Aix Marseille Université I – Université de Provence

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université d'Aix Marseille Université I

Mention : Bioinformatique, biochimie structurale et génomique

Présentée et soutenue publiquement par

Aurore Chevin

Le 10 septembre 2012

Le virus de la paralysie chronique de l'abeille : contribution à l'étude de la caractérisation de protéines virales

Jury :

Dr. Decroly Etienne	Président du jury
Dr. Tordo Noël	Rapporteur
Dr. Le Conte Yves	Rapporteur
Dr. Darbon Hervé	Directeur de thèse
Dr. Thiéry Richard	Co-directeur de thèse
Dr. Chabert Magali	Examinateur

A la mémoire de J-E. Chevin (1954-2009)
Om mani padme hum
(Mantra tibétain)

Sommaire

Sommaire 5

Remerciements 10

Liste des figures 12

Liste des tableaux 13

Liste des abréviations 14

Introduction générale 17

PARTIE 1 : Introduction bibliographique 23

Chapitre 1 : La paralysie chronique de l'abeille et son agent étiologique 25

I. Syndromes 27

II. Détection 28

III. Transmission 31

A. Transmission verticale via la reine 31

B. Transmission horizontale 32

1. Transmission indirecte 32

a) Par *Varroa destructor* 32

b) Par des fourmis 33

2. Transmission par voie trophique 34

3. Transmission par contact 35

IV. Répartition du virus et de la maladie 36

A. Répartition géographique et saisonnière 36

B. Répartition dans la ruche 38

C. Localisation du virus dans l'abeille 39

1. Dans l'abeille entière 39

2. Dans le système nerveux 39

Chapitre 2 : Etude du virus : la particule virale 43

I. Sa morphologie 45

II. Son génome 47

III. La position phylogénétique du CBPV 49

IV. Les protéines du CBPV 53

A. Protéines non-structurales putatives 53

B. Protéines structurales putatives 55

Objectifs de ce travail de thèse 57

PARTIE 2 : Matériels et Méthodes 59

I. Matériels biologiques 61

A. Infections expérimentales 61

1. Infections par injection de purification virale 61

a) Abeilles pour la purification virale 61

b) Abeilles pour le prélèvement d'hémolymphe 62

2. Infections par injection des ARN nus du CBPV 62

a) Infection expérimentale I 62

b) Infection expérimentale II 62

c) Infection expérimentale III 63

B. Suivi des expérimentations et prélèvements 63

1. Prélèvements pour purification virale 63

2. Prélèvement de l'hémolymphe 63

3. Prélèvements suite à l'injection d'ARN nus 64

C. Traitements des échantillons 64

1. Purification virale 64

2. Hémolymphe 65

3. Abeilles entières 65

II. Analyses moléculaires 65

A. Extraction de l'ARN viral et synthèse de l'ADNc 65

B. PCR et PCR en temps réel 65

C. Détection du brin négatif de l'ARN du CBPV 66

D. Electrophorèse des ARN 66

III. Microscopie électronique 67

IV. Expression protéique 67

A. Traduction *in vitro* 67

1. Réaction de traduction *in vitro* 67

2. Séparation et révélation des protéines 69

B. Production de protéines recombinantes 69

1. PCR 71

2. Réactions de recombinaison et clonages 72

3. Expressions des protéines 72

4. Purification des protéines exprimées ... 73
a) Sous conditions non-dénaturantes ... 73
b) Sous conditions dénaturantes ... 74
V. Méthodes d'identification des protéines virales ... 75
A. Recherche des protéines virales dans l'hémolymphe d'abeilles ... 75
1. Préparation des extraits protéiques ... 75
2. 2D-dige (Two dimensional differential in gel electrophoresis) ... 77
3. Analyse des images de gels ... 78
4. Digestion des protéines et analyse par spectrométrie de masse ... 79
B. Etudes antigéniques ... 79
1. Les anti-sérums ... 79
2. Analyse antigénique ... 81
a) Séparation des protéines ... 81
b) Western blot ... 81
C. Purification virale analysée par spectrométrie de masse ... 82
1. Séparation sur gel d'électrophorèse 1D ... 82
2. Digestion des protéines avec la trypsine ... 82
3. Analyse par Nano-HPLC MALDI-TOF/TOF ... 83
VI. Analyse des séquences de protéines ... 84
PARTIE 3 : Résultats et discussion ... 85
Chapitre 1 : Comparaison des protéomes d'hémolymphe ... 87
I. Analyses des différents échantillons d'hémolymphe ... 89
II. Identification des protéines différentiellement exprimées ... 91
III. Rôle des protéines identifiées ... 93
A. Protéines présentant une expression plus forte suite à l'infection ... 93
B. Protéines présentant une expression moins forte suite à l'infection ... 95
C. Protéines présentant une expression différentielle mais faible ... 97
IV. Discussion ... 98
Chapitre 2 : Développement d'un modèle in vivo ... 99
I. Premiers essais d'infections expérimentales avec des ARN viraux ... 103
A. Infection expérimentale I ... 103
B. Infection expérimentale II ... 104
II. Test d'injectivités des ARN du CBPV ... 104
Chapitre 3 : Expression des protéines virales putatives ... 113

I. Réalité des ORF 115
A. Essais de traduction *in vitro* des protéines potentiellement exprimées 115
1. Premièrs essais de traduction *in vitro* 115
2. Tentatives d'optimisation de la réaction 117
a) Vérification de l'intégrité des ARN 117
b) Quantités d'ARN et évaluation de la proportion en résidus lysine 117
c) Composition du mélange réactionnel, facteur d'inhibition et temps d'incubation 119
d) Quantité et structure des ARN viraux, révélation par chemioluminiscence 121
B. Discussion 121
II. Expression de protéines recombinantes du CBPV 123
A. Expression des protéines putatives de l'ARN 1 125
1. ORF 1 125
2. ORF 2 127
3. ORF 3 129
B. Expression des protéines putatives de l'ARN 2 131
1. ORF 1 131
2. ORF 2 et ORF 3 133
3. ORF 4 133
C. Discussion 133
Chapitre 4 : Identification de protéines virales 135
I. Identification de protéines à partir de la purification virale 136
A. Protéines structurales 136
B. Mécanisme de contrôle de la traduction des protéines structurales 163
C. Protéines non-structurales 165
II. Identification de protéines à partir de clarifiats d'abeilles 167
A. Protéine structurale putative (pSP) 167
B. RdRp 167
III. Discussion 170
PARTIE 4 : Conclusion et perspectives 173
I. Etudes comparatives des protéomes d'hémolymphes 174
II. Modèle d'infection par ARN nus et caractérisation du génome et des protéines 176
A. Extrémité 5' : structure CAP 176
B. ARN majoritaires et minoritaires et particule virale associée 177
III. Protéines structurales identifiées 178

A. Encapsidation des ARN et fonctions putatives de la pSP 178
B. Existence de la hSP 180
IV. Autres protéines virales 180
A. RdRp et son mécanisme de régulation (frameshift) 181
B. Activité protéase putative 182
V. Position taxonomique 183
Références 185
Annexes 197
Annexe 1 : Les 12 principaux virus de l'abeille et leur virose 199
Annexe 2 : Les couples d'amorces utilisés pour amplifier les séquences des protéines recombinantes 203
Annexe 3 : Communications orales et affichées lors de congrès nationaux et internationaux 207

Remerciements

Je remercie cordialement les membres du jury de cette thèse qui me font l'honneur d'examiner mon travail. Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Noël Tordo et le Dr. Yves Leconte qui ont consenti à être les rapporteurs de cette thèse.

Je souhaite remercier le Dr. Etienne Decroly pour sa participation au jury de soutenance en tant qu'examinateur.

Mes sincères remerciements vont également au Pr. Hervé Darbon, mon directeur de thèse, sans qui je n'aurais pu travailler sur ce sujet et au Dr. Richard Thiéry, directeur de l'Anses, laboratoire de Sophia-Antipolis et co-directeur de cette thèse : merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et de m'avoir fait confiance en me laissant une grande liberté dans le déroulement de mon travail.

Je remercie également le Dr. Magali Chabert, chef de l'unité « Pathologies de l'abeille » de l'Anses, laboratoire de Sophia-Antipolis, qui m'a encadrée durant ces 4 ans, m'a conseillée et m'a enseigné toutes les connaissances sur les pathologies de l'abeille. Malgré son emploi du temps surchargé, elle a toujours pris le temps de m'écouter et de me soutenir.

Cette thèse n'aurait pu se dérouler sans un support financier, par conséquent j'adresse mes remerciements à l'Anses pour m'avoir accordé une bourse doctorale et une prolongation de financement.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'Anses, laboratoire de Sophia-Antipolis, particulièrement aux membres de l'équipe « Virologie et diagnostic moléculaire » de l'unité « Pathologie de l'abeille ».

Mes sincères remerciements vont à tous les collaborateurs qui ont participé à ce travail de thèse et qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire :

- L'ensemble des membres du laboratoire d'Entomologie fonctionnelle et évolutive de Gembloux en Belgique.

- L’ensemble des membres du département de « Virologie structurale et drug design » du laboratoire « Architecture et fonction des macromolécules biologiques », UMR 6098, CNRS, à Marseille, et tout particulièrement le Dr. Bruno Coutard pour sa précieuse aide, ses conseils et sa disponibilité même après mon départ de Marseille ainsi que le Dr. Bruno Canard pour ses conseils et son implication au sein de mon comité de thèse et qui m’a donné, justement, la possibilité d’effectuer certain de mes travaux de thèse à Marseille.

- Le Dr. Anne-Sophie Dabert-Gay responsable de la plate-forme d’analyse de protéines de l’institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, UMR 7275, CNRS, de Valbonne, pour sa contribution à ce travail et sa très grande gentillesse.

J’exprime ma profonde gratitude à Philippe Blanchard pour sa disponibilité, son encadrement, son soutien, sa gentillesse, sa bonne humeur...

A Aurélie Delcont, j’adresse bien plus que des remerciements : toute mon amitié à celle qui a été mon coach mental et ma confidente de bureau.

Je remercie également :

- Ma mère et ma sœur, ainsi que Cath et Véro, pour leur immense soutien à distance et aussi pour avoir subi, sans rien dire, mes nombreuses sautes d’humeur, surtout durant la rédaction de ce manuscrit.

- Mes amis du Nord : Ladyhead, Fiston, Oz, et Oliv’ qui ont toujours été là pour me soutenir, me remonter le moral malgré les nombreux kilomètres qui nous séparaient. Je vous remercie de ne pas m’avoir oubliée et d’avoir partagé une bière avec moi à chaque fois que je rentrais dans le Nord.

- Mon amie du Sud, Cosette qui pendant ces 4 ans a rendu ma vie beaucoup plus joyeuse dans une région peu accueillante.

- Et, bien entendu, Romain qui a toujours fait son possible pour me donner le sourire et me détendre durant les moments de crise.

- Ma Kwak et la musique métal qui m’ont accompagnée durant ce chapitre de ma vie, et qui m’ont également aidée à garder la tête haute et à rester positive malgré les périodes difficiles…

Liste des figures

Figure 1 : Les différents syndromes de la paralysie chronique historiquement décrits 26
Figure 2 : Abeille atteinte du syndrome de type 2 26
Figure 3 : Distribution du CBPV dans différentes parties du cerveau. 40
Figure 4 : Distribution des ARN positif et négatif du CBPV dans le cerveau d'abeilles issues d'infection naturelle. 40
Figure 5 : Visualisation du CBPV en microscopie électronique 44
Figure 6 : Microscopie électronique du CBPSV, Chonic bee paralysis satellite virus 46
Figure 7 : Gel d'agarose des ARN majoritaires du CBPV 46
Figure 8 : Organisation du génome du CBPV : ARN 1 et 2 48
Figure 9 : Position phylogénétique du CBPV 50
Figure 10 : Position phylogénétique du CBPV après la découverte de LSV 1 et 2 52
Figure 11 : Mécanisme du frameshift (fs) putatif au niveau de l'ORF 1 et 3 de l'ARN 1 du CBPV 54
Figure 12 : Western blot réalisé à partir d'une purification virale 54
Figure 13 : Abeilles en conditions expérimentales 60
Figure 14 : Infection expérimentale par injection intra-thoracique 60
Figure 15 : Localisation et longueur en acides aminés (aa) des séquences protéiques correspondant aux protéines entières ou tronquées sélectionnées pour la production de protéines recombinantes. . 68
Figure 16 : Procédures appliquées pour la production des protéines recombinantes 70
Figure 17 : Principe de la 2D-Dige 76
Figure 18 : Schéma montrant la comparaison des gels comportant les différents échantillons 90
Figure 19 : Gel de 2D-Dige présentant les 125 spots sélectionnés et excisés 90
Figure 20 : Visualisation des ARN viraux sur gel d'agarose en conditions dénaturanres 116
Figure 21 : Protéines traduites révélées par la méthode colorimétrique 118
Figure 22 : Protéines traduites révélées par la méthode chémioluminescente des protéines 120
Figure 23 : Localisation sur l'ARN 1 des séquences protéiques correspondant aux protéines exprimées 126
Figure 24 : Localisation de CBPV 4 et 5, respectivement en amont et en aval du site de frameshift putatif 126
Figure 25 : Gel SDS-Page montrant différentes étapes de purification de CBPV 9 128
Figure 26 : Distribution des peptides identifiés par PMF sur la séquence correspondante à la protéine CBPV 9 130
Figure 27 : Localisation sur l'ARN 2 des séquences protéiques correspondant aux protéines exprimées 132
Figure 28 : Mécanisme de « stop codon readthrough » au niveau de l'ORF 3 et 2 de l'ARN 2 162
Figure 29 : Immunoblots sur des clarifiats d'abeilles issues d'infections expérimentales 166
Figure 30 : Immunoblots sur des clarifiats d'abeilles issues d'infections naturelles 168

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des virus séquencés de l'abeille 20
Tableau 2 : Similitudes entre le CBPV et les virus des familles *Nodaviridae* et T*ombusviridae*..... 50
Tableau 3 : Protocole d'immunisation des lapins réalisé par la société P.A.R.I.S..... 80
Tableau 4 : Résultats de la RT-qPCR, des PCR conventionnelles (détection des autres pathogènes de l'abeille) et PCR spécifique du brin négatif de l'ARN 1 du CBPV, réalisés à partir des différents prélèvements d'hémolymphe..... 88
Tableau 5 : Protéines identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight)..... 92
Tableau 6 : Infection expérimentale I : Evaluation de la charge virale du CBPV et détection du brin négatif de l'ARN 1 du CBPV..... 102
Tableau 7 : Infection expérimentale II : Evaluation de la charge virale du CBPV et détection du brin négatif de l'ARN 1 du CBPV..... 102
Tableau 8 : Proportion de résidus lysine dans les séquences des protéines putatives du CBPV..... 116
Tableau 9 : Conditions optimales d'expression des protéines suite aux tests analytiques 124

Liste des abréviations

2D-dige : 2 dimensional differential in gel electrophoresis
His : Histidine
ACN : Acétonitrile
ADN : Acide désoxyriblonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFC : Adjuvant de Freund complet
AFI : Adjuvant de Freund incomplet
ARN : Acide ribonucléique
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
ca : Calice
CC : Central complex, corps central
CCD : Colony collapse disorder
CCD (protein) : Cristallographic construct design
CCl_4 : Tétrachloride de carbone
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CSL : Central Science Laboratory
DETC : Diethylthiocarbamate
DEPC : Diethylpyrocarbonate
dl : Dorsal lobes, lobes dorsaux
DTT : Dithiothreitol
eb : Ellipsoid body, corps en ellipse
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay
es : Esophageal foramen, orifice de l'oesophage
FAO : Food organization of the united Nations
fb : Fan shaphed body, corps en éventail
fs : Frameshift
glo : Glomeruli, glomerules
H : Hémolymphe
HCCA : α-cyano-4-hydroxycinnamic acid
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC : High-performance liquid chromatography
hSP : hypothetical structural protein, protéine structurale hypothétique
IAA : Iodoacetamide
Ich : Inner chiasma, chiasme interne
ICTV : International committee on taxonomy of viruses
IDG : Immunodiffusion en gélose
Idgf4 : Imaginal disk growth factor 4
IEF : Isoelectric focusing
iKc : Inside of Kenyon cell somata, intérieur du soma des cellules de Kenyon
IMAC : Immobilized metal affinity chromatography
IPG : Immobilized pH gradient
IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kDa : kiloDalton
la : Lamina, laminaire
LA : Antennal lobes, lobes antennaires

LC : Liquid chromatography
LD : Limite de détection
lo : Lobulla, lobullaire
LQ : Limite de quantification
LSR : Lateral subesophageal ring, anneau lateral suboesophagien
MALDI : Matrix assisted laser desorption/ionisation
me : Medulla, médullaire
MM : Masses moléculaires
MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
Mowse : MOlecular Weight SEarch
MS : Mass spectrometry, spectrométrie de masse
NaCl : Chlorure de sodium
NH4HCO3 : Bicarbonate d'amonium
Och : Outer chiasma, chiasme externe
oKc : Outside of Kenyon cell somata, extérieur du soma des cellules de Kenyon
ORF : Open reading frame, cadre ouvert de lecture
Page : Polyacrylamide gel electrophoresis, électrophorèse en gel de polyacrylamide
PB : Phosphate buffer, tampon phosphate (K_2HPO_4 et KH_2PO_4)
pb : Paire de bases
pb : Protocerebral bridge, pont protocérébral
PCR : Polymerase chain reaction, réaction de polymérase en chaîne
PGK : Phosphoglycérate kinase
PGM : Phosphoglycérate mutase
pI : Point isoélectrique
pl : Protocerebral lobes, lobes protocérébrales
PM : Poids moléculaires
PMF : Peptide mass fingerprint, empreinte peptidique massique
Poly(A) : Polyadénylé
pSP : predicted structural protein, protéine structurale prédite (ou putative)
p/v : Poids/volume
qPCR : Quantitative PCR
RdRp : RNA-dependent RNA polymerase, ARN polymérase ARN-dépendante
RT : Reverse transcription, transcription inverse
SB : Super broth
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SEC : Size exclusion chromatography, chromatographie d'exclusion stérique
Serpin : Serine protease inhibitor
sog : Subesophageal ganglion, ganglion suboesophagien
SPH : Serine protease homolog
TBST : Tris-buffered Saline and Tween 20
TFA : Trifluoroacetic acid, acide trifluoroacétique
Ti : Témoin inoculé
Tni : Témoin non inoculé
TOF : Time of flight
Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRX : Thiorédoxine
v/v : Volume/volume
VLP : Virus like particle
VSR : Ventral subesophageal ring, anneau ventral suboesophagien

Virus de l’abeille :

ABPV : Acute bee paralysis virus, virus de la paralysie aiguë de l’abeille
BQCV : Black queen cell virus, virus de la cellule royale
BVX : Bee virus X, virus X de l’abeille
BVY : Bee virus Y, virus Y de l’abeille
CBPSV : Chronic bee paralysis satellite virus, virus satellite de la paralysie chronique de l’abeille
CBPV : Chronic bee paralysis virus, virus de la paralysie chronique de l’abeille
CWV : Clouding wing virus, virus des ailes nuageuses
DWV : Deformed wing virus, virus des ailes déformées
FV : Filamentous virus, virus filamenteux
IAPV : Israeli acute paralysis virus, virus israëlien de la paralysie aiguë
KBV : Kashmir bee virus, virus de l’abeille du Cachemire
LSV : Lake sinai virus, virus du lac Sinaï
SBPV : Slow bee paralysis virus, virus de la paralysie lente de l’abeille
SBV : Sacbrood virus, virus du couvain sacciforme

Pathogènes de l’abeille :

M. mellificae : *Malpighamoeba mellificae*
N. apis : *Nosema apis*
N. cerenae : *Nosema ceranae*
V. destructor : *Varroa destructor*

Autres virus :

CrPV : Criquet paralysis virus, virus de la paralysie du criquet
BaMV : Bamboo mosaic virus : virus de la mosaïque du bambou
BMV : Brome mosaic virus, virus de la mosaïque du brome
RCNMV : Red clover necrotic mosaic virus, virus de la mosaïque nécrotique du trèfle rouge
TEV : Tobacco etch virus, virus de la gravure du tabac

Introduction générale

La Terre perd entre un et dix pourcent de biodiversité par décennie, principalement due à la perte d'habitat, à l'invasion de nuisibles, à la pollution et à la surexploitation. Par ailleurs, la biodiversité végétale est dépendante de la pollinisation, celle-ci qui est donc vitale pour notre écosystème.

L'abeille (*Apis mellifera*) fait partie des insectes pollinisateurs les plus économiquement importants dans le monde. La biologie des abeilles et leur habileté à communiquer la localisation des ressources florales à leurs congénères font d'elles un pollinisateur particulièrement efficace. La valeur de la pollinisation par l'abeille sur l'agriculture mondiale a été estimée à environ 215 billions de dollars (Gallai et al., 2009). L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) estime que sur les 100 types de plantes cultivées qui fournissent 90 % de l'alimentation mondiale, 71 sont pollinisées par les abeilles, et qu'en Europe, 4000 variétés de légumes existent grâce à la pollinisation par cet insecte. (FAO 2012). Comme la proportion de terres dédiées à la production agricole nécessitant la pollinisation augmente (Aizen et al., 2008), sans l'activité de ces insectes, la production de certains fruits, graines et noix pourrait subir jusqu'à de 90 % de diminution (Klein et al., 2007).

En plus de leur rôle comme pollinisateurs, les abeilles sont productrices de miel et d'autres produits de la ruche tels que la propolis, la gelée royale et la cire. La production mondiale du miel a été estimée à 1,5 millions de tonnes en 2010, la même année la production de cire était de 62000 tonnes pour 66 millions de colonies d'abeilles élevées (FAO 2012). Le miel est une ressource nutritive qui comme le pollen et la gelée royale est consommé par l'Homme. Par ailleurs, ces produits comme la propolis et la cire sont également utilisés en industries cosmétiques, et depuis ces dernières années, le venin est collecté et commercialisé pour ses vertus thérapeutiques.

De plus, l'abeille est capable de parcourir un large rayon de kilomètres autour de la ruche afin de prélever les ressources essentielles à la survie de la colonie. Elle est exposée aux pollutions d'origines phytosanitaires et industrielles et est par conséquent considérée comme une sentinelle de l'environnement. Sa sensibilité sert d'indicateur précoce des changements de l'écosystème, de plus, l'accumulation des résidus toxiques dans les matrices apicoles (miel, cire, pollen, abeile) peut ainsi refléter la contamination de l'environnement (Chauzat et al., 2006 et 2007). Par conséquent, les abeilles ont un rôle essentiel dans l'économie mondiale, l'équilibre des espèces végétales et aussi dans la surveillance de l'environnement.

Depuis de nombreuses années, des mortalités et des affaiblissements de colonies d'abeilles ont été rapportées dans de nombreux pays (Ribière et al., 2008). Notamment, un phénomène important appelé syndrome d'effondrement des colonies (colony collapse disorder, CCD) a été décrit aux USA. Le CCD est relativement différent des mortalités habituellement observées, il semble que la perte des colonies apparait car les abeilles ne rentrent pas à la ruche. La disparition est rapide et lourde sans que les abeilles mortes ne soient retrouvées ni dans la colonie ni à proximité. Finalement, la reine n'est plus entourée que d'un petit groupe d'abeilles venant d'émerger alors que la ruche contient encore des réserves de nourriture et du couvain operculé (Ribière et al., 2008). Plusieurs études ont été menées afin de dégager les causes de ce phénomène. Néanmoins, un unique facteur n'a pu être identifié, plusieurs facteurs environnementaux et biologiques agiraient en concomitance.

En effet, les abeilles sont susceptibles à une large variété de menaces environnementales (les prédateurs, le climat, l'urbanisation, etc…) et de maladies. Parmi ces facteurs, certains parasites et maladies de l'abeille jouent un rôle important dans l'augmentation des pertes d'abeilles (Genersh et al., 2010). L'acarien ectoparasite, *Varroa destructor*, les champignons *Nosema apis* et *Nosema ceranae*, les bactéries, *Paenibacillus larvae* (Loque Américaine) et *Melissococcus plutonius* (Loque Européenne) aussi bien qu'un grand nombre de virus sont impliqués dans des sévères pertes de colonies ou des affaiblissements plus diffus.

Famille *Dicistroviridae*	Genre *Cripavirus*	BQCV
	Genre *Aparavirus*	ABPV (virus espèce), KBV, IAPV
Famille *Iflaviridae*	Genre *Iflavirus*	DWV, SBV, SBPV
Non assigné		CBPV

Tableau 1: Classification des virus séquencés de l'abeille

Selon le 9ème ICTV (King et al., 2011)

BQCV : Black queen cell virus, lvirus de la cellule royale noire, ABPV : Acute bee paralysis virus, lvirus de la paralysie aigüe de l'abeille, KBV : Kashmir bee virus, virus de l'abeille du Cachemire, IAPV : Israeli acute paralysis virus, virus israélien de la paralysie aigüe, DWV : Deformed wing virus, virus des ailes déformées, SBV : Sacbrood virus, virus du couvain sacciforme, SBPV : Slow bee paralysis virus, virus de la paralysie lente de l'abeille, CBPV : Chronic bee paralysis virus, virus de la paralysie chronique de l'abeille

Néanmoins, les infections virales sont les moins connues des pathologies de l'abeille. Le manque d'informations est du aux difficultés d'étude de ces maladies sur leurs mécanismes de dissémination, à l'absence de symptômes spécifiques pour certaines de ces infections et à l'association avec d'autres pathogènes. Pourtant, 19 virus ont été décrits chez l'abeille, et récemment, une étude basée sur l'analyse temporelle du microbiome de l'abeille a révélé 4 autres séquences virales correspondant à 4 virus qui peuvent infectés cette insecte (Runckel et al., 2011). Tous sont des virus à ARN simple brin positif à l'exception du virus filamenteux (Filamentous virus, FV) qui est un virus à ADN. Les 12 principaux virus de l'abeille et leur virose associée sont présentés en annexe 1.

Ces 12 principaux virus comptent seulement 8 virus totalement séquencés : le virus de la paralysie aiguë (*Acute bee paralysis virus, ABPV*) (Govan et al., 2000), le virus de la cellule royale noire (Black queen cell virus, BQCV) (Leat et al., 2000), le virus de la paralysie chronique (Chronic bee paralysis virus, CBPV) (Olivier et al., 2008a), le virus des ailes déformées (Deformed wing virus, DWV) (Ongus et al., 2004), le virus israélien de la paralysie aigüe (Israeli acute paralysis virus, IAPV) (Maori et al., 2007), le virus du Cachemire (Kashmir bee virus, KBV) (de Miranda et al., 2004), le virus du couvain sacciforme (Sacbrood virus, SBV) (Ghosh et al., 1999), le virus de la paralysie lente (Slow bee paralysis virus, SBPV) (de Miranda et al., 2010b).

Le séquençage de ces virus a permis d'apporter des informations supplémentaires sur l'organisation de leur génome et par conséquent 7 d'entre eux ont pu être classés dans des familles virales. Par ailleurs, lors du 9ème Comité International de Taxonomie des Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), deux nouveaux taxons ont été créés, le genre *Aparavirus* faisant parti de la famille *Dicistroviridae*, et une famille virale, *Iflaviridae* comprenant le genre *Iflavirus* (King et al., 2011), permettant ainsi une classification plus précise de ces 7 virus de l'abeille (Tableau 1).

Quant au virus de la paralysie chronique dont le génome a été complètement séquencé au cours d'une thèse effectuée précedemment au laboratoire (Olivier, 2008), il n'a pu être assigné à une famille virale existante. Pourtant, ces précédents résultats de thèse ont contribué à déterminer certaines caractéristiques du génome et à montrer également que le CBPV partage des similitudes avec d'autres virus des familles *Nodaviridae* et *Tombusviridae*. Par conséquent, il semblerait qu'il soit le premier membre d'une nouvelle famille virale. Cependant, nous manquons d'informations afin de caractériser plus précisément ce virus.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte et a pour principal objectif de caractériser les protéines du virus de la paralysie chronique de l'abeille. Pour ce faire plusieurs approches ont été employées. Cette thèse s'est principalement déroulée au sein de l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), laboratoire de Sophia-Antipolis.

Dans un premier temps, ce manuscrit présente les connaissances actuelles concernant la paralysie chronique puis les caractéristiques connues de son agent étiologique, le virus de la paralysie chronique de l'abeille. Ensuite, il décrit les stratégies mises en œuvre afin d'étudier les protéines virales. Enfin, il expose les résultats originaux obtenus à l'aide des approches employées, ainsi que les conclusions et perspectives qui en découlent.

PARTIE 1 : Introduction bibliographique

Chapitre 1 : La paralysie chronique de l’abeille et son agent étiologique

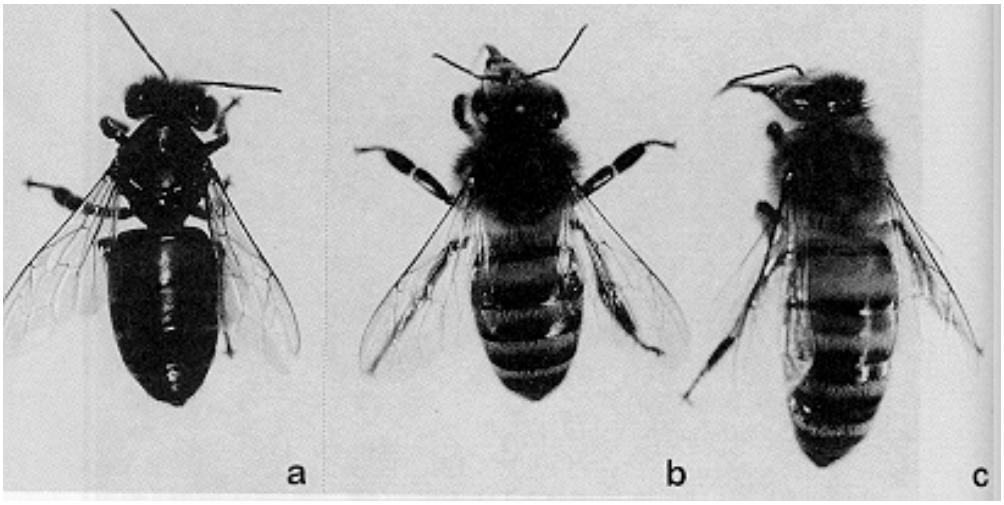


Figure 1 : Les différents syndromes de la paralysie chronique historiquement décrits

a) Abeille atteinte du syndrome de type 2, b) Abeille saine, c) Abeille atteinte du syndrome de type 1. Photographie de Ball B., tirée du livre « Honey bee pests, predators, and disease » Morse R. A. and Flottum K., 1997.



Figure 2 : Abeille atteinte du syndrome de type 2

Photographie de Faucon J.P., Anses, laboratoire de Sophia-Antipolis

La paralysie chronique est une maladie qui affecte les abeilles adultes. Elle est connue par les apiculteurs sous les noms « maladie noire » (Faucon et al., 1992), « mal des forêts » et « petites noires ». Elle est décrite principalement par la présence d'abeilles tremblantes, d'affaiblissements de colonies et de diminutions de production (Ball and Bailey 1997) mais peut aller jusqu'aux pertes importantes de ruchers (Kulincevic et Rothenbuhler 1975).

Ce syndrome a longtemps été associé à des causes alimentaires, génétiques ou encore attribué à d'autres pathogènes (Broeker, 1961, 1964 ; Vecchi and Zambonnelli, 1961). Par ailleurs, les symptômes de tremblements et la présence d'abeilles rampantes devant la ruche peuvent être confondus avec les symptômes d'autres maladies et/ou avec des cas d'intoxications chimiques. Bien que les symptômes de la paralysie aient été reconnus il y a longtemps par Aristote, l'agent responsable n'a été confirmé qu'en 1963 lorsque Bailey isola le virus de la paralysie chronique (Bailey, 1963).

I. Syndromes

Cette pathologie peut être distinguée par deux ensembles de symptômes historiquement décrits, le syndrome de Type 1 et le syndrome de Type 2 (Bailey and Ball, 1991, 1997)

Le plus communément décrit en Angleterre était le syndrome de Type 1. Chez les abeilles malades, des mouvements anormaux des ailes et du corps pouvant être considérés comme des tremblements sont observés. Ces abeilles sont désorientées, incapables de voler et rampent sur le sol ou les tiges de plantes. Souvent, elles présentent aussi un abdomen gonflé (Figure 1c) dû à la distension du jabot provoquant des dysenteries. Quelques jours après l'apparition des symptômes, les abeilles affectées meurent (Ribière et al., 2010b)

Le syndrome de Type 2 a été décrit comme plus présent en Europe continentale mais a aussi été décrit en Angleterre. Contrairement au Type 1, lorsque la maladie se déclare le premier symptôme observé n'est pas la difficulté à voler mais une perte de poils (Figures 1a et 2). Cette dépilation donne un aspect noir et brillant à leur corps et par conséquent ces abeilles semblent plus petites que les abeilles saines.

Les abeilles malades étant considérées comme intruses au sein de la ruche, elles sont attaquées par les abeilles saines de la colonie. En quelques jours, elles sont incapables de voler, tremblent puis meurent. Bien que ces deux syndromes soient décrits, ils ne sont pas distincts car ils peuvent être présents au sein d'une même colonie.

Par conséquent, un syndrome général a été déterminé, regroupant les principaux symptômes des 2 types. Le syndrome est caractérisé par la présence d'abeilles tremblantes, incapables de voler, rampantes, certaines sont noires et dépilées, enfin ces abeilles sont parfois rejetées de la colonie et sont retrouvées à l'entrée de la ruche (Ribière et al., 2010b).

II. Détection

Les virus de l'abeille comme les virus de mammifères peuvent persister au sein de la population à de bas niveau (Anderson and Gibbs 1988 ; Bailey, 1965a) d'où l'appellation pour ce type d'infection « infection inapparente ». De nombreux virus de l'abeille se trouvent dans une ruche bien que les abeilles ne présentent pas de symptômes évidents ou de pathologies. Par conséquent, l'infection dite inapparente est maintenue dans la population sans lui nuire. Cependant, dans certaines circonstances, l'infection peut être « réactivée » provoquant ainsi une infection déclarée (Ribière et al., 2008).

Historiquement, les infections inapparentes ont été révélées par des tests d'infectivité, en injectant soit des extraits d'abeilles vivantes provenant de colonies apparemment saines à des abeilles collectées de la même colonie (Bailey and Gibbs, 1964), soit des protéines étrangères ou de la solution tampon à des nymphes (Dall, 1985 ; Anderson and Gibbs 1988 ; Hung et al., 1996). Après inoculation, la multiplication virale aboutissait à la manifestation d'infections par l'apparition de symptômes et de mortalités, facilement détectable par des méthodes d'immunodétection (Ribière et al., 2010b).

Cependant, cette technique de test d'infectivité a certaines limitations de détection pour les infections inapparentes. En effet, il est souvent difficile de reproduire et d'interpréter les résultats. Lorsque plus d'un type de virus est présent dans les échantillons, le taux de réplication de l'un peut entrainer une exclusion compétitive d'un autre (Anderson and Gibbs, 1988). C'est ainsi que durant des travaux de laboratoire pour identifier le CBPV, l'ABPV a été découvert. Quand les abeilles étaient injectées simultanément avec de l'ABPV et du CBPV, la réplication plus rapide de l'ABPV pouvait exclure la multiplication du CBPV (Bailey, 1963). De plus, cette technique ne fonctionnerait que pour les virus dont la réplication est entrainée par l'inoculation à des abeilles adultes.

Les tests d'infectivité étaient souvent utilisés en combinaison avec des méthodes d'immnodétection tels que l'immunodiffusion sur gel d'agarose (IDG) (Ball, 1999) et l'ELISA. En recherche, ces techniques sont problématiques car elles sont limitées par leur faible sensibilité. Bien qu'elles soient utiles pour détecter des virus chez les abeilles malades, elles sont inadéquates pour la détection d'infections inapparentes (Rinderer and Green, 1976).

Grâce aux premières données sur le génome du CBPV, un fragment de séquence a permis de mettre en place un autre test de détection du virus. En effet, le premier test RT-PCR a été développé pour révéler les infections inapparentes (Ribière et al., 2002). Quand ce test était couplé à la méthode d'immunodiffusion, la caractérisation du statut d'une colonie par rapport à l'infection par le CBPV a été possible. Néanmoins, lors d'une étude terrain, certains échantillons collectés dans divers départements français étaient détectés positifs par la technique d'AGID et négatif par RT-PCR. Ces résultats ont suggéré une variabilité génomique au niveau des séquences utilisées comme cibles de la réaction dans les différents échantillons d'abeilles collectées. Grâce à l'obtention de séquences complètes du génome viral (Olivier et al 2008a), un nouveau diagnostic moléculaire a été par conséquent développé afin de s'assurer de la détection optimale des isolats viraux en tenant compte de la variabilité des isolats français (Blanchard et al., 2008). Cette nouvelle RT-PCR a permis une augmentation de 40 % de la détection des isolats viraux français. Elle a été validée par la suite sur des isolats viraux étrangers (Blanchard et al., 2009) .

Par la suite, un outil de quantification, la RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) basée sur la technologie TaqMan utilisant une sonde fluorescente a également été développé pour quantifier la charge génomique du CBPV (Blanchard et al., 2007 ; Celle et al., 2008). La sensibilité, la spécificité et la reproductibilité des résultats de quantification ont indiqué que cette technique est performante pour quantifier les infections par le CBPV dans les abeilles afin de déterminer la distribution des infections au sein de la colonie et des individus (Blanchard et al., 2007).

De 2007 à 2009, une étude a été menée sur 347 prélèvements d'abeilles issus de 60 départements français et reçus au laboratoire pour diagnostic (Ribière et al., 2010a). Cette étude a déterminé que des charges génomiques supérieures à 10^8 copies du génome du CBPV par abeille corrélaient significativement avec des mortalités anormales d'abeilles, les symptômes de tremblements, la présence d'abeilles noires et la faible activité à l'entrée de la ruche. Tandis que la présence d'abeilles rampantes, d'abeilles rejetées et d'une faible population à l'intérieur de la ruche pouvaient également correspondre à de faibles charges virales (Ribière et al., 2010a).

Par ailleurs, grâce à la standardisation et à la validation de ce test, les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de la qPCR ont été déterminées, permettant ainsi de préciser les critères d'interprétation des résultats (Blanchard et al., 2007 et 2012). Si le nombre de copies du génome viral par abeille est inférieur à 4000 copies, la valeur est considérée comme inférieure à la LD et par conséquent le virus est non détecté. En ce qui concerne la LQ, elle est comprise entre 4×10^3 et 8×10^3 copies du génome viral par abeille et le virus est considéré comme détecté. Entre 8×10^3 et 10^8 copies du génome du CBPV par abeille, la charge peut être quantifiée et le virus est également considéré comme détecté. Pour des charges virales entre 10^8 et 10^{10} copies du génome viral par abeilles, la paralysie chronique est dite probable. La conclusion finale est faite en fonction des symptômes observés lors des prélèvements (abeilles tremblantes, abeilles noires et/ou dépilées, faible activité devant la ruche). Au-delà de 10^{10} copies du génome viral par abeille, la paralysie chronique est considérée comme déclarée (Ribière et al., 2010 ; Blanchard et al., 2012).

Ainsi, au le laboratoire, la qPCR est utilisée dans le cadre des analyses de routine pour évaluer la charge génomique du CBPV et le diagnostic de la paralysie chronique est basé sur la quantification des charges virales couplée aux symptômes cliniques relevés par les apiculteurs ou agents de terrain.

III. Transmission

Une des étapes les plus importantes dans les infections virales est la transmission. De manière générale, la transmission d'un virus peut se faire par deux voies : verticale et/ou horizontale. La transmission verticale se fait de l'adulte à la descendance et la transmission horizontale se fait entre les individus d'une même génération.

A. Transmission verticale via la reine

Une voie de transmission plausible du CBPV serait la transmission verticale via la reine. Le virus peut être disséminé en l'injectant à la reine, aux nymphes ou aux faux-bourdons adultes (Ball et al., 1985), ou en l'incorporant dans la nourriture des jeunes reines (Kulincevic et Rothenbuhler, 1969).

La prévalence du virus a été étudiée chez la reine (Chen et al., 2005) et sa descendance. Le virus a été détecté dans 4 des 10 reines de l'étude et dans 3 pools de 50 œufs et dans 10 % des larves provenant des reines détectées positives (Chen et al., 2006b). Cependant, le virus n'a pas été détecté dans les ovaires ni dans la spermathèque des reines positives. De plus, par PCR en temps réel, il a été montré que la charge génomique du CBPV est relativement faible dans les œufs, les larves et les nymphes, environ 10^3 copies du génome de CBPV par individu (Blanchard et al., 2007). Par ailleurs, il est possible que la contamination des œufs provienne de l'environnement et non de la reine.

Néanmoins, plus d'informations sont requises (origine des échantillons et le statut des colonies) afin d'interpréter et de s'assurer une réelle transmission verticale. De plus, Tentcheva et ses collègues (2004) n'ont pas détecté le CBPV dans les nymphes provenant de colonies apparemment saines au printemps, en été et à l'automne 2002. Par contre, le virus a été détecté dans 4 % des abeilles adultes de cette étude durant l'été 2002 (Tentcheva et al., 2004). La détection sporadique du virus dans les adultes mais pas dans le couvain a suggéré la prédominance de la transmission horizontale.

B. Transmission horizontale

1. Transmission indirecte

a) Par *Varroa destructor*

Varroa destructor est un ectoparasite obligatoire de l'abeille, il est responsable de pertes importantes de colonies. Il se nourrit de l'hémolymphe des abeilles adultes et du couvain. Le cycle biologique des femelles s'effectue en 2 phases distinctes, une phase reproductive dans le couvain et une phase phorétique sur abeilles adultes. Juste avant l'operculation de la cellule du couvain d'abeille, une femelle fondatrice de varroa entre dans l'alvéole, elle pond plusieurs œufs dont le premier est non fécondé et donnera un varroa mâle qui fécondera ses sœurs. Par la suite, la femelle fondatrice et sa descendance se nourrissent au dépend de la larve d'abeille. Les nouvelles femelles varroa fécondées attendent l'émergence de l'abeille, sortent et sont phorétiques sur les abeilles adultes jusqu'à un nouveau cycle de reproduction (Rosenkranz et al., 2010).

Il a été démontré le rôle de *V. destructor* en tant que vecteur dans la dissémination des virus DWV, ABPV, KBV (de Miranda et al., 2010a), IAPV (Di Prisco et al., 2011) et SBPV (de Miranda et al., 2010b). Ces virus seraient transmis par l'injection de la salive de l'acarien lorsqu'il se nourrit de l'hémolymphe. Le CBPV n'avait jamais été détecté dans le parasite et aucune association n'avait été reportée entre les épidémies de paralysie chronique et les infestations de *V. destructor* (Ball and Allen, 1988). Cependant, une étude récente sur la dissémination du virus à partir de différents hôtes a permis de détecter une faible charge virale du CBPV dans ce parasite (10^4 copies du génome du CBPV par parasite). Par ailleurs, la forme réplicative de l'ARN du CBPV a également été mise en évidence dans le parasite, suggérant que le virus est capable de s'y multiplier (Celle et al., 2008).

Néanmoins, cette détection positive a été obtenue sur des acariens issus d'une colonie très atteinte de paralysie chronique. Le virus est présent à de très fortes charges dans l'hémolymphe des abeilles infectées (Blanchard et al., 2007 ; Chen et al., 2005). Par conséquent, l'hypothèse la plus plausible est que la détection de ce virus dans les acariens se nourrissant d'hémolymphe correspond à la détection du virus dans l'hémolymphe ingérée.

Dans ces conditions, malgré la détection du brin antigénomique de l'ARN du CBPV dans le parasite, rien ne prouve qu'il y ait eu réplication, il peut simplement s'agir du passage du brin antigénomique de l'hémolymphe à *V. destructor* lorsque celui-ci se nourrit. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour confirmer le rôle de cet acarien dans la dissémination du virus.

b) Par des fourmis

Lors de certaines observations de terrains, il a été remarqué la présence de fourmis portant des abeilles mortes à proximité de ruches présentant des symptômes plus ou moins sévères de la paralysie chronique. Deux espèce de fourmis carnivores ont été observées, *Camponotus vagus* et *Formica rufa*. Elles ont donc fait l'objet d'une étude sur leur rôle dans la possible dissémination du CBPV (Celle et al., 2008).

Par PCR en temps réel, la charge virale présente dans ces fourmis a été estimée de 10^3 à 10^8 copies du génome du CBPV par individu. La charge virale mesurée chez les ouvrières de *C. vagus* prélevées à l'intérieur de la fourmilière (située à 10 m d'une ruche symptomatique) a été de 10^{11} copies du génome du CBPV par individu, inférieure à celle mesurée dans les nymphes et les fourmis ailées de *C. vagus*. De plus, la réplication virale a été démontrée par la détection du brin antigénomique du CBPV dans les ouvrières et les nymphes de *C. vagus*. Par contre, la forme réplicative n'a pas été détectée chez *F. rufa*.

Ces résultats indiquent le rôle potentiel de *C. vagus* dans la dissémination du virus qui pourrait également être un hôte de ce virus et donc constituer un réservoir naturel. En effet, les fourmis en se nourrissant des abeilles mortes devant la colonie peuvent se contaminer et disséminer le virus dans l'ensemble du rucher entre les colonies. De plus, la détection du brin négatif de l'ARN du CBPV et les fortes charges détectées dans ces fourmis en dehors ou à l'intérieur de la fourmilière suggère la réplication du virus chez cet hôte et expliqueraient la récurrence de la paralysie chronique dans les mêmes ruchers chaque été. (Ribière et al., 2010b)

Parmi les hypothèses concernant le réservoir naturel du virus, il est possible que les abeilles et les fourmis puissent être contaminées en collectant le miellat des pucerons. En effet, historiquement et encore à ce jour, des cas de paralysie chronique sont fréquemment décrits au sein de ruchers récoltant des miellats (Ribière et al., 2008 ; Celle et al., 2008). Au cours de l'étude sur les fourmis, des analyses préliminaires du puceron, *Cinara pectinatae* et d'échantillons de son miellat ont été réalisées (Celle et al., 2008). La présence du CBPV n'a pas été mise en évidence, mais il serait intéressant d'analyser un plus grand échantillon de pucerons et éventuellement d'échantillons de miellat pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

2. Transmission par voie trophique

La transmission par voie trophique est l'infection par l'ingestion de nourriture contaminée ou par le partage de cette nourriture. Lors d'une expérimentation menée sur ce sujet, des abeilles infectées avec le CBPV ont transmis le virus dans la nourriture qu'elles pouvaient passer à des abeilles saines. Les abeilles infectées avec le CBPV par injection du virus dans la nourriture peuvent le transmettre aux abeilles saines (Bailey, 1965a), mais le nombre de particules est insuffisant pour causer la maladie (Bailey et al., 1983). Par ailleurs, ces d'études ont montré que le jabot d'abeilles infectées contenait plus de 10^{11} particules. Le CBPV a été détecté dans des échantillons de pollen suggérant que le pollen pourrait être une source d'infection virale (Ball, 1999 ; Chen et al., 2006a).

De plus, le CBPV a été quantifié à une charge virale moyenne de 10^6 copies du génome du CBPV par glande mandibulaire et hypo-pharyngienne chez des abeilles infectées (Blanchard et al., 2007). Cependant, le virus n'a jamais été détecté dans le miel et la gelée royale (Chen et al., 2006a). C'est pourquoi des études supplémentaires sont requises pour interpréter ces résultats. De plus, la large distribution de l'infection virale au sein de ruches symptomatiques (œufs, couvain d'abeille) pourrait être due aux excrétions du virus dans les fèces des abeilles adultes (Ribière et al., 2007).

3. Transmission par contact

En laboratoire, les abeilles adultes sont susceptibles à l'infection par le CBPV suite à l'injection, application locale et ingestion. Quelques particules suffisent pour induire la paralysie chronique par inoculation (100 particules) (Bailey et al., 1963) contrairement à une infection réalisée par application locale (10^7 copies du génome du CBPV par dose) (Ribière et al., 2004) ou par ingestion (supérieur à 10^{10} particules par dose) (Bailey, 1965a ; Bailey, 1976 ; Ball, 1999).

Les abeilles infectées expérimentalement manifestent les symptômes de la paralysie chronique 5 ou 6 jours après l'inoculation ; elles semblent faibles, présentent les mêmes tremblements que les abeilles infectées naturellement et meurent au bout de quelques jours (Bailey et al., 1963 ; Ribière et al., 2000).

Le CBPV peut être aussi transmis expérimentalement aux abeilles adultes par pulvérisation du virus sur la surface de la cuticule des abeilles dont le thorax a été préalablement rasé, ou lorsqu'un grand nombre d'abeilles saines sont mises en contact avec une seule abeille infectée dans une cagette. Le virus envahit probablement le corps des abeilles par le cytoplasme épidermique qui est exposé quand les poils sont cassés (Bailey et al., 1983).

Par ailleurs, sur la base d'observation de ruchers expérimentaux, il a été également proposé que la transmission par contact pouvait avoir lieu entre abeilles malades et gardiennes qui les attaquent pour les expulser (Kulincevic and Rothenbuhler,1969).

Parmi les symptômes décrits, la paralysie chronique peut provoquer des diarrhées chez les abeilles malades et lorsque les abeilles sont contaminées, les particules virales sont excrétées dans les fèces (Bailey, 1965a). En 2007, une étude a démontré la présence du CBPV dans les fèces à une charge virale de 10^{10} copies du génome du CBPV par microlitre de fèces chez les abeilles infectées par inoculation. Ce résultat s'est révélé similaire à celui obtenu dans les fèces d'abeilles infectées naturellement. Dans une colonie atteinte de paralysie chronique, les fèces ont été collectées à l'aide de papier absorbant, les analyses effectuées sur ces échantillons ont révélé la présence du virus dans les fèces excrétées (Ribière et al., 2007). De plus, cette étude a démontré que le virus présent dans les fèces était infectieux et pouvait contaminer les abeilles saines mises dans les cagettes souillées.

Entre 1947 et 1966, en Angleterre et aux Pays de Galles, la régression positive d'épidémies de paralysie chronique frappant des colonies a été attribuée à une augmentation de la recherche de l'alimentation induisant une diminution de contacts entre les abeilles saines et les colonies infectées (Bailey et al., 1983). Cette régression a été également attribuée à une diminution simultanée du nombre de colonies présentes sur les lieux de butinage, diminuant ainsi les contacts entre abeilles à l'extérieur des colonies. Le confinement des abeilles dans la ruche pour des raisons climatiques ou pour cause de transhumance augmente le risque de transmission du virus par contact (Ball and Bailey, 1997).

Pour conclure, bien que la persistance du CBPV dans les colonies reste peu comprise. Les résultats ont suggéré que quelques particules virales suffiraient pour être transmises entre les abeilles par l'échange de la nourriture, le contact et même par transmission transovarienne. Néanmoins, la transmission par contact semble être prédominante pendant les épidémies de paralysie chronique (Ribière et al., 2010b).

IV. Répartition du virus et de la maladie

A. Répartition géographique et saisonnière

Dans un premier temps, la répartition géographique de la paralysie chronique a été étudiée par des méthodes de détections immunologiques. Elles ont confirmé la présence de la paralysie chronique sur tous les continents à l'exception de l'Amérique du Sud (Bailey, 1965b, 1967). Le virus a été détecté sur ce continent à partir de 2005 grâce à des techniques de biologie moléculaire (Antúnez and Gibbs, 2005 ; Blanchard et al., 2009). Cependant, ni le virus, ni la maladie n'ont été rapportés dans les Caraïbes (Allen and Ball, 1995).

Au milieu des années 90, le CBPV a été détecté en tant que cause d'une sévère et inhabituelle mortalité d'abeilles dans les Iles Canaries. Des tests d'immunodiffusion ont révélé que plus de 75 % des abeilles mortes collectées contenaient une grande concentration de virus. L'augmentation de la prévalence du CBPV dans ces îles peut être associée à une grande densité de colonies ou à une possible susceptibilité à l'infection due à la consanguinité (Ball, 1999).

En France, le CBPV a été détecté par méthodes immunologiques dans des extraits d'abeilles mortes durant l'hiver, confirmant que la maladie peut être présente et entrainer des mortalités d'abeilles tout au long de l'année. Cependant, le plus grand taux de mortalité devant la ruche en lien avec cette maladie survient au cours du printemps et de l'été (Giauffret et al.,1967 ; Ribière et al., 2002).

A divers moments de l'année, la détection moléculaire du CBPV a été réalisée sur une même colonie montrant successivement des résultats positifs et négatifs, apparemment des abeilles saines révélaient la présence du CBPV en juillet mais pas en octobre (Ribière et al., 2002). Tentcheva et ses collègues (2004) ont également rapporté une détection sporadique du CBPV tout au long de l'année chez des abeilles adultes provenant de 360 colonies apparemment saines réparties dans différentes régions de la France. Le virus a été détecté faiblement durant l'été (4 % des colonies). Malgré ces faibles fréquences, CBPV a été trouvé dans les abeilles adultes de 28 % des 36 ruchers inspectés (Tentcheva et al., 2004).

Ces études moléculaires ont accentué la question sur la persistance et la dissémination du CBPV chez les populations d'abeilles. De plus, ces études étaient basées sur des abeilles collectées à l'intérieur de la ruche et sur les résultats obtenus à partir du premier test de RT-PCR développé, ce qui pourrait avoir sous-estimé l'occurrence du virus.

De nos jours, des abeilles tremblantes sont observées à l'entrée de la ruche durant toute la saison d'apicole (du printemps jusqu'à la fin de l'été). Au cours de cette saison en 2007, de nombreux cas de mortalités d'abeilles avec des symptômes de paralysie chronique ont été rapportés. Des échantillons de 50 ruches, réparties sur 23 départements français, provenant de ruchers avec un fort taux de mortalité et/ou avec des symptômes de tremblement observés de mars à octobre 2007, ont été analysés. Les résultats obtenus ont montré que la paralysie chronique jouait un rôle important dans la mortalité des abeilles (Blanchard et al., 2008). Dans 62 % des cas, la charge génomique était supérieure à 10^{10} copies du génome du CBPV par abeille et dans 16 % des cas la charge était entre 10^{7} et 10^{10} copies du génome du CBPV par abeille.

Par ailleurs, une étude statistique sur la distribution saisonnière de la paralysie chronique en France a été réalisée à partir des résultats de charges génomiques du CBPV obtenues sur 347 échantillons d'abeilles provenant de 60 départements. La charge génomique du CBPV est significativement plus forte durant la saison apicole. De plus il ne semblait y avoir aucune corrélation directe entre la paralysie chronique et les mortalités hivernales de colonies (en faible nombre dans cette étude) (Ribière et al., 2010a, 2010b).

Les épidémies de paralysie chronique durant l'été correspondent à la description historique de la maladie. De mauvaises conditions climatiques peuvent influencer l'amorçage de la maladie (Ball, 1999). Au cours de cette période, la population et l'activité de la colonie sont importantes et lors de conditions climatiques défavorables, les abeilles restent confinées.

Par conséquent, les blessures et les contacts entre les abeilles sont accrus contribuant à la transmission du virus et au déclenchement de la maladie. Bien que les abeilles soient confinées dans la ruche en hiver, leur nombre et leur activité sont inférieurs, freinant ainsi les risques de blessures (Ball, 1999). Cependant, l'impact de la paralysie chronique sur la survie des colonies affectées et sur le phénomène d'affaiblissement des colonies n'est pas connu.

B. Répartition dans la ruche

Bien que la distribution du CBPV soit très répandue au sein des colonies infectées, la paralysie chronique est connue pour être une infection des abeilles adultes (Ball, 1999). En 2007, une étude réalisée à partir d'échantillons provenant d'une ruche symptomatique a montré que le CBPV est présent dans les œufs, larves et nymphes avec une charge virale relativement faible (environ 10^3 copies du génome du CBPV par individu, donc inférieure à la LD).

D'un autre côté, les charges génomiques du CBPV ont été également quantifiées dans les abeilles adultes, elles étaient supérieures à 10^{13} copies du génome du CBPV dans les abeilles gardiennes, les mortes et les symptomatiques. Chez les butineuses, les faux-bourdons et les ouvrières provenant de l'intérieur de la ruche, les charges génomiques étaient de 10^6 copies du génome du CBPV par abeille (Blanchard et al., 2007). Ces quantifications ont indiqué que le virus est détecté dans tous les stades de développement au sein de colonies symptomatiques.

C. Localisation du virus dans l'abeille

1. Dans l'abeille entière

Les abeilles atteintes de paralysie chronique (infectées naturellement ou expérimentalement) peuvent contenir des millions de particules (Ball, 1999). La charge virale est supérieure à 10^{13} copies du génome du CBPV dans les abeilles symptomatiques et mortes d'une colonie symptomatique (Blanchard et al., 2007). Lorsque les abeilles sont infectées expérimentalement par une inoculation intra-thoracique qui contient une charge virale de 10^4 copies du génome du CBPV par microlitre, à l'apparition des symptôme (5 jours après l'inoculation) la charge génomique est supérieure à 10^{12} copies du génome viral par abeille (Carletto et al., 2009 ; Ribière et al., 2006).

Les abeilles provenant d'une infection expérimentale par dépôt d'une suspension virale sur le thorax d'abeilles ont présenté une charge génomique de 10^{10} copies du génome du CBPV par segment de corps de l'insecte (tête, thorax, abdomen). Tandis que la charge génomique était plus faible dans les organes disséqués (10^4 à 10^6 copies du génome virale par organe) tels que les glandes mandibulaires et hypopharyngienne, le tube digestif et le cerveau (Blanchard et al., 2007). Par ailleurs, la charge virale dans l'hémolymphe des abeilles infectées naturellement ou expérimentalement a été évaluée à 10^{10} copies du génome du CBPV par microlitre (Blanchard et al, 2007). Cette forte charge dans l'hémolymphe expliquerait ainsi la large distribution du virus dans tout le corps de l'abeille et les plus faibles charges virales déterminées dans les organes disséqués comparées à celles des segments du corps de l'abeille (Ribière et al., 2010b).

2. Dans le système nerveux

En 1936, Morison a mis en évidence la présence d'inclusions spécifiqes au niveau de l'intestin et du système nerveux de l'abeille (Morison, 1936). De plus, les études histologiques et microscopiques menées durant les années 70 ont montré que les particules virales étaient présentes dans les ganglions nerveux abdominaux et thoraciques, dans les glandes hypopharingiennes et dans le cerveau (Giauffret et al., 1966a, 1966b, 1967, 1970). Néanmoins, aucune particule n'était observée dans les muscles thoraciques ou dans le corps gras des abeilles affectées par la paralysie chronique.

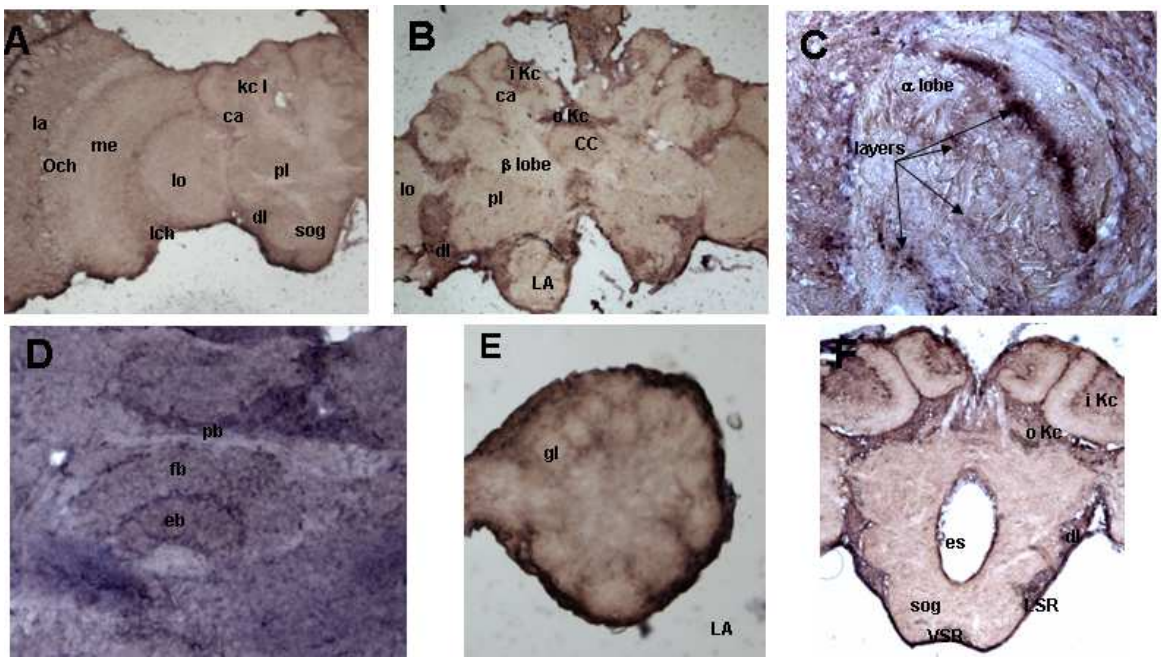


Figure 3 : Distribution du CBPV dans différentes parties du cerveau.

Détection par hybridation *in situ* de l'ARN du CBPV, (A) dans les lobes optiques dans la couche laminaire (la), médullaire (me), lobullaire (lo) et dans le chiasme interne (Ich) et externe (Och), (B) dans les lobes du protocérébron à l'intérieur et à l'extérieur du soma des cellules de Kenyon (iKc et oKc), le corps central (CC), les lobes protocérébrales (pl) et les lobes dorsaux (dl), falbles signaux dans les lobes β et les zones dendritiques du calice (ca), (C) dans le lobe α avec la couche dorsale, médiane et ventrale, (D) dans le corps central avec les corps en éventail (fb), le corps en ellipse (eb) et les cellules entourant ces structures incluant le pont protocérébral (pb), (E) dans le lobe antennaire (LA) avec les cellules entourant les glomérules (gl), (F) dans le ganglion suboephagien (sog) autour de l'orifice d l'œsophage (es) et dans l'anneau ventral et latéral suboesophagien (VSR et LSR). Olivier et al., 2008b.

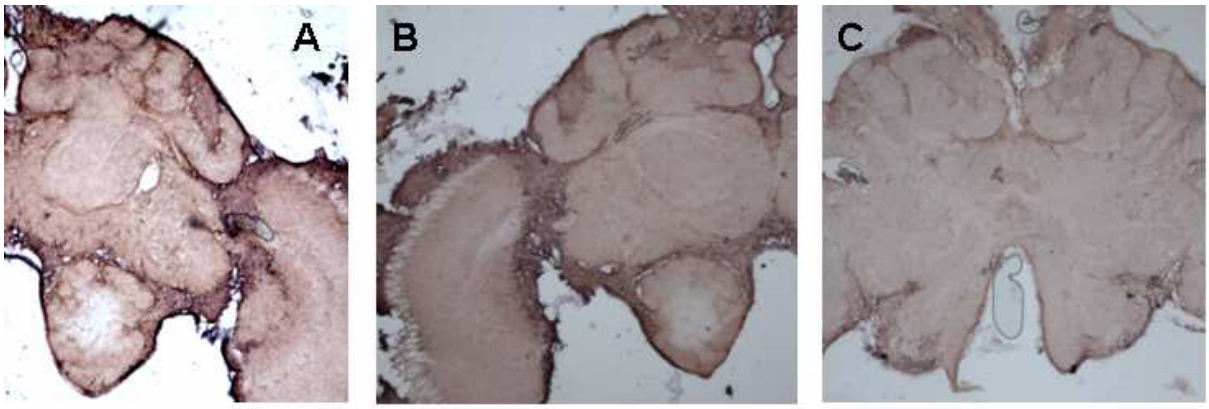


Figure 4 : Distribution des ARN positif et négatif du CBPV dans le cerveau d'abeilles issues d'infection naturelle.

Détection par hybridation *in situ*, (A) Contrôle positif, (B) Brin positif, (C) Brin négatif. Olivier et al., 2008b.

Le virus présente un neurotropisme, ce qui est en concordance avec les symptômes et les dommages observés dans le système nerveux des abeilles malades. Des millions de particules du CBPV peuvent être extraites d'une abeille affectée et la moitié de ces particules est concentrée dans la tête qui représente seulement un dizième de la masse totale du corps (Ball, 1999).

Afin de connaitre la distribution du virus dans les différents zones du cerveau de l'abeille, un protocole d'hybridation *in situ* a été développé (Olivier et al., 2008b). En utilisant des amorces spécifiques d'un ARN génomique du virus et de sa forme réplicative, il a été possible de montrer la distribution et la réplication du génome du CBPV au sein des tissus nerveux d'abeilles infectées naturellement ou expérimentalement. Dans cette étude, l'ARN génomique a été détecté dans certaines régions du protocérébron et du deutocérébron (Figure 3) :

- Les corps pédonculés qui sont impliqués dans l'apprentissage (olfactif), dans la mémoire et dans la locomotion.

- Le corps central qui joue un rôle dans le comportement, la régulation de l'éveil et la locomotion.

- Les lobes antennaires et optiques (les neuropiles sensoriels) qui traitent l'information olfactive et visuelle en les transférant aux corps pédonculés, et qui servent donc à la détection locale et à l'intégration spatiale.

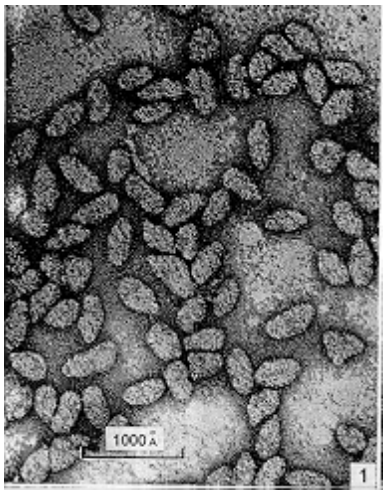
- Les ganglions suboesophagiens qui sont les relais entre le cerveau et la chaîne ventrale composée de nerfs sensoriels et moteurs (pour le proboscis et les mandibules).

De plus, la forme réplicative de l'ARN (brin antigénomique) du CBPV a aussi été détectée dans toutes les coupes de cerveau examinées, montrant une distribution similaire au brin génomique (Figure 4). Par conséquent, le CBPV n'est pas simplement présent dans le cerveau, il s'y réplique (Olivier et al., 2008b).

Les résultats de cette étude permettent de corréler les symptômes de la maladie avec la localisation du virus. En effet, le panel de symptômes observés (incapacité à voler, désorientation, ataxie (tremblements), paralysie…) proviendrait de l'atteinte spécifique de ces différentes structures du système nerveux par l'infection virale provoquant ainsi des perturbations fonctionnelles des cellules neuronales.

Chapitre 2 : Etude du virus : la particule virale

A



B

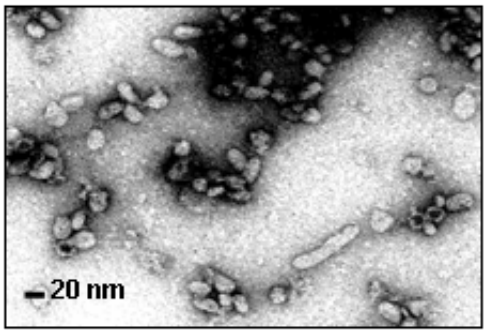


Figure 5 : Visualisation du CBPV en microscopie électronique

Particules purifiées sur gradient de saccharose, et colorées négativement, (A) Image tirée de l'article « The purification and properties of chronic bee paralysis virus » Bailey L., 1968, (B) Image tirée de l'article d'Olivier et al., 2008a.

Morison (1936) fut le premier à avoir suspecté l'origine virale de la paralysie chronique. La transmission expérimentale de la maladie par voie trophique, par contact et par injection d'extraits d'abeilles malades, filtrés sur de la porcelaine, a prouvé qu'une bactérie n'était pas en cause dans l'étiologie de cette maladie (Burnside, 1945). En 1963, Bailey et ses collègues ont isolé et réalisé avec ce virus purifié des infections expérimentales reproduisant les symptômes de la paralysie chronique. Il a été ainsi confirmé qu'il s'agissait bien de l'agent pathogène responsable de la paralysie chronique (Bailey et al., 1963). Actuellement, ce virus est nommé : virus de la paralysie chronique de l'abeille (Chronic bee paralysis virus, CBPV).

I. Sa morphologie

La particule virale est décrite comme non-enveloppée, de forme anisométrique, principalement ellipsoïdale présentant parfois une petite protubérance à l'une des extrémités. Elle mesure entre 30 et 60 nm de long et 20 nm de large (Figure 5) (Bailey et al., 1968). Cependant, une large variété de formes de particules a été observée comme des particules circulaires ou en formes de 8 (Ball and Bailey, 1991). Cette structure anisométrique de la particule est exceptionnelle parmi les virus de l'abeille et ainsi que parmi des virus non-enveloppés (Ribière et al., 2010b)

En 1982, Overton et ses collègues ont démontré que ce virus est un virus à ARN simple brin fragmenté à polarité positive. Il a été décrit comme une particule contenant 5 fragments d'ARN : 2 ARN majoritaires, ARN 1 et ARN 2 d'environ 4200 et 2800 nucléotides (nt), et 3 ARN minoritaires, ARN 3a, 3b, 3c d'environ 1100 nt chacun (Overton et al., 1982).

Plus récemment, afin de procéder au séquençage du génome (Ribière et al., 2002 ; Olivier et al., 2008a) le virus a été isolé à partir de tête d'abeilles infectées expérimentalement. Seuls les 2 ARN majoritaires ont été détectés et visualisés sur gel d'agarose, les 3 ARN minoritaires n'ont jamais été déterminés. Par conséquent, seuls les 2 ARN majoritaires ont été totalement séquencés, soit 3674 nt pour l'ARN 1 et 2305 nt pour l'ARN 2 (Olivier *et* al., 2008).

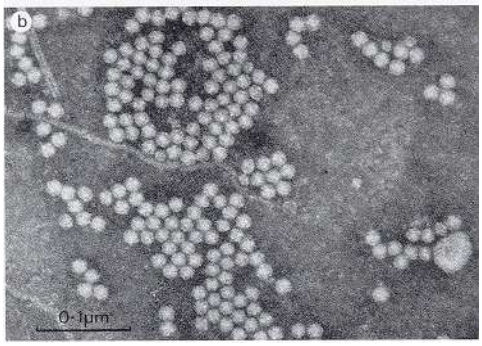


Figure 6 : Microscopie électronique du CBPSV, Chonic bee paralysis satellite virus

Particules purifiées et colorées négativement. Image tirée du livre « Atlas of invertebrate viruses » Adams J. R. & Bonami J. R., 1991.

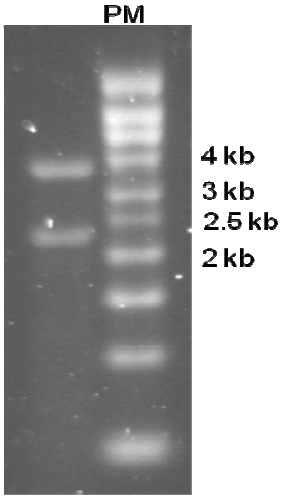


Figure 7 : Gel d'agarose des ARN majoritaires du CBPV

L'ARN 1 se situe entre 3 et 4 kb (kilobases) et l'ARN 2 entre 2 et 2,5 kb (Olivier et al., 2008a).
PM : Poids moléculaire

Comme pour les ARN minoritaires, les études menées dans les années 80 ont indiqué la présence d'une particule virale satellite associée (Chronic Bee Paralysis Satellite Virus, CBPSV) (Figure 6).

Le CBPSV est une particule isométrique de 17 nm de diamètre (Bailey et al., 1980), sérologiquement non relié au CBPV mais qui se multiplie seulement en présence du CBPV (Overton 1982). De plus, il a été rapporté que le CBPSV aurait une seule protéine de capside d'environ 15 kDa (Bailey et al., 1980). Son génome se composerait de trois ARN : A, B et C (Overton et al., 1982) de 1100 nt qui présenteraient des tailles égales et des structures secondaires différentes par l'analyse en gel polyacrylamide. L'analyse par fingerprint a montré que ces ARN avaient des séquences différentes mais présentaient des similitudes avec l'ARN 2 du CBPV, et seraient identiques aux 3 ARN minoritaires du CBPV.

Deux hypothèses sont envisagées, le CBPSV serait un virus satellite (dépendant de CBPV pour la réplication) soit il serait une particule abortive. Ce virus est classé par l'ICTV comme virus satellite et constitue à lui seul le sous-groupe nommé chronic bee paralysis associated satellite virus (King et al., 2011).

Cependant, comme les ARN minoritaires du CBPV, le CBPSV ne semble pas systématiquement lié au CBPV, en effet, cette particule n'a jamais pu être isolée dans les purifications réalisées au sein de notre laboratoire (Olivier et al., 2008a).

II. Son génome

La taille des 2 ARN majoritaires (3674 nt et 2305 nt) est en accord avec les masses moléculaires de génomes estimées sur gel d'agarose en conditions dénaturantes (Figure 7) (Olivier et al., 2008a).

Les expériences de polyadénylation, de circularisation et de ligation d'un adapteur aux extrémités 3' des ARN ont démontré que ces extrémités semblaient être bloquées. Par ailleurs, comme les extrémités 5' ont pu être déterminées seulement après le traitement par une phosphatase, celles-ci possèdent par conséquent une structure CAP (coiffe de l'extrémité 5' des ARN) (Olivier et al., 2008a).

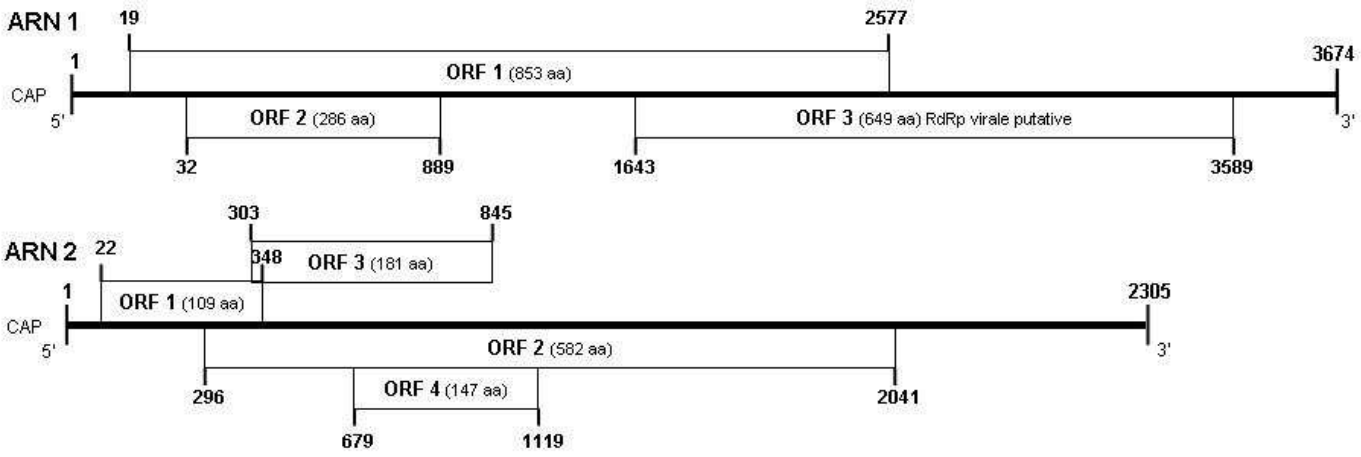


Figure 8 : Organisation du génome du CBPV : ARN 1 et 2

Sept ORF (Open reading frame, cadre ouvert de lecture) putatifs avec leurs positions et le nombre d'acides aminés (aa) des protéines putatives (Olivier et al., 2008a).

RdRp : RNA-dependent RNA polymerase (ARN polymérase ARN dépendante)

L'analyse de la séquence des ARNs a indiqué la présence de 7 cadres de lecture putatifs (open reading frame, ORF) se chevauchant parfois, 3 ORF pour l'ARN 1 et 4 ORF pour l'ARN 2 (Olivier et al., 2008a) (Figure 8).

La comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques des 2 isolats du CBPV, les plus divergents (A et B), a permis de déterminer la conservation des ORF et le polymorphisme au niveau des codons. Comme les ORF 1 et 3 de l'ARN 1 et les ORF 1, 2 et 3 de l'ARN 2 ont un fort pourcentage de similitudes entre les 2 isolats, ces ORF codent probablement les protéines virales.

Couplé à cette étude, la recherche de séquence Kozak (séquence conservée autour du codon d'initiation AUG) au niveau de leur codon AUG a appuyé l'hypothèse que ces ORFs codent des protéines virales (Olivier et al, 2008a). Bien que la séquence Kozak n'ait pas été trouvée au niveau de l'ORF 3 de l'ARN 2, celui-ci est chevauchant à l'ORF 2 et son AUG est très proche de celui de l'ORF 2, sa traduction pourrait s'effectuer par la lecture facultative du codon d'initiation AUG du premier ORF (leaky scanning) (Kozak, 1989). Cette voie de traduction permet d'exprimer indépendamment 2 protéines à partir d'une même région génomique.

III. La position phylogénétique du CBPV

Parmi les ORFs putatifs pour le génome du CBPV, l'ORF 3 de l'ARN 1 partage des similitudes avec les ARNs polymérases ARN dépendante (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) et spécifiquement avec la séquence des domaines conservées des RdRp des virus à ARN simple brin. Aucune autre similitude n'a été observée entre les séquences d'acides aminés déduites des ORF et les séquences connues des bases de données.

La comparaison du CBPV avec d'autres virus de l'abeille a confirmé qu'il ne pouvait pas être classé dans les familles *Dicistroviridae* et *Iflaviridae*. La RdRp des virus à ARN simple brin contient 8 domaines conservés, nommées par convention de I à VIII. La séquence contenant les 8 domaines conservés de la RdRp du CBPV ne possède que très peu de similitudes avec celles des virus de la famille *Dicistroviridae* : de 5,4 % avec le BQCV à 12,5 % avec le virus de la paralysie du criquet (*Cricket paralysis virus,* CrPV) (Ribière et al, 2010).

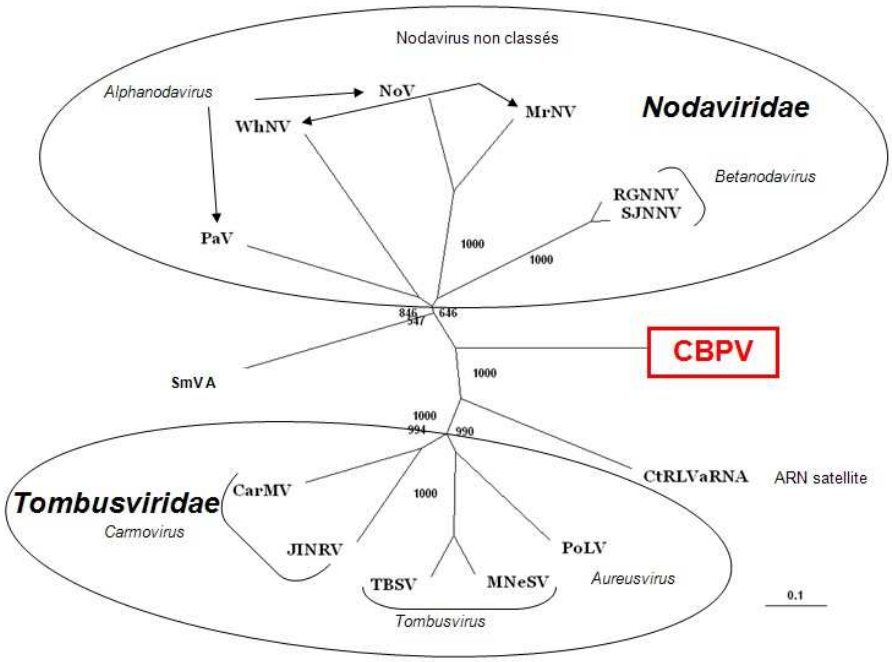


Figure 9 : Position phylogénétique du CBPV

Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences des domaines I-VIII de la RdRp (Résultat à partir de 1000 réplicats) (Olivier et al., 2008a).

Caractéristiques	*Nodaviridae*	*Tombusviridae*	CBPV
Hôtes	Insectes et poissons	Plantes	*Apis mellifera*
Morphologie	Non enveloppé, symétrie icosahédrique		Non enveloppé, Particule anisométrique
Taille	32-37 nm de diamètre	32-35 nm de diamètre	30-60 nm de long, 20 nm de large
Génome	ARN simple brin positif		
Nombre d'ARNs	2 ARNs majoritaires et ARN 3 subgénomique	2 ARNs majoritaires (*Dianthovirus*)	2 ARNs majoritaires
Taille du génome	3,1-1,4 kb	3,6-2,3 kb	3,9-1,5 kb
Extrémité 3'	Queue poly(A) (*Alphanodavirus*)	Pas de queue poly(A)	Pas de queue poly(A)
Extrémité 5'	CAP	Pas de CAP	CAP
Frameshift	Non	Non sauf les Dianthovirus	Supposé
Symptôme	Nerveux	Nécrose	Nerveux

Tableau 2 : Similitudes entre le CBPV et les virus des familles *Nodaviridae* et T*ombusviridae*

(Ribière et al., 2010b)

Une étude phylogénétique basée sur les 8 domaines conservés de la RdRp putative a montré que le CBPV occupe une position intermédiaire entre les virus de la famille *Nodaviridae* et de la famille *Tombusviridae* (Olivier et al., 2008a) (Figure 9). Ils partagent également d'autres caractéristiques (Tableau 2). En effet, ce sont tous des virus non enveloppés à ARN simple brin positif. L'ARN du génome du CBPV est fragmenté comme pour les Nodavirus, il est non fragmenté chez les virus de la famille *Tombusviridae* à l'exception du genre *Dianthovirus.*

Dans la famille *Nodaviridae*, les virus des genres *Alphanodavirus* et *Betanodavirus* comme le CBPV, présentent un neurotropisme. Les Alphanodavirus comme le CBPV, sont des virus d'insectes, qui provoquent souvent une incapacité à voler, la paralysie et la mort, tandis que les Betanodavirus sont des virus décrits chez de nombreuses espèces de poissons marins et causent des encéphalopathies et des rétinopathies associées à des troubles nerveux. Des Nodavirus ont également été décrits chez les crustacés. Les virus de la famille *Tombusviridae* sont des virus de plantes chez lesquelles ils provoquent des nécroses.

Les ARNs des Nodavirus et du CBPV présentent une structure CAP à leur extrémité 5', tandis que les Tombusvirus n'en possèdent pas, par contre aucun d'eux n'est polyadénylé à l'extrémité 3'. Chez les Nodavirus, l'ARN 1 code la sous-unité catalytique de la RdRp et l'ARN 2 code les protéines de capside. L'organisation de l'ARN est différente dans la famille *Tombusviridae* car l'ARN n'est pas fragmenté, il se compose de 4 ORF dont l'ORF 1 code la RdRp (King et al., 2011).

Deux séquences génomiques virales de l'abeille ressemblant aux séquences des ARN du CBPV ont été récemment identifiées, les virus du lac Sinai (Lake Sinai Virus 1 et 2, LSV 1 et LSV 2) (Runckel et al., 2011). L'ARN 1 du CBPV semble partager des similitudes avec les génomes de ces virus, plus précisément les ORF prédits présentent des tailles et des arrangements similaires.

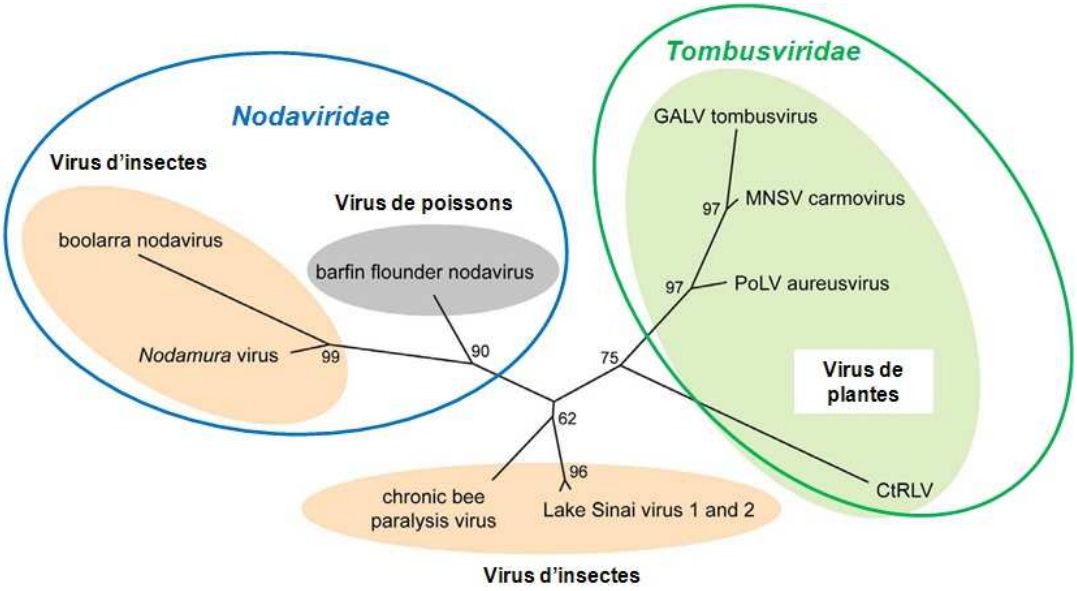


Figure 10 : Position phylogénétique du CBPV après la découverte de LSV 1 et 2
Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquence en acides aminés des RdRp de l'ordre *Nodavirales* (Résultat avec 100 réplicats) (Runckel et al., 2011).

Néanmoins, les génomes de LSV 1 et 2 sont composés d'un seul ARN contrairement au CBPV qui est dans une conformation d'ARN fragmenté. L'ORF 1 de l'ARN 1 du CBPV qui est de fonction inconnue et qui semblait être unique à ce virus est aussi présent chez LSV 1 et 2. De plus, les génomes de ces virus codent une RdRp qui est partiellement chevauchante à l'ORF 1 comme chez le CBPV. L'analyse phylogénétique basée sur la séquence protéique de la RdRp des familles *Nodaviridae* et *Tombusviridae* place LSV 1 et 2 sur la même branche que le CBPV (Figure 10).

IV. Les protéines du CBPV

Suite au séquençage du génome, l'identification des ORFs putatifs a permis d'avancer que les ORF codant le plus probablement des protéines virales sont les ORF 1 et 3 de l'ARN 1 et les ORF 1, 2 et 3 de l'ARN 2. Dans la famille *Nodaviridae*, l'ARN 1 code la sous-unité catalytique de la RdRp et l'ARN 2 code la protéine de capside (genre *Betanodavirus*) ou le précurseur de la protéine de capside (genre *Alphanodavirus*). Le génome du CBPV apparait être organisé similairement car l'ORF 3 de l'ARN 1 code la sous unité catalytique de la RdRp. Sur la base de ces résultats ajoutés aux ressemblances établies avec les Nodavirus, les ORF 1 et 3 de l'ARN 1 coderaient les protéines non-structurales tandis que les ORF 2 et 3 de l'ARN 2 coderaient les protéines structurales (Olivier et al., 2008a ; Ribière et al., 2010b).

A. Protéines non-structurales putatives

La séquence en acides aminés de l'ORF 3 de l'ARN 1 possède les 8 domaines conservés dont le motif spécifique du site catalytique, GDD (glycine, acide aspartique, acide aspartique), contenu dans le domaine VI. La séquence présente de fortes similitudes avec la séquence des domaines conservées I, IV, V et VI de la RdRp des virus de la famille *Nodaviridae* et *Tombusviridae*.

Au niveau des ORF 1 et 3 de l'ARN 1 du CBPV, il est supposé l'existence d'un phénomène de frameshift. Ce phénomène entraine le décalage du cadre de lecture par le ribosome et donc la régulation de l'expression de gènes. Il a été décrit chez le genre *Dianthovirus* que la séquence nucléotidique de leur RdRp est interrompu par un codon « stop » qui est périodiquement supprimé pour exprimer le site catalytique de la RdRp contenant le motif GDD (Kim and Lommel, 1998).

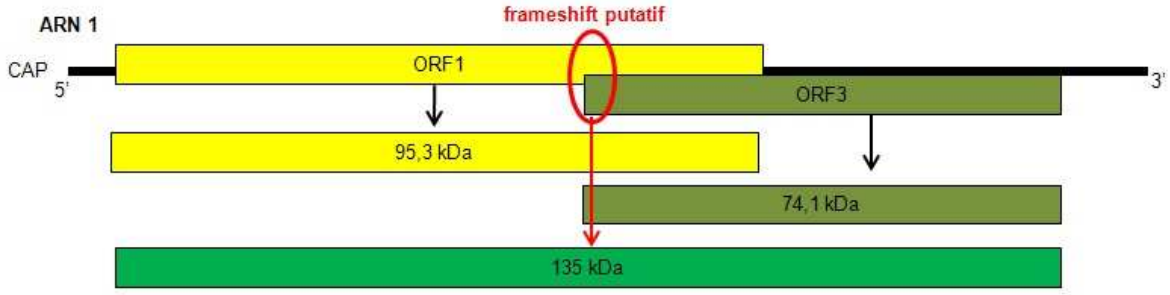


Figure 11 : Mécanisme du frameshift (fs) putatif au niveau de l'ORF 1 et 3 de l'ARN 1 du CBPV
(Olivier et al.,2008a)
kDa : kiloDalton

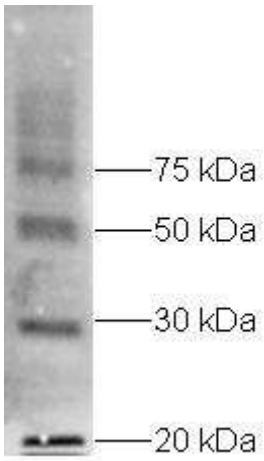


Figure 12 : Western blot réalisé à partir d'une purification virale
Détection réalisée avec les anticorps polyclonaux anti-CBPV (Ribière et al., 2002)

Par ailleurs, le pourcentage d'identité des acides aminés de la RdRp entre CBPV et LSV 1 et 2 est de 25 %. Le frameshift semble également présent chez LSV 1 et 2, où l'ORF codant la RdRp chevauche partiellement l'ORF inconnu correspondant à l'ORF 1 de l'ARN 1 du CBPV (Runckel et al., 2011).

Chez le CBPV, les ORF 1 et 3 pris séparément donneraient des protéines putatives respectivement de 95,3 kDa et 74,1 kDa. Par contre, le mécanisme de frameshift permettrait la traduction continue de l'ORF 1 jusqu'au codon « Stop » de l'ORF 3 donnant une polyprotéine de 135 kDa (Figure 11). Cette hypothèse est suggérée par la présence de 2 caractéristiques généralement considérées comme signaux de frameshift (Brierley, 1995) :

- La présence d'un heptanucléotide (CCCUUUC) en amont du codon « Start » de l'ORF 3 qui est conservé entre les isolats A et B (Olivier et al., 2008a)

- La présence d'une séquence conservée de 221 nucléotides en aval du codon « Start » de l'ORF 3 (Olivier et al., 2008a) qui pourrait former une structure secondaire de type tige-boucle

La taille du génome, la structure « cappée » en 5' et le blocage à l'extrémité 3' des ARN supposent la présence d'une hélicase et d'une méthyltransférase. Néanmoins, l'analyse des séquences protéiques n'a révélé aucun motif spécifique de ces 2 protéines.

B. Protéines structurales putatives

Historiquement, une seule protéine de capside de 23,5 kDa a été rapportée pour le CBPV (Bailey et al., 1976). Au vu de la forme anisométrique des particules, la composition de la capside du CBPV semble inhabituelle. Or ces 10 dernières années, des études suggèrent que la capside serait composée de plusieurs protéines. En effet, une analyse par western blot du CBPV purifié a révélé 4 protéines d'environ 75, 50, 30 et 20 kDa (Ribière et al., 2000) (Figure 12).

L'étude des séquences des ARN génomiques et les similitudes observées avec les Nodavirus permettent de supposer que les ORF 2 et 3 de l'ARN 2 du CBPV coderaient probablement les protéines structurales. Ils donneraient respectivement des protéines de 65,5 kDa et 19,7 kDa. Ces masses moléculaires correspondraient aux masses moléculaires des protéines détectées par western blot à 75 et 20 kDa (Ribière et al., 2002).

Par ailleurs, la masse moléculaire de la protéine de 20 kDa est similaire à la protéine de capside d'environ 23,5 kDa proposé par Bailey (1976). Par conséquent, l'ORF 3 coderait une des protéines de capside qui a été nommée protéine structurale prédite (predicted structural protein, pSP).

Lors de l'analyse phylogénétique de la pSP de différents isolats de CBPV provenant de 24 pays, l'alignement des séquences d'acides aminés a montré un très faible degré de divergence suggérant que la pSP est une protéine fortement conservé (Blanchard et al., 2009). Cette conservation conforte l'hypothèse que pSP soit une des protéines de capside.

A ce jour, il n'existe aucune information supplémentaire sur les protéines du CBPV. Par ailleurs, les caractéristiques morphologiques du virus, l'hôte, la taille de son génome et le faible degré de similitudes des séquences nucléotidiques comme protéiques ne permettent pas de classer le CBPV au sein des familles *Nodaviridae* et *Tombusviridae* selon les critères de l'ICTV (King et al., 2011). Par conséquent, le CBPV pourrait être le premier membre d'une nouvelle famille virale.

Objectifs de ce travail de thèse

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe «Virologie et diagnostic moléculaire» de l'unité «Pathologie de l'abeille» à l'Anses, laboratoire de Sophia-Antipolis, en collaboration avec plusieurs laboratoires.

L'objectif de ce travail était, dans un premier temps, de compléter les connaissances fondamentales sur le CBPV en identifiant les protéines codées par le génome viral, notamment dans le but de déterminer une position taxonomique. Dans un second temps, la caractérisation des protéines virales devait permettre d'obtenir des outils immunologiques (anticorps spécifiques) afin d'améliorer les tests immunologiques existants.

Cependant, l'étude plus approfondie du CBPV est frènée par certaines difficultés dues principalement au modèle animal. En effet, la purification virale est effectuée à partir de têtes d'abeilles infectées expérimentalement par le CBPV, par conséquent la préparation obtenue après protocole de purification contient de nombreuses protéines d'abeille qui sont très immunogènes. Ainsi, les anticorps précédemment obtenus à partir de la préparation virale reconnaissent également des protéines d'abeille. Par ailleurs, la culture de cellules d'abeilles n'est toujours pas maitrisée limitant ainsi la multiplication du virus par le modèle *in vitro* et l'étude de la composition protéique de la particule virale.

Au vu des objectifs et des difficultés méthodologiques liés au projet, des collaborations ont été mises en place afin de mener à bien certaines parties du projet. Différentes stratégies expérimentales ont été élaborées.

Tout d'abord, une comparaison des protéomes d'hémolymphe d'abeilles infectées et saines a été effectuée afin d'identifier par empreinte peptidique massique (PMF) les protéines exprimées différentiellement suite à l'infection. Afin de réaliser cette étude, mon travail s'est divisé en 2 parties. A l'Anses, laboratoire de Sophia-Antipolis, j'ai reproduit expérimentalement la paralysie chronique pour acquérir les échantillons d'hémolymphe.

Puis, au sein du laboratoire «Entomologie fonctionnelle et évolutive» de Gembloux (Belgique), les échantillons d'hémolymphe m'ont servi à être formée à la méthode développée par Julien Bauwens et Bach Kim NGuyen. J'ai ainsi pu effectuer le principe de la 2D-dige à partir des prélèvements adéquats. Mon travail s'est achevé après avoir établi la liste des protéines différentiellement exprimées, le laboratoire «Spectrométrie de masse» de Liège (Belgique) a pris le relai afin d'identifier les protéines sélectionnées suite à l'étude comparative.

Ensuite, un modèle *in vivo* d'infection expérimentale a été développé en inoculant les ARN nus du CBPV à des abeilles adultes.

Des essais de traduction *in vitro* ont été effectués afin de confirmer la réalité des 7 ORF putatifs identifiés sur le génome viral.

Afin de produire des anticorps dirigés contre les protéines putatives du CBPV, dans un premier temps mon travail a porté sur le clonage des séquences correspondantes à ces protéines putatives dans des vecteurs d'expression. Ensuite, sous la direction des Docteurs Bruno Coutard et Bruno Canard du département «Virologie structurale et drug design» du laboratoire «Architecture et fonction des macromolécules biologiques», UMR 6098, CNRS, à Marseille, les constructions plasmidiques, que j'ai obtenues, m'ont servi à exprimer et produire les protéines recombinantes et ainsi à être formée aux différentes méthodes de purifications de protéines.

Enfin, afin d'identifier les protéines du CBPV, une autre stratégie a été mise en place en collaboration avec le Docteur Anne-Sophie Dabert-Gay de la plate-forme d'analyse de protéines «Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, IPMC», UMR 7275, CNRS, de Valbonne. Au sein de ce laboratoire, j'ai pu me familiariser avec les méthodes permettant d'analyser des protéines en mélange complexe. En effet, l'approche était basée sur l'identification des protéines contenues dans la purification virale après séparation sur un gel monodimensionnel et analyse par nano-HPLC-MS/MS (High performance liquid chromatography-mass spectrometrry/mass spectrometry).

PARTIE 2 : Matériels et Méthodes



Figure 13 : Abeilles en conditions expérimentales
Les abeilles sont enfermées dans des cagettes où elles sont nourries à l'aide de mangeoires contenant du sucre candy et des abrevoires remplis de sirop de saccharose.

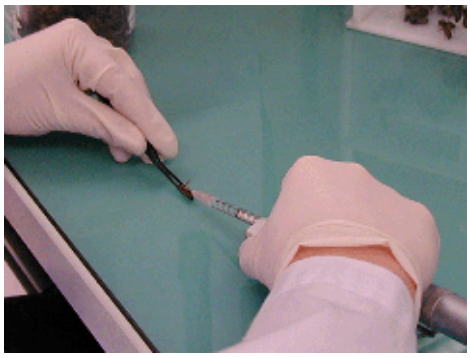




Figure 14 : Infection expérimentale par injection intra-thoracique
Photographies de Ribière M., Anses, laboratoire Sophia-Antipolis

I. Matériels biologiques

Plusieurs infections expérimentales sur abeilles ont été réalisées dans le but de recueillir divers échantillons pour des analyses ultérieures (préparation de virus purifié, extraits de protéines d'hémolymphe) ou pour étudier les signes cliniques.

A. Infections expérimentales

Avant les expérimentations, une ruche où aucune pathologie n'a été détectée par PCR spécifiques, est sélectionnée. Les abeilles émergentes de cette ruche sont prélevées, puis maintenues à 30°C en cagettes (entre 10 et 50 individus par cagette selon les expérimentations). Les abeilles sont alimentées avec du sucre candy et du sirop de saccharose complémenté avec la protéine L (Figure 13). Après une semaine, les abeilles sont anesthésiées avec du CO_2 et inoculées par injection intra-thoracique (4 µl).

1. Infections par injection de purification virale

La purification virale utilisée dont la charge virale estimée (par RT-qPCR) à $2,7 \times 10^{11}$ copies du génome de CBPV par microlitre, provient d'une précédente infection expérimentale. L'inoculum est préparé par dilutions successives de la purification virale dans 0,01 M de tampon phosphate (K_2HPO_4 et KH_2PO_4) à pH 6,8 (phosphate buffer, PB) afin d'obtenir un inoculum estimé à 10^4 copies du génome du CBPV par microlitre.

a) Abeilles pour la purification virale

Un nouveau stock de CBPV purifié a été préparé et utilisé pour les différentes études protéiques. Pour ce faire, 400 abeilles ont été inoculées avec les particules de CBPV purifiées de charge virale estimée à 10^4 copies de génome du CBPV par microlitre (Figure 14). En parallèle des abeilles infectées, des abeilles témoins ont été utilisées comme contrôles du bon déroulement de l'expérimentation :

- Témoins inoculés (Ti) : 200 abeilles inoculées avec du PB.
- Témoins non inoculés (Tni) : 200 abeilles uniquement anesthésiées.

b) Abeilles pour le prélèvement d'hémolymphe

Pour réaliser la comparaison de protéomes d'hémolymphe, 90 abeilles ont été inoculées avec les particules de CBPV purifiées de charge virale estimée à 10^4 copies de génome du CBPV par microlitre, les abeilles ont été placées dans 3 cagettes contenant chacune 30 abeilles (CBPV1, CBPV2 et CBPV3). Comme précédemment, des tests négatifs de l'infection ont été réalisés :

- Ti : 90 abeilles inoculées avec du PB et réparties en 3 cagettes de 30 abeilles (Ti1, Ti2 et Ti3)

- Tni : 30 abeilles uniquement anesthésiées et réparties en une seule cagette

2. Infections par injection des ARN nus du CBPV

Trois infections expérimentales (I, II et III) comportant plusieurs groupes d'abeilles inoculées, ont été réalisées. Pour toutes ces infections, les extraits d'ARN viraux ont été préparés à l'aide du kit d'extraction d'ARN viral (High Pure Viral RNA kit, Roche) selon le protocole du fournisseur.

a) Infection expérimentale I

Les ARN extraits et injectés provenaient d'un broyat d'abeilles infectées par le CBPV. La charge génomique a été estimée à 10^7 copies du génome du CBPV par microlitre et la concentration d'ARN extrait était de 100 ng/µl. Les ARN ont été dilués avec du PB pour obtenir 2 solutions de 4 ng/µl et 40 ng/µl. Quarante abeilles ont été inoculées avec 16 ng d'ARN par inoculation (4 µl étant le volume de l'inoculum) (Série 1) et 40 autres avec 160 ng par inoculation (Série 2). En parallèle, des tests négatifs de l'infection ont été réalisés :

- Série 3 : 40 abeilles inoculées avec du PB

- Série 4 : 40 abeilles uniquement anesthésiées

b) Infection expérimentale II

Les ARN extraits et injectés provenaient d'une précédente purification virale dont la charge génomique et la concentration ont été estimées respectivement à 10^{11} copies du génome du CBPV et 400 ng/µl. Les ARN ont été dilués pour obtenir une solution fille de 100 ng/µl. Dix abeilles ont été inoculées avec 400 ng par inoculation (Série 5). Comme précédemment des tests négatifs ont été effectués :

-Série 6 : 10 abeilles inoculées avec du PB

-Série 7 : 10 abeilles uniquement anesthésiées

c) Infection expérimentale III

Dans cette troisième infection, les ARN du CBPV avaient été extrait d'une précédente purification virale. Trois dilutions d'ARN extraits (A, B et C) ont été réalisées dans du PB en fonction de la charge virale estimée précédement (2,7 × 10^{11} copies du génome du CBPV par microlitre) et elles contenaient respectivement environ 2,7 x 10^{7}, 2,7 x 10^{8} et 2,7 x 10^{9} de copies de génome du CBPV par microlitre.

Six groupes de 45 abeilles ont été inoculés avec 4 µl de différentes solutions :

- Les groupes A, B et C : avec les différentes dilutions d'ARN viral extrait (dilutions A, B et C) à environ 10^{8}, 10^{9}, 10^{10} copies de CBPV par injection
- Le groupe D : avec de la purification virale (10^{4} copies du génome du CBPV par microlitre)
- Le groupe E : avec du PB
- Le groupe F : non inoculées uniquement anesthésiées.

B. Suivi des expérimentations et prélèvements

Pour toutes les expérimentations, les abeilles ont été placées à 30°C et la nourriture a été renouvelée tous les jours jusqu'à l'apparition des symptômes (5 à 6 jours après inoculation). Ces symptômes sont similaires à ceux observés lors de l'infection naturelle ; les abeilles sont affaiblies, parfois dépilées, elles présentent des tremblements des ailes et du corps et sont principalement sur le sol de la cagette. Les abeilles mortes au cours des expérimentations ont été quotidiennement prélevées et conservées à -80°C.

1. Prélèvements pour purification virale

Après l'apparition des symptômes (5 jours après l'inoculation), 5 abeilles de chaque condition expérimentale ont été prélevées et conservées à – 80°C afin d'être analysées en biologie moléculaire avant purification virale. La purification virale a été réalisée sur les têtes d'abeilles symptômatiques fraichement prélevées.

2. Prélèvement de l'hémolymphe

A l'apparition des symptômes de la paralysie chronique, les abeilles ont été anesthésiées par le froid et gardées sur la glace. L'hémolymphe a été collectée à l'aide d'une pipette pasteur effilée et poolée toutes les 10 abeilles (environ 20 µl).

Trois pools d'hémolymphe ont été prélevés pour les abeilles :

- CBPV1, 2 et 3 (H1-H3 CBPV1, 2 et 3)
- Ti2 (H1-H3 Ti3)
- Tni (H1-H3 Tni)

Deux pools d'hémolymphe ont été prélevés pour les abeilles :

- Ti1 (H1-H2 Ti1)
- Ti3 (H1-H2 Ti3)

3. Prélèvements suite à l'injection d'ARN nus

Pour l'infection expérimentale I, toutes les abeilles ont été collectées à 14 jours après l'inoculation.

Pour l'infection expérimentale II, les abeilles de la série 5 ont été collectées à 4 et 5 jours après inoculation et celles des séries 6 et 7 ont été collectées à 4 jours après inoculation.

Pour l'infection expérimentale III, des prélèvements systématiques d'abeilles ont été effectués dans les différents groupes au cours de l'expérimentation. Avant l'inoculation, 5 abeilles de chaque groupe ont été collectées. Immédiatement après l'injection, 2 abeilles des groupes A, B et C ont été collectées (0 jour post-inoculation, 0 jpi). L'apparition des symptômes a été suivie tout au long de l'expérimentation. Les abeilles asymptomatiques, symptomatiques et mortes ont été récupérées et conservées séparément à -80°C. De plus, des aliquotes de 4 µl de chaque dilution d'ARN nus correspondant aux inocula A, B et C.

C. Traitements des échantillons

1. Purification virale

Les particules du CBPV ont été purifiées à partir de 400 têtes d'abeilles comme décrit précédemment (Olivier et al., 2008). Brièvement, les têtes ont été broyées dans des broyeurs en verre de type Griffith avec 200 ml de tampon de broyage contenant du PB, 10 % (volume/volume, v/v) de diéthyle éther et 0,02 % (poids/volume, p/v) de diéthylthiocarbamate (DETC). Après addition de 4,4 ml de tétrachloride de carbone (CCl_4), les broyats ont été incubés à 4°C pendant 1 h puis clarifiés à 200 × g durant 10 min à 4°C. Les phases aqueuses ont été récoltées et centrifugées à 1700 × g pendant 1 h à 4°C. L'ultracentrifugation des surnageants a été réalisée à 75000 × g durant 3h30 à 4°C.

Deux solutions de 10 et 40 % (p/v) ont été préparées en mélangeant 5,19 g et 23,55 g de saccharose avec 50 ml de PB 0,01 M pH 6,8. Ces solutions ont été utilisées pour établir un gradient de saccharose (de 10 à 40 %) et séparer les particules virales concentrées par ultracentrifugation à 45000 × g pendant 4 h 30 à 15°C (rotor SW41). Après la séparation, une bande bleutée et dense était visible (entre 14 et 20 %) et correspondait aux fractions contenant le CBPV. Ces fractions ont été collectées, centrifugées et le culot a été repris dans du tampon PB. Enfin, la préparation virale a été divisée en aliquotes de 50 µl et conservée à -80°C.

2. Hémolymphe

Chaque pool d'hémolymphe des abeilles infectées avec le CBPV, des Ti et des Tni ont été divisés en deux. Une partie a été utilisée pour l'étude par 2D-dige (Cf. I.1.), l'autre partie a été conservée et le volume de chaque prélèvement a été ajusté à 200 µL avec du PB pour l'extraction de l'ARN viral.

3. Abeilles entières

Selon le contexte de l'expérimentation effectuée, les abeilles ont été broyées par groupe de 5 ou individuellement dans du PB (1 ml/abeille) avec le Tissue Lyser MM301 (Qiagen). Les broyats ont ensuite été clarifiés deux fois à 8000 × g pendant 10 min à 4°C. Les clarifications ont été récupérées et conservées à -80°C.

II. Analyses moléculaires

A. Extraction de l'ARN viral et synthèse de l'ADNc

Les extractions d'ARN viral ont été réalisées avec un kit d'extraction d'ARN viral (High Pure Viral RNA kit, Roche), à partir de 200 µl de clarification pour les abeilles entières, d'un volume ajusté à 200 µl pour les prélèvements d'hémolymphe et pour la purification virale. Les ARNs ont été élués dans 50 µl d'eau RNase-free. Puis, comme décrit précédemment par Ribière et al. (2002), l'ADNc a été synthétisé sur 12,5 µl issus des extractions d'ARN des différents échantillons et ainsi que sur les inocula A, B et C (4 µl) dont le volume a été ajusté à 12,5 µl.

B. PCR et PCR en temps réel

A partir de tous les échantillons, des PCR conventionnelles ont été effectuées pour vérifier l'absence des autres virus de l'abeille *: Acute bee paralysis virus* (*ABPV*) (Bakonyi et al., 2002), Black queen cell virus (BQCV), Deformed wing virus (DWV)

(Blanchard et al., 2007), Israeli acute bee paralysis virus (IAPV) (Cox-Foster et al., 2007), and Sacbrood virus (SBV) (Grabensteiner et al., 2001).

Tous les produits de PCR ont été visualisés sur gels d'agarose à 1,2 % (p/v) colorés au bromure d'éthidium pendant 20 à 30 min. Puis, la charge génomique du CBPV a été estimée par PCR quantitative en utilisant 5 µl d'ADNc. Cette PCR est basée sur la méthode Taqman en utilisant une sonde fluorescente, elle amplifie un fragment de 101 pb localisé dans la région du gène de la RdRp à l'aide d'un appareil en temps réel (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, Applera) (Blanchard et al., 2007; Blanchard et al., 2012).

C. Détection du brin négatif de l'ARN du CBPV

Une RT-PCR spécifique a été développée par Celle et al. (2008) pour s'assurer de la présence ou de l'absence du brin négatif de l'ARN du CBPV. Brièvement, l'ADNc spécifique du brin négatif a été synthétisé avec une amorce composée d'un tag couplé à une amorce spécifique de la séquence du brin négatif du virus. Ensuite, la PCR a été réalisée en utilisant une amorce sens correspondant à la séquence du tag et une amorce anti-sens mais spécifique du brin positif du CBPV, le produit de PCR correspondant est de 349 pb. Les contrôles des PCR ont aussi été effectués. La spécificité de cette PCR a été vérifiée en analysant l'ADNc obtenu avec des amorces aléatoires et la PCR donne un résultat négatif. En parallèle, une PCR contrôle spécifique au génome du CBPV a été effectuée sur l'ADNc synthétisé avec les amorces aléatoires et donne un résultat positif (produit de PCR de 331 pb) (Celle et al., 2008). Tous les produits de PCR ont été visualisés sur gels d'agarose à 1,2 % (p/v).

D. Electrophorèse des ARN

Afin de visualiser les ARN extraits de la purification virale, un gel d'agarose (1,2 %) dénaturant a été réalisé en mélangeant l'agarose à 5 ml de tampon MOPS 10X (Cambrex), 42,5 ml d'H_20 DEPC et 2,5 ml de formaldéhyde. Un volume de 10 µl d'ARN (correspondant à 10 µg d'ARN) a été mélangé à 10 µl de tampon de charge, les tubes ont été incubés à 65°C pendant 10 min, puis 1 min sur la glace.

Avant le dépôt des échantillons, un pré-run du gel a été effectué à 40 V pendant 10 min dans un tampon MOPS 1X. Les échantillons ont été déposés et les ARN ont été séparés à 40 V pendant 3 h 30. Après la migration, le gel a été coloré dans une solution contenant 100 ml de MOPS et 20 µl de Gelstar durant toute une nuit à l'abri de la lumière.

III. Microscopie électronique

Quatorze têtes et thorax d'abeilles symptomatiques inoculées avec de l'ARN nu du CBPV (groupe C) ont été broyés dans 11,2 ml tampon de broyage identique à celui utilisé pour la purification virale (Cf. I. C. 1.). Après addition du tétrachloride de carbone (CCl_4), les broyats ont été incubés à 4°C pendant 1 h puis clarifiés à 200 × g durant 10 min à 4°C. Les phases aqueuses ont été récoltées et centrifugées à 1700 × g pendant 1 h à 4°C. L'ultracentrifugation des surnageants a été réalisée à 75000 × g durant 3h30 à 4°C. Les culots ont été repris dans 50 µl de tampon PB.

Un broyage de 14 têtes et thorax d'abeilles asymptomatiques inoculées avec du tampon PB (groupe E) a été traité de façon identique afin de servir de contrôle. Ces deux échantillons et un aliquote de particules purifiées du CBPV ont été fixés dans un tampon composé de sodium cacodylate 0,1 M pH 7.4 et de 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde. Ils ont été colorés négativement avec 1 % (v/v) d'acétate d'uranyl, puis examinés par microscopie électronique par transmission au Centre commun de microscopie appliquée de l'Université de Nice Sophia-Antipolis.

IV. Expression protéique

A. Traduction *in vitro*

1. Réaction de traduction *in vitro*

La traduction *in vitro* a été réalisée à l'aide du kit Wheat Germ Extract System, Promega contenant de l'extrait de germe de blé et du kit Rabbit Reticulocyte Lysate System, Promega contenant de l'extrait de lysat de réticulocyte de lapin. Les mélanges réactionnels contenaient des ARNs du CBPV extraits de la purification virale (Cf II. A.), de l'extrait de germe de blé ou de lysat de réticulocyte de lapin, du complexe lysine biotinylée-ARNt, des acides aminés (1 mM), de l'acétate de potassium (1 M), de la RNasin (40 U/µl) et ajusté à 50 µL avec de l'eau.

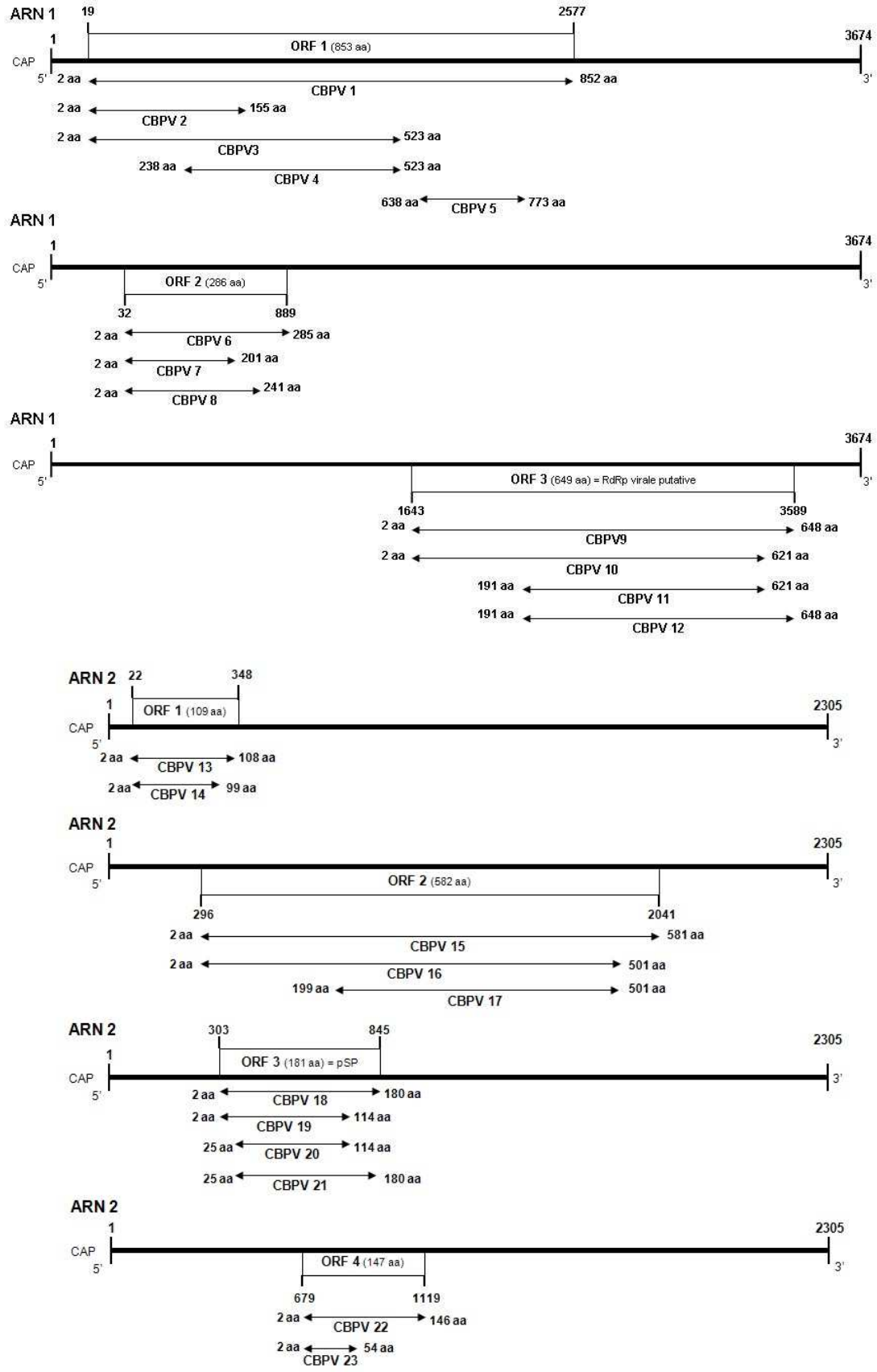


Figure 15 : Localisation et longueur en acides aminés (aa) des séquences protéiques correspondant aux protéines entières ou tronquées sélectionnées pour la production de protéines recombinantes.

Les réactions ont été incubées à 25°C durant 1 à 2h. Afin de tester différentes conditions, des concentrations croissantes d'ARN viraux (1 à 6 µg) ont été utilisées pour les réactions. En parallèle, le témoin positif de traduction du kit (ARN du *Brome mosaic virus, BMV*) a été inclus. Le mélange réactionnel en absence d'ARN (Témoin négatif) a permis de comparer les profils d'expression protéique car l'extrait de germe de blé possède des protéines naturellement biotinylées.

Enfin, des tests d'inhibition ont été effectués en mélangeant des ARN du CBPV (1µg) et du BMV (1µg).

2. Séparation et révélation des protéines

Après incubation, les protéines produites au cours de la réaction *in vitro* ont été séparées en gel SDS-Page (12 % d'acrylamide) avec un appareil à électrophorèse 1D (Mini PROTEAN 3, Biorad) à 200 V pendant 40 min.

Avant transfert, les gels et les membranes de nitrocellulose (0,45 µm, 7 x 8,4 cm, Biorad) ont été équilibrés dans un tampon de transfert composé à 20 % (v/v) d'éthanol, 25 mM de Tris et 192 mM de glycine. Puis, les protéines ont été électro-transférées sur membrane en utilisant un appareil permettant le transfert en semi-sec (Te70X semi dry transfer unit, Hoefer) à 45 mA pendant 1 h 20.

Enfin, les protéines biotinylées ont été révélées à l'aide d'un kit de révélation colorimétrique (Transcend™ Colorimetric Non-Radioactive Translation Detection System, Promega) selon les recommandations du fournisseur ou d'un kit de révélation chémioluminescence (Transcend™ Chemiluminescent Non-Radioactive Translation Detection System, Promega).

B. Production de protéines recombinantes

Afin de maximiser la production de protéines à partir des séquences des 7 ORF putatifs du CBPV, 23 séquences de protéines entières ou tronquées ont été déterminées (Figure 15). Les séquences tronquées correspondaient à des protéines dont certains domaines tels que des parties désordonnées et/ou hydrophobes ont été retirés. L'utilisation de ces séquences tronquées dans l'expression de protéines recombinantes a pour but de contrecarrer de potentiels échecs de la production de protéines recombinantes sous leur forme soluble ou durant le processus de cristallographie de protéine.

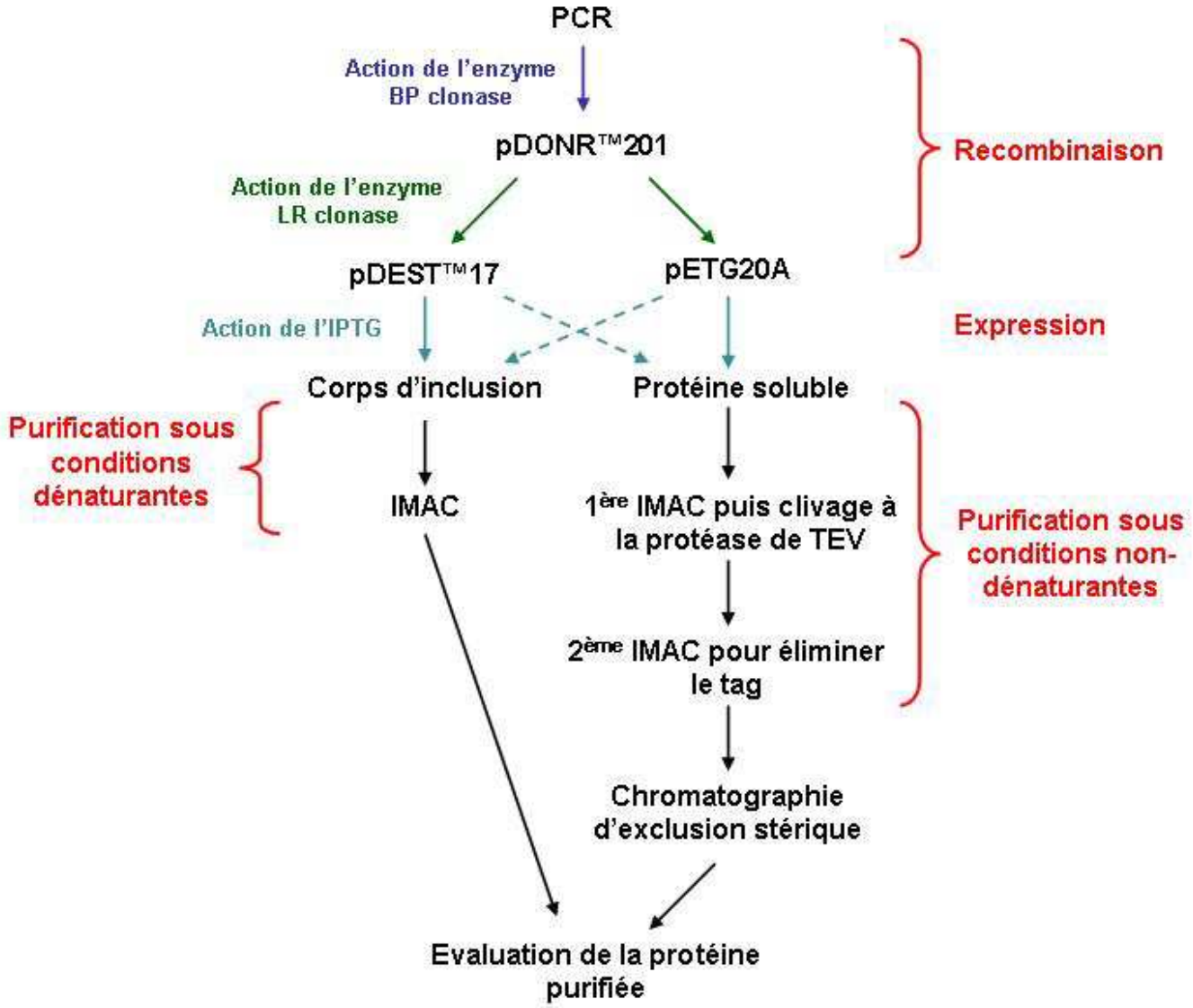


Figure 16 : Procédures appliquées pour la production des protéines recombinantes

(Lantez et al., 2011)

IMAC : Immobiliezd metal affinity chromatography

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

Les amorces ont été designées à l'aide du programme ProteinCCD (CCD pour Crystallographic Construct Design) disponible en ligne sur le site : http://xtal.nki.nl/ccd/Welcome.html (Mooij et al., 2009). Les différentes amorces synthétisées sont présentées dans l'annexe 2.

1. PCR

Les ADNc correspondant aux protéines CBPV 1 à 23 ont été amplifiés à partir d'ADNc synthétisé sur les ARNs extraits de la purification virale. Deux PCRs successives ont été effectuées à l'aide d'une polymérase à haute fidélité (2,5 U/µl) (Platinum® *Pfx* DNA polymerase, Invitrogen).

La première amplification a été réalisée avec une amorce sens contenant la séquence codante du site de clivage de la protéase du Tobacco Etch Virus (TEV) suivie par 21 nucléotides (nt) des séquences CBPV 1 à 23, et une amorce anti-sens contenant la séquence de *attB2* pour le clonage par recombinaison, de 2 codons stop et de 21 nt complémentaires aux séquences CBPV 1 à 23.

La seconde PCR a été réalisée sur le premier produit de PCR en utilisant les mêmes amorces anti-sens et une amorce universelle contenant la séquence de *attB1* puis 2 nucléotides supplémentaires (TA) pour que les séquences amplifiées soient en accord avec le cadre de lecture.

Le programme utilisé pour amplifier tous les fragments d'ADN était le suivant :

- Dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5 min
    - 20 cycles comprenant :
    - Dénaturation à 94°C pendant 15 s
    - Hybridation des amorces à 55°C pendant 30 s
    - Elongation à 68°C pendant 30 s à 3 min (selon la taille du fragment à amplifier)
- Elongation finale à 68°C pendant 10 min

L'amplification des fragments d'ADN d'intérêt a été vérifiée sur gel d'agarose 1,2 % (p/v) après coloration au bromure d'éthidium.

2. Réactions de recombinaison et clonages

A la suite de la seconde PCR, les produits amplifiés ont été purifiés à l'aide d'un kit de purification des produits de PCR (QIAquick® PCR Purification kit, QIAGEN) puis clonés par recombinaison dans le vecteur donneur pDONR™201 (Invitrogen) possédant les sites *attP1* et *attP2* et un gène de résistance à la Kanamycine. Suite à l'action de l'enzyme BP clonase (Gateway® BP Clonase™ Enzyme mix, Invitrogen), les plasmides donneurs sont devenus des vecteurs d'entrée contenant les séquences d'intérêt flanquées des sites de recombinaison *attL1* et *attL2* (Figure 16). Après transformation dans les bactéries DH5α (Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Invitrogen), les clones obtenus ont été récupérés à l'aide du kit (QIAprep® Spin Miniprep kit, QIAGEN) puis séquencés par la société MilleGen, France.

Les clones sélectionnés ont été utilisés comme vecteurs d'entrée pour 2 plasmides d'expression contenant les sites de recombinaison *attR1* et *attR2* et un gène de résistance à l'Ampicilline :

- pDEST™17 (Invitrogen) qui permet l'expression des protéines avec un tag de type 6 Histidine (6His) à l'extrémité N-terminale, pouvant être retiré grâce au site de clivage de la protéase TEV.

- pETG20A qui permet l'expression des protéines avec un tag de type thiorédoxine-6His (TRX-6His) pouvant être aussi retiré par action de la TEV.

Les séquences d'intérêt ont été insérées de manière unidirectionnelle grâce à l'enzyme LR clonase (Gateway® LR Clonase™ Enzyme mix, Invitrogen) (Figure 16). Enfin, après transformation dans les bactéries Dh5α, les vecteurs d'expression ont été récupérés.

3. Expressions des protéines

Ce travail a été réalisé au sein du **département de Virologie structurale et drug design de l'AFMB de Marseille sous la direction des Docteurs B. Coutard et B. Canard.**

Les plasmides d'expression ont été transformés dans 2 souches de bactéries possédant le plasmide pRARE (conférant un gène de résistance au chloramphénicol et au phage T1) : les bactéries Rosetta(DE3)pLysS (Novagen) et les bactéries T7 (DE3).

Une première étape analytique a consisté à sélectionner les protéines pouvant être exprimées et leur solubilité. Selon le caractère soluble ou non des protéines et le rendement d'expression, les conditions optimales d'expression : le plasmide d'expression, la souche bactérienne et la température d'expression (17 ou 25°C) ont été déterminées.

Pour les constructions permettant l'expression d'une protéine soluble, 2 litres de milieu Super Broth (SB) contenant 100 mg/l d'ampicilline et 34 mg/l de chloramphénicol ont été inoculés avec 20 ml de pré-culture (contenant les bactéries transformées). Pour les constructions permettant l'expression d'une protéine non soluble, 500 ml du même milieu ont été inoculées avec 5 ml de pré-culture. Les bactéries ont été mises en culture à 37°C jusqu'à obtenir une DO_{600nm} égale à 0,6.

L'expression des protéines recombinantes a été induite avec 0,5 mM d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (Figure 16) à une température de 25°C ou 17°C, pendant 16 h, déterminée en fonction des résultats de l'étape analytique. Pour toutes les cultures, les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 4000 × g pendant 10 min. Les culots ont été repris dans un tampon contenant 50 mM de Tris, 300 mM de NaCl, 10 mM d'imidazole, 0,1 % (v/v) de Triton, 5 % (v/v) de glycérol, de la lyzozyme (0,25 mg/ml), du fluorure de phénylméthylsulfonyle (1mM) et un cocktail d'anti-protéase (EDTA-free protease cocktail, Roche) puis placés à -80°C pendant 45 min. Ensuite, la DNase I (2 µg/ml) a été ajoutée et incubée pendant 1 h à 4°C. Les lysats ont été soniqués et centrifugés à 12000 × g pendant 45 min.

Les surnageants contenant les protéines solubles ont été récoltés afin de réaliser la purification en conditions non-dénaturantes. Les culots contenant les corps d'inclusion et par conséquent les protéines insolubles ont été récupérées pour la purification en conditions dénaturantes.

4. Purification des protéines exprimées

a) Sous conditions non-dénaturantes

Les protéines recombinantes solubles ont été purifiées du surnageant en utilisant un système de purification par chromatographie liquide (Akta Xpress fast purification liquid chromatography system, GE Healthcare).

La première étape de purification était une chromatographie d'affinité (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) (Figure 16). Elle a été réalisée sur une colonne permettant l'accrochage du tag des protéines (5 ml His prep column, GE Healthcare). Le surnageant a été chargé à 5 ml/min. Les colonnes ont été lavées avec un tampon de lavage (50 mM de Tris, 300 mM de NaCl et 50 mM d'imidazole, pH 8,0) et les protéines ont été éluées avec 50 mM de Tris, 300 mM de NaCl et 500 mM d'imidazole pH 8,0.

Les fractions éluées ont été dialysées avec un tampon contenant 10 mM d'Hepes, 300 mM de NaCl, pH 7,5). Le tag a été clivé par action de la protéase TEV à 4°C pendant une nuit. Le retrait du tag a été vérifié sur un gel SDS-Page (15 % d'acrylamide) coloré au bleu de Coomassie.

Après le clivage, les solutions ont subit une deuxième IMAC afin d'éliminer le tag et de ne récupérer que les protéines d'intérêt. Ces protéines ont été récoltées dans la fraction « flow through ». Puis, elles ont été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique (size exclusion chromatography, SEC) (Figure 16) dans 10 mM d'Hepes, 300 mM de NaCl pH 7,5 (Figure 16). Les protéines purifiées ont été vérifiées sur gel SDS-Page (15 % d'acrylamide) coloré au bleu de Coomassie.

b) Sous conditions dénaturantes

Les culots contenant les corps d'inclusion on été lavés une première fois dans du tampon contenant 50 mM de Tris, 25 mM d'imidazole, 300 mM de NaCl, 1 M d'urée et 0,1% de Triton, pH 8,0, puis centrifugés à 12000 × g pendant 30 min. Les surnageants ont été éliminés, puis les culots ont été une nouvelle fois lavés avec le même tampon mais sans Triton.

Après centrifugation à 12000 × g pendant 30 min, les surnageants ont été éliminés, puis les culots ont été repris dans un tampon contenant 50 mM de Tris, 300 mM de NaCl, 25 mM d'imidazole, 8 M d'urée. Les solutions ont été filtrées, puis la pureté des protéines a été vérifiée sur gel SDS-Page (15 % d'acrylamide).

Les protéines ont ensuite été purifiées sur IMAC en conditions dénaturantes (Figure 16). Les solutions ont été incubées avec 2 ml de résine Nickel pré-équilibrée avec un tampon (50 mM de Tris, 300 mM de NaCl, 25 mM d'imidazole et 8 M Urée, pH 8,0) à température ambiante pendant 30 min. Les mélanges contenant la résine et les solutions de protéines ont été chargés sur une cartouche de purification. Les différentes cartouches ont été lavées 3 fois avec le tampon d'équilibration, puis les protéines ont été éluées avec un tampon contenant 50 mM de Tris, 300 mM de NaCl, 250 mM d'imidazole et 8 M urée, pH 8,0. Les protéines purifiées ont été vérifiées sur gel SDS-Page (15 % d'acrylamide) coloré au bleu de Coomassie. Finalement, les protéines ont été concentrées sur centricon (Millipore) puis diluées afin d'obtenir une concentration finale de 4 M d'Urée.

Toutes les identifications de protéines purifiées ont été confirmées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, Bruker Autoflex, Bruker Daltonics) après digestion à la trypsine.

V. Méthodes d'identification des protéines virales

A. Recherche des protéines virales dans l'hémolymphe d'abeilles

Cette partie des expériences a été effectuée au sein du **laboratoire d'entomologie fonctionnelle et évolutive de Gembloux** sous la direction de **Kim Bach Nguen** et en partenariat avec le **laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Liège**.

1. Préparation des extraits protéiques

Les hémolymphes d'abeilles injectées avec du CBPV (H CBPV) ou inoculées avec du PB (H Ti) ont été chacunes mélangées à une solution d'extraction de protéines contenant 8 M d'urée, 40 mM de Tris et 4 % (p/v) de CHAPS, puis ont subit 3 sonication successives de 5 secondes. Les contaminants contenus dans ces échantillons ont été éliminés à l'aide d'un kit de purification de protéines (2-D Clean Up Kit, GE Healthcare) et les protéines précipitées ont été suspendues dans une solution de réhydratation (8 M d'urée et 40 mM deTris pH 8.5). La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de Lowry (Lowry, 1951).

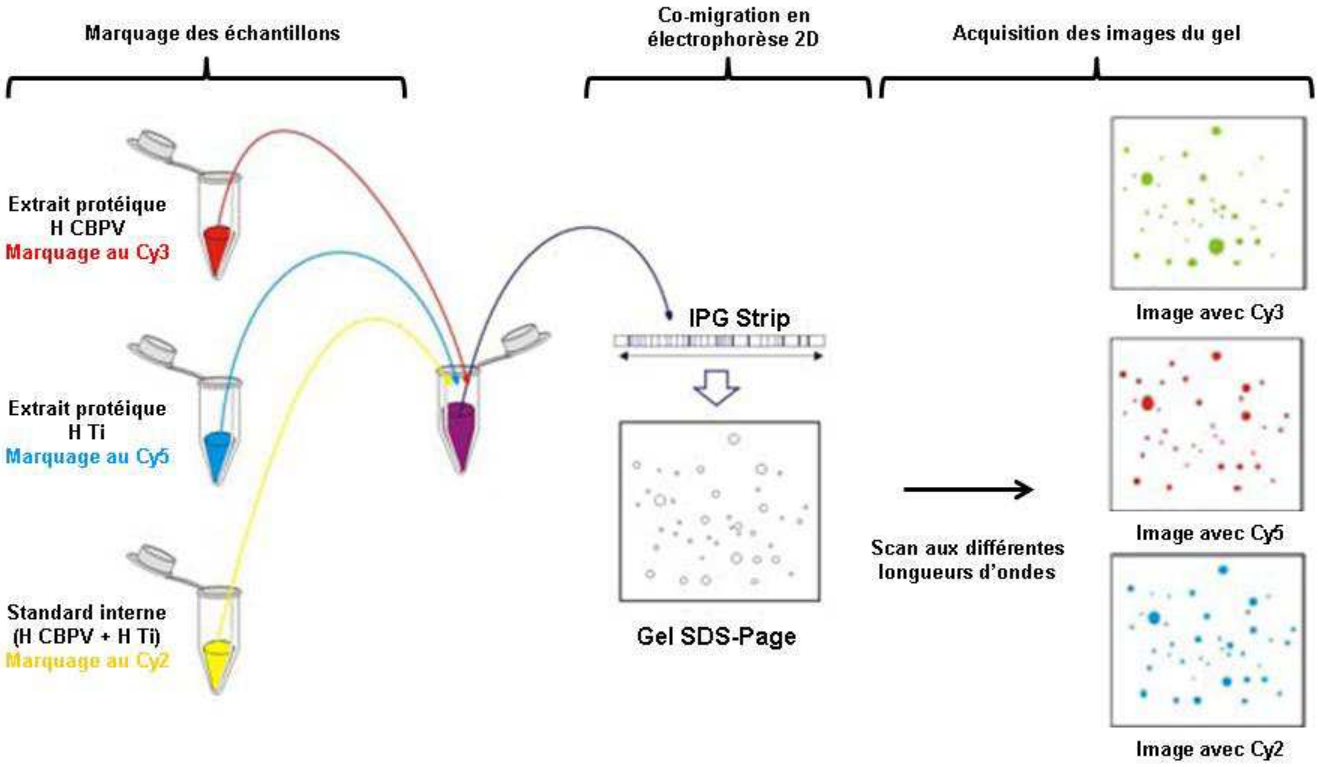


Figure 17 : Principe de la 2D-Dige

Schéma extrait du fournisseur GE Healthcare.
H CBPV : Hémolymphe d'abeilles infectées avec du CBPV
H Ti : Hémolymphe d'abeilles injectées avec du PB
IPG : Immobilized pH gradient

Pour chaque échantillon, 12,5 µg de protéines ont été marquées avec 100 pmol/µL de 2 fluorocromes distincts (Cy3™ ou Cy5™ 100pmol/µL). Afin d'exclure le marquage non spécifique et éviter les artefacts, un second marquage a été effectué en inversant les fluorocromes. Un standard interne constitué d'un mélange équimolaire des échantillons et marqué avec le fluorocrome Cy2™, a été inclus dans chaque gel, afin de s'affranchir des variations inter-gel (Figure 17). Après l'ajout des fluorocromes, les protéines ont été incubées à 4°C pendant 30 min à l'obscurité, la réaction a été arrêtée avec 10 mM de lysine et laissée à 4°C durant 10 min à l'obscurité.

2. 2D-dige (Two dimensional differential in gel electrophoresis)

Pour l'isoélectrofocalisation (isoelectric focusing, IEF), H CBPV, H Ti, et le standard interne marqués respectivement avec Cy3, Cy5 et Cy2 ont été mélangés et incubés avec 10 % (p/v) de DTT et 2 % (v/v) de tampon IPG (Immobilized pH Gradient) à 4°C durant 20 min à l'obscurité (Figure 17). Le volume a été ajusté à 450 µl avec une solution de réhydratation (6 M d'urée, 2 M de thiourée et 4 % (p/v) de CHAPS). Le même protocole a été suivi pour les échantillons inversement marqués.

Ces deux mélanges ont été appliqués sur des bandes (appelées communément strips) de 24 cm contenant un gradient de pH préformé allant de 3 à 11 immobilisé dans un gel de polyacrylamide (24 cm Immobiline™ DryStrip pH 3-11, GE Healthcare) et les strips ont ensuite été recouverts d'huile minérale. L'IEF a été effectuée à l'aide de l'appareil « Protean IEF Cell (Bio-Rad) » à 20°C et en appliquant 50 µA par strip selon les étapes suivantes :

- Réhydratation passive : 0 V pendant 9h
- Elimination des sels : 200 V pendant 2 h à 200 V, puis progressivement 200V à 1000 V pendant 4 h, et 1000 V à 10000 V pendant 1 h
- Focalisation : 10000 V pendant 5 h 30.

Après l'IEF, les strips ont été équilibrées en 2 étapes de 15 min dans du tampon d'équilibration contenant 6 M d'Urée, 90 mM de Tris-HCl, 2 % (p/v) de SDS et 30 % (v/v) de glycérol. Pendant la première étape, la phase de réduction, 1 % (p/v) de DTT a été ajouté. Durant la seconde étape, 2,5 % (p/v) d'iodoacétamide (IAA) a été ajoutés. Les strips ont été positionnées sur des gels à 12 % d'acrylamide et la séparation a été réalisée en conditions dénaturantes à l'aide de l'appareil « Ettan Daltsix system (Amersham, Biosciences) » en appliquant 1 W par gel toute la nuit.

3. Analyse des images de gels

Pour obtenir les images des différents gels, ceux-ci ont été scannés à l'aide d'un scanner de type Typhoon 9400 (Amersham, Biosciences). Cet appareil permet d'exciter successivement les trois fluorocromes. A haute résolution (100µm, 1 h par pair de gels), les gels ont été illuminés aux longueurs d'excitation de Cy3 (580 ± 30 nm), Cy5 (670 ± 30 nm) et Cy2 (520 ± 40 nm) (Figure 17).

Les analyses des images ont été réalisées à l'aide du logiciel « Progenesis Samespots software » (Nonlinear Dynamics). Sur le même gel, il permet la superposition des signaux des échantillons marqués avec Cy3 et Cy5, avec le signal du standard interne. A partir du gel de référence choisi, des vecteurs ont été générés automatiquement et manuellement afin d'aligner les gels.

Grâce à l'alignement, chaque spot d'un échantillon a été confronté à son spot analogue d'un autre échantillon. Le logiciel a détecté tous les spots dont les différences étaient statistiquement significatives (Anova, p-value ≤ 0.005), puis ces spots ont été vérifiés manuellement car des signaux parasites comme des artefacts ont pu être considérés comme des spots par le programme. Cette vérification a consisté à observer les représentations des spots candidats en 2 et 3 dimensions et à éliminer ceux ne présentant pas l'aspect d'un spot protéique. Finalement, les spots présentant une expression différentielle selon la nature du traitement des abeilles (inoculées avec le CBPV ou non) ont été sélectionnés.

Un gel préparatif a été réalisé afin d'exciser les spots. Celui-ci contenait 262,5 µg de standard interne dont 12,5 µg ont été marqués avec le Cy3. L'IEF a été réalisée comme décrite précédemment. Avant la seconde dimension, les plaques de l'Ettan Dalt system ont été traitées avec une solution de silane (80 % (v/v) de Norvanol, 4 % (v/v) d'acide acétique et 0.1 % (v/v) de silane) pendant 30 min à l'obscurité. Puis, 2 pastilles, servant de points de références pour l'Ettan spot picking, ont été placées sur les plaques. La seconde dimension a été réalisée comme décrit précédemment. Après la migration, le gel préparatif a été incubé dans une solution de fixation contenant 30 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique durant 20 min à l'obscurité. Ce gel a également été scanné et les spots ont été alignés avec ceux des autres gels.

4. Digestion des protéines et analyse par spectrométrie de masse

A partir du gel préparatif, les spots sélectionnés ont été excisés par l'Ettan spot picker robot (GE, Healthcare) selon leurs coordonnées spatiales (X et Y). Les spots excisés ont été placés dans 2 plaques de 96 puits.

Chaque spot a été rincé à l'eau distillée suivi d'une centrifugation pour retirer la solution de fixation des morceaux de gel (chaque étape a été suivie par une centrifugation afin d'éliminer le surnageant). Les fragments de gel ont été lavés avec une solution contenant 50 mM de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) et 50 % (v/v) d'acétonitrile (ACN). Après cette étape, 10 mM de DTT ont été ajoutés dans chaque puits et suivi d'une incubation à 56°C pendant 45 min. Ensuite, 55 mM d'IAA ont été ajoutés et les échantillons ont été incubés à 20°C durant 1 h, les puits ont été lavés avec une solution contenant du NH_4HCO_3 et de l'ACN. Une étape de déshydratation a été effectuée en utilisant un tampon à 100% d'ACN.

La digestion enzymatique a été réalisée avec une solution contenant 10 ng/µl de trypsine et 25 mM de NH_4HCO_3 pendant 1 h à 4°C et 4 h à 37°C. Les peptides obtenus ont été extraits par l'ajout de 10 % d'acide trifluoroacétique (TFA) durant 30 min à 40°C.

L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée en utilisant un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption Ionization – Time of Flight) (Bruker Daltonics). Les peptides extraits (5 µl) ont été déposés sur une plaque MALDI où la matrice acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA) avait été précédemment spottée. Les protéines ont été identifiées par empreintes peptidiques massiques en utilisant le programme « MASCOT » (Matrix science, London) à partir de la base de donnnées NCBInr contenant les séquences protéiques codées par les génomes des Métazoaires.

B. Etudes antigéniques

1. Les anti-sérums

Trois anti-séra différents ont été utilisés lors de cette étude antigénique.

Deux anti-séra ont été produits par la société P.A.R.I.S. France, selon les protocoles présentés dans le Tableau 3.

Jour	Protocole	
0	1er prélèvement : sérum contrôle	
0	Injection intra-dermique (1 ml/lapin) Antigène + AFC	
14	Injection intra-dermique (1 ml/lapin) Antigène + AFI	
28	Injection intra-dermique (1 ml/lapin) Antigène + AFI	
39	2ème prélèvement de séum et test ELISA	
42	Injection sous cutanée (1 ml/lapin) Antigène + AFI	
53	3ème prélèvement de sérum et test ELISA	
67	4ème prélèvement : sérum final, purification et test ELISA	
	Immunopurification pour l'immunisation avec les peptides	**Purification sur protéine A** pour l'immunisation avec la protéine recombinante

Tableau 3 : Protocole d'immunisation des lapins réalisé par la société P.A.R.I.S

AFC : Adjuvant de Freund complet
AFI : Adjuvant de Freund incomplet
ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

Brièvement, le premier anti-sérum (anti-RdRp 57) a été obtenu après 4 injections de 50 µg de la protéine recombinante, RdRp 57 (Tableau 3).

Le second (anti-pSP) a été généré après 4 injections de 2 peptides synthétisés à partir de la séquence de pSP (SRRPSRPRRSILDR, positionné entre les résidus 18 et 31, et AVLSSARRSEKFAY, positionné entre les résidus 103 et 117). Les immunisations ont été pratiquées sur 2 lapins de race New Zealand white. La première inoculation contenait de l'adjuvant complet de Freund et les 3 injections rappels contenaient de l'adjuvant incomplet de Freund (Tableau 3). Plusieurs prélèvements ont été réalisés et suivis de tests ELISA effectués par le prestataire. Les prélèvements finaux du sérum anti-RdRp ont été purifiés sur protéine A et ceux du sérum anti-pSP ont été immunopurifiés.

Le dernier anti-sérum était l'anti-CBPV produit en 2002 à partir de particules purifiées de CBPV injectées à un lapin, ces anticorps ont été adsorbés sur protéines d'abeille (Ribière et al., 2002).

2. Analyse antigénique

a) Séparation des protéines

Plusieurs types d'échantillons ont été analysées : 1) la purification virale ; 2) des clarifiats d'abeille. La concentration de protéines contenues dans les échantillons a été déterminée par la méthode de Lowry (Lowry, 1951).

Pour la purification virale, 25 µg de protéines avec ou sans βmercaptoéthanol ont été séparées sur gel d'électrophorèse (Cf IV. A. 2.). Ces gels ont été colorés au bleu de Coomassie (Coomassie blue R250,biorad). Pour les clarifiats d'abeilles, 25 µg de protéines ont été mélangées avec du tampon de Laemmli puis séparées sur gel.

b) Western blot

Après migration, les gels et les membranes ont été équilibrés dans le tampon de transfert, puis les protéines ont été électro-transférées en semi-sec à 45 mA pendant 1 h 20. Puis, les membranes ont été incubées dans un tampon de saturation contenant 5 % de lait (p/v) dans du TBST (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,05 % Tween-20 (p/v)) pendant 30 min. Elles ont ensuite été incubées avec chaque anti-sérum dilué au 200^{e} dans la solution de saturation à 4°C pendant une nuit.

Le lendemain, les membranes ont été rincées 3 fois dans du TBST. Ensuite, l'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (Alkaline phosphatase-conjugated Affinipure goat anti-IgG of rabbit, Jackson ImmunoResearch) » a été dilué au 1000^{e} dans du tampon de saturation, puis les membranes ont été incubées avec cette solution à 37°C pendant 2 h. Après cette incubation, les membranes ont été de nouveau rincées 3 fois avec du TBST. Enfin, le signal a été détecté avec un kit de révélation de l'alcaline phosphatase (alkaline phosphatase conjugate substrate kit, Bio-Rad).

C. Purification virale analysée par spectrométrie de masse

Cette méthode a été effectuée en collaboration avec **la plate forme d'analyse de protéines de l'IPMC de Valbonne sous la direction du Docteur A-S. Dabert-Gay.**

1. Séparation sur gel d'électrophorèse 1D

Un volume de 20 µl de purification virale contenant 50 µg de protéines a été séparée sur des gels à 12 % d'acrylamide « Mini-PROTEAN TGX precast gel » et « Any-KD Mini-PROTEAN TGX precast gel » (Bio-Rad), en conditions dénaturantes. Ces gels ont été colorés au bleu de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250, Pierce). Les bandes visibles sur le gel ou les régions de gel correspondant à différentes masses moléculaires ont été manuellement excisées puis coupées en morceaux.

2. Digestion des protéines avec la trypsine

Les morceaux de gel ont été décolorés par l'ajout de 100 µL de solution H_20/ACN (1/1). Après 10 min d'incubation sous agitation, le liquide a été éliminé, cette étape a été répétée 2 fois. Les morceaux de gels sont rincés avec de l'ACN pendant 15 min et séchés sous vide. Ils ont ensuite été repris dans 50 µl d'une solution de 100 mM de NH_4CO_3 contenant 100 mM de DTT, incubés pendant 45 min à 56°C puis laissés à température ambiante. La solution de DTT a été remplacée par 100 µl d'une solution de 100 mM de NH_4CO_3 contenant 55 mM d'IAA. Après 1h d'incubation à température ambiante, la solution a été jetée et les morceaux de gels ont été lavés en ajoutant successivement, 100 µl de solution H_20/ACN (1/1) (2 fois) et 100 µl d'ACN, puis séchés sous vide.

Ils ont ensuite été resuspendus dans 50 µl d'une solution de 50 mM de NH_4HCO_3 contenant 12,5 ng/µl de trypsine (modified porcine trypsin sequence grade, Promega) et incubés pendant 1 h à 4°C. La solution a été retirée et remplacée par 50 µl de solution à 50 mM de NH_4HCO_3 suivi d'une incubation de 18h à 37°C. Après la digestion à la trypsine, les peptides générés ont été extraits avec 50 µl d'eau contenant 1 % (v/v) d'acide formique durant 10 min à température ambiante puis en ajoutant 50 µl d'ACN durant 10 min à température ambiante. Les peptides extraits ont été poolés, concentrés sous vide et solubilisés dans 10 µl d'eau contenant 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique.

3. Analyse par Nano-HPLC MALDI-TOF/TOF

La séparation des peptides a été réalisée à partir d'une nano-HPLC offline (DIONEX, U3000) couplée à un spectromètre de masse de type MALDI-TO/TOF (4800 *plus*, Applied Biosystems).

Les solutions contenant les peptides ont été concentrées sur une précolonne de type « µ-Precolumn Cartridge Acclaim PepMap 100 C_{18} (5 mm, 5 µm, 100 Å, DIONEX, LC Packings) » à un flux de 20 µl/min et en utilisant un solvant contenant H_2O/ACN/TFA 98 %/2 %/0.04 %. Ensuite, la séparation a été effectuée sur une colonne « 75 µm i.d. x 150 mm (3 µm, 100 Å) Acclaim PepMap 100 C_{18} column (DIONEX, LC Packings) » à un flux de 200 nl/min et avec une détection à 214 nm. Les différents solvants utilisés étaient :

- (A) 100 % d'eau, 0,05 % de TFA,
- (B) 100 % d'ACN, 0,04 % de TFA.

Le gradient suivant a été appliqué avec une température constante de 30°C :

- t = 0 min à 100 % de A,
- t = 3 min à 100 % de A,
- t = 63 min à 80 % de B,
- t = 64 min à 100 % de B,
- t = 68 min à 100 % de B

Pour la nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS et les analyses de MS/MS, les fractions ont été collectées sur une cible de type Opti-TOF LC/MALDI target (123 x 81mm, Applied Biosystems) et le fractionnement a été fait en utilisant le Probot fractionation robotor (DIONEX, LC Packings). Les factions de nano-HPLC et la solution de matrice contenant 2,5 mg/ml de l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique ajoutés à une solution de 5,0% d'eau, 50 % d'ACN, 0.1 % TFA ont été mélangées selon un ratio 4 : 1 puis collectées toutes les 20 s (208 fractions ont été collectées par run).

Pour l'analyse MALDI-TOF/TOF-MS, les spectres MS on été enregistrés automatiquement à une masse variant de 500 à 4000 Da résultant de 200 tirs de laser de constante intensité. Les données ont été collectées à l'aide du « 4000 series Explorer » (Applied Biosystems) permettant une sélection automatique des masses de peptides pour les analyses MS/MS.

Chaque spectre de MS/MS ont été acquis par 1000 tirs de lasers et traité en utilisant 4000 series Explorer. Finalement, toutes les données brutes ont été transferées dans le logiciel « ProteinPilot software » (Applied Biosystems, MDS Analytical Technologies) et l'identification de protéines a été réalisée en utilisant le logicel « Paragon^{TM} Algorithm ».

VI. Analyse des séquences de protéines

Les séquences d'acides amines de la pSP (GI: 188572677) et de la hSP (GI: 188572676) ont été analysées et utilisées afin de générer le profil d'hydrophobicité de ces protéines selon l'algorithme de Kyte and Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982) en utilisant PROTSCALE (http://web.expasy.org/protscale/). Puis, les prédictions de structures secondaires ont été déterminées en utilisant PsiPred (Jones, 1999).

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Chapitre 1 : Comparaison des protéomes d’hémolymphe

Origine	Nb de copies du génome du CBPV par prélèvement d'hémolymphe	Détection des autres pathogènes de l'abeille			Détection du brin négatif de l'ARN du CBPV
H1 Tni	1,92E+04	DWV			Non
H2 Tni	4,04E+04	DWV		N. cer	Non
H3 Tni	1,36E+04	DWV	BQCV		Non
H1 Ti1	7,37E+03	DWV		N. cer	Non
H2 Ti1	7,60E+04	DWV		N. cer	Non
H1 Ti2	1,21E+04	DWV (faible)			Non
H2 Ti2	1,05E+04				Non
H3 Ti2	8,24E+03				Non
H1 Ti3	2,64E+04	DWV (faible)			Non
H2 Ti3	9,11E+03	DWV (faible)			Non
H1 CBPV1	2,00E+11	DWV			Oui
H2 CBPV1	3,42E+11	DWV			Oui
H3 CBPV1	2,75E+11	DWV			Oui
H1 CBPV2	2,53E+11	DWV			Oui
H2 CBPV2	4,57E+11	DWV			Oui
H3 CBPV2	5,33E+11	DWV			Oui
H1 CBPV3	5,55E+11	DWV			Oui
H2 CBPV3	6,13E+11	DWV			Oui
H3 CBPV3	5,08E+11	DWV	BQCV		Oui

Tableau 4 : Résultats de la RT-qPCR, des PCR conventionnelles (détection des autres pathogènes de l'abeille) et PCR spécifique du brin négatif de l'ARN 1 du CBPV, réalisés à partir des différents prélèvements d'hémolymphe

H Tni : Hémolymphe des abeilles témoins non inoculées
H Ti : Hémolymphe des abeilles témoins inoculées
H CBPV : Hémolymphe des abeilles inoculées avec le CBPV
DWV : Deformed wing virus
BQCV : Black queen cell virus
N. cer : *Nosema ceranae*

Ce chapitre 1 présente les travaux qui consistaient à comparer les protéomes d'hémolymphe d'abeilles non infectées et infectées par le CBPV. Tout d'abord, au sein de l'Anses, laboratoire de Sophia-Antipolis, j'ai reproduis expérimentalement la paralysie chronique afin d'acquérir différents échantillons d'hémolymphe et j'ai sélectionné les échantillons adéquats pour l'étude comparative. Ensuite, sous la direction de Kim Bach Nguyen, j'ai poursuivi l'étude au laboratoire « Entomologie fonctionnelle et évolutive » de Gembloux (Belgique) grâce à la méthode développée par le laboratoire durant le travail de fin d'étude de Julien Bauwens, intitulé « Contribution à l'étude de l'expression protéique différentielle dans l'hémolymphe *A. mellifera* L. suite à une infection par le virus de la paralysie chronique ». Dans le contexte de l'étude, l'analyse comparative avait pour buts de : 1) identifier les protéines du CBPV ; 2) identifier des protéines intervenant dans l'immunité antivirale de l'abeille suite à l'infection virale

I. Analyses des différents échantillons d'hémolymphe

Pour effectuer cette étude, une infection expérimentale a été réalisée comme expliqué dans la partie 2, matériels et méthodes.

Afin de sélectionner les échantillons adéquats pour la comparaison des protéomes d'hémolymphe, un volume de chaque pool d'hémolymphes prélevées a été utilisé pour réaliser différents tests de biologie moléculaire. Dans un premier temps, une PCR spécifique du brin négatif de l'ARN 1 du CBPV a été effectuée, celui-ci a été détecté seulement dans les hémolymphes des abeilles infectées avec le CBPV (Tableau 4). Ces premiers résultats ont permis de constater que le virus s'est répliqué dans l'hémolymphe et qu'il n'est pas simplement circulant. Ensuite, la charge génomique de CBPV présent dans chaque pool a été estimée par RT-qPCR, l'hémolymphe des abeilles infectées contenait 2×10^{11} à $6{,}13 \times 10^{11}$ copies du génome du CBPV par prélèvement. Quant aux abeilles Ti et Tni leurs charges génomiques étaient comprises entre $7{,}37 \times 10^{3}$ et $4{,}04 \times 10^{4}$ copies du CBPV par prélèvement, considérées comme à la limite de la quantification (Blanchard et al., 2012). Ces résultats ont donc révélé que le CBPV s'est multiplié dans les abeilles infectées. Enfin, les principaux virus de l'abeille ont été recherchés par PCRs conventionnelles dans les différents échantillons. Le DWV a été détecté dans la plupart des prélèvements et certains d'entre eux contenaient également du BQCV.

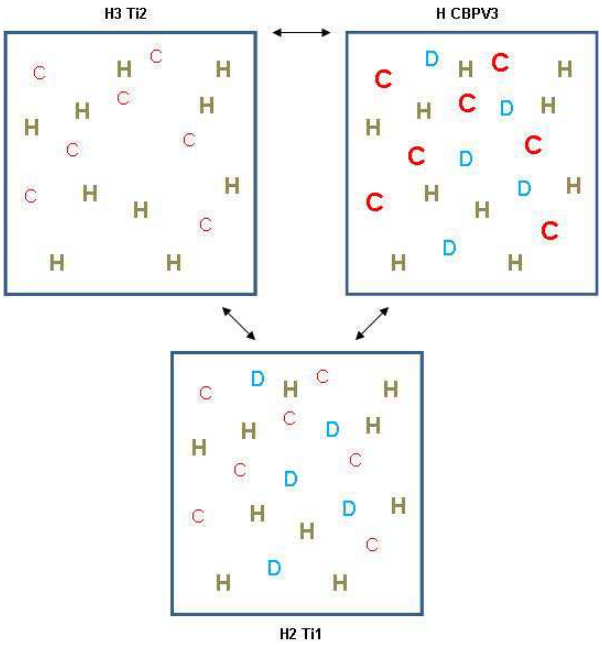


Figure 18 : Schéma montrant la comparaison des gels comportant les différents échantillons

H : Protéines de l'hémolymphe, C : Protéines du CBPV, D : Protéines du DWV

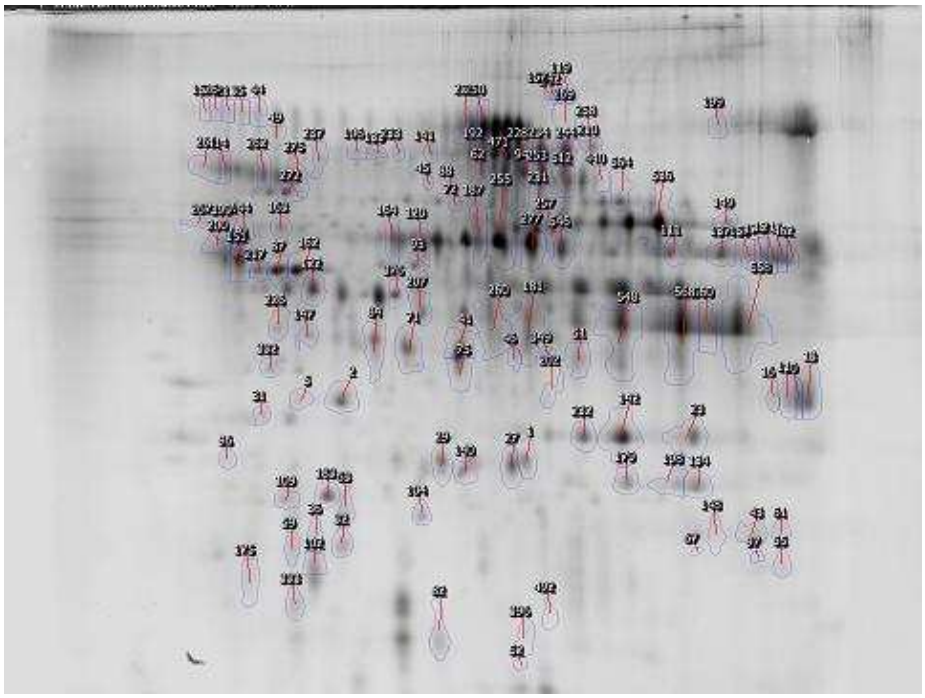


Figure 19 : Gel de 2D-Dige présentant les 125 spots sélectionnés et excisés

Par conséquent, les prélèvements à analyser ont été choisis afin d'exclure les protéines du DWV après comparaison des protéines exprimées dans les différents échantillons. Ainsi, les échantillons sélectionnés ont été les échantillons d'hémolymphe de témoins présentant du DWV dont le profil a été comparé à ceux d'échantillon témoin sans DWV et d'échantillons d'hémolymphe infectée avec le CBPV.

II. Identification des protéines différentiellement exprimées

Les échantillons sélectionnés étaient H3 Ti2, H2 Ti1, H1 CBPV3 et H2 CBPV3 et la purification virale du CBPV. Cependant, le dosage des protéines extraites à partir de la purification virale a révélé que la quantité de protéines n'était pas suffisante pour l'inclure dans l'étude. Par conséquent, le protocole de comparaison a été effectué selon la figure 18. Deux séries de gels ne comportant pas les mêmes échantillons ont été réalisés : Série 1 : L'échantillon H3 Ti2 versus les échantillons H1 et H2 CBPV3 avec 4 gels, Série 2 : L'échantillon H3 Ti2 versus H2 Ti1 avec 3 gels.

La comparaison de l'ensemble des gels a permis de déterminer les protéines qui pouvaient être différentiellement exprimées. En effet, les 8 gels ont généré 21 images. Après leur superposition à l'aide du logiciel Progenesis Samespots software (Nonlinear Dynamics), le programme a décelé 500 spots présentant une expression différentielle. Les spots candidats ont été vérifiés un par un ce qui a permis de réduire à 125 le nombre de spots montrant une expression différentielle suite à l'infection par le CBPV (Figure 19). Parmi ces 125 spots, 55 ont présenté une expression de 1,2 à 3,4 fois plus forte dans l'hémolymphe d'abeilles infectées comparée à l'expression observée dans les hémolymphes des témoins. Quant aux spots restant, les facteurs d'expression étaient plus élevés dans les hémolymphes des témoins. Suite à la digestion des protéines avec la trypsine, les peptides générés ont été analysés par spectrométrie de masse. Par conséquent, les masses des peptides protéolysés ont été estimées, créant ainsi une liste de masses peptidiques pour chaque spot. L'identification a été effectuée selon l'analyse par empreintes peptidiques massiques (PMF, peptide mass fingerprint). Précisément, les masses mesurées des peptides ont été comparées aux masses peptidiques théoriques des protéines digérées avec la tryspine *in silico*.

N° du spot	N° accession	Protéine identifiée	Organisme	Facteur d'expression	PM (kDa)	pI	Mowse Score	Nb de peptides
151	gi110758534	PREDICTED serine proteinase stubble isoform 1	*Apis mellifera*	1,5	46,4	5,46	96	7
75	gi66507096	PREDICTED Reticulon receptor-4 like	*Apis mellifera*	1,9	30,9	6,36	116	9
253	gi66512983	PREDICTED Esterase E4-like	*Apis mellifera*	1,3	65,8	6,11	104	12
536	gi66514614	PREDICTED Chitinase-like protein Idgf4-like	*Apis mellifera*	1,1	42,1	8,06	109	9
266	gi58585164	Alpha-glucosidase precursor	*Apis mellifera*	1,2	65,7	5,06	90	9
546	gi66566441	PREDICTED Antithrombin-III	*Apis mellifera*	1,1	51,4	7,16	91	7
228	gi58585196	Phenoloxidase subunit A3	*Apis mellifera*	1,4	80,4	6,28	80	10
234				1,3			104	13
471				1,2			109	12
111	gi110763826	PREDICTED Phosphoglycerate kinase isoform 1	*Apis mellifera*	1,6	45,1	8,15	85	10
137				1,6			123	11
142	gi34420368	Phosphoglycerate mutase	*Apis cerana*	1,6	29	8,4	89	7
267	gi58532730	testis beta tubulin	*Drosophila mercatorum*	1,2	36,3	5,11	87	7
162	gi195143563	GL23756 (Actin)	*Drosophila persimilis*	1,5	41,9	5,39	121	10
144	gi195355680	GM13022 (ATP-synthase)	*Drosophila sechellia*	1,6	41,5	5,59	98	8

Tableau 5 : Protéines identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight)

pI : point isoélectrique

PM : Poids moléculaire

Mowse : MOlecular Weight SEarch, algorithme pour l'identification de protéines à partir de la masse moléculaire de peptides créés par digestion et mesurée par spectrométrie de masse.

A partir des 125 spots analysés, 15 protéines ont présenté un mowse score signicatif à l'aide du logiciel Mascot ciblé sur la base de données protéiques NCBInr provenant des génomes des Métazoaires et ont pu être identifiées. Cependant, il est important de noter que les facteurs d'expression différentielle sont peu élevés. Les protéines qui ont présenté des facteurs plus élevés n'ont pas pu être identifiées du au mowse score non significatif. Le nombre de protéines a ensuite été réduit à 12 (Tableau 5) après l'élimination de plusieurs redondances d'identification. Ces redondances indiquent les mêmes protéines pour des spots localisés à des masses moléculaires et pI (point isoélectrique) différents. Le pI et la masse moléculaire d'une protéine peuvent souvent différer entre celles observées et celles théoriques (enregistrés dans les bases de données de séquences). Ces différences peuvent être dues à des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation et la phosphorylation voire à la dégradation de la protéine. Les valeurs de masses moléculaires sur un gel 2D sont approximatives car le pouvoir résolutif du gel est limité.

Au vu des charges virales déterminées dans les échantillons, on pouvait s'attendre à identifier une protéine virale telle que la protéine de capside qui est surexprimée lors d'infection virale. Or on peut noter dans le tableau 5 qu'aucune protéine d'origine virale n'a été identifiée, et seulement 9 protéines ont été identifiées comme appartenant au genre *Apis*.

III. Rôle des protéines identifiées

A. Protéines présentant une expression plus forte suite à l'infection

Parmi ces protéines, 3 d'entre elles ont une expression plus forte suite à l'infection par le CBPV. Deux protéines, la phosphoglycérate mutase (PGM) et la phosphoglycérate kinase (PGK), sont des enzymes impliquées dans la voie de la glycolyse et participent donc à l'apport en énergie à la cellule. Chez l'homme, des défauts d'expression de ces protéines sont associés à des défiences musculaires et mentales suggérant l'importance de ces enzymes dans l'excitabilité cellulaire.

Dans cette étude, bien que la phosphoglycérate mutase ait été identifiée comme appartenant à *Apis cerana*, une comparaison de la séquence par Blast a montré qu'elle possédait 98 % d'identité avec la PGM 2 d'*Apis mellifera*.

Des travaux sur les infections par le virus de l'influenza, le virus mayaro ou le virus de la dengue ont montré également une augmentation de l'expression de ces enzymes suite aux infections virales (Ritter et al., 2010 ; El-Bacha et al., 2004 ; Patramool et al., 2011). En effet, il est suggéré que l'augmentation de l'activité glycolytique est due à une rupture de la membrane mitochondriale diminuant la concentration d'ATP (Adénosine triphosphate) (Ritter et al., 2010). L'induction de ces phosphoglycérates suggère que la voie de glycolyse est fortement activée afin de compenser le manque d'énergie suite à l'infection virale.

L'abeille stimulerait la voie de la glycolyse pour empêcher les dommages cellulaires et ainsi lutter contre le virus. Par ailleurs, de récentes études ont révélé que la PGK peut également exercer des fonctions autres que la glycolyse telles que son implication dans les processus viraux. En effet, elle est un facteur de la cellule hôte pouvant se lier à l'ARN viral. Dans la réplication du virus Sendai, cette protéine stimule la transcription de l'ARNm grâce à l'interaction avec la tubuline qui a été intégrée dans le complexe de réplication (Ogino et al., 1999). Chez les plantes infectées par le virus de la mosaïque du bambou (Bamboo mosaic virus, BaMV), la PGK des chloroplastes est requise pour l'accumulation du virus. Cette protéine s'associe spécifiquement avec la queue poly(A) de l'extrémité 3'-UTR de l'ARN viral et la diminution de la PGK provoque par conséquent une réduction de l'accumulation de la protéine de capside (Lin et al., 2007). Bien que l'extrémité 3' du CBPV n'ait été déterminée, il est possible que le CBPV, comme ces virus, ait besoin de la PGK de l'hôte pour effectuer la réplication et la traduction de l'ARN viral.

La protéine, estérase E4-like, appartient à la large famille des estérases et des lipases qui agissent sur les esters carboxyliques. Chez les insectes, les carboxylestérases sont connues pour être impliquées dans la résistance contre les insecticides organophosphorés (Pan et al., 2009 ; Field et al. 1998). Cependant, certains isoformes de cette protéine sont induits dans le bombyx du mûrier (*Bombyx mori*) lors d'une infection par *Esherichia coli* (Shiotsuki and Kato, 1999). De plus, lors d'une étude protéomique pour étudier les protéines intervenant dans la réponse immunitaire de l'abeille suite à des infections bactériennes, Randolt et al. (2008) ont montré qu'une carboxylestérase était induite chez les abeilles adultes.

Dans notre étude, l'estérase E4-like est exprimée plus fortement dans les échantillons d'abeilles infectées par le virus (H CBPV) ainsi que dans les témoins inoculés avec du tampon (H2 Ti) dans lesquels *Nosema ceranae* a été détecté. Cette donnée suggére que cette protéine joue un rôle dans la réponse immunitaire contre les infections microbiennes et virales.

B. Protéines présentant une expression moins forte suite à l'infection

L'identification de la phénoloxydase parmi les protéines exprimées différentiellement permet d'apporter une information supplémentaire sur son implication suite à cette infection virale. En effet, la phénoloxydase montre une plus faible expression dans l'échantillon issu d'abeilles contaminées (H CBPV) comparée à l'expression observée dans les autres hémolymphes.

La phénoloxydase est une composante clef dans la réponse immunitaire des insectes. Cette enzyme est présente sous sa forme inactive, la prophénoloxydase, dans l'hémolymphe, la cuticule et les hémocytes. Elle est généralement activée par des sérines protéases qui clivent la prophénoloxydase en forme active. Cette enzyme activée génère des quinones cytotoxiques qui inactivent le virus. En effet, la phénoloxydase intervient dans la synthèse de la mélanine provoquant la séquestration du virus (Yang et Cox-Foster, 2005).

Lors de l'infection par le CBPV, certaines abeilles deviennent noires et dépilées, signes qui pourraient être provoqués par la forte activation de la phénoloxydase. Cependant, à l'inverse de nos attentes, la phénoloxydase a présenté une expression moins forte chez les abeilles contaminées. Par ailleurs, il est important de souligner que la dépilation n'est pas systématique chez les abeilles déclarant la pathologie. Par conséquent, cette réponse immunitaire ne semble pas être déclenchée chez toutes les abeilles infectées pour lutter contre le virus. Ainsi, le CBPV pourrait contourner la réaction immunitaire par la phénoloxydase en inhibant son activité. Cette hypothèse est soutenue par l'effet du polyadénovirus qui réduit l'activité prophénoloxydase chez les larves du lépidoptère *Spodoptera frugiperda* (Barat-Houari et al., 2006).

La sérine protéinase stubble est la protéine initialement nommée la sérine protéase homologue 42 (serine protease homolog 42, SPH42) (Zou et al., 2006) dont la séquence est similaire à la SPH-1 de *Manduca sexta*. La SPH-1 participe au clivage de la prophénoloxydase et par conséquent à l'activation de l'enzyme phénoloxidase (Tong et al, 2005 ; Zou et Jiang, 2005).

Zou et al. (2006) ont montré que le niveau du transcrit SPH42 augmente après l'injection de *Escherichia coli* ou *Paenibacillus larvae* (agent bactérien de la loque américaine du couvain d'abeille) dans des abeilles adultes et la protéine codée par le transcrit participerait à la cascade d'activation de la prophénoloxydase lors d'une infection bactérienne. Suite à l'infection par le CBPV, notre étude protéomique a montré que l'expression de la sérine protéinase stubble diminuait comparée à celle observée dans les hémolymphes des témoins inoculés.

Par conséquent, il semble que cette protéine soit inhibée par le virus, empêchant la cascade d'activation de la phénoloxydase. Par ailleurs, cette hypothèse est appuyée par le fait que l'expression de la phénoloxidase est diminuée suite à l'infection virale.

La protéine, Reticulon 4 receptor-like, présente une expression plus forte dans l'échantillon H2 Ti1, néanmoins il est intéressant de s'attarder sur son implication au vu de son induction dans cet échantillon. En effectuant une comparaison via Blast, la séquence protéique a révélé 92 % de conservation avec la séquence de la protéine IRP30 de l'espèce *Apis dorsata* suggérant qu'elle est une protéine homologue à l'IRP30.

Cette protéine a été identifiée la première fois par Randolt et al., (2008). A l'époque sa fonction était inconnue mais la protéine était induite dans l'hémolyphe suite à une infection bactérienne. Plus tard, en 2011, une étude a révélé que IRP30 est une nouvelle protéine intervenant dans la réponse immunitaire des hyménoptères (Albert et al., 2011). Sa caractérisation biochimique chez l'abeille a démontré sa réactivité contre une infection bactérienne et sa présence chez d'autres hyménoptères a confirmé que sa fonction immunitaire était conservée au cours de l'évolution.

Dans notre contexte d'étude, l'échantillon H CBPV ne présentait pas d'augmentation de l'expression de IRP30 par rapport aux abeilles témoins non inoculées, par conséquent le CBPV contrairement au virus Kakugo ne semble pas induire cette protéine (Fujiyuki et al., 2009). Bien que nous ne soyons pas en mesure de confirmer la présence ou l'absence de bactéries dans l'échantillon H2 Ti1 (expression plus forte pour IRP30), *Nosema ceranae* a été détecté. L'ensemble de ces informations suggère que la protéine, Reticulon 4 receptor-like/IRP30, intervienne également dans la réponse immunitaire contre les infections fongiques.

C. Protéines présentant une expression différentielle mais faible

Trois autres protéines identifiées, Alpha-glucosidase precursor, Idgf4 (Imaginal disk growth factor 4 like) et Antithrombin III, ont présenté une expression légèrement plus forte dans les échantillons d'hémolymphe d'abeilles avec le CBPV.

La protéine, Idgf4, fait partie de la sous famille des IDGF, qui possède de multiples fonctions chez les insectes. Dans la bilbliographie, il est notamment rapporté que chez la drosophile, cette famille de protéine participe à la réponse immunitaire lors d'une infection bactérienne et joue un rôle dans les voies Toll et Imd (Irving et al., 2001 ; Levy et al., 2004). Néanmoins, dans le cas d'une infection par le CBPV, cette famille de protéines ne semble pas intervenir dans les mécanismes immunitaires.

Etonnamment, l'antithrombine III appartenant à la famille des sérines protéines inhibitrices (Serine protease inhibitor, Serpin) et qui est codée par le gène *serpin-5*, n'est pas induite lors de l'infection virale. Pourtant, la serpin-5 est un orthologue de la serpin-6 de *Manduca sexta* (Zou et al., 2006) qui est un régulateur négatif de la mélanisation en inhibant la protéinase activant la prophénoloxydase 3 (ProPO-activating proteinase 3, PAP-3) (Zou et Jiang, 2005). De plus, la surexpression de serpin a été mise évidence dans l'infection par différents virus (Fragkoudis et al., 2009 ; Sanders et al., 2005), mais leur rôle n'est pas connu.

Ces protéines ont été sélectionnées comme étant différentiellement exprimées dans le cadre de cette étude comparative, cependant leur implication suite à l'infection virale reste à être confirmée.

IV. Discussion

Le faible nombre de protéines identifiées est probablement dû à plusieurs paramètres de l'étude.

Premièrement, la comparaison entre les différents hémolymphes s'est révélée difficile car les abeilles inoculées avec du PB et les abeilles non-inoculées révélaient la présence du CBPV mais également d'autre pathogènes. Il était donc complexe d'identifier des protéines intervenant spécifiquement dans l'infection virale.

Deuxièmement, la taxonomie spécifiée pour la comparaison des empreintes massiques des peptides regroupait l'ensemble des séquences protéiques codées par les métazoaires. Par conséquent, il est possible que les séquences protéiques de l'abeille aient été masquées par la masse de séquences des autres organismes.

De plus, aucune protéine du CBPV n'a été identifiée, néanmoins il semble que le logiciel Mascot ne soit pas l'outil idéal pour identifier ces protéines. En effet, lors de l'analyse protéique de la préparation virale décrite dans le chapitre 3 de cette partie, aucune protéine du CBPV n'a été détectée parmi les protéines de l'espèce *Apis mellifera* tandis que l'identification à l'aide du logiciel Paragon™ a révélé la présence de protéines virales. Apparemment, la restriction au taxon *Apis mellifera* pour la recherche des protéines virales et/ou de l'hôte améliore considérablement la pertinence des identifications protéiques.

Bien que cette étude ait révélé des protéines dont l'expression variait faiblement, certains résultats sont en accord avec de précédentes études. En effet, lors du développement de la méthode, Bauwens et ses collègues (2009) avaient identifié des protéines ayant une expression similaire à celles de notre étude telles que la phosphoglycérate mutase et la phénoloxydase. Par ailleurs, exéptée la phénoloxydase, cette analyse protéomique n'a révélé aucune des autres protéines spécifiques au système immunitaire suggérant que l'infection virale n'induit pas une réponse immunitaire antivirale chez les abeille (Azzami et al., 2012). Les résultats de notre étude semblent indiquer que le CBPV pourrait stimuler ou inhiber la transcription et la traduction de protéines de l'abeille pour assurer sa réplication.

Chapitre 2 : Développement d'un modèle *in vivo*

Dans ce chapitre 2, il sera exposé les différentes tentatives d'infections expérimentales par injection d'ARN nus extraits de purification virale et les résultats obtenus qui ont permis le développement d'un modèle expérimental *in vivo* par injection d'ARN du CBPV. Dans un premier temps, il sera décrit les 2 premières infections expérimentales qui ont servi de base de test et ont été réalisées avec des quantités d'ARN préalablement dosées par spectrophotométrie avant les inoculations. Et dans un second temps, la dernière infection expérimentale sera présentée sous la forme d'un article valorisant le travail effectué. Cet article montre les résultats obtenus lors de l'injection des ARN viraux nus préalablement quantifiés par qPCR.

Dans la littérature, quelques études ont été rapportées sur l'établissement de cultures de cellules d'abeilles. Les premières études ont montré la préparation de cultures primaires de neurones (Kreissl et al., 1992 ; Laurent et al., 1994) et de cellules antennaires (Gascue let al., 1994). Cependant, ces cultures cellulaires ne pouvaient être maintenues au-delà d'un mois. En 2006, Bergem et ses collègues ont réussi à développer une méthode qui a permis d'initier la culture de cellules à partir d'embryons d'abeille au stade prégastrula et de maintenir ces cellules viables et capables de se diviser pendant plus de 3 mois. Néanmoins, les facteurs de différenciation de cellules n'étant pas encore connus chez l'abeille, il n'est pas possible d'obtenir des lignées cellulaires spécifiques (Bergem et al. 2006). A cette époque, une étude sur l'infection du DWV sur ces cultures de cellules était en cours de rédaction, néanmoins aucune donnée sur cette étude n'est parue. La production virale semble donc difficile à partir de ces cellules.

Dans notre contexte de recherche, le manque de lignées cellulaires empêche l'étude de l'infection virale sur un modèle *in vitro*. Cependant, l'infection expérimentale d'abeilles adultes par le CBPV purifié est une technique maitrisée au laboratoire et qui permet de reproduire expérimentalement la maladie. Les abeilles sont fortement susceptibles à l'infection virale par injection intra-thoracique de particules virales. Cinq à 6 jours après l'inoculation, elles présentent les symptômes de la paralysie chronique. Elles sont affaiblies et manifestent les mêmes tremblements que ceux observées lors d'infection naturelle.

		Inocula	Quantité d'ARNs nus par injection (en ng)	Observations	Nb de copies du génome du CBPV par abeille	Détection du brin négatif de l'ARN 1 du CBPV
	Abeilles avant inoculation	**Aucun**	**0**	Asymptomatiques	$1,6 \times 10^5$	Non
Série 1	**Abeilles 14 jpi**	**ARNs nus du CBPV**	**16**	Asymptomatiques	$1,6 \times 10^6$	Non
Série 2	**Abeilles 14 jpi**	**ARNs nus du CBPV**	**160**	Asymptomatiques	$3,4 \times 10^6$	Non
Série 3	**Abeilles**	**PB**	**0**	Asymptomatiques	$6,2 \times 10^4$	Non
Série 4	**Abeilles**	**Aucun**	**0**	Asymptomatiques	$9,8 \times 10^4$	Non

Tableau 6 : Infection expérimentale I : Evaluation de la charge virale du CBPV et détection du brin négatif de l'ARN 1 du CBPV

jpi : jour post inoculation

		Inocula	Quantité d'ARNs nus par injection (en ng)	Observations	Nb de copies du génome du CBPV par abeille	Détection du brin négatif de l'ARN 1 du CBPV
Série 5	**Abeilles 4 jpi**	**ARNs nus du CBPV**	**400**	Mortes	$1,3 \times 10^9$ à $8,0 \times 10^{11}$	Oui
	Abeille 5 jpi			Symptomatique	$4,8 \times 10^{12}$	Oui
Série 6	**Abeilles 4 jpi**	**PB**	**0**	Asymptomatiques	$2,2 \times 10^5$	Non
Série 7	**Abeilles 4 jpi**	**Aucun**	**0**	Asymptomatiques	$5,7 \times 10^4$	Non

Tableau 7 : Infection expérimentale II : Evaluation de la charge virale du CBPV et détection du brin négatif de l'ARN 1 du CBPV

jpi : jour post inoculation

Cette technique d'infection permet de disposer d'un modèle expérimental de reproduction de la paralysie chronique et de l'utiliser aussi pour multiplier le virus en vue de son isolement.

L'une des méthodes employées pour l'étude des virus et de leurs interactions avec les cellules hôtes consiste à introduire des modifications ciblées dans le génome viral (délétion, mutations..), par génétique inverse, puis d'étudier les conséquences de ces mutations lors d'infections *in vitro* ou *in vivo*. Cette stratégie a été employée avec succès pour de nombreux virus à ARN y compris pour un virus d'abeille, le virus de la cellule royale (BQCV) (Benjeddou et al., 2002a et b), mais n'avait jamais été tentée pour le CBPV. La première étape indispensable à ce travail était de s'assurer que les ARN génomiques nus du virus sont bien infectieux pour les abeilles adultes.

I. Premiers essais d'infections expérimentales avec des ARN viraux

Benjeddou et al. (2002a et b) ont décrit des infections expérimentales sur larves d'abeille avec des inoculums contenant 66 et 660 ng d'ARN nu du BQCV. Par conséquent, les premières infections expérimentales par injection d'ARNs nus du CBPV ont été réalisées à partir d'ARN extraits qui ont été dosés par spectrophotomètrie.

A. Infection expérimentale I

Les séries 1 et 2 inoculées respectivement avec 16 et 160 ng d'ARNs nus par injection ont été observées jusqu'à 14 jours post-inoculation (jpi). Elles n'ont présenté aucun symptôme spécifique de la paralysie chronique. Cependant, elles ont été analysées par qPCR et le brin négatif du CBPV a été recherché. La charge génomique dans ces abeilles a été estimée à environ 10^6 copies de génome viral par abeille. Elle était légèrement supérieure à celles obtenues dans les abeilles témoins (Série 3 et 4) charges comprises entre 10^4 et 10^5 copies du génome du CBPV par abeille, avant inoculation la charge génomique était aux environs de 10^5 copies du génome du CBPV par abeille (Tableau 6). De plus, le brin négatif produit normalement pendant la réplication du virus n'a pas été détecté. Ces résultats ont suggéré que le génome du CBPV ne s'était pas multiplié.

B. Infection expérimentale II

Suite à cette première expérimentation, une seconde infection a été menée en augmentant la quantité d'ARN nus injectés à 400 ng par abeille. Dans la série 5, les abeilles ainsi inoculées avec une dose de 400 ng d'ARN nus par injection sont mortes au bout de 4 jpi. A 5 jpi, l'abeille vivante restante a présenté des tremblements suggérant la manifestation des symptômes de la paralysie chronique. Chez les abeilles à 4 jpi, la charge génomique du CBPV a été quantifiée entre 1,3 × 10^9 et 8 × 10^{11} copies du CBPV par abeille, tandis qu'à 5 jpi elle a été estimée à 10^{12} copies du génome du CBPV par abeille (Tableau 7). Ces charges génomiques se sont révélées plus importantes que celles estimées chez les abeilles témoins des séries 6 et 7 (environ 10^4 copies du génome du CBPV par abeille). Par ailleurs, le brin négatif a été détecté chez les abeilles infectées avec les ARN viraux nus (Tableau 7), confirmant la multiplication du génome viral. Néanmoins, bien que la charge génomique du CBPV se soit révélée importante chez les abeilles à 5 jpi, le nombre important d'abeilles mortes à 4 jpi a suggéré que la concentration d'ARN nus injectée était trop forte pour permettre la reproduction de la maladie avec développement des symptômes.

II. Test d'injectivités des ARN du CBPV

Article 1 : Infection expérimentale de l'abeille (*Apis mellifera* L.) avec le virus de la paralysie chronique de l'abeille : Infectivité des ARNs de CBPV

Accepté le 26 avril 2012 dans « Virus Research »

Chevin, A., Schurr, F., Blanchard, P., Thiéry, R., Ribière, M., 2012

Dans les infections expérimentales présentées dans cet article, les ARN inoculés n'ont pas été dosés par spectrophotométrie comme précédemment. Il a été choisi de se baser sur la charge virale estimée par PCR quantitative afin d'avoir une base de comparaison avec les infections réalisées à l'aide de purification virale. Dans les précédentes infections, en extrapolant les dosages d'ARN nus aux nombres de copies du génome du CBPV, on a estimé que les abeilles ont été inoculées à 10^6 copies du CBPV pour l'inoculum à 16 ng, et à 10^7 pour l'inoculum à 160 ng et à 10^{11} pour l'inoculum à 400 ng. Les infections expérimentales suivantes ont été effectuées en ajustant la fenêtre de concentration d'ARNs nus inoculés entre 10^8 et 10^{10} copies du génome du CBPV par injection.

G Model
VIRUS-05713; No. of Pages 6

ARTICLE IN PRESS

Virus Research xxx (2012) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs

Aurore Chevin, Frank Schurr, Philippe Blanchard*, Richard Thiéry, Magali Ribière

ANSES, Sophia-Antipolis Laboratory, Bee Diseases Unit, BP 111, 06902 Sophia-Antipolis, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 January 2012
Received in revised form 25 April 2012
Accepted 26 April 2012
Available online xxx

Keywords:
Chronic bee paralysis virus (CBPV)
Naked RNAs
In vivo experimental model
Negative-strand RNA
Replication, Viral particle

ABSTRACT

Chronic paralysis is an infectious and contagious disease of the honeybee (*Apis mellifera* L.) and is caused by the chronic bee paralysis virus (CBPV). This disease leads to death in adult bees and is therefore a serious threat for colony health. CBPV is a positive single-stranded RNA virus and its genome is composed of two RNA segments, RNA 1 and RNA 2, 3674 nt and 2305 nt, respectively. Although CBPV shares some characteristics with viruses classified into families *Nodaviridae* and *Tombusviridae*, it has not been assigned to any viral taxa yet. The characterisation of CBPV proteins and their functions are needed to better understand the mechanisms of CBPV infection. However, since honeybee cell lines are not yet available, experimental infection of adult bees is the only method currently available to propagate the virus. With the objective of studying CBPV proteins using the viral genome, we used experimental infection in adult bees to evaluate the infectivity of naked CBPV RNAs by direct inoculation. Our results demonstrated that an injection of naked RNAs, ranging from 10^9 to 10^{10} CBPV copies, caused chronic paralysis. Bees inoculated with naked RNA showed chronic paralysis signs 5 days after inoculation. Moreover, injected RNAs replicated and generated viral particles. We therefore provide an *in vivo* experimental model that will be useful tool for further studies by using a reverse genetics system.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic paralysis affects adult honeybees (*Apis mellifera* L.) and this disease is found worldwide (Bailey, 1965, 1967; Ribiere et al., 2010a). Chronic paralysis causes severe losses of workers during the beekeeping season (Giauffret et al., 1966; Ribiere et al., 2002). Chronic paralysis signs include clusters of trembling, flightless, crawling bees, with some individual black, hairless bees at the hive entrance (Ball and Bailey, 1997). Large numbers of dead individuals accumulate at the hive entrance, attesting to the reduction in the population.

Chronic bee paralysis virus (CBPV) is the etiological agent of the disease and was first isolated in 1963 (Bailey et al., 1963). CBPV is an anisometric and non-enveloped particle that measures 30–60 nm in length and 20 nm in width (Bailey et al., 1968). It is classified as a positive single-stranded RNA virus, and has a segmented genome consisting of two RNAs, RNA 1 (3674 nucleotides) and RNA 2 (2305 nucleotides) (Olivier et al., 2008). Furthermore, experiments have shown that RNAs are not polyadenylated at the 3′ ends, but are blocked, whereas the 5′ ends have a CAP structure. Besides, RNA 1 and 2 encode three and four putative overlapping open reading frames (ORFs), respectively (Olivier et al., 2008). However, only the amino acid sequence of ORF3 on RNA 1 shares significant similarities with the conserved sequence domains of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of families *Nodaviridae* and *Tombusviridae*. Therefore CBPV seems to occupy an intermediate position between these two virus families. Because CBPV and the families *Nodaviridae* and *Tombusviridae* share common characteristics (Ribiere et al., 2010a), it has been suggested that ORFs 1 and 3 from RNA 1 encodes non-structural proteins, and that ORFs 2 and 3 from RNA 2 encodes structural proteins. Although CBPV is a positive single-stranded RNA virus, it has not yet been assigned to any family or genus. To assess the taxonomic position of CBPV and to better understand how it infects bees, a description of CBPV proteins and their functions are now needed.

To date, honeybee cell lines have not been fully developed, thereby hampering the study of CBPV infection using an *in vitro* model. Nevertheless, experimental infection of adult worker bees by CBPV is a well-known and useful technique, and honeybees are highly susceptible to CBPV infection by injection of viral particles. They usually show signs of chronic paralysis about five or six days after injection: they appear weak, have the same trembling movements as observed in naturally infected bees and die within a few days. However, since functional studies of specific CBPV

* Corresponding author at: Philippe Blanchard, ANSES, Sophia-Antipolis Laboratory, Bee Diseases Unit, BP 111, Les Templiers, 06902 Sophia-Antipolis, France. Tel.: +33 492 948 769; fax: +33 492 943 701.
E-mail address: philippe.blanchard@anses.fr (P. Blanchard).

0168-1702/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.04.012

Please cite this article in press as: Chevin, A., et al., Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. Virus Res. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.04.012

proteins are not possible by infection with purified CBPV particles, viral proteins could be studied by genetically modifying the viral genome. The first step of such a reverse genetics approach requires determining whether naked genomic CBPV RNAs are infectious for honeybees.

Various studies have demonstrated the infectivity of naked viral RNAs of many positive single-stranded RNA viruses. Although these studies are generally based on infectious RNA in cell cultures (Boyce and Roy, 2007; Shi et al., 2002), a few have used *in vivo* models, e.g. the inoculation of naked foot-and-mouth disease virus RNA in mice (Baranowski et al., 2003). Furthermore, work has been done on the infectivity of viral RNA in the bee pupae: Benjeddou et al. (2002a, b) showed that the naked RNA and the full-length RNA transcripts of the black queen cell virus (BQCV) were infectious after injection in bee pupae.

The aim of this study was to demonstrate that naked CBPV RNAs are infectious after direct inoculation in honeybee. We determined the optimum amount of naked RNAs that must be injected to reproduce chronic paralysis signs. Successful infection was demonstrated by (1) recording daily signs of chronic paralysis; (2) detecting and quantitating the viral genome using real-time reverse-transcription PCR (RT-qPCR); (3) detecting the negative-strand form of CBPV RNA; (4) visualising *de novo* viral particles using electron microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Virus purification, RNAs extraction and preparation of inoculums

CBPV particles had previously been purified from 400 heads of experimentally infected honeybees *via* differential centrifugations and followed by a separation on a 10–40% (w/v) sucrose gradient as described by Olivier et al. (2008). Viral RNAs were extracted from 50 μl purified virus particles using the High Pure Viral RNA kit (Roche). Pure RNAs were eluted in 50 μl of RNase-free water. The purified virus was quantified using two-step RT-qPCR (Blanchard et al., 2007) and the absence of other honeybee viruses was checked using RT-PCR. The purified CBPV sample was evaluated at 2.7×10^{11} CBPV copies per microliter. Three dilutions of extracted viral RNAs were performed in 0.01 M RNase-free phosphate buffer (PB, pH 7.4). Dilutions A, B and C corresponded to about 2.7×10^{7}, 2.7×10^{8} and 2.7×10^{9} CBPV copies per microliter of extracted RNAs, respectively.

2.2. Experimental assay

Emerging honeybees (*A. mellifera* L.) were collected from a colony that was tested CBPV-free by RT-qPCR. For 7 days, they were maintained at 30 °C in groups of 45 bees in small cages and supplied with sugar candy food sources and sucrose syrup complemented with protein L (Calier Laboratory, Spain), a commercial mixture of amino acids and vitamins. The bees were anaesthetised with carbon dioxide (CO_2) and inoculated with 4 μl of various solutions *via* intra-thoracic injection. Groups A, B and C were inoculated with the dilutions of extracted viral RNAs (dilutions A, B and C) at about 10^{8}, 10^{9}, 10^{10} CBPV copies per injection, respectively. Bees from group D were injected with the purified CBPV particles corresponding to about 10^{4} CBPV genome copies per injection, bees from group E were inoculated with PB and bees from group F were not inoculated but just anaesthetised. The bees were incubated at 30 °C for 5 days (groups B, C and D) and 6 days (groups A, E and F). Aliquots (4 μl) of each RNA dilution (inoculum A, B and C) were stored at −80 °C for further controls.

2.3. Sample collection and observation of clinical signs

Bees from the different groups were collected at different times. Five bees were sampled from each group before inoculation. Immediately after RNAs injection, 2 bees from groups A, B and C were collected (0 days post-inoculation, dpi). Clinical signs were observed and recorded daily. Asymptomatic, symptomatic and dead bees were recovered and stored separately at −80 °C.

2.4. Treatment of bees: crushing, viral RNAs extraction and cDNA synthesis

For samples from groups D, E and F, 5 bees were crushed in PB (1 ml/bee) with Tissue Lyser MM301 (Qiagen). For samples from the other groups, bees were individually crushed as above. The homogenates were clarified twice at 8000 × *g* for 10 min at 4 °C. The supernatants were recovered and stored at −80 °C. An aliquot of each supernatant (200 μl) was used for viral RNA extraction with High Pure Viral RNA kit (Roche) according to the manufacturer's recommendations. cDNA was synthesised from 12.5 μl extracted RNA as previously described by Ribiere et al. (2002). Inoculums A, B and C (4 μl) were adjusted to 12.5 μl with RNA-free water to perform reverse transcription.

2.5. PCR and quantitation of CBPV genomic load by real time PCR

Conventional PCRs were performed to verify the absence of other honeybee viruses: *Acute bee paralysis virus* (ABPV) (Bakonyi et al., 2002), *Black queen cell virus* (BQCV), *Deforming wing virus* (DWV) (Blanchard et al., 2007), *Israelite acute bee paralysis virus* (IAPV) (Cox-Foster et al., 2007), and *Sacbrood virus* (SBV) (Grabensteiner et al., 2001). All PCR products were run on 1.2% agarose gels. The CBPV genomic load in bees was estimated using 5 μl cDNA in a real-time PCR reaction carried out on an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applera) (Blanchard et al., 2007, 2012).

2.6. Detection of negative-strand RNA

A specific RT-PCR was developed by Celle et al. (2008) to assess the presence or absence of negative-strand RNA in samples. Briefly, the specific cDNA was synthesised from the viral negative-strand with a primer consisting of a tag unrelated to CBPV coupled to a CBPV-specific primer. PCR was then performed using a forward primer corresponding to the tag sequence and different CBPV-specific primer, revealing a PCR product of 349 bp. Control PCRs were also carried out (Celle et al., 2008). All PCR products were run on 1.2% agarose gels.

2.7. Transmission electron microscopy

The formation of viral particles was checked using electron microscopy. Fourteen heads and thoraxes of symptomatic, CBPV RNAs-inoculated bees from group C and 14 heads and thoraxes of asymptomatic bees (inoculated with PB) from group E were separately crushed in 11.2 ml of 0.01 M PB, 10% (v/v) diethyl ether and 0.02% (v/v) diethylthiocarbamate (DETC). After addition of 2.5 ml carbon tetrachloride (CCl_4), homogenates were incubated for 1 h at 4 °C then clarified at 200 × *g* for 10 min at 4 °C. Aqueous phases were recovered and centrifuged at 1700 × *g* for 1 h at 4 °C. Ultracentrifugation of supernatants was carried out at 75,000 × *g* for 3.5 h at 4 °C. The pellets were resuspended in 50 μl PB. For both samples (groups C and E), an aliquot of dilution C and an aliquot of purified CBPV particles were fixed in a buffer composed of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4, negatively stained with 1% uranyl acetate and then examined by transmission electron

Please cite this article in press as: Chevin, A., et al., Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. Virus Res. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.04.012

microscopy (Centre commun de microscopie appliquée, Université de Nice Sophia-Antipolis, France).

3. Results

3.1. Quantification of RNAs in the CBPV inoculums

RNAs extraction was performed from purified CBPV particles and RNAs were quantified as described above. The amount of CBPV RNAs was estimated at 2.7×10^{11} CBPV copies per microliter. Furthermore, conventional PCR did not detect any other honeybee viruses. Inoculums from group A, B and C were checked and contained 10^8, 10^9 and 10^{10} CBPV copies, respectively.

3.2. Infectivity assay

During the experiment, bees were monitored for appearance of chronic paralysis signs and dead bees were collected. Results are summarised in Table 1. In group A, dead bees were recovered at 1, 2 and 5 dpi, symptomatic bees were euthanised at 5 and 6 dpi, and the rest of the bees, which were apparently healthy, were killed at 6 dpi. In groups B and C, dead bees were collected at 2 and 5 dpi, and symptomatic bees were euthanised at 5 dpi. In group D, all bees presented clinical signs at 5 dpi and were euthanised and stored at −80 °C. Control bees from groups E and F were asymptomatic at 5 and 6 dpi. Symptomatic bees from groups A, B and C showed typical signs of chronic paralysis such as trembling of the wings and bodies, inability to fly and mostly just crawled on the floor of the cage (Movie S1). These signs were similar to those observed in bees from group D that were inoculated with purified CBPV particles. However, in groups B and C, many bees died at 5 dpi, whereas no bees died in group D (Movie S2). Although the experiment lasted one extra day for group A, the proportion of dead and symptomatic bees from this group was lower compared to groups B, C and D. Moreover, in group A many bees remained apparently healthy at 6 dpi (Table 1).

3.3. Correlation between appearance of clinical signs and CBPV load

To determine whether observed clinical signs could be exclusively correlated to CBPV infection, collected bees were analysed using conventional RT-PCR for ABPV, DWV, IAPV and SBV. DWV was only detected in some infected bees from group A, but not in any other sample tested (Table 2). To estimate the level of CBPV infection after naked RNAs inoculation, CBPV genomic loads were determined using RT-qPCR. Results are summarised in Table 2. Several samples from each group were analysed. Since results were quite reproducible, only results of one representative sample are shown. Compared to the low CBPV viral load observed in bees before inoculation, bees at 0 dpi showed slightly higher genomic loads, which were consistent with the titres of CBPV inoculums in each group. The results obtained in dead and symptomatic bees from each infected group indicated higher CBPV genomic loads, ranging from 3.1×10^{11} to 5.2×10^{12} copies per bee. These results were correlated to genomic loads detected in bees inoculated with purified CBPV particles (group D) at 3.2×10^{12} genome copies per bee. Asymptomatic bees from group A revealed CBPV genomic loads slightly lower than the symptomatic bees, with 9.4×10^9 CBPV copies per bee. Furthermore, the detected CBPV genomic load was significantly lower in groups E and F, around 10^4 CBPV copies per bee, comparable to the viral load observed in bees before inoculation.

Table 1
Collection of samples during the infectivity assay. Dead bees from each group were collected daily and according to the appearance of signs, bees were euthanised at 5 or 6 days post-inoculation.

	Inoculums		CBPV copies per injection (4 μl)	Number of collected bees												
				Bees before inoculation	Bees 0 dpi	Dead bees						Symptomatic bees euthanised		Asymptomatic bees euthanised 6 dpi		
						1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi	5 dpi	6 dpi			
Group A	Naked CBPV RNAs		10^8	5	2	5	1	–	–	2	6	2	9	18		
Group B			10^9	5	2	–	1	–	–	34	x	8	x	x		
Group C			10^{10}	5	2	–	2	–	–	23	x	18	x	x		
Group D	CBPV particles		10^4	–	–	–	–	–	–	–	–	45	–	–		
Group E	Phosphate buffer		0	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	44		
Group F	None		None	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	44		

dpi, days post-inoculation; 0 dpi, 0 days post-inoculation (immediately after inoculation); –, no bee was collected; x, end of the experiment.

Please cite this article in press as: Chevin, A., et al., Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. Virus Res. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.04.012

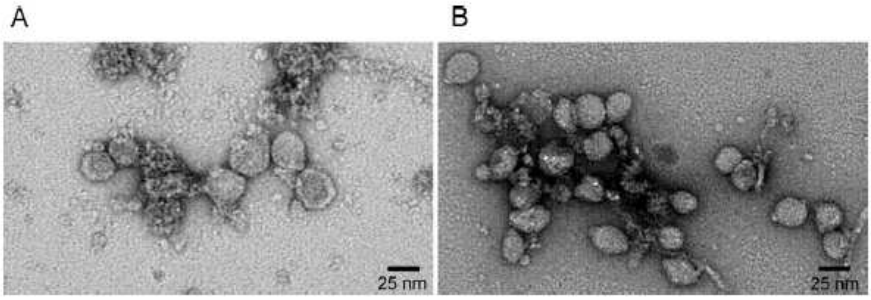


Fig. 1. Electron microscopy images showing CBPV particles extracted from experimentally infected bees. (A) CBPV recovered from heads and thoraxes of symptomatic bees (group C). (B) CBPV purified on a sucrose gradient. Scale bar, 25 nm.

Table 2
Detection of other honeybee viruses and evaluation of the CBPV genomic load using RT-qPCR in dead, symptomatic and asymptomatic bees.

Samples	Crushed bees	Other viruses detected	CBPV genomic load (CBPV copies per bee)
Inoculum A (4 µl)	x	None	2.6×10^{8}[a]
Inoculum B (4 µl)	x	None	2.9×10^{9}[a]
Inoculum C (4 µl)	x	None	4.9×10^{10}[a]
Bees before inoculation	1	None	1.5×10^{4}
Group A			
Bees 0 dpi	1	None	6×10^{4}
Dead bees 6 dpi	1	DWV	5.2×10^{12}
Symptomatic bees 6 dpi	1	DWV	1.2×10^{12}
Asymptomatic bees 6 dpi	1	DWV	9.4×10^{9}
Group B			
Bees 0 dpi	1	None	9.1×10^{5}
Dead bees 5 dpi	1	None	3.1×10^{11}
Symptomatic bees 5 dpi	1	None	2.4×10^{12}
Group C			
Bees 0 dpi	1	None	9.5×10^{6}
Dead bees 5 dpi	1	None	1×10^{12}
Symptomatic bees 5 dpi	1	None	1.6×10^{12}
Group D 5 dpi	5	None	3.2×10^{12}
Group E 6 dpi	5	None	7×10^{4}
Group F 6 dpi	5	None	4.7×10^{4}

dpi, days post-inoculation; 0 dpi, 0 days post-inoculation (immediately after inoculation); x, no bee was crushed; none, no other virus was detected.
[a] Results are expressed as CBPV copies per injection.

3.4. Detection of negative-strand CBPV RNA

Occurrence of viral replication was assessed by negative-strand specific RT-PCR in bee samples. This RT-PCR was carried out on the above-described samples. Negative-strand RNA was detected in dead, symptomatic and asymptomatic bees from groups A, B, C and D, but not in bees before inoculation or in bees from groups E and F (data not shown). Surprisingly, negative-strand RNA was also detected in all three RNAs inoculums. To determine whether this strand was a contaminant from CBPV purification, an additional experiment was performed. The viral purification was incubated with or without RNase A. Moreover, RNA extractions from viral purification and from bees infected with CBPV were also incubated with RNase A. After incubation, the negative-strand specific RT-PCR was carried out (data not shown). We noted the presence of the negative strand in the viral purification despite RNase treatment. No amplification was observed in the two RNA extractions, confirming the degradation of all RNAs. Therefore, these results suggested that the negative-strand RNA was incorporated in the CBPV virion.

3.5. Formation of viral particles after naked RNA inoculation

To avoid melanisation that could damage CBPV particles in dead bees, only symptomatic bees from group C were used. The heads and thoraxes of infected bees harbour high genomic loads (Blanchard et al., 2007). Therefore these organs were collected from selected bees and crushed to recover virus particles. This preparation was examined with transmission electron microscopy (Fig. 1A). Fig. 1A shows the presence of viral particles, about 35 nm of length, which were physically identical to particles from the purified CBPV particles (Fig. 1B). To ensure that particles were generated by naked RNAs, bees from group E were prepared as described above and an aliquot of the highest dilution (dilution C) were examined. No CBPV particles were found in these two samples. Therefore, the injection of naked RNAs induced the formation of CBPV particles.

4. Discussion

CBPV is a widespread viral infection and can be responsible for severe losses of worker bees during the beekeeping season. Although its genome has been previously characterised, the mechanisms of CBPV infection remain unclear. In the absence of honeybee cell lines, experimental infection is the only method available to reproduce the virus in honeybees. To improve knowledge on CBPV, development of a genetic system would be interesting. As a first step, we evaluated the infectivity of naked CBPV RNAs after injection in honeybee.

In this study, bees were inoculated with amounts of RNAs ranging from 10^{8} to 10^{10} CBPV copies per injection. Based on previous studies, we adjusted the amount of injected RNAs (data not shown). Bees that received between 10^{6} and 10^{7} CBPV copies per injection did not show chronic paralysis signs and naked RNA did not replicate. In contrast, when a dose of 10^{11} CBPV copies per microliter was used, most bees died after four days and the few bees still alive did not develop any obvious signs. The CBPV genomic load was 10^{12} CBPV copies per bee; negative-strand RNA was detected, and replication had occurred (data not shown). However, the amount of injected RNAs was too high to evaluate the infectivity of naked CBPV RNAs, because bees died faster than bees inoculated with purified virus particles.

In the present study, the amount of naked RNA used ranged from 10^{8} to 10^{10} CBPV copies per injection. Based solely on visual diagnosis, bee groups could be divided into three categories of bee status. For group A (10^{8} CBPV copies per injection), bees were dead, symptomatic or asymptomatic after 6 dpi. Although the symptomatic bees from group A showed chronic paralysis signs, the presence of asymptomatic and active bees suggested that the injection of 10^{8} CBPV copies of naked RNA was not sufficient to induce signs in all

Please cite this article in press as: Chevin, A., et al., Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. Virus Res. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.04.012

bees. Unlike group A, bees from groups B and C (10^9 and 10^{10} CBPV copies per injection, respectively) were dead or symptomatic at 5 dpi. The CBPV genomic load of 10^9 or 10^{10} CBPV copies per injection initiated infection in honeybees and these bee groups exhibited an infectivity phenotype resembling those of bees inoculated with purified CBPV particles. It therefore appears that naked viral RNAs can cause chronic paralysis from an injection of a minimum of 10^9 CBPV copies.

Recently, Dainat et al. (2012) demonstrated that the life span of adult bees infected with DWV is reduced significantly. In this study, DWV was detected in dead bees from group A at 6 dpi. Thus the contribution of DWV in the mortality of these bees cannot be excluded. The evaluation of the CBPV genomic load by RT-qPCR confirmed that naked RNAs induced chronic paralysis. For asymptomatic bees from group A, the CBPV genomic load was around 10^9 CBPV copies per bee, whereas for symptomatic and dead bees from group A, B and C, the viral genomic load was around to 10^{12} CBPV copies per bee. These results corroborate a previous study that demonstrated a strong correlation between chronic paralysis and high viral load in symptomatic and dead bees (Blanchard et al., 2007). For groups B and C, signs observed after 5 dpi, namely abnormal trembling of the wings and bodies, inability to fly and only crawling on the cage floor, was correlated to CBPV genomic loads of over 10^{10} CBPV copies per bee as described in a survey of pathogens detected in honeybee mortalities observed in France during 2008 and 2009 (Ribiere et al., 2010b). The amount of CBPV RNAs needed to induce chronic paralysis is much higher when using naked RNAs (10^9 CBPV copies per injection) compared to that needed when using the purified virus (10^4 CBPV copies per injection). Thus, naked RNAs infection is less effective, which may be due to several reasons. Integrity and/or conformation of purified RNAs may be significantly different from that of the native virus. In contrast, infection by the native virus probably occurs *via* interaction with a cell receptor, which may facilitate entry into cells.

The appearance of signs and formation of viral particles after CBPV RNAs inoculation in bees demonstrate that naked CBPV RNAs are infectious. CBPV RNAs were able to express all the CBPV proteins necessary for initiating virus replication, some of which are involved in capsid structure, and probably promote interaction with cellular receptors of neurones, and thus the penetration of virus or viral genome into the cell.

The detection of the negative-strand RNA indicates virus replication for positive single-strand RNA viruses (Craggs et al., 2001; Yue and Genersch, 2005). Negative-strand RNA was demonstrated in inoculated bees; therefore naked CBPV RNAs were able to initiate replication. These results along with those of RT-qPCR suggest that the CBPV genome replicates in the honeybee. In contrast, the negative-strand RNA was also detected in inoculums A, B and C. Contamination could be ruled out since RNase treatment of the viral preparation prior to RNAs extraction did not eliminate the negative-strand RNA. Consequently, this result suggests that negative-strand RNA may be encapsidated along with positive-strand RNA. Thus, during inoculation, both RNAs forms were transferred to the honeybee, and the anti-genomic RNA form may play a role in the infectivity of naked RNA by increasing the production of the genomic RNA form. The genomic RNA form may initiate translation of non-structural proteins. Any expressed RdRp would immediately replicate the positive-strand RNA from injected negative-strand RNA. However, further investigations are necessary to confirm these hypotheses.

Overton et al. (1982) described that the CBPV genome contains five single-stranded RNA fragments: two major RNAs, RNA1 and RNA2 and three minor fragments: RNA3a, 3b and 3c, each of 1100 nt. Further experiments will determine whether RNA1 and 2 alone are sufficient to initiate replication and if the minor fragments are required for CBPV infection.

The 5′ end of CBPV RNAs are capped (Olivier et al., 2008). It is well known that the CAP structure of RNA plays a role in RNA stability by protecting RNA from degradation by cellular exonucleases. It also ensures translation initiation by coupling with cap-binding protein. This may explain why naked CBPV RNAs remain infectious.

Using naked RNA injection to study CBPV is limited by the availability of bees: experiments can be performed only during the beekeeping season. Nevertheless, this study demonstrates that an *in vivo* model can be used for developing a reverse genetics system, for vector construction and for protein tagging, even though honeybee cell lines are not available. The production of infectious *in vitro* RNA transcripts will be very useful for studying CBPV biology. Site-directed mutagenesis as well as other modifications of the CBPV genome followed by injection in honeybees will lead to a better understanding of the function of viral proteins. Therefore, the reverse genetics approach will help explore the viral replication cycle, identify markers of virulence and will help determine the taxonomic position of CBPV.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Microscopy Facility at the University of Nice (*Centre commun de microscopie appliquée de l'Université de Nice Sophia-Antipolis*, France) for help with transmission electron microscopy. A. Chevin was the recipient of a PhD fellowship funded by ANSES.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.04.012.

References

Bailey, L., 1965. The occurrence of chronic and acute bee paralysis viruses in bees outside Britain. Journal of Invertebrate Pathology 7, 167–169.
Bailey, L., 1967. The incidence of virus diseases in the honey bee. Annals of Applied Biology 60, 43–48.
Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D., 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). Virology 21, 390–395.
Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D., 1968. The purification and properties of chronic bee-paralysis virus. Journal of General Virology 2, 251–260.
Bakonyi, T., Farkas, R., Szendroi, A., Dobos-Kovacs, M., Rusvai, M., 2002. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. Apidologie 33, 63–74.
Ball, B.V., Bailey, L., 1997. Viruses. In: Morse, R.A., Flottum, K. (Eds.), Honey Bee Pests, Predators, & Diseases. A.I. Root Company, Medina, pp. 11–32.
Baranowski, E., Molina, N., Nunez, J.I., Sobrino, F., Saiz, M., 2003. Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from suckling mice after direct inoculation with in vitro-transcribed RNA. Journal of Virology 77, 11290–11295.
Benjeddou, M., Leat, N., Davison, S., 2002a. Black queen cell virus RNA is infectious in honey bee pupae. Journal of Invertebrate Pathology 81, 205–206.
Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M., Davison, S., 2002b. Development of infectious transcripts and genome manipulation of Black queen-cell virus of honey bees. Journal of General Virology 83, 3139–3146.
Blanchard, P., Regnault, J., Schurr, F., Dubois, E., Ribiere, M., 2012. Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. Journal of Virological Methods 180, 26–31.
Blanchard, P., Ribiere, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A.L., Faucon, J.P., 2007. Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. Journal of Virological Methods 141, 7–13.
Boyce, M., Roy, P., 2007. Recovery of infectious bluetongue virus from RNA. Journal of Virology 81, 2179–2186.
Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Schurr, F., Cougoule, N., Faucon, J.P., Ribiere, M., 2008. Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. Virus Research 133, 280–284.
Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., Vanengelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm,

Please cite this article in press as: Chevin, A., et al., Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. Virus Res. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.04.012

M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 318, 283–287.
Craggs, J.K., Ball, J.K., Thomson, B.J., Irving, W.L., Grabowska, A.M., 2001. Development of a strand-specific RT-PCR based assay to detect the replicative form of hepatitis C virus RNA. Journal of Virological Methods 94, 111–120.
Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012. Dead or alive: deforming wing virus and Varroa destructor reduce the life span of winter honeybees. Applied and Environment Microbiology 78, 981–987.
Giauffret, A., Duthoit, J.L., Caucat, M.J., 1966. Etude virologique de quelques cas de maladie noire de l'abeille en France. Recueil de Medecine Veterinaire CXLII, 819–829.
Grabensteiner, E., Ritter, W., Carter, M.J., Davison, S., Pechhacker, H., Kolodziejek, J., Boecking, O., Derakhshifar, I., Moosbeckhofer, R., Licek, E., Nowotny, N., 2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 8, 93–104.
Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., Dubois, E., Tordo, N., Thiéry, R., Houlgatte, R., Ribière, M., 2008. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. Virus Research 132, 59–68.
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. Journal of General Virology 63, 171–179.
Ribiere, M., Olivier, V., Blanchard, P., 2010a. Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other. Journal of Invertebrate Pathology 103, 120–131.
Ribiere, M., Carletto, J., Blanchard, P., Schurr, F., Celi, O., Chevin, A., Faucon, J.-P., 2010b. Detection of pathogens in honeybee mortalities observed in France during 2008 to 2009. In: EurBee, 7–9 September 2010, Ankara.
Ribiere, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Aurières, C., Faucon, J.P., Pépin, M., 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. Apidologie 33, 339–351.
Shi, P.Y., Tilgner, M., Lo, M.K., Kent, K.A., Bernard, K.A., 2002. Infectious cDNA clone of the epidemic west nile virus from New York city. Journal of Virology 76, 5847–5856.
Yue, C., Genersch, E., 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). Journal of General Virology 86, 3419–3424.

Please cite this article in press as: Chevin, A., et al., Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. Virus Res. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.04.012

Ainsi, en rassemblant toutes les données obtenues durant ces études, la concentration optimale d'ARN nus du CBPV permettant la reproduction de la paralysie chronique est donc de 10^9 copies du génome du CBPV par injection. Cette concentration d'ARNs nus nécessaire à l'induction de la paralysie chronique est largement supérieure à la quantité de virus purifié qui correspond à 10^4 copies du génome du CBPV par injection. L'efficacité moindre de l'infection à l'aide d'ARN nus a plusieurs explications possibles : 1) l'intégrité et/ou la conformation des ARN viraux extraits peuvent être différentes des ARN du virus natif ; 2) l'infection par les particules virales est probablement plus efficace par la présence des protéines de la capside qui faciliteraient l'entrée du virion dans la cellule.

Cette stratégie d'infection expérimentale d'abeilles adultes par injection d'ARN nus a démontré qu'un modèle *in vivo* peut être utilisé pour développer un système de génétique inverse, pour la construction de vecteur et pour étudier des protéines virales ciblées en l'absence de lignées cellulaires d'abeille.

Chapitre 3 : Expression des protéines virales putatives

Ce chapitre 3 expose les différentes stratégies qui ont été utilisées afin d'identifier et d'étudier les protéines codées par le génome du CBPV. Basé sur la conservation des ORF et du polymorphisme des codons des 2 isolats français du CBPV les plus divergents, Olivier et ses collègues (2008a) ont suggéré que les ORF 1, 2 et 3 de l'ARN 1 et les ORF 2 et 3 de l'ARN 2 sont les plus probables pour coder des protéines du CBPV. Bien que 2 de ces protéines, la RdRp (ORF 3 de l'ARN 1) et la pSP (ORF 3 de l'ARN 2), soient les protéines virales qui nous semblent exister réellement, cette hypothèse doit être totalement vérifiée et des informations complémentaires sur leur caractérisation étofferaient les données sur le CBPV. Par conséquent, la RdRp et la pSP sont les protéines principalement ciblées au cours de différentes études.

Dans un premier temps, afin de déterminer la réalité des ORF, j'ai réalisé des essais de traduction *in vitro* à partir des ARN extraits d'une purification virale. Ces essais ont été conduits à l'aide d'un kit commercial de traduction contenant de l'extrait de germe de blé ou de l'extrait de lysat de réticulocytes de lapin.

Dans un second temps, j'ai réalisé des travaux sous la direction des Docteurs Bruno Coutard et Bruno Canard du département « Virologie structurale et Drug design » (Marseille) afin d'exprimer des protéines recombinantes du CBPV et ainsi de permettre : 1) la production des protéines non-structurales dans le but de réaliser des tests fonctionnels, en ciblant principalement la RdRp (les protéines recombinantes CBPV 9 à 12) ; 2) l'obtention d'au moins une protéine recombinante de chaque ORF afin de produire des anticorps.

I. Réalité des ORF

A. Essais de traduction *in vitro* des protéines potentiellement exprimées

1. Premièrs essais de traduction *in vitro*

Dans les premières expériences, différentes quantités d'ARN du CBPV ont été utilisées allant de 150 à 200 ng. Après la réaction de traduction, les protéines ont été révélées par détection colorimétrique. Dans tous les échantillons, les bandes se trouvant à 200, 80, 32 et 17 kDa correspondaient aux protéines naturellement biotinylées dans l'extrait de germe de blé.

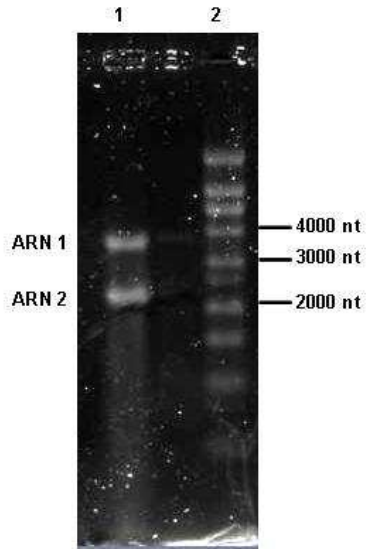


Figure 20 : Visualisation des ARN viraux sur gel d'agarose en conditions dénaturanres

Puits 1 : ARN viraux extraits (10 µg) ; Puits 2 : Marqueurs de masses moléculaires

	ORF	Nombre d'acides aminés	Nombre de résidus lysine	Pourcentage de résidus lysine (en %)	Masses moléculaires prédites (kDa)
ARN 1	1	853	29	3,4	95,3
	2	286	11	3,86	31
	3	649	27	4,17	74
	ORF fs	1190	31	2,61	135
ARN 2	1	109	0	0	12,2
	2	582	15	2,58	65,5
	3	181	4	2,22	19,7
	4	147	2	1,37	16,7

Tableau 8 : Proportion de résidus lysine dans les séquences des protéines putatives du CBPV

ORF fs : ORF putatif issu du frameshift entre les ORF1 et 3 de l'ARN 1.

Les quatre protéines du témoin positif (virus de la mosaïque du brome, BMV) ont été détectées à 109, 94, 20, 15 kDa indiquant la validité de la réaction, cependant aucune protéine du CBPV n'a été detectée. Malgré plusieurs tentatives, aucune protéine du CBPV n'a été traduite lors de ces essais.

2. Tentatives d'optimisation de la réaction

Différentes expériences ont ensuite été réalisées afin d'optimiser le protocole et de trouver des conditions permettant la traduction des protéines virales, en s'attachant notamment à vérifier l'intégrité des ARN viraux et en faisant varier les quantités d'ARN et réactifs.

a) Vérification de l'intégrité des ARN

Une des premières explications des échecs de traduction pouvait être la dégradation des ARN utilisés qui provenaient d'une extraction antérieure et qui avaient été conservés à -80°C.

Par conséquent, ces ARN ont été visualisés sur un gel en conditions dénaturantes (Figure 20). Les 2 ARN du CBPV ont été visualisés à leurs tailles respectives, comprises entre 3000 et 4000 nt pour l'ARN 1 et 2000 et 3000 nt pour l'ARN 2, ce qui prouve l'absence de dégradation importante. Néanmoins, les ARN utilisés pour la suite des tests, étaient fraichement extraits à partir d'une nouvelle purification virale.

b) Quantités d'ARN et évaluation de la proportion en résidus lysine

La deuxième raison pouvait être une quantité insuffisante d'ARN viraux dans le mélange réactionnel. Des réactions de traduction avec des concentrations croissantes d'ARN de 1 µg à 4 µg ont donc été effectuées.

De plus, une intensité suffisante de révélation du marquage a été évaluée. Afin de révéler les protéines traduites, des lysines biotinylées sont incorporées dans la protéine au cours de la traduction à l'aide du complexe lysine biotinylée-ARNt. De la quantité de lysine présente dans la séquence protéique dépend l'intensité de détection. Par conséquent, la proportion de résidus lysine dans les séquences des protéines putatives du CBPV a été calculée (Tableau 8). Il a été remarqué que le pourcentage de lysine contenu dans chaque protéine virale putative était relativement faible, entre 0 et 4,17 %, tandis que les protéines virales du BMV contiennent en moyenne 6,5 % de résidus lysine.

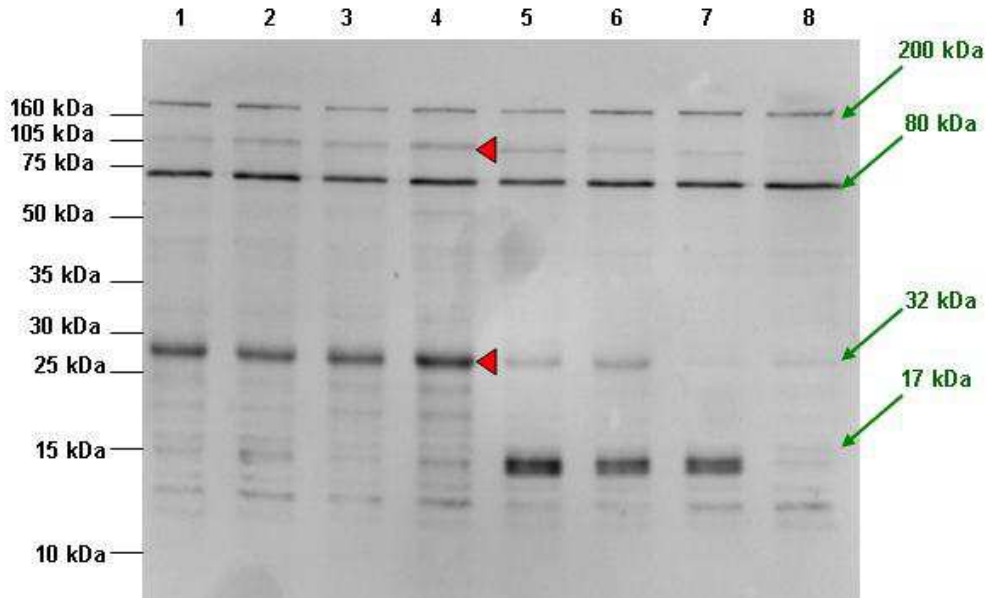


Figure 21 : Protéines traduites révélées par la méthode colorimétrique

Puits 1 à 4 : Protéines traduites à partir des ARNs du CBPV (1 µg, 1,5 µg, 3 µg et 4 µg)
Puits 5 et 6 : Protéines traduites suite au mélange des ARN du CBPV et du BMV
Puits 7 : Protéines traduites à partir de l'ARN du BMV
Puits 8 : Réaction de traduction sans ARN
Les flèches vertes indiquent les protéines de l'extrait de germe de blé qui sont naturellement biotynylées. Les triangles rouges indiquent les protéines du CBPV supposées traduites (105 kDa et 27 Kda).

Afin de remédier à ce possible problème, le volume du complexe lysine biotinylée-ARNt a été doublé dans le mélange réactionnel des réactions suivantes.

c) Composition du mélange réactionnel, facteur d'inhibition et temps d'incubation

Parmi les autres causes possibles, nous avons envisagé une concentration non optimale d'acétate de potassium, l'inhibition de la traduction par un élément présent dans l'extraction des ARN et enfin le temps d'incubation de la réaction. Ces points ont donc été pris en compte dans les réactions.

De nouvelles réactions de traduction *in vitro* ont été réalisées avec une incubation à 25°C durant 2h au lieu d'1h. Afin de tester l'éventuelle présence d'inhibiteurs dans les extraits d'ARN du CBPV, deux réactions contenant un mélange équimolaire d'ARN du CBPV et du BMV ont été effectuées. En parallèle, une réaction avec de l'ARN du BMV seul, ainsi que de plusieurs réactions contenant des ARN du CBPV à des quantités finales de 1 µg à 4 µg ont été réalisées.

Après avoir révélé les protéines exprimées des différents échantillons, la comparaison des réactions de traduction à partir des ARN du BMV seuls et mélangés avec ceux du CBPV montre que les protéines du BMV ont été traduites (Figure 21, puits 5 et 6). Ces résultats ont prouvé que le mélange des extraits d'ARN du CBPV avec les ARN du BMV n'a pas inhibé la traduction du témoin positif de façon visible.

Enfin, les quatre profils de traduction avec des concentrations croissantes d'ARN du CBPV (Figure 21, puits 1 à 4) ont montré la présence de 2 bandes supplémentaires vers 105 kDa et entre 25 et 30 kDa (triangles rouges) comparés aux profils du BMV seul et du contrôle négatif (sans ARN) (Figure 21, puits 7 et 8). Ces bandes étaient aussi visibles bien que de faible intensité dans les profils de traduction issus du mélange des ARN du contrôle positif et du CBPV (Figure 21, puits 5 et 6).

Ces résultats ont indiqué que 2 protéines du CBPV de 105 et 27 kDa avaient été traduites. Par ailleurs, d'autres bandes faiblement visibles après révélation suggéraient que d'autres protéines avaient été exprimées.

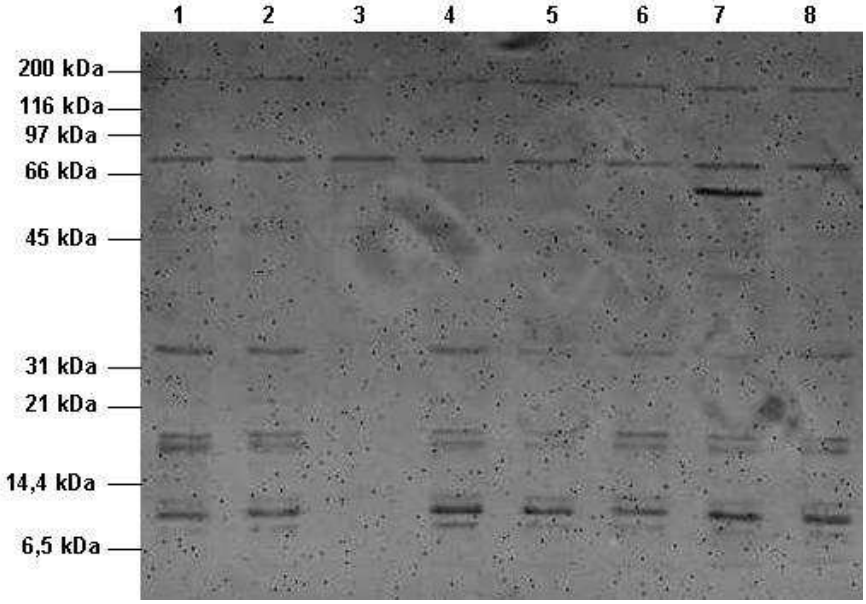


Figure 22 : Protéines traduites révélées par la méthode chémioluminescente des protéines

Puits 1 à 7 : Protéines traduites à partir des ARN du CBPV (1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg et 6 µg)
Puits 7 : Protéine traduite à partir de l'ARN témoins du kit (la luciférae) à 65 kDa
Puits 8 : Réaction de traduction sans ARN

d) Quantité et structure des ARN viraux, révélation par chemioluminiscence

Afin de confirmer la révélation de ces deux protéines et d'optimiser celles des protéines faiblement visibles, de nouvelles réactions ont été effectuées avec des concentrations plus importantes d'ARN du CBPV, allant jusqu'à 6 µg d'ARN. Puis, afin de révéler les protéines faiblement traduites, la détection colorimétrique a été remplacée par une technique plus sensible, la révélation par chémioluminiscence. Cependant, un nouveau témoin positif de la réaction avait été incorporé dans le kit commercial, ce témoin était l'ARN codant la luciférase.

Après plusieurs essais, l'amélioration de la réaction n'a pas abouti. En effet, aucune protéine nouvelle ou même précédemment détectée à l'aide de la méthode colorimétrique, n'a pu être révélée dans les réactions conduites (Figure 22, puits 1 à 6). La traduction à partir de l'ARN de la luciférase s'est cependant effectuée produisant la protéine attendue à 65 kDa (Figure 22, puits 7). Une autre hypothèse a été émise sur la difficulté à exprimer les protéines du CBPV, elle pourrait être due à une conformation particulière des ARN.

Cependant, même en incubant les ARN à une température d'environ 65°C durant 10 min afin de les dénaturer et d'éliminer les structures secondaires, aucune protéine n'a été observée lors des révélations.

B. Discussion

Ces résultats indiquent que l'expression des protéines du CBPV est difficile à obtenir à l'aide de ce type de stratégie. Bien que les résultats n'aient pas pu être reproduits les protéines de 105 et 27 kDa visualisables sur la Figure 21 pourraient correspondre aux produits de l'ORF 1 de l'ARN 1 et de l'ORF 3 de l'ARN 2. Cependant en l'absence de confirmation ces points restent des suppositions.

Différentes informations pourraient expliquer les difficultés rencontrées. Il est supposé que les ORF 2 et 3 de l'ARN 2 sont traduits via la lecture facultative du codon d'initiation de l'ORF 2, la traduction *in vitro* de ces ORF peut donc être limitée.

En effet, l'efficacité de reconnaissance du codon AUG peut être dépendante de divers facteurs d'initiation (les séquences entourant l'AUG, des éventuelles structures secondaires à l'extrémité 5', ou même l'abondance des facteurs d'initiation). Dans les systèmes de traduction *in vitro* issus d'extrait de germe de blé ou de l'extrait de lysat de réticulocytes de lapin, ces facteurs ne sont probablement pas les mêmes que ceux présents chez l'abeille. Le fait que nous n'ayons pas pu confirmer la réalité des ORF du CBPV par cette technique indique que cette confirmation n'est peut être pas possible par traduction *in vitro* à partir d'ARN viraux extraits. Malgré les précautions et tests réalisés au cours de ce travail, il ne peut pas être exclu que cette impossibilité puisse être liée soit à une conformation secondaire forte soit à une intégrité incomplète des extrémités des ARN extraits. Afin de remédier à ces difficultés, la solution pourrait être de réaliser des essais de transcription/traduction *in vitro* à partir des ADNc de chaque ARN viraux clonés en vecteur comme cela a été effectué pour étudier le frameshift par l'équipe du Dr. Andrew Firth.

En effet dans le cadre de la détection des ORF et de leur caractérisation, au cours de mon travail de thèse l'équipe du Dr. Andrew Firth du « Département de pathologie de l'Université de Cambridge » (Royaume-Uni) à pris contact avec notre laboratoire. Cette équipe travaille essentiellement sur la caractérisation des mécanismes inhabituels de traduction des virus à ARN (frameshift, leaky scanning, readthrough, IRES…). Firth et Brown ont développé un programme pour détecter et analyser les ORF chevauchants codant ou non-codant (MGLOD) (Firth and Brown 2005 et 2006 ; Firth et al., 2010 et 2011). Ce logiciel, basé sur une mesure du potentiel codant des ORF à partir des alignements de séquences de chaque ORF du CBPV, a permis de montrer que les ORF 1 et 3 de l'ARN 1 et les ORFs 1, 2 et 3 de l'ARN 2 codent le plus probablement les protéines virales. Ces données sont en accord avec les analyses de variabilité des codons réalisées par Olivier et al. (2008a). Cette étude statistique n'a pas été plus approfondie.

Avec notre collaboration, le travail de cette équipe se focalise actuellement sur le frameshift putatif pour l'expression de l'ORF 3 de l'ARN 1 du CBPV et sur l'existence d'éléments stimulateurs additionnels à l'extrémité 5' ou 3'. Pour ces travaux, des plasmides contenant l'ADNc des 2 ARN viraux, produits à l'Anses de Sophia-Antipolis ont été utilisés par l'équipe du Dr. A. Firth.

Dans leurs conditions expérimentales, des essais de traductions *in vitro* ont aussi été réalisés à l'aide de lysat de réticulocytes de lapin et ont montré un faible niveau d'expression. L'équipe s'est donc tournée vers un système de transcription/traduction de cellule d'insecte. Les résultats de ces transcriptions/traductions *in vitro* ont montré un faible niveau (environ 1 %) de « frameshifting » sur le motif CCCUUUC qui disparait lorsque ces nucléotides sont mutés. Il est possible que ce niveau d'efficacité soit suffisant pour le virus ou qu'il soit plus important dans les cellules infectées par le virus. Ils ont également montré que la traduction de l'ORF 1-3 produit de nombreuses protéines au lieu d'une protéine entière de 135 kDa. En effectuant des séries de délétions, ils ont localisé l'activité d'une protéase en amont de la RdRp.

Contrairement à l'hypothèse émise par Olivier et al. (2008a) qui supposaient un site de frameshift de type -1, ce site semble être de type + 1 qui signifie que le ribosome passe au dessus d'un nucléotide en direction de l'extrémité 3' et continue la traduction dans le nouveau cadre de lecture. Enfin, l'alignement des séquences du CBPV avec les séquences des deux virus potentiels de LSV 1 et 2 (Partie 1, Chapitre 2) au niveau du site de frameshift a montré des différences dans les bases composant l'heptanucléotide. Chez le CBPV, il est composé de CCC UUU CGU tandis que chez LSV 1 et 2 il est composé de CGA UUU CGU. Cette donnée suggère que « le glissement » se déroulerait au niveau du motif UUU C.

II. Expression de protéines recombinantes du CBPV

Lors de cette étude, le clonage des séquences correspondantes aux protéines putatives du CBPV (entières ou tronquées) dans les vecteurs d'expression a été réalisée par recombinaison via le système « Gateway ». L'avantage principal de ce système est de cloner facilement et rapidement la séquence d'intérêt dans une grande variété de vecteurs d'expression et ainsi d'avoir la possibilité d'exprimer les protéines dans différents systèmes cellulaires (bactéries, cellules d'insecte, cellules de mammifère). Dans notre étude, les vecteurs d'expression utilisés (pDEST17 et pET20AG) sont spécifiques du système d'expression bactérien, par conséquent 23 séquences correspondant aux 7 ORF entiers ou tronqués du CBPV ont été déterminées. Ainsi, au sein de l'Anses, laboratoire Sophia-Antipolis, mon travail a été d'amplifier les séquences et de les cloner dans les 2 vecteurs d'expression. La liste de ces protéines et l'ORF dont elles sont issues sont indiqué dans le tableau 9.

Génome		Protéines	Expression	Fraction	Vecteur	**Rendement prédit (mg/L de culture)**
ARN 1	ORF 1	CBPV1	Oui	Soluble	pETA20G	0,193
				Insoluble	pDEST 17	ND
		CBPV2	Oui	Soluble	pETA20G	0,1525
				Insoluble	pDEST 17	ND
		CBPV3	Oui	Soluble	pETA20G	0,066
				Insoluble	pDEST 17	ND
		CBPV4	Oui	Soluble	pDEST 17	0,1435
				Insoluble	pDEST 17	ND
		CBPV5	Oui	Soluble	pDEST 17 et pETA20G	15,3
				Insoluble	pDEST 17	ND
	ORF 2	CBPV6	Oui	Soluble	pDEST 17	0,545
				Insoluble	pETA20G	ND
		CBPV7	Non			
		CBPV8	Non			
	ORF 3	CBPV9	Oui	Soluble	pDEST 17 et pETA20G	0,407
				Insoluble	pDEST 17 et pETA20G	ND
		CBPV10	Oui	Insoluble	pDEST 17	ND
		CBPV11	Oui	Insoluble	pDEST 17	ND
		CBPV12	Non			
ARN 2	ORF 1	CBPV13	Oui	Soluble	pETA20G	39,8
				Insoluble	pDEST 17	ND
		CBPV14	Oui	Soluble	pETA20G	10,35
				Insoluble	pDEST 17	ND
	ORF 2	CBPV15	-			
		CBPV16	Oui	Soluble	pETA20G	0,56
		CBPV17	Non			
	ORF 3	CBPV18	Non			
		CBPV19	Oui	Soluble	pDEST 17	
		CBPV20	Non			
		CBPV21	Non			
	ORF 4	CBPV22	Non			
		CBPV23	Oui	Soluble	pETA20G	1,2185
				Insoluble	pETA20G	ND

Tableau 9 : Conditions optimales d'expression des protéines suite aux tests analytiques

ND : Non déterminé

Exceptée la séquence de CBPV 15, les 22 autres séquences ont été clonées avec succès dans les vecteurs d'expression permettant l'expression de protéines solubles ou insolubles (dans des corps d'inclusion) avec l'ajout de tag de type 6 histidines (6His) ou de type 6 histidines et thiorédoxine (TRX + 6His). Suite à l'acquisition des constructions, mon travail s'est poursuivi au département « Virologie structurale et drug design » sous la supervision et l'aide des Docteurs B. Coutard et B. Canard. Ctte partie du projet a été entamée par les tests analytiques d'expression. Ils ont montré que les protéines CBPV 1 à 6, CBPV 9, 13, 14, 16, 19 et 23 étaient exprimées sous leur forme soluble (Tableau 9). De plus, leurs paramètres optimaux d'expression ont pu être déterminés.

L'intérêt de purifier les protéines à partir de la fraction soluble est que la purification se déroule en conditions non-dénaturantes permettant ainsi d'obtenir la protéine sous sa forme native. Une protéine native peut donc être utilisée pour effectuer des tests fonctionnels, produire des anticorps et/ou déterminer la structure 3D de la protéine par cristallographie. Bien que 12 protéines puissent s'exprimer sous forme soluble, notre choix s'est focalisé sur celles ayant un rendement important (1,2 à 39,8 mg/l de culture) comme CBPV5, 13, 14 et 23. Par contre, la protéine CBPV 9 qui avait un rendement moyen (0,4 mg/ml de culture) a été sélectionnée car elle faisait partie des protéines d'intérêt issues de l'ORF de la RdRp.

Par ailleurs, comme l'un des deux buts de ce travail était d'obtenir une protéine recombinante de chaque ORF en vu de la production d'anticorps, des protéines s'exprimant sous leur forme insoluble ont été sélectionnées et purifiées en conditions dénaturantes à partir des corps d'inclusion (Ci) (Tableau 9).

A. Expression des protéines putatives de l'ARN 1

1. ORF 1

CBPV 1, la protéine complète correspondant au produit codé par l'ORF 1, n'a pu être purifiée, c'est pourquoi pour cette ORF, l'expression et la purification ont été ciblées sur des protéines tronquées.

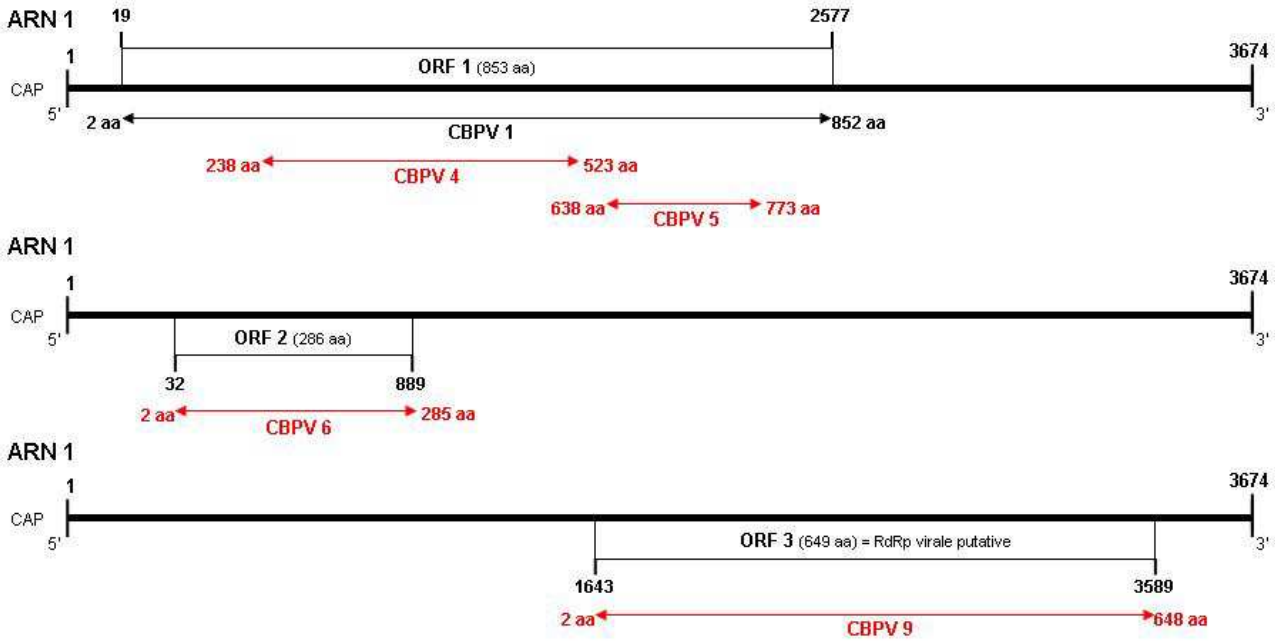


Figure 23 : Localisation sur l'ARN 1 des séquences protéiques correspondant aux protéines exprimées

Les séquences protéiques en rouge correspondent aux protéines exprimées et purifiées.

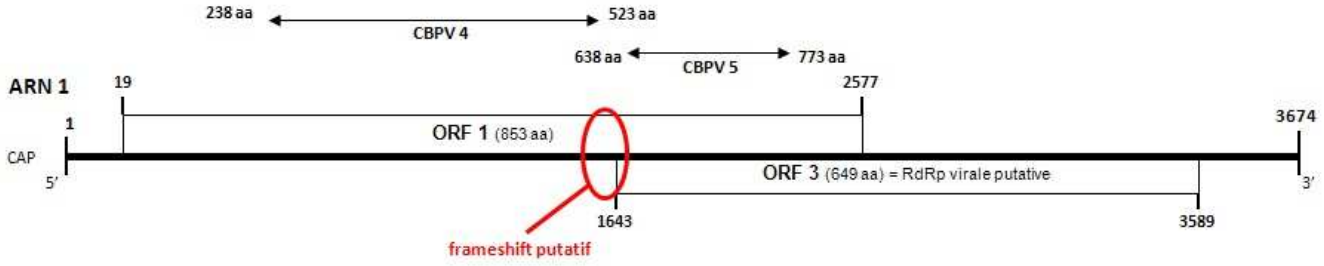


Figure 24 : Localisation de CBPV 4 et 5, respectivement en amont et en aval du site de frameshift putatif

CBPV 5 correspondant à la région C-terminale de la protéine (Figure 23) avec une masse moléculaire prédite de 15,4 kDa, était exprimée sous sa forme soluble. La protéine a été purifiée en conditions non-dénaturantes car l'analyse par empreinte peptidique massique (PMF) de CBPV 5+TRX+6His a montré que le pourcentage de recouvrement de la séquence était de 40,7 %. Cependant, après la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la visualisation sur gel de la protéine n'a rien révélé. De plus, la masse totale de la protéine n'a pu être déterminée par spectrométrie de masse confirmant la perte de la protéine. Comme cette protéine était également exprimée sous forme insoluble, elle a été purifiée en conditions dénaturantes. Les vérifications de la protéine sur gel et par PMF ont montré une pureté de la protéine supérieure à 90 % et un pourcentage de recouvrement de 69,1 % confirmant l'acquisition de CBPV 5.

Entre les ORF 1 et 3, au niveau du codon AUG de l'ORF 3, il est supposé un phénomène de frameshift. Néanmoins, la séquence correspondant à CBPV 5 se situait en aval du codon AUG de l'ORF 3. Dans le but d'acquérir un outil permettant de caractériser ce mécanisme de frameshift, CBPV 4 dont la séquence se situait en amont du frameshift (Figure 24) a été exprimée sous sa forme insoluble car la purification de la forme soluble a été infructueuse. La purification sous conditions dénaturantes a permis d'obtenir la protéine à la taille prédite de 32,8 kDa augmentée de 4 kDa (tag 6His).

2. ORF 2

Seule CBPV 6 correspondant à la protéine entière codée par l'ORF 2 (Figure 23) a présenté une expression en système bactérien. La protéine détectée dans la fraction soluble (plasmide pDEST17) a été estimée à 73 kDa alors que la masse attendue était de 31 kDa et que dans le cas d'une expression avec le vecteur pDEST17, la protéine est augmentée de 4 kDa. CBPV 6 a donc été exprimée à partir du vecteur pETA20G et la purification a été effectuée en conditions dénaturantes. La protéine a été visualisée sur gel et a révélé une masse moléculaire d'environ 45 kDa (31 kDa + 14 kDa) ce qui correspondait à la masse attendue car dans le cas d'une expression avec le vecteur pETA20G, la protéine est augmentée de 14 kDa correspondant à l'ajout du tag de type TRX + 6His.

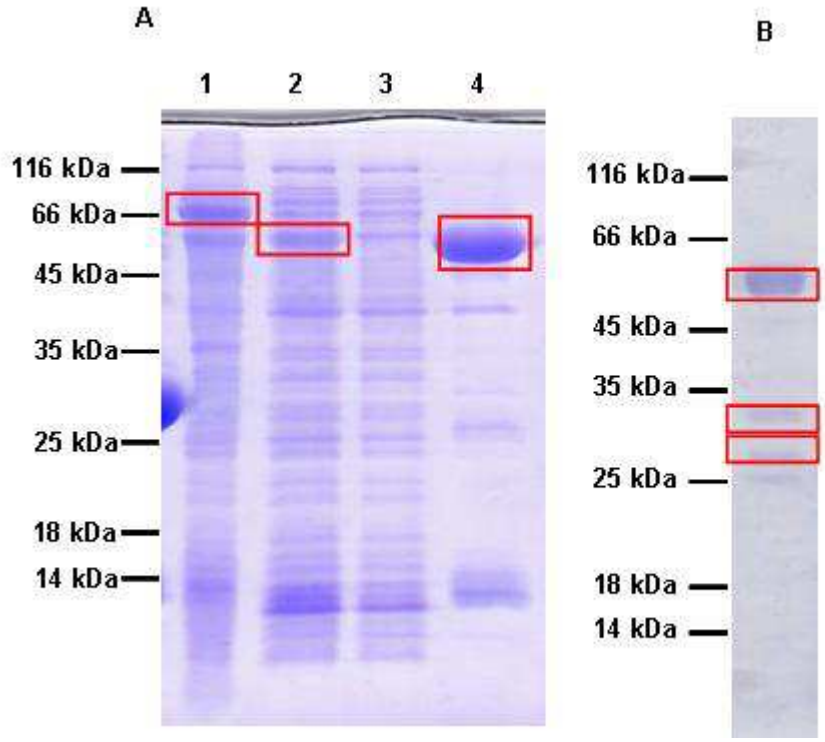


Figure 25 : Gel SDS-Page montrant différentes étapes de purification de CBPV 9

Le gel est coloré au bleu de Coomassie, (A) Purification de CBPV 9 jusqu'à la 1ère IMAC, puits 1 : Lysat bactérien avec CBPV 9T, puits 2 : Fraction soluble utilisée pour la 1ère IMAC révélant CBPV 9 + TRX+6His, puits 3 : « Flow through », fraction de déchets après la 1ère IMAC, puits 4 : Elution de CBPV 9 + TRX après la 1ère IMAC ; (B) Estimation de la pureté de CBPV 9 après purification totale. Les cadres rouges indiquent les protéines excisées pour l'analyse PMF.

3. ORF 3

Comme l'analyse bioinformatique de la séquence protéique de l'ORF 3 a montré que cet ORF code l'ARN polymérase du virus (RdRp) putative, il était crucial de purifier cette protéine en conditions non-dénaturantes afin de réaliser des tests fonctionnels.

Le test d'expression analytique a montré que seule CBPV 9 était exprimée sous forme soluble. Le vecteur d'expression utilisé était le pETG20A, la masse attendue de CBPV 9 correspondant à la RdRp entière (74,1 kDa) (Figure 25) était de 88 kDa (74 kDa + 14 kDa (TRX+6His)), cependant, la protéine soluble obtenue a été retrouvée à une masse plus basse correspondant à environ 70 kDa (tag compris). De plus, l'analyse du lysat bactérien a révélé une protéine d'environ 88 kDa suggérant aussi une expression de la protéine sous sa forme insoluble.

Bien que la protéine soluble obtenue ne se soit pas à la masse attendue, elle a été purifiée en conditions non dénaturantes. Suite à la première chromatographie d'affinité (IMAC), les protéines à 70 kDa dans la fraction soluble (CBPV 9+TRX+6His) (Figure 25A, puits 2 et 4) et à 88 kDa dans le lysat bactérien (CBPV 9T) (Figure 25A, puits 1) ont été excisées du gel et analysées par PMF. Cette analyse a permis de montrer que les deux protéines correspondaient effectivement à la RdRp avec 50,2 % de recouvrement de séquence pour CBPV 9T et 39,1 % de recouvrement pour CBPV 9+TRX+6His.

Après la deuxième IMAC, la masse totale de la protéine a été mesurée par spectrométrie de masse. Le spectre a révélé que 4 protéines étaient présentes au sein de cet échantillon, le pic à 57 kDa a semblé être la masse la plus vraisemblable au vu de la position de la protéine sur le gel. Après la SEC, la pureté de CBPV 9 a été évaluée sur gel. L'analyse a révélé 3 protéines, une première de 57 kDa (CBPV 9-57), une seconde d'environ 35 kDa (CBPV 9-35) et une troisième d'environ 30 kDa (CBPV 9-30) (Figure 25B).

Ces 3 protéines ont également été analysées par PMF. CBPV 9-57, renommée RdRp57, a présenté un pourcentage de recouvrement de 33,1 % confirmant que la protéine correspondait à la RdRp. Les 2 autres protéines ont montré un pourcentage de recouvrement inférieur à 30 %.

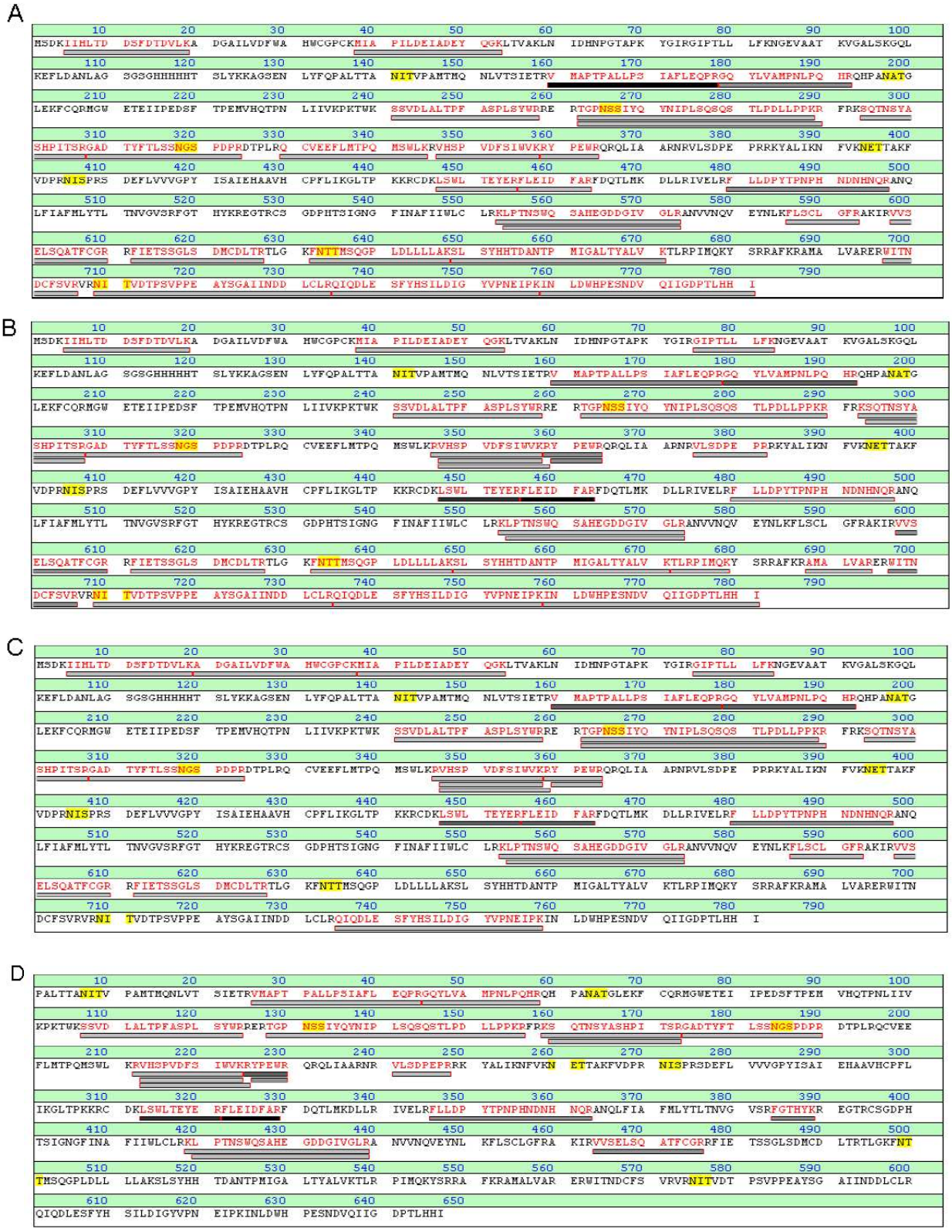


Figure 26 : Distribution des peptides identifiés par PMF sur la séquence correspondante à la protéine CBPV 9

(A) CBPV 9T ; (B) CBPV 9T purifié en conditions dénaturantes ; (C) CBPV 9+TRX+6His ; (D) RdRp57. Les séquences des figures A, B et C comportent 781 acides aminés car le tag est présent contrairement à la séquence de la figure D. Cette séquence comporte donc 647 acides aminés. Sur la séquence protéique, les peptides sont représentés en fonction de leur longueur par des barres grisées indiquant leur positionnement ainsi que par leur séquence en acides aminés (rouge).

L'analyse plus approfondie des données de spectrométrie de masse a montré qu'en les comparant, la répartition des peptides trouvés dans CBPV 9T (Figure 26A), CBPV 9+TRX+6His (Figure 26C) et RdRp57 (Figure 26D) n'étaient pas exactement la même. En effet, un faible nombre de peptides était présent dans la région C-terminal de la séquence de CBPV 9+ TRX+6His et de RdRp57 comparé au grand nombre de peptides présent dans la même région de CBPV 9T (Figure 26A). Cette protéine a donc été purifiée en conditions dénaturantes à partir des corps d'inclusion afin d'obtenir la forme entière de la protéine. L'analyse par PMF de CBPV 9 purifié (Figure 26B) a appuyé l'hypothèse que CBPV 9T semblait bien être la protéine entière car la répartition des peptides était semblable à la précédente (Figure 26A), des peptides sont retrouvés tout au long de la séquence et dans la région C-terminale. Ces données ont suggéré que CBPV 9+TRX+6His et RdRp57 sont des produits de protéolyse de CBPV 9T, rendant la protéine soluble et par conséquent que la RdRp subirait un clivage donnant une ou des protéines tronquées. Pour ce qui concerne les protéines de bas poids moléculaires, CBPV 9-35 et CBPV 9-30, leurs pourcentages de recouvrement n'étaient pas suffisamment significatifs pour confirmer leur appartenance à la RdRp. Cependant, ces protéines pourraient être des produits de clivage de la RdRp expliquant pourquoi le pourcentage de recouvrement à partir de la séquence entière de la RdRp n'était pas significatif.

Comme la RdRp57 a été purifiée sous forme soluble, des premiers tests fonctionnels ont pu être effectués. Cependant, bien que cette protéine tronquée semble posséder le motif specifique du site catalytique, GDD, l'activité polymérase n'a pas été démontrée.

B. Expression des protéines putatives de l'ARN 2

1. ORF 1

CBPV 13 et 14 correspondaient respectivement à la protéine entière et à la même protéine sans la région C-terminale (Figure 27). Ces 2 protéines on été exprimées sous leur forme soluble. Suite à la purification en conditions non-dénaturantes, l'analyse de masse totale a montré que la masse des protéines exprimées correspondaient aux masses attendues, 12,1 kDa pour CBPV 13 et 11,2 kDa pour CBPV 14.

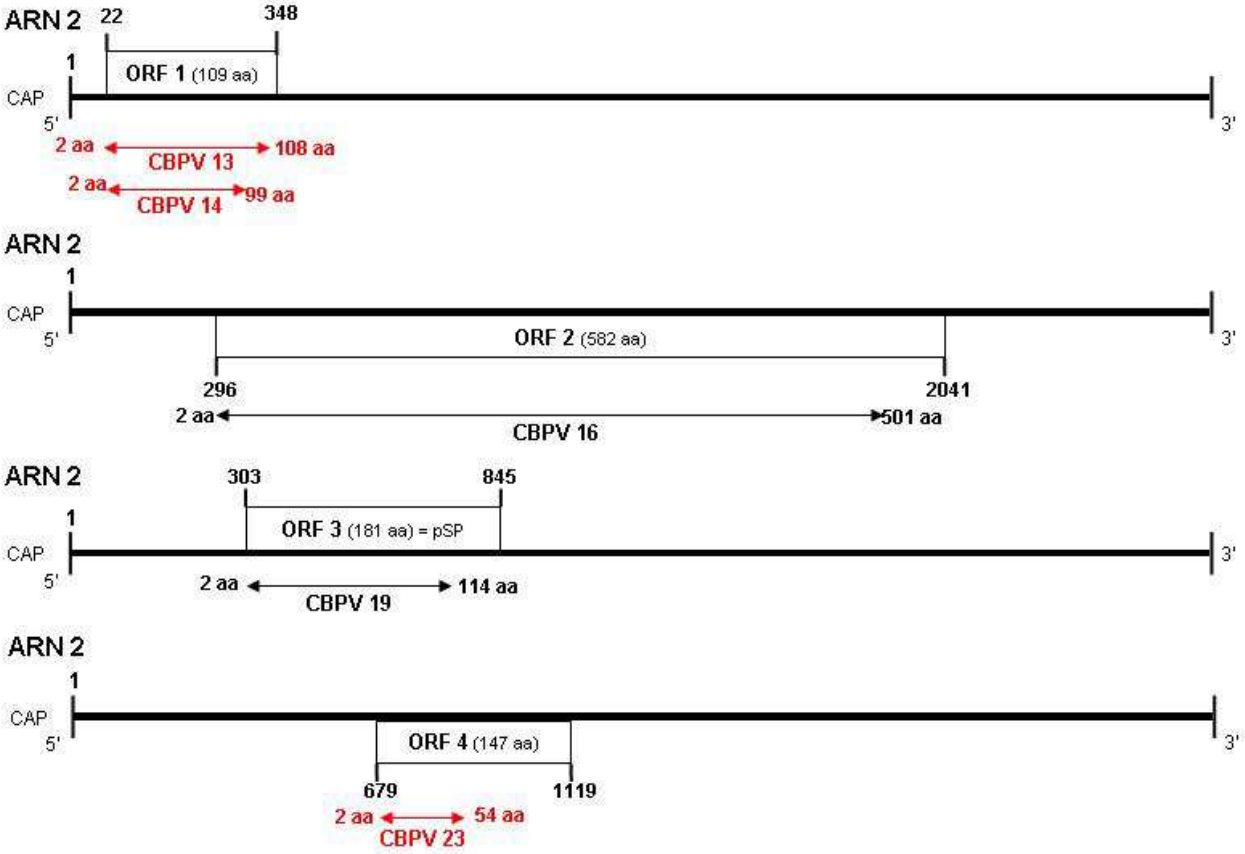


Figure 27 : Localisation sur l'ARN 2 des séquences protéiques correspondant aux protéines exprimées

Les séquences protéiques en rouge correspondent aux protéines exprimées et purifiées.

De plus, l'analyse par PMF a révélé un pourcentage de recouvrement de 82,2 % pour CBPV 13 et de 75,5 % pour CBPV 14. Ces données ont confirmé que les protéines purifiées étaient bien les protéines attendues.

Bien que la cristallographie n'était pas le but principal de cette étude, le rendement obtenue suite aux purifications a permis d'essayer de cristallographier CBPV 13 et CBPV 14. Des cristaux ont commencé à se former très rapidement, cependant au bout de 5 jours ceux-ci se sont progressivement désagrégés et ont fini par disparaitre totalement.

2. ORF 2 et ORF 3

Bien que CBPV 16 pour l'ORF 2 et CBPV 19 pour l'ORF 3 aient présenté une expression, il a été impossible de les purifier que ce soit sous conditions non-dénaturantes ou dénaturantes.

3. ORF 4

Parmi les constructions réalisées pour l'ORF 4, seule CBPV 23 a présenté une expression qui était sous forme soluble. Cette protéine correspondait à la région N-terminale de la protéine putative (Figure 27), sa masse moléculaire était prédite à 5,3 kDa. Elle a été purifiée en conditions non-dénaturantes. Néanmoins, après le clivage du tag et la deuxième IMAC, la protéine a été perdue, certainement en raison de la faible masse moléculaire de CBPV 23. Afin de remédier à ce problème, la protéine a été exprimée à partir du vecteur pETA20G et purifiée en conditions dénaturantes. Ainsi, le tag TRX+6His n'a pas été clivé et la protéine obtenue était à une masse moléculaire de 19,3 kDa.

C. Discussion

Sur les 22 séquences clonées dans les 2 vecteurs d'expression, 7 protéines recombinantes dont une sous sa forme soluble et insoluble ont donc pu être produites et purifiées. Bien qu'il n'ait pas été possible de produire des protéines pour chacun des 7 ORF putatifs, elles représentent de nouveaux matériels et outils maintenant disponibles pour poursuivre la caractérisation des protéines du CBPV.

Par ailleurs, l'expression des protéines recombinantes a permis d'émettre une nouvelle hypothèse concernant la RdRp. En effet, lors de la production de CBPV 9, celle-ci a présenté une masse moléculaire inférieure à la masse attendue de la RdRp (74,1 kDa). Pourtant, la séquence de la protéine produite, RdRp57, correspond à une longue partie de la RdRp du CBPV suggérant ainsi un clivage putatif de cette protéine. En étudiant la composition en acides aminés de la séquence de la RdRp, un site putatif du clivage a pu être déterminé. Les résidus 206 et 207 correspondant respectivement à une glutamine et une glycine (Q/G), pourraient être le site de protéolyse par une protéase. Chez de nombreux virus, les sites de type Q/G, Q/S (Glutamine/Sérine) ou Q/E (Glutamine/Acide glutamique) ont été identifiés comme sites spécifiques pour le clivage de polyprotéines virales par la protéase du virus (Wellink et al., 1986 ; Dougherty et al. 1986 ; Wang et al., 1999). Le clivage de la liaison entre ces 2 acides aminés provoquerait la perte de l'extrémité C-terminale de la protéine. Par ailleurs, la masse moléculaire théorique de la protéine protéolysée a été estimée à 57 kDa appuyant l'hypothèse du site clivage.

Dans l'optique de la caractérisation de la RdRp, la protéine recombinante produite pour la RdRp, nommée RdRp57, a servi à la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la RdRp du CBPV. Ces anticorps ont été utilisés dans le cadre de la caractérisation de la RdRp à partir de divers échantillon et ces études sont décrites dans le chapitre suivant traitant de l'identification des protéines du CBPV.

Chapitre 4 : Identification de protéines virales

Parmi les objectifs de l'étude, il était primordial de compléter l'identification des protéines, et principalement sur la polymérase virale RdRp et la protéine putative de capside pSP. Par conséquent, l'étude antigénique a été ciblée sur ces deux protéines. Comme la pSP recombinante n'a pu être obtenue, la production d'anticorps a été réalisée à partir de peptides de synthèse. Quant à la RdRp, la protéine recombinante CBPV9-57 soluble, nommée RdRp57, a été utilisée pour obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre la RdRp.

Ainsi, ce chapitre 4 expose les résultats d'identification de protéines du CBPV à partir de 2 principaux échantillons, la purification virale et les clarifiats d'abeilles infectées. Ces identifications ont été effectuées en combinant ou non différentes techniques, l'immunodétection en utilisant les anticorps produits et la spectrométrie de masse. Dans un premier temps, il est présenté sous forme d'article (soumis) les résultats obtenus d'identification de protéines structurales lors de l'analyse de la purification virale. J'ai réalisé cette étude avec l'aide du Docteur Anne-Sophie Dabert-Gay au sein de la plate-forme d'analyse de protéine de « Institut de Phamacologie Moléculaire et Cellulaire » à Valbonne. Cet article est complété par les hypothèses émises suite à ces identifications. Dans un second temps, il est rapporté les détections de protéines réalisées lors des analyses de clarifiats d'abeilles infectées expérimentalement ou naturellement.

I. Identification de protéines à partir de la purification virale

A. Protéines structurales

Article 2 : Caractérisation par spectrométrie de masse de deux protéines structurales du virus de la paralysie chronique de l'abeille

Soumis le 6 avril 2012 à « *Journal of General Virology* »

Chevin, A., Dabert-Gay, A. S., Blanchard, P., Ribière, M., Coutard, B., Thiéry, R.

Dans cet article, une analyse protéomique du CBPV a été réalisée à partir d'une purification virale. L'approche protéomique par l'utilisation de la nanoHPLC couplée à un MALDI-TOF/TOF, et les techniques d'immunodétection ont été combinées afin d'identifier les protéines virales.

Title

Characterisation of two structural proteins from the chronic bee paralysis virus using mass spectrometry

Running title

Proteins identified from chronic bee paralysis virus

Contents category

Insect viruses - RNA

Authors and affiliations

Aurore Chevin[a], Anne-Sophie Dabert-Gay[b], Philippe Blanchard[a,*], Magali Ribière[a], Bruno Coutard[c], Richard Thiéry[a]

[a] ANSES, Sophia-Antipolis Laboratory, Bee Diseases Unit, BP 111, 06902 Sophia Antipolis, France.

[b] Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, IPMC, UMR6097 CNRS, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France

[c] Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 6098 CNRS, Aix Marseille I et II, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille, France

*Corresponding author

Mailing address: Philippe Blanchard, ANSES Sophia-Antipolis Laboratory, Bee Diseases Unit, BP 111, Les Templiers, 06902 Sophia Antipolis; France

Telephone: +33 (0) 492.948.769

Fax: +33 (0) 492.943.701

e-mail: philippe.blanchard@anses.fr

Word and figure counts

Summary: 250

Main text: 4,834

Figures: 6

Tables: 2

Summary

Chronic bee paralysis virus (CBPV) is the etiological agent that causes an infectious and contagious disease in adult bees, called chronic paralysis. CBPV is a positive single-stranded fragmented RNA virus which contains two major viral RNA fragments characterised. RNA 1 (3674 nt) and RNA 2 (2305 nt) encode three and four putative open reading frames (ORFs), respectively. Only the amino acid sequence of ORF 3 on RNA 1 shares similarities with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of families *Nodaviridae* and *Tombusviridae*. CBPV therefore seems to occupy an intermediate position between these two virus families. It has been suggested that RNA 1 encodes non-structural proteins, with ORFs 1 and 3, and RNA 2 encodes structural proteins, with the ORFs 2 and 3, ORF 3 encoding a capsid protein, called predicted structural protein (pSP). CBPV proteins need to be characterised to determine the phylogenetic position of CBPV. In this study, we performed a proteomic analysis of CBPV from purified CBPV particles. The proteins were separated on a 1D electrophoresis gel under denaturing conditions and the contiguous bands containing proteins were excised. The digested peptide mixtures were resolved using nano-HPLC and analysed using mass spectrometry. Comparison of the resulting peptide sequence data against a protein sequence database identified two CBPV structural proteins: hypothetical structural protein (hSP) and pSP encoded by ORF 2 and 3 on RNA 2, respectively. This proteomic approach, together with immunodetection techniques, suggests the presence of pSP and hSP, which are probably involved in the formation of the viral capsid.

Keywords: Chronic bee paralysis virus (CBPV), nano-HPLC, MALDI-TOF/TOF, protein identification, predicted structural protein, hypothetical structural protein, antibodies

Introduction

Chronic paralysis is an infectious and contagious disease in adult honeybees (*Apis mellifera* L.). It is known to induce a cluster of symptoms, such as trembling and flightless bees crawling at the hive entrance (Ball & Bailey, 1997). The viral agent that causes this disease is the chronic bee paralysis virus (CBPV). CBPV shows neurotropism in concomitance with observed symptoms (Olivier et *al.*, 2008a). The viral particle is anisometric and non-enveloped, its size being about 30-60 nm in length and 20 nm in width (Bailey *et al.*, 1968). CBPV is a positive single-stranded fragmented RNAs virus; its genome is composed of two major RNA fragments that have been completely sequenced, RNA 1 (3674 nt) and RNA 2 (2305 nt) (Olivier *et al.*, 2008b). Bioinformatics analysis of RNA sequences has shown that there are seven putative overlapping open reading frames (ORFs), three on RNA 1 and four on RNA 2 (Figure 1). Comparing amino acid sequences deduced from each ORF with protein sequence databases, only ORF 3 on RNA 1 shares significant similarities with the RNA-dependent RNA polymerases (RdRp) of positive single-stranded RNA viruses. Indeed, RdRp of CBPV possesses the eight conserved domains (I-VIII), and the specific catalytic subunit containing the GDD motif. Based on the eight conserved domains of RdRp, a phylogenetic study shows that CBPV seems to occupy an intermediate position between families *Nodaviridae* and *Tombusviridae* (Olivier *et al.*, 2008b). CBPV shares some features with these virus families (Ribiere *et al.*, 2010), suggesting that the ORFs on RNA 1 encode non-structural proteins and ORFs on RNA 2 encode structural proteins. Furthermore, the amino acid sequence of ORF 2 and 3 on RNA 2 yield two proteins with predicted molecular masses of about 65.5 kDa and 19.7 kDa, respectively. These molecular masses may correspond to previously immunodetected proteins, estimated at 75 kDa and 20 kDa (Ribiere *et al.*, 2000). The molecular mass of the 20 kDa protein is similar to the single capsid protein of about 23.5 kDa proposed by Bailey (1976). Therefore, ORF 3 on RNA 2 may encode a capsid protein, called predicted structural protein (pSP) (Blanchard *et al.*, 2009). Despite the current knowledge on CBPV, this virus cannot yet be assigned to any viral family. However, two novel honeybee viruses have recently been identified, Lake Sinai virus 1 and 2 (LSV 1 and LSV 2). Their genomes have similarities with CBPV RNA 1 and the ORFs encoding RdRp show 25% amino acid identity with CBPV. Amino acid phylogeny of RdRp of families *Nodaviridae* and *Tombusviridae* places LSV 1 and 2 on the same branch as CBPV (Runckel *et al*., 2011).

Conventionally, protein characterisation from virus particles requires pure virus preparation, protein denaturation, electrophoretic separation and identification of proteins by western blot or by amino terminal Edman sequencing. Since mass spectrometry (MS) has emerged, a combination of techniques has been developed, thereby providing new tools for structural investigations on viruses. One-dimensional (1D) electrophoresis and liquid chromatography (LC) coupled to tandem MS (MS/MS) analysis has proved useful for the exploration of virus proteomes such as the murine cytomegalovirus (Kattenhorn *et al.*, 2004), *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (Renesto *et al.*, 2006) or *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (Wang *et al.*, 2010). Contrary to proteomic research on DNA viruses, proteomic studies have been performed on a limited spectrum of RNA viruses probably because the number of proteins in RNA viruses is smaller and proteomic approaches are generally not necessary. However, two RNA viruses have been intensively analysed: *Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus* (SARS-CoV) (Zeng *et al.*, 2004) and *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) (Chertova *et al.*, 2006). Using SDS-Page followed by Electrospray ionisation (ESI) MS/MS, structural proteins of SARS-CoV have been identified as components of the nucleocapsid and envelope. The LC coupled to MS/MS analysis of HIV-1 even identified cellular proteins associated with viral proteins, providing other ways to study HIV-1 assembly, infection and pathogenesis.

Although seven ORFs have been predicted from the analysis of the CBPV genome, little is known about the biological significance of these ORFs. CBPV proteins need to be characterised to gain insight into viral structure and, consequently, better classify this virus. Here, we describe the first proteomic analysis of CBPV. We examined a CBPV preparation from honeybee heads that was purified on a sucrose gradient, followed by SDS-Page separation and nano-HPLC coupled to a matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight/time of flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometer. Our analysis revealed two CBPV proteins that are likely to be structural proteins. These new results provide important information on CBPV and they will help to better understand capsid assembly.

Results

Purification of CBPV and profile of viral proteins

After sucrose gradient centrifugation, the purified viral particles were checked by electron microscopy and the negatively stained, purified CBPV sample showed mostly anisometric and ellipsoidal particles (Figure 2), as in previous observation (Olivier *et al.*, 2008b). Moreover, the micrograph confirmed that

the virions were morphologically intact and displayed the same small protuberance at one end as described by Bailey et al. (1968). Nevertheless, purified CBPV particles seem to be associated with microfilaments.

Western blot analysis of virions

The purified CBPV particles were used for western blotting with various antiserums. The detection profile with anti-RdRp antibodies is shown in Figure 3A. Although these antibodies recognise the recombinant protein corresponding to the fragment of RdRp (lane 2) used for rabbit immunisation, RdRp was not detected in the purified CBPV sample (lane 1). Figure 3B shows a western blot using anti-CBPV antibodies which revealed the presence of four polypeptides in the CBPV preparation with molecular masses of approximately 60 kDa, 43 kDa, 29 kDa and 18 kDa. These antibodies could detect CBPV proteins, but also honeybee proteins. Among the putative CBPV proteins, pSP has previously been considered to be a capsid protein. When using anti-pSP antibodies, we detected four proteins at 63 kDa, 44 kDa, 29 kDa and 18 kDa (Figure 3C). The two immunodetection profiles of purified CBPV particles were similar, three of these bands corresponded to three proteins (50 kDa, 30 kDa and 20 kDa) recognised with anti-CBPV antibodies provided by Dr Ball (Ribière *et al.*, 2000). The predicted molecular mass of pSP is 19.7 kDa corresponding to the immunodetected bands at 18 kDa. Surprisingly, the immunodetection profiles with anti-CBPV or anti-pSP antibodies were unexpected because three high molecular mass proteins were observed in addition to the expected high molecular mass protein. These results suggested that pSP may keep an oligomerisation state, even in denaturing conditions.

Immunoblots with or without β-mercaptoethanol

To determine whether pSP is bound by disulfide bonds and forms multimers, SDS-Page and western blotting were performed with or without β-mercaptoethanol. Figure 4A shows that the immunodetection profile with anti-pSP antibodies was similar in the presence or the absence of β-mercaptoethanol, suggesting that disulfide bonds are not involved in the oligomerisation of pSP. Besides, immunoblots with anti-CBPV antibodies were slightly different without β-mercaptoethanol, two additional bands being revealed at 17 and 37 kDa (Figure 4A, arrowheads). Furthermore, this difference was also observed in the same conditions on a Coomassie blue-stained gel (Figure 4C, arrowheads). The bands corresponding to the immunodetected proteins were excised and analysed using peptide mass fingerprinting (PMF) (data not shown). However, the results did not help to identify any CBPV proteins.

Identification of CBPV proteins by mass spectrometry

Although the immunodetection profiles revealed at least the presence of pSP, MS/MS analysis were also performed on a purified CBPV samples to confirm its presence and assess the presence of possible other CBPV structural proteins. The proteins contained in the purified CBPV particles were separated by 12% SDS-Page. After Coomassie blue staining, many proteins were revealed, ranging from less than 10 kDa to 250 kDa (Figure 5), with two major bands observed close to 45 kDa and 30 kDa. To analyse the proteins that were in the gel, the lane was sectioned into 16 contiguous regions (L1 to L16), as illustrated in Figure 5. Each band individually underwent in-gel trypsin digestion and the peptides generated were then extracted from gel slices and identified after mass spectrometry analysis. Trypsinised fragments were separated using nano-HPLC and characterised using a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer. To identify proteins, the peptide sequences were compared to the NCBInr database of coding sequences of the *Apis mellifera* genome using Paragon Algorithm™. Analysis of all fractions showed that two CBPV proteins were found: hypothetical protein CBPV_s2gp2 (GI: 188572676), called hSP (hypothetical structural protein), and pSP (predicted structural protein) (GI: 188572677) corresponding to the translated ORF 2 and 3 on RNA 2, respectively. These proteins were identified with at least one peptide at a confidence level greater than 95%. However, since many proteins were revealed on the gel, it is not surprising that the majority of proteins identified were honeybee proteins (data not shown). Table 1 gives the CBPV proteins that were identified along with the number of identified peptides belonging to these proteins. During the nano-HPLC, fractions L1 to L8 had low signal intensities; therefore, identification was performed on all fractions and not on each fraction individually. In L1 to L8, only pSP was detected, but the identified peptides had a confidence level lower than 95% which is insufficient to confirm its presence. pSP was then identified in L9 to L12 with a single peptide as in fractions L13 to L15 for hSP. Nevertheless, the identification of a protein using MS/MS analysis is confirmed when at least two peptides of a protein are recognised. Therefore, we cannot affirm the presence of pSP in L9 to L12 and hSP in L13 to L15. In contrast, hSP was characterised in L9 to L12 with three identified peptides. Thus, this global identification proved that hSP is present in high molecular mass fractions, namely between about 32 and 68 kDa. Moreover, hSP was detected in fraction L12 (50 to 68 kDa), corresponding to a mass close to its expected mass (65.5 kDa).

Analysis of three immunodetected proteins

In order to improve peptide detection of pSP, the MS/MS analysis was performed by focusing on bands detected from western blotting. The purified CBPV sample was separated on a gel that offered optimal resolution for low molecular mass proteins. After Coomassie blue staining, as shown in Figure 3D, three bands corresponding to immunodetected proteins around 18, 29 and 44 kDa (M1, M2 and M3) were excised and underwent trypsin digestion and extracted as described above. Surprisingly, the MS/MS analysis revealed that M1 (18 kDa) and M3 (44 kDa) contained both pSP and hSP, whereas only pSP peptides were detected in M2 (29 kDa). Table 2 gives the number of peptides found for each protein in the three fractions. For hSP, we detected only two peptides in M1, whereas in M3, we identified seven peptides. However, no peptides were found from the N and C-terminal regions of the protein. For pSP, one and three peptides were found in M1 and M3, respectively, and in M2, pSP was identified with four peptides. These results are in agreement with immunodetection of pSP, demonstrating proteomic identification confirms that anti-pSP antibodies recognize pSP, and anti-CBPV antibodies recognised hSP as well as pSP.

Analysis of the amino acid sequences of pSP and hSP

The grand average hydropathicity (GRAVY) value score of proteins provide an image of the hydrophobicity of the whole protein. A positive score indicates a hydrophobic protein and a negative score indicates a hydrophilic protein. The GRAVY of pSP is 0.300 according to ProtParam. Furthermore, of its 181 residues, this protein possesses 102 aliphatic residues. The hydrophobicity plot determined two hydrophobic regions, one internal (residues 43 to 58) and one large one at the C-terminus (residues 112 to 180) (Figure 6A). In the N-terminal region, encompassing residues 3 to 40, there are 14 arginines that confer a high density of positive charges. The region from residue 4 to residue 17 contains five arginine residues and is organised in a predicted α-helical secondary structure. Contrary to pSP, the GRAVY of hSP is -0.189 suggesting an overall hydrophilic protein. Despite this negative score, the hydrophobicity plot predicted two hydrophobic regions. Like pSP, hSP contains one predicted hydrophobic region (residues 200 to 222) and another one at the C-terminus (residues 504 to 560) (Figure 6B). In addition, the secondary structure predictions indicated that these hydrophobic regions have an α-helical organisation.

Discussion

In this study, we identified two viral proteins in CBPV particles purified from honeybee heads using mass spectrometry analysis and immunoblot techniques. This is the first identification of CBPV

proteins. Our proteomic data confirm the presence of some proteins deduced from predicted ORFs revealed in a previous study (Olivier *et al.*, 2008b), which determined seven putative overlapping ORFs. Among these ORFs, ORF 3 on RNA 1 encodes viral RdRp, since the amino acid sequence shares similarities with the conserved sequence domains of the RdRp of virus families *Nodaviridae* and *Tombusviridae*. However, we did not detect peptides belonging to RdRp in CBPV nor did we detect other putative non-structural proteins encoded by ORF 1 and 2 on RNA 1. As these proteins were not identified using MS/MS analysis, it seems that non-structural proteins are not encapsidated. In contrast to negative-stranded RNA viruses, it is currently accepted that in positive-stranded RNA viruses, the RdRp proteins are not incorporated into viral particles. This hypothesis has been confirmed for CBPV using polyclonal anti-RdRp antibodies. This protein was not immunodetected in the purified CBPV particles, although these antibodies detected the recombinant protein used for rabbit immunisation.

In contrast, some presumed structural proteins and encoded by the ORFs on RNA 2 were identified from the purified CBPV sample. The proteomic approach revealed two viral proteins: hypothetical protein CBPV_s2gp2 (hypothetical structural protein, hSP) and pSP (predicted structural protein), encoded by ORF 2 and 3 of RNA 2, respectively. It is noteworthy that very few identified peptides have been found for pSP and hSP, leading to low percentages of sequence coverage, 28 and 16% respectively (Figure 6). This low rate may be due to various properties of these proteins. For example, pSP and hSP sequences revealed two hydrophobic regions, and all identified peptides were outside of these hydrophobic regions. Also, pSP contains an arginine cluster leading to tryptic peptides that are too small to be analysed.

Since non-structural proteins were not observed, the two detected proteins may contribute to the formation of the CBPV capsid. pSP is a protein containing 181 amino acids, with a calculated molecular mass of 19.7 kDa, and was detected at an apparent mass of around 18 kDa by immunoblot. Western blottings and mass spectrometry experiments demonstrated the presence of a protein of around 18 kDa, corresponding to the predicted molecular mass of pSP (19.7 kDa). However, using anti-pSP antibodies, the immunoblot revealed three additional pSP states. One protein was detected at an apparent mass of 28 kDa, which is about 10 kDa larger than the predicted mass. The discrepancy between the apparent and predicted molecular masses of pSP may be due to the fact that this protein may be post-translationally modified, raising its apparent molecular mass by about 10

kDa. Post-translational modifications of viral capsid proteins, such as phosphorylation and glycosylation, have been reported for other non-enveloped viruses (Fang *et al.*, 1999; Geigenmuller *et al.*, 2002; Soldevila *et al.*, 1998). Two other proteins were revealed at 44 and 63 kDa, suggesting that pSP may be a dimer and a trimer, or associated with another protein. However, the immunodetection profile was the same, with or without β-mercaptoethanol, indicating no inter-chain binding by disulfide bonds. Therefore, pSP may be associated with itself or with another protein with high affinity. Moreover, many honeybee proteins were identified in the mass spectrometry analysis on the purified CBPV sample. The most frequently identified proteins could be divided into categories by their function: cytoskeleton, adhesion, signalling and intracellular trafficking (data not shown), suggesting that the purification on a sucrose gradient is not sufficient to recover only CBPV particles. In addition, transmission electron microscopy showed the presence of microfilaments associated with viral particles, which appear to be actin microfilaments that were overrepresented in the mass spectrometry results (data not shown). Thus, the method of CBPV purification used here cannot determine the interaction between host proteins and viral proteins. However, many studies using highly purified viruses have shown that viral proteins can associate with cytoskeleton proteins for viral penetration, movement and replication into cells (Bechtel *et al.*, 2005; Chertova *et al.*, 2006).

According to the composition of pSP (see above), the N-terminal region (residues 4 to 17) contains a high number of arginine residues and the peptide has a predicted α-helical secondary structure. Short regions containing basic amino acids (approximately 8-20 residues) are commonly used to bind RNA and can even recognise a specific RNA structure (Tan & Frankel, 1995). Arginine- and lysine-rich motifs (ARM and LRM) have been found in capsid proteins of some viruses; they have been described in insect viruses such as members of the genus *Alphanodavirus*, but also in plant viruses, such as members of the genera *Bromovirus*, *Dianthovirus* and *Tombusvirus*. For these genera of viruses, experiments on ARM deletions (Rao *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2000) and substitutions of arginine or lysine residues (Venter *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012) have demonstrated that this N-terminal region has a multifunctional nature. Indeed, ARM and LRM play a crucial role for RNA packaging and subsequent stable virion formation. In addition, this motif in *Bromovirus* and *Dianthovirus* is involved in infection and the cell-to-cell movement. Together with the proteomic results, the presence of positively charged sequences at the N-terminus of pSP reinforces the hypothesis that pSP is a structural protein of CBPV involved in the viral capsid.

The other protein that seems to contribute to the viral capsid is hSP, which is composed of 582 amino acids with a theoretical molecular mass of 65.5 kDa. According to the global identification of purified CBPV particles, hSP was detected in fractions of between 32 and 68 kDa, and the single peptide found in the other fractions can be considered as a trace of this protein. Furthermore, hSP was identified by MS/MS analysis between 50 and 68 kDa; it therefore seems to be present at its expected molecular mass. Surprisingly, hSP was also found at unexpected molecular masses. During the identification of proteins immunodecteted, hSP was located at about 18 kDa and 44 kDa, reflecting a lower molecular mass than the full-length protein. This difference may be due to cleavage of hSP; hSP may be an immature protein capsid precursor which is further cleaved to yield two or several capsid proteins. This type of processing has been reported in the genera *Aphtovirus* (Curry *et al.*, 1997), *Enterovirus* (Basavappa *et al.*, 1994) and *Alphanodavirus* (Gallagher & Rueckert, 1988). Cleavage may stabilise the virion and therefore reinforce the interaction between components of the capsid; it may even be crucial for infection. The release of a fragment of the hSP protein may prime cell entry of the virus. Although anti-CBPV antibodies can recognise hSP, we could not demonstrate the cleavage of hSP with these antibodies. Moreover, as mentioned above, the identified peptides were outside the hydrophobic regions, and none were from the N- or C-terminal regions of the protein. Therefore, the data on hSP do not provide any conclusive evidence as to whether it is cleaved or not.

Although the CBPV virion is an anisometric particle, it may share features of protein conformation with icosahedral viruses. Hydrophobic regions may be useful in oligomerisation and therefore play an important role in caspid assembly (Patkar *et al.*, 2007; Xiaofang *et al.*, 2001). Furthermore, the hydrophobic C-terminal amino acids of hSP may be essential for breaching the host membrane, enabling capsid entry, as shown in some non-enveloped viruses (Banerjee & Johnson, 2008). The coat proteins of these viruses undergo proteolysis and one fragment contains a hydrophobic sequence leading to the interaction with the host membrane. When the virus is in contact with the cell, the hydrophobic region is exposed for membrane breaching. For CBPV, the interaction of pSP with RNA may be facilitated by the initiation of hSP cleavage and capsid assembly to yield a mature virion.

This study confirms that ORF 2 and 3 on RNA 2 encode two proteins, hSP and pSP, which are most likely to be structural proteins. The original objective of the proteomic study was to find some features in common with related virus families (*i.e*. *Nodaviridae* and *Tombusviridae*) which have a single capsid protein. The fact that CBPV has two structural proteins suggests that it has a novel encapsidation

mechanism, different from that described in *Nodaviridae* and *Tombusviridae*. Further studies on the various regions predicted from pSP and hSP sequences will contribute to a better understanding of the mechanisms underlying CBPV virion assembly and CBPV entry into cells. In addition, the development of an *in vivo* experimental model showing infectivity of naked CBPV RNAs (Chevin *et al.*, submitted) will help to set up a reverse genetics system to study the role of hSP and pSP in CBPV capsid assembly.

Methods

Virus purification

Emerging bees (*Apis mellifera* L.) were sampled from a colony that tested CBPV-free and were maintained at 30°C in small cages supplied with sugar candy food sources and sucrose syrup complemented with protein L. After one week, 400 adult bees were inoculated via intra-thoracic injection using 10^4 CBPV genome copies per injection. CBPV particles were purified from heads of experimentally infected bees as previously described (Olivier *et al.*, 2008b). Briefly, 400 heads were manually crushed and the homogenate underwent successive centrifugations. Then, concentrated CBPV was separated on a 10 to 40% (w/v) sucrose gradient and centrifuged for 4.5 h at 15°C (SW41 rotor). Viral fractions were collected, centrifuged and the pellet was resuspended in 0.01 M phosphate buffer (PB). A sample of purified CBPV particles was negatively stained to be examined under a transmission electron microscope (*Centre commun de microscopie appliquée, Université Nice Sophia-Antipolis* - Microscopy Facility, University of Nice).

The purified virus was quantified using real time RT-PCR (Blanchard *et al.*, 2007; Blanchard *et al.*, 2012) and the absence of RNA genomes other than honeybee viruses was checked using conventional RT-PCR. Finally, protein concentration was determined using Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951).

Western blot analysis

The proteins from the CBPV purification (25 µg) in presence or absence of β-mercaptoethanol were separated on a 12% SDS-Page gel and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) via semidry electrophoresis transfer. Membranes were blocked in 5% (w/v) nonfat dry milk in TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% (w/v) Tween 20) and all antibody incubations were done in the same buffer. Three different primary antibodies were used, the first was the anti-RdRp antibodies,

the second was the absorbed anti-CBPV antibodies as described by Ribiere *et al.* (2000) and the third was the anti-pSP antibodies. The anti-RdRp antibodies were produced from rabbits immunised with one recombinant RdRp. The anti-pSP antibodies were generated from rabbits immunised with two synthesised peptides (SRRPSRPRRSILDR, position 18-31, and AVLSSARRSEKFAY, position 103-117) (P.A.R.I.S. Antibodies, France). The three antibodies were used at the concentration of 1:200. Alkaline phosphatase-conjugated Affinipure goat anti-IgG of rabbit (Jackson ImmunoResearch) was used as secondary antibody at concentration of 1:1000. The signal was detected with an alkaline phosphatase conjugate substrate kit (Bio-Rad).

In-gel digestion for protein identification

The proteins from CBPV purification (50 µg) were separated on a 12% and "Any-kD" Mini-PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad) under denaturing conditions and stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Pierce). Protein bands or regions were manually excised from the gel and cut into pieces. The gel pieces were destained by adding 100 µl of H_2O/ACN (acetonitrile) (1/1). After 10 min incubation with vortexing, the liquid was discarded. This procedure was repeated twice. Gel pieces were then rinsed (15 min) with ACN and dried under vacuum. Gel pieces were reswelled in 50 µl of 100 mM DTT (dithiothreitol) in 100 mM NH_4HCO_3. They were incubated for 45 min at 56°C, then cooled to room temperature. The DTT solution was replaced with 100 µl of 55 mM iodoacetamide in 100 mM NH_4HCO_3. After a 1 h incubation at room temperature, the solution was discarded and gel pieces were washed by adding successively (1) 100 µl of H_2O/ACN (1/1), repeated twice and (2) 100 µl of ACN, and they were dried in a vacuum. Then gel pieces were reswelled in 50 µl of 50 mM NH_4HCO_3 buffer containing 12.5 ng/µl trypsin (modified porcine trypsin sequence grade, Promega), incubated for 1 h at 4°C. Then the solution was removed and replaced by 50 µl of 50 mM NH_4HCO_3 buffer (without trypsin) and incubated for 18 h at 37°C. After trypsin digestion, the solution was transferred to an eppendorf tube and tryptic peptides were isolated by extraction with (1) 50 µl of 1% formic acid (FA) in water (v/v) (10 min at room temperature) and (2) 50 µl ACN (10 min at room temperature). Peptide extracts were pooled, concentrated under vacuum and solubilised in 10 µl of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (v/v).

Nano-HPLC MALDI-TOF/TOF analysis (peptide separation and fractionation and mass spectrometry)

Peptide separation was carried out using a nano-HPLC offline (DIONEX, U3000) coupled with a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (4800 *plus*, Applied Biosystems).

The peptide solution was concentrated on a µ-Precolumn Cartridge Acclaim PepMap 100 C_{18} (i.d. 5 mm, 5 µm, 100 Å, DIONEX, LC Packings) at a flow rate of 20 µl/min and using solvent containing 98%/2%/0.04% H_2O/ACN/TFA (v/v). Then, peptide separation was performed on a 75 µm i.d. x 150 mm (3 µm, 100 Å) Acclaim PepMap 100 C_{18} column (DIONEX, LC Packings) at a flow rate of 200 nl/min and with detection at 214 nm. Solvent systems were: (A) 100% water, 0.05% TFA, (B) 100% ACN, 0.04% TFA. The following gradient was used t = 0 min 100% A; t = 3 min 100% A; t = 63 min, 80% B; t = 64 min, 100% B; t = 68 min 100% B (temperature was set at 30°C).

For offline nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS and MS/MS analyses, fractions were collected on a Opti-TOF LC/MALDI target (123 x 81mm, Applied Biosystems) and fractionation was done using the Probot fractionation robotor (DIONEX, LC Packings). Matrix solution (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, 2.5 mg/ml in 5 0% water, 50% ACN, 0.1% TFA solution) and nano-HPLC fractions were mixed (at a ratio of 4:1, matrix:fractions) and collected every 20 s (208 fractions were collected per run).

MALDI-TOF/TOF-MS analysis: MS spectra were recorded automatically in a mass range of 500-4000 Da resulting from 200 laser shots of constant intensity. Data were collected using a 4000 series Explorer (Applied Biosystems) allowing for an automatic selection of peptide masses for subsequent MS/MS experiments. The MS/MS spectra, each acquired using 1000 laser shots, were further processed using the 4000 series Explorer. Finally, all raw data were transferred to ProteinPilot software (Applied Biosystems, MDS Analytical Technologies) and protein identification was processed using the Paragon™ algorithm.

Computer-assisted sequence analysis

Amino acid sequences of pSP (GI: 188572677) and hSP (GI: 188572676) were used to generate the GRAVY score value with ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/) and hydrophobicity plots with the algorithm of Kyte and Doolittle (1982) using PROTSCALE (http://web.expasy.org/protscale/). Then, secondary-structure predictions were performed using PsiPred (Jones, 1999).

References

Bailey, L. (1976). Viruses attacking the honey bee. In *Advances in Virus Research volume 20*, pp. 271-304. Edited by M. A. Lauffer, F. B. Bang, K. Maramorosch & K. M. Smith. New York: Academic Press.

Bailey, L., Gibbs, A. J. & Woods, R. D. (1968). The purification and properties of chronic bee-paralysis virus. *J Gen Virol* **2**, 251-260.

Ball, B. V. & Bailey, L. (1997). Viruses. In *Honey bee pests, predators, & diseases*, Third edition edn, pp. 11-32. Edited by R. A. Morse & K. Flottum. Medina: A.I. Root Company.

Banerjee, M. & Johnson, J. E. (2008). Activation, exposure and penetration of virally encoded, membrane-active polypeptides during non-enveloped virus entry. *Curr Protein Pept Sci* **9**, 16-27.

Basavappa, R., Syed, R., Flore, O., Icenogle, J. P., Filman, D. J. & Hogle J. M. (1994). Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Prot. Sci* **3**, 1651-1669.

Bechtel, J. T., Winant, R. C. & Ganem, D. (2005). Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **79**, 4952-4964.

Blanchard, P., Regnault, J., Schurr, F., Dubois, E. & Ribiere, M. (2012). Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. *J Virol Methods* **180**, 26-31.

Blanchard, P., Ribiere, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A. L. & Faucon, J. P. (2007). Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J Virol Methods* **141**, 7-13.

Blanchard, P., Schurr, F., Olivier, V., Celle, O., Antúnez, K., Bakonyi, T., Berthoud, H., Haubruge, E., Higes, M., Kasprzak, S., Koelberger, H., Kryger, P., Thiery, R. & Ribière, M. (2009). Phylogenetic analysis of the RNA-dependant RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographical regions. *Virus Res* **144**, 334-338.

Chertova, E., Chertov, O., Coren, L. V., Roser, J. D., Trubey, C. M., Bess, J. W., Jr., Sowder, R. C., Barsov, E., Hood, B. L., Fisher, R. J., Nagashima, K., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lifson, J. D. & Ott, D. E. (2006). Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol* **80**, 9039-9052.

Choi, Y. G., Grantham, G. L. & Rao, A. L. (2000). Molecular studies on bromovirus capsid protein. *Virology* **270**, 377-385.

Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J. & Stuart, D. (1997). Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **71**, 9743-9752.

Fang, N. X., Frazer, I. H., Zhou, J. & Fernando, G. J. (1999). Post translational modifications of recombinant human papillomavirus type 6b major capsid protein. *Virus Res* **60**, 113-121.

Gallagher, T. M. & Rueckert, R. R. (1988). Assembly-dependent maturation cleavage in provirions of a small icosahedral insect ribovirus. *J Virol* **62**, 3399-3406.

Geigenmuller, U., Ginzton, N. H. & Matsui, S. M. (2002). Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J Gen Virol* **83**, 1691-1695.

Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292**, 195-202.

Kattenhorn, L. M., Mills, R., Wagner, M., Lomsadze, A., Makeev, V., Borodovsky, M., Ploegh, H. L. & Kessler, B. M. (2004). Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol* **78**, 11187-11197.

Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982).A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-132.

Lowry, O. H., Rosebrough, A.L. Farr, N. J. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.

Olivier, V., Massou, I., Celle, O., Blanchard, P., Schurr, F., Ribière, M. & Gauthier, M. (2008a). In situ hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *J. Virol. Methods* **153**, 232-237.

Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., Dubois, E., Tordo, N., Thiéry, R., Houlgatte, R. & Ribière, M. (2008b). Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Res* **132**, 59-68.

Park, S. H., Sit, T. L., Kim, K. H. & Lommel, S. A. (2012). The Red clover necrotic mosaic virus capsid protein N-terminal lysine-rich motif is a determinant of symptomatology and virion accumulation. *Mol Plant Pathol*. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00784.x

Patkar, C. G., Jones, C. T., Chang, Y. H., Warrier, R. & Kuhn, R. J. (2007). Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein. *J Virol* **81**, 6471-6481.

Rao, A. L. & Grantham, G. L. (1996). Molecular studies on bromovirus capsid protein. II. Functional analysis of the amino-terminal arginine-rich motif and its role in encapsidation, movement, and pathology. *Virology* **226**, 294-305.

Renesto, P., Abergel, C., Decloquement, P., Moinier, D., Azza, S., Ogata, H., Fourquet, P., Gorvel, J. P. & Claverie, J. M. (2006). Mimivirus giant particles incorporate a large fraction of anonymous and unique gene products. *J Virol* **80**, 11678-11685.

Ribiere, M., Faucon, J. P. & Pépin, M. (2000). Detection of chronic bee paralysis virus infection: application to a field survey. *Apidologie* **31**, 567-577.

Ribiere, M., Olivier, V. & Blanchard, P. (2010). Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S120-S131.

Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R. & DeRisi, J. L. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS One* **6**, e20656.

Soldevila, A. I., Huang, S. & Ghabrial1 SA (1998). Assembly of the Hv190S totivirus capsid is independent of posttranslational modification of the capsid protein. *Virology* **251**, 327-333.

Tan, R. & Frankel, A. D. (1995). Structural variety of arginine-rich RNA-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5282-5286.

Venter, P. A., Marshall, D. & Schneemann, A. (2009). Dual roles for an arginine-rich motif in specific genome recognition and localization of viral coat protein to RNA replication sites in flock house virus-infected cells. *J Virol* **83**, 2872-2882.

Wang, R., Deng, F., Hou, D., Zhao, Y., Guo, L., Wang, H. & Hu, Z. (2010). Proteomics of the Autographa californica nucleopolyhedrovirus budded virions. *J Virol* **84**, 7233-7242.

Xiaofang, L., Zafrullah, M., Ahmad, F. & Jameel, S. (2001).A C-Terminal Hydrophobic Region is Required for Homo-Oligomerization of the Hepatitis E Virus Capsid (ORF2) Protein. *J Biomed Biotechnol* **1**, 122-128.

Zeng, R., Ruan, H. Q., Jiang, X. S., Zhou, H., Shi, L., Zhang, L., Sheng, Q. H., Tu, Q., Xia, Q. C. & Wu, J. R. (2004). Proteomic analysis of SARS associated coronavirus using two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry and one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by mass spectroemtric analysis. *J Proteome Res* **3**, 549-555.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Microscopy Facility at the University of Nice (*Centre commun de microscopie appliquée de l'Université de Nice Sophia-Antipolis*, France) for help with transmission electron microscopy. Aurore Chevin was the recipient of a PhD fellowship funded by ANSES.

Figure captions

Figure 1

Diagram of the predicted genome organisation of CBPV RNA 1 (A) and RNA 2 (B). Seven putative ORFs are indicated with their positions and putative amino acid sequence length. aa: amino acid, RdRp: RNA-dependent RNA polymerase, pSP: predicted structural protein, hSP: hypothetical structural protein.

Figure 2

Electron microscopy image showing intact CBPV particles extracted from the heads of experimentally infected bees. Scale bar, 35 nm.

Figure 3

Western blot analyses of CBPV purification, using the anti-RdRp antibodies (A), anti-CBPV antibodies (B) or anti-pSP antibodies (C). Coomassie blue stained of a purified CBPV sample (25 µg of proteins) on an "Any kD" gel (D). MM: Molecular mass in kDa.

Figure 4

Analysis of CBPV purification with or without β-mercaptoethanol, on western blots using the anti-CBPV antibodies (A) or anti-pSP antibodies (B), Coomassie blue stained gel stained (C). MM: Molecular mass in kDa. The + symbol indicates samples with β-mercaptoethanol and the - symbol, samples without β-mercaptoethanol. Arrowheads indicate additional proteins that were immunodetected in the absence of β-mercaptoethanol.

Figure 5

SDS-Page profile of purified CBPV sample (50 µg of proteins) and samples for nano-HPLC-MS/MS analysis. L1 to L16 indicate the approximate location of the bands analysed. MM: Molecular mass in kDa.

Figure 6

Amino acid sequences of pSP (181 amino acids) (A) and hSP (582 amino acids) (B). Bars represent the peptides identified using mass spectrometry, the percentage of coverage is 28% for pSP and 16% for hSP. Hydrophobic domains corresponding to the predicted alpha-helices are indicated in grey. The arginine residues from the N-terminal region of pSP are shown in bold and underlined. Points correspond to the stop codon.

Table 1

Global identification of CBPV proteins contained in the purified virus sample, fractions L1 to L16, using nano-HPLC coupled to MALDI-TOF/TOF.

Table 2

Identification of immunodetected proteins (fractions M1, M2, M3) from purified CBPV samples using nano-HPLC coupled to MALDI-TOF/TOF.

Figure 1

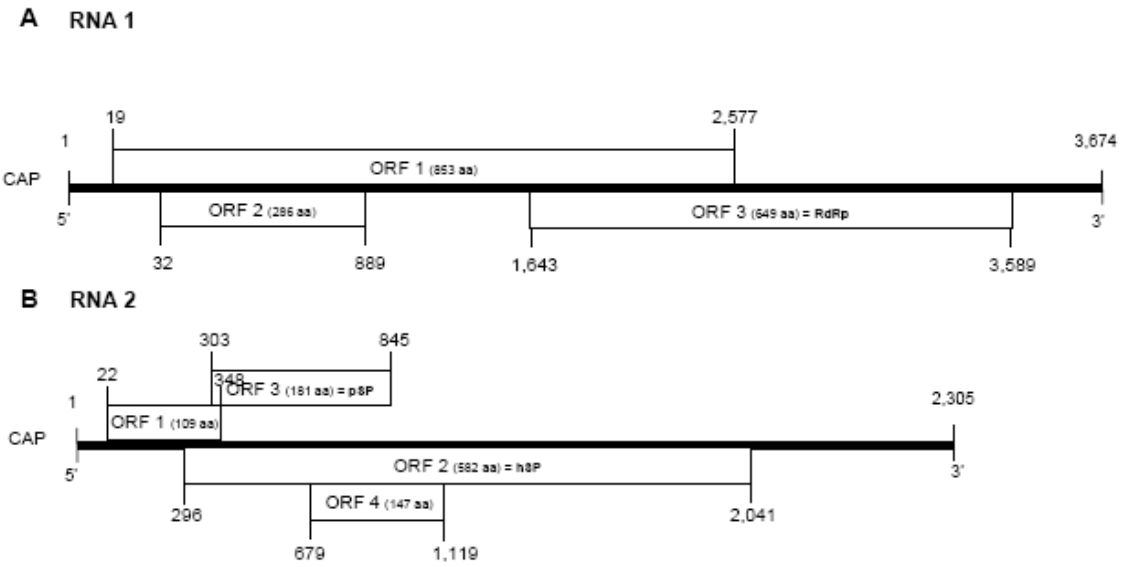

A RNA 1
19
2,577
1
3,674
CAP
ORF 1 (853 aa)
5'
ORF 2 (286 aa)
ORF 3 (649 aa) = RdRp
3'
32
889
1,643
3,589
B RNA 2
303
845
22
348
ORF 3 (181 aa) = p8P
1
2,305
ORF 1 (109 aa)
CAP
5'
ORF 2 (582 aa) = h8P
3'
ORF 4 (147 aa)
296
2,041
679
1,119

Figure 2

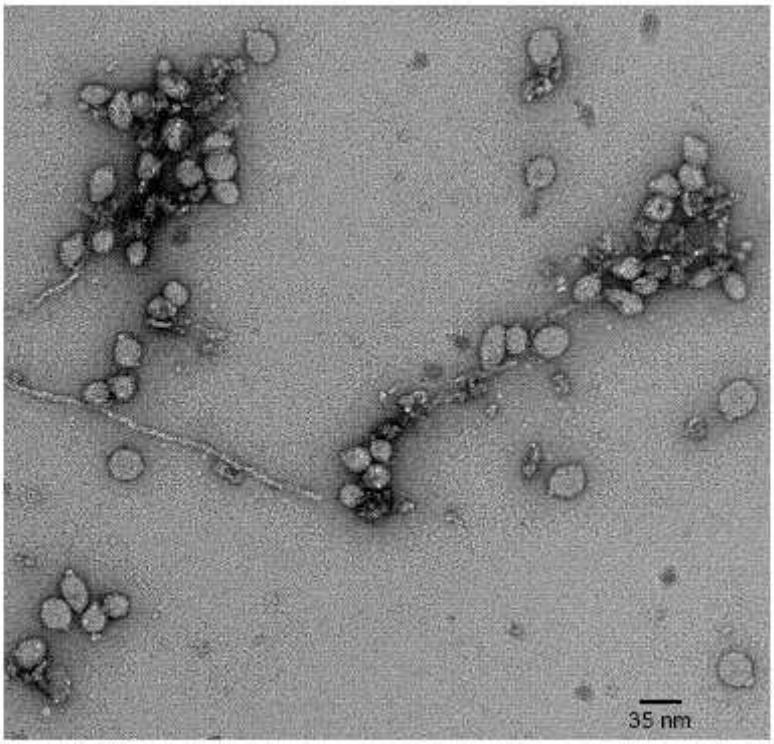


Figure 3

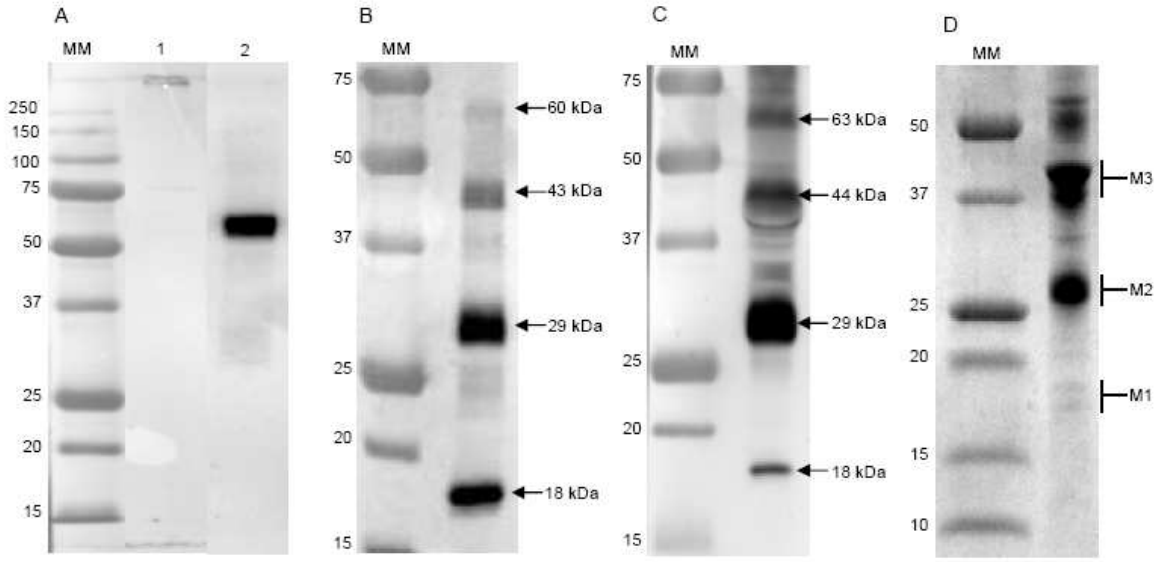

A
MM
1
2
250
150
100
75
50
37
25
20
15
B
MM
75
50
37
25
20
15
60 kDa
43 kDa
29 kDa
18 kDa
C
MM
75
50
37
25
20
15
63 kDa
44 kDa
29 kDa
18 kDa
D
MM
50
37
25
20
15
10
M3
M2
M1

Figure 4

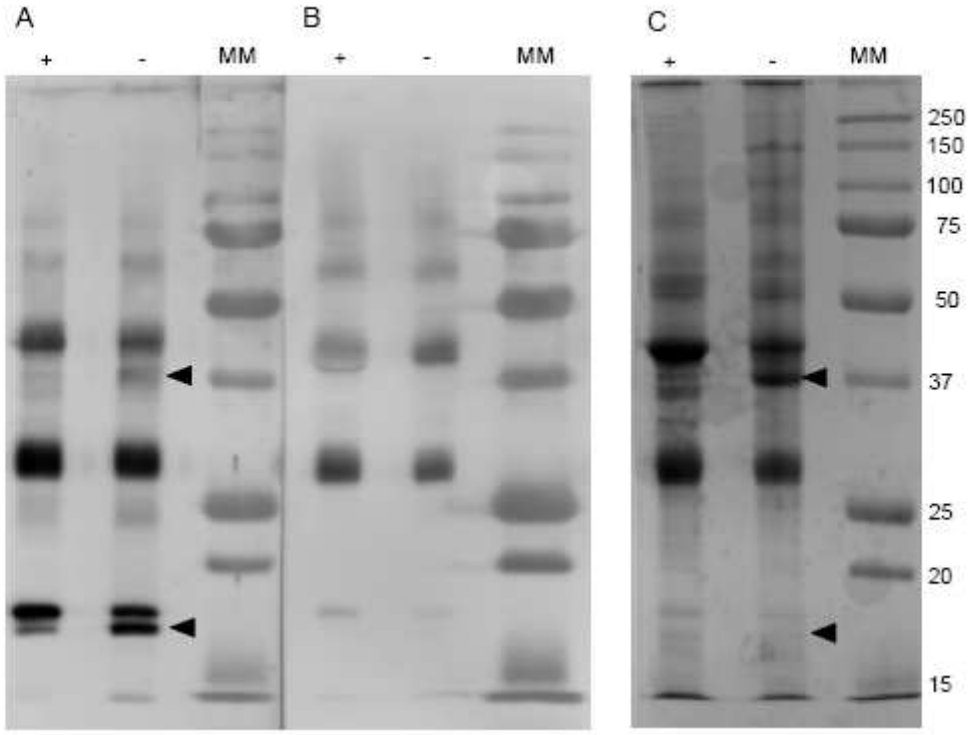


Figure 5

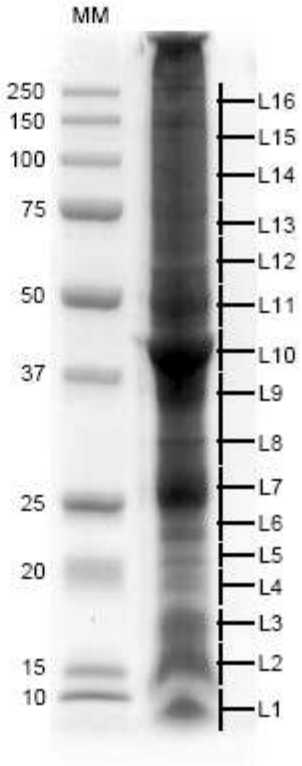

MM
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
L16
L15
L14
L13
L12
L11
L10
L9
L8
L7
L6
L5
L4
L3
L2
L1

Figure 6

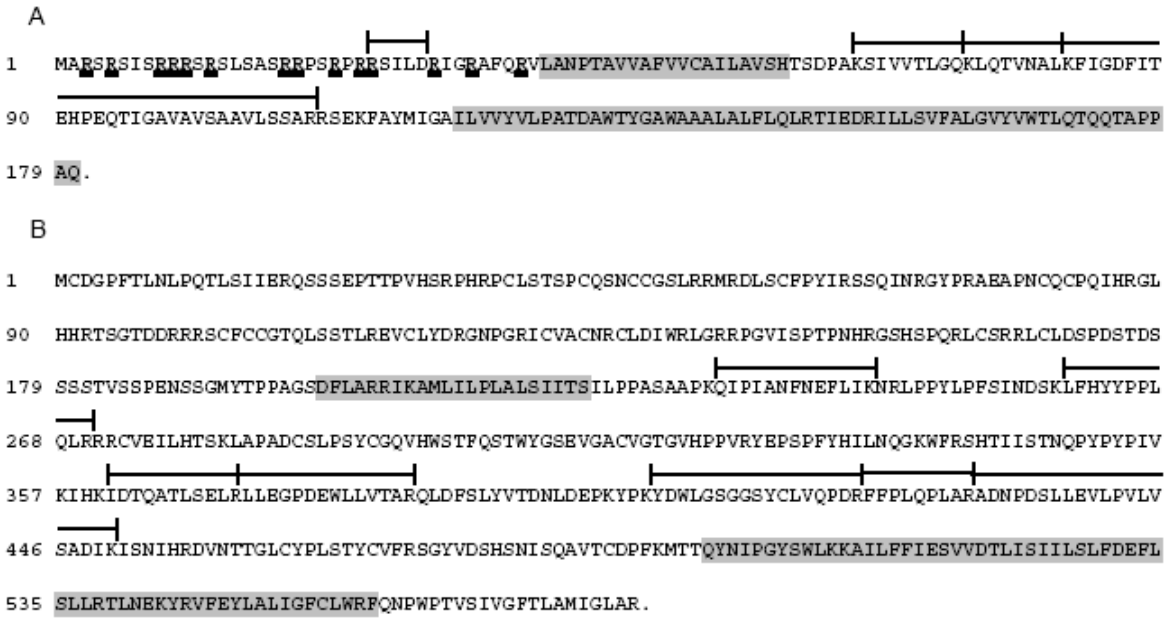

A
1 MARSRSISRRRSRSLSASRRPSRPRRSILDRIGRAFQRVLANPTAVVAFVVCAILAVSHTSDPAKSIVVTLGQKLQTVNALKFIGDFIT
90 EHPEQTIGAVAVSAAVLSSARRSEKFAYMIGAILVVYVLPATDAWTYGAWAAALALFLQLRTIEDRILLSVFALGVYVWTLQTQQTAPP
179 AQ.
B
1 MCDGPFTLNLPQTLSIIERQSSSEPTTPVHSRPHRPCLSTSPCQSNCCGSLRRMRDLSCPPYIRSSQINRGYPRAEAPNCQCPQIHRGL
90 HHRTSGTDDRRRSCFCCGTQLSSTLREVCLYDRGNPGRICVACNRCLDIWRLGRRPGVISPTPNHRGSHSPQRLCSRRLCLDSPDSTDS
179 SSSTVSSPENSSGMYTPPAGSDFLARRIKAMLILPLALSIITSILPPASAAPKQIPIANFNEFLIKNRLPPYLPFSINDSKLFHYYPPL
268 QLRRRCVEILHTSKLAPADCSLPSYCGQVHWSTFQSTWYGSEVGACVGTGVHPPVRYEPSPFYHILNQGKWFRSHTIISTNQPYPYPIV
357 KIHKIDTQATLSELRLLEGPDEWLLVTARQLDPSLYVTDNLDEPKYPKYDWLGSGGSYCLVQPDRFFPLQPLARADNPDSLLEVLPVLV
446 SADIKISNIHRDVNTTGLCYPLSTYCVFRSGYVDSHSNISQAVTCDPFKMTTQYNIPGYSWLKKAILFFIESVVDTLISIILSLFDEFL
535 SLLRTLNEKYRVFEYLALIGFCLWRFQNPWPTVSIVGFTLAMIGLAR.

Table 1

Fraction	Approximate molecular mass (kDa)	Viral protein	Number of peptides (confidence of identity >95%)	Sequence of identified peptide
L1-L8	<10-32	pSP	0	
L9	32-37	pSP	1	FIGDFITEHPEQTIGAVAVSAAVLSSAR
		hSP	3	QIPIANFNEFLIK, LLEGPDEWLLVTAR, ADNPDSLLEVLPVLVSADIK
L10	37-45	pSP	1	FIGDFITEHPEQTIGAVAVSAAVLSSAR
		hSP	3	QIPIANFNEFLIK, LLEGPDEWLLVTAR, ADNPDSLLEVLPVLVSADIK
L11	45-50	pSP	1	FIGDFITEHPEQTIGAVAVSAAVLSSAR
		hSP	3	QIPIANFNEFLIK, LLEGPDEWLLVTAR, ADNPDSLLEVLPVLVSADIK
L12	50-68	pSP	1	LQTVNALK
		hSP	3	QIPIANFNEFLIK, LLEGPDEWLLVTAR, ADNPDSLLEVLPVLVSADIK
L13	68-75	hSP	1	QIPIANFNEFLIK
L14	75-100	hSP	1	QIPIANFNEFLIK
L15	100-150	hSP	1	LLEGPDEWLLVTAR
L16	150-250	-	-	

pSP: predicted structural protein
hSP:hypothetical structural protein
-: no CBPV protein identified

Table 2

Fraction	Approximate molecular mass (kDa)	Viral protein	Number of peptides (confidence of identity > 95%)	Sequence of identified peptide
M1	18	pSP	1	FIGDFITEHPEQTIGAVAVSAAVLSSAR
		hSP	2	QIPIANFNEFLIK, LLEGPDEWLLVTAR
M2	29	pSP	4	FIGDFITEHPEQTIGAVAVSAAVLSSAR, LQTVNALK, SILDR, SIVVTLGQK
M3	44	pSP	3	FIGDFITEHPEQTIGAVAVSAAVLSSAR, LQTVNALK, SIVVTLGQK
		hSP	7	QIPIANFNEFLIK, LFHYYPPLQLR, IDTQATLSELR, LLEGPDEWLLVTAR, FFPLQPLAR, ADNPDSLLEVLPVLVSADIK, YDWLGSGGSYCLVQPDR

pSP: predicted structural protein
hSP:hypothetical structural protein

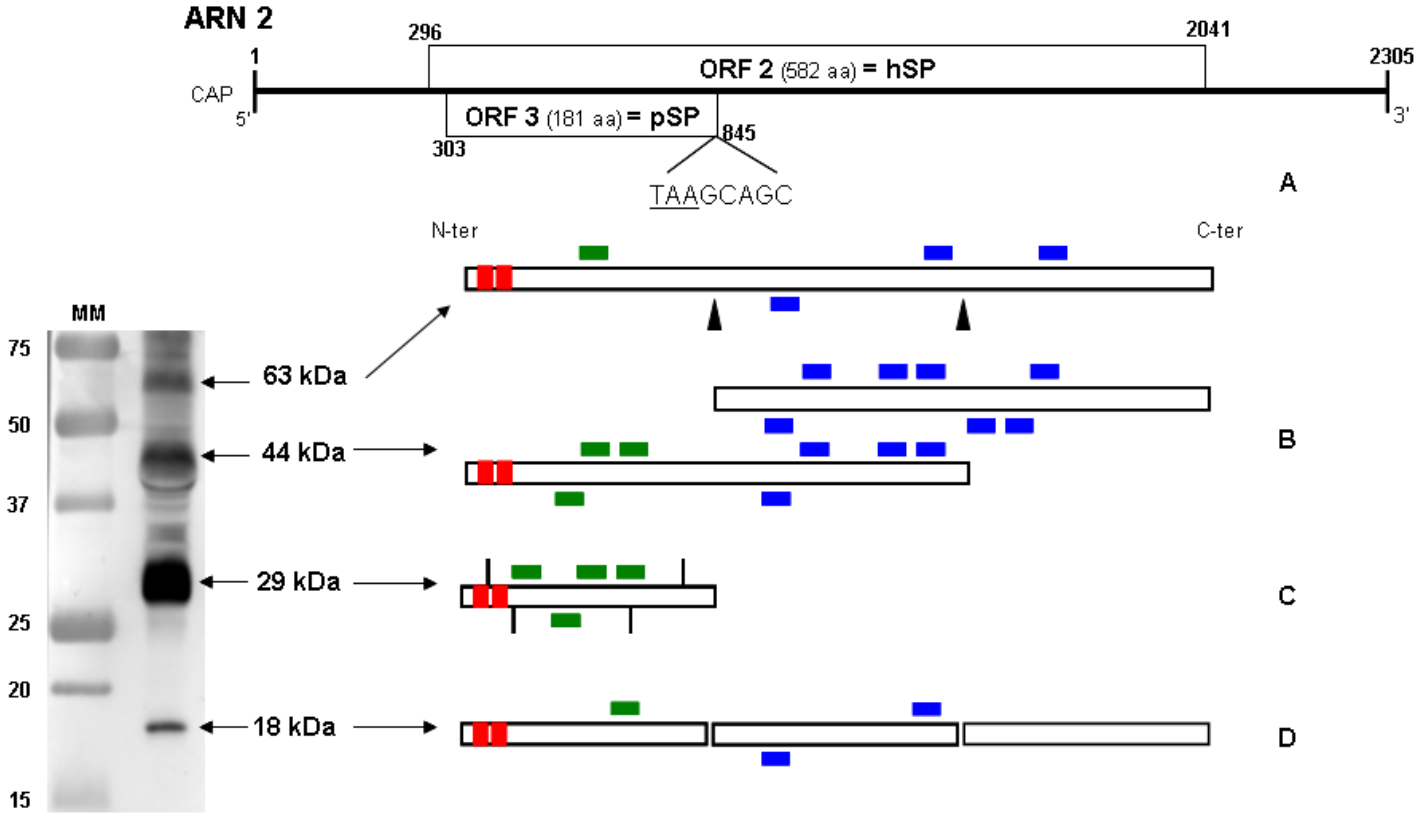


Figure 28 : Mécanisme de « stop codon readthrough » au niveau de l'ORF 3 et 2 de l'ARN 2

(A) L'ORF 3 est chevauchante l'ORF 2, lors de la traduction de la pSP un mécanisme de « readthough » se produirait au niveau du codon stop de l'ORF 3 (TAAGCAGC), provoquant la lecture continue du ribosome au niveau de l'ORF 2 et traduisant ainsi une protéine de fusion de 64,5 kDa correspondant à la protéine immunodétectée à 63 kDa. (B) La protéine de fusion se cliverait donnant 2 produits différents de protéolyse d'environ 45 kDa. (C) La pSP pourrait être traduite idividuellement ou être aussi un produit de protéolyse de 19,7 kDa, étant modifiée de façon post-traductionnelle pour donner une protéine d'environ 29 kDa. (D) La protéine de fusion se cliverait également en 3 produits d'environ 20 kDa.

Les triangles noirs indiquent les sites putatifs de clivage. Les carrés rouges correspondent aux peptides de synthèse utilisés pour la production des anticorps anti-pSP. Les rectangles verts sont les peptides identifiés appartenant à la pSP et les rectangles bleus sont les peptides identifiés de la séquence hSP. Les barres noires correspondent aux modifications post-traductionnelles.

B. Mécanisme de contrôle de la traduction des protéines structurales

Dans ce second article, des peptides identifiés comme appartenant à la séquence protéique codée par l'ORF 2 de l'ARN 2 ont été détectés. La répartition des peptides identifiés ajoutée à la détection de hSP à des masses moléculaires inférieures à 65,5 kDa (44 kDa et 18 kDa) ont suggéré que la hSP serait une protéine précurseur qui serait clivée durant l'assemblage de la capside. Par ailleurs, des hypothèses comme les modifications post-traductionnelles (phosphorylation ou glycosylation) ou une affinité forte de liaison avec une autre protéine, ont également été émises pour expliquer la détection de la pSP à des masses moléculaires supérieures à 19,7 kDa.

Néamoins, une nouvelle analyse de la séquence de ces ORF a révélé que ce n'était pas l'ORF 2 qui est dans un contexte de séquence Kozak, mais l'ORF 3. De plus, la séquence de l'ORF 3 (pSP) étant chevauchante à la séquence de l'ORF2 (hSP), une autre hypothèse peut donc être émise pour expliquer les résultats obtenus. Un mécanisme de contrôle de la traduction, le « stop codon readthrough », au niveau du codon terminateur de l'ORF 3 provoquerait la lecture continue du ribosome qui entrainerait la traduction d'une protéine de fusion contenant la séquence complète de la pSP et la région C-terminale de la hSP (Figure 28A). Ce type de mécanisme est connu chez des virus de plantes (Dreher and Miller, 2006). Chez les virus de la famille *Luteoviridae* et du genre *Furovirus* (Peter et al., 2009 ; Cowan et al., 1997), ce phénomène se déroule lors de la traduction de la protéine de capside, et permet la production d'une protéine de capside fusionnée avec la protéine codée par l'ORF juxtaposé.

La répartition des peptides identifiés comme issus de pSP et de hSP, mais aux environs de 63 kDa correspondrait à la localisation de ces mêmes peptides au sein de la séquence de la protéine de fusion attendue à 64,5 kDa (Figure 28A). De plus, les peptides de synthèse utilisés pour la production des anticorps anti-pSP sont situés dans la région N-terminale de la pSP et donc dans la région N-terminale de fusion putative. Les protéines révélées à des masses moléculaires inférieures à 64,5 kDa seraient des produits de protéolyse de la protéine de fusion en supposant la présence de 2 sites de clivage (Figure 28A).

Par conséquent, à 44 kDa, on trouverait une protéine clivée et correspondant à la pSP jusqu'au milieu de la séquence hSP, mais également une protéine clivée correspondant à la région C-terminales de hSP (Figure 28B). A 29 kDa, il n'y aurait que la pSP mais modifiée de façon post-traductionnelle (phosphorylation et/ou glycosylation) (Figure 28C). Enfin, à 18 kDa, les protéines pourraient correspondre aux 2 produits de protéolyse de la protéine à 44 kDa et à la pSP (Figure 28D). Le « stop codon readthrough » associé à des clivages expliquerait pourquoi aucun peptide n'a été identifié dans la région N-terminale de la hSP et les détections de pSP et hSP à des masses moléculaires inattendues.

L'hypothèse de ce mécanisme d'expression ne modifie pas les supputations quant aux fonctions de la pSP et de la hSP indiquées par la présence du domaine riche en arginine pour la pSP et de la région C-terminale hydrophobe pour la hSP. Leurs implications dans l'assemblage de la capside et dans l'encapsidation des ARN viraux restent à vérifier.

C. Protéines non-structurales

Les anticorps polyclonaux anti-RdRp57 ont été utilisés pour rechercher cette protéine dans la purification virale. Cependant, aucune protéine n'a été détectée dans cet échantillon suggérant que la RdRp du CBPV n'est pas incorporée dans le virion. Par ailleurs, l'analyse par spectrométrie de masse n'a pas révélé de peptides appartenant à la RdRp dans la purification virale ni de peptides potentiellement issus des autres protéines supposées non-structurales. Par conséquent, la RdRp et de manière plus générale les protéines non-structurales du CBPV ne semblent pas être des composants de la particule virale. Bien qu'une récente étude sur le coronavirus de la gastroentérite transmissible (Transmissible gastroenteritis coronavirus, TGEV) qui est un virus à ARN positif, ait démontré que la RdRp et des protéines non-structurales étaient incorporées dans les particules virales (Nogales et al., 2012), l'encapsidation de ces protéines est essentiellement rencontrée chez les virus à ARN simple brin à polarité négatif et à ARN double brin (Myazaki et al., 2008 ; Zhang et al., 2010). Ainsi, il n'est pas étonnant que le CBPV (virus à ARN poisitif) ne présente pas la même caractéristique que ces virus.

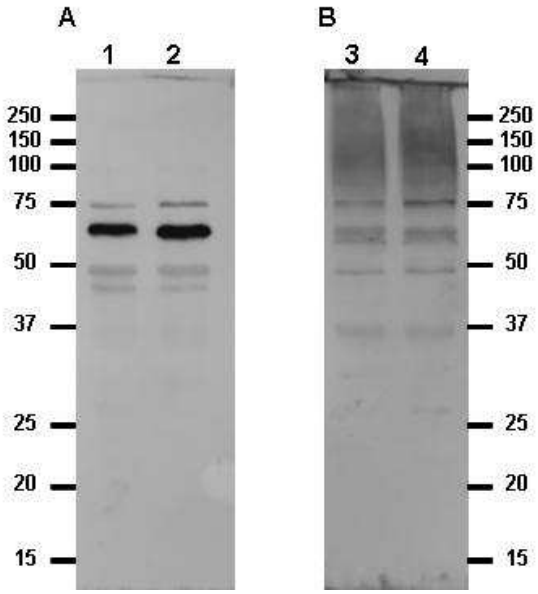


Figure 29 : Immunoblots sur des clarifiats d'abeilles issues d'infections expérimentales

(A) Avec les anticorps anti-RdRp57 et (B) Avec le sérum du lapin avant immunisation, Puits 1 et 3 : clarifiats d'abeilles inoculées avec du tampon PB, puits 2 et 4 : clarifiats d'abeilles inoculées avec le CBPV.

II. Identification de protéines à partir de clarifiats d'abeilles

A. Protéine structurale putative (pSP)

Des clarifiats d'abeilles inoculées avec du tampon PB et inoculées avec le CBPV ont été analysés à l'aide des anticorps anti-pSP. Bien que les profils d'immunodétection soient sensiblement identiques pour les 2 échantillons, les immunoblots ont montré la présence de protéines qui ne semblent pas correspondre à la pSP ou aux autres formes détectées dans la purification virale.

B. RdRp

Des broyats d'abeilles clarifiés provenant d'abeille infectées expérimentalement ont été analysés par western blot à l'aide des anticorps polyclonaux anti-RdRp57 (Figure 29). Les 2 échantillons analysés sont des abeilles injectées avec du PB (Ti) (puits 1 et 3) et des abeilles inoculées avec le CBPV (puits 2 et 4). A l'aide de ces anticorps, quatre protéines ont été détectées dans les 2 échantillons. Ces 4 protéines se situent respectivement à 74 kDa, 60 kDa puis 2 protéines entre 37 et 50 kDa (Figure 29). Cependant, aucune différence d'intensité de détection n'a été observée entre les protéines révélées dans les clarifiats Ti et CBPV bien que les charges génomiques aient été estimées à 10^4 copies du génome de CBPV par abeille pour les Ti et à 10^{12} copies du génome de CBPV par abeille pour les abeilles inoculées avec le CBPV. La protéine détectée à une masse de 74 kDa correspondrait à la RdRp dont la masse moléculaire théorique a été calculée à cette taille. Les 3 autres protéines, situées en dessous de 74 kDa, pourraient provenir d'un clivage de la RdRp. En effet, le produit détecté à 60 kDa pourrait correspondre à un produit de protéolyse de la polymérase conformément à l'hypothèse émise pour expliquer le profil d'expression de la RdRp (CBPV 9) en système bactérien.

En absence de clarifiats d'abeilles provenant d'infection expérimentale et indemne de CBPV (charge génomique inférieure à la limite de détection de 10^3 copies du CBPV par abeille) et il est difficile de conclure sur la réalité des protéines détectées. Afin d'acquérir des données complémentaires, des clarifiats d'abeille provenant d'infections naturelles ont été analysés. La charge virale de ces échantillons a été évaluée par qPCR d'inférieure à la LD (limite de détection) à 10^8 copies du génome du CBPV par abeille (Figure 30).

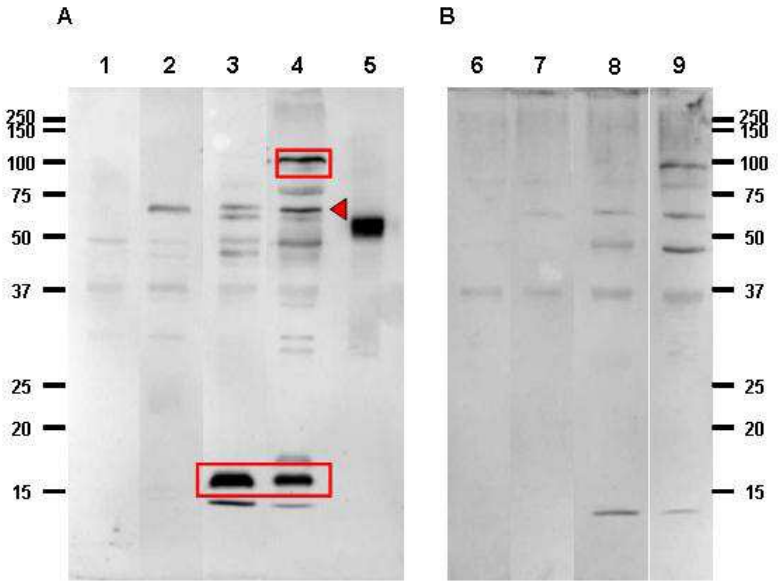


Figure 30 : Immunoblots sur des clarifiats d'abeilles issues d'infections naturelles

(A) Avec les anticorps anti-RdRp57 et (B) Avec le sérum du lapin avant immunisation, clarifiats d'abeilles dont la charge virale a été estimée, à la LD (puits 1 et 6), à 10^4 copies du génome par abeille (puits 2 et 7), à 10^7 copies du génome par abeille (puits 3 et 8) et à 10^8 copies du génome par abeille (puits 4 et 9), puits 5 : RdRp57.

Le triangle rouge indique les protéines immunodétectées aux environs de 74 kDa qui correspond à la masse moléculaire de la RdRp du CBPV. La bande encadrée aux environs de 100 kDa est la protéine uniquement détectée dans le clarifiat à 10^8 copies du génome du CBPV par abeille. Les bandes encadrées à 15 kDa sont les protéines dont l'intensité de détection est la plus intense, ces protéines pourraient être des produits de protéolyse de la RdRp.

Les immunoblots ont montré que les profils de détection étaient totalement différents de ceux des abeilles issues d'infection expérimentale (Figure 29). Plusieurs protéines ont été immunodectées dans les différents clarifiats. Les protéines détectées dans l'échantillon estimé à la LD étaient présentes dans tous les échantillons mais étaient également détectées avec le sérum pré-immun. Par conséquent, la détection de ces protéines a été considérée comme aspécifique.

La comparaison entre les profils de détection sur les clarifiats dont la charge virale était plus forte a montré que le nombre de protéines immunodetectées semblaient augmenter en fonction de la charge génomique estimée. De manière plus précise, il a semblé que la RdRp soit détectée à sa masse attendue de 74 kDa dans les clarifiats dont la charge génomique était supérieure ou égale à 10^4 copies du génome du CBPV (Figure 30A, puits 2, 3 et 4). Cependant, plusieurs produits de masses moléculaires inférieures à 74 kDa ont été également détectés. Parmi ces protéines, 2 bandes plus intenses ont été révélées à 15 kDa dans les clarifiats à 10^7 et 10^8 copies du génome du CBPV (Figure 30A, puits 3 et 4). Par ailleurs, une protéine supérieure à 100 kDa a été uniquement détectée dans le clarifiat à 10^8 copies du génome du CBPV (Figure 30A, puits 4).

Une hypothèse pourrait expliquer la présence de cette protéine, c'est-à-dire que la protéine produite lors du phénomène de frameshift qui engendrerait la traduction d'une protéine de 135 kDa.

Les protéines détectées à des masses moléculaires inférieures à 74 kDa seraient en accord avec les résultats de transcription/traduction *in vitro* réalisés par Andrew Firth et son équipe. En effet, en traduisant les ORF 1 et 3 de manière continue, ils ont remarqué que ce n'était pas un seul et long produit de 135 kDa qui était traduit mais plusieurs de petites tailles.

Afin de confirmer l'identification de la RdRp ou du produit de traduction lors du phénomène de frameshift, une seule immunoprécipitation a été réalisée à partir du clarifiat à 10^8 copies du génome du CBPV par abeille. Cependant, après l'analyse effectuée par coloration du gel au bleu de coomassie, aucune protéine, mises à part les chaines lourdes et légères des anticorps, n'a été révélée.

Cet échec est probablement dû à des quantités insuffisantes d'anticorps et de protéines dans le milieu réactionnel. Cet essai n'a pas pu être renouvelé mais cette technique permettrait d'isoler les protéines immunodétectées et de les analyser en spectrométrie de masse dans le but d'identifier les différentes protéines et les sites potentiels de clivage.

III. Discussion

Les résultats obtenus à partir de ces immunoblots soulèvent un problème au vu de l'absence de différence entre les profils révélés sur les abeilles avec de faible charges virales et les abeilles présentant de fortes charges. Par ailleurs, lors de ces études, on remarque nettement la présence de nombreuses protéines d'abeilles après coloration du gel et des détections aspécifiques.

Afin de s'affranchir des difficultés liées aux charges virales, il apparait indispensable de disposer d'abeilles témoins non contaminées par le virus. Dans ce cadre le laboratoire est en cours de réaménagement de son rucher expérimental. De plus, l'amélioration de la préparation des échantillons en partant de prélèvements d'hémolymphe ou d'organes disséqués permettrait de limiter les déchets de broyage.

De même, la purification virale est actuellement effectuée à partir de broyages d'abeilles entières or la préparation de particules reste contaminée par de nombreuses protéines d'abeilles. Par conséquent, l'optimisation de la purification virale à partir d'échantillon limitant la présence de ces protéines serait un atout. Des cerveaux disséqués, l'hémolymphe d'abeilles infectées, voire la réplication du virus sur larves lors d'élevage larvaire ou des essais d'infection sur culture de cellules d'autres insectes pourraient être utilisés comme matériels biologiques pour la production et l'isolement du virus. En effet, bien que le CBPV soit un virus se multipliant à de fort taux chez les abeilles adultes, il est possible que l'infection avec des charges virales élevées fonctionne sur les larves d'abeille. Si les charges virales produites sont suffisantes la purification serait alors simplifiée car permettant d'éliminer les débris de cuticule et les réactions fortes de mélanisation rencontrées chez les abeilles adultes.

Enfin, des essais d’autres méthodes de purification virale par exemple sur gradient de chlorure de césium après une première séparation sur gradient de saccharose pourraient permettre d’obtenir des préparations virales dont la pureté est plus importante.

PARTIE 4 : Conclusion et perspectives

Le CBPV est un virus très répandu qui est responsable d'une maladie infectieuse et contagieuse des abeilles adultes provoquant un panel de symptômes bien décrits (tremblement, dépilation et une faible activité de la colonie…) et de sévères pertes d'abeilles durant la saison apicole. Bien que son génome ait été précédemment caractérisé, les protéines virales et les mécanismes de l'infection par le CBPV sont peu connus.

Cette thèse menée au sein de l'équipe « Virologie et diagnostic moléculaire » de l'unité pathologies de l'abeille, Anses, Sophia-Antipolis, avait pour but d'apporter des connaissances fondamentales supplémentaires sur ce virus en identifiant les protéines codées par le génome viral, notamment dans l'optique de déterminer une position taxonomique. Mon travail a porté plus particulièrement sur la caractérisation des protéines du CBPV et l'étude plus approfondie des protéines identifiées. Même si toutes les hypothèses amenées par la caractérisation du génome n'ont pas été totalement confirmées, ces travaux réalisés en collaboration avec différentes équipes de recherche ont contribué à étendre les champs des investigations sur le CBPV et à amener de nouveaux outils et hypothèses sur les protéines virales qui ont pu être identifiées.

Cette partie 4 présente les conclusions que l'ont peut tirer grâce aux résultats acquis aux travers des différentes études effectuées, ainsi que des perspectives en matière d'expériences complémentaires qui pourront être réalisées dans le futur, afin de poursuivre les travaux initiés lors de cette thèse.

I. Etudes comparatives des protéomes d'hémolymphes

La comparaison des protéomes d'hémolymphes d'abeilles non-infectées et infectées par le CBPV a permis d'identifier 9 protéines de l'hôte mais aucune protéine du virus. Cependant, il est important de noter que l'analyse par spectrométrie de masse effectuée, c'est-à-dire par PMF, présente certaines limites. En effet, les échantillons en mélanges complexes peuvent donner des superpositions d'empreintes peptidiques difficiles à interpréter et également des phénomènes de suppression de signal.

La digestion de protéines de faible masse moléculaire ou faiblement abondantes va produire un petit nombre de peptides pouvant être identifiés ce qui influencera la qualité et la confiance accordée à l'identification de ces protéines. Par ailleurs, la précision de mesure doit être très élevée pour limiter les identifications de faux-positifs.

Par conséquent, l'ajout d'une étape de chromatographie liquide (LC) avant l'analyse par spectrométrie de masse apporterait une meilleure identification de peptides en mélanges complexes et réduirait la suppression du signal. De plus, comme suggéré précédemment l'identification à partir des bases de données protéiques ne comportant que les protéines de l'espèce *Apis mellifera*, affinerait considérablement les résultats et l'identification via Paragon, un autre logiciel que MASCOT, donnerait un autre panel de protéines identifiées.

Les protéines identifiées présentant une expression différentielle suite à l'infection par le CBPV ne semblent pas participer clairement à la réponse immunitaire antivirale, mais interviendraient dans différents mécanismes de lutte des cellules d'abeilles afin de compenser les dommages provoquer par la propagation du virus ou au contraire en favorisant la multiplication du virus.

Des analyses protéomiques mériteraient d'être poursuivies en se basant sur les enseignements tirés des difficultés rencontrés. Parmi ces axes d'amélioration la qualité et la préparation des échantillons paraissent des points importants. Ces analyses devraient permettre d'identifier des protéines virales et de poursuivre l'étude des protéines impliquées positivement ou négativement dans la réponse de l'hôte face à cette infection ou diminuées par celle ci. Cependant, la protéomique serait aussi pertinente pour l'étude de nombreux aspects de la pathogénicité de l'infection par le CBPV. Des analyses protéomiques supplémentaires et plus poussées permettraient d'aborder de nouvelles aires de recherche en addition de l'analyse comparative des protéines exprimées.

L'approche protéomique possède un fort intérêt. En effet, l'identification des protéines reliées à la pathogénicité permettrait le développement de nouveau biomarqueurs protéiques pour le diagnostic et la détection précoce de l'infection par le CBPV. Dans ce travail de thèse, l'étude comparative était basée sur 2 conditions expérimentales, abeilles non-infectées et infectées par le virus. La comparaison d'hémolymphes d'abeilles à différents stades de l'infection virale, en accord avec les diagnostics par RT-qPCR (limite de détection et de quantification, virus détecté, paralysie chronique probable, paralysie chronique déclarée), amènerait une analyse plus pointue des changements d'expression de protéines. Ces protéines pourraient servir comme de nouveaux marqueurs du diagnostic des stades de la maladie.

II. Modèle d'infection par ARN nus et caractérisation du génome et des protéines

Le développement du modèle *in vivo* par inoculation directe d'ARN nus du CBPV à des abeilles adultes a démontré le caractère infectieux des ARN. De plus, il a permis de déterminer la concentration optimale d'ARN à injecter pour provoquer la réplication et la formation de particules virales. Ce modèle original ouvre des voies d'études sur la biologie du CBPV. Cependant, il faut garder à l'esprit que l'injection d'ARN nus pour étudier le CBPV est limitée par la disponibilité des abeilles (saison apicole ou utilisation d'un rucher couvert) et le risque de contaminations par d'autres pathogènes lors de l'expérimentation.

La mutagénèse dirigée aussi bien que d'autres modifications ciblées du génome devraient permettre de déterminer les caractéristiques du génome essentielles à sa réplication et les fonctions des protéines virales. Cependant, un certain nombre d'éléments concernant le génome du CBPV serait intéressant à vérifier au préalable.

A. Extrémité 5' : structure CAP

Durant le séquençage des 2 ARN majoritaire, un traitement à la CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase) a permis de déterminer les extrémités 5' des 2 fragments et de révéler la présence d'une structure CAP (Olivier et al., 2008a) qui pourrait expliquer l'infectiosité des ARN nus. Il est connu que la structure CAP de l'ARN joue un rôle dans la stabilité de l'ARN en les protégeant de la dégradation par les exonucléases cellulaires.

Elle assure aussi l'initiation de la traduction en se couplant avec des protéines se liant spécifiquement au CAP (cap-binding protein). Par conséquent, il serait intéressant d'éliminer la structure CAP des ARN du CBPV par traitement à la CIAP et de les injecter dans l'abeille. La comparaison de l'infectiosité des ARNs cappés ou non-cappés permettrait de déterminer si la présence de la structure CAP est nécessaire au pouvoir infectieux des ARN viraux.

B. ARN majoritaires et minoritaires et particule virale associée

En 1982, Overton et ses collègues ont décrit que le génome du CBPV contenait 5 fragments d'ARN simple brin dont les 2 majeurs ont été complètement séquencés. Les 3 fragments minoritaires : ARN 3a, 3b et 3c sembleraient posséder une taille de 1100 nt chacun. Au cours de l'étude du génome menée au laboratoire, seule la séquence des deux ARN majoritaires a été obtenue (Olivier et al., 2008a). Les ARN minoritaires n'ont, en effet, pas pu être visualisés sur gel, et n'étaient pas présents dans la/les banque d'ADNc. Cependant, un pyroséquençage permettrait de déterminer si les séquences du génome viral sont complètes et si les ARN minoritaires existent réellement.

Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si les ARN 1 et 2 seuls sont suffisants pour initier la réplication et la formation de particules virale, sans nécessiter la présence des 3 ARN minoritaires potentiellement présents dans les ARNs viraux extraits. De tels essais seraient réalisables sur des ARN transcrits *in vitro* après clonage des séquences complètes de l'ADNc de chaque ARN viral dans des plasmides. Deplus, cet outil permettrait de réaliser de plus des infections expérimentales à l'aide de l'ARN 1 ou 2 seuls ce qui permettraient de déterminer si les 2 fragments sont nécessaires à la multiplication du virus et quelles sont les protéines codées par chaque fragment. En effet, l'ARN 2 est supposé contenir les ORFs codant les protéines structurales, par conséquent l'injection de l'ARN 2 seul pourrait provoquer la formation de VLPs (virus like particles) vide. La vérification de la réplication virale serait quantifiée par RT-qPCR), la formation de particules serait visualisée en microscopie electronique et l'infectiosité des particules ainsi produites seraient évaluées par l'injection de ces particules lors de nouvelles infections expérimentales.

III. Protéines structurales identifiées

L'identification des protéines virales par la spectrométrie de masse et les techniques d'immunodetection a, ainsi, confirmé au sein de la particule virale l'existence de la pSP et la présence d'une autre protéine, la hSP codée par l'ORF 2 de l'ARN 2. Les autres protéines putatives n'ont pas été révélées et surtout aucune protéine non-structurale, suggérant que les 2 protéines identifiées sont structurales. Cependant, les fonctions précises de ces protéines ne sont pas encore déterminées. En tant que protéines structurales, elles jouent un rôle évident dans l'assemblage de la capside, et des hypothèses sur d'autres fonctions putatives peuvent être avancées et vérifiées par des expériences supplémentaires.

A. Encapsidation des ARN et fonctions putatives de la pSP

Le génome du CBPV est composé de 2 fragments majoritaires d'ARN (ARN 1 et ARN 2) et il est supposé la présence de 3 fragments minoritaires d'ARN (ARN 3a, 3b et 3c) (Overton et al., 1982 ; Ball, 1985). Dans la littérature, il est décrit que ces 3 ARN minoritaires seraient similaires (études menées en fingerprinting donc basées sur la comparaison de profils de restriction) aux 3 ARN de la particule virale satellite du CBPV, le CBPSV, et similaires à l'ARN 2. Par conséquent, ils pourraient être considérés comme des ARN subgénomique de l'ARN 2. Néanmoins, ces 3 fragments n'ont pas été visualisés sur gel (Olivier et al., 2008a) et la particule virale satellite n'a pas été mise en évidence. Cette absence de mise en évidence des ARN minoritaires et de la particule satellite est commune avec le laboratoire de collègues Anglais du CSL (Central Science Laboratory). Cependant, en 1985, Ball et ses collègues ont suggéré que la présence de population de particules hétérogènes au sein de la purification virale serait due à une incorporation des ARN selon différentes combinaisons qui provoquerait la formation de particules plus ou moins grandes.

Dans un premier temps, la détermination du ratio ARN 1/ARN 2 permettrait d'apporter une donnée sur la prévalence du packaging des 2 ARN d'où l'utilité de développer une RT-qPCR ciblant l'ARN 2. Dans ce cadre, le développement d'une PCR en temps réel ciblant l'ARN 2 est indispensable. Chez des virus de la famille *Bromoviridae* (BMV) et du genre *Dianthovirus* (RCNMV) ayant un génome fragmenté, l'arrangement flexible des ARN a été démontré et provoque la formation de populations distinctes de virions (Basnayake et al., 2006 ; Choi and Rao, 2003). Des traitements du CBPV par chaleur et/ou UV couplés aux qPCR pourront probablement déterminer les différentes combinaisons d'ARN possibles.

Chez les virus BMV et RCNMV, il est décrit que la présence d'un peptide riche en charges positives (Acides aminés basiques, lysine ou arginine) en région N-terminale de la protéine de capside est requis pour le packaging des ARNs et la stabilité des virions produits (Choi et al., 2000 ; Park et al., 2012). En effet, le peptide se lie aux ARN grâce à la force électrostatique (charges positives du peptide versus charges négatives des ARN) (Ni et al., 2012). Cependant, les raisons qui gouvernent les liaisons préférentielles du petide aux ARN ne sont pas encore déterminées. Il est suggéré que la structure secondaire (type hélice α) et/ou la structure tertiaire du peptide et une structure particulière du génome joueraient également un rôle dans l'encapsidation différentielle des ARN.

Chez le CBPV, l'analyse des résidus de la séquence de la pSP a révélé une région N-terminale riche en arginine. Par conséquent, ce motif participerait au packaging des ARN viraux. Il serait intéressant d'injecter des transcrits, où ce motif aurait été délété, à des abeilles afin d'étudier son rôle dans l'incorporation des ARN dans la particule et d'apporter probablement des éléments de réponses sur le packaging différentiel des ARN.

De même, l'incorporation de mutations dans ce peptide en substituant une ou plusieurs arginines par des alanines, permettrait d'étudier le rôle de la région N-terminale de la pSP dans l'infection virale. En effet, Park et al. (2012) ont démontré en modifiant cette région que la protéine de capside du RCNMV est impliquée dans la symptomatologie et l'accumulation des particules.

B. Existence de la hSP

Durant la discussion sur l'identification des protéines structurales, une hypothèse a été soulevée. En effet, la présence d'un mécanisme de traduction de type « stop codon readthrough » suggère que la protéine codée par l'ORF 2 de l'ARN 2 (hSP) ne serait pas traduite individuellement mais que sa traduction dépendrait de celle de l'ORF 3. Au final, une protéine de fusion d'environ 64,5 kDa serait traduite puis protéolysée en plusieurs fragments.

L'utilisation d'anticorps dirigés contre la région N-terminale de la hSP en amont du site supposé de « readthrough » permettrait de confirmer ou d'infirmer l'existence de cette région chez cette protéine. De plus, l'expression de protéines recombinantes correspondant à la région C-terminale de la hSP permettrait la production d'anticorps qui serviraient à mettre en évidence le domaine « readthrough » et les clivages putatifs. Ainsi, le rôle de la protéine de fusion et de ses produits de protéolyse serait déterminé et montrerait l'implication de ces protéines dans la particule virale (Cowan et al., 1997 ; Peter et al., 2009).

IV. Autres protéines virales

Il est clair que l'identification des protéines du CBPV à partir de la purification virale réalisée sur gradient de saccharose, s'est révélée difficile en raison de la présence de nombreuses protéines d'abeille dans la préparation. L'analyse par spectrométrie de masse devrait être effectuée après une purification plus poussée des particules virales, sur gradient de chlorure de césium par exemple. Cette nouvelle analyse permettrait d'affiner l'identification et de confirmer les données précédemment obtenues. Dans l'hypothèse où de nouvelles protéines virales seraient révélées, l'obtention de la protéine recombinante correspondante permettrait la production d'anticorps et son identification par des techniques d'immunodétection.

En ce qui concerne les protéines non-structurales qui n'ont pas été identifiées dans la préparation virale, des informations complémentaires ont pu être apportées via les stratégies élaborées dans ce travail de thèse. Par conséquent, des hypothèses sur la nature et les caractéristiques de certaines protéines ont pu être émises.

A. RdRp et son mécanisme de régulation (frameshift)

A l'aide des constructions réalisées pour l'expression de la RdRp, une protéine recombinante a été produite et purifiée à partir de la séquence entière (CBPV 9). La protéine obtenue (RdRp57) a permis d'obtenir des anticorps polyclonaux et de montrer que la RdRp n'était pas présente au sein de la particule virale mais qu'elle semble présente dans les clarifiats d'abeilles infectées naturellement et expérimentalement. Certes, les profils d'immunodétection sont différents, mais ils révèlent un aspect intéressant de cette protéine, car plusieurs protéines sont détectées suggérant une protéolyse de la RdRp.

Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, la traduction de cette protéine pourrait être régulée par un mécanisme de frameshift. Par conséquent, les différentes protéines immunodétectées proviendraient d'un clivage du produit de fusion, résultant de la traduction continue de l'ORF 1 jusqu'à la fin de l'ORF 3 de l'ARN 1. Ceci est corroboré par deux données obtenues : 1) la RdRp recombinante purifiée ne correspond pas à la taille attendue (57 kDa au lieu de 74 kDa) supposant un clivage de la protéine ; 2) l'étude par traduction *in vitro* sur le phénomène de frameshift révèle que la production d'un long produit de traduction (135kDa) est faible mais que plusieurs plus petites protéines sont présentes.

A partir de préparations issues d'abeilles infectées par le CBPV, les anticorps anti-RdRp57 permettraient la purification de la/les protéines par immunoprécipitation. Cette immunoprécipitation couplée avec une approche MS/MS confirmerait la qualité de détection de ces anticorps, puis de s'assurer que les protéines immunodétectées correspondent à la RdRp et à ses produits de protéolyse ou encore à des produits de clivage de la protéine de fusion ORF 1-3.

A l'aide de 2 clones (pDEST17-CBPV 3 et pDEST17-CBPV 4) obtenus au cours de ces travaux de thèse, l'équipe du Docteur Andrew Firth souhaite produire des anticorps dirigés contre la séquence en amont du site de frameshift, et ainsi vérifier s'ils détectent la protéine codée par l'ORF 1, mais également la protéine de fusion de 135 kDa (ORF 1 jusqu'à la fin de l'ORF 3) dans des extraits d'abeilles infectées. La détection de la protéine de 135 kDa démontrerait que le mécanisme de frameshift est indubitablement présent et bien plus efficace dans l'abeille que dans un système *in vitro*.

Bien qu'une protéine recombinante (RdRp57) ait été produite à partir de la séquence de la RdRp, son l'activité polymérase n'a pas pu être mise en évidence. Cependant, cette absence d'activité pourrait résulter du fait que la protéine recombinante produite était tronquée, même si le motif GDD est présent dans la séquence de la RdRp57. D'un autre côté, il se pourrait que la matrice ARN mise en réaction ne soit pas optimale pour mettre en évidence l'activité de cette RdRp. En remplaçant cette matrice par des ARN extraits du CBPV ou transcrits, l'activité polymérase pourrait se révéler positive. Dans le cas où cette stratégie ne présenterait pas les résultats attendus, de nouvelles constructions devront être réalisées afin de produire d'autres protéines recombinantes et de tester les protéines purifiées. Par ailleurs, par mutagénèse dirigée, il serait intéressant de modifier le site catalytique de la RdRp, puis d'injecter à des abeilles le transcrit obtenu en complément de l'ARN 2 afin de voir si réplication virale et la production de particules infectieuses sont maintenues.

B. Activité protéase putative

La RdRp recombinante produite présente une masse moléculaire inférieure à celle attendue (57 kDa au lieu de 74 kDa) suggérant un clivage de la protéine. De plus, lors de l'étude sur l'existence du frameshift putatif, le Dr. A. Firth et ses collègues ont montré par la traduction *in vitro* que la protéine de fusion de 135 kDa était faiblement présente.

Cependant, un grand nombre de protéines dont les masses moléculaires étaient inférieures à 74 kDa, étaient détectées suggérant également un phénomène de clivage de protéines et par conséquent une activité protéase au sein des protéines traduites à partir de l'ARN 1. Les délétions successives de la séquence ont révélé que l'activité protéase serait en amont de la RdRp et incluse dans le produit de fusion ORF 1-3. La détection de plusieurs protéines indique la présence de plusieurs sites de protéolyse potentiels. Ainsi, des expériences d'immunoprécipitation à l'aide des anticorps anti-RdRp57 couplées avec la MS/MS permettraient d'identifier les sites de clivage du produit de fusion (ORF 1-3 de l'ARN 1) et de confirmer le site de clivage putatif (Q/G, positions 206/207) de la RdRp.

V. Position taxonomique

Bien que de nombreuses données aient été apportées par ce travail de thèse, une position taxonomique plus précise n'a pu être déterminée. Les caractéristiques des protéines identifiées ressemblent à certaines des virus des familles *Nodaviridae* et *Tombusviridae*. Néanmoins, il faut rappeler que récemment les séquences génétiques de 2 nouveaux virus potentiels de l'abeille, Lake Sinai Virus 1 et 2, ont été identifiées. Ces virus sont positionnés sur la même branche phylogénétique que le CBPV. Des premiers travaux réalisés au sein du laboratoire ont permis de détecter LSV 1 et 2 dans des clarifats d'abeille à l'aide des amorces définies par Runckel et al. (2011). Ces virus semblent bien divergents du CBPV car les PCR de détection de ces virus appliquées sur les purifications du CBPV n'ont révélé aucun produit d'amplification. Les séquences obtenues à partir des produits de PCR ont été comparées avec les séquences du CBPV, cependant cette comparaison a révélé un pourcentage important de divergences. Des études plus approfondies, tels que le séquençage des produits de PCR clonés et le séquençage complet des génomes des souches LSV identifiées dans les échantillons du laboratoire, apporteraient de meilleures comparaisons avec les séquences du CBPV. Les séquences obtenues permettraient de confirmer la position du CBPV par rapport aux LSV et ainsi d'apporter des données aidant à la caractérisation des protéines non-structurales du CBPV.

L’étude des protéines du CBPV est réalisée afin de mieux caractériser le virus et d’obtenir des outils complémentaires de diagnostic. Au sein du laboratoire, la qPCR est utilisé en routine pour le diagnostic de la paralysie chronique. Cette méthode faisant partie des diagnostics directs onéreux, l’utilisation d’autres méthodes dont le coût est moins élevé se révélerait intéressante. Par conséquent, des méthodes basées sur la révélation des constituants protéiques viraux ou des marqueurs de la maladie seraient des outils supplémentaires pour le diagnostic de la paralysie chronique.

Comme soulevé lors de l’analyse comparative protéomique, une réponse immunitaire antivirale spécifique suite à l’infection par le CBPV n’a pas été mise en évidence. Cependant, des analyses comparatives plus approfondies, réalisées selon les pistes et la méthodologie proposées suite à ce travail de thèse, permettraient une étude plus pertinente de la réponse de l’hôte à l’infection. Si ces analyses révèlent un profil de réponse à cette infection virale, ces protéines pourront être utilisées comme marqueurs afin d’établir un lien entre les manifestations cliniques et le statut de l’infection virale.

Enfin, grâce aux outils obtenus (anticorps polyclonaux anti-pSP et anti-RdRp, protéines recombinantes) et aux études réalisées durant ce travail de thèse (modèle d’infection par les ARN viraux nus, analyses protéomique et protéique avec mises en évidence de voies d’amélioration), des moyens et méthodes supplémentaires, de détection et d’étude du génome et des protéines de ce virus sont maintenant disponibles

Références

Adams J.R. and Bonami J.R., 1991. Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca Raton.

Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., Klein, A.M., 2008. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. Curr. Biol. 18, 1572–1575.

Albert, S., Gätschenberger, H., Azzami, K., Gimple, O., Grimmer, G., Sumner, S., Fujiyuki, T., Tautz, J., Mueller, M.J., 2011. Evidence of a novel immune responsive protein in the Hymenoptera. Insect Bioch. Mol. Biol. 41, 968-981.

Allen, M. and Ball, B.V., 1995. Characterisation and serological relationships of strains of *Kashmir bee virus*. Ann. Appl. Biol. 126, 471-484.

Anderson, D.L. and 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.

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. Invert. Pathol. 90, 69-72.

Azzami, K., Ritter, R., Tautz, J., Beier, H., 2012. Infection of honey bees with acute bee paralysis virus does not trigger humoral or cellular immune responses. Arch. Virol. 157, 689-702.

Bailey, L., Gibbs, A.J., and Woods, R.D., 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). Virol. 21, 390-395.

Bailey, L., and Gibbs, A.J., 1964. Acute infection of bees with paralysis virus. J. Insect Pathol. 6, 395-407.

Bailey, L., 1965a. Paralysis of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. J. Invert. Pathol. 7, 132-140.

Bailey, L. and Ball, B.V., 1991. Honey bee pathology. Harcourt Brace Jovanovich. Sidcup, UK.

Bailey, L., 1965b. The occurrence of chronic and acute bee paralysis viruses in bees outside Britain. J. Invert. Pathol. 7, 167-169.

Bailey, L., 1967. The incidence of virus diseases in the honey bee. Ann. Appl. Biol. 60, 43-48.

Bailey, L., 1976. Viruses attacking the honey bee. In: Lauffer, M.A., Bang, F.B., Maramorosch, K., Smith, K.M. (Eds.), Advances in Virus Research volume 20. Academic Press, New York, pp. 271-304.

Bailey, L., Ball, B.V., Carpenter, J.M., Woods, R.D., 1980. 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., 1983. Honeybee paralysis: its natural spread and its diminished incidence in England and Wales. J. Apic. Res. 22, 191-195.

Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D., 1968. The purification and properties of chronic bee-paralysis virus. J. Gen. Virol. 2, 251-260.

Bakonyi, T., Farkas, R., Szendroi, A., Dobos-Kovacs, M., Rusvai, M., 2002. Detection of *acute bee paralysis virus* by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. Apidologie 33, 63-74.

Ball, B.V., 1999. Paralysis. In: Colin, M.E., Ball, B.V., Kilani, M. (Eds.), Bee disease diagnosis. Options Mediterannéennes, pp. 81-89.

Ball, B.V. and Allen, M.F., 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (Apis mellifera) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. Ann. Appl. Biol. 113, 237-244.

Ball, B.V. and Bailey, L., 1991. Viruses of honey bees. In: Adams, J.R., Bonami, J.R. (Eds.), Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca Raton, pp. 525-551.

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. and Bailey, L., 1997. Viruses. In: Morse, R.A. and K. Flottum, K. (Eds), Honey bee pests, predators, and diseases. A.I. Root Company, Medina, pp. 11-32.

Ball, B.V., 1999. Paralysis. In: Colin, M.E., Ball, B.V., Kilani, M. (Eds.), Bee disease diagnosis. Options Mediterannéennes, pp. 81-89.

Barat-Houari, M., Hilliou, F., Jousset, F.X., Sofer, L., Deleury E., Rocher, J., Ravallec, M., Galibert, L., Delobel, P., Feyereisen, R., Fournier, P., Volkoff, A.N.,2006. Gene expression profiling of *Spodoptera frugiperda* hemocytes and fat body using cDNA microarray reveals polydnavirus-associated variations in lepidopteran host genes transcript levels. BMC Gen. 7:160.

Basnayake, V.R., Sit, T.L., Lommel, S.A., 2006. The genomic RNA packaging scheme of *Red clover necrotic mosaic virus*. Virology 345, 532-539.

Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M., Davison, S., 2002a. Development of infectious transcripts and genome manipulation of *Black queen-cell virus* of honey bees. J. Gen. Virol., 83, 3139-3146.

Benjeddou, M., Leat, N., Davison, S., 2002b. *Black queen-cell virus* RNA is infectious in honey bee pupae. J. Invert. Pathol. 81, 205-206.

Bergem, M., Norberg, K., Aamodt, R.M., 2006a. Long-term maintenance of *in vitro* cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. BMC Dev. Biol. 6, 17-26.

Bergem, M., Norberg, K., Roseth, A., Meuwissen, T., Lien, S., Aamodt, R.H., 2006b. Chimeric honeybees (*Apis mellifera*) produced by Transplantation of embryonic cells into pre-gastrula stage embryos and detection of chimerism by use of microsatellite markers. Mol. Reprod. Dev. 73, 475-481.

Blanchard, P., Olivier, V., Iscache, A.L., Celle, O., Schurr, F., Lallemand, P., Ribière, M., 2008a. Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates. J. Invert. Pathol. 97, 182-185.

Blanchard, P., Ribière, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A.L., Faucon, J.P., 2007. Evaluation of a real-time two step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. J. Virol. Methods 141, 7-13.

Blanchard, P., Schurr, F., Olivier, V., Celle, O., Antúnez, K., Bakonyi, T., Berthoud, H., Haubruge, E., Higes, M., Kasprzak, S., Koelberger, H., Kryger, P., Thiery, R., Ribière, M., 2009. Phylogenetic analysis of the RNA-dependant RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographical regions. Virus Res. 144, 334-338.

Blanchard, P., Regnault, J., Schurr, F., Dubois, E. & Ribière, M., 2012. Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. J. Virol. Methods, 180, 26-31.

Brierley, I., 1995. Ribosomal frameshifting on viral RNAs. J. Gen. Virol., 76, 1885-1892.

Broeker, W., 1961. Nouvelles connaissances sur l'origine de la maladie noire des abeilles mellifères. Bull.Apic. IV, 199-199.

Broeker, W., 1964. Le Mal de Mai. Bull.Apic. VII, 42-42.

Burnside, C.E., 1945. The cause of paralysis of honeybees. Am. Bee J. 85, 354-363.

Carletto, J., Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Ribière, M., 2009. How to detect and quantify an honeybee virus: The CBPV (Chronic bee paralysis virus). Poster. Workshop New molecular tools, Bern 19-20 May 2009. In.

Celle, O., Blanchard, P., Schurr, F., Olivier, V., Cougoule, N., Faucon, J.P., Ribière, M., 2008. Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and RNA replication in various host : possible ways of spread. Virus Res. 133, 280-284.

Chauzat, M.P., Faucon, J.P., Martel, A.C., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M., 2006. Les pesticides, le pollen et les abeilles. Phytoma - La Défense des Végétaux. 594, 40-45.

Chauzat, M.P. and Faucon, J.P., 2007. Des cires sentinelles de l'environnement. Phytoma - La Défense des Végétaux. 608, 8-12.

Chen, Y., Evans, J., Feldlaufer, M., 2006a. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, Apis mellifera. J. Invert. Pathol. 92, 152-159.

Chen, Y.P., Pettis, J.S., Collins, A., Feldlaufer, M.F., 2006b. Prevalence and transmission of honeybee viruses. Appl. Environ. Microbiol. 72, 606-611.

Chen, Y., Pettis, J.S., Feldlaufer, M.F., 2005. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. J. Invert. Pathol. 90, 118-121.

Choi, Y.G., Grantham, G.L., Rao, A.L., 2000. Contributions of the N-Terminal Arginine-Rich Motif of BMV Capsid Protein to Virion Stability and RNA Packaging. Virology 270, 377-385.

Choi, Y.G. and Rao, A.L., 2003. Packaging of brome mosaic virus RNA3 is mediated through a bipartite signal. Virology 77, 9750–9757.

Cowan, G.H., Torrance, L., Reavy, B., 1997. Detection of potato mop-top virus capsid readthrough protein in virus particles. J. Gen. Virol. 78, 1779-1783.

Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., Vanengelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 318, 283-287.

Dall, D.J., 1985. Inapparent infection of honey bee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia. Ann. Appl. Biol. 106, 461-468.

de Miranda, J.R., Drebot, M., Tyler, S., Shen, M., Cameron, C.E., Stoltz, D. B., Camazine, S. M., 2004. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. J.Gen.Virol. 85, 2263-2270.

de Miranda, J.R., Cordoni, G., Budge, G.E., 2010b. The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. J. Invert. Pathol. 103, S30-S47;

de Miranda, J.R., Dainat, B., Locke, B., Cordoni, G., Berthoud, H., Gauthier, L., Neumann, P., Budge, G.E., Ball, B.V., Stoltz, D.B., 2010b. Genetic characterization of slow bee paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera* L.). J. Gen. Virol. 91, 2524–2530.

Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, Jr, H.F., Evans, J.D., Chen, Y., 2011. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. J. Gen. Virol. 92, 151-155.

Dougherty, W.G., Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D., 1988. Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. EMBO J. 7, 1281-1287.

Dreher, T.W. and Miller, W.A., 2006. Translational control in positive strand RNA plant viruses. Virology 344, 185-197.

El-Bacha, T., Menezes, M.M.T., Azevedo e Silva, M.C., Sola-Penna, M., Da Poian, A.T., 2004. Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. Mol. Cell. Bioch. 266, 191-198.

Faucon, J.P., Vitu, C., Russo, P., Vignoni, M., 1992. Diagnostic de la paralysie aiguë : application à l'épidémiologie des maladies virales en France en 1990. Apidologie. 23, 139-146.

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.

Field, L.M. and Devonshire, A.L., 1998. Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid Myzus persicae (Sulzer) are part of a gene family. Bioch. J. 330, 169-173.

Firth, A.E., Blitvich, B.J., Wills, N.M., Miller, C.L., Atkins, J.F., 2010. Evidence for ribosomal frameshifting and a novel overlapping gene in the genomes of insect-specific flaviviruses. Virology 399, 153-166.

Firth, A.E. and Brown, C.M., 2005. Detecting overlapping coding sequences with pairwise alignments. Bioinformatics 21, 281-292.

Firth, A.E. and Brown, C.M., 2006. Detecting overlapping coding sequences in virus genomes. BMC Bioinfo. 7, 75-80.

Firth, A.E., Wang, Q.S., Jan, E., Atkins, J.F., 2009. Bioinformatic evidence for a stem-loop structure 5'-adjacent to the IGR-IRES and for an overlapping gene in the bee paralysis dicistroviruses. J. Virol. 6, 193-200.

Firth, A.E., Wills, N.M., Gesteland, R.F., Atkins, J.F., 2011. Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3’ RNA structural element. Nucl. Acids Res. 39, 6679-6691.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2012. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>.

Fragkoudis, R., Attarzadeh-Yazdi, G., Nash, A.A., Fazakerley, J.K., Kohl, A., 2009. Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. J. Gen. Virol. 90, 2061-2072.

Fujiyuki, T., Matsuzaka, E., Nakaoka, T., Takeuchi, H., Wakamoto, A., Ohka, S., Sekimizu, K., Nomoto, A., Kubo, T., 2009. Distribution of Kakugo virus and its effects on the gene expression profile in the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L. J. Virol. 83, 11560-11568.

Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of worldagriculture confronted with pollinator decline. Ecol. Econ. 83, 810-821.

Gascuel, J., Masson, C., Bermudez, I., Beadle, D.J., 1994. Morphological analysis of honeybee antennal cells growing in primary cultures. Tissue Cell. 26, 551-558.

Genersh, E. and Aubert, M., 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (Apis mellifera L.). Vet. Res. 41, 1-20

Ghosh, R.C., Ball, B.V., Willcocks, M.M., Carter, M.J., 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. J.Gen.Virol. 80, 1541-1549.

Giauffret, A., Duthoit, J.L., Caucat, M.J., 1966a. Etude histologique du tissu nerveux de l'abeille atteinte de maladie noire. Bull. Apic. IX, 221-228.

Giauffret, A., Duthoit, J.L., Caucat, M.J., 1966b. Etude virologique de quelques cas de maladie noire de l'abeille en France. Recl. Méd. Vét. CXLII, 819-829.

Giauffret, A., Caucat, M.J., Amargier, A., Bres, N., 1967. Etude histopathologique de la maladie noire de l'abeille. Bull. Apic. X, 133-144.

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.

Govan, V.A., Leat, N., Allsopp, M., Davison, S., 2000. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. Virol. 277, 457-463.

Grabensteiner, E., Ritter, W., Carter, M.J., Davison, S., Pechhacker, H., Kolodziejek, J., Boecking, O., Derakhshifar, I., Moosbeckhofer, R., Licek, E., Nowotny, N., 2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 93-104.

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.

Irving, P., Troxler, L., Heuer, T.S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., Hetru, C., 2001. A genome-wide analysis of immune responses in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 15119-15124.

Jones, D.T., 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J Mol Biol 292, 195-202.

Kim, K.H. and Lommel, S.A., 1998. Sequence Element Required for Efficient 21 Ribosomal Frameshifting in Red Clover Necrotic Mosaic Dianthovirus. Virology, 250, 50-59

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. Lefkowitz, E.J., 2011. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego.

Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. Roy. Soc. Lond., B. 274, 303–313.

Kozak, M., 1989. The scanning model for translation: an update. J. Cell. Biol., 108, 229-241.

Kreissl, S. and Bicker, G., 1992. Dissociated neurons of the pupal honeybee brain in cell culture. J. Neuroc. 21, 545-556.

Kulincevic, J.M. and Rothenbuhler, W.C., 1975. Selection for resistance and susceptibility to hairless-black syndrome in the honeybee. J.Invert.Pathol. 25, 289-295.

Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 157, 105-132.

Lantez, V., Dalle, K., Charrel, R., Baronti, C., Canard, B., Coutard, B., 2011. Comparative Production Analysis of Three Phlebovirus Nucleoproteins under Denaturing or Non-Denaturing Conditions for Crystallographic Studies. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e936.

Lanzi, G., de Miranda, J.R., Boniotti, M.B., Cameron, C.E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S.M., Rossi, C., 2006. Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (Apis mellifera L.). J. Gen. Virol. 80, 4998–5009

Laurent, S., Masson, C., Jacob, I., 2002. Whole-cell recording from honeybee olfactory receptor neurons: ionic currents, membrane excitability and odorant response in developing workerbee and drone. Eur. J. Neurosci. 15, 1139-1152.

Leat, N., Ball, B., Govan, V., Davison, S., 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus from honey bees. J. Gen. Virol. 81, 2111-2119.

Levy, F., Bulet, P., Ehret-Sabatier, L., 2004. Proteomic Analysis of the Systemic Immune Response of *Drosophila.* Mol. Cell. Prot. 86, 607-616.

Lin, J.W., Ding, M.P., Hsu, Y.H., Tsai, C.H., 2007. Chloroplast phosphoglycerate kinase, a gluconeogenetic enzyme, is required for efficient accumulation of Bamboo mosaic virus. Nucl. Acids Res. 35, 424-432.

Lowry, O.H., Rosebrough, A.L. Farr, N.J., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., Sela, I., 2007. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. J. Gen. Virol. 88, 3428–3438

Mooij, W.T.M., Mitsiki, E., Perrakis, A., 2009. ProteinCCD: enabling the design of protein truncation constructs for expression and crystallization experiments. Nucl. Acids. Res. 37, W402-W405.

Morison, G.D., 1936. Bee paralysis. Rothamsted Conferences. XXIII, 16-21.

Nogales, A., Marquez-Jurado, S., Galan, C., Enjuanes, L., Almazan, F., 2012. Transmissible Gastroenteritis Coronavirus RNA-Dependent RNA Polymerase and Nonstructural Proteins 2, 3, and 8 Are Incorporated into Viral Particles. J. Virol. 86, 1261-1266.

Ni, P., Wang, Z., Ma, X., Das, N.C., Sokol, P., Chiu, W., Dragnea, B., Hagan, M., Kao, C.C., 2012. An Examination of the electrostatic interactions between the N-terminal tail of the Brome Mosaic Virus coat protein and encapsidated RNAs. J. Mol. Biol. 419, 284-300.

Ogino, T., Iwama, M., Kinouchi, J., Shibagaki, Y., Tsukamoto, T., Mizumoto, K., 1999. Involvement of a Cellular Glycolytic Enzyme, Phosphoglycerate Kinase, in Sendai Virus Transcription. J. Biol. Chem. 274, 35999-6008.

Olivier, V. and Ribière, M., 2006. Les virus infectant l'abeille *Apis mellifera* : le point sur leur classification. Virologie. 10, 267-278.

Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., Dubois, E., Tordo, N., Thiéry, R., Houlgatte, R. & Ribière, M., 2008a. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. Virus Res 132, 59-68.

Olivier, V., Massou, I., Celle, O., Blanchard, P., Schurr, F., Ribière, M., Gauthier, M., 2008b. In situ hybridization assays for localization of the Chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. J. Virol. Methods 153, 232-237.

Ongus, J. R., Peters, D., Bonmatin, J. M., Bengsch, E., Vlak, J. M., van Oers, M. M., 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite Varroa destructor. J.Gen.Virol. 85, 3747-3755.

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.

Park, S.H., Sit, T.L., Kim, K.H., Lommel, S.A., 2012. The Red clover necrotic mosaic virus capsid protein N-terminal lysine-rich motif is a determinant of symptomatology and virion accumulation. Mol. Plant Pathol. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00784.x.

Patramool, S., Surasombatpattana, P., Luplertlop, N., Sévéno, M., Choumet, V., Thomas, F., Missé, D., 2011. Proteomic analysis of an Aedes albopictus cell line infected with Dengue serotype 1 and 3 viruses. Parasit. Vectors 4:138.

Peter, K.A., Gildow, F., Palukaitis, P., Gray, S.M., 2009. The C terminus of the polerovirus P5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. J. Virol. 83, 5419-5429.

Randolt, K., Gimple, O., Geissendörfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Mueller, M.J., Albert, S., Tautz, J., Beier, H., 2008. Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. Arch. Insect Bioch. Physiol. 69, 155-167.

Ribière, M., Blanchard, P., Schurr, F., Lallemand, P., Celle, O., Olivier, V., Faucon, J.P., 2006. Study of Chronic bee paralysis virus (CBPV) repartition in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. EurBee. Prague 10-15 September 2006. In.

Ribière, M., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Faucon, J.P., Aubert, M., 2004. Asymptomatic contamination of adult honey bee by the chronic bee paralysis virus (CBPV). Viral load relative quantification assay by real time-PCR. In: Bernardinelli, I., Milani, N. (Eds.), Proceeding of the first european conference of apidology, EurBee, Udine, Italy, pp. 94-95.

Ribière, M., Faucon, J.P., Pépin, M., 2000. Detection of chronic bee paralysis virus infection: application to a field survey. Apidologie 31, 567-577.

Ribière, M., Lallemand, P., Iscache, A.L., Schurr, F., Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Faucon, J.P., 2007. Spread of infectious Chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7711-7716.

Ribière, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Aurières, C., Faucon, J.P., Pépin, M., 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. Apidologie 33, 339-351.

Ribière, M., Olivier, V., Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Drajnudel, P., Faucon, J. P., Thiéry, R., Chauzat, M. P, 2008. Les effondrements de colonies d'abeilles : le cas du CCD (colony collapse disorder) et du virus IAPV (Israeli acute paralysis virus). Virologie 12, 319-322.

Ribière, M., Ball, B., Aubert, M., 2008. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. In: Aubert, M., Ball, B., Fries, I., Moritz, R.F., Milani, N., Bernardinelli, I. (Eds.), Virology and the honey bee. European Commission, Brussels, pp. 15-119.

Ribière, M., Carletto, J., Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Chevin, A., Faucon, J.P., 2010a. Detection of pathogens in honeybee mortalities observed in France during 2008 to 2009. EurBee. Ankara 7-9 September 2010. In.

Ribière, M., Olivier, V. Blanchard, P., 2010b. Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? J. Invert. Pathol. 103, S120-S131.

Rinderer, T.E., Green, T.J., 1976. Serological relationship between chronic bee paralysis virus and the causing hairless-black syndrome in the honeybee. J. Invert. Pathol. 27, 403-405.

Ritter, J.B., Wahl, A.S., Freund, S., Genzel, Y., Reichl, U., 2010. Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling. BMC Syst. Biol. 4:61.

Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of Varroa destructor. J. Invert. Pathol. 103, S96-S119.

Runckel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G., Ganem, D., Andino, R., DeRisi, J. L., 2011.Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. PLoS One. 6, 1-18.

Shiotsuki, T. and Kato, Y., 1999. Induction of carboxylesterase isozymes in Bombyx mori by E. coli infection. Insect Bioch. Mol. Biol. 29, 731-736.

Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in Apis mellifera L. and Varroa destructor mite populations in France. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7185-7191.

Tong, Y., Jiang, H., Kanost, M.R., 2005. Identification of plasma proteases inhibited by *Manduca sexta* Serpin-4 and Serpin-5 and their ssociation with components of the prophenol oxidase activation pathway. J. Biol. Chem. 280, 14932-14942.

Vecchi, M.A. and Zambonelli, C., 1961. Recherches sur l'étiologie du "mal noir" des abeilles (*Apis mellifera* L.) en Italie. Bull. Apic. IV, 181-195.

Wang, A., Carrier, K., Chisholm, J., Wieczorek, A., Huguenot, C., Sanfaçon, H., 1999. Proteolytic processing of tomato ringspot nepovirus 3C-like protease precursors: definition of the domains for the VPg, protease and putative RNA-dependent RNA polymerase. J. Gen. Virol. 80, 799-809.

Wellink, J., Rezelman, G., Goldbach, R., Beyreuther, K., 1986. Determination of the proteolytic processing sites in the polyprotein encoded by the bottom-component RNA of Cowpea mosaic virus. J. Virol. 59, 50-58.

Zhang, S., Weng, L., Geng, L., Wang, J., Zhou, J., Deubel, V., Buchy, P., Toyoda, T., 2010. Biochemical and kinetic analysis of the influenza virus RNA polymerase purified from insect cells. Bioch. Biophys. Res. Commun. 390, 570-574.

Zou, Z. and Jiang, H., 2005. Manduca sexta serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8. cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. J. Biol. Chem. 280, 14341-14348.

Zou, Z., Lopez, D.L., Kanost, M.R., Evans, J.D., Jiang, H., 2006. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. Insect Mol. Biol. 15, 603-614.

Annexes

Annexe 1 : Les 12 principaux virus de l’abeille et leur virose

Virus	Découverte	Infection expérimentale	Conséquences de la virose et symptômes
Virus de la **paralysie aiguë (ABPV, Acute bee paralysis virus)**	Lors d'études sur le CBPV (1963).	Symptômes de **paralysie précoce,** mortalités rapides.	Participe aux affaiblissements, associé à *V. destructor* en entraînant des mortalités d'ouvrières et de couvain.
Virus de la **cellule royale noire** (**BQCV**, Black queen cell virus)	A partir de **larves de reines** dans des **alvéoles à parois noires** (1977).	Dépendant de *N. apis* pour l'infection des adultes.	Participerait à des mortalités d'ouvrières, associé à *N. apis.* Entraînerait des mortalités de larves de reines.
Virus X de l'abeille (**BVX, Bee virus X**)	Lors de l'étude d'autres virus (1974).	Pas de symptôme, raccourcirait la durée de vie des adultes	Participerait à des mortalités d'ouvrières, associé à *M. mellificae*.
Virus Y de l'abeille (**BVY, Bee virus Y**)	A partir d'abeilles mortes en Angleterre (1980).	Dépendant de *N. apis* pour l'infection des adultes.	Participerait à des mortalités d'ouvrières, associé à *N. apis*.
Virus de la **paralysie chronique** (**CBPV**, **Chronic bee paralysis virus**)	Maladie connue depuis l'antiquité (Aristote) : **Maladie noire** ou **Paralysie chronique**.	**Symptômes paralytiques** plusieurs jours avant la mort.	Entraîne des mortalités, parfois importantes, d'ouvrières **dépilées et noires** avec des symptômes de **tremblements**.
Virus des **ailes nuageuses (CWV, Cloudy wing virus)**	A partir d'**abeilles aux ailes opaques** (1980).	Pas de symptôme précis, études sujettes à controverse.	Conséquences mal connues. La dissémination du virus serait associée à *V. destructor*.
Virus des **ailes déformées (DWV, Deformed wing virus)**	A partir d'abeilles provenant du Japon (1983).	**Déformations des ailes et du corps** des abeilles naissantes.	Participe aux affaiblissements, associé à *V. destructor* en entraînant des mortalités d'ouvrières et **des déformations d'abeilles naissantes**.
Virus filamenteux (**FV, Filamentous virus**)	A partir d'hémolymphe laiteuse d'abeilles aux USA (1977).	Pas de symptôme, ni mortalité.	Conséquences mal connues. Virus considéré comme commun mais non pathogène.
Virus **israélien de la paralysie aiguë** (**IAPV**, Israeli paralysis virus)	Décrit pour la 1ère fois en 2002, découvert en **Israël** en 2004, puis en France en 20048	Symptômes rappelant ceux de la **paralysie aiguë**, mortalités rapides	Participerait aux affaiblissements, associé à *V. destructor,* pourrait être un marqueur du CCD (Cox-Foster et al., 2007)
Virus du **Cachemire (KBV, Kashmir bee virus)**	A partir d'abeilles *Apis cerana* provenant du **Cachemire** (1974).	Mortalités très rapides sans symptôme.	Participerait aux affaiblissements, associé à *V. destructor*.
Virus du **couvain sacciforme (SBV, Sacbrood virus)**	1er virus identifié comme responsable d'une maladie : le **couvain sacciforme** (1917).	Mortalités de **larve en forme de sac**.	Mortalités de **larves en forme de sac** (fluide entre le tégument et le corps), entraînant des affaiblissements de colonies.
Virus de la **paralysie lente (SBPV, Slow bee paralysis virus)**	Lors de l'étude du BVX (1974).	Symptômes de **paralysie tardive**, suivi de mortalités.	Participerait à des mortalités d'ouvrières associé à *V. destructor*.

(Olivier V. & Ribière M., 2006)

Annexe 2 : Les couples d’amorces utilisés pour amplifier les séquences des protéines recombinantes

Nom de la protéine	ORF ciblé	Position sur la séquence d'acides aminés	Amorces sens	Amorces anti-sens
CBPV 1	ARN 1 ORF 1	2-852 (entière)	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT AAT CTT AGC AAT GTC AAT GAT	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA CAT CTC TTC TTC GGT GTC AGC
CBPV 2	ARN 1 ORF 1	2-155	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT AAT CTT AGC AAT GTC AAT GAT	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA TGG TAT GGA ATC TGG GAG ATC
CBPV 3	ARN 1 ORF 1	2-523	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT AAT CTT AGC AAT GTC AAT GAT	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA GTC AAT GTG ACG TGC GCG TCG
CBPV 4	ARN 1 ORF 1	238-523	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT GAT TTC CCC GGA GCG TTG CTC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA GTC AAT GTG ACG TGC GCG TCG
CBPV 5	ARN 1 ORF 1	638-773	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT GAA TCT GAT TAT TGT GAA GCC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA TGT CGC CAT TCT GGG TAG CGT
CBPV 6	ARN 1 ORF 2	2-285 (entière)	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT TCA ATG ATG TTC TTT CAT CCG	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA CTC CAT CCC CCT TCT TCG TGA
CBPV 7	ARN 1 ORF 2	2-201	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT TCA ATG ATG TTC TTT CAT CCG	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA ATG GGT TGC AGA GAT GTT TGA
CBPV 8	ARN 1 ORF 2	2-241	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT TCA ATG ATG TTC TTT CAT CCG	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA GAC AGA GCA ACG CTC CGG GGA
CBPV 9	ARN 1 ORF 3	2-648 (entière)	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT CCT GCC CTG ACA ACA GCG AAC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA AAT GTG GTG AAG TGT AGG ATC
CBPV 10	ARN 1 ORF 3	2-621	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT CCT GCC CTG ACA ACA GCG AAC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA GTT AGG CAC ATA CCC AAT GTC
CBPV 11	ARN 1 ORF 3	191-621	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT CGC GAC ACT CCG TTA CGC CAG	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA GTT AGG CAC ATA CCC AAT GTC
CBPV 12	ARN 1 ORF 3	191-648	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT CGC GAC ACT CCG TTA CGC CAG	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA AAT GTG GTG AAG TGT AGG ATC
CBPV 13	ARN 2 ORF 1	2-108 (entière)	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT GAT AGA GTC CTA CCA TTA TCC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA ATG ATC GAG AGC GTC TGC GGG
CBPV 14	ARN 2 ORF 1	2-99	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT GAT AGA GTC CTA CCA TTA TCC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA AGC GTG AAC GGG CCA TCG CAC
CBPV 15	ARN 2 ORF 2	2-581 (entière)	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT TGC GAT GGC CCG TTC ACG CTC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA CCG TGC AAG GCC GAT CAT GGC
CBPV 16	ARN 2 ORF 2	2-501	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT TGC GAT GGC CCG TTC ACG CTC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA GAT GTT ATA CTG CGT CGT CAT
CBPV 17	ARN 2 ORF 2	199-501	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT TCC GAT TTT CTC GCC CGA CGT	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA GAT GTT ATA CTG CGT CGT CAT
CBPV 18	ARN 2 ORF 3	2-180 (entière)	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT GCC CGT TCA CGC TCA ATC TCC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA CTG TGC TGG AGG AGC TGT CTG
CBPV 19	ARN 2 ORF 3	2-114	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT GCC CGT TCA CGC TCA ATC TCC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA CTT CTC TGA GCG TCG AGC TGA
CBPV 20	ARN 2 ORF 3	25-114	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT CGC CGG TCC ATT CTA GAC CGC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA CTT CTC TGA GCG TCG AGC TGA
CBPV 21	ARN 2 ORF 3	25-180	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT CGC CGG TCC ATT CTA GAC CGC	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA CTG TGC TGG AGG AGC TGT CTG
CBPV 22	ARN 2 ORF 4	2-146 (entière)	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT TGT TGC CTG CAA CAG ATG CTT	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA ACA CAC CGG CGT CTC AAC TGT
CBPV 23	ARN 2 ORF 4	2-54	GAAAACCTGTACTTCCAGGGT TGT TGC CTG CAA CAG ATG CTT	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTATTA GTG CTG GAG GAG CTG TCT GTT
Amorce sens universelle utilisée pour la seconde PCR			CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TA GAAAACCTGTACTTCCAGGGT	

Les nucléotides en rouges = la séquence du site de clivage de la protéase
Les nucléotides en bleus soulignés = la séquence des sites *attB1* et *attB2*
Les nucléotides en verts = les nucléotides rajoutés non spécifiques
Les nucléotides en noirs = les nucléotides spécifiques à la séquence d'intérêt

Annexe 3 : Communications orales et affichées lors de congrès nationaux et internationaux

Communication orale

Comparaison entre les protéomes d'abeilles infectées par le virus de la paralysie chronique et d'abeilles non infectées

Aurore Chevin, Julien Bauwens, Bach Kim Nguyen, Philippe Blanchard, Frank Schurr, Richard Thiéry, Eric Haubruge, Frédéric Francis, Magali Ribière.

Immuninv 2011, 4-6 mai 2011, La Colle sur Loup

L'abeille, *Apis mellifera L*, possède un rôle économique et écologique important de part son activité de pollinisation. Cet insecte pollinisateur est exposé au milieu extérieur et en tant qu'insecte social, il vit dans une grande promiscuité. L'abeille est donc exposée à de nombreux pathogènes dont les virus. La réponse immunitaire contre ces pathogènes se fait via l'hémolymphe par des cellules et la production de protéines. Cependant, les protéines impliquées dans la réponse immunitaire suite à une infection virale sont peu connues.

Le virus de la paralysie chronique (CBPV, Chronic Bee Paralysis Virus) est l'agent étiologique d'une maladie contagieuse des abeilles adultes. Le génome du virus est composé de 2 ARNs précédemment caractérisés, l'ARN 1 (3674 nt) et l'ARN 2 (2305 nt), mais les protéines virales codées par les différents ORFs des 2 ARNs ne sont pas encore clairement identifiées.

Dans cette étude, les protéines extraites d'hémolymphe provenant d'abeilles infectées par le virus et non-infectées ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Les spots des protéines différentiellement exprimées ont été excisés, et après digestion à la trypsine les fragments peptidiques ont été analysés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Les masses des empreintes peptidiques obtenues ont été comparées avec celles des bases de données protéiques (Métazoaires et Virales). Ainsi, suite à une infection par le CBPV certaines protéines intervenant dans le système immunitaire de l'abeille ont été identifiées.

Communications affichées

Comparison of proteome between infected and uninfected honey bees with the Chronic Bee Paralysis Virus.

Aurore Chevin**,** Julien Bauwens, Bach Kim Nguyen, Philippe Blanchard, Frank Schurr**,** Richard Thiéry, Eric Haubruge, Magali Ribière, Frédéric Francis**.**

EURBEE 2010, 4th European conference of apidology, 7-9 september 2010, Ankara, Turkey

The Chronic bee paralysis virus (CBPV) is the etiologic agent of an infectious and contagious disease of adult honey bees (*Apis mellifera* L.) called Paralysis. The genome of this virus is composed of two previously characterized RNAs, RNA1 (3674 nt) and RNA2 (2305 nt). RNA1 and RNA2 respectively encode three and four open reading frames (ORFs). The amino acid sequence of ORF3 on RNA1 has shown similarities with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of positive single-stranded RNA viruses whereas the ORF3 on RNA2 encodes a putative structural protein. Although the complete sequences of RNA1 and RNA2 have been determined, CBPV cannot be assigned to any viral family. Consequently, characterization of viral proteins is essential in order to suggest a taxonomic position of CBPV. Indeed, this virus could be the first type specie of a new viral family.

In this study, proteins extracted from hemolymph collected from virus-infected and uninfected bees were separated by two-dimensional gel electrophoresis to identify viral proteins. Differentially expressed protein spots were excised, and after trypsin digestion the peptide fragments were analyzed by matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Resulting peptide mass fingerprints were compared with those in protein databases and some viral protein sequences have been identified. In addition of these identifications, these results provide first information on differential honey bee protein expression after CBPV infection.

Comparison of proteome between infected and uninfected honey bees with the Chronic Bee Paralysis Virus

Aurore Chevin[1], Julien Bauwens[2], Bach Kim Nguyen[2], Philippe Blanchard[1], Lionel Hartert[1], Frank Schurn[1], Richard Thiéry[1], Eric Haubruge[2], Magali Ribière[1], Frédéric Francis[2].

[1]Anses, Sophia Antipolis, France
[2]University of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech, Department of Functional and Evolutionary Entomology, Gembloux, Belgium

Background

The Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) is the etiologic agent of an infectious and contagious disease of adult honey bee (*Apis mellifera* L.) called Paralysis. The genome of this virus is composed of two previously characterized RNAs, RNA1 (3,6 kb) and RNA2 (2,3 kb). RNA1 and RNA2 respectively encode three and four open reading frames (ORFs) (Olivier et al., 2008) (Figure 1).
The amino acids sequence of ORF3 on RNA1 has shown similarities with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of positive single-stranded RNA viruses whereas the ORF3 on RNA2 encodes a predicted structural protein (psP) (Blanchard et al., 2009).
Although the complete sequences of RNA1 and RNA2 have been determined, CBPV cannot be assigned to any viral family. Consequently, characterization of viral proteins is essential in order to suggest a taxonomic position of CBPV. Indeed, the virus should be considered as the prototype of a new group of positive-stranded RNA viruses.

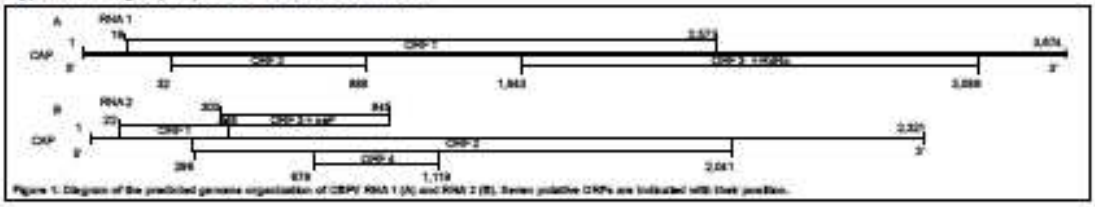


Figure 1: Diagram of the predicted genome organization of CBPV RNA 1 (A) and RNA 2 (B). Seven putative ORFs are indicated with their position.

Methods

The aim of the project was to compare proteome between CBPV-infected and uninfected bee in order to deduce CBPV proteins.

Ninety adult bees were infected using CBPV purification (10^8 virus copies) and the same number of bees was inoculated with phosphate buffer (control) (Figure 2).

At the onset of chronic paralysis symptoms, hemolymph was collected in pool of 10 bees, part of hemolymph was used to assess CBPV quantity by real time RT-PCR (Blanchard et al., 2007) and to detect CBPV negative strand (Celle et al., 2008).

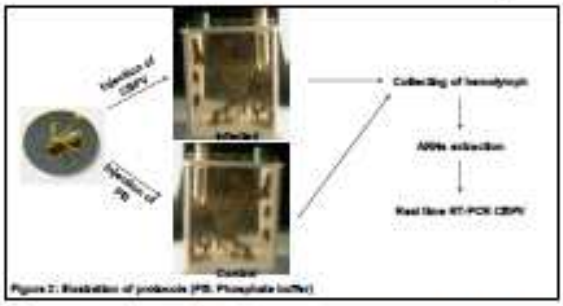


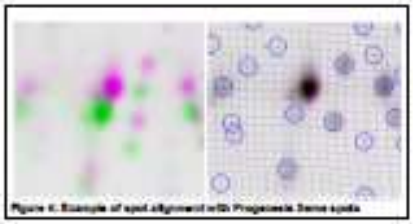
Figure 2: Illustration of protocole (PB: Phosphate buffer)


Figure 3: Two-dimensional gel of extracted proteins from CBPV-infected hemolymph and stained with silver nitrate

For protein analysis, hemolymph was suspended in a extraction proteins solution and protein concentration was determinated by the method of Bradford using BSA as the standard.

A two-dimensional electrophoresis was run in order to confirm integrity of proteins. For isoelectric focusing (IEF), a 200 µg protein sample (infected hemolymph) has been loaded on 24 cm non linear IPG strip, pH 3-11 and IEF was performed at 20° C according to a defined program. After IEF, the strip was transferred to SDS-Page 12% for run the second dimension. Then the gel has been stained with silver nitrate solution (Figure 3).

The samples were analyzed by a 2D-DIGE method that is a proteomic technique. 12,5 µg of protein from each experimental condition has been labeled with Cy3 or Cy5 fluorescence dyes and a mixture of different samples (internal standard) was labeled with Cy2 fluorescence dye. These labeled proteins have been loaded on 24 cm strip to carry out a two-dimensional electrophoresis as described previously.
After migrations, gels have been scanned with Typhoon 9400. This machine excited the 3 CyDyes successively according to their excitation wavelengths. The images have been analyzed with the program called "Progenesis Same Spots" that allowed alignment between internal standard and labeled (Cy3/Cy5) samples spots (Figure 4), and the detection of differentially expressed protein spots.
These spots will be excised and digested with trypsin. The resulting peptide fragments will be separated by MALDI TOF/TOF. Peptide mass fingerprints will be compared with protein databases via MASCOT.


Figure 4: Example of spot alignment with Progenesis Same spots

Results and future directions

In CBPV-infected hemolymph:
- Real time RT-PCR showed that bees developed the chronic paralysis because the viral load exceeded 10^{12} CBPV copies and bees exhibited symptoms.
- The presence of CBPV negative strand confirmed the virus multiplication.

After the comparison of gel images, about 125 protein spots were selected on 800 differentially expressed spots. The excision of spots and digestion of proteins with trypsin are in progress, and they will be followed by MALDI TOF/TOF analysis.
This analysis should allow to identify some viral proteins and to bring supplementary data on viral family of the Chronic Bee Paralysis Virus.

References: Blanchard P., Ribière M., Celle O., Lallemand P., Schurr F., Olivier V., Iscache A.L., Faucon J.P. (2007) Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. J. Virol. Methods 141, 7-13. / Blanchard P., Schurr F., Olivier V., Celle O., Antúnez K., Belzunces L., Berthoud H., Haubruge E., Higes M., Kryger P., Ribière M. (2008) Hypothesis of honey bee virus transmission between honey bees and bumble bees. J. Invertebr. Pathol. 98, 240-244. / 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 Res. 132, 200-204. / Olivier V., Blanchard P., Chaouch S., Lallemand P., Schurr F., Celle O., Dubois E., Tordo N., Thiéry R., Houlgatte R., Ribière M. (2008) Molecular characterization and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. Virus Res. 132, 59-67.

Proteins characterisation of Chronic Bee Paralysis Virus

Aurore Chevin

Colloque de l'Ecole Doctorale, 23-24 juin 2011, Marseille

The Chronic bee paralysis virus (CBPV) is the etiologic agent of an infectious and contagious disease of adult honey bees (*Apis mellifera* L.) called Paralysis. The genome of this virus is composed of two previously characterized RNAs, RNA1 (3674 nt) and RNA2 (2305 nt). RNA1 and RNA2 respectively encode three and four open reading frames (ORFs). The amino acid sequence of ORF3 on RNA1 has shown similarities with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of positive single-stranded RNA viruses whereas the ORF3 on RNA2 encodes a putative structural protein. Although the complete sequences of RNA1 and RNA2 have been determined, CBPV cannot be assigned to any viral family. Consequently, characterization of viral proteins is essential in order to suggest a taxonomic position of CBPV. Indeed, this virus could be the first type specie of a new viral family.

Different methods were used to characterise CBPV proteins. To verify ORFs reality, the first experimental strategy has been *in vitro* translation with extracted CBPV ARNs. However, this method encountered difficulties. Consequently, to identify viral proteins, a comparison of proteomes between bees infected with the Chronic Bee Paralysis Virus and uninfected bees was performed. Proteins extracted from hemolymph were separated by two-dimensional gel electrophoresis. Differentially expressed protein spots were excised, and after trypsin digestion the peptide fragments were analyzed by Maldi-tof. Resulting peptide mass fingerprints were compared with those in protein databases.

Moreover, recombinant proteins expression is conducted with the goal to produce antibodies and to study the function of non-structural proteins as the RdRp. Thus, twenty two cDNA corresponding to the seven putative ORFs, deleted or not, were amplified and cloned by recombination into two expression plasmids with a N-terminal Hexahistidine tag. After expression in *E. coli*, recombinant proteins were purified under non-denaturing or denaturing conditions. The obtained antigens will be injected into rabbits and polyclonal antibodies will be used to detect viral proteins. Depending of the purification of recombinant proteins expressed the function of non-structural proteins as the RdRp could be studied.

Proteins characterisation of Chronic Bee Paralysis Virus

Aurore Chevin, Anses, Sophia Antipolis, 105 route des Chappes, Les Templiers B.P. 111, 06902 Sophia Antipolis
Thesis co-directors : Richard Thiéry and Hervé Darbon
Thesis speciality: Bioinformatic, structural biology and genomic

Background

The Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) is the etiologic agent of an infectious and contagious disease of adult honey bee (*Apis mellifera* L.) called Paralysis. The genome of this virus is composed of two previously characterized RNAs, RNA1 (3,6 kb) and RNA2 (2,3 kb). RNA1 and RNA2 respectively encode three and four open reading frames (ORFs) (Olivier et al., 2008) (Figure 1).
The amino acids sequence of ORF3 on RNA1 has shown similitaries with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of positive single-stranded RNA viruses whereas the ORF3 on RNA2 encodes a predicted structural protein (psP) (Blanchard et al., 2009).
Although the complete sequences of RNA1 and RNA2 have been determined, CBPV cannot be assigned to any viral family. Consequently, characterization of viral proteins is essential in order to suggest a taxonomic position of CBPV. Indeed, the virus should be considered as the prototype of a new group of positive-stranded RNA viruses.

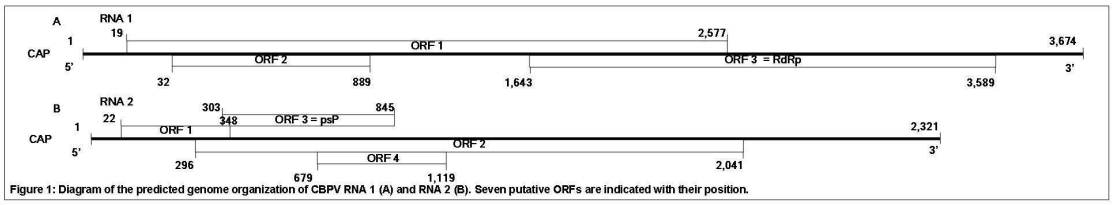


Figure 1: Diagram of the predicted genome organization of CBPV RNA 1 (A) and RNA 2 (B). Seven putative ORFs are indicated with their position.

Methods

- **2D-Dige** : The aim of the project was to compare proteome between CBPV-infected and uninfected bee in order to deduce CBPV proteins.

Adult bees were infected using CBPV purification (10^4 virus copies/µL) and the same number of bees was inoculated with phosphate buffer (control) (Figure 2).
The samples were analyzed by a 2D-DIGE method that is a proteomic technique. Protein from each experimental condition were labeled with Cy3 or Cy5 fluorescence dyes and a mixture of different samples (internal standard) was labeled with Cy2 fluorescence dye. These labeled proteins were used to a two-dimensional electrophoresis (Figure 3).

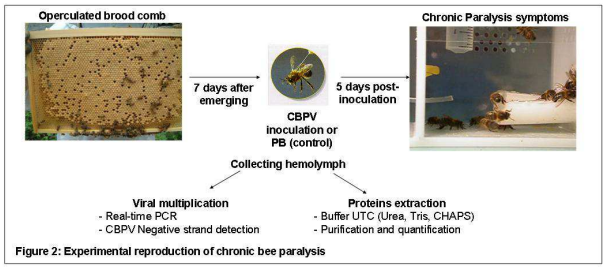


Figure 2: Experimental reproduction of chronic bee paralysis

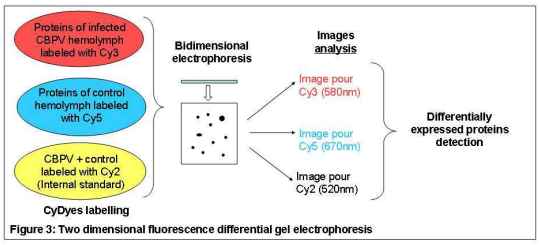
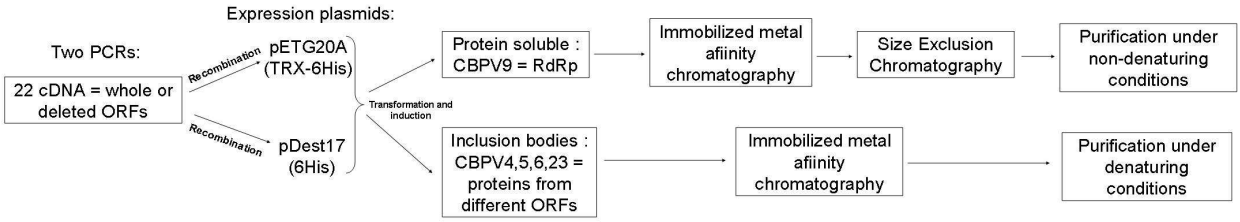


Figure 3: Two dimensional fluorescence differential gel electrophoresis

After migrations, gels were scanned with Typhoon 9400, this machine excited the 3 CyDyes successively according to their excitation wavelengths. The images were analyzed with the program called "Progenesis Same Spots" that allowed alignment between internal standard and labeled (Cy3/Cy5) samples spots, and the detection of differentially expressed protein spots (Figure 3).
These spots were excised and digested with trypsin. The resulting peptide fragments were separated by MALDI TOF/TOF. Peptide mass fingerprints were compared with protein databases via MASCOT.

- **Proteins expression**:



Results and future directions

- **2D-Dige**:
After the comparison of gel images, about 125 protein spots were selected on 800 differentially expressed spots.
➔Three proteins were identified, expression was varied following CBPV infection :
• Serine protease inhibitor (Serpin-5) ➔ This protein could inhibit melanisation in hemolymph.
• Succiny-CoA ligase ➔ Involvement in cellular excitation
• Phenoloxydase subunit A3 ➔ Decrease after infection
BUT no CBPV protein was identified, other method is being programmed. Viral purification will be loaded on a SDS-page, proteins will be detected with coomassie blue, excised and fractionated by Nano-HPLC in order to analyse by MALDI TOF/TOF.
- **Proteins expressions**:
Purified proteins were loaded on a gel (1D) and stained with coomassie blue, we were showed that proteins have expected weight and have a purity above 90%. CBPV9 (= RdRp) will be used to fonctional test and the other proteins (CBPV 4, 5, 6, 23) will be injected to rabbit for antibodies production.

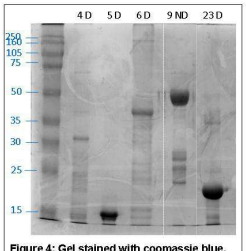


Figure 4: Gel stained with coomassie blue.
D = denaturing conditions
ND = Non denaturing conditions

References: Blanchard P., Schurr F., Olivier V., Celle O., Antúnez K., Bakonyi T., Berthoud H., Haubruge E., Higes M., Kasprzak S., Koelberger H., Kryger P., Thiery R., Ribière M. (2009) Phylogenetic analysis of the RNA-dependant RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographical regions. / Celle O., Blanchard P., Olivier V., Schurr F., Cougoule N., Faucon J.P., Ribiere M. (2008) Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. / Olivier V., Blanchard P., Chaouch S., Lallemand P., Schurr F., Celle O., Dubois E., Tordo N., Thiéry R., Houlgatte R., Ribière M. (2008) Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus, Virus Res. 132, 59-68.

Infectiosité des ARNs nus du virus de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV) par injection à des abeilles adultes *Apis mellifera* L.

Aurore Chevin, Frank Schurr, Philippe Blanchard, Richard Thiéry, Ribière Magali

14ème Journées Francophones de Virologie, 29-30 mars 2012, Paris

La paralysie chronique est une maladie infectieuse et contagieuse affectant les abeilles adultes (*Apis mellifera* L.), elle est causée par le virus de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV). Cette pathologie se manifeste au niveau de la colonie par la présence d'abeilles traînantes, tremblantes, incapables de voler et dans certains cas, d'abeilles mortes, noires dépilées, et aux ailes écartées, occasionnant des pertes importantes d'abeilles adultes pour les apiculteurs. Le CBPV est un virus à ARN simple brin à polarité positive et son génome est composé de deux ARNs, l'ARN1 de 3674 nucléotides et l'ARN2 de 2305 nucléotides. Sept cadres ouverts de lecture (ORFs) putatifs ont été déduits de ces deux ARNs, trois sur l'ARN1 et quatre sur l'ARN2. Cependant seul l'ORF 3 de l'ARN1 possède des similitudes avec l'ARN polymérase ARN dépendante des virus à ARN simple brin positif tandis que l'ORF 3 de l'ARN2 coderait une protéine structurale appelée putative Structurale Protein (pSP). Malgré ces observations, le CBPV ne peut pas être assigné à une famille virale et par conséquent il n'est pas possible d'identifier les protéines virales et leurs fonctions par comparaison de séquences protéiques.

Jusqu'à maintenant les cultures de cellules d'abeilles ne sont pas maîtrisées, il est donc difficile d'étudier l'infection par le CBPV avec un modèle *in vitro* ; néanmoins l'infection expérimentale réalisée à partir d'une purification virale est bien contrôlée chez les abeilles adultes au laboratoire.

Afin de fournir un modèle d'étude *in vivo* de l'infection par ce virus, nous avons évalué l'infectiosité des ARNs viraux nus par inoculation intra thoracique à des abeilles adultes. Les ARNs ont été extraits à partir d'une purification du CBPV et différentes doses d'ARNs ont été inoculées. La survie des abeilles, maintenues en conditions expérimentales, a été suivie en parallèle pour les abeilles infectées et les contrôles négatifs sur une période de cinq à six jours. Des prélèvements ont été effectués quotidiennement, les symptômes et la mortalité ont été notés. La charge génomique du CBPV a été estimée par PCR en temps réel dans les abeilles mortes, symptomatiques et non-symptomatiques. Le brin négatif de l'ARN viral néo-synthétisé lors de la réplication virale a été également recherché. Enfin, une préparation virale provenant d'abeilles symptomatiques issues de l'expérimentation a été comparée par microscopie électronique avec la purification virale afin de vérifier la production de virions suite à l'injection d'ARNs nus.

Nos résultats ont démontré, que suite à une injection d'ARNs nus du CBPV, variant de 10^9 à 10^{10} copies de génome viral, les abeilles ont développé les symptômes de la paralysie chronique au cinquième jour post-inoculation. Cette injection a également conduit à la réplication du virus qui a généré des particules virales observables.

Infectiosité des ARNs nus du virus de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV) par injection à des abeilles adultes, *Apis mellifera* L.

Aurore Chevin, Frank Schurr, Philippe Blanchard, Richard Thiéry, Magali Ribière.

Anses, Laboratoire de Sophia Antipolis, 105 route des Chappes, BP 111 Les templiers, 06902 Sophia-Antipolis

Introduction

• La paralysie chronique est une maladie infectieuse et contagieuse de l'abeille adulte (*Apis mellifera* L.), causée par le virus de la paralysie chronique (Chronic bee paralysis virus, CBPV). Cette maladie entraine l'affaiblissement des colonies et la mort des abeilles et représente une menace importante pour l'apiculture.

• Le CBPV est un virus à ARN simple brin positif mesurant entre 30 et 60 nm de long et environ 20 nm de large[1]. Son génome est composé de 2 ARNs complètement séquencés, ARN 1 : 3674 nt et ARN 2 : 2305 nt, et codant respectivement 3 et 4 ORFs putatifs. Non assigné actuellement (source ICTV 2011), ce virus partage des caractéristiques communes avec les virus des familles *Nodaviridae* et *Tombusviridae*[2].

• La caractérisation des protéines virales et de leurs fonctions est importante pour mieux comprendre les mécanismes d'infection du CBPV. Sans système cellulaire disponible, l'infection expérimentale par injection de CBPV purifié dans l'abeille demeure la méthode couramment utilisée pour produire le virus.

• Dans le cadre du développement d'un modèle *in vivo*, l'infectiosité des ARNs nus du CBPV après inoculation directe dans l'abeille adulte a été évaluée. La concentration optimale devant être injectée afin de reproduire les symptômes de la paralysie chronique a été déterminée, démontrant que les ARNs nus injectés étaient capables de se répliquer et de générer des particules virales.

Méthodes

• Différentes infections expérimentales ont été réalisées selon l'expérimentation schématisée en Figure 1.
➔ Six groupes de 45 abeilles ont été inoculés après anesthésie sous CO_2 avec 4 µl de différentes solutions. Groupes A, B et C : dilutions des **ARNs du CBPV extraits** à partir de la purification virales, estimées à environ respectivement 10^8, 10^9, 10^{10} copies de CBPV par injection, groupe D : **CBPV purifié** (10^4 copies de CBPV par µl), groupe E : **Tampon phosphate** et groupe F : **non inoculées**. Ces abeilles ont été observées jusqu'à l'apparition des symptômes de la paralysie chronique (5 à 6 jours post-inoculation).

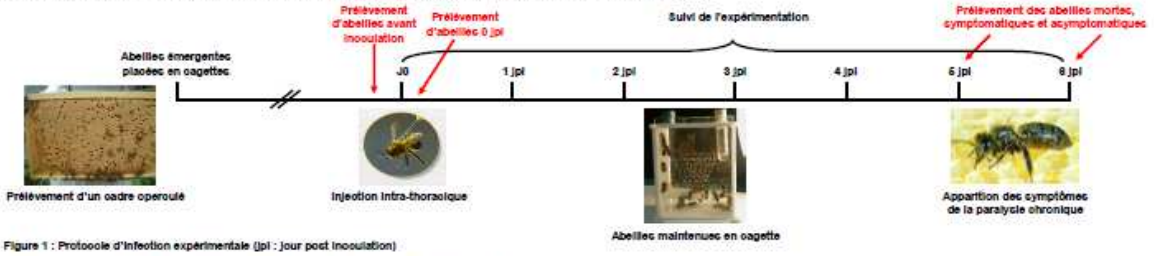


Figure 1 : Protocole d'infection expérimentale (jpi : jour post inoculation)

• Après l'apparition des symptômes, les abeilles prélevées ont été analysées par différentes méthodes (Figure 2) afin d'évaluer la charge virale du CBPV, la présence d'autres virus et la présence du brin négatif du CBPV signe de réplication virale[3,4,5].

• Une préparation réalisée à partir des têtes et des thorax des abeilles symptomatiques du groupe C a été observée par microscopie électronique parallèlement à un échantillon de CBPV purifié sur gradient de saccharose.



Figure 2 : Traitements des abeilles prélevées

Résultats et discussion

Echantillons	Autres virus détectés	Détection du brin négatif du CBPV	Charge génomique du CBPV (copies de CBPV par abeille)
Abeilles avant inoculation	aucun	non	1.5×10^6
Groupe A			
Abeilles 0 jpi	aucun	non	6×10^3
Abeilles mortes 6 jpi	DWV	oui	5.2×10^{12}
Abeilles symptomatiques 6 jpi	DWV	oui	1.2×10^{12}
Abeilles asymptomatiques 6 jpi	DWV	oui	9.4×10^{9}
Groupe B			
Abeilles 0 jpi	aucun	non	9.1×10^{8}
Abeilles mortes 5 jpi	aucun	oui	3.1×10^{11}
Abeilles symptomatiques 5 jpi	aucun	oui	2.4×10^{10}
Groupe C			
Abeilles 0 jpi	aucun	non	9.5×10^{8}
Abeilles mortes 5 jpi	aucun	oui	1×10^{12}
Abeilles symptomatiques 5 jpi	aucun	oui	1.6×10^{12}
Groupe D 5 jpi	aucun	oui	3.2×10^{10}
Groupe E 6 jpi	aucun	non	7×10^{4}
Groupe F 6 jpi	aucun	non	4.7×10^{6}

Tableau 1 : Détection d'autre virus d'abeille et évaluation de la charge génomique du CBPV dans les abeilles prélevées.

• Groupes B, C et D : proportion d'abeilles mortes et symptomatiques plus importantes que dans le groupe A puisque présence d'abeilles asymptomatiques dans ce même groupe.
➔ Observation des **symptômes de la paralysie chronique** seulement dans les abeilles inoculées des **groupes B, C et D.**

•**Abeilles symptomatiques et mortes** de chaque groupe : **fortes charges génomiques du CBPV** (Tableau 1).
➔ Résultats en corrélation avec charge virale estimée dans **abeilles du groupe D.**

• **Détection du brin négatif** de l'ARN dans les abeilles mortes, symptomatiques et asymptomatiques des groupes A, B, C et D
➔ **Réplication des ARNs nus.**

• Présence de particules virales dans les abeilles du groupe C (Figure 3A), particules physiquement identiques à celles du CBPV purifié (Figure 3B).
➔ **Formation de particules du CBPV à partir d'ARNs nus.0**

• **Corrélation entre les fortes charges virales** (10^{12} copies par abeille) estimées **dans les abeilles symptomatiques et les symptômes observées** (tremblements des ailes et du corps, abeilles incapables de voler et rampant sur le sol des cagettes)[3, 6].

• Capacité des ARNs nus à **initier la réplication du génome** et à générer la **formation de particules virales** ➔ **Concentration optimale d'ARNs nus** : 10^9 copies du CBPV par injection.

• **Développement d'un modèle** *in vivo* ➔ Utilisation dans l'étude des mécanismes d'infection du CBPV par une approche de génétique inverse.

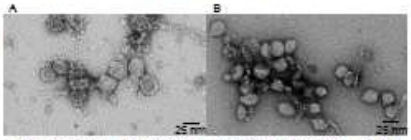


Figure 3 : Images de microscopie électronique de particules CBPV extraites d'abeilles infectées expérimentalement. (A) CBPV récupéré de tête et de thorax d'abeilles symptomatiques (groupe C), (B) CBPV purifié sur gradient de saccharose

Références: (1) Bailey et al., 1968, The purification and properties of chronic bee paralysis virus. (2) Olivier et al., 2008, Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. (3) Blanchard et al., 2007, Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. (4) Blanchard et al., 2012, Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. (5) Celle et al., 2008, Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. (6) Ribière et al., 2010, Detection of pathogens in honeybee mortalities observed in France during 2008 to 2009.

Analyse protéomique du virus de la paralysie chronique (CBPV) de l'abeille *Apis mellifera* L.

Aurore Chevin, Anne-Sophie Dabert-Gay, Philippe Blanchard, Magali Ribière, Bruno Coutard, Richard Thiéry

14ème Journées Francophones de Virologie, 29-30 mars 2012, Paris

Le virus de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV) est l'agent étiologique d'une maladie infectieuse et contagieuse de l'abeille adulte, la paralysie chronique. Ce virus non enveloppé de forme anisométrique mesurant 30 à 60 nm de long et 20 nm de large, est un virus à ARN simple brin positif mais n'a, jusqu'alors, pas pu être rattaché à une famille virale sur la base de ses caractéristiques morphologiques et physicochimiques. Les séquences complètes de ses deux ARNs majoritaires ont été caractérisées. L'ARN1 (3674 nucléotides) et l'ARN2 (2305 nucléotides) codent respectivement trois et quatre cadres ouverts de lecture (ORFs). La séquence d'acides aminés de l'ORF 3 de l'ARN1 a montré des similitudes avec l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) des virus à ARN simple brin positif tandis que l'ORF 3 de l'ARN2 coderait pour une protéine structurale putative, appelée pSP (putative Structural Protein). Bien que les séquences complètes des ARN1 et 2 aient été déterminées, les similarités au niveau génétique restent faibles, le CBPV ne peut donc pas être assigné à une famille virale. Par conséquent, la caractérisation des protéines virales est essentielle pour suggérer une position taxonomique du CBPV.

Une approche par analyse protéomique a donc été entreprise pour identifier les protéines virales. Des abeilles adultes ont été inoculées à l'aide d'une purification virale, puis maintenues en conditions expérimentales jusqu'à développement des symptômes et apparition des mortalités caractéristiques de la paralysie chronique. Une purification virale sur gradient de saccharose a été réalisée à partir de têtes d'abeilles symptomatiques. Les protéines contenues dans la préparation virale ont ensuite été séparées sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Après coloration du gel au bleu de Coomassie, les bandes de gel ont été excisées et soumises à un traitement enzymatique à la trypsine conduisant à la digestion des protéines. Les mélanges peptidiques ainsi obtenus ont été analysés sur un système chromatographique nano-HPLC (en phase inverse) couplé à un spectromètre de masse de type MALDI-TOF/TOF. Le logiciel ProteinPilot™ intégrant l'algorithme Paragon™ a été utilisé pour l'interrogation des bases de données protéiques (NCBInr, taxonomy : *Apis mellifera*) à l'aide des données brutes obtenues par spectrométrie de masse.

Dans la purification virale, deux protéines ont été identifiées sur la base de leur taille et de leurs séquences peptidiques comme étant les protéines putatives codées par l'ORF 2 (hypothetical protein CBPV_s2gp2) et 3 (pSP) de l'ARN2. Cette approche protéomique valide la présence de la protéine structurale putative dans notre purification. Ceci suggère fortement que la pSP rentre dans la composition de la capside virale. La seconde protéine identifiée semble correspondre à une protéine détectée par western blot lors de précédentes études, et jouerait donc un rôle dans la structure du virus. Cette approche a donc mis en évidence deux protéines qui seraient constitutives de la capside virale.

ANALYSE PROTÉOMIQUE DU VIRUS DE LA PARALYSIE CHRONIQUE (CBPV) DE L'ABEILLE *APIS MELLIFERA* L.

Aurore Chevin[1], Anne-Sophie Dabert-Gay[2], Philippe Blanchard[1], Magali Ribière[1], Bruno Coutard[3], Richard Thiéry[1].
[1] Anses, Laboratoire de Sophia Antipolis, 105 route des Chappes, BP 111 Les Templiers, 06902 Sophia-Antipolis.
[2] IPMC, UMR6097 CNRS, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne.
[3] AFMB, Département de virologie structurale et drug design, UMR6098 CNRS, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille.

Introduction

• Le virus de la paralysie chronique (Chronic bee paralysis virus, CBPV) est responsable d'une maladie infectieuse et contagieuse de l'abeille adulte (*Apis mellifera* L.) appelée la paralysie chronique.

• Le CBPV est un virus à ARN simple brin positif constitué de 2 ARNs majeurs séquencés, l'ARN 1 (3674 nt) et l'ARN 2 (2305 nt), codant respectivement 3 et 4 ORFs putatifs[1] (Figure 1).

• Seule la séquence d'acides aminés de l'ORF 3 de l'ARN 1 partage des similitudes avec la RdRp des virus des familles *Nodaviridae* et *Tombusviridae*. Non assigné actuellement, le CBPV occuperait une position intermédiaire entre ces 2 familles virales[1].

• Les ORFs de l'ARN 1 coderaient les protéines non-structurales avec l'ORF 1 et l'ORF 3, et ceux de l'ARN 2 coderaient les protéines structurales avec l'ORF 2 et l'ORF 3, appelée predicted structural protein (pSP).

• Afin de déterminer la position phylogénétique du CBPV, la caractérisation des protéines virales est indispensable. Une étude par spectrométrie de masse (nano-HPLC-MS/MS) a été réalisée à partir d'une purification virale du CBPV et a permis d'identifier les protéines structurales du CBPV.

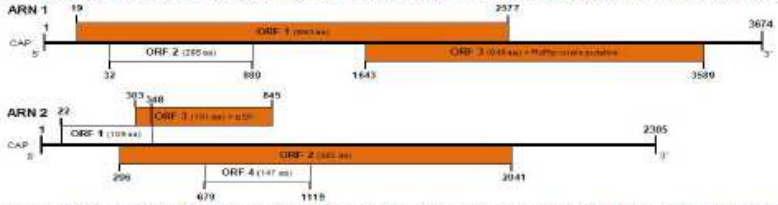


Figure 1 : Organisation prédite des ARNs du CBPV. Les 7 ORFs putatifs sont indiqués avec leurs positions et leur taille en acides aminés. Les ORFs colorés sont ceux codant le plus probablement des protéines du CBPV.

Méthodes

Le CBPV a été purifié sur gradient de saccharose à partir d'un broyat de têtes d'abeilles infectées expérimentalement et utilisé selon le protocole schématisé ci-dessous.

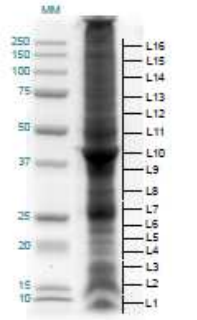
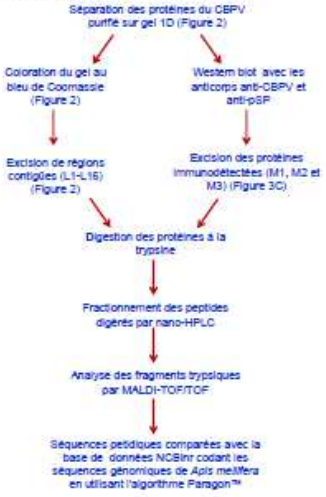


Figure 2 : Profil SDS-Page du CBPV purifié et position des fractions (L1-L16) analysés par nano-HPLC-MS/MS.



Résultats

• Identification des protéines dans les fractions L1-L16
➔ Seulement 2 protéines du CBPV identifiées : hypothetical protein CBPV_s2gp2, appelée hSP (hypothetical structural protein) et la pSP, mais identification d'une grande majorité de protéines d'abeille (cytosquelette, adhésion…).

• Profils de détection similaires avec anticorps anti-CBPV (Figure 3A) et avec anticorps anti-pSP (Figure 3B).
➔ 4 protéines immunodétectées dont 3 correspondant aux fractions M1, M2 et M3 sur gel 1D coloré au bleu de coomassie (Figure 3C).

• Identification des protéines de M1, M2 et M3
➔ pSP et hSP détectées dans M1 et M3, seule pSP détectée dans M2.

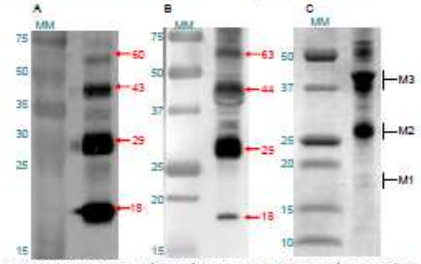


Figure 3 : Analyse par western blot du CBPV purifié avec l'anticérum anti-CBPV adsorbé sur protéines d'abeilles[2] (A), anticérum anti-pSP (B). Profil SDS-Page du CBPV purifié coloré au bleu de Coomassie.

Discussion

• Aucune protéine non-structurale identifiée dans le CBPV purifié ➔ RdRp non encapsidée.

• Identification des protéines hSP et pSP codées respectivement par les ORFs 2 et 3 de l'ARN 2, supposées structurales ➔ Participation probable de ces protéines dans la formation de la capside.

• pSP identifiée à 18 kDa correspondant à la masse moléculaire prédite (19,7 kDa) mais aussi immunodetectée à des masses non attendues.
➔ Probables modifications post-traductionnelles, ou forte affinité avec une autre protéine.

• Région N-terminal de pSP riche en résidus arginine (basique) présentant une structure secondaire de type hélice α.
➔ Implication dans l'encapsidation de l'ARN tel que décrit chez les virus des genres *Bromovirus*, *Dianthovirus* et *Tombusvirus* [3,4]?

• hSP identifiée dans la fraction correspondant à la masse moléculaire prédite (65,5 kDa) mais aussi à des masses plus petites (45 et 20 kDa)
➔ Clivage probable de hSP tel que décrit chez les virus des genres *Alphanodavirus* et *Poliovirus*[5,6].

• Détermination de 2 régions hydrophobes des protéines pSP et hSP : une région interne et une région en C-terminal ➔ Rôle dans l'oligomérisation et/ou dans la pénétration du virus dans la cellule comme décrit chez certains virus non-enveloppés[7] ?

• Développement du modèle *in vivo* (infectiosité des ARNs nus – poster 68 JFV2012) ➔ Outil indispensable pour étudier les rôles de pSP et hSP dans l'assemblage de la capside du CBPV

Références: (1) Olivier et al., 2008, Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. (2) Ribière et al., 2010, Detection of chronic honey bee (Apis mellifera L.) paralysis virus infection: application to a field survey. (3) Rao et al., 1996, Functional analysis of the amino terminal arginine-rich motif and its role in encapsidation, movement , and pathology. (4) Park et al., 2012, The RCNMV capsid protein N-terminal lysine-rich motif is a determinant of symptomatology and virion accumulation. (5) Curry et al., (1997) Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. (6) Basavappa et al., 1994, Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 A resolution. (7) Banerjee et al., (2008), Activation, exposure and penetration of virally encoded, membrane active polypeptides during non-enveloped virus entry.