

Caractérisation génomique des pathogènes associés à l'abeille mellifère *Apis mellifera* et à son parasite acarien *Varroa destructor* dans les ruchers du Québec



Pierre Giovannazo, M.Sc., candidat au doctorat en sciences vétérinaires à l'Université de Montréal
Chercheur en apiculture, Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD)
et chargé de cours à l'Université Laval

Collaborateurs :

Nicolas Derome et **Émilie Hins**, CRSAD et Université Laval

*Ce projet de recherche a été rendu possible grâce au soutien financier
du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation*



Plusieurs travaux soulignent du rôle potentiel de la varroase dans la transmission d'infections secondaires et dans l'affaiblissement du système immunitaire des abeilles mellifères. Une grande partie du potentiel pathogène de l'acarien *Varroa destructor* résiderait non pas de l'action directe du parasitisme sur la santé de l'abeille, mais plutôt de l'impact des pathogènes associés à la présence des varroas. À ce jour, 18 virus des abeilles ont été identifiés et on reconnaît maintenant que les varroas pourraient agir comme vecteurs ou activateurs de plusieurs de ces virus. Quatre points supportent l'hypothèse d'interactions physiopathologiques complexes entre les varroas et l'abeille domestique :

- L'apparition des maladies virales dans le monde apicole coïncide avec l'émergence de la varroase sur *Apis mellifera* dans les années 1970 en Europe;
- Plusieurs virus de l'abeille ne sont pas létaux normalement pour une colonie;
- Des concentrations virales plus grandes ont été mesurées chez les abeilles avec la varroase comparativement aux abeilles sans varroase;
- Des virus ont été détectés dans les tissus des varroas.

Ces connaissances suggèrent la présence d'une action synergique entre le parasite *V. destructor* et son hôte *A. mellifera*. L'effet négatif de cette synergie pourrait donc être à l'origine de plusieurs cas de mortalités d'abeilles et même de l'effondrement complet de colonies.

L'objectif général de l'étude était de faire une étude génomique par PCR quantitative afin de détecter la présence de certains pathogènes viraux dans les colonies d'abeilles mellifères avec et sans contrôle de la varroase.

Le 9 juin 2008, 50 colonies ont été préparées avec 1,5 kg d'abeilles provenant du cheptel apicole du CRSAD et des jeunes reines issues du même greffage. Les ruches ont été construites à partir de matériel neuf afin d'assurer l'homogénéité sanitaire de toutes les colonies. Ces colonies ont été distribuées aléatoirement dans les deux groupes expérimentaux A (varroase contrôlée) et B (varroase non contrôlée) et ont été intégrées dans la routine apicole du CRSAD jusqu'en septembre 2009.

Variables dépendantes mesurées :

- Population d'abeilles et quantité de couvains;
- Évolution de la chute naturelle des varroas;
- Production de miel;
- Force relative avant et après l'hivernage;
- Présence de pathogènes par PCR quantitative et leur abondance relative par PCR quantitative dans des échantillons d'abeilles et dans des échantillons de varroas. Les virus évalués sont : virus des ailes déformées (DWV), virus de la cellule noire de la reine (BQCV), virus de la paralysie aiguë israélienne (IAPV), virus du Cachemire (KBV).

L'analyse génomique par PCR montre la présence de virus (DWV, IAPV, BQCV) dans les colonies d'abeilles. On les retrouve dans les tissus des abeilles ouvrières, des larves ainsi que dans ceux de l'ectoparasite *V. destructor*. Le KBV n'a pas été décelé dans nos échantillons. Le traitement des colonies contre la varroase réduit la contamination virale des abeilles et du couvain par le DWV et l'IAPV. Dans les colonies traitées contre la varroase, la proportion de colonies infestées par le DWV et le l'IAPV est inférieure à celle des colonies non traitées et il en est de même pour les charges virales.


Le contrôle de la varroase est important afin de minimiser les risques de contaminations virales dans les colonies d'abeilles. Le DWV est un virus qui a un impact majeur sur les jeunes abeilles émergentes tandis que l'IAPV a été identifié comme un des agents infectieux associé au Syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles (*Colony collapse disorder* ou CCD) aux États-Unis.

Il est maintenant possible de réaliser des analyses virales au laboratoire de Nicolas Derome (Université Laval).




Autre partenaire financier :

Centre de recherche en sciences animales de Deschambault.



Caractérisation génomique de pathogènes associés à *Apis mellifera* et à *Varroa destructor* au Québec

Nicolas Derome et Émilie Hins
Université Laval
Pierre Giovenazzo
Centre de recherche en sciences animales de Deschambault



Partenaires

	Programme de soutien à l'innovation en Agroalimentaire \$120 000
	Centre de recherche en sciences animales de Deschambault \$30 000
	Université Laval \$20 000



Pourquoi?

- Mettre en place une méthodologie et une expertise pour la détection des virus chez l'abeille mellifère au Québec;
- Réaliser une étude génomique par PCR qualitative et quantitative de pathogènes viraux chez *Apis mellifera*;
- Réaliser une étude préliminaire de la distribution de pathogènes viraux au Québec.



Pathologies présentes



abeilles faibles 018.avi

- Symptômes
 - Abeilles luisantes sans poils
 - Abeilles tremblantes à l'entrée de la ruche
 - Ailes en croix
- Analyses MAPAQ (C.Boucher)
 - IAPV positif
 - KBV positif
 - *Nosema cerena* positif
 - *Varroa destructor* positif



La varroase

- Le parasite *Varroa destructor* se nourrit de l'hémolymphe de l'abeille
 - Action directe
 - physiologie de l'abeille
 - Action indirecte
 - Infections secondaires
 - Porteurs de virus et autres pathogènes
 - Traitements acaricides
 - Pesticides de synthèse, acides organiques et autres.



Interactions physiopathologiques entre la varroase et l'abeille

- Selon Shen et al. 2005:
 - Apparition des maladies virales dans le monde apicole coïncide avec l'émergence de la varroase sur *A. mellifera* dans les années 1970;
 - Les cas d'infections virales ont augmenté significativement depuis 1987 aux USA et ils correspondent à une croissance du nombre de pertes de colonies d'abeilles à travers le pays.
 - Plusieurs virus de l'abeille ne sont pas létaux normalement pour une colonie;
 - Avant l'arrivée de *V. destructor* en Grande Bretagne, le virus de la paralysie aiguë de l'abeille n'a jamais causé la mort de colonies. Maintenant ces virus peuvent causer la mort de colonies lorsque cette infection est jumelée à la varroase.
 - Les concentrations virales sont plus grandes dans les abeilles avec la varroase comparativement aux abeilles sans varroase;
 - On détecte des virus dans les tissus des varroas.

Immunité des insectes

(Dadant 1992, Hoffmann et al. 1999, Yang et Cox-Foster 2007B)



Sécrétions de l'abeille

- Propolis
- Glandes hypopharyngiennes

Barrières corporelles

- Cuticule
- Trachées aériennes
- Tube gastrointestinal

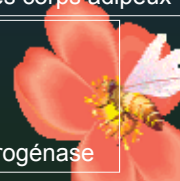
Réactions humorales

- Peptides antimicrobiens
 - Cecropines et défensines (+ de 400)
 - Synthèse principale par les corps adipeux



Réactions cellulaires

- Actions des hémocytes
 - Phagocytose, encapsulation
 - Ex.phénoloxydase et glucose deshydrogénase



Interactions physiopathologiques entre la varroase et l'abeille

- Varroa est souvent un vecteur/porteur (Chen et al. 2004, 2005)
 - Méthode RT-PCR (reverse transcriptase polymérase chain reaction) et RTQ-PCR (reverse transcriptase quantitative polymérase chain reaction)
 - Infection du couvain d'une colonie sans infestation virale par des varroas provenant d'une colonie infestée par la varroase et porteuse du virus

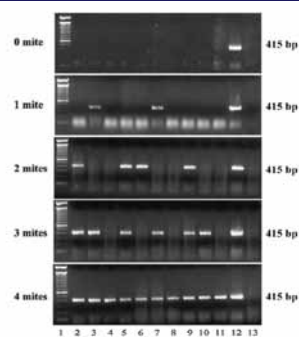


Figure 2. Representative RT-PCR results obtained from one transmission experiment involving bee pupae presumed to be KBV-negative and *Varroa* presumed to be KBV-positive. Total RNA was extracted from pupae exposed to varying numbers (0-4) of mites. All samples were subjected to RT-PCR. The number of mites introduced in each experimental group is indicated on the left of gel. Lane 1 = 100 bp DNA ladder; Lanes 2-11 = RNA from individual pupae (n = 10) after five days exposure to mites; Lane 12 = positive control (previously identified KBV positive sample); Lane 13 = negative control (without template). The band at 415 bp indicates the presence of KBV.

Interactions physiopathologiques entre la varroase et l'abeille

- Varroa est activateur de la réplication virale (Yang et Cox-Foster 2007B)
 - Méthode RTQ-PCR
 - La réplication virale du virus des ailes difformes est plus grande dans les abeilles avec varroase et que l'inoculation par *E. Coli* agit en synergie
 - (MF:mite free, NW:varroa infested normal wing, DW:varroa infested deformed wing, NTC:Non treatment control)

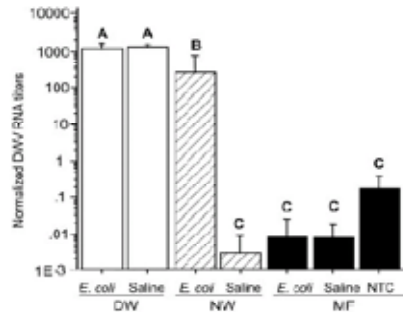


Fig. 4. The effect of varroa infestation and microbial exposure on DWV genomic RNA levels (mean \pm SEM) in newly emerged worker bees: DW, NW, and MF. Deformed-wing bees are heavily infected by DWV, and varroa infestation and microbial exposure boost the replication of DWV (note that the y axis is a log scale). The bees were either injected with bee saline or heat-killed *E. coli* suspended in the saline. NTC refers to the nontreatment control (i.e., the MF bees without injection). The bars with different letters are significantly different (ANOVA, $P < 0.0001$; pairwise comparison with Fisher's PLSD, $P \leq 0.042$).

Interactions physiopathologiques entre la varroase et l'abeille

- Varroa provoque une forme d'immuno suppression humorale (Yang et Cox-Foster 2007B)
 - Les niveaux d'ARNm codant pour l'hymenoptaecin sont inférieurs dans les groupes d'abeilles avec la varroase et chez lesquelles il y a eu injection d'une saline contenant une suspension d'*E. coli* ou d'*E. coli* tuées par chaleur.

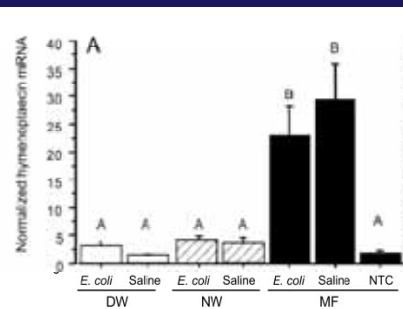


Fig. 2. The effect of varroa infestation on the expression of genes encoding the antimicrobial peptides in newly emerged worker bees: DW, NW, and MF. The bees were either injected with bee saline or heat-killed *E. coli* suspended in the bee saline. NTC refers to the nontreatment control (i.e., the MF bees without injection). All of the values shown are mean \pm SEM. (A) Varroa infestation suppressed the expression of hymenoptaecin gene. The bars with different letters are significantly different (ANOVA, $P < 0.0001$; pairwise comparison with Fisher's protected least significant difference (PLSD), $P \leq 0.0003$). (B) Varroa infestation suppressed the expression of defensin gene in

Conclusions

Tout facteur de stress recèle donc un potentiel pathogène important pour une colonie parasitée par *V. destructor*.

La varroase est une parasitose majeure et son contrôle est prioritaire.

Varroa destructor est un pathogène "clé",



Étude en France

virus in decreasing order of frequency →

number of apiaries	DWV	SBV	BQCV	ABPV	CBPV	KBV	number of viruses
10	■	■	■	■	■	■	4
6	■	■	■	■	■	■	3
5	■	■	■	■	■	■	5
3	■	■	■	■	■	■	5
3	■	■	■	■	■	■	4
1	■	■	■	■	■	■	3
1	■	■	■	■	■	■	3
1	■	■	■	■	■	■	3
1	■	■	■	■	■	■	2
1	■	■	■	■	■	■	2
1	■	■	■	■	■	■	1
1*							0
number of infected apiaries**	33 (94)	31 (89)	31 (89)	20 (57)	9 (26)	6 (17)	

virus distribution pattern in decreasing order of frequency

Figure 7. Prevalence pattern of 6 bee viruses in 36 apiaries in France revealed by RT-PCR (interpreted from Tentcheva et al., 2004b). Data given by the authors have been gathered for showing the infection of adults or pupae sampled during spring, summer or autumn 2002: a black box indicates that the corresponding virus has been diagnosed in one sample at least of adults and/or pupae. Virus (columns) and patterns of virus infection (rows) are ordered in decreasing order of frequency. Adapted from Tentcheva *et al.*, (2004b)

* This apiary was located in the Island of Ouessant which is Varroa free.

** Between parenthesis : infected among continental apiaries per cent.



Protocole projet génomique

Tableau 1. Description sommaire des groupes expérimentaux.

GROUPE A (N=25)	GROUPE B (N=25)
<p><u>Colonies à varroase contrôlée</u></p> <ul style="list-style-type: none">- Traitement 2 juillet 2008 avec Apistan®- Traitement début septembre 2008 avec le MiteAway2® (acide formique)- Traitement mi-novembre à l'acide oxalique par égouttement : 5 ml d'une solution contenant 35g d'acide oxalique par litre de sirop de sucrose (1:1, P/V) entre les cadres d'abeilles.	<p><u>Colonies à varroase non contrôlée</u></p> <p>Sans traitement anti varroa jusqu'en septembre 2009</p>

Préparation des colonies



Formation des jeunes colonies 9 juin 2008 avec un mélange d'abeilles provenant de 20 colonies infestées par la varroase. Matériel neuf.

Variables

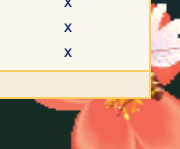
- Paramètres zootechniques
- Force de la colonie
 - Quantité de couvain
 - Nombre de cadre avec abeilles et couvain
 - Poids de la colonie
- Production de miel
- Évolution de la chute naturelle des varroas
- Varroas totaux : Apivar™ (septembre 09)



Échantillonnage d'abeilles

Tableau 2 : Dates d'échantillonnage des abeilles et des varroas ainsi que les analyses génomiques réalisées avec la PCR qualitative. Abréviations : Virus des ailes déformées DWV; Virus de la cellule noire de la reine BQCV; Virus israélien de la paralysie aiguë IAPV; Virus de Cachemire KBV; Nosema apis NA; Nosema cerana NC.

Échantillonnages	Analyses génomiques avec la PCR qualitative			
	DWV*	BQCV	IAPV	KBV
9 juillet 2008				
- Ouvrières intra-colonies	x	x	x	x
- Larves	x	x	x	x
10 novembre 2008				
- Ouvrières intra-colonies	x	x	x	x
- Larves	x	x	x	x
14 mai 2009				
- Ouvrières intra-colonies	x	x	x	x
- Larves	x	x	x	x
13 septembre 2009				
- Butineuses	x	x	x	x
- Ouvrières intra-colonies	x	x	x	x
- Larves	x	x	x	x
- Varroas sur cartons	x	x	x	x



PCR quantitative

Tableau 4. Amorces utilisées en PCR qualitative pour la détection des différents virus analysés: virus des ailes déformés (DWV), virus Israélien de la paralysie aigüe (IAPV), virus de la cellule noire de la reine (BQCV), et pour le gène de contrôle-qualité (β -actine) chez *Apis mellifera* et chez *Varroa destructor*.

Identification	Amorce sens	Amorce antisens
DWV	CAGTAGCTTGGGCGATTGTT	AGCTTCTGGAACGGCAGATA
IAPV	CGTCGACCCATTGAAAAAGT	GGTTGGCTGTGTGCATCAT
BQCV	TTTGCTATGCGTGTGTAGGC	TGCGTAAATTGGTTCATCA
KBV	GATGAACGTCGACCTATTGA	TGTGGGTTGGCTATGAGTCA
β -actine <i>A. mellifera</i>	AGGAATGGAAGCTTGCGGTA	AATTTTCATGGTGGATGGTGC
β -actine <i>V. destructor</i>	TCGTCGCCTTAGAAAAGTCGTACGAG	GACAGGGAGGCAAGGATGGAAC

PCR Qualitative

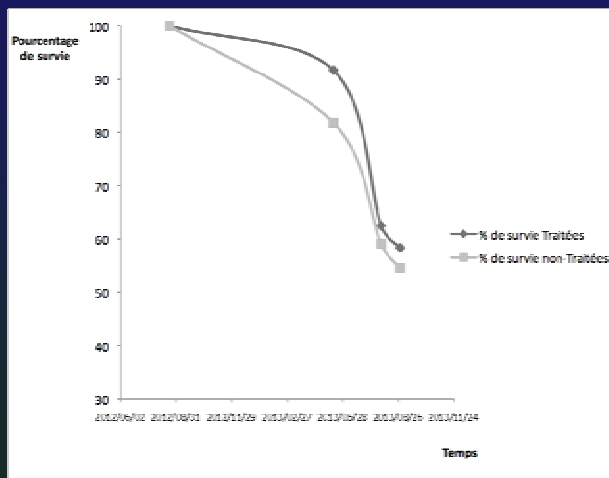
Tableau 7. Amorces utilisées en qPCR pour les virus analysés: virus des ailes déformés (DWV), virus Israélien de la paralysie aigüe (IAPV), virus de la cellule noire de la reine (BQCV), et le gène contrôle Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) chez *Apis mellifera*.

Identification	Amorce sens	Amorce antisens
DWV	GGCGATTGTTTCGATTTTGG	ACTTGAACGGCGGATTTCCT
IAPV	CCCAAAGTATGTACGAAGCT	TTCACCTGAACATCACATCG
BQCV	TAGTGGACACAACCCAGGTG	CGACACGTACCATTTAAGAGT
GAPDH	GATGCACCCATGTTTGTGTTG	TTTGCAGAAGGTGCATCAAC

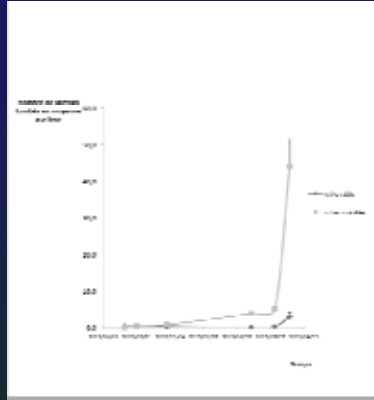
Résultats

	Traitées	Non Traitées	Valeur P*
Quantité de couvain (cellules avec larves et œufs), moyenne ± erreur standard			
19 Août 2008	29 641 ± 890 (24)	32 326 ± 2 023 (22)	0.218
12 Mai 2009	19 821 ± 1 813 (21)	24 661 ± 1 371 (18)	0.034*
28 Juillet 2009	26 836 ± 3 009 (15)	25 483 ± 11 034 (12)	0.759
28 Août 2009	26 401 ± 3 065 (15)	24 414 ± 1 212 (12)	0.761
Force (cadres avec abeilles et couvain)			
Jun 2008 (force des nucléis au début)	2	2	
18 Novembre 2008	6.9 ± 0.3 (24)	7.8 ± 0.2 (22)	0.041*
23 Avril 2009	4.9 ± 0.4 (24)	6.0 ± 0.5 (22)	0.103
Poids (kg)			
18 Novembre 2008	37.4 ± 0.9 (24)	39.3 ± 0.7 (22)	0.094
16 Avril 2009	28.2 ± 0.8 (24)	31.5 ± 0.7 (22)	0.003*
Consommation (kg)			
hiver 08-09	9.2 ± 0.5 (24)	7.9 ± 0.3 (22)	0.033*
Gain miel (kg)			
2009	28.6 ± 3.7 (15)	30.6 ± 5.0 (12)	0.748

Résultats



Résultats

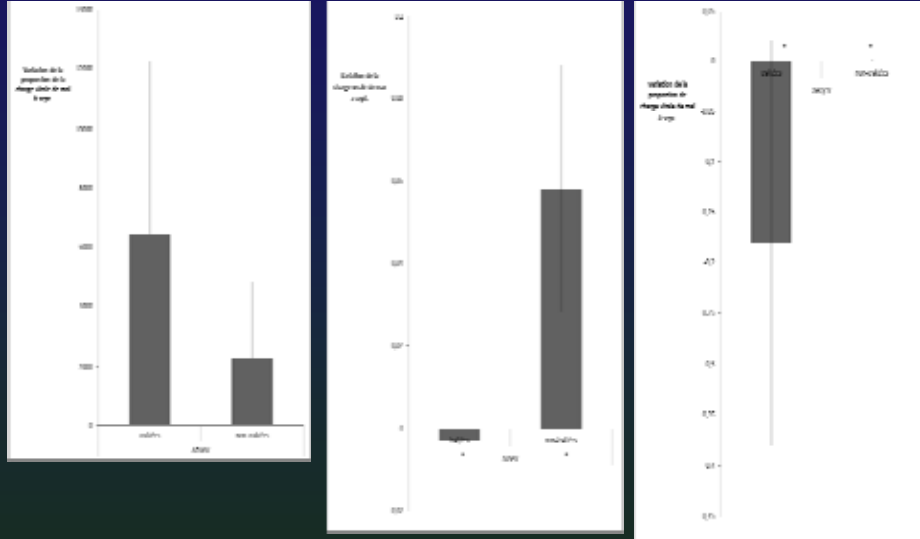


	Traitées	Non Traitées	Valeur P*
Chute naturelle de varroas par jour (moyenne ± erreur standard)			
9 juillet 2008	0.4 ± 0.1 (24)	0.05 ± 0.02 (22)	< 0.001
19 août	0.7 ± 0.1 (24)	0.5 ± 0.1 (22)	0.298
30 octobre	0.2 ± 0.1 (24)	0.8 ± 0.2 (22)	0.008
21 mai 2009	0.1 ± 0.1 (24)	3.8 ± 0.3 (22)	< 0.001
16 juillet	0.3 ± 0.1 (22)	4.9 ± 0.8 (18)	< 0.001
21 août	2.5 ± 0.7 (21)	34.4 ± 6.5 (18)	< 0.001

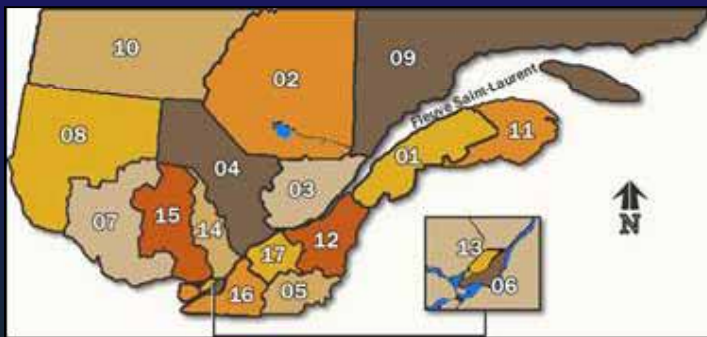
Résultats

	Date	DWV		IAPV		BQCV	
		A	B	A	B	A	B
Ouvrières	7 juillet 2008	6/24	8/25	16/24	18/25	23/24	23/25
	10 novembre 2008	6/24	7/24	1/24*	9/24*	24/24*	12/24*
	14 mai 2009	21/22	17/18	0/22	0/18	21/22	17/18
	13 septembre 2009	12/13	12/12	0/13	1/12	13/13	12/12
Couvains	10 novembre 2008	1/24	0/23	0/24	2/23	0/24	0/23
	14 mai 2009	1/22	0/18	1/22	1/18	0/22	1/18
	13 septembre 2009	5/10	10/12	0/10	0/12	1/10	1/12
Varroas	13 septembre 2009	13/13	12/12	11/13*	2/12*	13/13	15/17

Résultats



Enquête préliminaire provinciale



Région apicoles du Québec

1- Bas Saint-Laurent; 2- Saguenay/Lac-Saint-Jean; 3- Capitale Nationale; 4- Mauricie; 5- Estrie; 6- Montréal; 7- Outaouais; 8- Abitibi-Témiscamingue; 9- Côte Nord; 10- Nord du Québec; 11- Gaspésie/Iles de la Madeleine; 12- Chaudière-Appalaches; 13- Laval; 14- Lanaudière; 15- Laurentides; 16- Montérégie; 17- Centre du Québec.

Enquête préliminaire provinciale

Région	Apiculteur	Rucher	varroase	NC	NA	IAPV	BQCV	DWV	KBV
03	15	A	<1%	+	-	+	+	+	-
		B		-	-	-	-	-	-
04	1	A	<1%	-	-	-	+	+	-
		B		-	-	+	+	+	-
	3	A	5.6%	+	-	-	+	-	-
		B		+	-	+	+	+	-
	4	A	2.9%	+	-	+	+	+	-
		B		+	-	+	+	+	-
9	C		+	-	+	+	+	-	
	D		+	-	+	+	+	-	
12	10	A	<1%	+	-	+	+	+	-
		B		+	-	+	+	+	-
		C		+	-	+	+	+	-
		D		+	-	+	+	+	-
		E		+	-	+	+	+	-
				+	-	+	+	+	-
	17	A	5.6%	+	-	+	+	+	-
		B		+	-	+	+	+	-
	19	A	<1%	-	-	+	+	+	-
		B		-	-	+	+	+	-
21	A	16.3%	+	+	+	+	+	-	
	B		-	-	+	+	+	-	
17	23	A	3.5%	-	-	-	+	+	-
		B		+	-	+	+	+	+
	25	A	3.5%	-	-	+	+	+	-
		B		-	-	+	+	+	-
	27	A	4.0%	+	-	+	+	+	-
		B		+	-	+	+	+	-
		C		+	-	+	+	+	-
		D		+	-	+	+	+	-
32	E	19.5%	+	-	+	+	+	-	
	A		+	-	+	+	+	-	
	B		+	-	+	+	+	-	



Résumé

- *Nosema cerana*: 23/32
- *Nosema apis*: 1/32
- Virus cellule noire de la reine: 37/37
- Le virus des ailes déformées: 35/37
- Virus israélien paralysie aiguë: 31/37
- Virus de Cashmire: 1/37



Conclusions

- Présence des virus dans les colonies d'abeilles au Québec
 - Nos travaux démontrent la présence de virus (DWV, IAPV, BQCV) du virus des ailes déformés dans les colonies d'abeilles du Québec. On les retrouve dans les tissus des abeilles ouvrières, des larves ainsi que dans ceux de l'ectoparasite *Varroa destructor*.
 - La présence du KBV n'a pas été mesurée dans notre échantillonnage.



Conclusions

- Traitement contre la varroase et son impact sur la contamination virale
 - Le contrôle de la varroase est important afin de minimiser les risques de contaminations virales dans les colonies d'abeilles. Dans les colonies traitées contre la varroase, la proportion de colonies infestées par le DWV et le IAPV est inférieure à celle des colonies non traitées et il en est de même pour les charges virales.



Conclusions

- Application possible pour l'industrie
 - Les analyses virales sont maintenant disponibles dans un laboratoire du Québec. Le laboratoire de Nicolas Derome (Université Laval) offre depuis 2009 les services d'analyses virales via les services du Centre de recherche en sciences animales de Deschambault.



L'équipe CRSAD

