activation d'un autre facteur cellulaire que la voie des récepteurs Toll, ainsi que certains composants de la voie de signalisation JNK (Boutros et al., 2002).

## 3.3 Les défenses contre les virus

### 3.3.1 Mort cellulaire programmée

Le statut de parasite obligatoire du virus pour permettre sa survie et a fortiori sa multiplication, fait de la mort cellulaire programmée, ou apoptose, un mécanisme important

contre l'infection virale. Une étude réalisée sur un baculovirus exprimant une protéine « apopto-suppressive » et sur des mutants déficients à ce niveau (Lee et al., 1998), a démontré l'importance de ce mécanisme. La drosophile possède un récepteur, homologue au CD36, exprimé par le gène *croquemort* au niveau des macrophages et qui entraîne la phagocytose des cellules apoptotiques (Franc et al., 1999).

### **3.3.2 Hémocytes**

Les hémocytes peuvent également jouer un rôle dans la défense contre les infections virales. Trudeau et collègues (2001) ont montré que la susceptibilité de deux espèces de papillons envers un baculovirus dépendait notamment de la capacité des hémocytes à empêcher la réplication du virus en eux. En préservant leur intégrité, ils permettent une encapsulation efficace du virus.

### **3.3.3 Phénoloxydases**

Popham et collègues (2004) ont montré l'activité antivirale d'une phénoloxydase dans une réaction contre un baculovirus chez des lépidoptères.

### **3.3.4 Interférence ARN**

L'interférence ARN est un mécanisme de défense très ancien puisqu'on le retrouve au sein des règnes végétal et animal. La formation d'ARN double brin déclenche la dégradation de l'ARN visé. Ce mécanisme est très important dans la réponse antivirale chez la drosophile (Kemp & Imler, 2009).

### **3.3.5 Phérokines**

Les phérokines (phk) sont des petites protéines sécrétées dans l'hémolymphe ou au niveau de la région olfactive de l'antenne (Sabatier et al., 2003). Chez la drosophile, certaines phérokines sont induites en réponse à une infection par un virus (phk-2) ou par des bactéries (phk-3). Des molécules apparentées ont été identifiées chez d'autres insectes, notamment les hyménoptères.

## **4 Lutte contre les virus : sélection et amélioration**

Afin de réduire l'impact des maladies virales sur les abeilles, la sélection de résistances ou de tolérances est jusqu'à présent la solution majeure.

L'obstacle principal réside dans le fait que l'évaluation et la sélection de ces caractères nécessitent un processus très long. De plus, l'accouplement en vol, établi par Janscha en 1771, complique fortement son contrôle, et par conséquent, la sélection et l'amélioration des races (Winston, 1987). Une solution consiste à importer la reine vierge et la colonie « à bourdons » sur un lieu, une île par exemple, dépourvu de colonies d'abeilles (Laidlaw & Page, 1997 ; Harris et al., 2002). Selon Newmann et collègues (1999), cette technique ne serait toutefois pas infaillible. Des techniques d'insémination artificielle ont été développées mais requièrent beaucoup de travail et de compétences. Elles ne peuvent s'appliquer à des programmes de croisement à grande échelle (Moritz & Kühnert, 1984).

Chez l'abeille, les stratégies de sélection doivent tenir compte d'un niveau supérieur à celui de l'individu. En effet, la colonie est considérée comme un superorganisme, possédant un phénotype particulier (Moritz & Southwick, 1987 ; Bienefeld & Pirchner, 1991 ; Boecking et al., 2000) et dony deux ans.

Dans le cas particulier de la sélection de résistances contre des maladies ou des pathogènes, la standardisation des conditions d'infection augmente considérablement la complexité de la procédure. La lignée résistante durement obtenue peut être facilement corrompue par un accouplement non contrôlé. Or, le maintien perpétuel de la même lignée peut engendrer des problèmes d'homozygotie notamment. Ceci souligne précisément les gènes intervenant dans la résistance aux pathogènes. Ces gènes peuvent en outre conditionner le comportement, avec un impact au niveau de la colonie, ou intervenir dans les défenses individuelles de l'insecte.

Le comportement hygiénique des ouvrières influence les maladies du couvain, et notamment sa contamination par des virus. (plus de détails par ex CBPV-fèces ?) En 1964, Rothenbuhler découvrit les premiers composants génétiques du comportement hygiénique chez *A. mellifera*. Depuis, sept loci se sont vus attribuer un rôle dans cet aspect du comportement de l'abeille (Moritz, 1988 ; Lapidge et al., 2002). Du point de vue phénotypique, le comportement hygiénique des ouvrières peut être évalué par leur capacité à éliminer les larves, tuées par le froid, sur une période donnée (Spivak & Reuter, 2001). Par ailleurs, une basée sur l'hygiène effectuée par Harbo et Harris (2005) a permis d'obtenir des abeilles capables d'ôter le parasite *V. destructor* des cellules.

Les mécanismes de défense individuels, dont le système immunitaire, sont également très importants dans une optique de sélection de résistance (Chen et al., 2000 ; Evans, 2004). De nombreuses études ont été menées sur d'autres insectes, comme *Drosophila*

*melanogaster* (Hultmark, 2003 ; Imler & Hoffmann, 2003). Les études réalisées antérieurement sur *D. melanogaster* notamment, dont le séquençage de son génome, forment les bases des connaissances sur l'immunité des insectes.

Des prospections sont actuellement menées parmi les sous-espèces indigènes de plusieurs continents, afin de révéler d'éventuelles résistances chez *A. mellifera*.

## 5 Protéomique

La protéomique est l'étude de l'ensemble des protéines exprimées au niveau d'un organe, d'un tissu, d'une cellule ou d'un organite, à un moment défini. Le protéome est représentatif du réel fonctionnement plus ou moins localisé du génome. En effet, les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles que peuvent subir respectivement l'ARN prémessager et les protéines sont prises en compte. Cependant, ces techniques restent complémentaires.

Chan et collègues (2006), ont décrit les protéomes de l'hémolymphe d'*Apis mellifera* en fonction de la caste, et constitué des bases de données à partir de ceux-ci.

La diversité des rôles remplis par l'hémolymphe et les nombreuses réactions qui s'y déroulent complexifient l'étude d'une voie particulière. D'autre part, ce carrefour de multiples fonctions offre la possibilité d'étudier les interactions entre ces différentes voies.

Un autre protéome pertinent pour l'étude des réactions immunitaires et l'impact d'une infection sur le métabolisme de l'insecte est celui de la tête. L'expression différentielle de protéines au niveau de la tête d'abeilles suite à une infection par une bactérie a déjà fait l'objet d'une étude (Scharlaken, 2008). Les protéines dont l'expression varie suite à cette infection sont très diverses : protéines structurales, protéines intervenant dans l'olfaction, la transduction de signaux, le métabolisme énergétique, la réponse au stress, ou encore des protéines trouvées dans la gelée royale.

## **Matériel et méthodes**

### **1 Optimisation des méthodes de prélèvement et d'extraction des protéines de l'hémolymphe**

#### **1.1 Prélèvement**

Le premier objectif de cette mise au point fut de déterminer la méthode de conservation des échantillons d'abeilles permettant le prélèvement optimum d'hémolymphe tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

Pour ce faire, des abeilles domestiques ont été prélevées vivantes dans une ruche de l'unité d'entomologie fonctionnelle et évolutive de la Faculté des sciences agronomiques de Gembloux. Trois lots d'abeilles ont été constitués. Le premier comprend des abeilles maintenues vivantes et les deux autres ont été respectivement conservés à -20°C et à -80°C.

L'hémolymphe a ensuite été prélevée à l'aide de tubes micro-capillaires (2, 5, ou 10 µl) entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> tergite après perforation de l'hémocoele grâce à un aiguillon. L'hémolymphe est directement recueillie dans un tube eppendorf de 2 ml contenant du tampon d'extraction (1.2) et le tout est déposé sur glace le temps du prélèvement de l'échantillon. Dans le cas des abeilles vivantes, et afin de faciliter les manipulations, les insectes ont été préalablement engourdis par le froid.

Les critères retenus pour l'évaluation des prélèvements sont l'aspect de l'hémolymphe, le volume d'hémolymphe prélevé, le taux de protéines, la conservation des échantillons, et l'aspect des gels sur lesquels les protéines ont été séparées selon une ou deux dimensions.

Dans un premier temps, lorsque le liquide prélevé n'était pas translucide, mais opaque et de couleur brunâtre, l'échantillon a été écarté. Cela correspondait en effet à une contamination de l'hémocoele par perforation du tube digestif.

#### **1.2 Extraction des protéines**

Deux tampons ont été testés pour l'extraction des protéines de l'hémolymphe. Un tampon PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dans 800 ml d'eau distillée) auquel des inhibiteurs de protéases (Complete™, Roche) ont été adjoint, et un tampon « UTC » (Urée 8M, Tris 40mM, CHAPS 4%). Les critères pour l'évaluation de ces tampons d'extractions de protéines sont le dosage des protéines, la conservation des

échantillons et l'aspect des gels sur lesquels les protéines ont été séparées selon une ou deux dimensions.

Les échantillons prélevés ont subi une sonication de 3 fois 5 secondes avec un intervalle de 10 secondes sur glace, avant d'être entreposés à -80°C.

### **1.3 Précipitation des protéines**

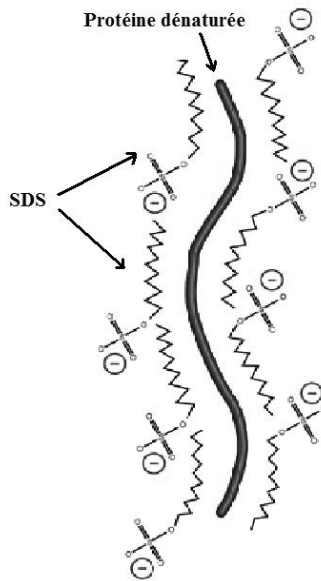
Les échantillons récoltés ne contiennent pas uniquement des protéines, on y retrouve notamment des acides nucléiques, des sels, et des acides gras. Afin de ne conserver que les molécules d'intérêt, les contaminants sont donc éliminés grâce au 2D Clean-up kit (Amersham). Les protéines précipitées sont suspendues dans un tampon, qui est fonction de l'étape suivante, à savoir la focalisation isoélectrique (IEF), ou le marquage aux CyDyes™, celui-ci nécessitant un pH particulier.

### **1.4 Quantification des protéines**

Une fraction de chaque échantillon est prélevée afin de doser les protéines, à l'aide du kit RC DC protein assay (Bio-Rad). Ce test colorimétrique est basé sur la méthode de Lowry (1951), avec des améliorations permettant notamment la compatibilité avec les détergents.

### **1.5 Séparation des protéines**

Les techniques de séparation de protéines employées dans le cadre de ce travail sont des électrophorèses sur gels de polyacrylamide et sodium dodecylsulfate (SDS). Ces techniques sont couramment appelées SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Elles sont basées sur le principe suivant : le SDS, un détergent anionique, entoure les protéines dont il favorise la dénaturation. Il forme un manteau uniforme chargé négativement sur toute la longueur de la protéine, procurant à celle-ci une charge proportionnelle à sa masse moléculaire (Figure 2). Cette charge est utilisée pour faire migrer les protéines à travers un champ électrique. L'acrylamide polymérisée forme un tamis moléculaire et freinant davantage la migration des protéines de plus haut poids moléculaire.



**Figure 2: Protéine dénaturée entourée de SDS**

Les protéines ont été séparées selon une ou deux dimensions. Il sera fait mention respectivement de gels 1D ou gels 2D. Pour les gels 2D, seule la seconde dimension de séparation est de type SDS-PAGE. La première dimension, ou focalisation isoélectrique, se base en effet sur la charge nette propre à la protéine (voir point 2.2.2.2). Les préparations de ces gels, ainsi que les méthodes d'électrophorèses employées sont décrites ci-après.

### **1.5.1 Electrophorèse 1D SDS-PAGE**

#### **1.5.1.1 Préparation des gels 1D SDS-PAGE**

Les gels 1D réalisés sont composés de deux parties, le gel de séparation et le gel de concentration, différant par leur concentration en acrylamide (Tableau 1). Le gel de séparation, plus concentré, présente un maillage plus serré, limitant d'autant plus la migration des protéines de haut poids moléculaire. Il permet une migration différentielle des protéines selon leur taille, et comme son nom l'indique, il favorise leur séparation en bandes distinctes. Le gel de concentration, dont le maillage est plus lâche, favorise l'entrée rapide des échantillons dans le gel, minimisant leur dispersion dans le tampon d'électrophorèse (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0.1%). Le gel de concentration permet une migration relativement uniforme des protéines malgré leur différents poids moléculaires. Celles-ci se tassent alors à la limite entre le gel de concentration et le gel de séparation, créant un front de migration plat et uniforme pour tous les échantillons du gel.

**Tableau 1: Composition des gels 1D SDS-PAGE**

<b>Gel de séparation</b>		<b>Gel de concentration</b>	
<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>	<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
Acrylamide/Bisacrylamide	5 ml	Acrylamide/Bisacrylamide	1,2 ml
Tris 1,5M/HCl pH 8,8	2,5 ml	Tris 1,5M/HCl pH 8,8	1,5 ml
Eau	2,3 ml	Eau	3,2 ml
SDS 10% (100 mg/ml)	10 mg	SDS10% (100 mg/ml)	6 mg
Homogénéisation sur agitateur magnétique			
TEMED	10 µl	TEMED	6 µl
APS	10 mg	APS	6 mg
Brève homogénéisation sur agitateur magnétique			

Les gels de polyacrylamide sont préparés selon le tableau suivant. Le TEMED (N,N,N',N'-Tetraméthyl-1-,2-diaminométhane) déclenche la réaction de polymérisation de l'acrylamide. L'APS (persulfate d'ammonium) est un catalyseur de cette réaction de polymérisation. Ces deux réactifs doivent donc être ajoutés à la solution juste avant de couler les gels.

Les plaques sont montées et l'étanchéité du système est vérifiée avec de l'eau désionisée. Le gel de séparation est coulé en premier lieu : 5 ml par gel, de sorte que la surface de ce gel se situe environ à 5 mm du peigne. Une solution de SDS 0,1% est ajoutée par dessus le gel de séparation pour aplanir sa surface lors de la polymérisation. Une fois le gel polymérisé, le SDS est éliminé, et la surface du gel est rincée à l'eau. Le gel de concentration est ensuite coulé et les peignes sont placés directement, afin de créer les puits dans le gel de concentration.

#### 1.5.1.2 Électrophorèse

Les gels polymérisés ont été placés sur leur support d'électrophorèse (Mini-Protean II™, Bio-Rad) et l'étanchéité du système a été vérifiée. Un tampon TGS a été coulé dans le compartiment entre les plaques ainsi qu'autour de ce compartiment, en veillant à ce que ces deux compartiments ne communiquent pas. L'électrophorèse est programmée sur 150 V, mais en fin de migration, le voltage peut être réglé à 200 V pour accélérer la séparation.

#### 1.5.2 Electrophorèse 2D

Lors d'une électrophorèse bidimensionnelle, les protéines sont séparées successivement selon deux dimensions, sur base de deux caractéristiques indépendantes : leur point isoélectrique et leur masse moléculaire. Cette séparation aboutit à la formation de spots protéiques.

### 1.5.2.1 Préparation des échantillons

Les objectifs de cette première étape sont multiples. La solubilisation et la dénaturation des protéines grâce au tampon conditionnent la représentativité de l'échantillon. L'urée rompt les ponts hydrogène et les liaisons hydrophobes. La dénaturation des protéines est favorisée par des agents réducteurs comme le dithiothreitol (DTT), qui rompt les ponts disulfures. Les détergents zwitterioniques, comme le 3- [(3 - Cholamidopropyl)diméthyl-ammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) ou l'amidosulfo-betaïne-14 (ASB14) favorisent la rupture des membranes, la solubilisation des lipides, la délipidation des protéines et inhibent les interactions hydrophobes. La thiourée augmente également la solubilité des membranes.

Le volume d'échantillon correspondant à la quantité de protéines à séparer est placé dans un tube eppendorf de 500 µl. Après une incubation de 20 minutes à l'obscurité avec du DTT 10% et de l'IPG buffer 2%, le volume est ajusté à 450 µl avec du tampon de réhydratation. Afin d'observer le bon déroulement de la focalisation isoélectrique, 1µl de bleu de bromophénol est ajouté à l'échantillon.

### 1.5.2.2 Focalisation isoélectrique

La première dimension de séparation des protéines se base sur leur point isoélectrique (PI), c'est-à-dire le pH auquel leur charge nette est nulle. Elle s'effectue sur des strips de polyacrylamide contenant un gradient de pH immobilisé (immobilized pH gradient, IPG), à travers lequel les protéines migrent jusqu'à leur PI, grâce à un champ électrique. Les strips utilisés sont les Immobiline™ DryStrip pH 3-11 NL de 24 cm (Amersham Biosciences).

Des morceaux de papier Whatman sont disposés sur les électrodes du strip holder (Protean IEF Cell, Bio-rad) et imprégnés d'un peu de tampon de réhydratation afin de permettre le contact avec les électrodes sans endommager les gels. Les échantillons sont ensuite placés sur la partie centrale du strip holder. Les strips, manipulés à l'aide d'une pince, sont déposés dans les sillons du strip holder. Les éventuelles bulles sont évacuées en exerçant de légères pressions sur les strips. Dans chaque sillon, 2 ml de cover fluid (huile minérale) sont déposés.

**Tableau 2: programme de focalisation isoélectrique**

Phase	Voltage	Durée
Réhydratation passive	0 V	9h
Elimination des sels	200 V	2h montée rapide
	200 V → 1000 V	4h montée linéaire (en 4h)
	1000 V → 10000 V	1h montée linéaire (en 1h)
Focalisation	10000 V	5h30

### 1.5.2.3 Seconde dimension (SDS-PAGE)

La seconde migration sépare les protéines selon leur poids moléculaire, grâce à la charge fournie par le SDS et à un champ électrique. Cette migration s'effectue à travers un gel de polyacrylamide 12% sur le dessus duquel est déposé le strip.

#### Préparation des gels de polyacrylamide 12%

Les gels de polyacrylamide 12% sont préparés selon le tableau 3. Les remarques concernant le TEMED et l'APS au point 2.2.1.1 sont également d'application pour ces gels.

**Tableau 3: Préparation des gels 2D SDS-PAGE**

Nombre de gels:	1	2	3	4	5	6
<b>Acrylamide/Bis-acrylamide (ml) 30%</b>	<b>33,4</b>	<b>66,7</b>	<b>100</b>	<b>133,4</b>	<b>166,8</b>	<b>200</b>
<b>Tris 1,5M pH8,8 (ml)</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>120</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> froide (ml)</b>	<b>25,2</b>	<b>50,5</b>	<b>76,3</b>	<b>101</b>	<b>127,2</b>	<b>152,6</b>
<b>SDS 10% (ml)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Homogénéiser quelques minutes sur agitateur magnétique						
Dégazer 20 à 30min avec une pompe à vide (la mise et le retrait du bouchon se fait robinet ouvert).						
<b>APS 10% (ml)</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>1,2</b>	<b>1,6</b>	<b>2</b>	<b>2,4</b>
<b>TEMED (µl)</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>120</b>	<b>160</b>	<b>200</b>	<b>240</b>
Homogénéiser doucement sur agitateur magnétique						
Volume total (ml)	80	160	240	320	400	480

Les gels coulés polymérisent pendant au moins 4 heures dans l'Ettan DALT gel casting cassette (GE Healthcare). Pour éviter qu'ils ne se déshydratent et pour aplanir leur surface, 1 ml d'isobutanol saturé en eau ou 1 ml de SDS 0,1% est déposé par dessus.

#### Équilibration

Les strips doivent passer par une étape d'équilibration avant la seconde séparation. L'équilibration comporte une phase de réduction des protéines à l'aide de DTT, qui brise

les ponts disulfures et une phase d'alkylation à l'aide d'iodoacétamide (IAA), afin d'éviter que des ponts disulfures ne se reforment. Cela permet au sodium dodécyl sulfate (SDS) de charger négativement les protéines proportionnellement à leur longueur.

Les strips sortant de l'IEF sont rincés à l'eau désionisée, et déposés dans un strip holder. Chaque strip est laissé à incuber 15 minutes sous agitation dans 4 ml de solution de réduction (urée 36% w/v, tris 3,375% v/v, Glycérol 30% , SDS 2% w/v, DTT 40 mg par strip). Les strips sont ensuite rincés et laissés à incuber 15 minutes sous agitation chacun dans 4 ml de solution d'alkylation (urée 36% w/v, tris 3,375% v/v, Glycérol 30%, SDS 2% w/v, IAA 100 mg par strip).

### Electrophorèse

Les strips sont rincés dans du tampon TGS (25 mM de Tris, 122 mM de glycine, 0,1% w/v de SDS) et déposés sur le coté supérieur des gels de polyacrylamide 12%. Les éventuelles bulles sont chassées. Les strips sont stabilisés à la surface du gel grâce à une solution d'agarose 0,5% préalablement chauffée. Un peu de bleu de bromophénol est ajouté à la solution d'agarose, afin de visualiser le front de migration.

Les plaques sont posées sur le portoir de la cuve Ettan DALTsix electrophoresis system (GE Healthcare), et le tout est introduit dans la cuve. L'électrophorèse se déroule généralement en deux phases. Lors de la première phase, les protéines quittent le strip IPG et entrent dans le gel de polyacrylamide 12%. Lors de cette phase, la puissance est réglée typiquement sur 1 ou 1,5 Watt/gel. En fin de migration, la séparation peut être accélérée en réglant la puissance jusqu'à 25W/gel mais pour un total de 100 watt maximum.

## **1.6 Révélation des spots protéiques**

Différentes méthodes de coloration existent pour visualiser les protéines sur le gel. Elles se distinguent par leur sensibilité, leur reproductibilité, leur échelle dynamique de sensibilité et leur coût. Les méthodes utilisées dans le cadre de la mise au point sont celles au nitrate d'argent et au bleu de Coomassie (R-250 et G-250).

### **1.6.1 Coloration au nitrate d'argent**

La coloration au nitrate d'argent (Tableau 4) est une méthode très sensible et assez rapide. Elle est par contre assez peu reproductible et possède une échelle dynamique assez faible.

**Tableau 4: Protocole de coloration au nitrate d'argent**

Etape	Solution et <b>Quantité</b> (pr 400 ml/ 1 gel)	Durée (minutes)
Fixation	Ethanol 30% v/v <b>120 ml</b> Acide acétique 10% v/v <b>40 ml</b>	20 min minimum
Rinçage	Ethanol 50% <b>200 ml</b>	10 min
Rinçage	H <sub>2</sub> O	10 min
Sensibilisation	Thiosulfate de Sodium 0,02% w/v <b>0,08 g</b> <b>ou 0,12 g</b> si pentahydraté Méthanol 20% <b>80 ml</b> Acétate de Sodium 6,8% w/v <b>27,2 g</b>	1 min
Rinçage	H <sub>2</sub> O	2 x 1 min
Coloration	Nitrate d'Argent 0,1% w/v <b>0,4 g</b> Formaline 0,04% v/v <b>400 µl</b>	20 min
Rinçage	H <sub>2</sub> O	2 x 1 min
Développement	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2% w/v <b>20 g</b> (préparer 1l!) Formaline 0,04% v/v <b>400 µl</b>	par petites quantités*
Lavage (et arrêt)	Acide acétique 5% v/v <b>40 ml</b>	20 min minimum
Conservation (4°C)	Acide acétique 5% v/v <b>40 ml</b>	

\*: la solution doit être renouvelée lorsqu'elle arrive à saturation

Solutions devant être préparées le jour de la coloration et conservées à l'obscurité.

### **1.6.2 Coloration au Bleu de Coomassie R-250**

La coloration au bleu de Coomassie R-250 est 10 à 20 fois moins sensible que la coloration au nitrate d'argent, mais elle est par contre plus reproductible.

Les gels sont placés 1h dans une solution de coloration (30% v/v méthanol, 10% v/v acide acétique, 1 g/l de bleu de Coomassie R-250) sur plaque agitatrice. Les gels sont ensuite décolorés 3 fois 10 minutes dans une solution de décoloration (30% v/v méthanol, 10% v/v acide acétique) sur plaque agitatrice. Lors de la décoloration, un morceau de papier Törk est placé dans la boîte pour absorber le bleu et favoriser la décoloration du gel. Les gels peuvent être conservés dans une solution d'acide acétique (5% v/v), à 4°C.

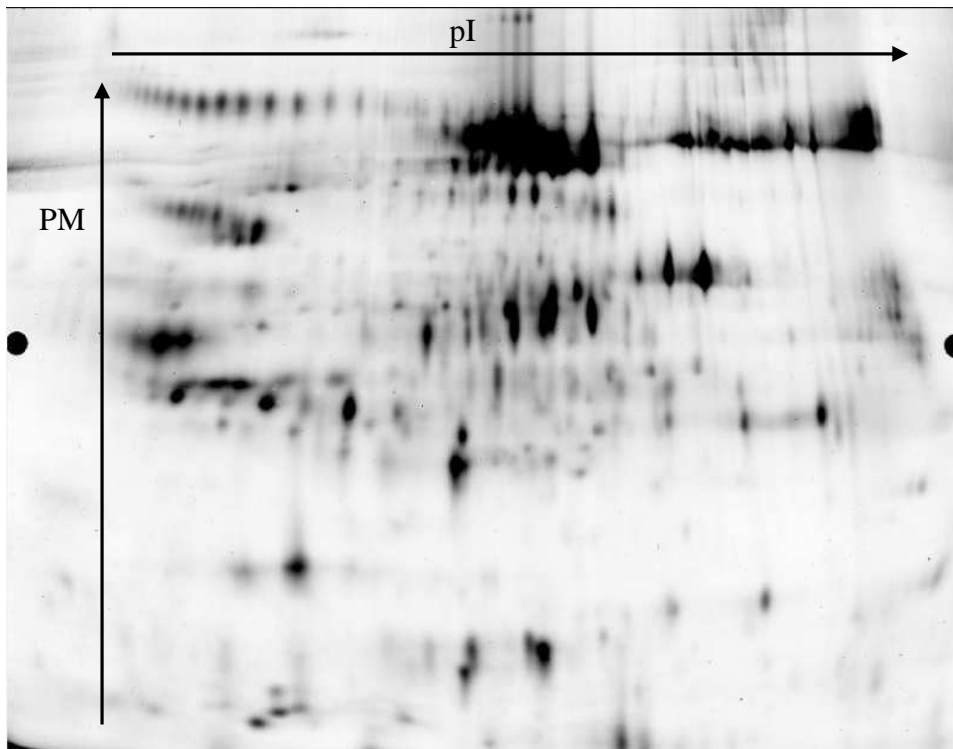
### **1.6.3 Coloration au Bleu de Coomassie colloïdal G-250**

La sensibilité du Bleu de Coomassie colloïdal G-250 se situe entre 20 et 40 ng. L'avantage du bleu G-250 par rapport au R-250 est que le bruit de fond peut être complètement éliminé.

Les gels sont fixés au moins 3h (ou la nuit), sur plaque agitatrice, dans une solution de fixation (50% éthanol, 3% acide phosphorique). Les gels sont rincés trois fois 20 minutes dans de l'eau désionisée. Ils sont ensuite placés une heure dans une solution de préincubation (34% v/v méthanol (à ajouter en dernier), 3% v/v acide phosphorique (85%), 17% w/v sulfate d'ammonium). Une petite quantité est prélevée pour accélérer et homogénéiser la mise en suspension des 53 mg/l de bleu de Coomassie colloïdal G-250. Après une heure, le bleu de Coomassie colloïdal est réparti dans les deux boîtes contenant les gels. La coloration est maximum après 4 ou 5 jours. Le bruit de fond peut être atténué par un lavage à l'eau désionisée.

### **1.6.4 Présentation des gels 2D**

La Figure 3 représente un gel obtenu par électrophorèse de type 2D. Tous les gels présentés dans ce travail sont disposés de façon identique : les valeurs de pI croissent horizontalement de gauche à droite, et les poids moléculaires sont décroissants du bas vers le haut.



**Figure 3: Représentation des gels 2D**

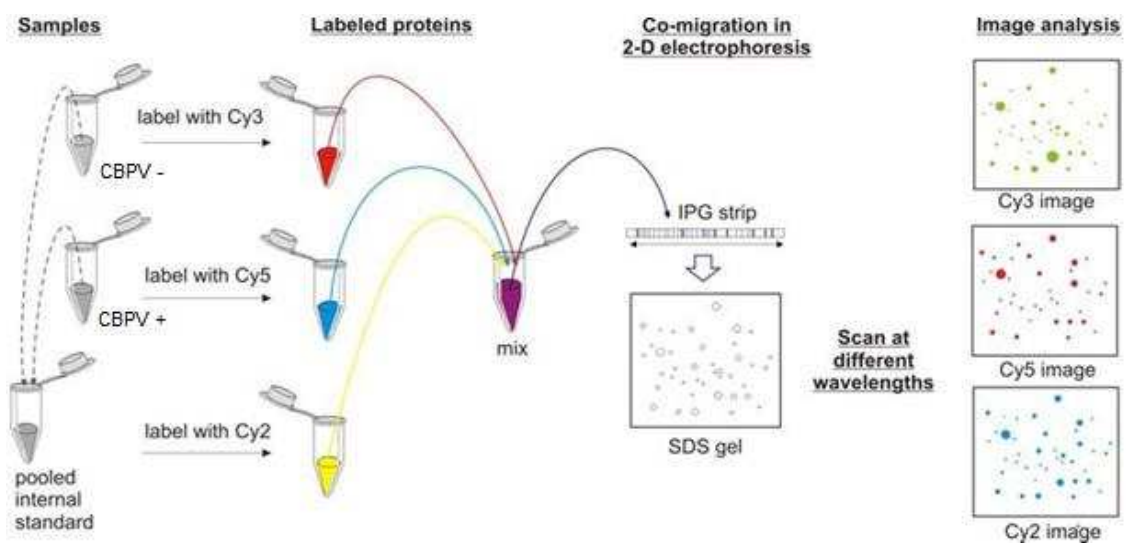
## **2 Expression protéique différentielle dans l'hémolymphe de *A. mellifera* suite à une infection par le CBPV**

Les protéomes d'hémolymphe et d'abeilles saines et infectées par le virus de la paralysie chronique, sont comparés grâce à une méthode particulière d'électrophorèse à deux dimensions : le 2D-DIGE.

Le 2D-DIGE (2 Dimension-Differential In Gel Electrophoresis) est une méthode d'électrophorèse à deux dimensions utilisée pour la comparaison qualitative et quantitative d'échantillons protéiques. Elle se distingue des méthodes décrites au point 1.5.2, à différents niveaux.

Tout d'abord, la méthode de révélation des spots protéiques utilise des marqueurs fluorescents, offrant une très grande sensibilité, ainsi qu'une échelle dynamique importante. Ce marquage est par ailleurs réalisé préalablement à la focalisation isoélectrique.

Ensuite, cette technologie permet de charger deux échantillons sur le même gel, marqués à l'aide de fluorophores distincts (Figure 4), éliminant ainsi la variabilité entre gels lors de la comparaison de ces deux échantillons (Figure 5).



**Figure 4: Echantillons chargés dans un gel 2D-DIGE**

Enfin, cette méthode présente l'avantage d'incorporer au sein de chaque gel un échantillon standard, constitué de quantités égales de chacun des échantillons de tous les gels de l'expérience. Ce standard interne « poolé » permet la comparaison des différents gels de l'expérimentation, c'est-à-dire des répétitions biologiques (Figure 5). Ce standard est marqué avec un troisième fluorophore. Chaque gel comporte donc trois échantillons marqués avec trois fluorophores différents.

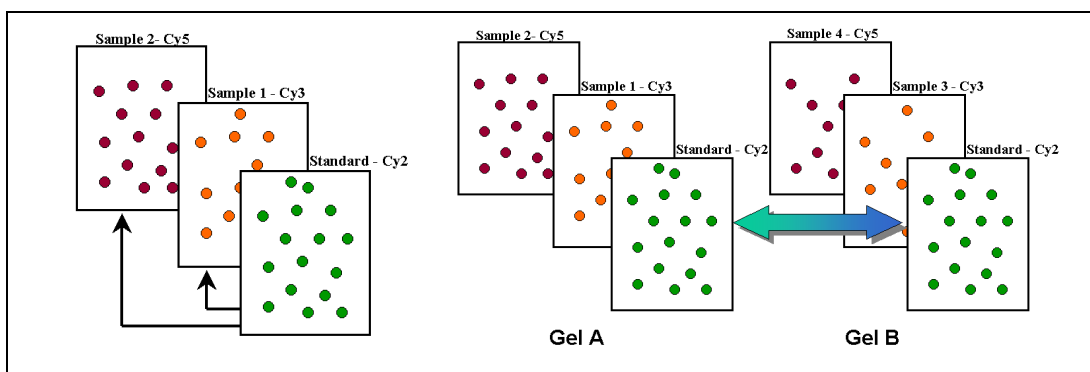


Figure 5 : Comparaison des échantillons intra-gel (à gauche) et inter-gels (à droite)

La masse et la charge des trois marqueurs sont telles que la migration des protéines n'est pas modifiée selon le marquage. Les spectres des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des fluorophores se recouvrent peu, de manière à pouvoir analyser chaque signal indépendamment (Figure 6). Des filtres d'émission sont appliqués pour s'assurer que le signal enregistré par le système optique ne provienne que du fluorochrome excité. Les marqueurs fluorescents utilisés sont les trois CyDyes™ (Cy2™, Cy3™, Cy5™, Amersham Biosciences).

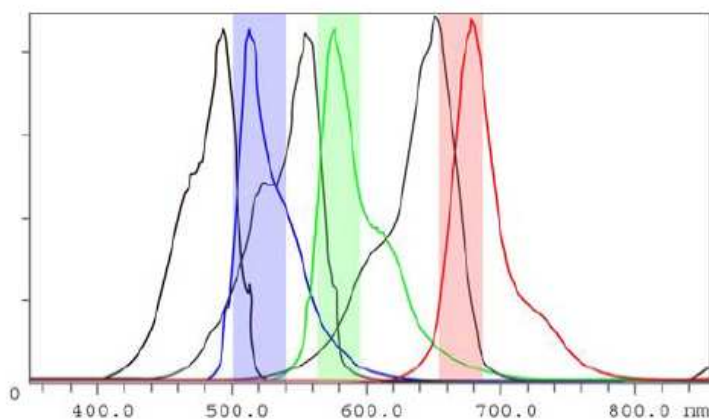


Figure 6: Spectres des longueurs d'onde d'excitation (courbe noire), d'émission (courbe bleue: Cy2; courbe verte: Cy3; courbe rouge: Cy5), et filtres d'émission correspondants.

Tableau 5: Longueurs d'onde des filtres d'émission et caractéristiques des trois CyDyes

Fluorophore	Emission Filter (nm)	Laser
Cy2	520 BP 40	Blue2 (488)
Cy3	580 BP 30	Green (532)
Cy5	670 BP 30	Red (633)

## 2.1 Plan expérimental

Chaque gel contient un échantillon protéique d'hémolymphe d'abeille infectée par le CBPV (CBPV+), un échantillon d'abeille saine (CBPV-), ainsi qu'un standard interne

(Figure 4). Quatre gels ont été réalisés pour l'hémolymphe ainsi que pour les têtes d'abeilles. Le standard interne est marqué avec le Cy2™ dans tous les gels, tandis que chacun des deux autres échantillons est marqué alternativement avec un des deux autres fluorophores. Cette alternance de combinaison « échantillon-fluorophore », appelée Dye switch, sert à éviter les artefacts dus au marquage préférentiel de certaines protéines avec le Cy3™ ou le Cy5™.

## **2.2 Matériel biologique**

Deux lots de 40 abeilles ont été utilisés : un lot d'abeilles inoculées avec le virus de la paralysie chronique de l'abeille, et un lot d'individus sains, chacun répartis en 4 groupes de 10 individus . Ces abeilles proviennent du Laboratoire de Recherche sur la Pathologie des petits Ruminants et de l'Abeille (AFSSA, Sophia Antipolis). Durant le prélèvement, les échantillons récoltés ont été maintenus sur glace, et ce afin de minimiser la dégradation des protéines.

## **2.3 Extraction des protéines**

L'extraction des protéines se déroule comme décrite au point 1.2. Les prélèvements d'hémolymphe ont été réalisés de façon à ce que celle-ci soit récoltée le plus rapidement dans le tampon. En effet, lors de la mise au point, des problèmes de dégradation des échantillons ont parfois été rencontrés. C'est pourquoi les échantillons ont été récoltés dans le tampon avant que le tube capillaire ne soit rempli.

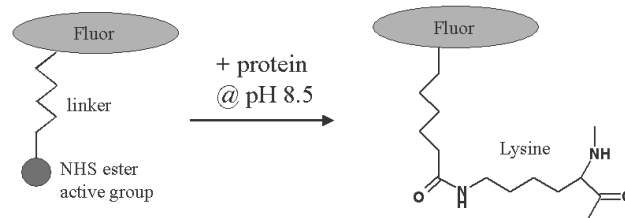
## **2.4 Précipitation des protéines**

La précipitation des protéines est effectuée de la même manière qu'au point 1.3. Cependant, étant donné que les échantillons doivent subir un marquage aux CyDyes, le tampon final contient également du Tris afin que le pH soit situé entre 8 et 9. Si le pH n'est pas suffisamment élevé, il peut être corrigé par un ajout de Tris 300mM.

## **2.5 Marquage aux CyDyes™**

Les solutions stock de CyDyes™ sont conservées à -80°C. Ces solutions sont diluées jusqu'à 100 pmol/μl pour le marquage des protéines. Parallèlement, les échantillons de protéines d'hémolymphe sont tous ramenés à une même concentration (2,41 μg/μl) afin de faciliter les étapes ultérieures. Les 12,5 μg d'échantillons sont marqués avec 100 pmol de

CyDyes™, pendant 30 minutes (Figure 7). Le marquage se fait à l'obscurité afin de préserver la fluorescence des CyDyes™. La réaction est stoppée à l'aide de 1 µl de lysine 10 mM. Cette étape est également effectuée à l'obscurité pendant 30 minutes. Après avoir réunis les trois échantillons d'un gel dans un tube eppendorf 0,5 ml, la suite du protocole est identique qu'à partir du point 1.5.2.1.



**Figure 7: Réaction de marquage aux fluorophores**

## **2.6 Séparation des protéines**

La focalisation isoélectrique, l'équilibration et la seconde dimension sont réalisées de manière identique au point 1.5.2. Toutefois, les échantillons sont préservés de la lumière tant que possible pour éviter toute perte de fluorescence.

## **2.7 Révélation des spots protéiques**

Les gels sont scannés à l'aide d'un scanner de type Typhoon 9400 (GE Healthcare). Cet appareil excite successivement les trois CyDyes™. Les voltages PMT (PhotoMultiplier Tubes) sont réglés pour obtenir une intensité maximale des spots protéiques, sans qu'ils ne saturent dans aucun des gels de l'expérience, ce qui est vérifié à l'aide du programme ImageQuant™ TL (GE Healthcare). La saturation du signal compromet l'analyse quantitative des spots protéiques. Pour les gels de protéome d'hémolymphe, les voltages PMT pour les Cy2™, Cy3™, et Cy5™ sont respectivement de 670V, 680V, et 650V. Ces réglages sont effectués lors de scans préliminaires rapides (10 minutes par paire de gels) à faible résolution (1000 µm). Les gels sont ensuite scannés à haute résolution (100 µm, une heure par paire de gels). Cette augmentation de résolution augmente également le signal, ce qui peut entraîner l'apparition de points de saturation. Il faut donc surveiller la prévisualisation des gels lorsqu'ils sont scannés à 100 µm.

Les voltages PMT pour le gel du protéome de têtes étaient de 710V, 685V et 690V respectivement.

## **2.8 Analyse d'image**

Les images de gels sont analysées avec le programme Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics). Ce programme permet de faire correspondre les signaux des échantillons standards de chaque gel entre eux ainsi que les signaux des échantillons marqués aux Cy3™ et au Cy5™ avec le signal de l'échantillon standard sur le même gel. Pour ce faire, des vecteurs sont générés automatiquement et manuellement pour aligner les gels. Une fois cet alignement réalisé, le signal de chaque spot d'un échantillon peut être comparé avec les signaux du spot analogue dans chaque échantillon de l'expérience. Les images des échantillons marqués aux Cy3™ et Cy5™ sont réparties par groupe selon l'expérience. Deux groupes sont comparés dans cette expérimentation : l'hémolymphe d'abeilles saine et celle d'abeilles infectées par le CBPV. Le programme détecte alors les zones dont l'intensité se dégage du bruit de fond et plus particulièrement, celles dont l'intensité varie statistiquement entre deux groupes d'échantillons ( $p$ -valeur  $\leq 0,05$ ). Les spots candidats sont vérifiés manuellement car des signaux parasites, comme des poussières sur la plaque lowF, peuvent être considérés comme des spots par le programme. Cette vérification consiste à observer les représentations des spots candidats, générées par le programme en deux et en trois dimensions et à éliminer celle ne présentant pas l'aspect d'un spot protéique.

## **2.9 Spot picking**

La liste de spots candidats à l'identification en spectrométrie est réalisée à la suite de l'analyse des images des gels dans le programme Progenesis SameSpots. Cette liste est transmise via fichier électronique à l'automate Ettan™ spot picker (GE Healthcare), sous forme de coordonnées. Les spots excisés sont récoltés à l'aide de deux plaques de 96 puits.

## **2.10 Digestion des protéines**

Le liquide est éliminé des puits par une brève centrifugation des plaques (30 secondes à 2000 rpm). Les morceaux de gel sont rincés avec 30  $\mu$ l d'eau dispensés dans chaque puits à l'aide d'un Multipette® Plus (Eppendorf), et éliminés par centrifugation. Le rinçage est réalisé une seconde fois. Le but du rinçage est d'éliminer les reliquats de solution dans laquelle le gel était conservé. Celle-ci contient en effet 5% d'acide acétique, alors que la digestion à la trypsine se réalise en milieu basique. Les morceaux de gel sont ensuite déshydratés à l'aide de 30  $\mu$ l d'acétonitrile (ACN). Après centrifugation, 30  $\mu$ l de bicarbonate d'ammonium 25 mM sont déposés pour imprégner les morceaux de gel avec un

tampon basique et éliminer l'acidité résiduelle dans le gel. Une nouvelle déshydratation à l'ACN est réalisée, après quoi 3 µl d'une solution de trypsine (trypsine 2,5 ng/µl ; bicarbonate d'ammonium 25 mM) sont déposés dans chaque puits. Après une incubation de 20 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière, 5 µl de tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM sont ajoutés sans centrifugation. Les plaques sont recouvertes de parafilm et laissées à incuber la nuit à 32°C. Les échantillons ont ensuite été réhydratés avec 13 µl d'une solution ACN 50%, et acide formique 1%. La diminution du pH stoppe la réaction de digestion par la trypsine. Les peptides ont été laissés diffuser du gel vers la solution pendant la nuit, à 4°C, puis les plaques ont été centrifugées afin de récupérer le surnageant dans une plaque non trouée.

## **2.11 Identification des protéines**

Dans chaque puits, 2 µl de surnageant ont été prélevés et déposés sur une plaque MALDI (Bruker) de 384 puits dont la matrice a été préalablement déposée. Après un séchage, chaque puits a été lavé avec 5 µl de solution de lavage (acide trifluoroacétique 0,1%, phosphate d'ammonium monobasique 10 mM). Une fois les puits séchés, la plaque est placée dans son étui et entreposée à 4°C.

La plaque de 384 puits a été passée en spectrométrie de masse selon une analyse MALDI-TOF. La masse des peptides tryptiques est mesurée, et les données générées, ou empreintes peptidiques massiques, ont été comparées avec les séquences de peptides tryptiques du taxon métazoaires, via le moteur de recherche Mascot.

Les identifications ont été considérées comme significatives lorsque la valeur du mowse score atteignait 75. Les protéines proposées ont également été évaluées selon leur PI et leur masse afin de vérifier la correspondance avec le spot excisé. Lorsque la protéine proposée n'appartenait pas à *A. mellifera*, une recherche à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a été réalisée dans le genre *Apis*. Seules les protéines proposées possédant une e-value inférieure à  $10^{-5}$  ont été considérées. À nouveaux, les points isoélectriques et les masses moléculaires ont été confrontés avec la position du spot sur le gel.

### **3 Approche préliminaire à l'étude de l'expression protéique différentielle des segments corporels majeurs de *A. mellifera* suite à une infection par le CBPV**

Ce volet a été développé dans l'optique d'utiliser ces segments ou certains d'entre eux, afin d'apporter des informations complémentaires à l'étude de l'expression différentielle de protéines de l'hémolymphe suite à une infection par le CBPV.

#### **3.1 Prélèvement**

Les trois segments corporels majeurs testés provenaient d'abeilles vivantes, engourdies par le froid. Les ailes et les pattes ont été excisées du thorax préalablement à l'extraction des protéines, étant donné le peu d'intérêt qu'elles représentent dans le cadre de cette étude.

Des échantillons d'abeilles congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  ont été reçues du Laboratoire de Recherche sur la Pathologie des petits Ruminants et de l'Abeille (AFSSA, Sophia Antipolis). Une électrophorèse sur gel 1D des protéines extraites des têtes de ces abeilles a été effectuée afin de comparer ces échantillons à des échantillons non congelés ainsi qu'à des échantillons congelés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2 Extraction des protéines**

L'extraction de protéines de la tête, du thorax, et de l'abdomen d'abeilles a été testée avec les tampons PBS et UTC.

Chaque segment est excisé et récolté dans un tube eppendorf 1,5 ml contenant 150  $\mu\text{l}$  de tampon. L'échantillon est ensuite broyé manuellement pendant 5 minutes avec un « potter » adapté au tube. Pour un broyage optimal dans ces conditions, le volume de tampon ne doit pas dépasser 200  $\mu\text{l}$ . Une sonication est effectuée (3 fois 10 secondes, avec un intervalle de 15 secondes sur glace). Une centrifugation de 5 minutes à 12000xg entraîne les débris solides dans le fond du tube, permettant de récupérer les protéines en suspension dans le surnageant. Ce surnageant est déposé dans un tube eppendorf 2 ml et entreposé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **4 Analyse statistique**

Lors de l'optimisation de la méthode, les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du programme Minitab 15, en utilisant le modèle linéaire généralisé. Le seuil pour une p-valeur significative était de 0,05.

## **Résultats**

### **1 Optimisation de la méthode de prélèvement et d'extraction des protéines de l'hémolymphe**

Pour rappel, le but de cette mise au point consiste à déterminer certains paramètres du prélèvement d'échantillon et de l'extraction des protéines, afin d'optimiser leur déroulement. Les paramètres évalués dans un premier temps sont le mode de conservation des abeilles, et le tampon à employer pour l'extraction des protéines.

Trois modes de conservation des d'échantillons ont été testés : abeilles congelées à -20°C (C20), abeilles congelées à -80°C (C80), et abeilles prélevées vivantes, simplement engourdies par le froid (F).

Deux tampons d'extraction de protéines ont été comparés : un tampon PBS avec des inhibiteurs de protéases, et un tampon UTC.

L'évaluation de la qualité des prélèvements issus d'échantillons frais (F) ou conservés à -80°C ou -20°C a été basée sur les volumes prélevés par abeille, l'aspect de l'hémolymphe prélevée, le dosage des protéines, la conservation des protéines extraites à -20°C, et enfin l'aspect des gels obtenus par électrophorèse 1D ou 2D.

La qualité de l'extraction des protéines a été évaluée par le dosage des protéines, la conservation des échantillons, et la séparation des protéines par électrophorèse.

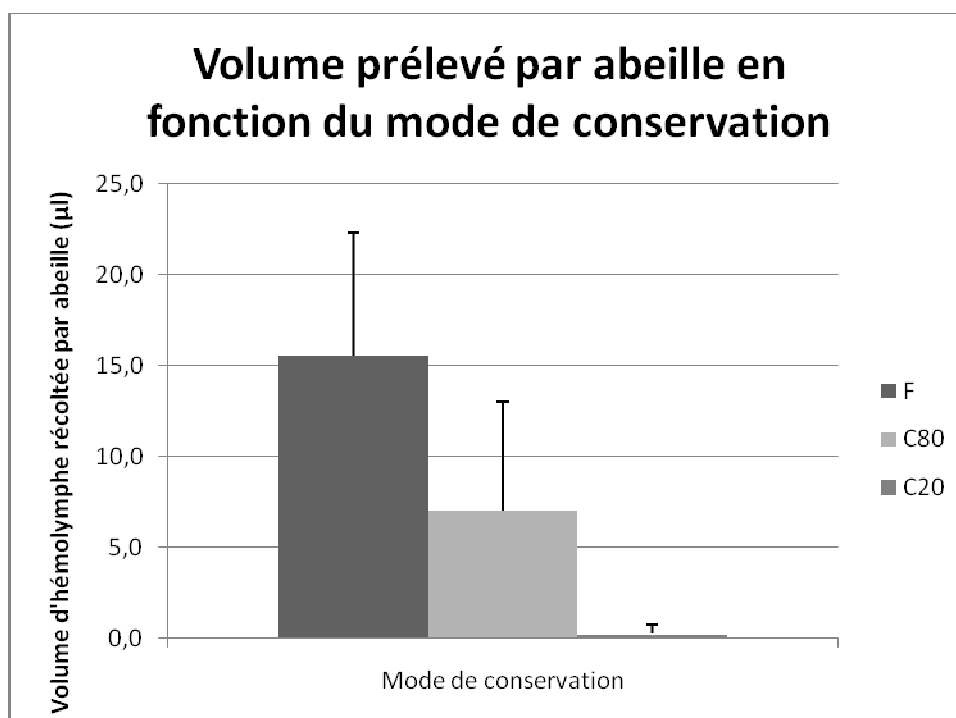
#### **1.1 Quantité d'hémolymphe prélevée**

La quantité d'hémolymphe prélevée par individu s'est avérée très variable. En effet des volumes variant de 0 à 30 µl ont été mesurés.

Sur certains groupes d'abeilles, les prélèvements d'hémolymphe se sont révélés particulièrement difficile à effectuer. Il s'agit notamment de la plupart des abeilles conservées à -80°C et surtout à -20°C.

Ainsi, il existe une différence très hautement significative, tant entre la quantité d'hémolymphe prélevée chez les abeilles vivantes et la quantité prélevée chez les abeilles conservées à -80°C ( $P = 0,0017$ ), qu'avec la quantité extraite des abeilles conservées à -20°C ( $P < 0,0001$ ).

Les volumes moyens d'hémolymphe collectés chez les abeilles vivantes, conservées à -80°C et à -20°C étaient respectivement de 15,545 µl, 7 µl, et 0,227 µl (Figure 9).



**Figure 8: Volume prélevé par abeille en fonction du mode de conservation**

## **1.2 Aspect de l'hémolymphe prélevée**

L'aspect de l'hémolymphe prélevée était identique pour les abeilles fraîches et les abeilles congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ces échantillons étaient translucides et leur couleur variait d'incolore à jaune vif. Les prélèvements contaminés suite à une perforation ou un éclatement du tube digestif, étaient plus opaques et présentaient une couleur brunâtre. Les prélèvements effectués sur les abeilles conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  possédaient systématiquement les caractéristiques des échantillons contaminés par le contenu du tube digestif.

## **1.3 Dosage des protéines**

Les dosages de protéines dans l'hémolymphe récoltée sur abeilles congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  n'ont pas été effectués car les volumes prélevés par abeilles étaient trop faibles pour permettre la réalisation des étapes ultérieures.

Les concentrations en protéines dans l'hémolymphe récoltée sur abeille congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  et fraîches ont été comparées. Deux tampons d'extraction ont été testés : le PBS et l'UTC (Figure 9).

Lors du dosage de protéines dans l'hémolymphe récoltée sur abeilles conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , les concentrations mesurées selon l'emploi du PBS ou de l'UTC étaient

respectivement de  $41,01 \pm 14,19 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  et de  $33,3 \pm 15,94 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Toutefois, aucune différence significative n'a été observée en fonction du tampon utilisé ( $P = 0,2437$ ).

Concernant le dosage dans l'hémolymphe prélevée sur abeilles fraîches, les teneurs en protéines ce sont avérées significativement plus faibles ( $P < 0,05$ ) que dans l'hémolymphe d'abeilles congelées, et ce quelque soit le tampon employé.

Les concentrations en protéines dans l'hémolymphe d'abeilles fraîches mesurées étaient de  $12,34 \pm 7,43 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  dans le tampon PBS et de  $23,46 \pm 8,24 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  dans le tampon UTC. Une différence significative a été calculée entre ces deux tampons ( $P = 0,0215$ ).

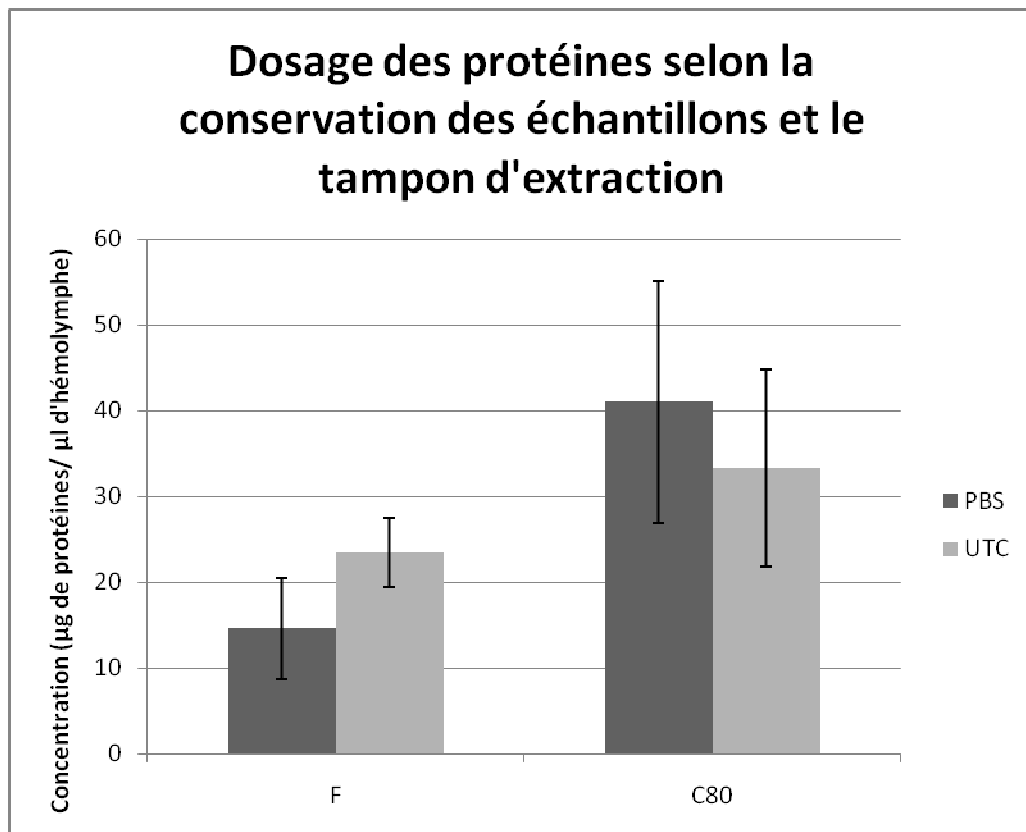


Figure 9: Dosage des protéines selon la conservation des échantillons et le tampon d'extraction

#### **1.4 Conservation des solutions d'extraction**

Suite à l'extraction, un échantillon de chaque combinaison « mode de conservation-tampon d'extraction » a été conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Certains échantillons de protéines extraites de l'hémolymphe, conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , ont montré un changement de couleur. Cette variation de couleur fut systématique pour les échantillons provenant d'abeilles congelées.

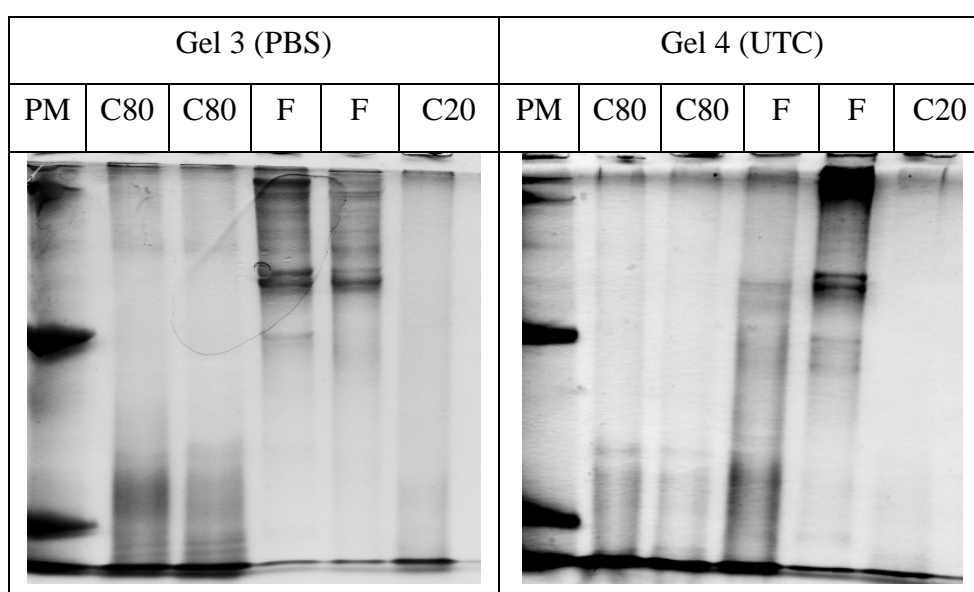
Les échantillons récoltés dans le PBS ont montré une variation de couleur suite à une conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$ , que les abeilles aient été congelées avant le prélèvement ou non. L'influence du tampon semblait primer sur celle du traitement des abeilles.

En définitive, le seul échantillon dont la couleur ne semble pas avoir évolué était le F UTC, tandis que celui dont la variation était la plus marquée était le C80 PBS.

### 1.5 Séparation des protéines sur gel 1D

Après séparation sur gel 1D, les échantillons d'abeilles non congelées (F) montrent des bandes plus distinctes et situées dans la partie supérieure des gels (Figure 10). Au contraire, les échantillons d'abeilles congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  (C80) laissent apparaître des bandes moins distinctes, voire non discernables. Les échantillons provenant d'abeilles congelées semblent contenir relativement moins de protéines de haut poids moléculaire que les échantillons d'abeilles fraîches.

Les gels n°3 et n°4 (Figure 10) ne diffèrent que par le tampon d'extraction utilisé. Les échantillons du gel n°3 ont été recueillis dans du tampon PBS, tandis que ceux du gel n°4 l'ont été dans du tampon UTC. La comparaison des échantillons frais entre les deux gels semble indiquer que le tampon PBS permet une meilleure séparation. Les bandes protéiques situées dans le tiers supérieur du gel apparaissent en effet plus distinctement dans le gel n°3 que dans le gel n°4. Ce résultat doit toutefois être discuté.



**Figure 10: Gels 1D n°3 et n°4. Tous les échantillons du gel n°3 ont été récoltés dans du tampon PBS, et tout ceux du gel n°4 dans du tampon UTC.**

## 1.6 Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle

Les scans de certains gels 2D réalisés lors de l'optimisation de la méthode sont présentés à l'Annexe I. Un aperçu de ces gels est repris à la Figure 11.

Les résultats des gels (b), (c) et (e) sont peu satisfaisants, principalement par le peu de spots protéiques qui apparaissent. La

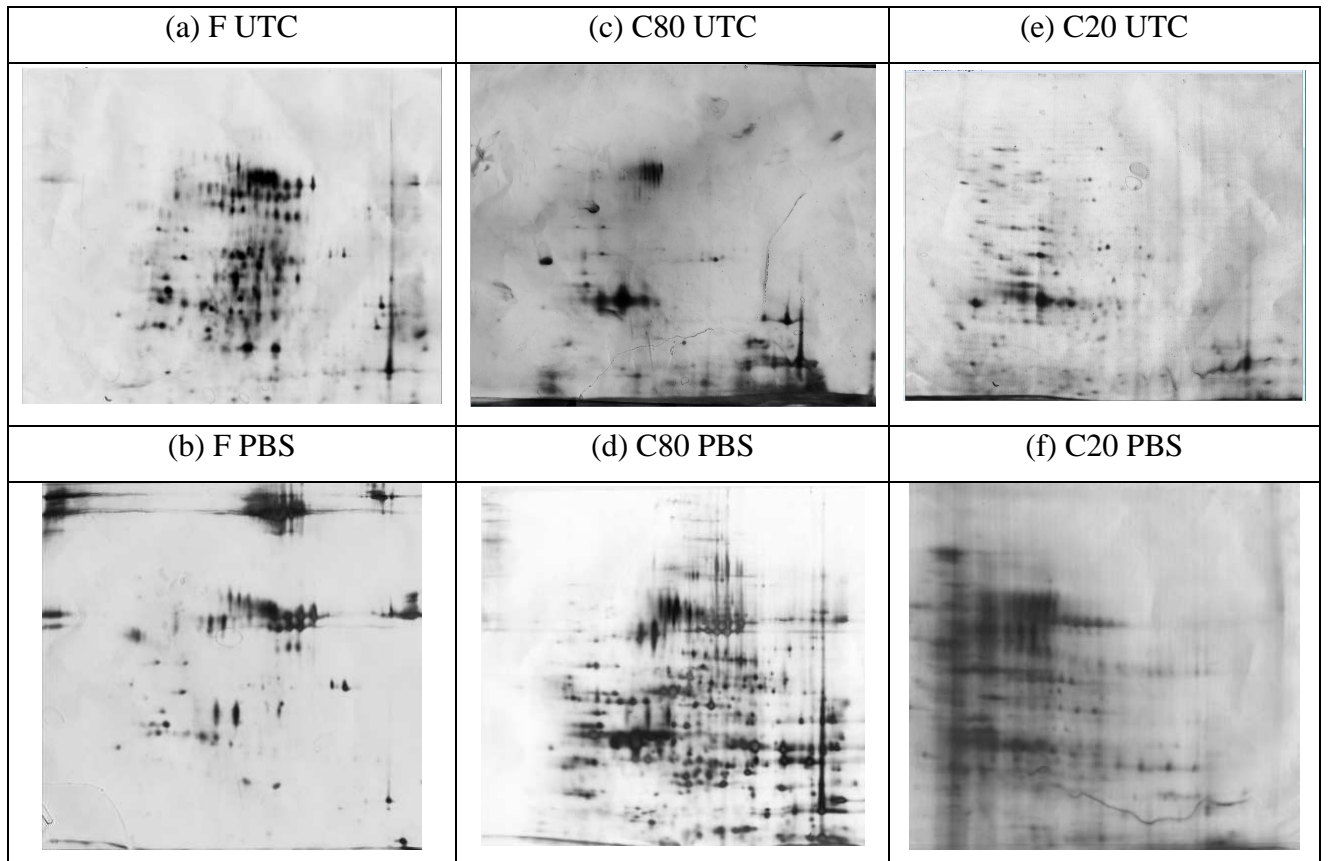


Figure 11: gels 2D réalisés lors de l'optimisation de la méthode, colorés au nitrate d'argent

## 1.7 Conclusions relatives à la mise au point

Au terme de cette mise au point, les choix concernant les paramètres évalués ont pu être réalisés. Ces choix sont brièvement énoncés étant donné leur utilisation dans la suite des résultats. La discussion de ces choix est présentée à la suite des résultats.

L'utilisation d'abeilles congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou à  $-80^{\circ}\text{C}$  s'est avérée ne pas être optimale pour une étude protéomique de l'hémolymphe. Les prélèvements d'hémolymphe sur les individus sains et ceux infectés par le CBPV ont donc été effectués sur des abeilles vivantes. Toutefois, une amélioration supplémentaire a été apportée étant donné l'impact de la rapidité du prélèvement sur la qualité de l'échantillon. Seuls les volumes prélevés rapidement ont été récoltés.

Le tampon qui a été retenu pour ces mêmes échantillons est l'UTC. Celui-ci permettait en effet une meilleure extraction des protéines sur abeilles fraîches, ainsi qu'une meilleure conservation des solutions d'extraction.

## **2 Expression protéique différentielle dans l'hémolymphe de *A. mellifera* suite à une infection par le CBPV.**

### **2.1 Matériel biologique**

Les abeilles infectées présentaient bien les symptômes occasionnés par le CBPV, bien que ceux-ci n'étaient pas exprimés uniformément par tous les individus. Le seul symptôme n'ayant pu être observé sont les attaques subies par les ouvrières infectées. Cependant, la conséquence de ces attaques, c'est-à-dire la diminution de la pilosité, a bien été observée.

### **2.2 Prélèvement d'hémolymphe**

Les prélèvements d'hémolymphe ont été réalisés différemment que lors de la mise au point. L'hémolymphe n'a pas été récoltée selon un volume donné, mais de façon à ce que le prélèvement se déroule le plus rapidement possible. Malgré la variabilité des volumes prélevés, les quatre gels de l'expérimentation présentent un aspect similaire en terme de quantité de spots.

### **2.3 Extraction**

L'extraction des protéines avec le tampon sélectionné suite à la mise au point s'est déroulée correctement. Les volumes d'hémolymphe prélevés n'ayant pas été mesurés, ce résultat n'a pu être quantifié.

### **2.4 Analyse d'image**

Le programme Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics) n'a rencontré aucun problème de qualité d'image lors de l'analyse préliminaire de chacune des trois images des quatre gels. Au total, 951 variations d'intensité du signal ont été détectées et assimilées à autant de spots protéiques par le programme. Parmi ces spots, 326 ont été identifiés comme exprimés de façon différentielle dans l'hémolymphe d'abeilles saines et celle d'abeilles infectées par le CBPV. Suite à une vérification manuelle, ce nombre s'est vu réduire à 180. Ces spots ont été sélectionnés pour être excisés en vue de leur identification.

## **2.5 Identification de protéines**

Sur les 180 spots ayant subi une digestion à la trypsine, 81 ont abouti à une proposition de séquence. Parmi celles-ci, cinq correspondaient à une identification certaine, et dix autres à une identification probable. Les soixante-six dernières propositions de séquences sont considérées comme non identifiées. Les recherches de séquences proches de celles proposées, via l'outil Blast dans le taxon Apis, ont permis d'identifier chez Apis mellifera, des protéines correspondant au spot recherché par leur point isoélectrique et leur poids moléculaire. Les protéines identifiées sont présentées dans le tableau de l'annexe IV.

### **3 Approche préliminaire à l'étude de l'expression protéique différentielle des segments corporels majeurs de *A. mellifera* suite à une infection par le CBPV**

L'utilisation des segments corporels majeurs de l'abeille dans l'optique d'une étude de leurs protéomes respectifs a été brièvement évaluée. Ensuite, les protéines de la tête de l'abeille ont été extraites dans le but d'apporter un complément de résultats à l'étude réalisée sur le protéome de l'hémolymphe.

#### **3.1 Aspect des échantillons de segments corporels**

Les têtes broyées présentent une couleur rouge très marquée, provenant des pigments oculaires. La couleur des échantillons de thorax est plutôt brun-orange, tandis que celle des échantillons d'abdomen broyé est jaunâtre, assez proche de la couleur des échantillons d'hémolymphe.

Lors du clean up, le comportement des échantillons de thorax est particulier. Ils forment un précipité d'aspect caoutchouteux, dont la mise en suspension est très laborieuse. Les deux autres segments corporels se comportent de façon normale.

## **Discussion**

Le choix du mode de conservation des échantillons d'abeilles précédant le prélèvement d'hémolymphe a été dirigé vers les abeilles non congelées. Plusieurs éléments, à travers l'ensemble des résultats, permettent d'aboutir à ce choix. Tout d'abord, les volumes d'hémolymphe prélevés sur les abeilles non congelées étaient plus élevés que sur les autres échantillons, et ce de façon très hautement significative. Au delà du volume en tant que tel, la rapidité de l'opération a également joué un rôle dans le choix du type d'échantillons. Le prélèvement d'hémolymphe sur les abeilles fraîches était généralement réalisé plus rapidement que sur les abeilles congelées. Suite à un prélèvement sur abeilles fraîches, durant lequel les volumes ont été récoltés de façon inhabituellement lente, les gels 2D obtenus étaient de qualité médiocre (Annexe II, a). À l'inverse, au cours de la même série de prélèvements, les échantillons d'hémolymphe d'abeilles congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  se sont montrés plus aisés qu'à l'habitude, et la qualité des spots obtenus sur les gels était supérieure aux précédents (Annexe II, b). Cette observation met en évidence l'importance de la rapidité du prélèvement. La lenteur des prélèvements sur abeilles congelées explique probablement une grande partie des résultats peu satisfaisants auxquels ils ont conduit (Figure 10). Par la suite, lors de prélèvements sur abeilles saines et infectées par le CBPV, une attention particulière a été apportée à ce facteur. L'hémolymphe n'a pas été prélevée dans l'optique de récolter un volume maximum, mais un volume suffisant, dans un intervalle de temps minimum entre la perforation de l'hémocoel et le dépôt de l'hémolymphe dans le tampon.

Selon les résultats des dosages, les abeilles conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  permettent d'extraire des quantités de protéines plus importantes que les abeilles non congelées. Or, selon Cremonoz et al. (1998), les ouvrières de âgées de six jours, et qui ont été alimentées avec la nourriture naturelle des abeilles, possèdent une teneur en protéines de  $27,57 \pm 7,41 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Bien que les abeilles utilisées dans le cadre de ce travail n'aient pas été caractérisées au niveau de l'âge ni du stade de développement comportemental, les valeurs des dosages obtenues pour les échantillons conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  semblent suspectes. Une cause probable serait une contamination, non perçue, de l'hémolymphe par du contenu de tube digestif. La congélation pourrait compromettre l'intégrité des membranes, augmentant le risque de contamination. La présence dans l'échantillon d'une quantité importante de protéines provenant du tube digestif, risquait de masquer les protéines extraites de l'hémolymphe. De

plus, la diminution du taux de protéines dans l'hémolymphe prélevée sur abeilles fraîches est compensée par le volume plus important qui peut être tiré de ces individus. En définitive, les prélèvements sur abeilles fraîches se sont montrés plus pratiques et plus sûrs en terme de qualité des échantillons récoltés.

Le tampon d'extraction des protéines choisi suite à la mise au point est le tampon UTC. En effet, la quantité de protéines extraites à partir d'abeilles vivantes était significativement plus élevée lorsque la récolte avait lieu dans l'UTC. L'utilisation de ce type d'abeille s'avérant primordiale pour la réalisation de cette étude, ces dosages constituent des arguments en faveur de l'UTC. De plus, la variation de couleur observée suite à la conservation, à -20°C, d'échantillons de protéines extraites, était plus marquée pour les échantillons récoltés dans le PBS. Cette altération des échantillons n'a pas été observée pour l'hémolymphe prélevée sur abeilles fraîches et récoltées dans l'UTC (échantillons F UTC).

Du point de vue de la séparation des protéines sur des gels, le PBS semble avoir donné de meilleurs résultats en SDS-PAGE de type 1D (Figure 10, gel n°3). Ce résultat doit être relativisé car le gel n°4 (Figure 10) présentait un défaut au niveau des puits. Ceux-ci n'étaient pas aussi bien découpés, et des zones de polyacrylamide ont perturbé le dépôt des échantillons dans les puits. De ce fait, il est possible que le gel de concentration n'ait pas joué son rôle de façon optimale et que le front de migration n'ait pas été idéal.

La technique du 2D-DIGE a permis de déceler 180 spots protéiques exprimés de façon différentielle dans l'hémolymphe suite à une infection par le CBPV. Le facteur d'expression entre les deux groupes était au minimum de 1,2. À titre comparatif, Levy et al. (2004), ont étudié l'expression différentielle de protéines dans l'hémolymphe de *D melanogaster* suite à des infections respectivement par un champignon et une bactérie. Les techniques employées pour la révélation des spots protéiques, à savoir la coloration au nitrate d'argent et celle au bleu de Coomassie colloïdal, n'ont permis la révélation que de 160 spots, dont 70 seulement ont été détecté comme exprimés de manière différentielle. La sensibilité du 2D-DIGE permet donc une amélioration considérable de ce type d'études.

Le faible pourcentage d'identification avérée de protéines est probablement la conséquence de deux éléments. Premièrement, la base de donnée utilisée pour la comparaison des empreintes massiques des peptides regroupait l'ensemble des métazoaires. De ce fait, les recherches spécifiques à l'abeille pourraient avoir été « diluées » dans la

masse de séquences. De nombreuses protéines identifiées comme appartenant à d'autres espèces que l'abeille domestique possédaient généralement des homologues chez *A. mellifera*. Du point de vue du mowse score, la valeur statistique de certaines identifications semble peu pertinente. Cependant, couplée avec une vérification du pI et de la masse moléculaire, cette identification s'affine considérablement. Deuxièmement, certains problèmes ont été rencontrés lors de la digestion manuelle des protéines contenues dans les morceaux de gel excisés. L'extraction des peptides pourrait ne pas avoir été optimale.

Les protéines jugées les plus pertinentes sont abordées dans la discussion, les autres nécessitant une nouvelle recherche dans une base de donnée plus restrictive, ainsi que des investigations plus poussées concernant leur implication. L'identification de certaines protéines confirme leur implication dans la réaction à une infection par le CBPV. C'est notamment le cas de la prophénoloxydase (proPO) dont l'expression semble diminuer. Deux hypothèses pourraient expliquer ce résultat. Selon la première, la proPO étant le précurseur de l'enzyme induisant la mélanisation, il pourrait s'agir d'une mobilisation accrue de ce précurseur, afin de produire la phénoloxydase (PO) et permettre la réaction de mélanisation. Cette activation faisant appel à un clivage de la proPO par une protéase à sérine, la PO obtenue ne possède plus la même masse moléculaire ni le même point isoélectrique. Elle constitue donc un spot protéique distinct, permettant d'observer la mobilisation de la proPO. La seconde hypothèse serait l'inhibition de l'activité phénoloxydase par le CBPV, comme le font les polydnavirus, indispensables aux parasitoïdes pour permettre le développement de ces derniers au sein de leur hôte (Barat-Houari, 2006).

Une protéine de choc thermique a également été identifiée (Heat shock protein cognate 5) et son expression augmente d'un facteur 2,5 suite à l'infection virale. Cette protéine appartient à la famille des hsp70, qui possèdent diverses fonctions, comme celle de protéine chaperone. Kang et al. (2008), ont montré qu'une protéine de cette famille était induite à la suite d'une infection virale chez *An. gambiae*. La région promotrice du gène codant pour cette protéine possède des éléments permettant l'interaction avec divers facteurs, dont le facteur nucléaire kappa- $\beta$  (NF- $K\beta$ ).

L'intensité d'un spot protéique correspondant à une transferrine s'est révélée diminuer suite à l'infection par le CBPV. Cette famille de protéines est supposée remplir un rôle peu spécifique dans l'immunité innée (Yun et al., 2009). La région promotrice du gène codant pour une transferrine chez *Bombyx mori* possède des sites de liaison pour NF- $K\beta$ .

La phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5) est surexprimée par un facteur 18 chez les abeilles infectées par le CBPV. Les phosphoglycerate mutases sont généralement impliquées dans la glycolyse mais la PGAM5 possède une activité de phosphatase à sérine/thréonine (Takeda et al., 2009). Elle active la kinase ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), qui est une composante essentielle des mécanismes aboutissant à l'apoptose (Aras & Aizenman, 2005).

La protéine CG10068-PA, surexprimée par un facteur 6,4 chez les individus infectés, possède un domaine ELMO (Engulfment and Cell MObility). Les protéines contenant ce domaine possèdent des rôles dans diverses fonctions cellulaires, et notamment l'apoptose et la migration cellulaire (Gumienny et al., 2001).

La protéine CG6597-PA, isoform A, possède une région reconnue comme une caspase. Les caspases interviennent dans l'apoptose (Siman et al., 1999). La protéine identifiée possède également une région dont le rôle est inconnu. Il pourrait dès lors s'agir du précurseur de cette caspase. En effet, ces protéases à cystéines sont conservées sous forme de zymogène. La diminution de l'expression de cette protéine chez les abeilles infectées pourrait traduire, comme dans le cas de la prophénoloxydase, une activation de l'enzyme par clivage de son précurseur.

La thréonine aspartase 1 (taspase-1) est une protéase dont un des substrats est TFIIA (Zhou et al., 2006). La taspase-1 clive cette protéine en deux sous-unités du facteur général de transcription. L'augmentation de l'expression de cette protéase par un facteur 3,2 indique une augmentation du mécanisme de transcription au sein des individus atteints par le virus de la paralysie chronique. Cette augmentation serait due aux réponses mises en place par l'abeille suite à l'infection.

La protéine odorant binding protein (OBP) ASP5 a été identifiée et se montre surexprimée par un facteur 1,5 suite à l'infection. Les OBP interviennent dans la perception et le transport de molécules volatiles peu solubles, notamment des phéromones, au niveau des antennes ou de l'hémolymphe (Graham et al., 2003).

L'histidine décarboxylase est sous-exprimée chez les individus infectés. Cette protéine catalyse la décarboxylation de l'histidine en histamine. L'histamine intervient dans de nombreux mécanismes, et notamment l'attraction de certains leucocytes lors de l'inflammation chez les mammifères. Elle possède également le rôle de neurotransmetteur (Lundquist et al., 1996 ; Osborne, 1996).

## **Conclusion et perspectives**

Les résultats de la mise au point mettent en évidence certains paramètres de l'optimisation des méthodes de prélèvement et d'extraction des protéines de l'hémolymphe chez l'abeille domestique. La nécessité de travailler à partir d'échantillons d'abeilles non congelées dans le cadre d'une étude protéomique de l'hémolymphe a été montrée. Ces abeilles permettent de meilleurs prélèvements en terme de volume récolté et les contaminations par du contenu de tube digestif sont moins fréquentes. La rapidité des prélèvements effectués sur les abeilles fraîches, comparé aux abeilles congelées, est un facteur supplémentaire favorisant l'obtention d'échantillons de qualité. Les abeilles fraîches présentent toutefois l'inconvénient de ne pas être stable dans le temps. Elles ne peuvent être conservées indéfiniment avant le prélèvement d'hémolymphe. Le cas échéant, une attention devrait être portée sur les paramètres de nutrition, notamment en protéines, ainsi que sur la disponibilité en eau. Des améliorations supplémentaires de la méthode prélèvement pourraient être envisagées, comme par exemple un traitement des tubes capillaires, avec de la phenylthiourée, pour prévenir la mélanisation des échantillons, ou encore une anesthésie des abeilles à l'aide de CO<sub>2</sub>.

Un autre paramètre important ayant fait l'objet d'une mise au point est le tampon d'extraction des protéines. Un tampon composé d'urée, de tris et de CHAPS a été retenu. Un nombre plus élevé de tampons d'extraction pourraient être comparés au cours d'expérimentations ultérieures.

Une étude de l'expression différentielle de protéines de l'hémolymphe suite à une infection par le CBPV a pu être réalisée selon les paramètres mis au point. Cette étude, basée sur la technique du 2D-DIGE a permis de mettre en évidence l'impact de cette infection virale sur le protéome de l'hémolymphe chez l'abeille. En effet, 180 spots protéiques ont montré une intensité influencée de manière significative par le caractère infecté ou non des abeilles. L'analyse en spectrométrie de masse des peptides, issus de la digestion des protéines à l'aide de trypsine, a conduit à l'identification de protéines possédant un rôle connu ou suggéré dans l'immunité.

Le nombre de protéines identifiées pourrait être augmenté par une recherche de correspondance des empreintes peptidiques massiques obtenues suite à l'analyse Maldi-TOF dans une banque de données plus ciblée. L'utilisation de technique complémentaires, telles que la 2D-LC (2D-Liquid Chromatography), permettrait d'améliorer encore ces résultats.

L'identification des protéines doit être suivie d'une exploration des voies les impliquant, afin de mieux caractériser les réactions induites suite à l'infection par le CBPV. Dans la même optique, une fois ces voies définies, l'interactome, c'est-à-dire l'ensemble des interactions survenant entre ces voies pourraient également faire l'objet d'étude. Toute cette information ne peut aisément être fournie par l'approche protéomique. C'est pourquoi les méthodes telles que la génomique, la transcriptomique et la peptidomique, avec l'aide de l'outil bioinformatique se révéleraient nécessaires à la réalisation d'une telle étude.

## Références Bibliographiques

- ADAMO S. A., 2004. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Insects Physiology*, 50, 209-216.
- AGAISSÉ H., 2007. An adaptative immune response in *Drosophila* ?. *Cell Host & Microbe*, 1(2), 91-93.
- AGAISSÉ H. & PERRIMON N., 2004. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.*, 198, 72-82.
- AKRATANAKUL P., BURGETT M., 1975. *Varroa jacobsoni* : a prospective pest of honeybees in many part of the world. *Bee World*, 56, 119-121.
- ALLEN M., BALL B.V., 1995. Characterisation and serological relationships of strains of Kashmir bee virus. *Ann. Appl. Biol.*, 126, 471-484.
- ALLEN M., BALL B.V., 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses, *Bee World*, 77, 141-162.
- ANDERSON D.L., GIBBS A.J., 1988. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. *J. Gen. Virol.*, 69, 1617-1625.
- ANDERSON D.L., GIBBS A.J., 1989. Transuparial transmission of Kashmir bee virus and sacbrood virus in the honey bee (*Apis mellifera*). *Ann. Appl. Biol.*, 114, 1-7.
- ANTÚNEZ K., D'ALESSANDRO B., CORBELLA E., & ZUNINO P., 2005. Detection of Chronic bee paralysis virus and Acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *J. Invertebr. Pathol.*, 90, 69-72.
- AMDAM G. V., AASE A. L. T. O., SEEHUUS S. C., FONDRK M. K., NORBERG K., & HARTFELDER K., 2005. *Exp. Gerontol.*, 40(12), 939-947.
- ARAS M. A. & AIZENMAN E., 2005. Obligatory role of ASK1 in the apoptotic surge of K<sup>+</sup> currents. *Neuroscience Letters*, 387, 136-140.
- ASHIDA M., & BREY P. T., 1995. Role of the integument in insect defense: Pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Immunology*, 92, 10698-10702.
- BAILEY L., 1965a. Paralysis of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J. Invertebr. Pathol.*, 7, 132-140.
- BAILEY L., 1967. The incidence of virus diseases in the honey bee. *Ann. Appl. Biol.*, 60, 43-48.
- BAILEY L., 1968. Multiplication of sacbrood virus in the adult honey bee. *Virol.*, 36, 312-313.
- BAILEY M., 1969. The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Ann. Appl. Biol.*, 63, 483-491.
- BAILEY M., 1969. The signs of adult bee diseases. *Bee World*, 50, 66-68.
- BAILEY L., BALL B.V., 1991. Honey bee pathology. Harcourt Brace Jovanovich, Sidcup, UK.

- BAILEY L., BALL B.V., CARPENTER J.M., WOODS R.D., 1980a. Small virus-like particles in honey bees associated with chronic paralysis virus and with a previously undescribed disease. *J. Gen. Virol.*, 46, 149-155.
- BAILEY L., BALL B.V., PERRY J.N., 1981a. The prevalence of viruses of honey bee in Britain. *Ann. Appl. Biol.*, 97, 109-118.
- BAILEY L., BALL B.V., PERRY J.N., 1983a. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.*, 103, 13-20.
- BAILEY L., BALL B.V., PERRY J.N., 1983b. Honeybee paralysis: its natural spread and its diminished incidence in England and Wales, *J. Apic. Res.*, 22, 191-195.
- BAILEY L., CARPENTER J.M., GOVIER D.A., WOODS R.D., 1980b. Bee virus Y. *J. Gen. Virol.*, 51, 405-407.
- 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., 1964. Acute infection of bees with paralysisvirus. *J. Insect Pathol.*, 6, 395-407.
- BAILEY L. & MILNE R.G., 1969. The Multiplication Regions and Interaction of Acute and Chronic Bee-paralysis Viruses in Adult Honey Bees. *J. Gen. Virol.*, 4, 9-14.
- BAILEY L., CARPENTER J. M. & WOODS R. D., 1979. Egypt Bee Virus and Australian Isolates of Kashmir Bee Virus. *J. Gen. Virol.* 43, 641-647.
- BAILEY L., GIBBS A.J., WOODS R.D., 1963. Two viruses from adult honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virol.* 21, 390-395.
- BAILEY L., WOODS R.D., 1974. Three previously undescribed viruses from the honey bee. *J. Gen. Virol.* 25, 175-186.
- BAILEY L., WOODS R.D., 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J. Gen. Virol.* 37, 175-182.
- BAILEY L., CARPENTER J. M., WOODS R. D., 1981. Properties of a filamentous virus of the honey bee (*Apis mellifera*). *Virology*, 114, 1-7.
- BALL B.V., 1983. The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees, Meeting of the EC Experts' group, Wageningen, in: Wageningen, pp.21-23.
- BALL B. V., OVERTON H. A., BUCK K. W., BAILEY L. & PERRY J. N., 1985. Relationships between the Multiplication of Chronic Bee-Paralysis Virus and its Associate Particle. *J. gen. Virol.*, 66, 1423-1429.
- BALL B.V., 1997. Varroa and viruses, in : Munn, P., Jones R. (Ed), Varroa ! Fight the mite. International Bee Research Association, Cardiff, pp. 11-15.
- BALL B.V., 1999. Paralysis. In, Colin M.E. (Ed), Ball B.V. (Ed), Kilani M. (Ed), Bee diseases diagnosis. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza, 81-89.
- BALL B.V., 2004. The trouble with viruses. *Bee World*, 85, 25.
- BALL B.V., BAILEY L., 1997. Viruses, in: Morse, R.A. and Flottum, K. (Ed.), Honey bee pests, predators, & diseases, A.I. Root Company, Medina, pp. 11-32.
- BARAT-HOUARI M., HILLIOU F., JOUSSET F. X., SOFER L., DELEURY E., ROCHER J., RAVALLEC M., GALIBERT L., DELOBEL P., FEYEREISEN R., FOURNIER P., ET VOLKOFF A. N., 2006. BMC Genomics, 7, 160-180.

- BEUTLER B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.*, 40, 845-859.
- BILIKOVA K., HANES J., NORDHOFF E., SAENGER W., KLAUDINY J., & SIMUTH J., 2002. Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS letters*, 528, 125-129.
- BLANCHARD P., RIBIÈRE M., CELLE O., LALLEMAND P., SCHURR F., OLIVIER V., ISCACHE A. L., FAUCON J. P., 2006. 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. *Journal of Virological Methods*, 141, 7-13
- BLANCHARD P., OLIVIER V., ISCACHE A.L., CELLE O., SCHURR F., LALLEMAND P. & RIBIÈRE M., 2008. Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 182-185.
- CALDERON R.A., VAN VEEN J., ARCE H.G., ESQUIVEL M.E., 2003. Presence of DWV and KBV in africanized honey bee colonies in Costa Rica infested with *V. destructor*. *Bee world*, 84, 112-116.
- CELAN E., 1971. La paralysie infectieuse. *La Belgique apicole*, 11, 275-277.
- CELLE O., BLANCHARD P., OLIVIER V., SCHURR F., COUGOULE N., FAUCON J.P. & RIBIÈRE M., 2008. Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Research*, 133, 280-284.
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K., 2004. The prophenoloxdase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews*, 198, 116-126.
- CERENIUS L., LEE B. L., & SÖDERHÄLL K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity.
- CHAN Q. W. T., HOWES C. G. & FOSTER L. J., 2006. Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. *Mol. Cell. Proteomics*, 5(12), 2252-2262.
- CHEN Y.P., PETTIS J.S., & FELDLAUFER M.F., 2005. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90, 118-121.
- CHEN Y.P., PETTIS J.S., COLLINS A., & FELDLAUFER M.F., 2006. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl. Environn. Microbiol.*, 71, 606-611.
- CLARK T.B., 1977. Another virus in honey bees. *Am. Bee J.*, 117, 340-341.
- CLARK T.B., 1978. A filamentous virus of the honey bee. *J. Invertebr. Pathol.*, 32, 332-340.
- COLONELLO N. A., ZUFELATO M. S., SIMOES Z. L. P., & BITONDI M. M. G., 2003. In vitro secretion of ecdysteroid-dependent proteins and of a 70 kDa subunit reactive to anti-prophenoloxdase serum by *Apis mellifera* integument. *Apidologie*, 34, 377-388.
- DALL D.J., 1985. Inapparent infection of honey bee pupae by sacbrood and Kashmir bee viruses in Australia. *Ann. Appl. Biol.*, 106, 461-468.
- ELLIS J.D., & MUNN P.A., 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86, 88-101.
- EVANS J. D., ARONSTEIN K., CHEN Y. P., HETRU C., IMLER J. L., JIANG H., KANOST M., THOMPSON G. J., ZOU Z., & HULTMARK D., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insects Molecular Biology*, 15(5), 645-656.
- FEARON D. T., 1997. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature*, 388, 323-324.

- FAUCON J.P., MATHIEU L., RIBIÈRE M., MARTEL A.C.M. DRAJNUDEL P., ZEGGANE S., AURIÈRES C., AUBERT M., 2002. Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee World*, 83, 14-23.
- GIAUFFRET A., DUTHOIT J. L., TOSTAIN-CAUCAT M. J., 1970. Ultrastructure des cellules d'abeilles infectées par le virus de la paralysie-maladie noire. Etude des inclusions cellulaires. *Bull. Apic.*, XIII, 115-126.
- GIBBS A. J., 1969. Comparison of Bee Chronic Paralysis Virus with Mouse Lactic Dehydrogenase Virus. *J. gen. Virol.*, 5, 447-449.
- GILLESPIE J. P., KANOST M. R., & TRENCZEK T., 1997. Biological mediators of insects immunity. *Annual Review of Entomology*, 42, 611-643.
- GULLAN P. J. & CRANSTON P. S., 2004. *The insects: outline of entomology*. 3 éd. Oxford: Blackwell.
- GLINSKY Z. & JAROD J., 1995. Mechanical and biochemical defenses of the honey bee. *Bee World*, 76, 110-118.
- GRAHAM L. A., BREWER D., LAJOIE G., & DAVIES P. L., 2003. Characterization of a Subfamily of Beetle Odorant-binding Proteins Found in Hemolymph *Molecular & Cellular Proteomics*, 2, 541-549.
- GUMIENNY T.L., BRUGNERA E., TOSELLO-TRAMPONT A.C., KINCHEN J.M., HANEY L.B., NISHIWAKI K., WALK S.F., NEMERGUT M.E., MACARA I.G., FRANCIS R., SCHEDL T., QIN Y., VAN A.L., HENGARTNER M.O., AND RAVICHANDRAN K.S., 2001. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*, 107, 27-41.
- HAN S. M., LEE K. G., YEO J. H., KWEON H. Y., WOO S. O., LEE M. L., BAEKB H. J., KIM S. Y., PARK K. K., 2007. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 176-181.
- HAUBRUGE E., NGUYEN B. K., WIDART J., THOMÉ J. P., FICKERS P., & DEPAUW E., 2006. Le dépérissement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera : Apidae) : faits et causes probables. *Notes fauniques de Gembloux*, 59 (1), 3-21.
- HUNG A.C.F., SHIMANUKI H., KNOX D.A., 1996. Inapparent infection of acute virus and Kashmir bee virus in the U.S. honey bees. *Am. Bee J.*, 136, 874-876.
- HUNG A.C.F., PENG C.Y.S. & SHIMANUKI H., 2000. Nucleotide sequence variations in Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* L. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 31, 17-23.
- JEAN-PROST P. & LE CONTE Y., 2005. *Apiculture Connaître l'abeille – conduire le rucher*. Tec et Doc, Lavoisier.
- KANG S., SIM C., BYRD B. D., COLLINS F. H., & HONG Y. S., 2008. Ex vivo promoter analysis of antiviral heat shock cognate 70B gene in *Anopheles gambiae*. *Virology*, 5, 136-145.
- KAVANAGH K. & REEVES E. P., 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 101-112.
- KONING, ROSS E. "Honeybee Biology". *Plant Physiology Website*. 1994. [http://plantphys.info/plants\\_human/bees/bees.html](http://plantphys.info/plants_human/bees/bees.html) (24/03/2009)
- KULINCEVIC J. M., STAIRS G. R., & ROTHENBUHLER W. C., 1969. A disease of the honey bee causing comportemental changes and mortality. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14(1), 13-17.

- KULINCEVIC J. M., ROTHENBUHLER W. C., & STAIRS G. R., 1973. The effect of presence of a queen upon outbreak of a hairless-black syndrome in the HB. *Journal of Invertebrate Pathology*, **21**(3), 241-247.
- LEE P.E. & FURGALA B., 1965. Chronic bee paralysis virus in the nerve ganglia of the adult honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, **2**, 170-174.
- LEVY F., BULET P., & EHRET-SABATIER L., 2004. Proteomic Analysis of the Systemic Immune Response of *Drosophila* *Molecular & Cellular Proteomics*, **3**, 156–166.
- LI W. F., MA G. X., ET ZHOU X. X., 2006. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides*, **27** (9), 2350-2359.
- LOURENÇO A. P., ZUFELATO M. S., BITONDI M. M. G., SIMOES Z. L. P., 2005. Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 541–552.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., LEWIS F. A., & RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**(1), 265-275.
- LUNDQUIST C. T., BAINES R. A., & BACON J. P., 1996. *The Journal of Experimental Biology*, **199**, 1973–1982.
- MENDOZA H. L. & FAYE I., 1999. Physiological aspect of the immunoglobuline super-family in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.*, **23**, 359-374.
- NORDSTRÖM S., FRIES A., AARHUS A., HANSEN H. & KORPELA S., 1999. Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. *Apidologie*, **30**, 475-484.
- OLIVIER V. & RIBIÈRE M., 2006. Les virus infectant l’abeille *Apis mellifera* : le point sur leur classification. *Virologie*, **10**, 267-278.
- OLIVIER V., MASSOUB I., CELLE O., BLANCHARD P., SCHURRA F., RIBIÈRE M. & GAUTHIER M., 2008. In situ hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *Journal of Virological Methods*, **153**, 232–237.
- OSBORNE R. H., 1996. Insect Neurotransmission: Neurotransmitters and Their Receptors. *Pharmacol. Ther.*, **69**(2), 117-142.
- OVERTON H.A., BUCK K .W., BAILEY L. & BALL B.V., 1982. Relationships between the RNA Components of Chronic Bee-Paralysis Virus and those of Chronic Bee-Paralysis Virus Associate *J. gen. Virol.*, **63**, 171-179
- REITER L. T., POTOCKI L., CHIEN S., GRIBSKOV M., & BIER E., 2001. A Systematic Analysis of Human, Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*, 2001. *Genome Research*. **11**: 1114-1125.
- 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.
- RIBIÈRE, M., BALL B., & AUBERT M.. 2008. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses, p. 15-79. In M. Aubert, B. Ball, I. Fries, R. F. Moritz, N. Milani, and I. Bernardinelli (ed.), *Virology and the honey bee*. European commission, Brussels.
- RIBIÈRE M., LALLEMAND P., ISCACHE A.-L., SCHURR F., CELLE O., BLANCHARD P., OLIVIER V., ET FAUCON J.-P., 2007. Spread of Infectious Chronic Bee Paralysis Virus by Honeybee (*Apis mellifera* L.) Feces. *Appl. Environn. Microbiol.*, **73**, 7711–7716.

- RINDERER T. E. & ROTHENBUHLER W. C., 1976. Characteristic field symptoms comprising honey bee hairless-black syndrome induced in the laboratory by a virus. *Journal of invertebrate pathology*, 27(2), 215-219.
- SABATIER L., JOUANGUY E., DOSTERT C., ZACHARY D., DIMARCQ J. L., BULET P. & IMLER J. L., 2003. Pherokine-2 and -3 : Two Drosophila molecules related to pheromone/odor-binding proteins induced by viral and bacterial infections. *Eur. J. Biochem.*, 270, 3398-3407.
- SCHARLAKEN B., 2008. Integrated 'omic' study on the molecular events in the honey bee head after a bacterial challenge. Thèse de doctorat: Université de Gand.
- SCHMID M. R., BROCKMANN A., PIRK C. W. W., STANLEY D. W., & TAUTZ J., 2008. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*, 54, 439-444.
- SFORCIN J. M., 2007. Propolis and the immune system : a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 13, 1-14.
- SIMAN R., BOZYCZKO-COYNE D., MEYER S. L., & BHAT R. V., 1999. Immunolocalisation of caspase proteolysis in situ: evidence for widespread caspase-mediated apoptosis of neurons and glia in the postnatal rat brain. *Neuroscience*, 92(4), 1425–1442.
- SNODGRASS R. E., 1956. *Anatomy of the honey bee*. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates.
- SPIVAK M. & REUTER G. S., 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, 32, 555–565.
- TAKEDA K., KOMURO Y., HAYAKAWA T., OGUCHI H., ISHIDA Y., MURAKAMI S., NOGUCHI T., KINOSHITA H., SEKINE Y., IEMURA S. I., NATSUME T., & ICHIJO H., 2009. Mitochondrial phosphoglycerate mutase 5 uses alternate catalytic activity as a protein serine/threonine phosphatase to activate ASK1. *PNAS*, 106(30), 12301–12305.
- TRUDEAU D., WASHBURN J. O., & VOLKMAN L., 2001. Central Role of Hemocytes in Autographa californica M Nucleopolyhedrovirus Pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *J. Virol.*, 75, 996-1003.
- TU W. C., WU C. C., HSIEH H. L., CHEN C. Y., & HSU S. L., 2008. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon*, 52, 318–329
- VARIS A.L., BALL B.V. & ALLEN M., 1992. The incidence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera* L) colonies in Finland and Great Britain. *Apidologie*, 23, 133-137.
- WANNER K. W., WILLIS L. G., THEILMANN D. A., ISMAN M. B., FENG Q., & PLETTNER E., 2004. Analysis of the insect os-d-like gene family, *J. Chem. Ecol.*, 30, 889-911.
- WIEGERS F.P., 1986. Transmission of honey bee viruses by *Varroa jacobsoni* Oud. European research on varroaosis control, Udine, Italy, in: Cavaloro, R. (Ed), Commission of the European Communities, Joint Research Centre, Ispra, Luxembourg.
- WISLON-RICH N., DRES S. T., STARKS P. T., 2008. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 54, 1392–1399.
- YUE C., GENERSCH E., 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honey bees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.*, 86, 3419-3424.

YUE C., SCHRÖDER M., BIENEFELD K., GENERSCH E., 2006. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J. Invertebr. Pathol.*, 92, 105-108.

YUN E. Y., LEE J. K., KWON O. Y., HWANG J. S., KIM I., KANG S. W., LEE W. J., DING J. L., YOU K. H. & GOO T. W., 2009. *Bombyx mori* transferrin: Genomic structure, expression and antimicrobial activity of recombinant protein. *Developmental & Comparative Immunology*, 33 (10), 1064-1069.

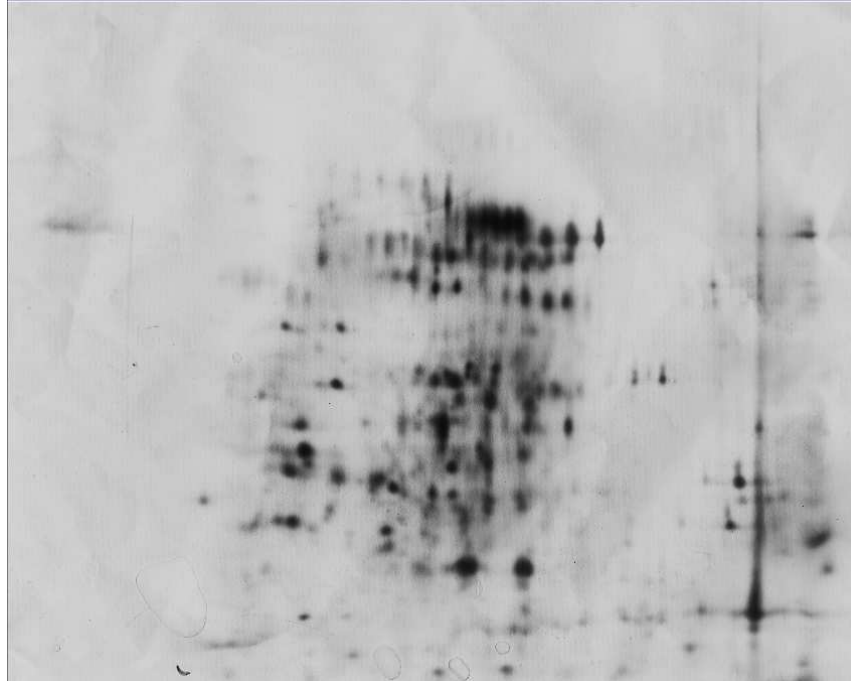
ZHOU H., SPICUGLIA S., HSIEH J. J. D., MITSIOU D. J., HØIBY T., VEENSTRA G. J. C., KORSMEYER S. J., & STUNNENBERG H. G., 2006. Uncleaved TFIIA Is a Substrate for Taspase 1 and Active in Transcription. *Molecular and cellular biology*, 26(7), 2728–2735

ZUFELATO M. S., LOURENÇO A. P., SIMOES Z. L. P., JORGE J. A., & BITONDI M. M. G., 2004. Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 1257–1268.

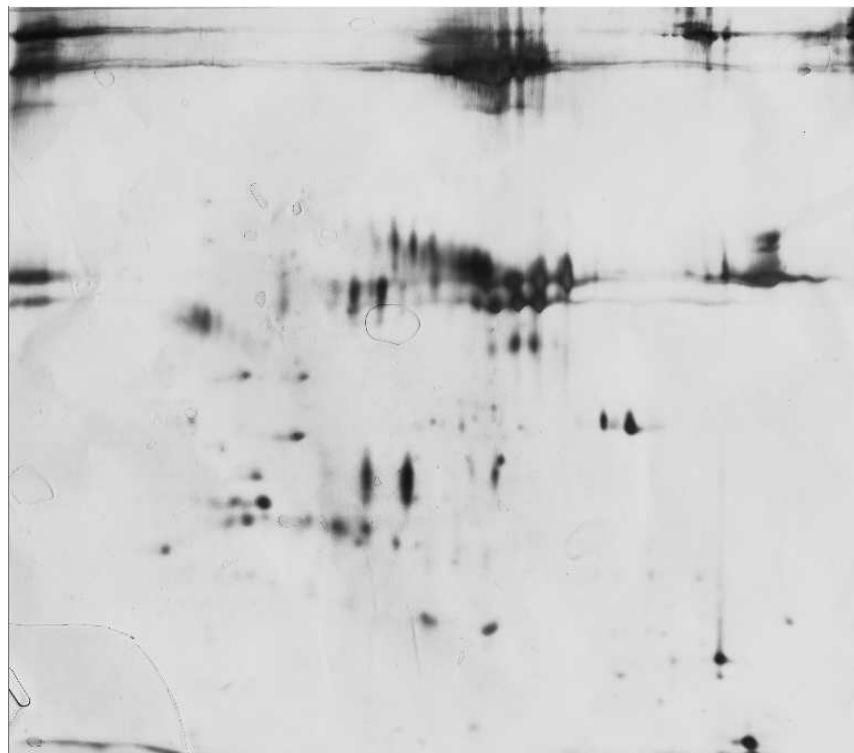
## Annexes

### Annexe I : Scans de gels 2D réalisés dans le cadre de la mise au point

a) Gel F UTC coloré au nitrate d'argent



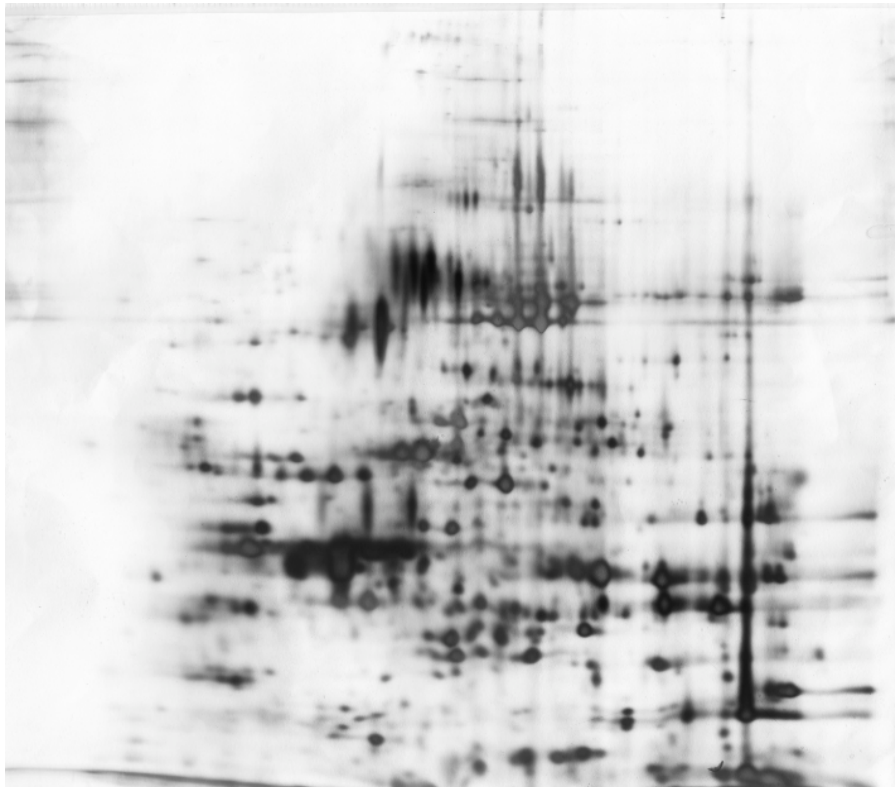
b) Gel F PBS coloré au nitrate d'argent



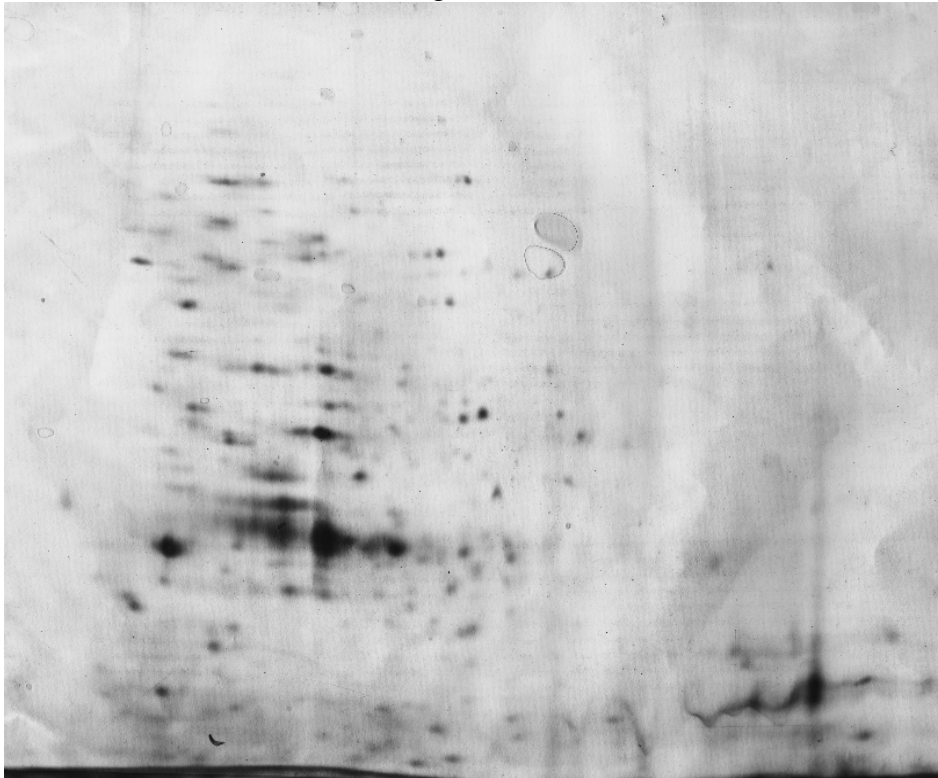
c) Gel C80 UTC coloré au nitrate d'argent



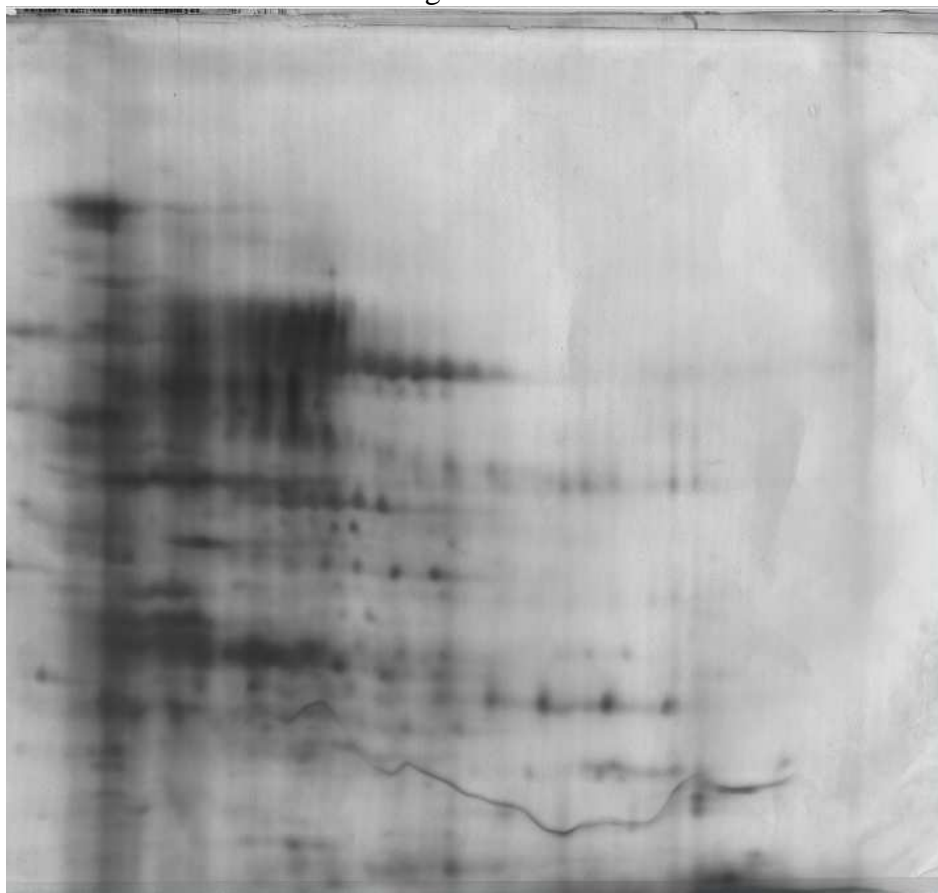
d) Gel C80 PBS coloré au nitrate d'argent



e) Gel C20 UTC coloré au nitrate d'argent



f) Gel C20 PBS coloré au nitrate d'argent

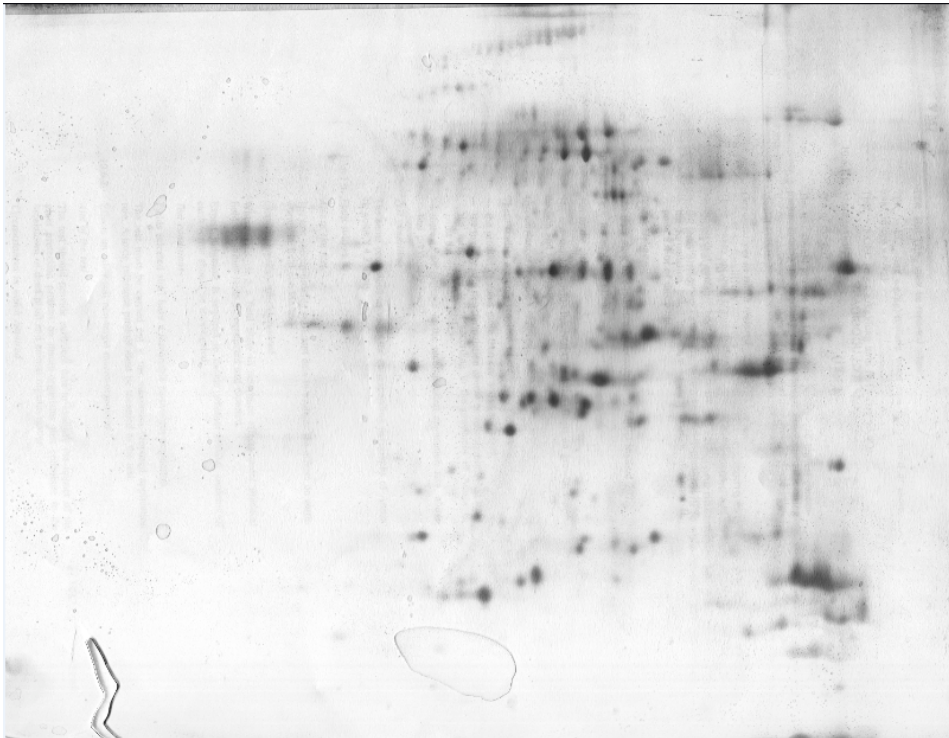


## Annexe II : Gels 2D colorés au nitrate d'argent

- a) Gel F UTC résultant d'un prélèvement particulièrement lent pour ce type d'échantillon



- b) Gel C80 UTC résultant d'un prélèvement particulièrement rapide pour ce type d'échantillon



### Annexe III: Tableau des protéines identifiées

N° Spot	PM	pI	Score	Nombre de peptides	Protéine identifiée	Facteur d'expression différentielle	Accession	Organism
368	29932	9.21	49	4	phosphoglycerate mutase 5	(+) 18	gi 66511103	[Apis mellifera]
98	37804	8,89	46	4	Threonine aspartase 1 (Taspase-1)	(+) 3,2	GI:66529880	[Apis mellifera]
50	37718	5,92	42	4	hypothetical protein	(+) 2,4	gi 6678459	[Apis mellifera]
53	69846	8,86	41	5	Hypothetical protein CBG02874	(-) 2,2	gi 157751380	[Caenorhabditis briggsae AF16]
386	109563	8,97	34	4	Rim CG33547-PA	(+) 2,1	gi 189514813	Apis mellifera
93	39975	7,57	68	6	Aldolase CG6058-PF, isoform F	(+) 2,8	gi 110748949	Apis mellifera
427	80653	7,37	41	4	Kinesin-like protein at 61F CG9191-PA	(-) 2,3	gi 194227511	Apis mellifera
456	133238	6,30	160	17	similar to CG18140-PA	(-) 2,2	GI:66519127	[Apis mellifera]
199	117585	6,30	58	4	CG8920-PB, isoform B	(-) 2,1	GI:110764792	[Apis mellifera]
999	35938	8,32	49	6	CG10068-PA	(+) 6.4	GI:66513973	[Apis mellifera]
152	75642	6,38	104	14	Heat shock protein cognate 5	(+) 2.5	gi 66501507	[Apis mellifera]
29	97994	9,41	57	5	Protein phosphatase 2C CG2984-PA	(-) 4.3	GI:66555121	[Apis mellifera]
420	80033	6,77	74	8	transferrin	(-) 1.4	gi 58585086	[Apis mellifera]
379	80443	6,28	57	7	prophenoloxidase	(-) 1,5	gi 58585196	[Apis mellifera]
208	79951	5.69	60	5	Histidine decarboxylase CG3454-PA	(-) 1,4	GI:66500257	[Apis mellifera]
528	72326	6,08	49	5	hemocyanin subunit F	(+) 1,7	gi 28569690	[Apis mellifera]
165	190616	5,12	46	4	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1a	(-) 1,7	gi 224095869	[Apis mellifera]
995	16379	8,43	38	2	odorant binding protein ASP5	(+) 1,5	gi 195432789	[Apis mellifera]
369	35328	9,57	55	4	(col-56)	(+) 15	gi 17508941	Caenorhabditis elegans
898	61002	7,04	51	6	CG11265-PA, isoform A	(+) 2.7	gi 156554609	Apis mellifera
591	45632	8.55	45	3	26S protease regulatory subunit 8 isoform 1	(-) 1.7	GI:66520165	[Apis mellifera]
457	55173	7.99	49	3	CG6597-PA, isoform A	(-) 1.7	GI:66521752	[Apis mellifera]
149	30581	9,38	42	5	IP08159p	(+) 2	gi 66770735	[Drosophila melanogaster]
208	79951	5,69	60	5	Histidine decarboxylase CG3454-PA	(-) 1,4	GI:66500257	[Apis mellifera]
165	81940	5,45	53	4	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1a	(-) 1.7	GI:110760637	[Apis mellifera]
350	59765	5.87	46	6	p21/Cdc42/Rac1-	(-) 1,4	GI:110764306	[Apis mellifera]

					activated kinase 1			
121	109865	8,48	57	4	Topoisomerase III $\alpha$	(-) 2	GI:110763026	[Apis mellifera]