

Université Aix Marseille
UFR science de la vie et de la santé

Thèse

Pour obtenir le grade de
Docteur en science d'université Aix Marseille
Discipline : Bioinformatique, biologie structurale et génomique

Présentée et soutenue par

Ibrahim Youssef

Le 15 septembre 2016

**Contribution à la mise en place d'un système de génétique
inverse pour le virus de la paralysie chronique de l'abeille**

Jury :

Dr. Pascal Rihet

Dr. Stéphane Zientara

Dr. David Biron

Dr. Hervé Darbon

Dr. Richard Thiéry

Dr. Magali Chabert

Dr. Eric Dubois

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Co-directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Examineur

Examineur

Table de matières

Table de matières	3
Remerciements.....	9
Liste des Abréviations	11
Avant-Propos	13
Partie 1 : Introduction bibliographique	19
<i>Chapitre 1 : La paralysie chronique et son agent étiologique (CBPV).....</i>	<i>21</i>
A. La maladie de la paralysie chronique.....	23
I. Historique	23
II. Syndromes de la maladie de la paralysie chronique	23
III. Voies de transmission de la maladie	24
1. Transmission par contact	24
2. Transmission par voie trophique	25
3. Transmission via un vecteur	25
4. Transmission verticale	26
B. Le virus de la paralysie chronique (CBPV)	29
I. Caractéristiques morphologiques	29
II. Le génome du CBPV	31

III. La particule virale associée au CBPV (CBPSV)	33
IV. Fonctions des protéines du CBPV	33
1. Protéines codés par l'ARN 1	34
1. Protéines codés par l'ARN 2	37
V. Classification phylogénétique.....	39
Chapitre 2 : La génétique inverse des virus à ARN de polarité positive	43
A. Principe.....	47
B. Application de la génétique inverse en virologie.....	51
Virus à polarité positive	51
1. Les picornavirus	52
2. Les flavivirus	53
3. Les coronavirus.....	55
4. Les Nodavirus	57
Objectif de la thèse.....	61
Partie 2 : Travaux expérimentaux	63
Chapitre 1 : Les éléments génétiques essentiels à la réplication du CBPV.65	
A. Les essais de mise en culture de la lignée de cellules d'abeilles AmE-711	66
I. Introduction.....	66
II. Matériel et méthode.....	68
III. Résultats et discussion.....	70

B. Optimisation des conditions de purification des ARN et d'inoculation aux abeilles	71
I. Purification des ARN 1 et 2	71
II. Inoculation expérimentale d'abeilles avec les ARN purifiés.....	73
C. Pouvoir infectieux des ARN majoritaires du CBPV	75
Conclusion.....	84
<i>Chapitre 2 : Vers la mise au point d'un système de génétique inverse pour le CBPV.....</i>	85
A. Matériel et méthode	87
I. Infection expérimentale	87
II. Clonage du génome du CBPV par synthèse des inserts.....	89
III. Clonage du génome du CBPV en vecteur procaryote/eucaryote	89
1. Vecteur utilisés.....	89
2. Synthèses des fragments ADNc des deux segments du génome viral par PCR.....	91
3. Ligation des inserts	91
4. Transformation des bactéries <i>E. coli</i>	92
5. Vérification des clones	92
6. Transcription <i>in vitro</i>	93
B. Les différentes constructions plasmidiques	94
I. Construction dans puC57	94

II. Clonage des deux segments viraux dans le vecteur d'expression pcDNA3	97
1. Stratégie de l'ADNc 1	97
2. Stratégie ADN 2	101
C. Pouvoir infectieux des plasmides recombinants	103
I. Stratégie 1 : plasmide puC57	103
II. Stratégie 2 : plasmide pcDNA3	105
1. Inoculation des clones pcDNA3-ADNc.....	105
2. Inoculation par les ARN transcrit in vitro des clones pcDNA3 –ADNc.....	109
D. Discussion	112
<i>Chapitre 3 : Etude fonctionnelle de l'ORF 1 de l'ARN1 du CBPV</i>	<i>115</i>
A. Matériel et méthodes	119
I. Production des protéines recombinantes	119
1. PCR	119
2. Clonage par recombinaison homologue.....	121
3. Expression de protéines.....	123
4. Purification par chromatographie d'affinité	123
II. Synthèse de protéines marquées à la méthionine S35	124
III. Western blot	124
IV. Etude l'activité GTase par mesure de la fixation de l'alpha GTP (GTase-GMP)	125
B. Résultats.....	127

I. Clonage Gateway	127
II. Expression protéiques	128
III. Formation de la liaison covalente GTase-GP	128
IV. Analyse Western blot	129
V. Transcription/Traduction in vitro	129
C. Discussion :	130
Partie 3 : Conclusions générales et perspectives.....	133
A. Pouvoir infectieux des ARN majoritaires du CBPV	134
B. Recherche du modèle cellulaire pour la réplication du CBPV <i>in vitro</i>	135
C. Clonage du génome du CBPV	136
D. Etude du domaine MTase-GTase codée par l'ARN 1 du CBPV	138
Références Bibliographiques.....	139
Annexes.....	151
<i>Communications orales</i>.....	152
<i>Communications affichées</i>.....	158

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury de cette thèse, plus particulièrement le Dr. Stéphan Zientara (DR, UMR 1161 de virologie) et le Dr. David Biron (CR 1, UMR CNRS 6023), d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que le Pr. Pascal Rihet (PR, AMU UMR 1090 INSERM) de présider le jury.

Je tiens à remercier le Dr. Richard Thiéry, mon co-directeur de thèse et directeur du laboratoire l'Anses de Sophia Antipolis, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie pour sa confiance, sa bienveillance, sa pédagogie, sa relecture attentive du manuscrit et de m'avoir donné les moyens de développer mes compétences au sein d'autres laboratoires.

Je remercie le Dr. Hervé Darbon, mon co-directeur de thèse, sans qui je n'aurais pas pu travailler sur ce projet. Je le remercie particulièrement pour ses encouragements à progresser dans mes travaux, pour son soutien et sa disponibilité.

Je remercie le Dr. Magali Ribière-Chabert, chef de l'unité Pathologie de l'abeille de l'Anses de Sophia Antipolis, de m'avoir accueilli dans son unité et transmis ses connaissances en virologie d'abeille. Je la remercie particulièrement pour ses conseils, pour son soutien et par sa lecture attentive du manuscrit.

Mes très sincères remerciements vont au Dr. Eric Dubois qui m'a encadré durant les trois années de thèse. Je le remercie particulièrement pour n'avoir jamais hésité à prendre du temps pour combler mes lacunes en virologie et biologie moléculaire. Je le remercie pour sa grande disponibilité, pour son encadrement, sa patience, son soutien et son réconfort quand c'était nécessaire. Je le remercie pour sa confiance et d'avoir fait de moi le scientifique, que j'espère être devenu aujourd'hui ! Je le remercie également pour sa bonne humeur et son attitude positive qui ont rendu cette formation doctorale si agréable. Je le remercie enfin pour les relectures attentives de mon manuscrit et ses conseils de rédaction.

Je tiens à remercier tous les collaborateurs qui ont participé à ce travail de thèse et qui m'ont accueilli dans leur laboratoire :

- Je remercie le Dr. Michel Brémont, pour les échanges que nous avons eu lors du comité de thèse et son accueil très chaleureux au sein de l'unité virologie et immunologie moléculaire à l'INRA de Jouy-en-Josas. Je remercie également son

équipe, et particulièrement le Dr. Stéphane Biacchesi qui m'a encadré tout le long de mon séjour pour sa disponibilité et sa relecture attentive du manuscrit. Je le remercie pour ses conseils qui m'ont aidé à développer mes compétences en biologie moléculaire et notamment dans le clonage

- Je remercie le Dr. Bruno Canard qui m'a accueilli au sein de son équipe au laboratoire AFMB de l'Université Aix-Marseille. Je tiens à remercier le Dr. Etienne Decroly qui m'a encadré dans mes travaux sur l'expression protéique, de m'avoir appris à organiser mon temps et à être efficace. Je le remercie de sa patience, pour la relecture du manuscrit et le partage de ses connaissances. Je remercie également le Dr. Isabelle Imbert qui m'a conseillé et aidé dans les aspects techniques. Enfin, je remercie l'ensemble des membres de l'équipe « Viral Replicases: Structure, function and drug-design » de leur soutien.

J'exprime également ma reconnaissance et mes remerciements au Dr. Damien Vitour de l'Anses de Maisons-Alfort pour ses conseils lors du comité de thèse.

Je remercie aussi le Dr. Karim Sidi-Boumedine d'avoir été toujours présent pour me soutenir, m'encourager, me conseiller. Je le remercie particulièrement d'avoir fait de tout son possible pour m'aider et pour les discussions très intéressantes au niveau scientifique ou à un niveau plus général.

J'adresse un grand merci à l'ensemble des agents du laboratoire de l'Anses de Sophia Antipolis, particulièrement au service administratif, à Mr. Nicolas Cougoule de son aide dans les expérimentations sur abeilles. Mes remerciements particuliers vont à Mr. Frank Schurr, qui m'a formé et aidé dans toutes les expériences. Je le remercie aussi pour sa gentillesse, sa disponibilité, son soutien et pour les moments formidables que nous avons partagés.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, mes amis particulièrement Sara, Nathalie, Joëlle, Sam pour leur immense soutien et un grand merci à Gemma de ses infatigables encouragements et d'avoir toujours été présente pour me rassurer et me donner le sourire durant les moments difficiles. Mille remerciements à vous tous !

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de la région Provence-Alpes Côte d'Azur et de l'Anses.

Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AmE-711 : *Apis mellifera* embryonic – July (7) year 2011 (11)
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adenosine triphosphate
BAC : bacterial artificial chromosome
BET : Bromure d'éthidium
CCl₄ : Tétrachlorure de carbone
CMV : cytomégalovirus
DEPC : Diethylpyrocarbonate
DO : Densité optique
DTT : Dithiothreitol
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
GTP : Guanosine-5'-triphosphate Kb: Kilobase
Gtase : guanylyltransferase
HDV : hepatitis delta virus
Hepes : 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HH : hammerhead
His : Histidine
hSP : hypothetical structural protein
ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses
IMAC : Immobilized metal affinity chromatography
IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kda : kilodalton
L : litre
LB : Luria broth
MOPS : 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid
Mtase : methyltransferase
NaCl: chlorure de sodium

nt : nucléotide
ORF: Open reading Frame
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
pb : paire de base
PB : Phosphate buffer
PCR : Polymerase chain reaction
PMF: peptide mass fingerprint
Poly (A) : polyadénylé
pSP : predicted structural protein
qPCR : quantitative PCR
RdRp : ARN polymérase ARN dépendante
RNP : Ribonucléoprotéine
RT : reverse transcription
SAM : S adénosyl méthionine
SDS : Soduim dodecyl sulfate
TBST : Tris-Buffered Saline and Tween 20

Avant-Propos

L'abeille fait partie des insectes pollinisateurs les plus importants dans le monde. Elle joue un rôle dans la préservation de la biodiversité végétale en contribuant à la pollinisation principalement des angiospermes, service vital pour l'écosystème. De plus, elle a un rôle économique très important. La valeur mondiale de la pollinisation a été estimée à 153 milliards euros par an (Gallai et al., 2009). Sans l'activité des insectes pollinisateurs, la production de certains fruits, graines et noix pourrait diminuer de 90 % (Klein et al., 2007).

En plus de la pollinisation, les produits de la ruche comme le miel, la gelée royale, le pollen, la propolis, et la cire sont aussi commercialisés directement aux consommateurs ou aux entreprises des secteurs agro-alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. La valeur directe du miel produit dans l'Union européenne a été estimée à environ 140 millions d'euros (Moritz et al., 2010).

L'abeille peut parcourir une distance allant jusqu'à d'une dizaine de kilomètres autour de sa ruche à la quête de nourriture (pollen, nectar) et d'eau. De ce fait, elle est exposée aux pollutions liées à l'activité humaine (résidus phytosanitaires et industrielles). L'accumulation des résidus toxiques au sein des colonies peut ainsi refléter la contamination de l'environnement exploré par les abeilles (Chauzat and Faucon, 2007; Chauzat et al., 2006).

Depuis les années 1990, des affaiblissements de colonies d'abeilles domestiques sont décrits dans le monde (Becher et al., 2013). Ces pertes peuvent être associées à plusieurs facteurs environnementaux et biologiques (exemples : pollution de l'environnement, réchauffement climatique, diminution de la diversité florale, prédateurs, parasites et agents pathogènes, pratiques apicoles) (rapport afssa 2009 et avis de l'anses 2015).

Parmi les agents biologiques (prédateurs, parasites et agents pathogènes), on peut citer le rôle majeur de l'acarien ectoparasite, *Varroa destructor* responsable d'une maladie, la varroose. Il entraîne un affaiblissement des défenses immunitaires de l'abeille et contribue à la transmission de virus. Les champignons *Nosema apis* et *Nosema ceranae*, la bactérie *Paenibacillus larvae* (responsable de la loque américaine), l'hyménoptère *Vespa velutina* (frelon asiatique), le coléoptère *Aethina tumida* (petit coléoptère de la ruche) sont également des dangers majeurs pour la santé des colonies

(Monceau et al., 2014). En plus de ces facteurs, un grand nombre de virus sont impliqués dans les affaiblissements de colonies. Parmi ces virus, trois entraînent des signes cliniques clairement identifiables et sont rapportés responsables ou impliqués fortement dans une maladie, le virus DWV qui en association étroite avec *V. destructor* entraîne des déformations des ailes et du corps des abeilles signes cliniques de la varroose (Di Prisco et al., 2016). Le SBV virus du couvain sacciforme qui entraîne la mortalité de larves avant la nymphose (Grabensteiner et al., 2001). Et le CBPV, virus de la paralysie chronique qui est le sujet de cette thèse.

La majorité des virus d'abeille sont des virus à ARN simple brin, positif à l'exception du Filamentous virus (FV) qui est un virus à ADN. Neuf virus d'abeille sont 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 CBPV (Olivier et al., 2008), le virus des ailes déformées (*Deformed wing virus*, DWV) (Ongus et al., 2004), le virus israélien de la paralysie aiguë (*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 virus filamenteux (FV) (Gauthier et al., 2015). Malgré le grand nombre de virus identifié chez l'abeille, les mécanismes de ces infections virales sont les moins connus. Cela est dû aux difficultés d'études de ces infections, à l'absence de symptômes spécifiques pour certaines infections virales et à l'association avec d'autres pathogènes.

L'abeille domestique possède plusieurs systèmes de défense antivirale (Brutscher et al., 2015). Parmi ces systèmes, on peut citer la voie RNAi (ARN interférent), Jak/STAT (Janus Kinase/signal Transducer and activator of Transcription stat), Toll, JNK, Imd, ainsi que les mécanismes d'autophagie et d'endocytose. En effet, par analyse bio-informatique, les gènes intervenant dans ces voies ont été retrouvés dans le génome de l'abeille domestique. Ils sont orthologues aux gènes trouvés chez les insectes. Ces voies ont été impliquées lors de la défense contre le DWV, ABPV, IAPV et KBV (Brutscher et al., 2015).

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

Tableau 1 : Classification des virus à ARN séquencés de l'abeille selon le rapport en 2014 de la classification ICTV.

Grace à la détermination de leurs séquences nucléotidiques, sept virus d'abeilles ont pu être classés dans deux familles virales : La famille *Iflaviridae* et la famille *Dicistoviridae* (<https://talk.ictvonline.org>) (Tableau 1).

Le génome du CBPV a été complètement séquencé lors d'une thèse précédente à l'Anses de Sophia Antipolis. Ce virus partage des similarités avec les nodavirus et les tombusvirus. Néanmoins, il n'a pas pu être assigné à une famille virale existante (Olivier et al., 2008). Une autre étude du génome a montré que le CBPV présente aussi des homologues avec certains virus de plantes (Kuchibhatla et al., 2014). Par conséquent, le CBPV pourrait appartenir à une nouvelle famille virale qui n'a pas été encore définie.

Ce travail de thèse, réalisé au sein de l'Unité de pathologie de l'abeille de l'Anses de Sophia Antipolis dans l'équipe du Dr. Eric Dubois, a pour principal objectif de développer des outils permettant d'étudier les mécanismes de réplication et les fonctions des protéines du CBPV. Pour ce faire plusieurs approches ont été employées.

Une première étude a consisté à définir les éléments génétiques indispensables à la réplication du virus. Ces travaux ont fait l'objet d'un premier article publié dans *Journal of immunology research*. Puis, grâce à une collaboration avec l'équipe de Dr. Michel Brémont à l'INRA de Jouy-en-Josas, le génome de CBPV a été cloné afin de mettre en place un système de génétique inverse. Enfin, en collaboration avec le Dr. Etienne Decroly (Université Aix Marseille, laboratoire Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques - AFMB), j'ai réalisé le clonage de l'ORF 1 de l'ARN 1 (séquence complète et séquences partielles), afin d'étudier l'activité enzymatique des domaines méthyl-transférase (MTase) et guanylyl-transférase (GTase) supposés être codés par cet ORF.

Ce manuscrit s'articule en trois parties. La première partie introductive fait un point bibliographique sur le sujet de mes recherches. Cette introduction est suivie par la présentation des résultats issus de cette thèse. Pour finir, la troisième partie reprend l'ensemble de ces résultats dans une conclusion générale.

L'introduction bibliographique, se divise en deux chapitres. Le premier chapitre présente la maladie, la paralysie chronique ainsi que son agent étiologique, le CBPV. Le deuxième chapitre d'introduction porte sur la génétique inverse. L'importance de cette approche et son application dans les études des virus à polarité positive et négative y sont décrites.

La deuxième partie de cette thèse présente les résultats expérimentaux obtenus. Le premier chapitre décrit le modèle d'expérimentation sur les abeilles et les éléments génétiques indispensables à la réplication du CBPV. Le second chapitre porte sur la mise en place du système de génétique inverse du CBPV par le clonage de son génome. Les différentes constructions moléculaires et stratégies utilisées seront présentées ainsi que les résultats obtenus. Le dernier chapitre présente une étude fonctionnelle des domaines MTase et GTase supposés être codés par l'ORF 1 de l'ARN 1.

Pour finir, la conclusion générale fait le bilan de l'ensemble des informations obtenues lors de ce travail de recherche et ouvre des perspectives.

Les posters et présentations orales que j'ai effectuées lors de congrès sont présentés en annexe.

Partie 1 : Introduction bibliographique

Chapitre 1 : La paralysie chronique et son agent étiologique (CBPV)

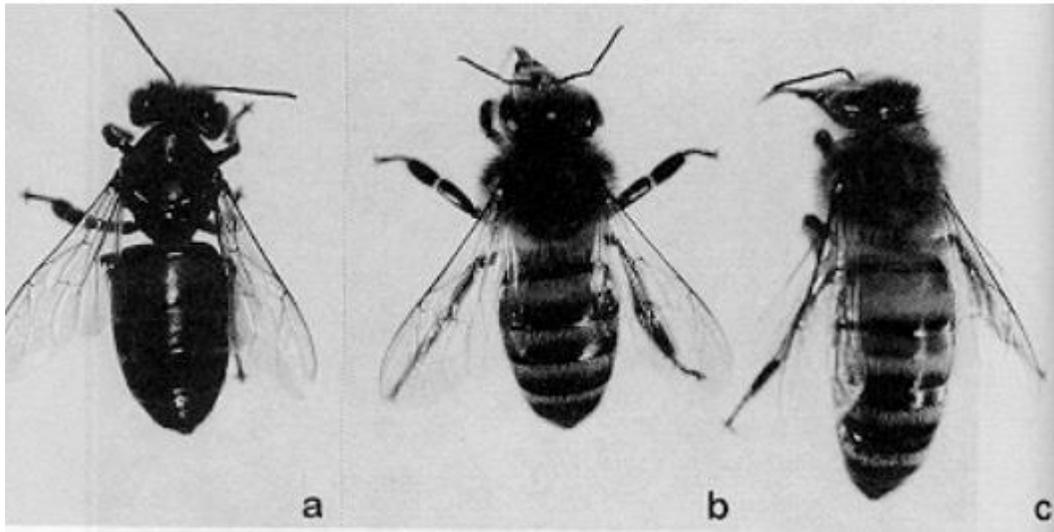


Figure 1 : Différents types de syndromes a) Abeille atteinte du syndrome de type 2, b) Abeille saine, c) Abeille atteinte du syndrome de type 1. (Ball and Bailey, 1997)

A. La maladie de la paralysie chronique

I. Historique

La paralysie chronique est connue aussi sous le nom de « maladie noire » ou encore « mal des forêts » ou « petites noires ». Elle est caractérisée principalement par la présence d'abeilles tremblantes, trainante devant de la colonie et par des mortalités plus ou moins importantes d'abeilles devant les colonies (Ball and Bailey, 1997). En 1936, une étude histologique menée par l'équipe de Morison permet de suspecter une étiologie virale en raison de la présence d'inclusions spécifiques au niveau de l'intestin et du système nerveux de l'abeille, appelées depuis inclusions de Morison (Morison, G. D, 1936). Cette hypothèse a été renforcée par Burnside lors d'une étude sur la transmission expérimentale de la maladie par voie trophique, par contact ou par injection d'extraits d'abeilles malades (Burnside, C. E, 1945). Cette maladie a également été considérée comme un syndrome associé à des causes alimentaires, génétiques ou encore attribuée à d'autres agents pathogènes (Broeker, W., 1961; Broeker, W., 1964; Vecchi, M. A. and Zambonelli, C, 1961). Enfin, en 1963 c'est Bailey qui définit l'étiologie virale de la maladie en purifiant un virus (Bailey et al., 1963). Ce virus est appelé le virus de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV).

II. Syndromes de la maladie de la paralysie chronique

Il a été décrit historiquement deux types de syndromes pour cette maladie (Figure 1) :

Syndrome de Type 1 : Ce syndrome a été décrit en Angleterre. Il a été caractérisé par des abeilles tremblantes, trainantes devant les colonies, incapables de voler et qui présentent un abdomen gonflé. Les abeilles meurent quelques jours après l'infection.

Syndrome de type 2 : Ce syndromes se caractérise par des abeilles dépilées noires, et rejetées de leur colonie par les abeilles saines. Elles deviennent rapidement incapables de voler, tremblantes et meurent.

Comme souligné par certains auteurs, les signes cliniques des deux types de syndromes se retrouvent de façon simultanée sur des colonies atteintes. Un syndrome général a été donc déterminé, regroupant les principaux signes cliniques des deux types. Il est caractérisé par la présence à l'entrée des colonies d'abeilles tremblantes, incapables de voler, certaines sont noires et dépilées. Ces abeilles sont parfois rejetées de la colonie.

III. Voies de transmission de la maladie

L'étude de la transmission du virus est indispensable à la compréhension de l'épidémiologie de la maladie. Généralement, il existe deux voies de transmission virale : horizontale et verticale. La transmission horizontale se fait entre les individus soit par contact, par voie trophique ou par des vecteurs, tandis que la transmission verticale se fait de l'adulte à sa descendance lors de la reproduction.

1. Transmission par contact

Le CBPV peut être transmis par contact. Cette voie a été mise en évidence lors d'infections expérimentales durant lesquelles le virus était pulvérisé sur les abeilles ou déposé sur leur thorax préalablement rasé, mais aussi lorsqu'un grand nombre d'abeilles saines est mis dans une cagette en contact d'abeilles infectées (Ribiere et al., 2010). De plus, il a été montré qu'en augmentant le nombre d'abeilles présentes dans la cagette, la transmission du virus était plus efficace (Bailey et al., 1983; Bailey et al., 1963). En outre, le CBPV présent dans les fèces des abeilles infectées est infectieux et peut contaminer les abeilles saines mises dans les mêmes cagettes (Ribiere et al., 2007).

En se basant sur les observations de ruchers expérimentaux, il a été supposé que la transmission par contact peut se faire entre les abeilles malades et les gardiennes qui les attaquent pour les expulser (Kulincecic and Rothenbuhler, 1975).

2. Transmission par voie trophique

L'ingestion de la nourriture contaminée ou le partage de cette nourriture entre les abeilles (trophallaxie) peut déclencher la maladie. En effet, en 1965, Bailey a montré que le CBPV peut être transmis entre les abeilles par la nourriture (Bailey, 1965). Cependant, le nombre des particules virales était insuffisant pour causer la maladie (Bailey et al., 1983).

Le virus a été détecté dans les glandes mandibulaires et hypo-pharyngiennes des abeilles infectées. La charge virale dans ces organes a été estimée à 10^6 copies du génome du CBPV par abeille (Blanchard et al., 2007).

3. Transmission via un vecteur

a. Par Varroa destructor

V. destructor est un ectoparasite de l'abeille qui est responsable de pertes importantes de colonies. Il se nourrit de l'hémolymphe des abeilles adultes ou du couvain. Plusieurs études ont montré le rôle de *V. destructor* dans la dissémination des virus DWV, ABPV, KBV, IAPV (de Miranda et al., 2010a) et IAPV (Di Prisco et al., 2011). Ces virus seraient transmis par l'injection de la salive de l'acarien lorsqu'il se nourrit de l'hémolymphe.

Contrairement à beaucoup d'autres virus de l'abeille, le CBPV ne semble pas être transmis par l'acarien (Ball and Allen, 1988). Il n'avait jamais été détecté chez l'acarien jusqu'à une étude récente sur la dissémination du virus à partir de différents hôtes (Celle et al., 2008). Une faible charge virale du CBPV a été détectée lors de cette étude chez *le varroa* (10^4 copies du génome du CBPV par parasite). La forme répliquative de l'ARN du CBPV (ARN anti-génomique) a également été mise en évidence chez le parasite, suggérant que le virus est capable de s'y multiplier.

Néanmoins, cette détection positive du brin anti-génomique de l'ARN du CBPV dans le varroa a été obtenue sur des acariens issus d'une colonie très atteinte de paralysie chronique. Par conséquent, la contamination des acariens se nourrissant

d'hémolymphe semble être l'hypothèse la plus probable. Rien ne prouve qu'il y ait eu réplication du virus chez l'acarien, il pourrait simplement s'agir du passage passif du brin anti-génomique de l'hémolymphe de l'abeille vers le varroa lorsque celui-ci se nourrit.

b. Par les fourmis

Des fourmis portant des abeilles mortes ont été remarquées à proximité de ruches présentant des symptômes plus ou moins sévères de la paralysie chronique. Lors des observations de terrain, deux espèces de fourmis carnivores ont été observées, *Camponotus vagus* et *Formica rufa*. Suite à ces observations, une étude a été menée afin de définir le rôle des fourmis dans la dissémination du CBPV (Celle et al., 2008). La charge virale présente dans ces fourmis a été estimée de 10^3 à 10^8 copies du CBPV par individu. Celle mesurée chez les ouvrières de *C. vagus* prélevées à l'intérieur de la fourmilière (située à 10 m d'une ruche symptomatique) a été évaluée à 10^{11} copies de CBPV par individu. La charge virale était 100 fois inférieure dans les nymphes et 100.000 fois inférieure dans les fourmis ailées de *C. vagus*. Le brin anti-génomique du CBPV a été détecté chez les ouvrières et les nymphes de *C. vagus* à l'intérieur comme à l'extérieur de la fourmilière. Ces fourmis pourraient constituer un réservoir de virus et expliquer la récurrence de la paralysie chronique dans les mêmes ruchers chaque été. Par contre, la forme répliquative du génome du CBPV n'a pas été détectée chez *F. rufa*.

4. Transmission verticale

Une autre voie probable de dissémination du virus est la transmission verticale *via* la reine. Le CBPV peut être transmis aux nymphes *via* la reine infectée expérimentalement par inoculation (Bailey, 1965) ou par la voie trophique (Kulinčević and Rothenbühler, 1975).

Ce mode de dissémination du virus a été étudié par Chen et ses collaborateurs en 2005. En effet, le CBPV a été détecté dans 4 des 10 reines testées, dans les œufs et chez 10% des larves issues des reines détectées positives (Chen et al., 2005b). Toutefois, le virus n'a pas été détecté dans les ovaires ni dans la spermathèque de ces reines. Cette absence de détection peut être due à des charges virales très faibles

inférieures au seuil de détection de la méthode utilisée. En effet, la charge virale est relativement faible dans les œufs, les larves, les nymphes, environ 10^3 copies du génome du CBPV par abeille (Blanchard et al., 2007). Par ailleurs, il serait possible aussi que la contamination des œufs provienne de l'environnement et non pas de la reine.

De plus, le virus paraît très largement réparti dans la population d'abeille. En effet, lors des essais conduits au laboratoire il est très difficile de travailler sur des abeilles indemnes de contamination par le CBPV que ce soit pour les infections expérimentales comme pour la réalisation d'Essais inter-laboratoires. Cette large prévalence pourrait aller dans le sens d'une transmission verticale.

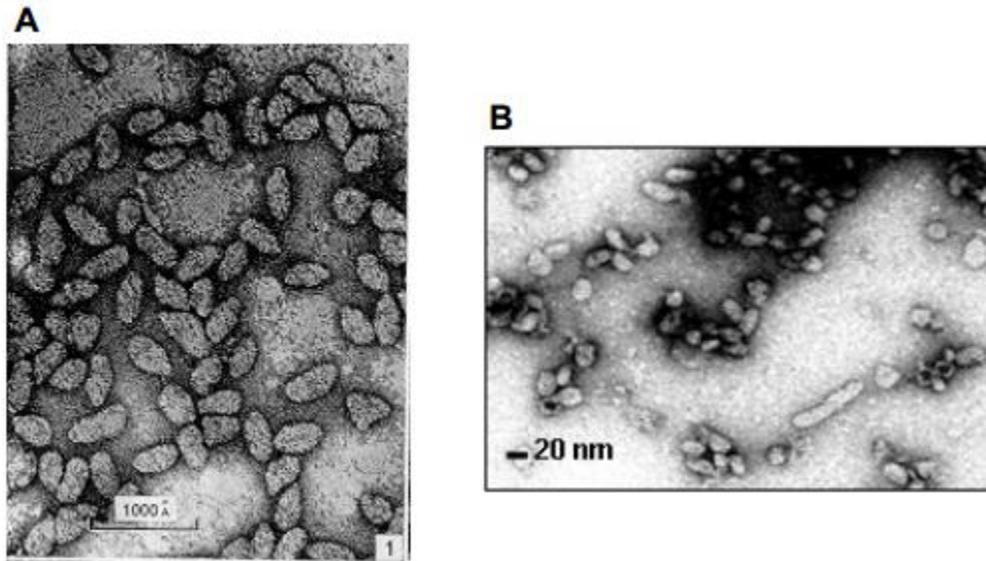


Figure 2 : Visualisation du CBPV en microscopie électronique. Particules purifiées sur gradient de saccharose, et colorées négativement. A : Image tirée de l'article de Bailey et al., 1968. B : Image tirée de l'article d'Olivier et al., 2008.

B. Le virus de la paralysie chronique (CBPV)

Le CBPV a été isolé en 1963 à partir des abeilles infectées expérimentalement par une injection d'extraits clarifiés d'abeilles qui présentaient les signes cliniques de la maladie (Bailey et al., 1963). Depuis, plusieurs études ont été menées afin de mieux caractériser ce virus.

I. Caractéristiques morphologiques

Les particules virales du CBPV sont anisométriques, principalement ellipsoïdales (Figure 2). Elles mesurent entre 30 à 60 nm de long et 20 nm de large (Bailey et al., 1963, 1968). Le coefficient de sédimentation du CBPV varie en fonction de la taille des particules entre 80 et 130 S. La densité des particules en chlorure de césium est fixe et de 1,33 g/cm³ (Bailey et al., 1968). Cette structure du CBPV diffère de la structure icosaédrique des principaux virus d'abeille (Ribiere et al., 2010)

Lors des premières études sur le CBPV, les auteurs ont déduit qu'il s'agissait d'un virus non enveloppé, suite à des traitements par des détergents. Cependant, une étude récente remet en question cette hypothèse (Kuchibhatla et al., 2014). En effet, par analyse des séquences, ces auteurs ont suggéré que l'ORF3 de l'ARN 2 code pour une protéine transmembranaire nommée SP24 en raison de la présence de domaines hydrophobes en alpha hélice. Cette protéine présente des homologies structurales avec celles de certains virus de plantes et d'insectes du genre *Negevirus*. Ces mêmes auteurs ont également prédit que l'ORF2 de l'ARN 2 coderait pour une glycoprotéine également sur la base d'homologies avec les negevirus et en raison de la présence potentielle de sites de glycosylation. Si ces prédictions étaient exactes, alors les particules virales du CBPV devraient être enveloppées. Cependant, la possibilité d'une transmission environnementale du virus (Ribiere et al., 2007) serait en faveur de

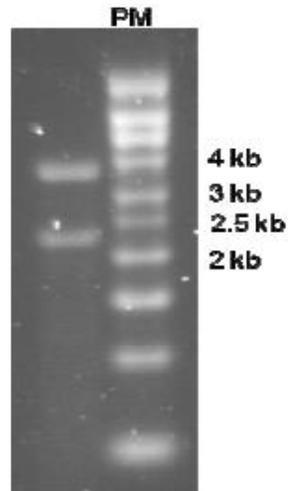


Figure 3 : Gel d'agarose des ARN majoritaires du CBPV. L'ARN 1 se situe entre 3 et 4 kb (kilobases) et l'ARN 2 entre 2 et 2,5 kb (Olivier et al., 2008).

PM : marqueur de taille moléculaire

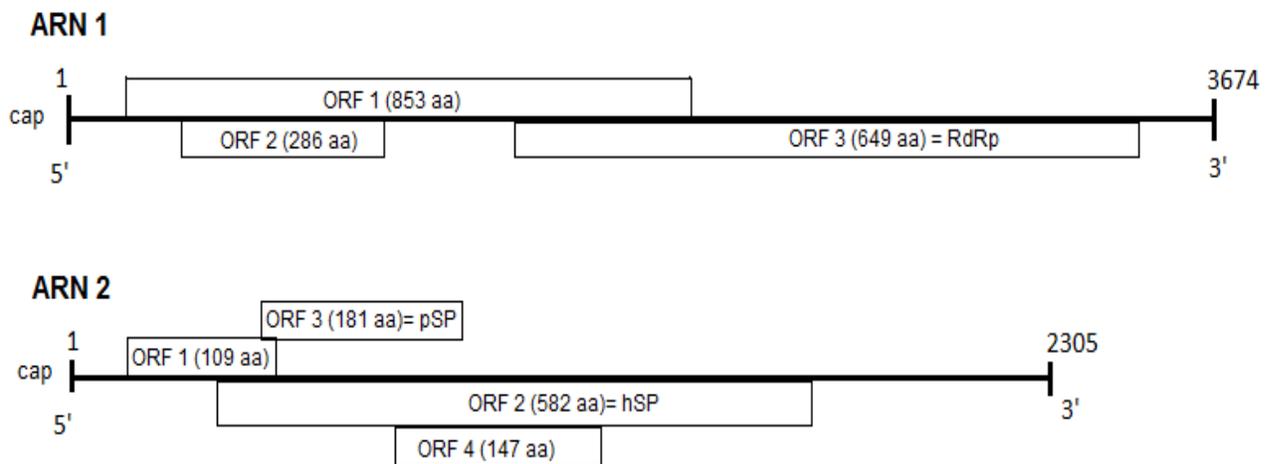


Figure 4 : Organisation du génome du CBPV (Olivier et al., 2008). ORF: open reading frame.

Aa: Acide aminé. pSP : predicted structural protein. hSP : Hypothetical structural protein.

particules résistantes aux facteurs physico-chimiques et donc à une structure non enveloppée.

II. Le génome du CBPV

Le CBPV est un virus à ARN simple brin positif. Cinq fragments d'ARN avaient été caractérisés par électrophorèse en gel de polyacrylamide : deux ARN majoritaires, l'ARN 1 et l'ARN 2 dont les tailles ont été estimées à 4 200 et 2 800 bases respectivement, et trois ARN minoritaires, les ARN 3a, 3b et 3c, d'environ 1100 bases chacun (Overton et al., 1982).

Plus récemment, les 2 ARN majoritaires ont été visualisés sur gel d'électrophorèse (Olivier et al., 2008). En revanche, les 3 ARN minoritaires n'ont pas été détectés par ces auteurs (Figure 3). Cette étude a permis de séquencer les deux ARN majoritaires. La longueur de l'ARN 1 est de 3.674 bases et l'ARN 2 est de 2.305 bases. Ces ARN sont coiffés mais non polyadénylés. Ils porteraient 7 cadres de lecture putatifs, chevauchants (open reading frame, ORF), trois ORF sur l'ARN 1 et quatre sur l'ARN 2 (Figure 4).

Quant aux ARN minoritaires, ils pourraient être les segments du génome de la particule virale associée au CBPV (CBPSV) (Overton et al., 1982).

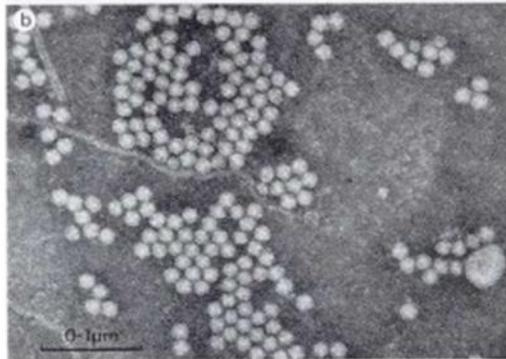


Figure 5: Microscopie électronique du CBPSV, Chronic bee paralysis satellite virus, « Atlas of invertebrate viruses » Adams J. R. & Bonami J. R., 1991.

III. La particule virale associée au CBPV (CBPSV)

Lors de l'étude du CBPV en 1980 (Bailey et al, 1980), une particule virale a été fréquemment retrouvée associée au CBPV. Elle a été nommée *Chronic bee paralysis virus associate* (CBPVA), mais ensuite elle a été renommée *Chronic bee paralysis satellite virus* (CBPSV) par le Comité international de taxonomie des virus (Fauquet et al., 2005). La particule du CBPSV est isométrique et mesure environ 17 nm de diamètre (Bailey et al., 1980) (Figure 5). Le CBPSV ne serait pas sérologiquement reliée au CBPV, son coefficient de sédimentation est de 41 S et sa densité en chlorure de césium de 1,38 g/cm³. Une seule protéine de capsid de 15 kDa a été décrite.

Son génome serait composé de trois fragments d'ARN simple brin, les ARN A, B et C (Overton et al., 1982). Ces ARN sont égaux et leur taille a été estimée à environ 1.100 bases. Par analyse de fingerprint, il a été montré que les trois ARN minoritaires du CBPV migrent de manière identique aux ARN A, B et C du CBPSV. Par conséquent, les ARN identifiées comme minoritaires du CBPV pourraient être un artéfact expérimental et correspondre aux ARN du CBPSV (Overton et al., 1982).

IV. Fonctions des protéines du CBPV

Le séquençage du CBPV a permis de donner plus d'informations concernant les fonctions des protéines du virus. Par la comparaison à des séquences virales, connues (Ahola and Karlin, 2015; Kuchibhatla et al., 2014; Olivier et al., 2008) et par l'étude de spectrométrie de masse (Chevin et al., 2015), il a été avancé que l'ARN 1 coderait pour les protéines non structurales tandis que l'ARN 2 coderait pour les protéines structurales.

1. Protéines codés par l'ARN 1

L'analyse de la séquence de l'ORF 3 de l'ARN 1 montre qu'il code pour un motif « glycine-acide aspartique-acide aspartique » (GDD), spécifique du site catalytique d'une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) (Olivier et al., 2008). De plus, le gène possède les huit domaines conservés qui présentent notamment de fortes similitudes avec la séquence des domaines conservés I, IV, V et VI de la RdRp des virus des familles *Nodaviridae* et *Tombusviridae*.

Lors d'une thèse précédente effectuée au laboratoire, la protéine traduite de l'ORF 3 de l'ARN 1 a été purifiée sous forme soluble. Grâce aux analyses par chromatographie d'affinité (IMAC) et Peptid Mass Fingerprinting (PMF), l'équipe a pu montrer que cette protéine correspondrait à la RdRp. Cependant, son activité catalytique n'a pas été étudiée (<http://www.theses.fr/2012AIXM4734>)

Cette protéine est supposée être codée par un mécanisme de frameshift entre l'ORF 1 et l'ORF 3. Ce mécanisme entraîne le décalage du cadre de lecture par le ribosome et donc la régulation de l'expression de gènes. Ainsi, il permet de synthétiser une protéine de 135 kda résultant de la fusion entre l'ORF 1 et l'ORF 3 au lieu de deux protéines de 95,3 kda et 74,1 kda respectivement (Olivier et al., 2008).

L'hypothèse du frameshift est suggérée en se basant sur deux caractéristiques généralement considérées comme des signaux de frameshift (Brierley, 1995):

- Présence d'un héptanucléotide (CCC UUUC) en amont de codon « Start » de l'ORF 3 qui est conservé entre les deux isolats de CBPV étudiés (Olivier et al., 2008).
- La présence d'une séquence conservée de 221 nucléotides en aval du codon « Start » de l'ORF 3 qui pourrait former une structure secondaire de type tige-boucle.

En plus du frameshift, une autre hypothèse a été aussi suggérée. En effet, lors de la production de la protéine codée par l'ORF 3, celle-ci a présenté une masse moléculaire inférieure à la masse attendue de la RdRp (74,1 kDa). Ces résultats

suggèrent un clivage de la protéine. En étudiant la composition en acides aminés de la séquence de la RdRp, un site putatif de clivage a été déterminé. Ce sont les résidus 206 et 207 correspondant respectivement à une glutamine et une glycine (Q/G), qui pourraient être le site de protéolyse.

Les ARN génomiques sont coiffés du côté 5' et bloqués du côté 3' (Olivier et al., 2008), ce qui suggère l'existence d'une activité MTase. Une étude récente basée sur la comparaison de séquences virales du CBPV avec celles d'autres virus à ARN positif, en utilisant des logiciels automatiques et des analyses manuelles, a permis d'identifier des protéines homologues (Kuchibhatla et al., 2014). Les auteurs ont ainsi trouvé des similarités entre l'ORF 1 de l'ARN 1 et la MTase de certains virus du genre *Alphavirus*. Une autre étude appuie l'hypothèse que l'ORF 1 de l'ARN 1 de CBPV coderait pour un domaine MTase et GTase homologue à celui des alphavirus (Ahola and Karlin, 2015). De même, les *Lake Sinai Virus 1* et 2 (LSV 1 et 2), virus proches au plan phylogénétique du CBPV, possèdent aussi les domaines MTase et GTase (Runckel et al., 2011) (figure 7). Donc, l'ORF1 du CBPV pourrait coder pour les activités enzymatiques MTase et GTase.

En revanche, aucun homologue n'a été retrouvé pour l'ORF 2 de l'ARN 1 du CBPV (Kuchibhatla et al., 2014).

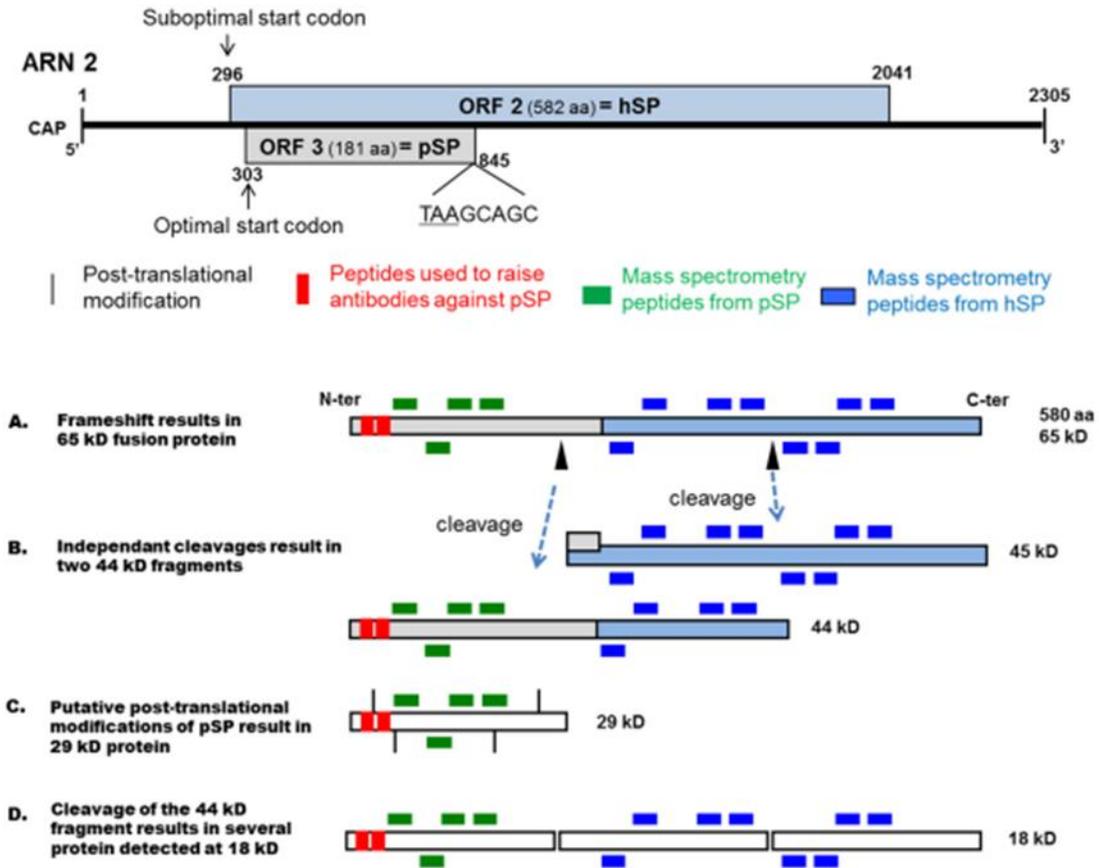


Figure 6 : Mécanisme de « stop codon readthrough » au niveau de l'ORF 3 et 2 de l'ARN 2 (Chevin et al., 2015).

A : L'ORF 3 est chevauchante l'ORF 2, lors de la traduction de la pSP un mécanisme de « readthrough » 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 immuno-détectée 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 individuellement 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.

1. Protéines codés par l'ARN 2

Lors des premières études du virus, une seule protéine de 23,5 kDa avait été décrite (Bailey et al., 1968). En 2000, une analyse par western blot du CBPV purifié révèle quatre protéines d'environ 75, 50, 30 et 20 kDa (Ribiere et al., 2000). Grâce au séquençage et à l'analyse des séquences, les ORF 2 et 3 de l'ARN 2 semblent coder pour deux protéines structurales (Olivier et al., 2008). En effet, ces deux ORF codent pour des protéines putatives dont la taille a été estimée à environ 65 et 20 kDa, respectivement. Ceci est en concordance avec les résultats obtenus préalablement (Ribiere et al., 2000). Une étude récente a montré que l'ARN 2 code pour les protéines structurales (Chevin et al., 2015). Grâce aux analyses des peptides issus des ORFs de l'ARN 2 par spectrométrie de masse, l'équipe a montré l'existence de deux protéines codées par l'ORF 2 et l'ORF 3 de l'ARN 2, nommées respectivement pSP (Predicted structural protein) et hSP (Hypothetical structural protein) (Figure 4 et Figure 6).

La hSP, détectée à des masses moléculaires inférieures à 65,5 kDa (44 kDa et 18 kDa), serait une protéine précurseur qui serait clivée durant l'assemblage de la capsid. La pSP a été détectée à une masse moléculaire supérieure à 19,7 kDa. Ainsi, les auteurs ont suggéré que cette protéine subirait des modifications post-traductionnelles (phosphorylation ou glycosylation) ou elle interagirait avec une autre protéine. La séquence de l'ORF 3 (pSP), se trouve dans un contexte de séquence Kozak et se chevauche avec la séquence de l'ORF 2 (hSP). Cela suggère un mécanisme de contrôle de la traduction, le « stop codon readthrough », au niveau du codon terminateur de l'ORF 3. Ce mécanisme 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 6). Ce type de mécanisme est connu chez des virus de plantes comme les virus *Potato virus X* et *Cauliflower mosaic virus* (Dreher and Miller, 2006)

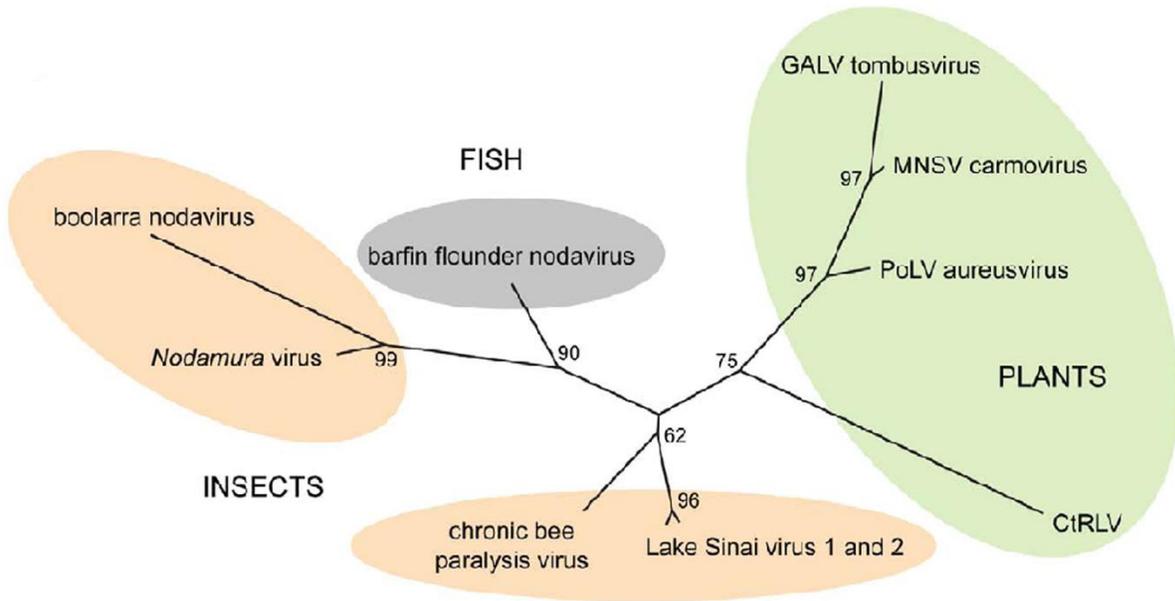


Figure 7: Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences en acides aminés de la RdRp montrant la position du CBPV (Runckel et al., 2011)

V. Classification phylogénétique

Le séquençage du CBPV a permis de mettre en évidence des similitudes entre l'ORF 3 de l'ARN 1 et la séquence des domaines conservés des RdRp des virus à ARN simple brin positif. En se basant sur ces domaines conservés, une étude phylogénétique a montré que le CBPV se positionne entre la famille *Nodaviridae* et *Tombusviridae* (Olivier et al., 2008). Les ARN de nodavirus comme du CBPV sont coiffés en 5' et non polyadénylés à l'extrémité 3' à l'exception des virus du genre *Alphanodavirus*. Les ARN des tombusvirus ne sont ni coiffés ni polyadénylés. L'organisation génomique de CBPV est similaire à celle des nodavirus, l'ARN 1 code pour la RdRp et l'ARN 2 code pour les protéines structurales. L'organisation du génome des tombusvirus est différente, le génome n'est pas fragmenté et il se compose de quatre ORF dont l'ORF 1 qui code pour la RdRp.

Des séquences génomiques de deux virus ont été récemment mises en évidence lors d'études sur des abeilles aux USA, ces séquences ont été attribuée aux virus LSV 1 et LSV 2 (Runckel et al., 2011). L'ARN 1 du CBPV partage des similitudes avec ces génomes. L'ORF 1 de l'ARN 1 du CBPV qui semblait être propre 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 les LSV 1 et 2 sur la même branche que le CBPV (Runckel et al., 2011)(Figure 7). Récemment, une analyse des séquences a mis en évidence un virus putatif nommé *Anopheline associated C virus* (AACV) (Cook et al., 2013). Ce virus d'insecte partage des similitudes avec le CBPV notamment un mécanisme de traduction de ses protéines comparable. En se basant sur la séquence de la RdRp, un arbre phylogénétique a été construit et montre que l'AACV est plus proche du CBPV que des LSV.

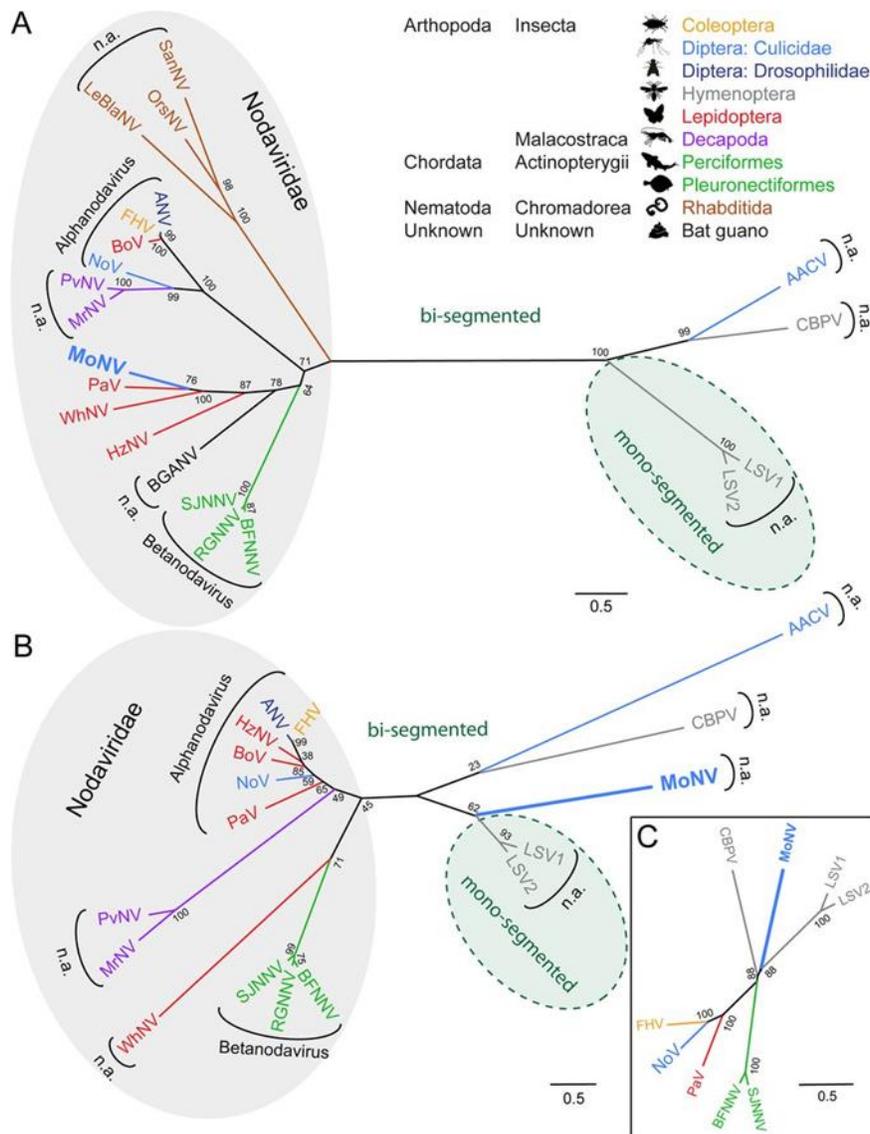


Figure 8 : Arbre phylogénétique montrant la position du MoNV en se basant sur la RdRP (A) et sur la protéine de la capside incluant tous les nodavirus (B) ou sur les représentants de nodavirus (C). Les analyses « Maximum Likelihood (ML) » ont été effectuées sur tous les sites de l'alignement guidé par la matrice de substitution Dayhoff en utilisant Mega v5. Les valeurs de bootstrap sont marquées à chaque nœud et sont basées sur 1000 réplicats. Les barres indiquent les substitutions durant l'évolution. En haut à droite, les hôtes des virus sont représentés en couleur. Les membres de la famille *Nodaviridae* sont surlignés en gris et les virus LSV 1 et LSV 2 en vert (Schuster et al., 2014).

Récemment, un nouveau virus apparenté aux nodavirus a été identifié chez des moustiques en Côte d'Ivoire (Schuster et al., 2014). Ce virus dénommé *Mosinovirus* (MoNV), de la famille *Nodaviridae* est aussi placé par les auteurs entre le CBPV et les LSV selon une étude phylogénétique basée sur la RdRp et sur la protéine de la capsid (Figure 8).

De plus, l'étude par spectrométrie de masse (Chevin et al., 2015) a montré que la pSP présente des motifs riches en arginine et lysine. Cela a été aussi retrouvé chez des protéines de capsid de virus d'insectes comme chez les alphanodavirus et les virus de plantes des genres *Bromovirus*, *Dianthovirus* et *Tombusvirus* (Chevin et al., 2015). Malgré ces différentes analogies, la classification du CBPV au sein d'une nouvelle famille virale reste à établir.

L'organisation génomique du CBPV et le manque d'un modèle cellulaire pour la réplication *in vitro* du virus rendent l'étude de son génome plus complexe. Il apparaît alors nécessaire de mettre en place un système de génétique inverse afin de faciliter sa caractérisation.

Chapitre 2 : La génétique inverse des virus à ARN de polarité positive

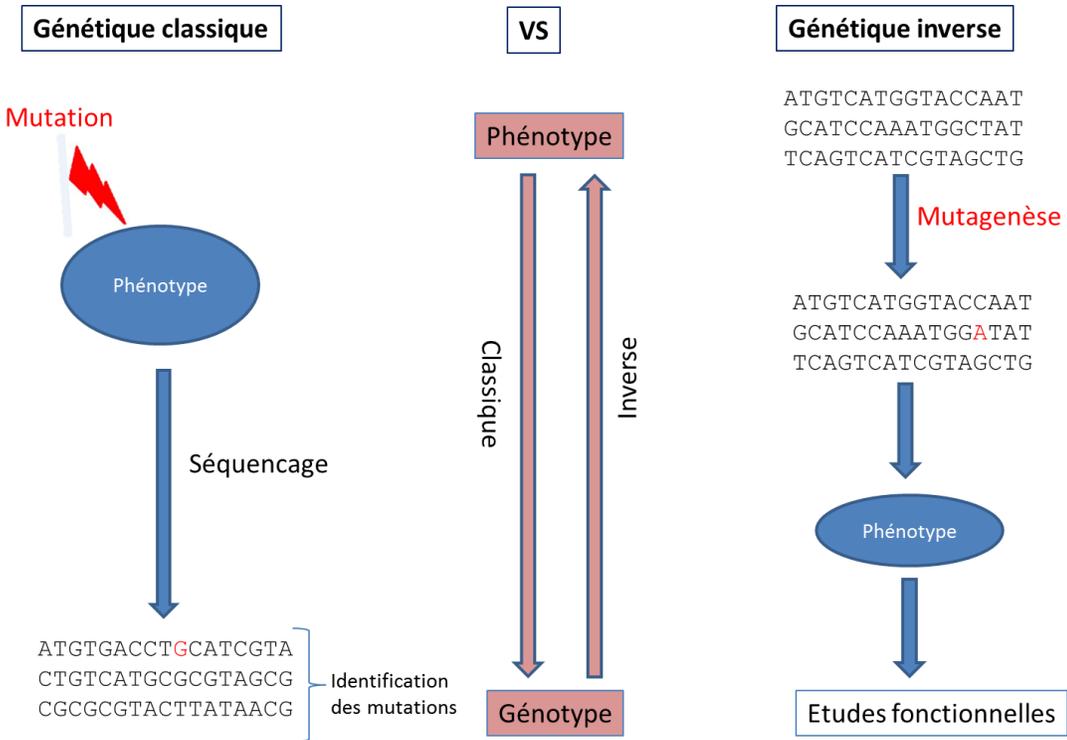


Figure 9 : Schéma montrant la différence de stratégie entre la génétique classique et la génétique inverse. La génétique classique part de l’observation d’un phénotype pour découvrir le(s) gène(s) associé(s) alors que la génétique inverse consiste à induire des mutations par mutagenèse afin d’étudier la fonction du gène. En rouge est indiquée la mutation.

Dans les années 1860, Gregor Mendel a réalisé les premiers travaux de génétique. Ensuite, la découverte de la structure de l'ADN (Watson and Crick, 1953) suivie par le développement du séquençage (Sanger et al., 1977) et l'invention de la PCR (Mullis et al., 1986) ont révolutionné la génétique. A ce jour, il existe deux types de génétique : classique et inverse (Figure 9).

La génétique classique s'appuie sur des mutants pour découvrir la fonction de gènes, à priori inconnus. La génétique inverse, quant à elle, repose sur l'introduction de modifications dans un ou plusieurs gènes définis, par mutagenèse dirigée (mutations ponctuelles, insertions, délétions...). Les modifications phénotypiques qui en résultent permettent de déduire la ou les fonctions des gènes considérés. Ainsi, on regarde une perte ou un gain de fonction.

Dans ce chapitre, je vais décrire particulièrement la génétique inverse et l'application de cette approche à l'étude des virus à ARN simple brin, positif.

Il existe différentes organisation des génomes de virus à ARN : génome segmenté/non segmenté, monocaténaire ou bicaténaire, de polarité positive ou négative. Chez les virus à ARN positif, l'ARN génomique a la même orientation que les ARN messagers viraux. L'acide nucléique peut directement être traduit en protéines, alors que l'ARN négatif de certains virus doit être transcrit par l'ARN polymérase virale en un ARN positif pour permettre la synthèse des protéines virales. Le complexe de réplication est alors présent dans la capsid de ces virus à ARN négatifs. Afin d'étudier et de mieux caractériser le génome des virus à ARN, la génétique inverse a largement été utilisée.

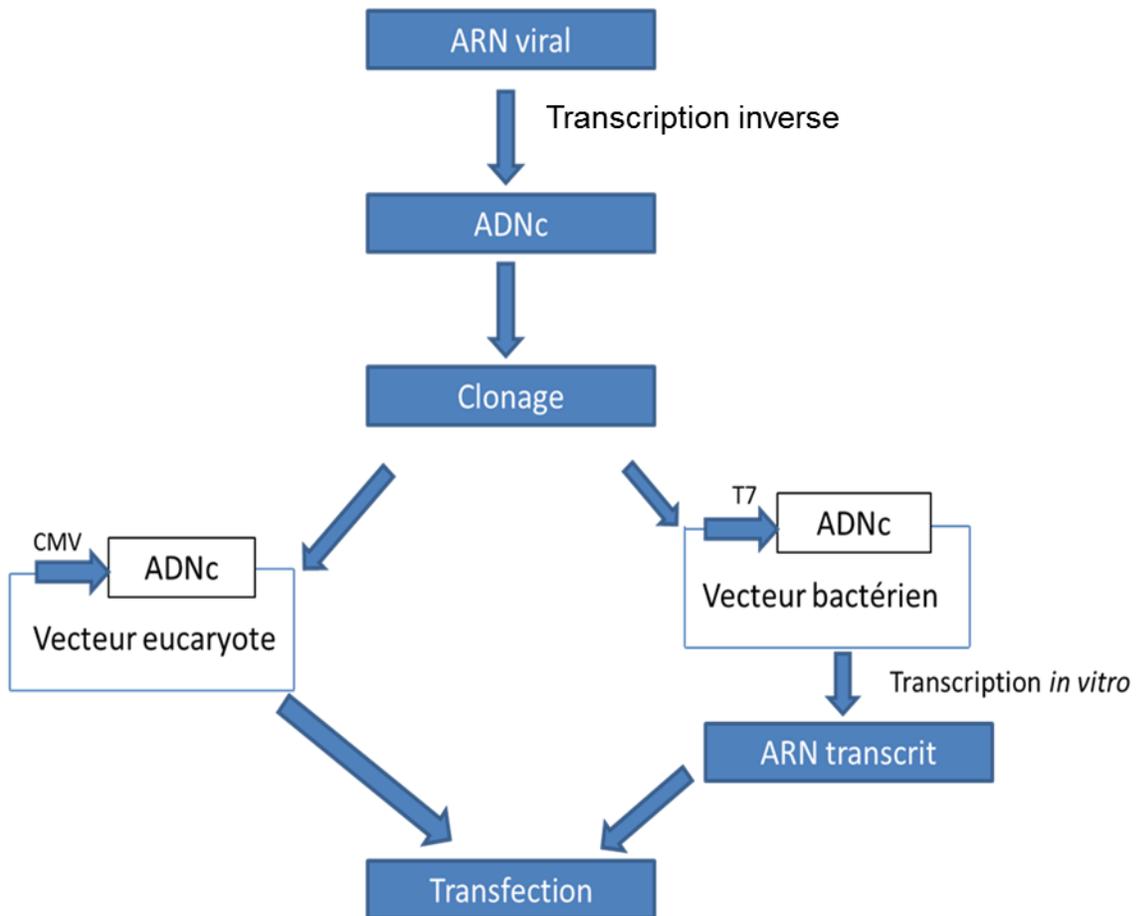


Figure 10 : Schéma montrant les étapes de la génétique inverse et les différentes stratégies de clonage chez un virus de polarité positive. L'ARN viral est retro-transcrit en ADNc qui sera cloné soit dans un vecteur eucaryote permettant d'être directement transfecté aux cellules, soit dans un vecteur bactérien suivi par une transcription *in vitro* afin de transférer les ARN transcrits.

A. Principe

Dans le domaine de la virologie, la génétique inverse des virus à ARN est définie comme la génération d'un virus infectieux à partir d'ADN complémentaire (ADNc) cloné dans un vecteur de transcription. L'ARN viral est retro-transcrit en ADNc grâce à une transcriptase inverse (ADN polymérase RNA dépendante – à l'origine une enzyme de rétrovirus). Ensuite, cet ADNc est cloné dans un vecteur possédant un promoteur permettant la synthèse d'ARN, qui seront traduits et répliqués afin de régénérer des virus. Il existe deux stratégies de génétique inverse (Figure 10) :

1. Le clonage dans un vecteur possédant un promoteur procaryote (exemple : le promoteur du bactériophage T7). Afin de régénérer le virus, une étape de transcription est réalisée *in vitro*. Les ARN transcrits seront transfectés aux cellules.
2. Clonage de l'ADNc dans un vecteur possédant un promoteur permettant la transfection directe du clone ADNc dans des cellules exprimant l'ARN polymérase DNA dépendante adéquat pour ce promoteur. Par exemple, un vecteur possédant le promoteur eucaryote (exemple promoteur du *Cytomegalovirus*, CMV) pourra être pris en charge par l'ARN polymérase DNA dépendante des cellules eucaryotes. Cette méthode a comme avantage de contourner la manipulation des ARN qui ne sont pas stables (acides nucléiques sensibles aux nucléases).

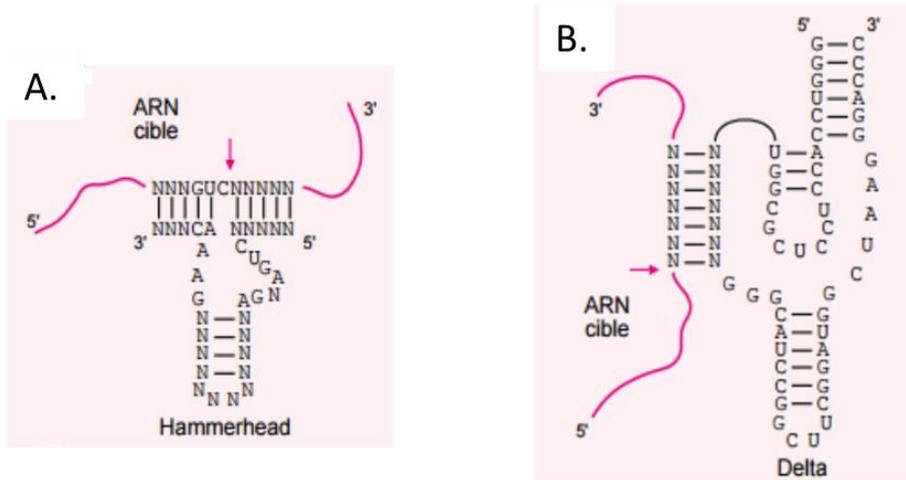


Figure 11 : Représentation schématique de deux ribozymes. A. le ribozyme hammerhead (en tête de marteau) ; et B. Le ribozyme du virus de l'hépatite delta (*Hepatitis delta virus*). Les ARN cibles sont représentés par une ligne dont seulement les nucléotides impliqués dans la reconnaissance ribozyme-substrat sont identifiés. Seule l'identité des nucléotides absolument requis est présentée. N représente un nucléotide quelconque (A, G, C ou U) ayant la capacité de former ou non des liaisons hydrogène par complémentarité des bases. Les sites de clivage sont pointés par des flèches (Mercure et al., 1997).

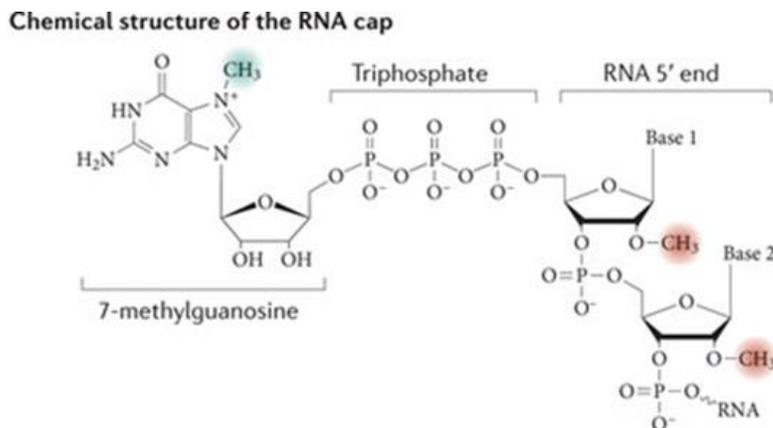


Figure 12: La structure chimique de la coiffe. Elle est composée d'un groupement 7-methylguanosine lié à l'extrémité 5' nucléoside de la chaîne ARNm à travers un pont 5'-5' triphosphate. Le groupement méthyl à la position N7 est surligné en bleu, et le groupement méthyl à la position 2'O du premier et deuxième résidu nucléoside est surligné en rouge. (Decroly et al., 2012)

L'arrêt de la transcription se fait soit par clivage du plasmide (traduction *in vitro* exclusivement), soit par l'intermédiaire d'un terminateur permettant le décrochage de l'ARN polymérase, ou encore en ajoutant un ribozyme du côté 3' (exemple le ribozyme de l'*Hepatitis delta virus*, HDV). Cette séquence permet par sa conformation de catalyser son propre clivage à un site spécifique (Figure 11).

Lors de la réplication des virus à ARN dans les cellules, l'ARN polymérase ARN-dépendante virale (RdRp) multiplie le nombre des copies génomiques. Pour les virus d'ARN de polarité positive, l'ARN viral est immédiatement traduit en protéines virales grâce à l'action des ribosomes de l'hôte cellulaire. Ainsi, le système de génétique inverse pour les virus à ARN de polarité positive se base principalement sur les deux stratégies décrites ci-dessus (Biacchesi, 2011; Scobey et al., 2013; Souto et al., 2015). Dans les cellules eucaryotes, plusieurs éléments de traduction sont importants pour le virus. Parmi ces éléments, on peut citer la méthyl-transférase qui permet le coiffage des ARNm. La coiffe est une 7-méthylguanine qui se lie au premier nucléotide de l'ARN transcrit *via* un pont 5'-5' triphosphate (Figure 12) (Decroly et al., 2012). Cette coiffe a plusieurs rôles biologiques importants : la protection de l'ARN messenger (ARNm) de la dégradation par la 5' exo-ribonucléase, et la reconnaissance de l'ARNm par le facteur d'initiation de traduction d'eucaryote 4E (eIF4E) (Shatkin, 1976).

Chez les virus à ARN de polarité négative, l'ARN est encapsidé dans la nucléocapside avec les protéines virales nécessaires à sa réplication pour former une ribonucléoprotéine (RNP). L'acide nucléique seul n'est pas infectieux. L'ARN viral n'est pas un ARNm, et donc il n'est ni pas le substrat de l'ARN polymérase DNA dépendante cellulaires ni du complexe de traduction. Pour permettre la synthèse de l'ARNm par génétique inverse, il faut reconstituer la RNP.

Pour ce faire, le génome du virus est introduit dans les cellules selon différentes stratégies (Figure 10):

1. Co-transfection de l'ADNc anti-génomique linéarisé possédant le promoteur avec soit un virus helper qui apporte la RdRp soit différents plasmides exprimant la RdRp et codant pour les protéines nécessaires à la formation de la RNP.
2. Système de transcription bidirectionnelle ou unidirectionnelle. Cela consiste à cloner le génome du virus dans un plasmide exprimant l'ARN polymérase I et II et sous le contrôle du promoteur CMV, ce qui permet de synthétiser l'ARN viral et l'ARNm à partir du même plasmide.

Cette approche est nommée : « Ambisense ». Elle a été utilisée pour certains virus comme le virus *Influenza* (Hoffmann et al., 2000) et virus de la chorioméningite lymphocytaire LCMV (Flatz et al., 2006).

Par ailleurs, de récents progrès ont aussi été utilisés pour les virus à polarité positive ou négative. Notamment, l'une d'elles consiste à utiliser un chromosome artificiel bactérien (Bacterial Artificial Chromosome - BAC). Le génome viral est cloné dans un plasmide BAC sous forme d'ADNc et sous le contrôle du promoteur CMV ou T7. Cette approche permet une bonne stabilité des longues séquences d'ADN dans les bactéries, une production illimitée des clones ADNc, et une efficacité élevée lors des transfections dans des cellules mammifères. Elle a été initialement utilisée pour les virus à ADN. Grâce à ces avantages et sa stabilité dans *Escherichia coli*, les chercheurs l'ont également utilisé pour la mise en place du système génétique inverse pour certains virus à ARN positif (Almazan et al., 2013; Usme-Ciro et al., 2014) et négatif (Hotard et al., 2012).

B. Application de la génétique inverse en virologie

Le premier virus à ARN régénéré à partir de son ADNc est le bactériophage Q bêta en 1978 (Taniguchi, 1978). En 1981, une étude a montré pour la première fois que le clone ADNc du *Poliovirus*, virus d'eucaryote à ARN simple brin de polarité positive du genre *Enterovirus*, peut générer un virus infectieux dans des cellules des mammifères directement après transfection (Racaniello and Baltimore, 1981). Ensuite, avec la découverte de la PCR (Mullis et al., 1986) et le développement de la méthode de transcription *in vitro* en utilisant des promoteurs T7 ou SP6, il est devenu possible de synthétiser l'ARN viral et ensuite de l'injecter aux cellules.

Par conséquent, la génétique inverse est devenue un outil très puissant pour étudier et mieux caractériser les génomes viraux, grâce à la facilité de manipulation des clones ADNc infectieux. Pour étudier les fonctions des protéines et pour l'analyse des gènes viraux, ce clone peut être modifié par mutagenèse dirigée ou par synthèse *de novo*. Néanmoins, la mise en place de ce système n'est pas toujours évidente pour certains virus.

Le CBPV est un virus d'ARN de polarité positive et selon les arbres phylogénétiques, il est proche des nodavirus et tombusvirus (Figure 7 et Figure 8). Des exemples d'application de la génétique inverse chez les virus à ARN positif sont donc détaillés dans la partie ci-après.

Virus à polarité positive

L'étude des virus à ARN à polarité positive est plus facile que celle des virus à ARN négatif étant donné que l'ARN nu de ces virus est directement infectieux. Le virus se fixe sur un récepteur cellulaire, il pénètre dans la cellule et libère son ARN viral. Cet ARN viral (+) sert directement d'ARN messager qui sera traduit en protéines virales structurales et non structurales. Pour assurer la duplication de l'ARN (+), un intermédiaire négatif est toutefois nécessaire. Ce brin d'ARN négatif est synthétisé à partir de la matrice positive grâce à la RdRp virale. Les ARN (+) synthétisés seront les

nouveaux ARN génomiques viraux ; ils peuvent également participer à l'amplification de la synthèse protéique nécessaire à la production des particules virales.

Le premier système de génétique inverse pour un virus ARN de polarité positive, portant sur le poliovirus, a été mis en place en 1981 (Racaniello and Baltimore, 1981). Ces travaux ont souligné l'intérêt de cette stratégie. Depuis, plusieurs systèmes de génétique inverse ont été établis pour plusieurs virus à ARN de polarité positive comme des virus appartenant aux familles *Picornaviridae*, *Nodaviridae*, *Coronaviridae* ou au genre *Flavivirus*.

1. Les picornavirus

Ce sont des virus non enveloppés, la capsid à une symétrie icosaédrique, leur génome est constitué d'ARN de polarité positive dont la taille varie entre 7 et 9 kb. Ces virus infectent les animaux et les humains et causent des maladies qui peuvent être sévères comme la poliomyélite. Dans la famille *Picornaviridae*, les poliovirus et les rhinovirus sont les plus étudiés. Dans les années 1950, les premiers efforts ont été faits pour développer un vaccin contre le virus de la poliomyélite dans le but d'éradiquer la maladie.

En 1981, Racaniello et Baltimore ont réussi à mettre en place le premier système de génétique inverse pour le poliovirus (Racaniello and Baltimore, 1981). Dépourvus à l'époque de la PCR, les auteurs avaient réussi à transcrire des segments génomiques et à les cloner dans plusieurs plasmides qui étaient co-transfectés aux cellules. Ainsi, Cette approche a été adaptée pour développer des systèmes de génétique inverse pour d'autres picornavirus comme *Theiler's virus* (Roos et al., 1989), *Hepatitis A virus* (Cohen et al., 1987), *Rhinovirus* (Mizutani and Colonna, 1985), *Foot and Mouse Disease virus* (Zibert et al., 1990), *Swine Vesicular Disease virus* (Inoue et al., 1990), *Echovirus type 6* (Blackburn et al., 1992), *Echovirus type 9* (Zimmermann et al., 1995). Les progrès dans la compréhension et la construction des plasmides ont abouti à des systèmes de génétique inverse plus efficace et qui sont utilisés aujourd'hui pour les études des picornavirus et pour la mise en place des vaccins, comme dans le cas de *l'Enterovirus 71* (Meng et al., 2012) responsable de la maladie main-pieds-bouche.

2. Les flavivirus

Les virus du genre *Flavivirus* sont des virus enveloppés, simple brin d'ARN de polarité positive. La taille du génome varie entre 10,5 kb et 11 kb. Il n'existe qu'un seul ORF entouré du côté 5' et 3' d'une région non traduite (UTR) formant une structure secondaire indispensable pour la réplication du génome et la traduction des protéines (Gritsun and Gould, 2007). Les flavivirus contiennent aussi un ARN subgénomique de 0,3 à 0,5 kb, non codant et présent dans l'extrémité 3'-UTR de l'ARN viral. Cet ARN subgénomique semble être essentiel pour la réplication du virus dans les cellules et pour moduler la pathogénicité chez les animaux (Roby et al., 2014). Ce genre regroupe plusieurs virus qui causent des maladies sévères comme l'encéphalite, la méningite et la myélite, d'où la nécessité d'établir des systèmes de génétique inverse afin de mieux comprendre ces virus (Ishikawa et al., 2014). Pour les flavivirus comme pour les autres virus à ARN simple brin positif, la mise en place de la génétique inverse nécessite soit l'ARN viral transcrit *in vitro* soit l'ADNc viral cloné ou des systèmes BAC, qui seront transfectés dans des cellules compétentes. Plusieurs systèmes de génétique inverse existent pour les flavivirus, on peut citer ceux décrits pour le virus de la fièvre jaune (Bredenbeek et al., 2003; Rice et al., 1989), les virus de la dengue types 1-4 (Blaney et al., 2004; Chen et al., 1995; Polo et al., 1997; Puri et al., 2000), le virus de Kunjin (Khromykh and Westaway, 1994), le virus de l'encéphalite japonaise (Yun et al., 2003), le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) (Gritsun and Gould, 1998), le Langat virus (Campbell and Pletnev, 2000), le virus West Nile (Bahuon et al., 2012; Yamshchikov et al., 2001) et le virus de la fièvre hémorragique d'Omsk (Yoshii et al., 2011).

Grâce à la manipulation des génomes par mutagenèse et la production des mutants, ces systèmes de génétique inverse ont permis de mieux comprendre la biologie des flavivirus comme les interactions virus/hôtes, les facteurs de virulence (Dridi et al., 2015; Mandl, 2005), le mécanisme de l'évasion immunitaire virale (Schuessler et al., 2012), ainsi que de contribuer au développement des vaccins et de traitements antiviraux (Yang et al., 2014).

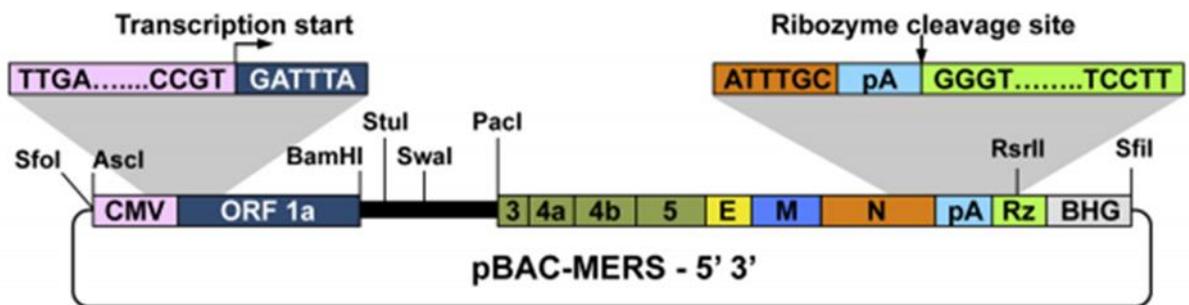


Figure 13 : Schéma représentatif du système BAC-MERS-5'-3'. Le promoteur CMV en rose, le début de la séquence de l'ORF 1a du MERS-CoV en bleu, les différents sites de restriction, la queue polyA en bleu clair et le site du ribozyme HDV. (Almazan et al., 2013)

3. Les coronavirus

Les coronavirus sont des virus enveloppés de la famille *Coronaviridae*. Leur génome est composé d'ARN simple brin de polarité positive dont la taille varie entre 26 et 31 kb. Ils infectent les mammifères, y compris les humains. Ils ciblent la trachée respiratoire, les organes gastro-intestinaux ainsi que les tissus neurologiques. Certains de ces virus peuvent causer des maladies graves chez l'homme comme le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV), le coronavirus du syndrome respiratoire du moyen orient (MERS-CoV) et le coronavirus du bovin.

Pour mettre en place les systèmes de génétique inverse pour les coronavirus les trois approches citées précédemment ont été adoptées. Par exemple, le système BAC a été utilisé pour la génétique inverse du MERS-CoV (Figure 13) et pour le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV) (Balint et al., 2012). Ces systèmes ont permis d'étudier le rôle de certaines protéines virales impliquées dans la réplication et la pathogenèse mais aussi dans la génération de virus génétiquement atténués qui constituaient des candidats potentiels à l'élaboration de vaccins contre le SARS-CoV et d'autres coronavirus (Almazan et al., 2013; Fett et al., 2013; Lamirande et al., 2008).

Une étude récente de génétique inverse pour le virus de l'hépatite murine (MHV) a permis de mettre en évidence les facteurs de virulence du virus et les protéines virales responsables de la pathogenèse (Zhang et al., 2015).

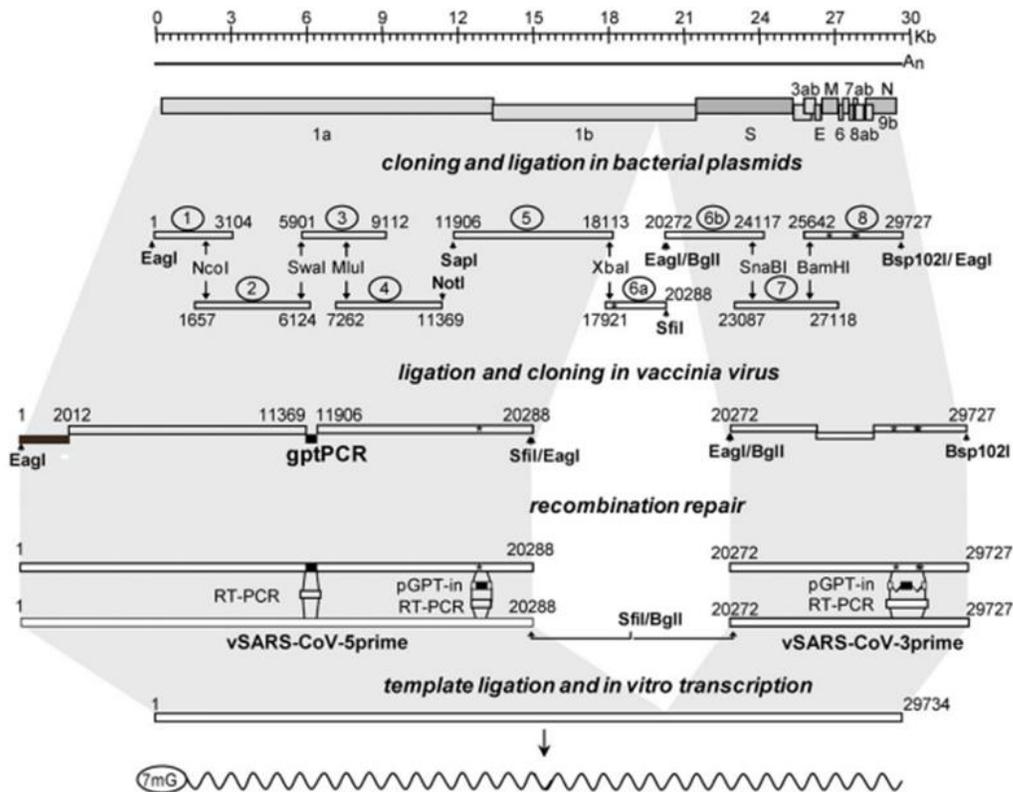


Figure 14 : Construction du système de génétique inverse du SARS-CoV basé sur le clonage dans le virus de la vaccine. Le génome du SARS-CoV est indiqué en haut du schéma. Neuf clones ADNcont été produits pour couvrir la séquence de l'ARN génomique virale du SARS-CoV isolat HKU-39849. Les sites de restrictions utilisées pour la liaison des différents clones sont indiqués ainsi que les sites de restriction ajoutés (en gras). Les fragments ADNcinstables ont été synthétisés par PCR et clonés dans le virus de la vaccine par recombinaisons homologues afin de reconstruire les fragments subgénomiques du SARS-CoV. Ceci a permis d'obtenir deux clones du virus de la vaccine : clone vSARS-CoV-5' et clone vSARS-CoV-3'. Les fragments d'ADN ont été isolés du virus de la vaccine par digestion enzymatique et ensuite liés par les sites de restriction SfiI and BglI. A la fin, une étape de transcription *in vitro* a permis d'obtenir l'ARN du génome de SARS-CoV. (van den Worm et al., 2012)

Une nouvelle approche a été aussi utilisée (Figure 14). Elle consiste à se servir du virus de la vaccine comme vecteurs de clonage. Elle a été utilisée pour la première fois pour générer des clones infectieux du *Coronavirus humain 229E* (Thiel et al., 2001), ensuite pour le MHV (Coley et al., 2005), le SARS-CoV (van den Worm et al., 2012), le FIPV (Tekes et al., 2012). Cette approche présente un avantage important : la recombinaison homologue du virus de la vaccine peut être utilisée pour modifier la séquence insérée durant la phase de répllication *in vitro* du vecteur. Cette stratégie de mutagenèse dirigée a été largement appliquée pour introduire des séquences hétérologues au génome des coronavirus recombinants (van den Worm et al., 2012), pour la délétion ou la modification des gènes viraux (Lei et al., 2013; Stokes et al., 2010) ou même pour la réparation des erreurs dans la séquence (Coley et al., 2005; van den Worm et al., 2012).

En plus, différentes constructions plasmidiques de coronavirus ont été générés en utilisant les différentes approches citées (Almazan et al., 2006; Almazan et al., 2004; Ge et al., 2007). Elles ont été utilisées pour l'identification des facteurs viraux et cellulaires impliqués dans la synthèse de l'ARN des coronavirus (Almazan et al., 2004; Galan et al., 2009) et pour évaluer des souches vaccinales (Chen et al., 2005a).

4. Les Nodavirus

Les nodavirus appartiennent à la famille des *Nodaviridae*. Ce sont des virus non enveloppés, à structure icosaédrique. Leur génome est constitué de deux segments d'ARN de polarité positive, coiffé en 5' et polyadénylé en extrémité 3'. Ils infectent les invertébrés et les vertébrés, notamment les poissons mais aussi les insectes, voire les mammifères pour les Alphanodavirus.

Le premier système de génétique inverse pour les Nodavirus a été mis en place pour le virus du coléoptère noir en 1986 (Dasmahapatra et al., 1986). Cela a été réalisé grâce à la transfection des ARN génomiques transcrits *in vitro* à partir des clones du virus dans les cellules de drosophile. Les ARN transcrits sont infectieux et ont permis de régénérer le virus. Ensuite en 2001, un autre système de génétique inverse a été reporté pour un betanodavirus : *Striped jack nervous necrosis virus* (SJNNV).

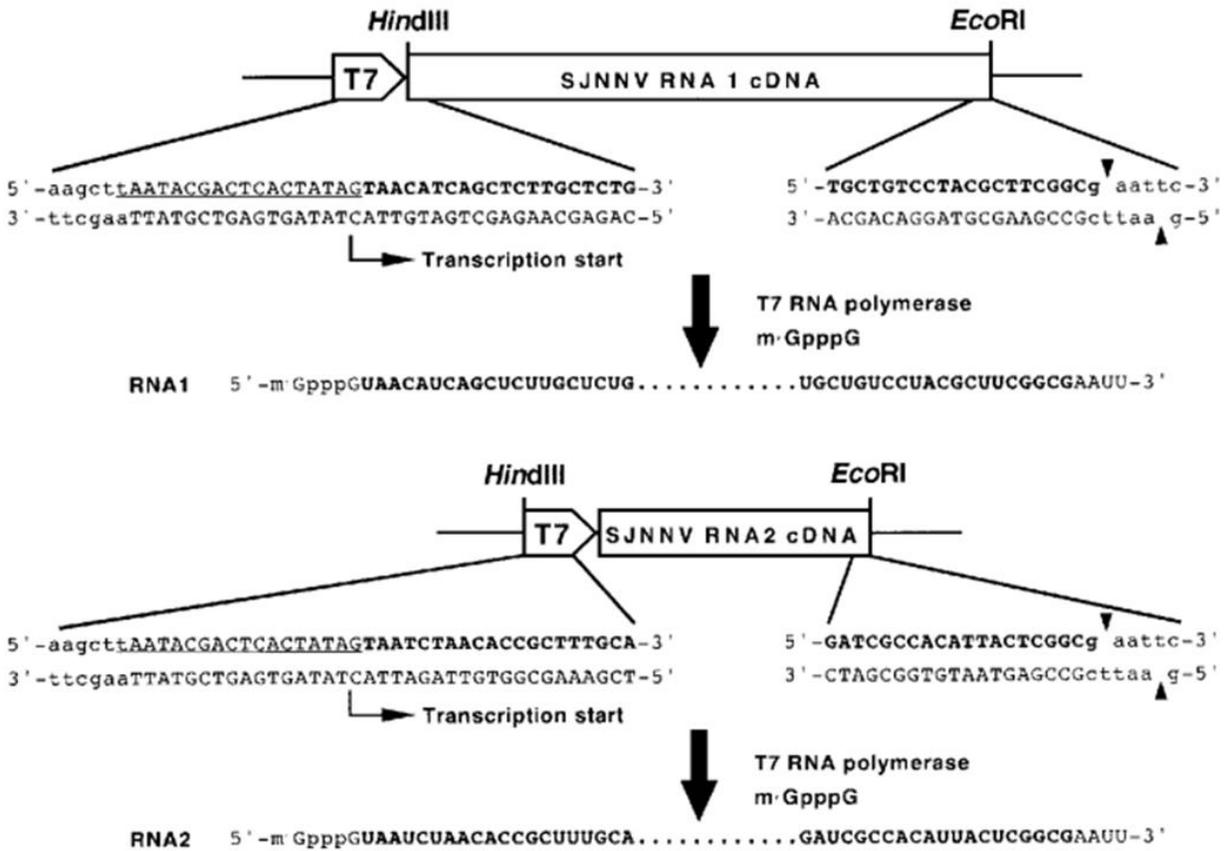


Figure 15: Le système de génétique inverse pour le *Striped jack nervous necrosis virus* (SJNNV). Les séquences ADNc de l'ARN 1 et l'ARN 2 sont clonées dans le vecteur puC18. Les plasmides recombinants ont été linéarisés par *EcoRI* et transcrits *in vitro* en présence de la coiffe m⁷GpppG. La séquence de l'ARN 1 et l'ARN 2 est indiquée en gras. La séquence du promoteur T7 est soulignée et le 1^{er} site de transcription est indiqué: transcription start. (Iwamoto et al., 2001).

Ce système est basé sur la transfection des ARN transcrits et coiffés *in vitro* dans des cellules de poissons E-11 (Figure 15) (Iwamoto et al., 2001). Enfin une autre modification a été apportée à la construction des clones infectieux pour répondre aux contraintes de respect de la séquence terminale des extrémités 3'. Le clivage précis des ARN synthétisés était obtenu par l'ajout du ribozyme dérivé du virus delta de l'hépatite humaine (HDV) du côté 3' (Figure 16). Cette stratégie a été utilisée pour mettre en place le système de génétique inverse pour le *Redspotted grouper nervous necrosis virus* (RGNNV) (Takizawa et al., 2008).

Ces systèmes de génétique inverse ont permis de mieux explorer la biologie des Nodavirus en créant des mutants qui ont servi à étudier les fonctions des protéines (Chen et al., 2009; Su et al., 2009), à déterminer la région responsable de la spécificité d'hôtes chez les betanodavirus (Ito et al., 2008) ainsi qu'à caractériser les facteurs de virulence (Souto et al., 2015).

L'organisation du génome du CBPV est similaire à celle des nodavirus à l'exception que les ARN du CBPV ne sont pas polyadénylés. Ainsi, les modèles et les stratégies du développement de la génétique inverse utilisées pour les nodavirus pourront être appliqués pour le CBPV.

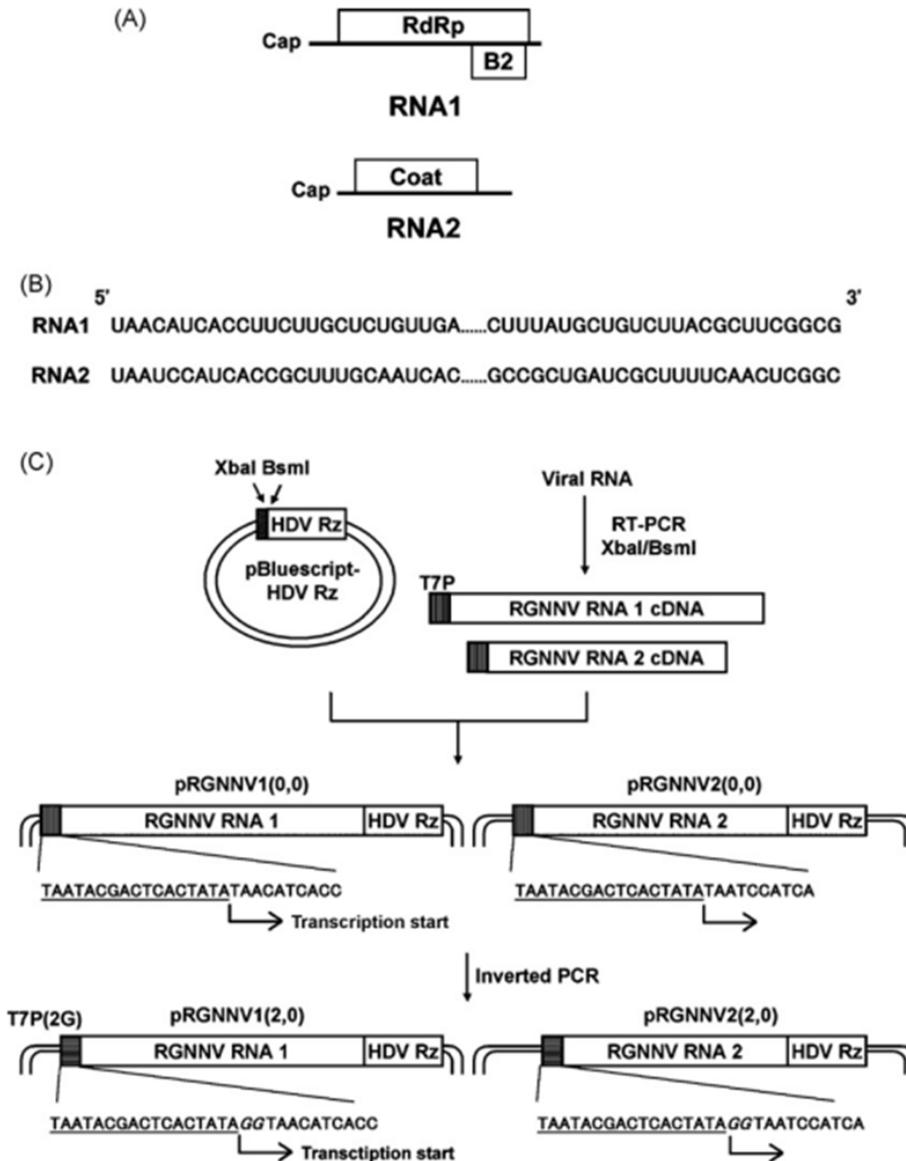


Figure 16 : Construction des plasmides ADNC pour le RGNNV. (A) La structure du génome de bétanodavirus. RdRP : ARN polymérase ARN dépendante. (B) Les extrémités 5' et 3' des séquences du RGNNV déterminée par 5' et 3' RACE. (C) Un digramme schématique des plasmides contenant la séquence entière du génome du RGNNV. La séquence du promoteur T7 est soulignée. En italiques, les deux résidus additionnels de l'ARN viral transcrit. HDV Rz : ribozyme delta du virus de l'hépatite. T7P : promoteur T7. T7P (2G) le promoteur T7 avec les deux résidus guanine rajoutés. (Takizawa et al., 2008).

Objectif de la thèse

Cette thèse était cofinancée par l'Anses et la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur. Les travaux expérimentaux se sont principalement déroulés au sein de l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) de Sophia Antipolis dans l'Unité de pathologie d'abeille mais aussi dans le cadre de collaborations avec deux autres laboratoires.

Mon travail était divisé en trois parties : la première consistait à définir les éléments génétiques essentiels à la réplication du virus en éprouvant l'hypothèse selon laquelle les ARN majoritaires (ARN 1 et ARN 2) peuvent par infection *in vivo* induire les signes cliniques de la paralysie chronique chez l'abeille. Cette partie avait pour but d'enrichir nos connaissances fondamentales sur la réplication du virus. Ce travail représentait aussi la première étape dans la mise en place d'un système de génétique inverse.

La deuxième partie consistait à cloner le génome de CBPV et à optimiser les stratégies de transfection *in vivo* d'ARN synthétisés *in vitro* afin de permettre la réplication virale chez des abeilles émergentes. Face aux difficultés rencontrées, une collaboration a été initiée avec l'équipe de « Virologie et immunologie moléculaire » sous la direction du Dr Michel Brémont à l'INRA de Jouy-en-Josas. Cela m'a permis de redéfinir l'approche utilisée et de cloner le virus dans un nouveau vecteur sous le contrôle d'un promoteur eucaryote (promoteur du cytomégalovirus [CMV]). En effet, cette stratégie nous permettait d'envisager l'inoculation directe des clones ADNc aux abeilles, sans recours à la transcription *in vitro*.

Enfin, les clones ADNc m'ont permis de réaliser une étude fonctionnelle visant à valider expérimentalement la présence des domaines MTase et GTase supposée être codée par l'ORF 1 de l'ARN 1 du CBPV. Cette étude devait nous permettre également de mieux comprendre le mécanisme de traduction des protéines virales. Ce travail a été effectué au sein de l'UMR CNRS 7257 à l'AFMB, sous l'encadrement du Dr Etienne Decroly.

Partie 2 : Travaux expérimentaux

Chapitre 1 : Les éléments génétiques essentiels à la réplication du CBPV

Ce chapitre décrit les essais d'infection expérimentale réalisés afin de montrer le pouvoir infectieux des ARN majoritaires du CBPV. Il est divisé en trois parties. Dans la première, je décris les essais de mise en culture des cellules d'abeille de la lignée AmE-711 récemment décrite (Golbrish et al., 2013). La seconde partie est relative aux travaux préliminaires d'optimisation des conditions de purification des ARN sur gel et de la concentration en ARN des inocula, induisant chez l'abeille les signes cliniques de la paralysie chronique. Dans la troisième partie, les infections expérimentales démontrant le pouvoir infectieux des ARN 1 et ARN 2 (nommés ARN majoritaires) chez l'abeille seront présentées sous la forme d'un article.

A. Les essais de mise en culture de la lignée de cellules d'abeilles AmE-711

I. Introduction

Plusieurs études ont reporté la mise en place de culture de cellules d'abeilles. Les premières décrivaient la préparation de cultures primaires de neurones (Kreissl and Bicker, 1992; Laurent et al., 2002) et de cellules antennaires (Gascuel et al., 1994). Mais ces cultures primaires ne pouvaient pas se maintenir plus d'un mois en culture. En 2006, Bergem et ses collaborateurs ont développé une méthode permettant d'initier la culture de cellules embryonnaires d'abeille au stade pré-gastrula et de maintenir ces cellules viables et capables de se diviser pendant plus de 3 mois. Cependant, le manque d'informations sur les facteurs de différenciation des cellules de l'abeille ne permettait pas d'obtenir des lignées cellulaires spécifiques (Bergem et al., 2006). Récemment, une équipe américaine a mis en place une lignée de cellules embryonnaires d'abeille, nommée AmE-711 (Goblirsch et al., 2013). La disponibilité d'une telle lignée cellulaire pouvant s'avérer un outil très utile pour mon travail de thèse, j'ai donc pris le contact avec les auteurs afin de recevoir ces cellules dans l'objectif de mettre en place un modèle cellulaire *in vitro* pour étudier le CBPV.

Trace mineral stock D ($\times 10^3$)

Ingredient	Weight (mg/100 ml)	Final molarity in L-15B
Stock solution A ($\times 10^5$)		
CoCl \cdot 6H $_2$ O	20	8.4×10^{-9}
CuSO $_4$ \cdot 5H $_2$ O	20	8.0×10^{-9}
MnSO $_4$ \cdot H $_2$ O	160	9.5×10^{-8}
ZnSO $_4$ \cdot 7H $_2$ O	200	7.0×10^{-8}
Stock solution B ($\times 10^5$)		
NaMoO $_4$ \cdot 2H $_2$ O	20	8.3×10^{-9}
Stock solution C ($\times 10^5$)		
Na $_2$ SeO $_3$	20	1.2×10^{-8}
Stock solution D ($\times 10^3$)		
Glutathione (reduced)	1000	3.3×10^{-5}
Ascorbic acid	1000	7.5×10^{-5}
FeSO $_4$ \cdot 7H $_2$ O	50	1.8×10^{-6}
Stock solution A	1 ml	—
Stock solution B	1 ml	—
Stock solution C	1 ml	—

Tableau 2 : Liste des réactifs utilisés pour faire le stock minéral. Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (Goblirsch et al., 2013)

Vitamin stock ($\times 10^3$)

Ingredient	Weight (mg/100 ml)	Final Molarity in L-15B
<i>p</i> -aminobenzoic acid	100	7.3×10^{-3}
Cyanocobalamine (B $_{12}$)	50	3.7×10^{-4}
d-Biotin	10	4.1×10^{-4}

Tableau 3 : Liste des réactifs utilisés pour faire le stock de vitamines. Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (Goblirsch et al., 2013).

II. Matériel et méthode

Le milieu de culture L15-C a été préparé au laboratoire selon les recommandations des auteurs (Goblirsch et al., 2013). Les Tableaux 2, 3, 4 et 5 montrent la composition des solutions mères et du milieu final. Avant la préparation, les différentes bouteilles en verre (Schott, laboratoire Duran) utilisées pour le stockage des réactifs ont été incubées à 180°C pendant 3 h pour éliminer les endotoxines. Toutes les solutions ont été préparées dans un milieu stérile, apyrogène. Les milieux L15- B et L15-C ont été filtrés en utilisant des unités de filtration 0,22 µm (Thermo Fisher Scientific).

Les cellules AmE-711 congelées sont rapidement décongelées en bain-marie à 32°C et cultivées dans des flasques 25 cm² (Dutscher) contenant 3 ml du milieu L15-C complété en antibiotiques et antifongique : 50 IU/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 0.15 µg/mL du fungizone (Sigma-Aldrich). Les cellules sont ensuite incubées à 32°C dans un incubateur sans CO₂. La première sub-culture a été réalisée 24 h après la resuspension des cellules avec un ratio 1:3 (volume à volume) dans des flasques contenant le milieu L15-C préchauffé. Le milieu Leibowitz L-15 a été fourni par Thermo Fisher Scientific. Tous les produits utilisés sont de qualité culture cellulaire. La stérilité du milieu a été testée sur gélose LB (Invitrogen) incubée 24 h à 37°C.

Ingredient	Amount	Storage	Comments
Cell culture water	1 Liter (1 L)	room temperature	<u>endotoxin-free</u>
L-15 powder	1 package (1 <u>pkg</u>)	4°C	
L-aspartic acid	0.449 g	4°C	
L-glutamine	0.500 g	-20°C	< 1 year old
L-proline	0.450 g	4°C	
L-glutamic acid	0.490 g	4°C, desiccated	
α -ketoglutaric acid	0.449 g	4°C, desiccated	
D-glucose	18.018 g	room temperature	
mineral stock D	1 mL	-20°C	***
vitamin stock	1 mL	-20°C	***
10 N NaOH	0.5 mL	-20°C	

*** Munderloh UG, Kurtti TJ (1989). Formulation of medium for tick cell culture. Exp Appl Acarol. 7:219–229. doi:10.1007/BF01194061.

Tableau 4: Liste des différents réactifs du milieu intermédiaire L15-B (Goblirsch et al., 2013).

Ingredient	Amount	Comments
Fetal bovine serum	1 mL	
<u>Tryptose phosphate broth</u>	0.5 mL	
<u>Diluted lipoprotein concentrate</u>	50 - 100 μ L	
1M <u>Hepes</u>	125 μ L	
5% Sodium bicarbonate	150 μ L	Make fresh every 3 months
Tissue culture grade water	1.5 mL	
L-15 basal medium	6.80 mL	

Tableau 5: Liste des différents réactifs du milieu final complet L15-C (Goblirsch et al., 2013).

III. Résultats et discussion

Dès la réception des cellules AmE-711, les cultures et subcultures ont été réalisées avec une observation quotidienne des cellules. Dix jours après la décongélation, la plupart des cellules s'arrondissaient et se détachaient du support. Afin d'éliminer les cellules mortes, une étape de centrifugation à 300 x g pendant 10 min a été réalisée. Le surnageant a été récupéré dans 3 ml du milieu L15-C préalablement chauffé à 32°C. Deux jours après, aucune cellule n'était adhérente et l'ensemble des cellules apparaissaient mortes après coloration au bleu de Trypan 0,4% (Gibco).

Suite à ces résultats, j'ai contacté l'équipe américaine et nous avons proposé de leur envoyer notre milieu de culture L15-C ainsi que le milieu basique L15-B afin de tester une éventuelle toxicité du milieu pour les cellules.

Après plusieurs essais, il s'est avéré impossible de maintenir en vie les cellules plus de 2 à 3 semaines, y compris avec des milieux de culture préparés par les collègues américains. Au sein du laboratoire de l'équipe américaine, les cellules congelées présentent le même problème. Ainsi cette équipe envisage de repartir de cultures primaires des cellules pour les adapter dans tout nouveau laboratoire. Nous restons toujours en contact avec l'équipe afin d'envisager la mise en place de la culture de telles cellules.

Il n'a donc pas été possible de tester la réplication du CBPV dans les cellules AmE-711. Néanmoins, ce travail m'a permis d'acquérir plus d'expertise dans le domaine de culture cellulaire (identification des fournisseurs, préparations des milieux complexes dans des conditions stériles), et de gérer une collaboration internationale.

D'autres cellules comme celles de *Drosophila melanogaster* : Schneider 2 cells (S2 cells), *Trichoplusia ni* : Highfive cells (H5-cells), *Spodoptera frugiperda* (lignées SF9 ou SF21), *Aedes albopictus* Skuse : c6/36 ou des cellules de poissons pourraient être testées pour leur permissivité à la réplication du CBPV.

A ce jour et en l'absence d'un modèle cellulaire permettant la réplication du CBPV *in vitro*, l'infection expérimentale d'abeilles adultes par le CBPV reste la technique de choix pour étudier ce virus (Chevin et al., 2012). Cinq à six jours après l'inoculation

du virus par voie intra-thoracique, les abeilles ont multiplié le virus et présentent les signes cliniques de la paralysie chronique.

B. Optimisation des conditions de purification des ARN et d'inoculation aux abeilles

Le génome du CBPV se compose de deux ARN majoritaires l'ARN 1 de 3.674 bases et l'ARN 2 de 2.305 bases (Olivier et al., 2008). Il serait également composé de trois ARN minoritaires (Overton et al., 1982). Cependant, ces trois ARN minoritaires n'ont pas été identifiés lors du séquençage du génome de CBPV.

L'injection du CBPV dans le thorax des abeilles induit la paralysie chronique. Cette méthode d'infection a été couramment utilisée en laboratoire pour reproduire expérimentalement la maladie et produire le virus. Récemment, il a été reporté que les ARN nus du CBPV étaient infectieux suite à une inoculation intra-thoracique d'abeilles (Chevin et al., 2012). En revanche, les auteurs n'ont pas pu définir les éléments génétiques essentiels à la réplication du CBPV.

Afin de déterminer si les ARN majoritaires sont infectieux et suffisants pour initier la réplication du virus et la formation des particules virales, sans nécessiter la présence des trois ARN minoritaires (potentiellement présents dans les ARN nus viraux), nous avons inoculé aux abeilles les ARN majoritaires purifiés par électrophorèse sur gel dénaturant.

I. Purification des ARN 1 et 2

Plusieurs essais de purification des ARN majoritaires par électrophorèse sur gel dénaturant (MOPS/formaldéhyde) ont été réalisés. Les conditions expérimentales visaient à optimiser le temps, la température et la vitesse de migration des ARN en électrophorèse.

Ces travaux préliminaires ont permis d'obtenir un meilleur rendement, en termes de quantité et de qualité des ARN. Les ARN ont été purifiés à partir des gels d'électrophorèse en utilisant les réactifs QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) et en suivant les recommandations du fournisseur pour l'extraction d'ARN.

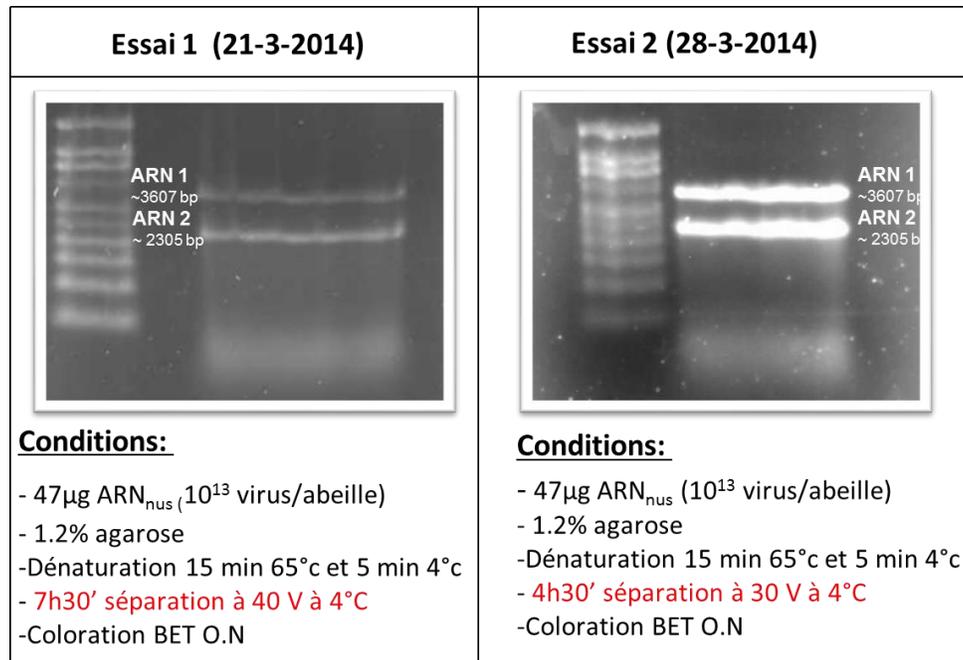


Figure 17 : Illustration des deux essais d'électrophorèse des ARN majoritaires sur gel dénaturant MOPS/Formaldéhyde réalisés.

Conditions	Copies ARN viral par inoculum (4 µl)
Tni: Abeilles témoins non inoculées	—
VP: Virus purifié VP	10 ⁴
ARN nus	10 ⁹
ARN majoritaire: condition 1	10 ⁸
ARN majoritaire: condition 2	10 ⁹
ARN majoritaire: condition 3	10 ¹⁰
ARN 1 CBPV purifié sur gel	10 ⁹
ARN 2 CBPV purifié sur gel	10 ⁹

Tableau 6 : Les différentes conditions testées lors des infections expérimentales préliminaires.

Lors des premiers essais de purification des ARN sur le gel, une importante dégradation des ARN a été observée, réduisant de 80% de la quantité d'ARN totale, déposée. Pour limiter cette dégradation, le temps de migration ainsi que le voltage a été diminué. La Figure 17 montre les résultats de cette optimisation.

II. Inoculation expérimentale d'abeilles avec les ARN purifiés

Après l'obtention des ARN majoritaires purifiés en quantité suffisante, une inoculation expérimentale d'abeille par voie intra-thoracique a été réalisée, en testant différentes concentrations d'ARN purifiés (Tableau 6), afin de déterminer la concentration optimale.

De plus et afin de voir l'effet d'inoculation de chaque segment d'ARN, nous avons inoculé des abeilles avec l'ARN 1 purifié et d'autres avec l'ARN 2 purifié. Les quantités d'ARN purifiés étant limitées lors de ces premiers essais, nous n'avons pas pu envisager d'inoculer un grand nombre équivalent d'abeille avec l'ARN 1. Nous remarquons que les abeilles témoins (Tni) sont contaminées par le CBPV mais la charge virale reste constante tout au long de l'expérience au-dessous de 10^4 copies d'ARN par abeilles. Cependant, cette contamination naturelle des abeilles n'entravait pas l'interprétation des résultats observés (Figure 18).

Lors de cette expérience, une augmentation du nombre de copies d'ARN du CBPV, similaire à celle obtenue après inoculation avec le virus purifié, a été observée pour 4 abeilles sur 26 abeilles, lorsque les abeilles étaient inoculées avec 10^9 copies d'ARN majoritaires. De plus, le brin anti-génomique, produit normalement lors de la réplication du CBPV, a été détecté dans ces quatre abeilles. Cependant, aucun signe clinique n'avait été observé même après 12 jours post-inoculation.

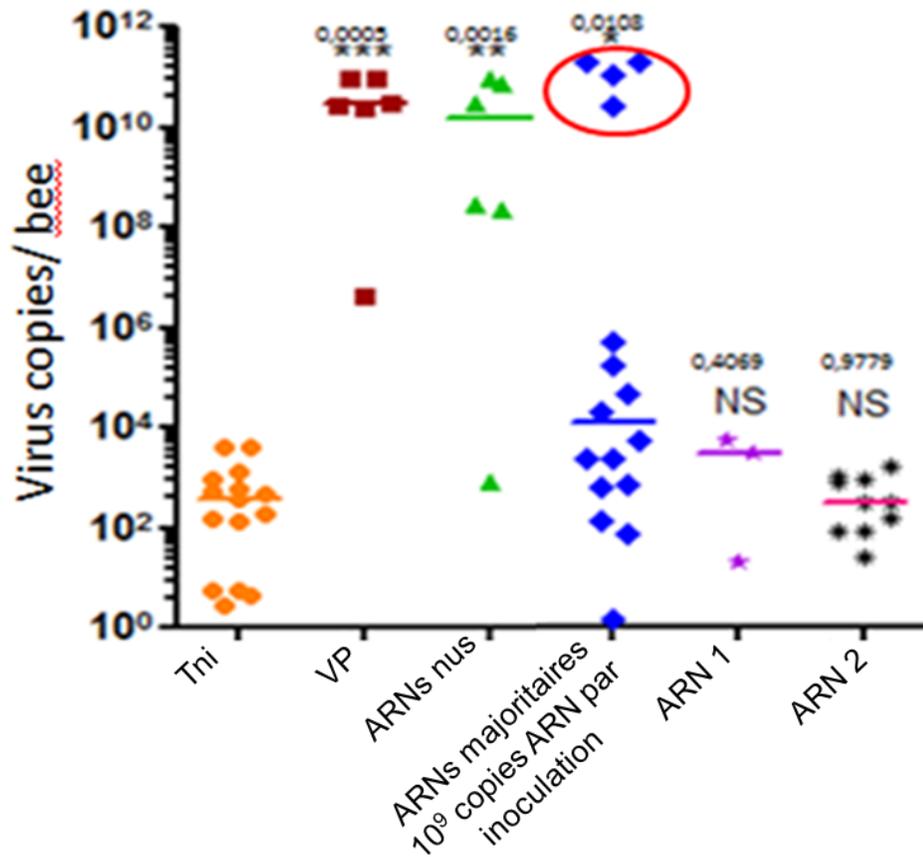


Figure 18 : Graphe montrant les charges virales mesurées par RT-qPCR ciblant l'ARN1 du CBPV, en fonction des conditions d'inoculation. Tni : abeille témoin non inoculée. VP : virus pur après 5 jours d'inoculation. ARN nus après 5 jours d'inoculation. ARN majoritaires : 10^9 copies d'ARN par inoculation, ARN 1 et ARN 2 après 12 jours d'inoculation. Le cercle rouge montre les quatre abeilles montrant une forte charge virale. Chaque point représente une abeille.

Les abeilles inoculées avec 10^8 copies d'ARN n'ont pas montré d'augmentation du nombre de copies d'ARN 12 jours après inoculation. En revanche, les abeilles inoculées avec 10^{10} copies d'ARN viral par inoculation ont montré les mêmes résultats que celles inoculées avec 10^9 copies d'ARN par inoculation (Figure 18). Ces résultats étaient comparables à ceux obtenus précédemment au laboratoire (Chevin et al., 2012).

En se basant sur ces résultats préliminaires, une charge de 10^9 copies d'ARN purifié par abeille a été retenue pour les expériences ultérieures afin de tester le pouvoir infectieux des ARN majoritaires. Pour pallier à toute interférence d'une contamination naturelle des abeilles par le CBPV, des colonies d'automne indemnes ou présentant une très faible charge en CBPV ont été sélectionnées et placées en condition d'élevage contrôlées (disposition des ruches dans un bâtiment à température contrôlée de 20 à 23°C et apport d'un nourrissage artificiel à base de sirop de saccharose et de pâte protéinée). Ces nouvelles conditions d'expérimentation et les résultats obtenus sont présentés dans le paragraphe suivant.

C. Pouvoir infectieux des ARN majoritaires du CBPV

Ayant défini les conditions optimales de purification des ARN 1 et 2 viraux et de leur inoculation aux abeilles, nous avons réalisé des expérimentations *in vivo* afin de confirmer le pouvoir infectieux de ces ARN majoritaires. Les abeilles ont été analysées préalablement afin de vérifier l'absence d'autres virus d'abeilles. Ensuite, elles étaient inoculées avec 10^9 copies d'ARN majoritaires quantifié par RT-qPCR.

Ces résultats ont été valorisés par un article publié dans *Journal of immunology research* (Youssef et al., 2015).

Research Article

RNA 1 and RNA 2 Genomic Segments of Chronic Bee Paralysis Virus Are Infectious and Induce Chronic Bee Paralysis Disease

Ibrahim Youssef,^{1,2} Frank Schurr,¹ Adeline Goulet,² Nicolas Cougoule,¹
Magali Ribière-Chabert,¹ Hervé Darbon,² Richard Thiéry,¹ and Eric Dubois¹

¹Ansès Sophia Antipolis, Unit of Bee Pathology, 105 route des Chappes, CS 20111, 06902 Sophia Antipolis, France

²Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB), Aix Marseille University, CNRS, UMR 7257, Case 932, Campus de Luminy, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France

Correspondence should be addressed to Eric Dubois; eric.dubois@anses.fr

Received 9 June 2015; Revised 28 August 2015; Accepted 8 September 2015

Academic Editor: Roy A. Hall

Copyright © 2015 Ibrahim Youssef et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Chronic bee paralysis virus (CBPV) causes an infectious and contagious disease of adult honeybees. Its segmented genome is composed of two major positive single-stranded RNAs, RNA 1 (3,674 nt) and RNA 2 (2,305 nt). Three minor RNAs (about 1,000 nt each) have been described earlier but they were not detected by sequencing of CBPV genome. In this study, the results of *in vivo* inoculation of the two purified CBPV major RNAs are presented and demonstrate that RNA 1 and RNA 2 are infectious. Honeybees inoculated with 10^9 RNA copies per bee developed paralysis symptoms within 6 days after inoculation. The number of CBPV RNA copies increased significantly throughout the infection. Moreover, the negative strand of CBPV RNA was detected by RT-PCR, and CBPV particles were visualized by electronic microscopy in inoculated honeybees. Taken together, these results show that CBPV RNA 1 and CBPV RNA 2 segments can induce virus replication and produce CBPV virus particles. Therefore, the three minor RNAs described in early studies are not essential for virus replication. These data are crucial for the development of a reverse genetic system for CBPV.

1. Introduction

Honeybee (*Apis mellifera*) is one of the most important pollinators with a big impact on agriculture and economics [1]. Honeybee is susceptible to a wide variety of environmental threats (climate, urbanization, predators, pesticides, ...) and diseases. The chronic bee paralysis virus (CBPV) is responsible for a contagious and infectious disease of adult honeybee that can lead to mortalities, the chronic paralysis disease. This pathology is characterized by clusters of trembling, flightless, crawling bees, and individual black, hairless bees standing at the hive entrance [2].

CBPV can be transmitted by two main routes: (i) contact between infected and noninfected bees [3] and (ii) spread of infectious particles in the feces of paralyzed bees that are taken up orally by healthy nest mates [4]. CBPV, first isolated in 1963 [2], has anisometric particles that measure 30–60 nm in length and 20 nm in width [5]. It is a positive single-stranded RNA virus and its genome is composed of

two major RNAs, RNA 1 (3,674 nucleotides [nt]) and RNA 2 (2,305 nt) [6]. The genomic RNAs are not polyadenylated at their 3'-end and have a CAP structure at the 5'-end. RNA 1 and RNA 2 encode three and four overlapping Open Reading Frames (ORFs), respectively. RNA 1-ORF3 is predicted to encode the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) [6]. RNA 2-ORF2 and RNA 2-ORF3 are thought to encode two structural proteins (hSP and pSP, resp.) [7]. To date, CBPV remains unclassified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (<http://www.ictvonline.org/>). Only RNA 1-ORF3 shows similarities with Nodaviridae and Tombusviridae family [6]. Runckel et al. [8] discovered new viral sequences (Lake Sinai 1 virus and Lake Sinai 2 virus) highly related to CBPV which might belong to the same viral family. Moreover, Schuster et al. [9] described a new virus named mosinovirus related to LSV and to CBPV. The authors suggested that these viruses could belong to a new viral family.

In addition to the two major RNAs, three minor RNAs have been described in the early studies of CBPV [10]. However, these minor RNAs were not reported in any subsequent study. They were not visualized on gel and were not detected by sequencing [6]. Recently, it has been shown that total RNA obtained from purified CBPV particles is infectious after direct inoculation in honeybee [11]. However, since total RNA preparation can contain both major and minor RNAs, it was not possible to conclude about the possible role of the minor RNAs. Besides, the determination of the genetic elements essential to recover an infectious virus is needed in order to establish a reverse genetic system for CBPV.

In this study, our goal was to determine whether CBPV RNA 1 and CBPV RNA 2 inoculated together were sufficient to induce the virus replication and the chronic paralysis disease. After purification of the two major RNAs by gel electrophoresis, emerging bees were inoculated with 10^9 RNAs copies per bee. The infectivity of CBPV major RNAs was demonstrated by observation of the clinical signs of CBPV infection, quantification of the viral genome by RT-qPCR throughout infection, detection of the antigenomic strand of CBPV RNA, and observation of CBPV viral particles by electron microscopy.

2. Materials and Methods

2.1. Maintenance of Honey Bee Colonies. This study was performed in January 2015. The queens were changed six months before the experiment and the new colonies were placed in new hives equipped with new frames. In October 2014, these hives were placed in a room heated to 32°C and were supplied by sucrose syrup complemented with protein L (Calier Laboratory, Spain). The absence of CBPV and other bee viruses was checked regularly by RT-PCR.

2.2. Virus Purification. Five- to seven-day-old honeybees (450 emerging bees) collected from CBPV-free colonies were used to produce CBPV by injection of the A79-P isolate (NC_010712.1). After observation of chronic paralysis signs (5 to 6 days after inoculation), CBPV particles were purified from the heads of bees by ultracentrifugation on a 10 to 40% (w/v) sucrose gradient as previously described by Olivier et al. [6].

2.3. CBPV Major RNAs Purification. The genomic RNAs (naked RNAs) were extracted from the purified A79-P isolate using the High Pure Viral RNA Kit (Roche) and recovered in 50 μ L of RNase-free water. Extracted RNA was denatured by heating at 70°C and chilled for 5 min at 4°C and submitted to electrophoresis on a 1% low melting agarose gel using MOPS/formaldehyde buffer during 4.5 h. The RNA 1 and RNA 2 fragments were cut from the gel and extracted using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

2.4. Experimental Inoculation: Sample Preparation and Collection. Emerging honeybees were collected from a CBPV-free colony. They were maintained for 5 to 7 days at 32°C in small cages providing *ad libitum* sugar candy and sucrose syrup complemented with protein L (Calier Laboratory, Spain).

Eight bees from each cage were collected before the inoculation as negative controls. The remaining bees were anaesthetized with carbon dioxide (CO₂) and inoculated with 4 μ L of phosphate buffer (PB, pH 7) suspension containing whole CBPV particles (A79-P isolate), naked RNA, or major RNA mixture *via* intrathoracic injection (Table 1). Immediately after inoculation, 8 bees from each experimental condition were sampled to quantify the RNA loads. The bees were then incubated at 32°C for 6 days and the clinical signs were observed and recorded daily. Asymptomatic, symptomatic, and dead bees were recovered daily and stored separately at -80°C.

2.5. RNA Extraction and cDNA Synthesis. Bees were individually crushed in 1 mL of 0.01 mM PB. After two clarifications of the homogenate by centrifugation (10 min at 8,000 \times g), the viral RNA was extracted using the High Pure Viral RNA Kit (Roche) according to the manufacturer's recommendations. The quantity and quality of purified RNA were estimated by measuring the optical density at 260 nm and 280 nm. Complementary DNA was synthesized by reverse transcription as described by Ribière et al. [12].

2.6. CBPV Major RNA Quantification by Real-Time Reverse-Transcription PCR (RT-qPCR). The RNA 1 fragment was quantified by RT-qPCR as described by Blanchard et al. [13]. A new RT-qPCR was set up for RNA 2 quantification. CBPV RNA 2 sequences available in GenBank were aligned, and primers and probes were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems) in the conserved region. Because no consensus sequences were found, several sequences were selected for each primer and the probe. The selected primers amplify a fragment (72 to 74 nt long) and are located in the coding region of the predicted structural protein pSP (RNA 2, ORF3). The forward, reverse primers and TaqMan probes are detailed in Table 2. The probes were labeled with the fluorescent reporter dye FAM (6-carboxyfluorescein) at the 5'-end and with the fluorescent quencher dye TAMRA at the 3'-end.

The number of RNA copies was estimated using 5 μ L cDNA by RT-qPCR carried out on a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA). Briefly, the PCR reaction was performed in duplicate in a MicroAmp Optical 96-Well Plate, containing 1X TaqMan Universal PCR Master Mix with uracil-N-glycosylase (UNG) (Applied Biosystems, USA), 320 nM of each primer mix (forward and reverse primer mix), 200 nM of the qCBPV probe mix, 1X Exo Internal Positive Control (IPC) Mix VIC (Applied Biosystems, USA), 1X Exo IPC DNA (Applied Biosystems, USA), and 5 μ L of standard template (10^8 to 10^2 DNA copies of pGEM-T Easy [Promega] recombinant plasmid containing the pSP sequence) or cDNAs in a total volume of 25 μ L. The thermal cycling conditions were 2 min at 50°C (active temperature for UNG to degrade any carryover DNA amplified from previous reactions) and 10 min at 95°C (activation of AmpliTaq Gold DNA Polymerase and degradation of UNG), followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min.

TABLE 1: Experimental conditions and bee sampling.

Conditions	CBPV RNA copy number per bee	Number of bees per cage
Bees not inoculated (negative control: NC)	0	30
Bees inoculated with inoculation buffer (IB)	0	30
Bees inoculated with CBPV particles (VP)	4.0×10^4	40
Bees inoculated with CBPV (naked RNAs)	4.0×10^9	65
Bees inoculated with the mix of CBPV RNA 1 + RNA 2 (major RNAs)	4.0×10^9	65

TABLE 2: Sequences of the primers and probes used for the CBPV RNA 2 RT-qPCR. Oligonucleotide sequences are located on RNA 2 complete genome of the A-79P isolate (NC_010712.1).

Equimolar mixture	Sequences	Position on CBPV-RNA 2 (based on A79-P isolate)
Forward primer mix	AGGCGCCGTAGCTGTTTCT	590–608 nt ¹
	GCGCCGTGGCTGTTTCT	592–608 nt
Reverse primer mix	CCCCGATCATATAAGCAAACCTTCTC	637–663 nt
	CCCGATCATATAGGCAAACCTTCTC	639–662 nt
	CCCCGATCATATATGCAAACCTTCTC	639–663 nt
Probe mix	CTGCGGTACTCAGCTCAGCTCGACG	610–634 nt
	TGCGGTACTCAGCTCAGCTCGGC	611–631 nt

¹nt: nucleotide.

2.7. Detection of Bee Viruses. Before the inoculation, a multiplex RT-PCR [14] was performed to verify the absence of other bee viruses using previously published primers: black queen cell virus (BQCV) [15], acute bee paralysis virus (ABPV) [16], deforming wing virus (DWV) [17], Israeli acute bee paralysis virus (IAPV) [18], and sacbrood virus (SBV) [19]. In addition, bees were tested for Lake Sinai virus by RT-PCR according to Runckel et al. [8].

2.8. Detection of CBPV Negative RNA. To assess the CBPV replication, we used a specific RT-PCR to detect the negative strand form of CBPV RNA as developed by Celle et al. [20].

2.9. Transmission Electron Microscopy. The formation of viral particles was checked using electron microscopy. All RNA samples of bees inoculated with CBPV major RNAs showing a load of $>10^{10}$ RNAs copies per μL were mixed together. After addition of 2.5 mL carbon tetrachloride (CCl_4), homogenates were incubated for 1 h at 4°C and then clarified at $200 \times g$ for 10 min at 4°C . Aqueous phases were recovered and centrifuged at $1,700 \times g$ for 1 h at 4°C . Ultracentrifugation of supernatants was carried out at $75,000 \times g$ for 3.5 h at 4°C . The pellet was resuspended in $50 \mu\text{L}$ PB. All the samples were diluted with water to 0.1 mg/mL , the negative control was diluted with the same 1/25 ratio, and $3.5 \mu\text{L}$ drops were applied onto glow-discharged formvar-carbon coated grids (Agar Scientific). After 1 min incubation at room temperature, the liquid excess was blotted off and the grids were rinsed with water before being stained with uranyl acetate 1%. Grids were transferred into a FEI Tecnai Spirit G2 Electron Microscope operated at 120 kV and imaged with an EAGLE 2kX2k CCD camera at a nominal magnification of 18,000x and with an underfocus of approximately $2.5 \mu\text{m}$.

3. Results

3.1. CBPV Major RNA Purification. The total RNA extracted from the purified CBPV particles (A79-P isolate) was run on a MOPS/formaldehyde gel to separate RNA 1 and RNA 2 (Figure 1). After the electrophoresis, only major RNAs were visualized. No fragment of about 1,100 base long was visualized. The fragments of RNA 1 and RNA 2 were cut from the gel and purified, and their amounts were calculated by RT-qPCR. The quantity estimated of purified RNA 1 was about 2.1×10^{10} copies per μL and purified RNA 2 was about 8.3×10^{10} copies per μL . Each RNA was diluted to 1.0×10^9 RNAs copies per μL . Then, RNA 1 and RNA 2 were mixed together (major CBPV RNAs) to be inoculated to the bees.

3.2. Validation of the CBPV RNA 2 RT-qPCR. In order to evaluate the CBPV RNA 2 RT-qPCR, four independent runs were performed using a 10-fold serial dilution of a plasmid DNA control as standard. The standard curve (Figure 2) showed a linear correlation between Ct and \log_{10} DNA concentration of each run ($R^2 = 0.998$). The slope of the DNA standard curve was -3.27 and the average efficiency of RNA 2 RT-qPCR was 102%. The limit of quantification was 100 DNA copies per reaction.

3.3. Symptoms of Chronic Bee Paralysis. Bees were exposed to five different treatment groups including (i) bees not inoculated, (ii) bees inoculated with PB, (iii) bees inoculated with CBPV particles, (iv) bees inoculated with CBPV naked RNAs, and (v) bees inoculated with CBPV major RNAs (Table 1). CBPV clinical signs were observed and dead bees were collected daily. Figure 3 shows the cumulative percentages of dead, symptomatic, or asymptomatic bees observed

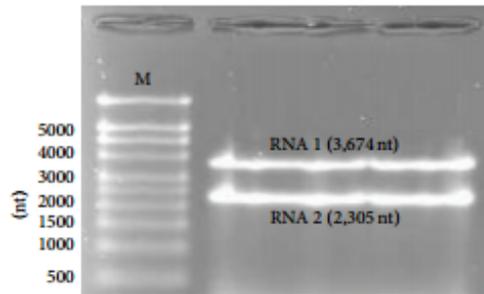


FIGURE 1: Gel electrophoresis separation of RNA 1 and RNA 2 segments of CBPV genome (A79-P isolate). IX MOPS/formaldehyde 1% agarose gel. M: millennium RNA marker (Ambion).

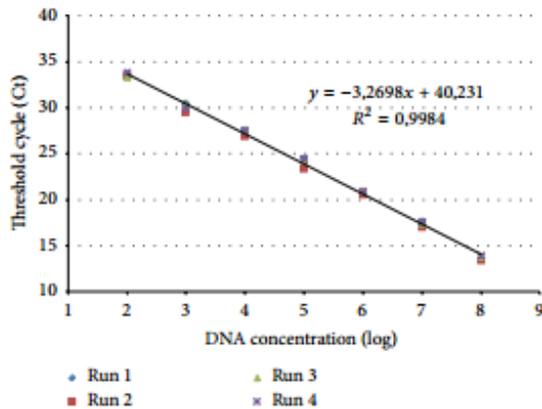


FIGURE 2: DNA standard curve of CBPV RNA 2 RT-qPCR obtained with a 10-fold serial dilution (10^8 to 10^2 DNA copies per reaction) of 2,710 kb plasmid including the coding sequence of the predicted structural protein pSP on RNA 2-ORF3. Four independent runs were performed and allowed to obtain the linear regression analysis of the Ct measured for each amplification (y-axis) versus \log_{10} of DNA concentration of each dilution (x-axis). The equation of the linear regression and the correlation coefficient (R^2) are indicated.

in each experimental condition after 6 days of inoculation. Bees not inoculated (NC) and those inoculated with PB buffer only (inoculation buffer: IB) did not show any signs of chronic paralysis throughout the experiment. However, 28% of bees not inoculated (4 bees out of 14) and 35% inoculated with the buffer (5 bees out of 14) were dead during the first days of the assay (2 and 4 days post-inoculation [dpi]). The bees inoculated with CBPV particles (VP) showed chronic paralysis signs (trembling, crawling) within 5 and 6 dpi. About 12.5% of bees were dead at 2 and 4 dpi and 87.5% were symptomatic. In the group of bees inoculated with naked RNAs, 69% of bees were dead 6 dpi, 19% of bees showed chronic paralysis clinical signs, and 12% bees were asymptomatic. In the group of bees inoculated with CBPV major RNAs, 71.4% of bees were dead within 6 dpi, 14.2% of bees showed the chronic paralysis clinical signs, and 14.2% bees were asymptomatic. Based on a chi-squared test, a significant difference in the number of symptomatic and

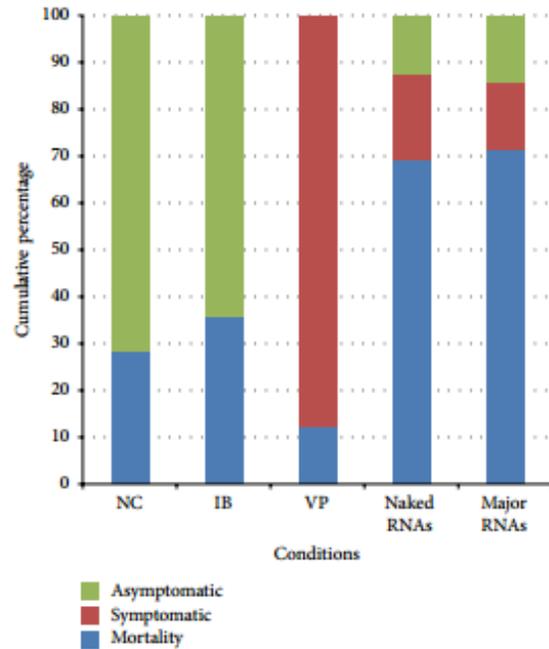


FIGURE 3: Cumulative percentage of dead, symptomatic, and asymptomatic bees after different treatments 6 days after inoculation: Negative control (NC), CBPV-free inoculation buffer (IB), positive control: CBPV particles (VP), CBPV naked RNAs, and CBPV major RNAs.

dead bees was found between control and inoculated bees ($p < 0.001$). However, no significant difference in symptoms and mortality was found between bees inoculated with CBPV naked RNAs and those inoculated with CBPV major RNA ($p = 0.766$). This result confirms that the clinical signs observed could be associated with RNA inoculations (naked RNA as well as major RNA).

In addition, two other treatments were tested: bees inoculated with CBPV RNA 1 or with CBPV RNA 2. Around 12.5% (5 bees out of 40 bees) of bees inoculated with CBPV RNA 1 and 25% (7 bees out of 40 bees) of those inoculated with CBPV RNA 2 were dead. However, no chronic bee paralysis symptoms were observed (data not shown).

3.4. Quantification of CBPV Major RNAs in Inoculated Bees.

The number of copies of RNA 1 and RNA 2 was estimated using RT-qPCR methods. Figure 4 shows the RNA 1 copies number per bee after different treatments at inoculation day (ID) and 6 days post-inoculation (6 dpi). The negative control (NC) and IB-treated bees remained negative for CBPV throughout the infection, whereas the RNA copy number increased significantly when bees were inoculated with VP, naked RNAs, and major RNAs between ID and 6 dpi. At 6 dpi, the symptomatic and dead bees inoculated with CBPV major RNAs showed a similar CBPV RNA load as those inoculated with CBPV particles and CBPV naked RNAs (10^{10} – 10^{11} RNA 1 copies/bee). In contrast, the asymptomatic

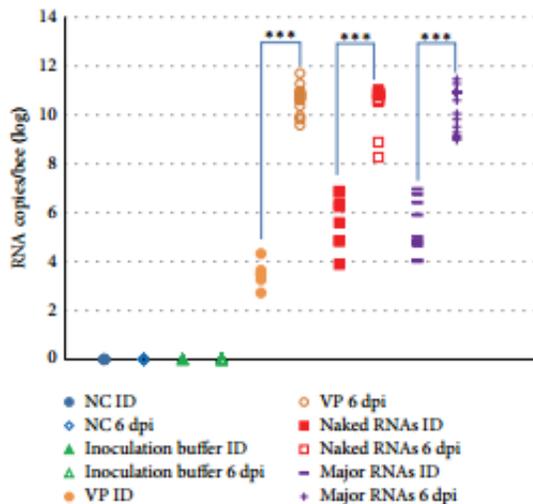


FIGURE 4: CBPV RNA 1 quantification in individual inoculated bees. NC: negative control, VP: bees inoculated with CBPV viral particles, CBPV naked RNAs, and CBPV major RNAs. This graph shows the results of the RT-qPCR of CBPV RNA 1. Significant differences between inoculation day (ID) and 6 days post-inoculation (dpi) for each condition are indicated (***) (p value < 0.001, Mann-Whitney test).

bees inoculated with naked or major CBPV RNAs presented a lower amount, ranging from 10^7 to 10^8 RNA copies/bee. Bees inoculated with CBPV RNA 1 or CBPV RNA 2 only did not show any increase of the viral load throughout the infection (data not shown).

The quantities of RNA 1 and RNA 2 copies per bee were estimated using the two RT-qPCR methods (Figure 5). The results showed that there is no significant difference between RNA 1 and RNA 2 copy numbers in the bees. The slope of the regression curve is 0.9919 and the intercept is 0.11.

3.5. CBPV Replicative Strand Detection by Strand-Specific RT-PCR. The replicative RNA strand was tested by a specific RT-PCR on several samples from each condition studied (Figure 6). Interestingly, the CBPV antigenomic strand was detected in the bees inoculated with CBPV particles (VP), naked RNAs, and major RNAs (Figure 6(a)), whereas it was not detected neither in bees not inoculated (NC) nor in bees inoculated with the phosphate buffer (IB) (Figure 6(b)).

3.6. Assembly of CBPV Particles. Transmission electron microscopy was used to confirm the formation of viral particles (Figure 7). Six days after inoculation, bees inoculated with CBPV major RNAs show the presence of anisometric viral particles (Figure 7(c)). These particles, around 50 nm in length, are physically identical to CBPV purified particles, the positive control (Figure 7(b)). Moreover, to ensure that the formation of the viral particles is due to the inoculation with CBPV major RNAs, not inoculated bees (negative control) were examined; no CBPV particles were found (Figure 7(a)).

3.7. Absence of Other Bee Viruses. No other bee viruses were detected by conventional RT-PCR in the bees used for the experiments.

4. Discussion

This study demonstrates that the RNA 1 and RNA 2 segments of the CBPV genome are the essential genetic elements for CBPV replication and that they are sufficient to induce the chronic bee paralysis disease.

CBPV, a worldwide virus, infects the honeybees. The anisometric morphology of its particles is unique among bee viruses as most of them are picorna-like viruses with icosahedral particles. CBPV genome consists of positive single-stranded RNA segments. Overton et al. [10] reported that it is composed of five RNA fragments: the two major RNAs (RNA 1 and RNA 2) and three minor RNA segments: RNA 3a, RNA 3b, and RNA 3c, each of 1,100 nucleotides long. In this study, we did not detect the minor RNAs by gel electrophoresis during the purification of CBPV genome (Figure 1). This result confirms the previous conclusions from Olivier et al. [6] who sequenced the CBPV genome and did not detect any minor RNAs. These authors showed that CBPV RNA 1 and CBPV RNA 2 encode three and four overlapping ORFs, respectively. The RNA polymerase synthesis is supposed to be the result of a frame-shift mechanism between the ORF1 and ORF3 of RNA 1. Very recently, Chevin et al. [7] reported that RNA 2 might support the coding sequences of structural proteins. Kuchibhatla et al. [21] could identify homologs of most of CBPV protein thought to be orphans. Indeed, they found that ORF 1 of CBPV RNA 1 is homologous to the *alphavirus* methyltransferase guanylyltransferase. In addition, they found that ORF3 of CBPV RNA 2 shares significant similarities with a virion membrane protein found in various insect and plant viruses, and they suggested that ORF2 of CBPV RNA 2 may be a virion glycoprotein.

Recently, Chevin et al. [11] showed that CBPV total RNAs purified from infected bees induce the replication of CBPV in the honeybees and the formation of viral particles. However, the authors did not conclude about the genetic elements essential to the replication of CBPV. Here, we investigated further this point. Emerging honeybees were inoculated with purified CBPV major RNAs at 10^9 RNAs copies per μL . We also inoculated bees with a lower amount of CBPV major RNAs in an independent experiment (10^4 major RNAs copies per bee) and found a significant increase of CBPV RNA level and CBPV replication in 16% of those bees (data not shown). However, no clinical signs were observed in this last experiment. Therefore, the efficiency of the infectivity depends on the amount of inoculated major RNAs.

In the current study, five different treatments were tested (Table 1). In each one, the bees were divided into three categories: symptomatic, asymptomatic, and dead bees. The bees not inoculated (NC) and those inoculated with the buffer showed, respectively, 28% and 35% of mortality throughout the infection, which represents, respectively, 4 and 5 bees out of 14 (Figure 3). In these control groups, neither CBPV (Figure 4) nor other bee viruses were found. Thus, this

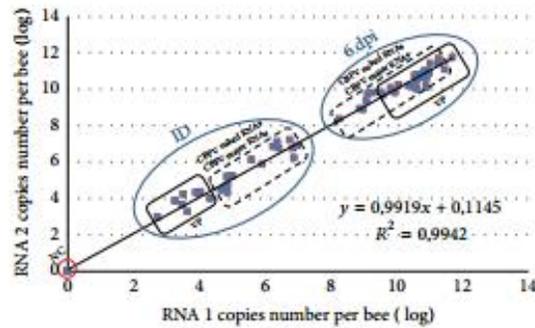


FIGURE 5: Linear regression analysis of the results from RT-qPCR quantification of RNA 1 versus RNA2. The equation of the curve and the correlation coefficient are indicated. The results at inoculation day (ID) and those at 6 days post-inoculation (6 dpi) are represented in a blue circle. The RNA copies number of bees inoculated with CBPV viral particles (VP) is represented by a rectangle, bees inoculated with naked RNAs and major RNAs by dotted rectangle, and bees not inoculated as negative control (NC) by a red circle.

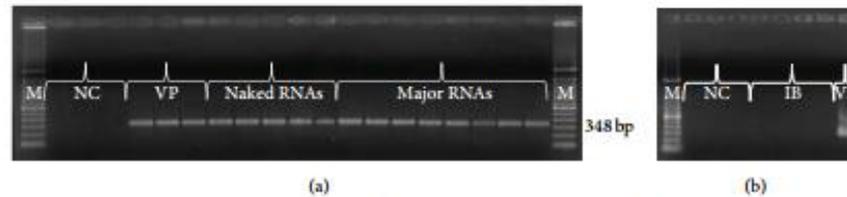


FIGURE 6: Antigenomic RNA detection by specific RT-PCR. 1.2% agarose gel electrophoresis of the PCR products (amplicons). (a) Three samples of negative control (NC) and three samples of bees inoculated with CBPV particles (VP), five samples of bees inoculated with CBPV naked RNAs, and eight samples of bees inoculated with CBPV major RNAs. (b) Three samples of negative control (NC), four samples of bees inoculated with inoculation buffer (IB), and one sample of bees inoculated with viral particle (VP) were tested. M: 100 bp DNA marker (TrackIt, Invitrogen).

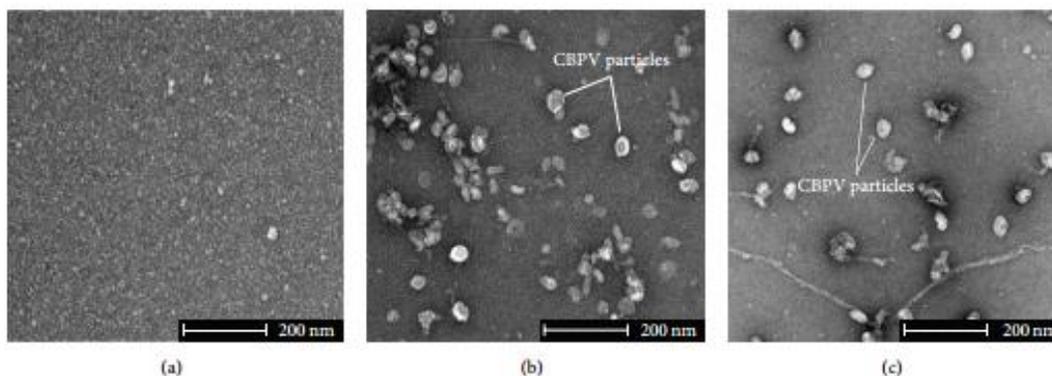


FIGURE 7: Transmission electron microscopy of homogenates from experimented bees. (a) Negative control bees, (b) positive control bees (inoculated with CBPV particles), and (c) bees inoculated with CBPV major RNAs.

mortality can be due to the experimental and the artificial conditions that these bees could not stand.

Bees inoculated with major RNAs showed the signs of chronic paralysis disease within 6 days after inoculation and 87.5% of the bees were dead or symptomatic (Figure 3),

suggesting that CBPV major RNAs are infectious. Moreover, CBPV genomic load increased significantly after 6 days of inoculation with CBPV major RNAs (Figures 4 and 5), up to approximately 10^{12} RNAs copies/bee in dead bees. No other bee virus could be detected by conventional RT-PCR

indicating that the mortality and the clinical signs were associated with CBPV replication. The amount of CBPV RNAs needed to induce chronic paralysis is much higher when using major RNAs (4.0×10^9 CBPV copies per bee) compared to that needed when using the CBPV particles (4.0×10^4 CBPV copies per bee). This may be due to several reasons: a lower stability of purified RNAs compared to native RNA protected by the viral capsid, partial degradation of RNAs during the purification process, and/or lower efficiency of infection through RNA transfection compared to that obtained with the virus. The infection by the native virus particles probably occurs *via* interaction with a cell receptor, which may facilitate entry into cells.

CBPV is a positive single-stranded RNA virus, so the synthesis of antigenomic RNA (negative strand) is carried out during viral replication [19]. The negative strand form was detected in bees inoculated with CBPV particles, naked RNAs, and major RNAs. In addition, anisometric particles similar to CBPV particles were observed by electron microscopy after the infection of bees with CBPV major RNAs. These results along with those of RT-qPCR demonstrate that CBPV major RNAs could induce CBPV genome replication and virus particles formation in the honeybees. In conclusion, this study shows that CBPV RNA 1 and CBPV RNA 2 are infectious and sufficient to induce genomic replication, virus production, and the chronic paralysis disease in honeybee. Therefore, the three minor RNAs described in early studies are not essential for CBPV infection and are not part of the CBPV genome. Whether minor RNAs were subgenomic RNAs remains to be determined. It should be noticed that they were associated with the small virus-like particles associated with chronic bee paralysis virus [22] and thus may result from virus contamination by a satellite virus. Altogether, these results are crucial to develop a reverse genetic system in order to study the CBPV genome.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

Authors' Contribution

Ibrahim Youssef, Eric Dubois, Magali Ribière-Chabert, Hervé Darbon, and Richard Thiéry conceived and designed the experiments. Ibrahim Youssef, Frank Schurr, Adeline Goulet, and Nicolas Cougoule performed the experiments. Ibrahim Youssef and Eric Dubois analyzed the data. Ibrahim Youssef, Eric Dubois, and Richard Thiéry wrote the paper.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Electron Microscopy Platform at the Laboratory of *Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques*, University of Marseilles, France. This project was funded by the Provence-Alpes-Côte d'Azur Région and Anses. Ms. Cristina Gastaldi is also acknowledged for improving English form of the paper. The authors also thank Dr. Karim Sidi Boumedine for helpful discussions.

References

- [1] M.-P. Chauzat, L. Cauquil, L. Roy, S. Franco, P. Hendrikx, and M. Ribière-Chabert, "Demographics of the European apicultural industry," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11, Article ID e79018, 2013.
- [2] L. Bailey, A. J. Gibbs, and R. D. Woods, "Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus)," *Virology*, vol. 21, no. 3, pp. 390–395, 1963.
- [3] L. Bailey, B. V. Ball, and J. N. Perry, "Honeybee paralysis: its natural spread and its diminished incidence in England and Wales," *Journal of Apicultural Research*, vol. 22, pp. 191–195, 1983.
- [4] M. Ribière, P. Lallemand, A.-L. Iscache et al., "Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 23, pp. 7711–7716, 2007.
- [5] L. Bailey, A. J. Gibbs, and R. D. Woods, "The purification and properties of chronic bee-paralysis virus," *Journal of General Virology*, vol. 2, no. 2, pp. 251–260, 1968.
- [6] V. Olivier, P. Blanchard, S. Chaouch et al., "Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus," *Virus Research*, vol. 132, no. 1–2, pp. 59–68, 2008.
- [7] A. Chevin, B. Coutard, P. Blanchard, A. S. Dabert-Gay, M. Ribière, and R. Thiéry, "Characterisation of structural proteins from Chronic bee paralysis virus (CBPV) using mass spectrometry," *Viruses*, vol. 7, no. 6, pp. 3329–3344, 2015.
- [8] C. Runckel, M. L. Flenniken, J. C. Engel et al., "Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 6, Article ID e20656, 2011.
- [9] S. Schuster, F. Zirkel, A. Kurth et al., "A unique nodavirus with novel features: mosinovirus expresses two subgenomic RNAs, a capsid gene of unknown origin, and a suppressor of the antiviral RNA interference pathway," *Journal of Virology*, vol. 88, no. 22, pp. 13447–13459, 2014.
- [10] H. A. Overton, K. W. Buck, L. Bailey, and B. V. Ball, "Relationships between the RNA components of chronic bee-paralysis virus and those of chronic bee-paralysis virus associate," *Journal of General Virology*, vol. 63, no. 1, pp. 171–179, 1982.
- [11] A. Chevin, F. Schurr, P. Blanchard, R. Thiéry, and M. Ribière, "Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs," *Virus Research*, vol. 167, no. 2, pp. 173–178, 2012.
- [12] M. Ribière, C. Triboulot, L. Mathieu, C. Aurières, J.-P. Faucon, and M. Pépin, "Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection," *Apidologie*, vol. 33, no. 3, pp. 339–351, 2002.
- [13] P. Blanchard, V. Olivier, A.-L. Iscache et al., "Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates," *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 97, no. 2, pp. 182–185, 2008.
- [14] J. Carletto, A. Gauthier, J. Regnault, P. Blanchard, F. Schurr, and M. Ribière-Chabert, "Détection des principaux agents pathogènes de l'abeille domestique par PCR Multiplex," EuroReference, no. 4, ER04-10R01, 2010, <https://pro.anses.fr/euroreference/numero4/index.htm>.
- [15] M. Benjeddou, N. Leat, M. Allsopp, and S. Davison, "Development of infectious transcripts and genome manipulation of Black queen-cell virus of honey bees," *Journal of General Virology*, vol. 83, no. 12, pp. 3139–3146, 2002.
- [16] T. Bakonyi, R. Farkas, A. Szendrői, M. Dobos-Kovács, and M. Rusvai, "Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in

- honey bee and Varroa destructor field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries," *Apidologie*, vol. 33, no. 1, pp. 63–74, 2002.
- [17] P. Blanchard, M. Ribière, O. Celle et al., "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*, vol. 141, no. 1, pp. 7–13, 2007.
- [18] D. L. Cox-Foster, S. Conlan, E. C. Holmes et al., "A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder," *Science*, vol. 318, no. 5848, pp. 283–287, 2007.
- [19] E. Grabensteiner, W. Ritter, M. J. Carter et al., "Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR," *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 8, no. 1, pp. 93–104, 2001.
- [20] O. Celle, P. Blanchard, V. Olivier et al., "Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread," *Virus Research*, vol. 133, no. 2, pp. 280–284, 2008.
- [21] D. B. Kuchibhatla, W. A. Sherman, B. Y. W. Chung et al., "Powerful sequence similarity search methods and in-depth manual analyses can identify remote homologs in many apparently 'orphan' viral proteins," *Journal of Virology*, vol. 88, no. 1, pp. 10–20, 2014.
- [22] L. Bailey, B. V. Ball, J. M. Carpenter, and R. D. Woods, "Small virus-like particles in honey bees associated with chronic paralysis virus and with a previously undescribed disease," *Journal of General Virology*, vol. 46, no. 1, pp. 149–155, 1980.

Conclusion

Dans cette étude nous avons réalisé une inoculation expérimentale *in vivo* par injection intra-thoracique aux abeilles d'ARN purifiés afin de montrer le pouvoir infectieux des ARN majoritaires du CBPV (ARN 1 et ARN 2).

Les abeilles ont été inoculées avec 10^9 copies d'ARN majoritaires. Six jours après l'inoculation, les signes cliniques de la paralysie chronique ont été observés chez ces abeilles (tremblements, incapacité à voler, regroupement des abeilles). Par RT-qPCR ciblant l'ARN 1, nous avons montré l'augmentation de la charge virale suite à l'inoculation par les ARN majoritaires de façon similaire à celle obtenue après inoculation du virus pur. De plus, nous avons développé une RT-qPCR ciblant l'ARN 2 du CBPV. Les résultats de cette quantification de l'ARN 2 montrent la multiplication de ce second segment génomique d'une façon équimolaire à l'ARN 1. Nous avons remarqué une forte corrélation ($R^2=0,992$) entre les quantités mesurées pour l'ARN 1 et pour l'ARN 2 autour d'une droite de pente voisine de 1 et d'intercepte voisin de 0 (équation de la régression linéaire : $y= 0.9919 x + 0.1145$).

Le brin anti-génomique de l'ARN 1 du CBPV a été détecté dans ces abeilles par RT-PCR conventionnelle (Celle et al., 2008), indiquant la réplication du génome du CBPV. Enfin une collaboration avec l'AFMB nous a permis par microscopie électronique, de visualiser les particules virales du CBPV chez les abeilles inoculées avec le virus comme avec les ARN majoritaires.

Ainsi, nous concluons que les ARN majoritaires du CBPV sont essentiels à la réplication du virus et suffisent pour induire les signes cliniques de la paralysie chronique chez l'abeille. Cette information est cruciale pour le développement d'un système de génétique inverse, visant à cloner le génome du CBPV.

Chapitre 2 : Vers la mise au point d'un système de génétique inverse pour le CBPV

Dans ce chapitre, je présente les différentes stratégies de clonage pour la mise en place d'un système de génétique inverse pour le CBPV. Il est divisé en quatre parties. La première décrit le matériel et les méthodes utilisées durant ce travail. En deuxième partie, j'illustre les différentes constructions plasmidiques réalisées qui nous ont permis de réaliser plusieurs essais d'infection expérimentale *in vivo*. Cette dernière partie est présentée dans la partie 3. Enfin, la partie 4 reprend les résultats obtenus pour établir une discussion.

A. Matériel et méthodes

I. Infection expérimentale

Les inoculations expérimentales sont réalisées sur des abeilles émergentes issues du rucher de l'Anses Sophia Antipolis. Des colonies ne présentant pas de signes cliniques de paralysie chronique sont sélectionnées et le statut virologique des abeilles émergentes est contrôlé par RT-qPCR. Les abeilles émergentes d'une ou plusieurs colonies (en fonction des besoins expérimentaux) sont collectées au laboratoire et mises en cagette et incubées à 32°C. Les abeilles sont nourries avec du sirop à 50% de saccharose complété en protéine L, et avec du sucre. Ces aliments sont changés tous les jours.

Après 5 jours, les abeilles sont anesthésiées au CO₂ et inoculées par injection intra-thoraciques de 4 µl d'inoculum réalisé en tampon phosphate. Le suivi clinique est réalisé tous les jours et les abeilles mortes sont retirées des cagettes. En fin d'expérimentation les abeilles encore vivantes sont sacrifiées par congélation. L'ensemble des abeilles destinées aux analyses virologiques est conservé à -80°C. Le suivi de la réplication du génome du CBPV (quantification par RT-qPCR de l'ARN 1 et de l'ARN 2, détection de l'ARN négatif, électrophorèses des ARN) a été réalisé dans les conditions décrites au Chapitre 1 de la Partie 2 (Youssef et al., 2015).

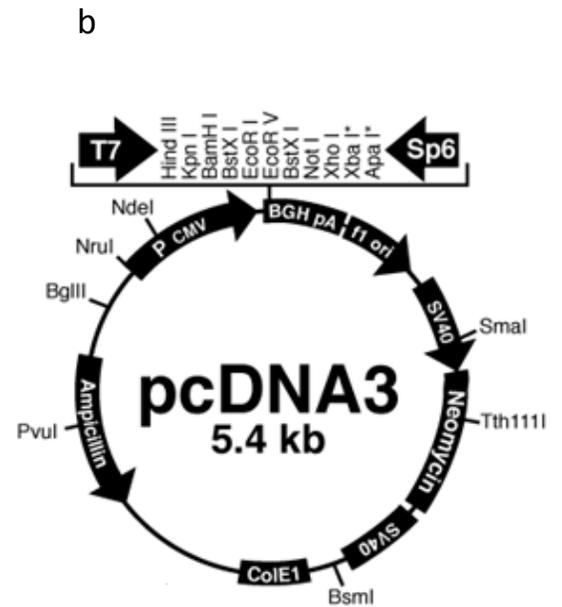
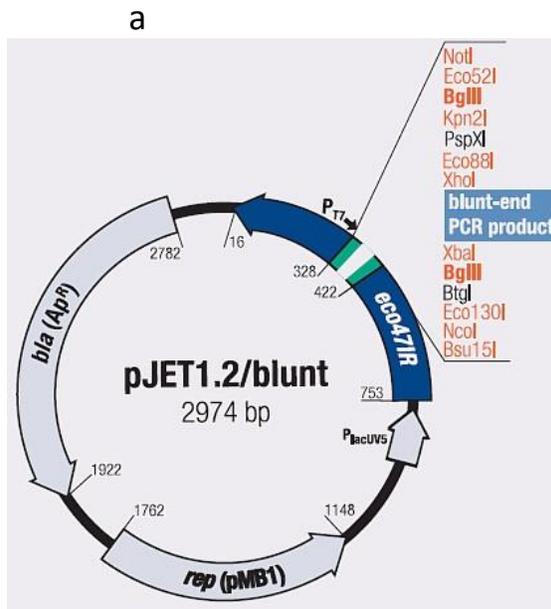


Figure 19. a) plasmide du clonage pJET 1.2 blunt end (Thermo Fisher Scientific) et b) le vecteur d'expression pcDNA3 (invitrogen)

II. Clonage du génome du CBPV par synthèse des inserts

Les premiers clonages ont été réalisés par synthèse *in vitro* des ADNc (homologues des ARN 1 et ARN 2 du CBPV) et clonage dans le vecteur bactérien puC57. Les deux clones sous le contrôle du promoteur T7 ont été produits par la société GeneCust (Luxembourg). Ce prestataire a également vérifié par séquençage la conformité du clonage et l'homologie des inserts avec les séquences des ARN1 et ARN2 de la souche de CBPV-A79P (NC_010711.1 et NC_010712). En plus, une autre synthèse de l'ADNc 1 (homologue de l'ARN 1 du CBPV) a été effectuée dans pcDNA3 par la même société.

III. Clonage du génome du CBPV en vecteur procaryote/eucaryote

Le clonage des segments 1 et 2 du génome du CBPV sous le contrôle d'un promoteur eucaryote (promoteur du cytomégalo virus CMV) a été réalisé dans l'unité INRA de Virologie et Immunologie Moléculaires de Jouy-en-Josas dans l'équipe virologie moléculaire des poissons, sous la direction des Dr. Michel Brémont et Dr. Stéphane Biacchesi.

1. Vecteurs utilisés

Le plasmide pJET1.2 (Thermofisher) (Figure 19.a) a été utilisé pour réaliser les constructions intermédiaires. Ce plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline et un gène "léta" dont la séquence contient le site de clonage multiple. L'insertion du fragment d'ADN dans ce site de clonage conduit à l'inactivation de ce gène "léta" rendant ainsi possible la croissance des bactéries transformées. En revanche, les bactéries transformées par le vecteur vide ne pourront pas se développer.

Le clonage final du génome viral a été réalisé dans le vecteur pcDNA3 (Invitrogen) (Figure 19.b). Ce vecteur possède le promoteur eucaryote CMV ainsi que le promoteur du bactériophage T7. Ce vecteur nous permet donc d'établir les deux différentes stratégies de génétique inverse décrites dans la partie 2 de l'introduction : la transfection/injection d'ARN synthétisés *in vitro* par la polymérase T7 ou la transfection/injection du plasmide.

Amorce	Séquence
P1.a F	GATATC CAAAGTTTACCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACTATAGGAAAGG AATTCCTATAGTCGTAAACTTTA
P1.a R	GATGGAGTGGTAA AAGCTT TCCAGATCTTGG
P1.b F	CTGGA AAGCTT TTACCACTCCATCTTGGACATTGG
P1.b R	CGGACCGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCCTACCTTACCAGTGCC TGACGGACTTATCTGGCG
P1.c F	CGCCAGATAAGTCCGTCAAGGACTGGTAAGGTAGGGGTCGGCATGGCATCT CCACCTCCTCGCGGTCCG
P1.c R	AAGCTTTCTAG ACCATCCGGATATAGTTCCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCC
P2.a F	GGATCC TAAGGTTTACCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACTATAGGAAAGG AATTCCTATAGTCGTAAACCTTAGGCTTTCATCTATGG
P2.a R	CTTATCT ATCGAT GGCTGCTGTGTTCCCC
P2.b F	CATCGAT AGATAAGTCGTCATACGCCCTATCATGGTTGGGTCGGCATGGCA TCTCCACCTCCTCGCGGTCCG
P2.b R	CCAAGCTTCCCGGG ATCCGGATATAGTTCCCTCCTTTCAGCAAAAAACC
P2.int	CGGAGGTCGTTGAGTGATCTGTGGTGTGG

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées lors du clonage. Les sites de restrictions utilisés sont en gras et la séquence du ribozyme HH est soulignée.

Enzyme	Site de la coupure	Température	Extrémité
<i>Bgl</i> II	A [^] GATCT	37°C	cohésive
<i>Hind</i> III	A [^] AGCTT	37°C	Cohésive
<i>Cl</i> I	AT [^] CGAT	37°C	Cohésive
<i>Sna</i> BI	TAC [^] GTA	37°C	Franche
<i>Eco</i> RV	GAT [^] ATC	37°C	Franche
<i>Eco</i> RI	G [^] AATTC	37°C	Cohésive
<i>Bam</i> HI	G [^] GATCC	37°C	Cohésive
<i>Sma</i> I	CCC [^] GGG	30°C	Franche
<i>Xba</i> I	T [^] CTAGA	37°C	Cohésive

Tableau 8 : Liste des enzymes de restriction utilisées lors du clonage (fournisseur : Fermentas).

2. Synthèses des fragments ADNc des deux segments du génome viral par PCR

Les amorces utilisées pour les différentes constructions sont indiquées dans le Tableau 7. Notamment, les amorces P1.a F et P2.a F contiennent la séquence du ribozyme Hammerhead (Ribozyme HH). P1.c R et P2.b R contiennent la séquence antigénique du ribozyme du virus delta de l'hépatite (Ribozyme δ). Ces quatre amorces situées en amont et en aval des segments viraux contiennent aussi les sites de restriction nécessaires pour le clonage final dans le vecteur pcDNA3. Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant les réactifs « Smarter PCR ADNc synthesis kit » (Clontech) selon les recommandations du fournisseur. La taille des produits de PCR a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2%.

3. Ligation des inserts

Les fragments d'ADNc produits par PCR ont été purifiés directement en utilisant le kit de purification "QIAquick PCR purification kit" (Qiagen) ou sur gel d'agarose à l'aide d'un kit, le "QIAquick gel extraction kit" (Qiagen). La réaction de ligation des produits de PCR dans le vecteur de clonage pJET1.2 a été faite en utilisant les réactifs « Clonejet PCR cloning kit » (Thermofisher), selon les recommandations du fournisseur. Ce vecteur permet le clonage des produits de PCR sans traitement préalable par des enzymes de restriction.

Dans les autres cas, les plasmides ont été digérés avec des enzymes de restriction adéquates pour préparer le fragment d'ADNc à cloner et le plasmide de clonage. Les inserts ont été purifiés après migration par électrophorèse sur un gel d'agarose. L'enzyme T4 DNA ligase (Invitrogen) a été utilisée pour la ligation des inserts dans le vecteur d'expression. Le vecteur pcDNA3 préalablement digéré avec les enzymes de restriction choisies a été soumis à une déphosphorylation par la phosphatase alcaline (Thermofisher) pour éviter que les plasmides partiellement digérés ne se recircularisent lors de l'étape de ligation. La réaction de ligation a été incubée à 16°C pendant une nuit.

Afin de réaliser les réactions de ligation, les concentrations des fragments d'ADNc et du vecteur ont été soit estimées par électrophorèses (en référence à l'intensité des bandes du marqueur de taille et de concentration connue), soit déterminées en spectrophotométrie par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm. Un rapport molaire de 3:1 (insert : vecteur) a été utilisé pour les ligations.

4. Transformation des bactéries *E. coli*

En conditions stériles, 50 µL de bactéries compétentes TOP 10 (Thermofisher), préalablement décongelés dans la glace, sont ajoutés à 5 µL de produit de ligation (environ 2 µg) dans un tube de 1,5 mL. L'ensemble est placé sur la glace pendant 30 min. La transformation est provoquée par un choc thermique de 30 secondes à 42°C. Le microtube est de nouveau transféré dans la glace et 250 µL de milieu enrichi SOC (tryptone 2%, extraits de levure 0,5 %, NaCl 8,5 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM et glucose 20 mM) sont ajoutés. Le tube est incubé pendant 1 heure à 37°C sous agitation (200 rpm). Un volume de 150 µL de la suspension bactérienne estensemencé en utilisant des billes de verre stériles sur boîtes LB-agar complétées en ampicilline nécessaire à la sélection. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées toute la nuit à 37°C.

5. Vérification des clones

Plusieurs colonies en croissance sur la boîte de pétri sont prélevées à l'aide d'une anse et incubées dans 3 mL de milieu LB + antibiotiques pendant 7 heures. L'ADN plasmidique est extrait en utilisant les réactifs « Nucleo spin kit-plasmid miniprep » (Machery Nagel) en suivant le protocole du fournisseur. L'ADN plasmidique est digéré avec deux enzymes de restriction adéquates (Tableau 2), permettant de vérifier la présence de l'insert et aussi le sens d'intégration de l'insert. Le profil de la digestion est visualisé par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,2 %. Les clones positifs ont été séquencés (par un prestataire externe Eurofins Genomics) pour la validation de leur séquence. Les clones bactériens sélectionnés sont amplifiés dans 200 mL de milieu LB supplémenté en antibiotique et incubé à 37°C pendant une nuit. L'ADN plasmidique est ensuite extrait en utilisant les réactifs « NucleoBond extra, Midiprep kit » (Machery-Nagel). Le dosage de l'ADN est réalisé par mesure de la DO à 260 nm avec

le spectrophotomètre Nanodrop 2000. La pureté de l'échantillon est évaluée par le rapport des valeurs d'absorbance à 260 et 280 nm. Une valeur de ce rapport comprise entre 1,8 et 2,0 permet d'évaluer une faible contamination en protéines.

6. Transcription *in vitro*

Les vecteurs d'expression contenant les segments viraux sont linéarisés en utilisant une enzyme de restriction clivant en aval de l'insert. La réaction est ensuite traitée à la protéinase K afin d'inactiver les enzymes. Les vecteurs linéarisés sont purifiés sur gel d'agarose, en utilisant les réactifs "QIAquick PCR purification kit" (Qiagen) et dosé par spectrophotométrie.

Les ARN sont produits par transcription *in vitro* en utilisant les réactifs « MEGAscript T7 transcription kit » (Ambion) en suivant le protocole du fournisseur. Dans certaines conditions, une coiffe ; Cap Analog (m7G(5')ppp(5')G) (ThermoFisher) a été utilisée afin de coiffer les ARNs synthétisés en 5'. Cette enzyme a été rajoutée à la réaction de transcription selon un rapport molaire 1:10 avec le guanosine triphosphate (GTP).

Après la transcription *in vitro*, les ARNs synthétiques sont traités à la DNase (Ambion) afin d'éliminer l'ADN plasmidique matrice. Les ARNs sont purifiés à l'aide des réactifs « RNA clean-up kit » (Machery Nagel) et dosé par spectrophotométrie afin de mesurer leurs quantités.

L'intégrité des ARNs est vérifiée en électrophorèse en conditions dénaturantes (MOPS/Formaldéhyde). Cette méthode est décrite dans le Chapitre 2 (Youssef et al., 2015).

B. Les différentes constructions plasmidiques

Le clonage des deux segments génomiques (ARN 1 et ARN 2) du CBPV a été réalisé afin d'établir un système de génétique inverse.

Dans cette partie, je vais présenter les différentes constructions plasmidiques qui ont été réalisées.

I. Construction dans puC57

La stratégie de clonage dans le plasmide puc57 des ADNc 1 et ADNc 2 du CBPV est illustrée par les Figures 20 et 21, respectivement. Les deux clones ont été construits selon une stratégie comparable.

En amont des séquences homologues aux segments génomiques viraux (extrémité 5' des cDNA1 et cDNA2), la séquence du promoteur T7 a été rajoutée. Cette séquence avait été modifiée en supprimant les deux dernières bases guanidine (G) du promoteur afin que la première base transcrite (G +1) corresponde à la première base de chaque ARN viral. Ainsi lors de la transcription *in vitro*, les ARN transcrits devaient être identiques à ceux du virus sauvage, sans ajout d'aucune base. En aval des séquences, des sites de restriction ont été rajoutés de façon à obtenir une terminaison à extrémité 3' des ARN transcrits identique à celle des ARN sauvages.

Les séquences ont été clonées dans le vecteur puc57 entre les sites de restriction *Xba*I et *Sma*I pour l'ADNc 1, *Bam*HI et *Pst*I pour l'ADNc 2. Un séquençage des plasmides recombinants a été fait par la même société (Genecust) pour vérifier les constructions.

Après l'obtention des clones, une étape de linéarisation a été réalisée et suivie d'un traitement à la mung bean nucléase (Promega) afin d'obtenir des extrémités 3' francs et la protéinase K pour éliminer les RNAses. La transcription *in vitro* a été faite en utilisant « Megascript T7 transcription kit » (Ambion) selon les recommandations du fabricant.

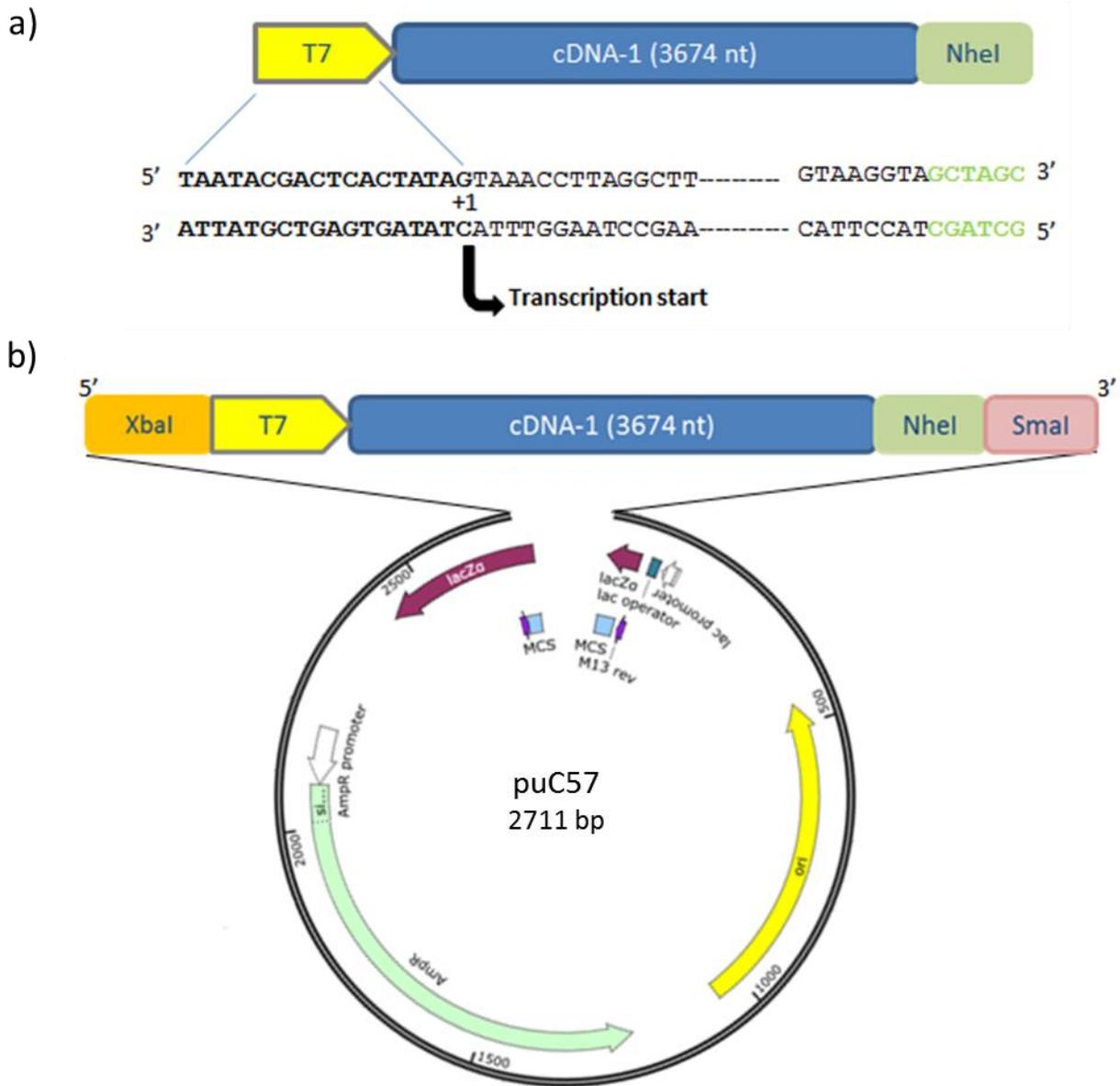


Figure 20 : Construction plasmidique de l'ADNc 1 à partir du vecteur puC57. a) Représentation de la séquence synthétisée, b) Clonage de la séquence entre les sites de restriction *XbaI* et *SmaI*. La boîte jaune symbolise le promoteur T7 avec sa séquence en caractères gras et la boîte bleue représente la séquence ADNc. Le nucléotide +1 représente la première base transcrite. La séquence du site de restriction *NheI* est représentée en caractères verts.

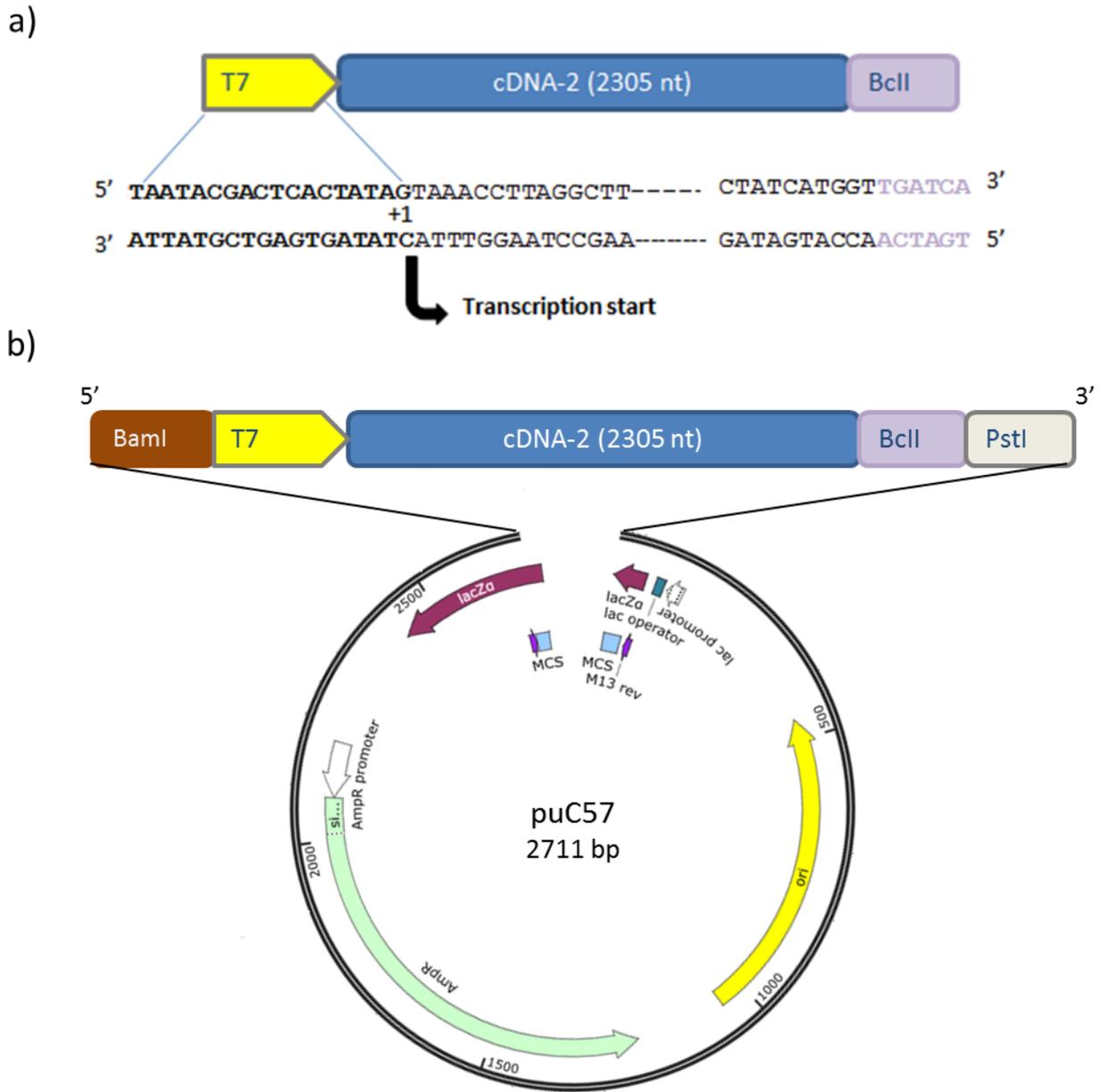


Figure 21 : Construction plasmidique de l'ADN 2 à partir du vecteur puC57. a) Représentation de la séquence synthétisée b) Clonage de la séquence entre les sites de restriction *Bam*HI et *Pst*I. La boîte jaune symbolise le promoteur T7, avec sa séquence est en caractères gras et la boîte bleue représente la séquence ADNc. Le nucléotide +1 représente la première base transcrite. Le site de restriction *Bcl*I est représenté en caractères violets.

II. Clonage des deux segments viraux dans le vecteur d'expression pcDNA3

Cette stratégie consistait à cloner le génome du CBPV dans un vecteur possédant un promoteur eucaryote (promoteur du CMV) dans la perspective d'inoculer les plasmides recombinants directement aux abeilles. Cette construction a été réalisée en deux étapes :

- Clonage dans pJET1.2 blunt end des ADNc correspondant à des fragments des deux segments génomiques viraux
- Ligation de ces deux segments dans le vecteur pcDNA3

Par une réaction de PCR, des séquences ont été rajoutées aux extrémités 5' et 3' des ADNc1 et ADNc2. Ces séquences correspondaient à des ribozymes ainsi qu'aux sites de restriction nécessaires au clonage dans le vecteur pcDNA3.

En plus du promoteur CMV, le vecteur pcDNA3 contient la séquence du promoteur T7. Ce vecteur permet donc de conduire deux stratégies de génétique inverse soit l'injection des plasmides, soit l'injection d'ARN transcrits in vitro avec l'ARN polymérase T7. Les Figures 22 et 23 illustrent les stratégies utilisées pour l'ADNc 1 et l'ADNc 2 respectivement.

1. Stratégie de l'ADNc 1

L'ADNc 1 (3.674 pb) cloné dans le vecteur puC57 (voir ci-dessus) nous a servi de matrice d'ADN pour l'amplification par PCR. La stratégie du clonage était de diviser l'ADNc 1 en deux fragments (ADNc 1.a et ADNc 1.b) au niveau du site de restriction *HindIII* uniques présent dans la séquence de l'ADNc 1.

Le fragment 5' (cDNA1.a) a été amplifié par PCR en rajoutant le site de restriction *EcoRV*, le ribozyme HH grâce à l'amorce P1.a F. Ce fragment a été ensuite cloné dans le vecteur pJet 1.2 blunt end. Le plasmide recombinant a été nommé pJET ADN1.a.

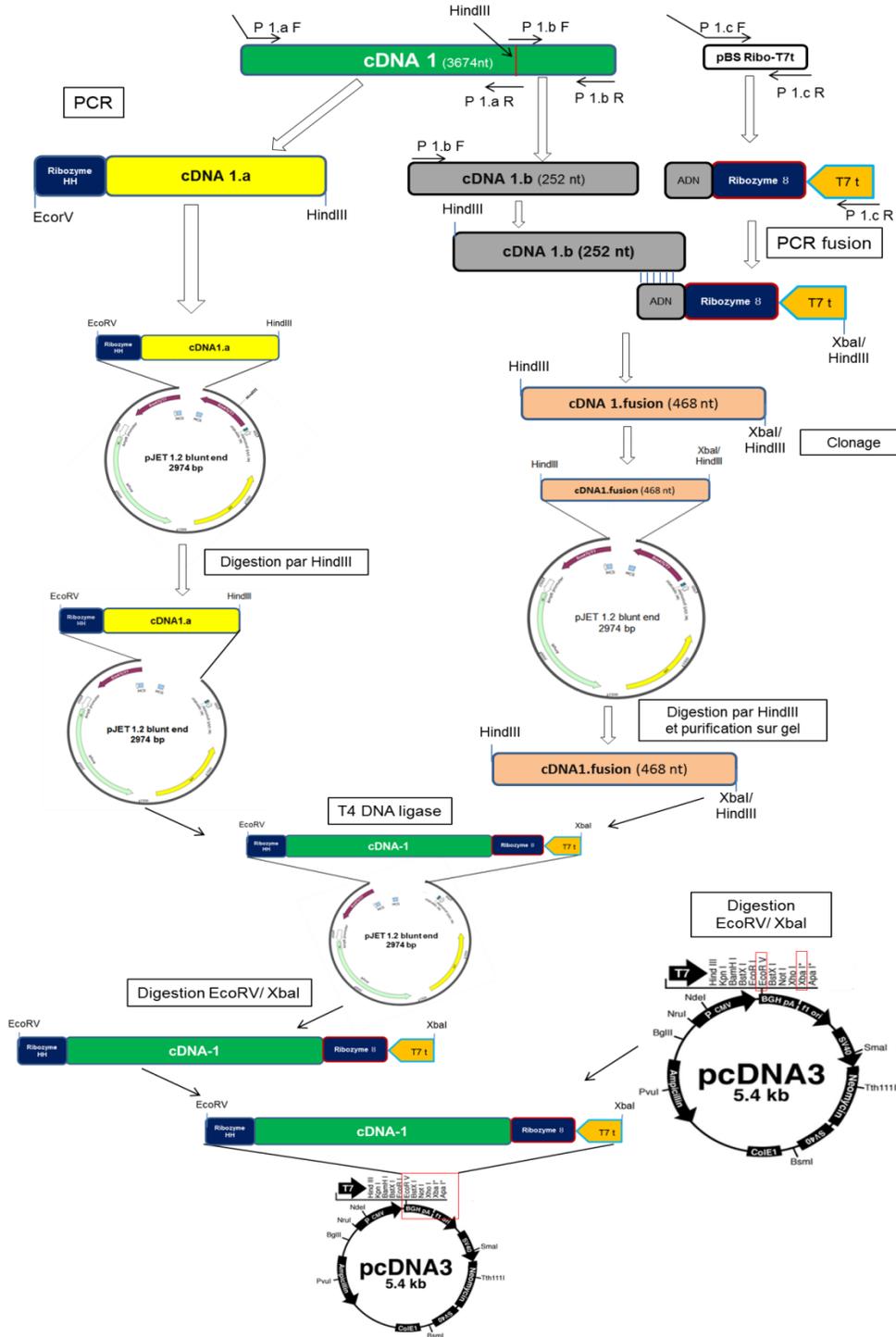


Figure 22 : Stratégie de construction plasmidique de l'ADN 1 dans pcDNA3. La première étape consiste à amplifier les fragments par PCR, ensuite de les cloner dans le vecteur pJET 1.2 blunt end. Le fragment ADN fusion sera fusionné au fragment ADN 1.a dans pJET avant d'être transféré dans pcDNA3 entre les deux sites de restriction *EcoRV* et *XbaI*. Les ribozymes sont indiqués en bleu foncé et le T7t en jaune.

Une troisième séquence codant pour le ribozyme δ et le terminateur T7 (T7t) était amplifiée à partir du plasmide pBS Ribo-T7t en incluant également les deux sites de restrictions *Xba*I/*Hind*III nécessaires pour le clonage. Ce fragment avait à son extrémité 5' une séquence chevauchante à celle du fragment ADN1.b amplifié également par PCR à partir du plasmide puC57-ADNc 1. Les deux fragments ont été fusionnés par PCR en utilisant les amorces P1.b F/P1.c R. L'amplicon nommé ADNc 1.fusion a été cloné dans le vecteur pJET 1.2 blunt end.

Le fragment ADNc 1.fusion a été ensuite excisé du vecteur pJET par digestion avec l'enzyme *Hind*III et purifié sur gel d'agarose. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pJET_ADN1 afin de reconstituer le segment 1. La vérification de la construction a été réalisée par digestion enzymatique et par séquençage.

Pour finir, le fragment entier cDNA.1 a été excisé du plasmide pJET par digestion enzymatique et inséré dans le vecteur pcDNA3 entre les deux sites de restriction *Eco*RV et *Hind*III. Cette stratégie est illustrée dans la Figure 22.

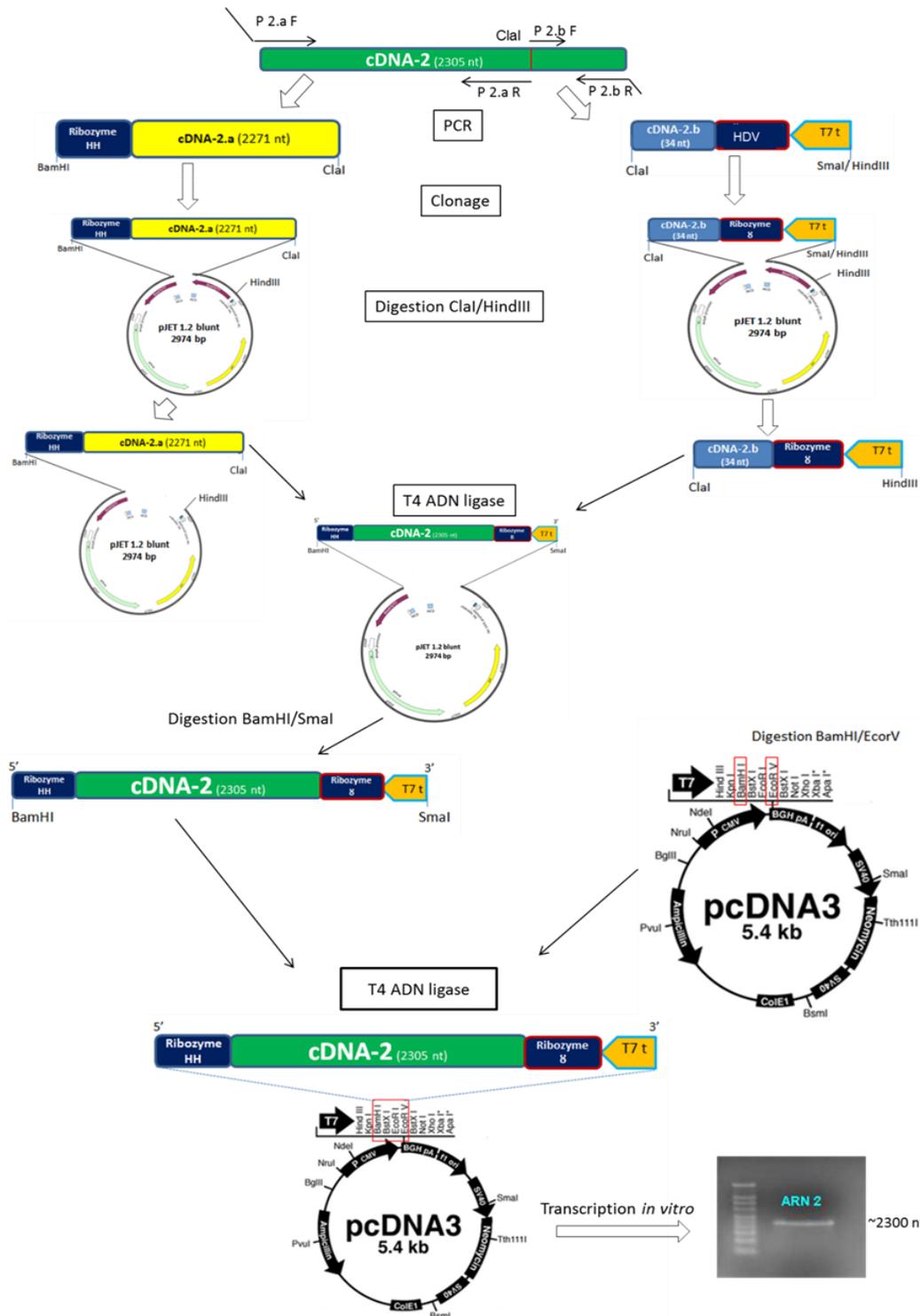


Figure 23 : Stratégie de construction plasmidique de l'ADN 2 dans pcDNA3. La première étape consiste à amplifier les 2 fragments par PCR, ensuite de les cloner dans le vecteur pJET 1.2 blunt end. Le fragment 2.b sera lié au fragment ADN 2.a dans le pJET avant d'être transféré dans le pcDNA3 entre les deux sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RV. Enfin, une étape de transcription est faite pour vérifier la taille de la séquence. Les ribozymes sont indiqués en bleu foncé et le T7t en jaune.

2. Stratégie ADN 2

La stratégie pour l'ADN 2 consistait à diviser le fragment ADN 2 (2.305 pb) cloné dans puC57 en deux fragments (ADNc 2.a et ADNc 2.b) en utilisant le site de restriction unique *Clal* présent dans sa séquence. Du côté 5', le site de restriction *Bam*HI et le ribozyme HH ont été ajoutés par PCR. Cet amplicon (ADNc 2.a) a été cloné dans le vecteur pJET 1.2 blunt end. Du côté 3', le fragment ADNc 2.b a été amplifié par PCR en rajoutant le ribozyme δ , le terminateur T7 (T7t) et les deux sites de restrictions *Sma*I/*Hind*III nécessaires pour le clonage. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pJET1.2.

Le fragment ADNc 2.b a été réisolé par digestion *Clal*/*Hind*III et purifié. Il a été lié au fragment ADNc 2.a dans le vecteur pJET 1.2 ouvert avec les mêmes enzymes. Pour la dernière étape du clonage, le fragment a été excisé du vecteur pJET 1.2 grâce aux enzymes *Bam*HI et *Sma*I, ce dernier libérant une extrémité à bord franc. Il a été inséré dans le vecteur pcDNA3 entre les sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RV. Le site *Eco*RV génère aussi une coupure à bord franc compatible avec celui généré par *Sma*I. La stratégie est illustrée dans la Figure 23.

Condition	Charge virale par inoculation (4µl)	Nombre d'abeilles
Témoins non inoculé (Tni)	-	30
Particule virale CBPV (VP)	10 ⁴ copies d'ARN	30
ARN 1+ ARN 2: coiffé (C)	10 ⁹ copies d'ARN	30
ARN 1+ ARN 2: non coiffé (NC)	10 ⁹ copies d'ARN	30

Tableau 9 : les différentes charge virales pour chaque condition testée ainsi que le nombre d'abeille par condition.

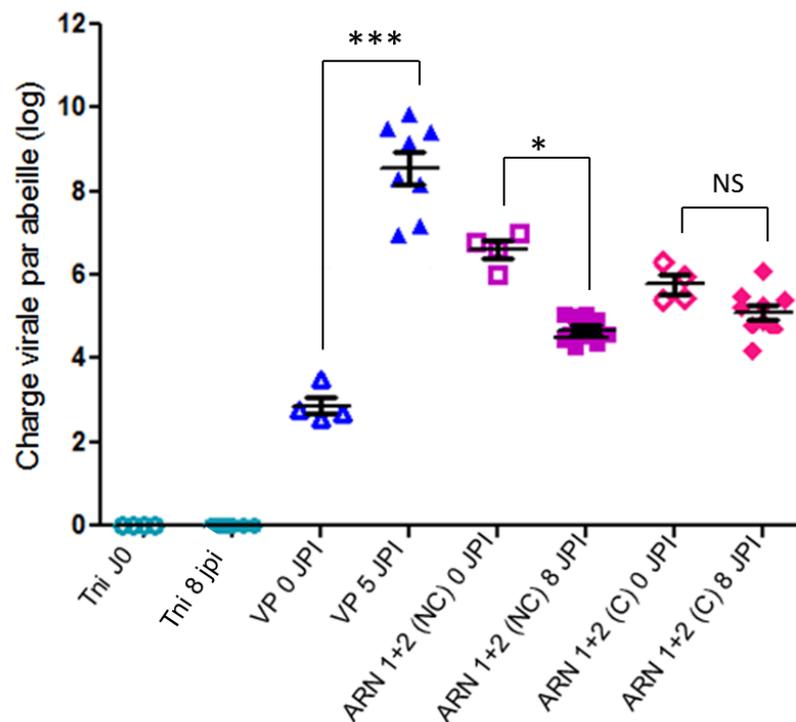


Figure 24 : Graphe montrant la charge virale (en log) mesurée par RT-qPCR ciblant l'ARN1, en fonction des conditions testées. Tni : témoin non inoculé. VP : virus pur. ARN 1+2 (C) : Coiffé. ARN 1+2 (NC) : Non Coiffé.

J0 : avant l'inoculation. 0 JPI : jour 0 après l'inoculation. 8 JPI : 8 jours après l'inoculation.

Le test Mann-Whitney a été effectué pour montrer la différence significative. $p < 0.05$ * et $p < 0.01$

***.

C. Pouvoir infectieux des plasmides recombinants

I. Stratégie 1 : plasmide puC57

Après l'obtention des plasmides recombinants avec la séquence homologue à l'ARN 1 et l'ARN 2 du CBPV, sous le contrôle d'un promoteur T7 tronqué, j'ai réalisé une linéarisation enzymatique des plasmides et leur transcription *in vitro* afin de tester le pouvoir réplcatif des ARN produits.

Quatre conditions ont été testées (Tableau 9) : les abeilles témoins, non inoculées (Tni) ; les abeilles inoculées avec 10^4 particules virales CBPV purifiées sur gradient saccharose (témoin positif) ; les abeilles inoculées avec les ARN transcrits coiffés ou non coiffés, à une dose de 10^9 copies d'ARN par abeille. La charge d'ARN transcrits avait été choisie en se basant sur les travaux décrits dans le Chapitre 2 (Youssef et al., 2015). La Figure 24 illustre le nombre de copies d'ARN, quantifié dans les abeilles par RT-qPCR en fonction des conditions d'inoculation et aux différents jours d'expérimentation. La différence de charge en ARN mesurée en début d'expérimentation (juste avant [J0] ou juste après l'inoculation [J 0PI]) et en fin d'expérimentation permettait d'évaluer la réplcation des ARN inoculés. Les conditions expérimentales étaient validées par les abeilles témoins. Les abeilles non inoculées avec les ARN restaient négatives tout le long de l'expérience, alors que les abeilles inoculées avec le virus pur développaient les signes cliniques de la paralysie chronique. Ces signes cliniques étaient associés à une augmentation, 5 jours après inoculation, de la charge en RNA viraux, supérieure à 10^8 copies par abeille. En revanche, les ARN transcrits coiffés et non coiffés n'apparaissaient pas être infectieux. Les signes cliniques de la paralysie chronique n'ont pas été observés et il n'y a pas eu d'augmentation du nombre de copies d'ARN. Huit jours après l'inoculation, les charges moyennes en ARN étaient inférieures aux charges mesurées juste après inoculation.

Les résultats obtenus par la RT-qPCR sur le brin ARN 2 du CBPV étaient identiques aux résultats de la RT-qPCR de l'ARN 1 CBPV présenté dans la Figure 24. Ces résultats remettaient en question cette stratégie dans l'efficacité de production des ARN viraux entiers et de la transfection.

Conditions	Copies du virus/ inoculation
<u>Tni:</u> abeille non inoculé	-
<u>PB:</u> abeille inoculé avec le tampon de dilution du CBPV: le PB	-
<u>VP:</u> particule virale du CBPV purifiées	10 ⁴
<u>Inoculum A:</u> pcDNA3-ADNc 1+ pcDNA3-ADNc 2	10 ⁴
<u>Inoculum B:</u> pcDNA3-ADNc 1+ pcDNA3-ADNc 2	10 ⁶
<u>Inoculum C:</u> pcDNA3-ADNc 1+ pcDNA3-ADNc 2	10 ⁹

Tableau 10 : Les différentes conditions testées durant pour l'expérimentation abeilles.

II. Stratégie 2 : plasmide pcDNA3

1. Inoculation des clones pcDNA3-ADNc

Afin de contourner les problèmes identifiés pour la stratégie précédente, nous avons procédé à un nouveau clonage en insérant des ribozymes en amont et en aval de nos séquences homologues aux ARN 1 et ARN 2 du CBPV. Le ribozyme Hammerhead du côté 5' et le ribozyme du virus delta de l'hépatite du côté 3' permettaient l'auto-clivage des ARN transcrits. Cette approche évitait le recours aux digestions enzymatiques des plasmides et fiabilisait la taille des ARN transcrits.

De plus, le vecteur pcDNA3 portant le promoteur eucaryote du CMV, nous avons pu tester directement le pouvoir infectieux des clones sans réaliser de transcription *in vitro*. En effet, l'ARN polymérase de l'abeille reconnaissant ce promoteur, elle devait initier la transcription des clones *in vivo*. En outre, cette stratégie facilitait la mise en place de l'outil génétique inverse en réduisant la manipulation des ARN (macromolécules très sensibles aux nucléases).

Dans un premier temps, des abeilles émergentes étaient inoculées avec les clones. En plus des témoins négatifs et le témoin virus pur, trois différentes conditions ont été testées (Tableau 10) :

- 10^4 copies plasmidiques par abeille (A – avec un inoculum de charge comparable à celle des abeilles inoculées avec le virus purifié).
- 10^6 copies plasmidiques par abeille (B – inoculée avec une charge intermédiaire entre la charge de virus purifié et la charge en ARN viraux purifiés, cf. Chapitre 2).
- 10^9 copies plasmidiques par abeille (C – correspondant à la charge utilisée avec les ARN viraux purifiés – cf. Chapitre 2).

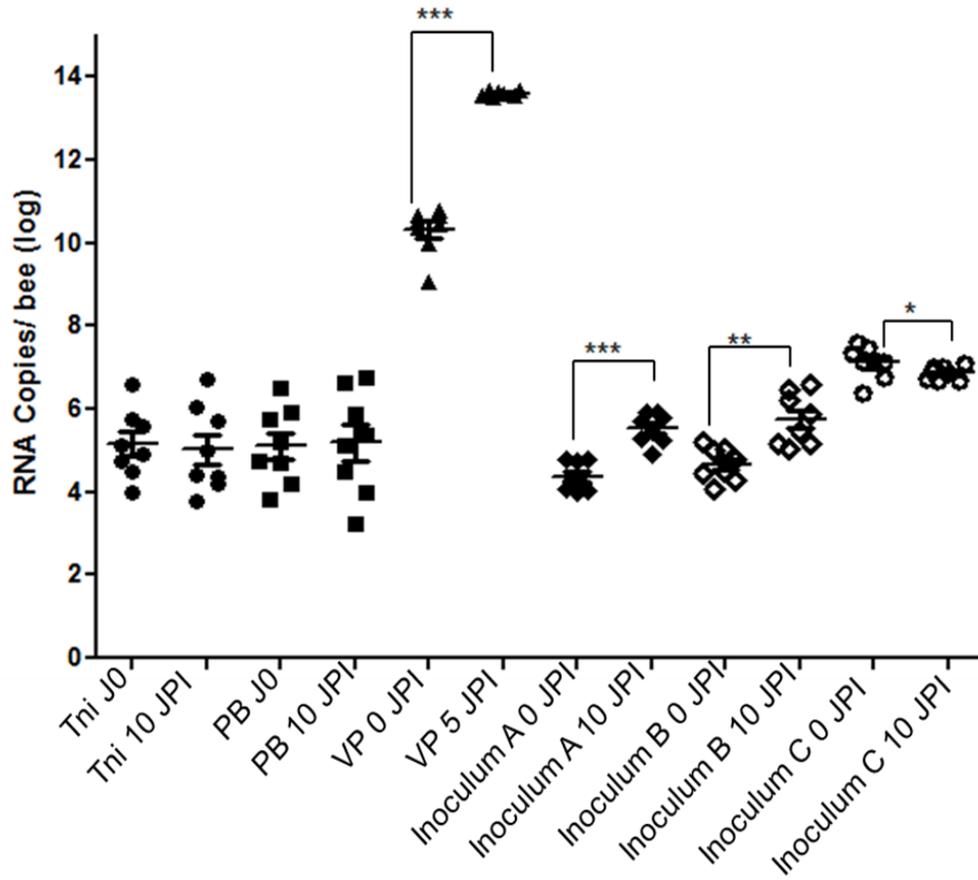


Figure 25 : Quantification de l'ARN 1 du CBPV par RT-qPCR. Le graphe montrant le nombre de copies d'ARN par abeille en échelle logarithmique en fonction des conditions testées et présenté dans le tableau 10. Le test Mann-Whitney a été effectué pour montrer la différence significative. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ***, $0,01 < p < 0,05$ **.

Les résultats de cette expérience sont illustrés dans la Figure 25. Par RT-qPCR, nous avons quantifié la charge virale en fonction des conditions testées au jour d'inoculation (J0), 5 et 10 jours après inoculation (JPI). Bien que les abeilles témoins ne fussent pas indemnes de CBPV, les conditions expérimentales ont été considérées comme validées. En effet, ces abeilles présentaient une charge comprise entre 10^4 et 10^7 copies de génome par abeille mais la charge moyenne restait constante tout au long de l'expérience et ces abeilles ne présentaient pas de signe de paralysie chronique. De plus, les abeilles inoculées avec le virus purifié développaient la paralysie chronique. Les signes cliniques (tremblements, abeilles incapables de voler et regroupé) étaient observés après 5 jours et s'accompagnaient d'une augmentation significative ($p > 0.01$) du nombre de copies d'ARN viral, atteignant jusqu'à 10^{13} copies du virus par abeille.

Les abeilles inoculées avec les plasmides recombinants à 10^4 copies plasmidiques/abeille (A) et 10^6 copies plasmidiques/abeille (B) montraient une augmentation significative des copies d'ARN par abeille à 10 JPI. Cependant cette charge en ARN restait comparable à la charge en ARN de CBPV mesurée dans les témoins négatifs (Tni et PB). En revanche, les abeilles inoculés avec 10^9 copies plasmidiques / abeille montraient une diminution des copies d'ARN 10 JPI. Avec ces 3 inocula (A, B et C), aucun signe clinique de la maladie de la paralysie chronique de l'abeille n'a été observé.

Les résultats obtenus par la RT-qPCR sur le brin ARN 2 du CBPV étaient identiques aux résultats de la RT-qPCR de l'ARN 1 CBPV présenté dans la Figure 25.

Afin de vérifier la spécificité de quantification des ARN transcrits *in vivo* et non la quantification des plasmides recombinants inoculés, nous avons réalisé une PCR quantitative sur les extraits d'ARN total sans étape de transcription inverse. Les charges ainsi mesurées étaient comprises entre 10^2 à 10^3 copies d'ADN par abeille à la fin de l'expérience dans l'ensemble des conditions testées (inocula A, B et C). Cette charge est significativement plus faible que celle mesurée après la synthèse de l'ADNc par la reverse transcriptase qui était comprise entre 10^6 à 10^9 copies d'ARN par abeille.

Conditions		Copie du virus / inoculation
1	ARN 1 sauvage + pcDNA3 ADN 2	10 ⁹
2	ARN 2 sauvage + pcDNA3 ADN 1	10 ⁹
3	ARN 1 sauvage + ARN 2 transcrit	10 ⁹
4	ARN 2 sauvage + ARN 1 transcrit	10 ⁹
5	pcDNA3 ADN 1+ pcDNA3 ADN 2	10 ⁹
6	(ARN 1 + ARN 2) transcrit	10 ⁹
7	ARN 1+ ARN 2 sauvage (Témoin ARN)	10 ⁹
8	Virus purifié (VP) (Témoin virus)	10 ⁴
9	Abeilles non inoculées (Témoins négatif)	-----

Tableau 11 : Les différentes conditions testé lors de l'expérimentation abeilles

2. Inoculation par les ARN transcrits in vitro des clones pcDNA3 –ADNc

Suite aux résultats obtenus après inoculation du pcDNA3, nous avons soulevé l'hypothèse d'une mutation dans la séquence homologue du génome du CBPV (notamment dans la séquence de référence du génome du CBPV décrite par (Olivier et al., 2008)). Dans le but d'investiguer cette hypothèse, nous avons réalisé une expérimentation de complémentation des ARN transcrits *in vitro* avec l'ARN du virus sauvage. Les différentes conditions sont présentées dans le Tableau 11.

Les résultats de cette expérimentation sur abeilles sont illustrés dans la Figure 26. Cet histogramme compare la moyenne des valeurs obtenues par RT-qPCR en fonction des conditions testées entre le jour d'inoculation et 5 JPI.

Les abeilles non inoculées étaient contaminées par le CBPV mais la charge virale restait faible (10^4) tout au long de l'expérience. Les témoins positifs correspondant aux abeilles inoculées soit avec le virus purifié soit avec les ARN 1 + ARN 2 viraux purifiés (Youssef et al., 2015) montraient quant à eux une augmentation de charge atteignant 10^{13} copies d'ARN par abeille. De plus dans les deux conditions, nous avons observé les signes cliniques de la paralysie chronique.

Parmi les autres conditions testées, les abeilles inoculées avec les ARN 1 et ARN 2 transcrits *in vitro* à partir du clone pcDNA3 (condition 6), présentaient une augmentation des copies d'ARN d'environ de 3 log et atteignaient une charge d'environ 10^{12} copies d'ARN/ abeille. Toutefois, les signes cliniques de la maladie n'ont pas été observés dans ces conditions.

Dans les autres conditions, aucune augmentation de la charge virale n'a été détectée. D'une façon surprenante, la condition 5 (correspondant aux abeilles inoculées avec les plasmides recombinants) conduisait à la mortalité de l'ensemble des abeilles 4 jours après inoculation. Nous avons analysé les abeilles utilisées pour ces expérimentations par PCR conventionnelle et RT-qPCR et montré l'absence de BQCV et d'ABPV. En revanche, les virus DWV et SBV était présents avant inoculation à des charges virales <100 DWV par abeille et comprises entre 10^4 et 10^5 SBV par abeille.

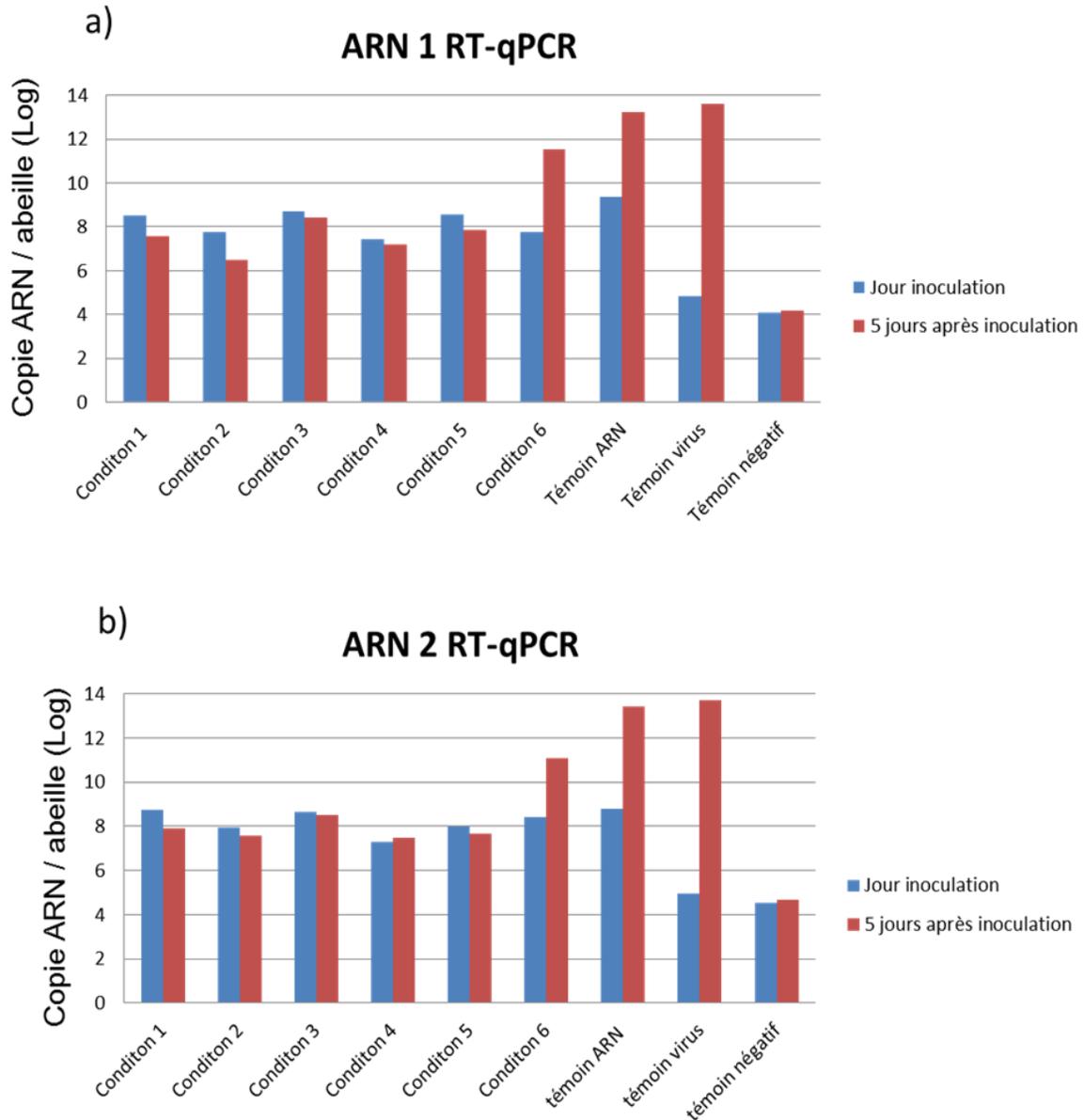


Figure 26 : Résultats de la RT-qPCR ARN 1 (a) et RT-qPCR ARN 2 (b) du CBPV. En ordonnée : nombre de copies d'ARN retrouvé dans l'abeille en échelle logarithmique. En abscisse, les conditions testées qui sont détaillées dans le tableau 11. L'histogramme bleu indique la charge retrouvée le jour 0 juste après l'inoculation et l'histogramme en rouge montre la charge retrouvée dans l'abeille 5 jours après inoculation.

Les analyses des abeilles mortes dans la condition 5 indiquent qu'une abeille parmi toutes les abeilles testées présentait une forte charge en ABPV (10^7 copies d'ARN/abeille). Chez les autres abeilles, l'ABPV était indétectable. Ces résultats pouvaient expliquer la mortalité individuelle de l'abeille infectée par l'ABPV mais ne permettaient pas de connaître la cause de la mortalité de toutes les autres abeilles dans ces conditions expérimentales.

D. Discussion

Dans ce travail, nous avons testé la capacité des différentes constructions plasmidiques à reproduire l'infection virale chez l'abeille. Ainsi nous avons réalisé les deux stratégies de génétique inverse présentée dans l'introduction ; à savoir, la transformation avec des ARN transcrits *in vitro* et la transformation avec des vecteurs ADN sous le contrôle de promoteur eucaryotes (Figure 10).

La difficulté majeure de nos expérimentations était le recours à des abeilles au statut sanitaire difficilement maîtrisable. Pour ces expériences, des abeilles émergentes avaient été prélevées sur des ruches sans signe clinique de paralysie chronique et conduites en condition de nourrissage contrôlé : mis en place d'un rucher hivernal, limitant les sortie des abeilles dans le milieu naturel compensé par un nourrissage des colonies au sirop et à la pâte protéinée (Youssef et al., 2015). Ces abeilles avaient été également testées préalablement pour vérifier l'absence de CBPV. Hormis dans les conditions expérimentales décrites pour évaluer la stratégie 1 pour lesquelles les abeilles étaient indemnes de CBPV, ce virus était généralement détecté à une charge d'environ 10^4 copie d'ARN par abeille. Cette charge restait toutefois constante tout au long des expériences et ne semblait pas interférer sur les résultats. Les abeilles restaient néanmoins sensibles à l'injection intra-thoracique de virus purifié ou d'ARN viraux purifiés. Cinq jours après inoculation, elles développaient les signes cliniques de la paralysie chronique et les charges virales étaient significativement accrues. Ces critères définissaient les conditions de validité de nos essais.

Les premiers résultats obtenus après l'inoculation des ARN transcrits *in vitro* à partir des plasmides recombinants puC57 n'ont pas montré de répllication des ARN attendus. Cela pouvait être dû au promoteur T7 tronqué qui n'était pas efficace, ce qui a entraîné une diminution du rendement de purification des ARN transcrits. De plus, les nombreuses étapes pour la purification des ARN faisaient craindre (en dépit des précautions prises et de l'usage de réactifs et matériel traités au diéthylpyrocarbonate) le clivage ou la dégradation partielle des ARN produits. Les clones nous ont alors servi pour élaborer une nouvelle stratégie visant à cloner les séquences génomique du CBPV dans le vecteur pcDNA3. Grâce au promoteur eucaryote (promoteur du CMV) porté par

ce vecteur et aux ribozymes rajoutés, nous avons tenté d'inoculer directement les plasmides recombinants aux abeilles.

Après la production des clones, nous avons inoculé les plasmides recombinants purifiés aux abeilles à différentes concentrations. Aucune des conditions testées n'a conduit à une forte augmentation des copies d'ARN, notamment de manière comparable aux abeilles inoculées par le virus purifié. L'analyse des abeilles par RT-qPCR sur l'ARN 2 du CBPV montrait des résultats très similaires à ceux obtenus par RT-qPCR sur l'ARN 1. Dans les conditions extrêmes, l'inoculation de 10^9 copies plasmidiques par abeille avait un effet létal sur les abeilles sans même d'augmentation significative du nombre de copie d'ARN.

En revanche, l'ARN polymérase de l'abeille semblait prendre en charge rapidement le promoteur CMV. La comparaison des résultats de RT-qPCR et de PCR quantitative sans étape de transcription inverse, réalisées sur des abeilles juste après inoculation (environ 1 heure après), révélait la présence majoritairement d'ARN transcrits. Ces observations étaient en accord avec celles de (Kunieda and Kubo, 2004). Ces auteurs ont montré que le promoteur CMV peut induire l'expression du gène de la protéine fluorescente verte (GFP) chez les abeilles.

Nos résultats suscitaient l'hypothèse d'une erreur de séquençage du génome du CBPV, pris en référence pour la construction des plasmides (Olivier et al., 2008). Des tests de complémentarité ont alors été réalisés. Nous avons fait un réassortiment du génome du CBPV en mélangeant l'ARN viral purifié sur gel avec l'ARN transcrit *in vitro* à partir du clone pcDNA3. Ces essais nous ont permis aussi d'éprouver le pouvoir infectieux des ARN transcrits *in vitro* à partir des nouveaux vecteurs recombinants. Les résultats préliminaires ont montré que l'inoculation des abeilles avec les ARN 1 et ARN 2 transcrits du pcDNA3 provoquait la multiplication de ces ARN. Ces résultats obtenus par RT-qPCR ciblant l'ARN 2 ont été aussi confirmés en RT-qPCR ARN 1, montrant par la même que les deux ARN se multipliaient dans un rapport équimolaire. Néanmoins, aucun signe clinique n'a été observé.

En comparant la quantité de l'ARN inoculé à J0, nous avons remarqué qu'elle était en moyenne plus faible que celle mesurée chez les abeilles témoins (inoculées avec les ARN viraux purifiés ou avec le virus). Cela pourrait expliquer le fait que la multiplication des ARN n'ait pas pu atteindre la charge 10^{13} copies par abeille. De plus, lors de ces expérimentations, nous n'avons attendu que 5 jours après inoculation. En laissant plus de temps, la charge virale pourrait éventuellement augmenter et conduire à déclencher les signes cliniques de maladie.

Chapitre 3 : Etude fonctionnelle de l'ORF 1 de l'ARN1 du CBPV

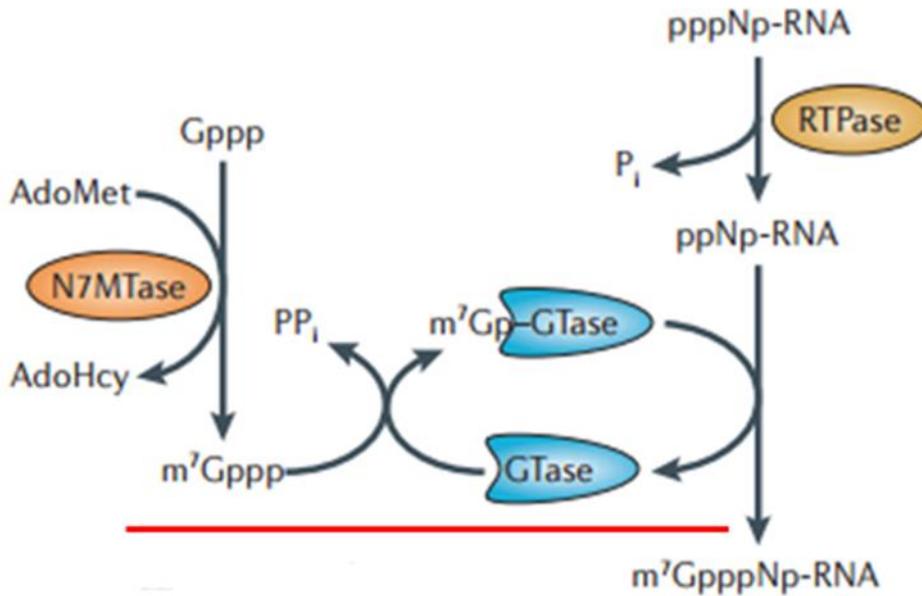
b Alphaviridae-like

Figure 27 : Les différentes réactions enzymatiques pour le coiffage de l'ARN chez les alphavirus. La réaction étudiée par radioactivité lors notre expérience est soulignée en rouge. La GTase réagit avec le α -phosphate du GTP (Gppp), libérant un pyrophosphate (PP_i) et formant une liaison covalente entre l'enzyme et guanosine (Gp-GTase). (Decroly et al., 2012)

Récemment, plusieurs équipes ont montré par analyse de séquences que l'ORF 1 de l'ARN 1 du CBPV coderait pour un domaine Méthyl-Guanylyl transférase (Mtase-Gtase). Celui-ci présente des homologues de séquences avec le domaine MTase-GTase des Alphavirus (Ahola and Karlin, 2015; Kuchibhatla et al., 2014).

Afin de confirmer l'activité MTase-GTase de la protéine codée par l'ORF1 de l'ARN1 du CBPV, nous avons réalisé des essais de production de la protéine entière ou tronquée. Cela nous a permis d'étudier l'activité enzymatique du domaine GTase *in vitro* par mesure de la fixation de l'alpha GTP. En effet la première réaction du coiffage des ARN chez les alphavirus est la formation d'une liaison covalente entre l'enzyme et le GTP (Figure 27) (Decroly et al., 2012).

Ainsi, quatre séquences correspondant à la protéine entière ou à des domaines putatifs de la protéine ont été clonées. Les délétions des séquences N-terminale ou C-terminale de la protéine ont été choisies afin d'éliminer les domaines non désordonnés et/ou des domaines membranaires. Cette analyse prédictive avait été faite grâce au logiciel MeDor (Lieutaud et al., 2008). Chaque domaine a été cloné en fusion avec une séquence codante pour un peptide composé de six histidines (tag 6-His) rajouté soit du côté C-terminal soit à l'extrémité N-terminal. Ainsi, huit séquences ont été clonées pour tenter la production du domaine MTase-GTase prédit. Ces travaux ont été réalisés à Marseille au laboratoire AFMB sous l'encadrement de Dr. Etienne Decroly.

amorce	Séquence	Position	Tag 6-histidines
F_ORF 1 complet_Hist	ggggACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTAAGGAGGTA GAACCATGAAGCATCACCATCACCATCACAATCTTAGCAAT GTCAAT	1 nt	N-terminal
F_ORF 1 complet	ggggACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTAAGGAGGTA GAACCATGAAGAATCTTAGCAATGTCAAT	1 nt	-
R_ORF 1 complet	ggggACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACATCTCTT CTTCGGTG	2557 nt (852 aa)	-
R_ORF 1 complet_Hist	ggggACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTGATGGT GATGGTGATGCATCTCTTCTTCGGTG	2557 nt (852 aa)	C-terminal
F_ORF1_112 aa_Hist	ggggACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTAAGGAGGTA GACCATGAAGCATCACCATCACCATCACCGCACCAGGCACC TTAAG	336 nt (112 aa)	N-terminal
F_ORF1_112 aa	ggggACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTAAGGAGGT AGAACCATGAAGCGCACCAGGCACCTTAAG	336 nt (112 aa)	-
R_ORF 1_548 aa	ggggACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGCTGTTGT CAGGGCAGGC	1643 nt (548 aa)	-
R_ORF 1_548 aa_Hist	ggggACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTGATGGT GATGGTGATGGCTGTTGTCAGGGCAGGC	1643 nt (548 aa)	C-terminal

Tableau 12 : Amorces utilisées pour amplifier les différentes séquences de la protéine codée par l'ORF1 de l'ARN1 du CBPV. La position de l'amorce est relative à la séquence de l'ORF 1 de l'ARN 1 de la souche A79-P. Les nucléotides soulignés indiquent la séquence du tag 6-histidines.

A. Matériel et méthodes

I. Production des protéines recombinantes

1. PCR

Les différentes amorces sens contenaient dans leur partie 5' la séquence de clonage par recombinaison homologue *attB1* (système Gateway, Invitrogen), la séquence Ribosomal Binding Site (RBS), la séquence Kozak et éventuellement les nucléotides correspondant à l'épitope 6-His suivis d'une dizaine de nucléotide correspondant à la séquence de l'ORF1-ARN 1 du CBPV. Les amorces anti-sens contiennent une vingtaine de nucléotides complémentaires à la séquence de l'ORF 1-ARN1 du CBPV, éventuellement les nucléotides correspondant à l'épitope 6-His, un codon stop et la séquence de recombinaison *attB2*. La liste des amorces utilisées est représentée dans le Tableau 12. Afin de limiter le risque de mutation au cours de l'amplification des fragments par PCR, une polymérase haute-fidélité a été utilisée (Platinum® Pfx DNA polymerase, Invitrogen) dans les conditions décrites par le fournisseur.

La PCR a été réalisée dans les conditions suivantes :

- Dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5 minutes
- 35 cycles comprenant :
 - Dénaturation à 94°C pendant 35 secondes
 - Hybridation des amorces à 56°C pendant 30 secondes
 - Elongation à 72 °C pendant 30 secondes à 3 minutes (selon la taille du fragment à amplifier).
- Elongation finale à 72°C pendant 10 minutes

Le poids moléculaires des fragments de PCR a été vérifié après migration des produits de PCR sur gel d'agarose à 1,2 % et coloration au bromure d'éthidium.

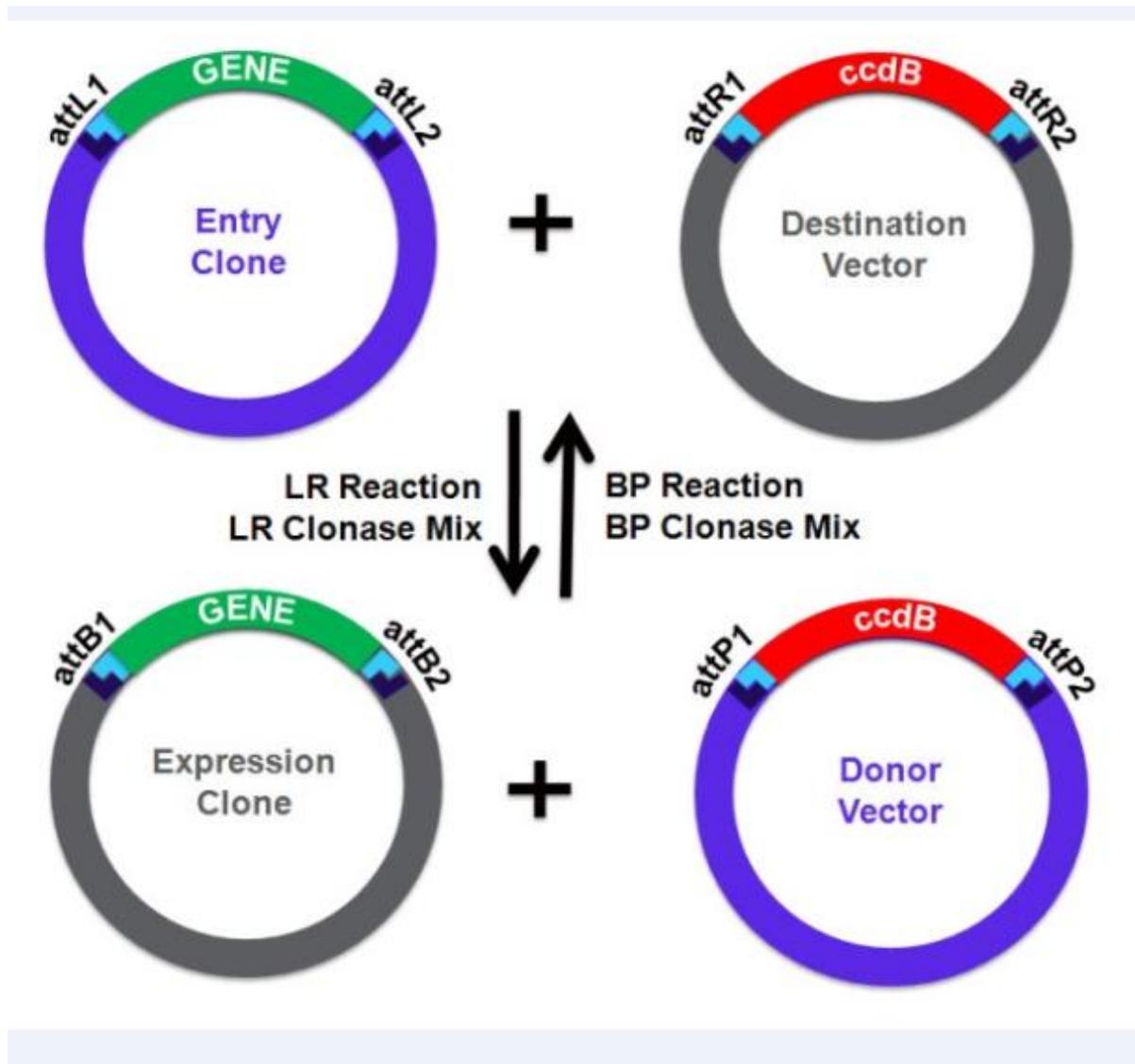


Figure 28 : Les différentes réactions du clonage par recombinaison homologue en système Gateway. (Fontes et al., 2011).

2. Clonage par recombinaison homologue

Les amplicons ont été purifiés à l'aide du kit « QIAquick® PCR Purification kit » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Ces séquences sont clonées par recombinaison homologue dans le vecteur donneur pDONR™201 possédant les séquences de recombinaison *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 perdent leur gène suicide et sont convertis en vecteurs d'entrée contenant les séquences d'intérêt flanquées des sites de recombinaison *attL1* et *attL2* (Figure 27). Après transformation par choc thermique dans les bactéries *E. coli* NEB 5 α , les clones obtenus sur milieu kanamicine ont été utilisés pour purifier les plasmides recombinants à l'aide du kit « QIAprep® Spin Miniprep kit » (Qiagen). La séquence des différents clones a été vérifiée par séquençage (MWG Eurofins).

Les séquences insérées dans les plasmides d'entrée, ont ensuite été transférées dans les plasmides d'expression pDEST™14 (Invitrogen) qui permettent l'expression des protéines (avec le tag 6-His à l'extrémité N- ou C-terminale. Ce plasmide possède les séquences de recombinaison *attR1* et *attR2* et un gène de résistance à l'Ampicilline (Figure 28).

Les séquences d'intérêt ont été insérées de manière directionnelle grâce à l'enzyme LR clonase (Gateway® LR Clonase™ Enzyme mix, Invitrogen). Enfin, après transformation dans les bactéries *E. coli* NEB 5 α , les clones obtenus (clones LR) ont été sélectionnés sur milieu gélosé LB-agar en présence de 100 μ g/ml d'ampicilline et 17 μ g/ μ l de chloramphénicol et validés par analyse du profil de restriction enzymatique et par séquençage de la région insérée en aval de la séquence *attB1*.

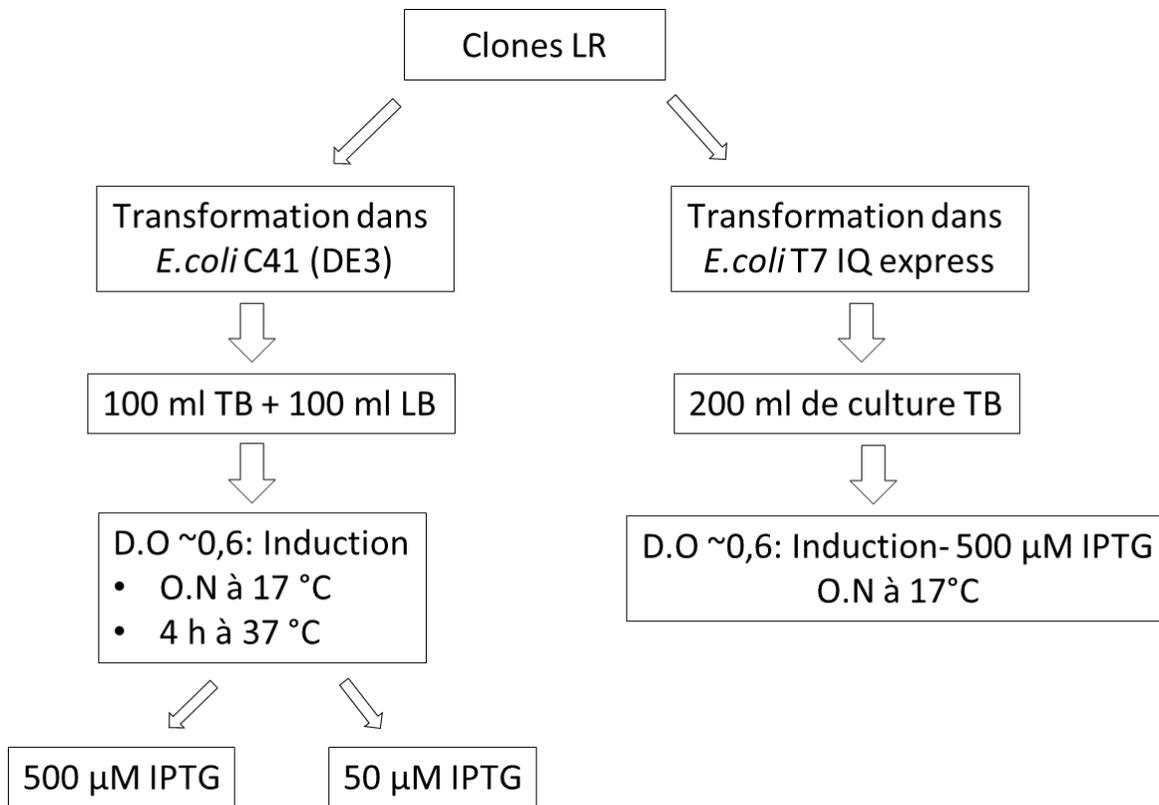


Figure 29: Expression des protéines selon les différentes conditions.

3. Expression de protéines

Les différentes étapes réalisées pour l'expression de la protéine codée par l'ORF-1 de l'ARN1 sont illustrées dans la Figure 29. Les plasmides recombinants issus des clones LR sélectionnés ont été purifiés et utilisés pour transformer différentes souches d'*E. coli* : OverExpress™ C41(DE3) (Sigma-Aldrich) et T7 Express lq Competent *E. coli* (New England Biolabs) par choc thermique. Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur milieu gélosé LB-agar en présence de 100 µg/ml d'ampicilline et 17 µg/µl de chloramphénicol. Plusieurs colonies ont été cultivées dans 100 ml du LB ou du TB en présence de 100 µg/ml d'ampicilline et 17 µg/µl de chloramphénicol (à 37°C jusqu'à atteindre une DO (600 nm) comprise entre 0,6 et 0,7. L'induction de la transcription couplée à la synthèse protéique s'effectue par l'ajout d'IPTG (iso-propanyl-β-D-Thio-galactopyranoside). Deux concentrations d'IPTG ont été testées (50 µM et 500 µM) afin de rechercher les conditions optimales d'induction. Les cultures bactériennes sont incubées soit à 17°C pendant une nuit ou à 37°C pendant 4 heures. Une fois l'incubation terminée, la DO (600 nm) est contrôlée et les bactéries sont sédimentées par centrifugation à 4.000 x g pendant 10 min.

4. Purification par chromatographie d'affinité

Les culots bactériens sont lysés dans un tampon contenant 50 mM Hepes (pH 7,5), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 100 mM DTT, 10 µg/ml DNase, et 0,25 mg/ml de lysosyme. Après resuspension du culot, 1% (v/v) de Triton X 100 est rajouté et le lysat est incubé à 4°C pendant 30 min. Les protéines sont solubilisées en utilisant le tampon BugBuster® 10x (Merck Millipore) selon les recommandations du fabricant. Le lysat (100 µl) est incubé pendant 30 min à 4°C sous agitation rotative, puis clarifié par centrifugation à 24.000 rpm pendant 30 min. Le surnageant (fraction soluble des protéines) est incubé avec 600 µl de billes de résines chargée de cobalt (Thermo Fisher Scientific) pendant 30 min à 4°C.

Les protéines portant le tag 6-His sont retenues par affinité pour les billes de cobalts. Les protéines non fixées sont éliminées par 2 lavages successifs des colonnes avec 10 ml du tampon contenant 50 mM Hepes (pH 7,5), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 0,5

mM DTT et 5 mM MgCl₂. Ce tampon de lavage contient 500 mM de NaCl afin d'éliminer les ARN qui pourraient être co-purifiés avec la protéine d'intérêt. Les protéines sont éluées (3 fractions) en tampon 50 mM Hepes (pH 7,5), 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, 0,5 mM DTT et 5 mM MgCl₂.

Les protéines des fractions solubles, totales (élutions 1, 2 et 3) ont été concentrées par différentes centrifugations tangentielles à 13.000 x g (soit sur membranes de celluloses d'une porosité de 30 kDa soit de 3 kDa). Le tampon était composé de 50 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5 mM DTT.

Après concentration, les protéines ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12% contenant 0.1 % SDS (SDS-PAGE) après coloration au bleu de Coomassie.

II. Synthèse de protéines marquées à la méthionine S35

La transcription et la traduction *in vitro* des différents domaines de l'ORF-1 ont été réalisées à l'aide du kit « TNT T7 insect cell extract protein expression system » contenant des lysats cellulaire des cellules d'insecte SF9 (Promega), en suivant le protocole du fournisseur. Le marquage isotopique des protéines néoformées a été obtenu en utilisant la méthionine S³⁵ radioactive (EasyTag™ L-[³⁵S]-Methionine, 500 µCi, PerkinElmer).

III. Western blot

Les protéines concentrées sont séparées en SDS-PAGE. Des marqueurs de poids moléculaires « Prestain protein ladder PAGE ruler » et « His-tag protein ladder » (Thermo Fisher Scientific) ont été utilisées en contrôles. Les membranes de transfert en nitrocellulose de 0,1 µm ont été équilibrés dans le tampon de transfert TBS contenant, 25 mM Tris, 250 mM glycine et 20% d'éthanol. Puis les protéines ont été transférées en conditions semi-seches à 90 volts pendant 1 heure.

Après le transfert, les membranes ont été saturées dans un milieu TBST contenant 25 mM Tris, 15 mM NaCl (pH 7,2), tween 0,05 % final, 25 mg/ml d'albumine sérique de

bovins à température ambiante pendant 1 heure et sous agitation. La membrane est lavée deux fois en tampon TBST pendant 10 min. Ensuite la membrane est incubée en tampon de saturation supplémenté par un anticorps anti-histidine couplé à la phosphatase alcaline « Penta-His-HRP conjugué » (Quiagen) diluée à 1/5000, pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. La membrane est ensuite lavée trois fois en tampon TBST (10 min /lavage).

Afin de révéler les complexes protéines/conjugués par chémifluorescence, la membrane est couverte par 2 ml de la solution « Luminata Crescendo Western HRP substrate » (Millipore) et incubée pendant 10 min à température ambiante. Enfin, les protéines portant les épitopes 6 histidines sont détectées à l'aide d'une caméra CCD à haute résolution (MyECL imager, thermofisher).

IV. Etude l'activité GTase par mesure de la fixation de l'alpha GTP (GTase-GMP)

Nous avons recherché l'activité GTase porté par les différentes protéines codées par l'ARN1 de l'ORF1 en recherchant la formation d'une liaison covalente entre le site catalytique de l'enzyme GTP guanylyltransferase (GTase) et des molécules de GMP en incubant les enzymes en présence d'alpha 32P Guanosine 5'-triphosphate (GTP) et de SAM.

Un mélange réactionnel (volume finale de 10 µl) est préparé à partir de 2 à 3 µg protéine d'intérêt, 80 mM Tris pH 8,0, 2 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 5 µCi [alpha-P32] GTP (PerkinElmer) et complété ou non de 20 µM de S-adenosyl-méthionine (SAM, donneur d'un groupement méthyl). Deux contrôles positifs (enzymes : GTase du virus de la vaccine : VVD1 et VV) ont été aussi utilisés. La réaction est incubée à 37°C pendant 15 min. Les produits des réactions sont séparés par électrophorèse sur un gel polyacrylamide 10% puis révélés par autoradiographie.

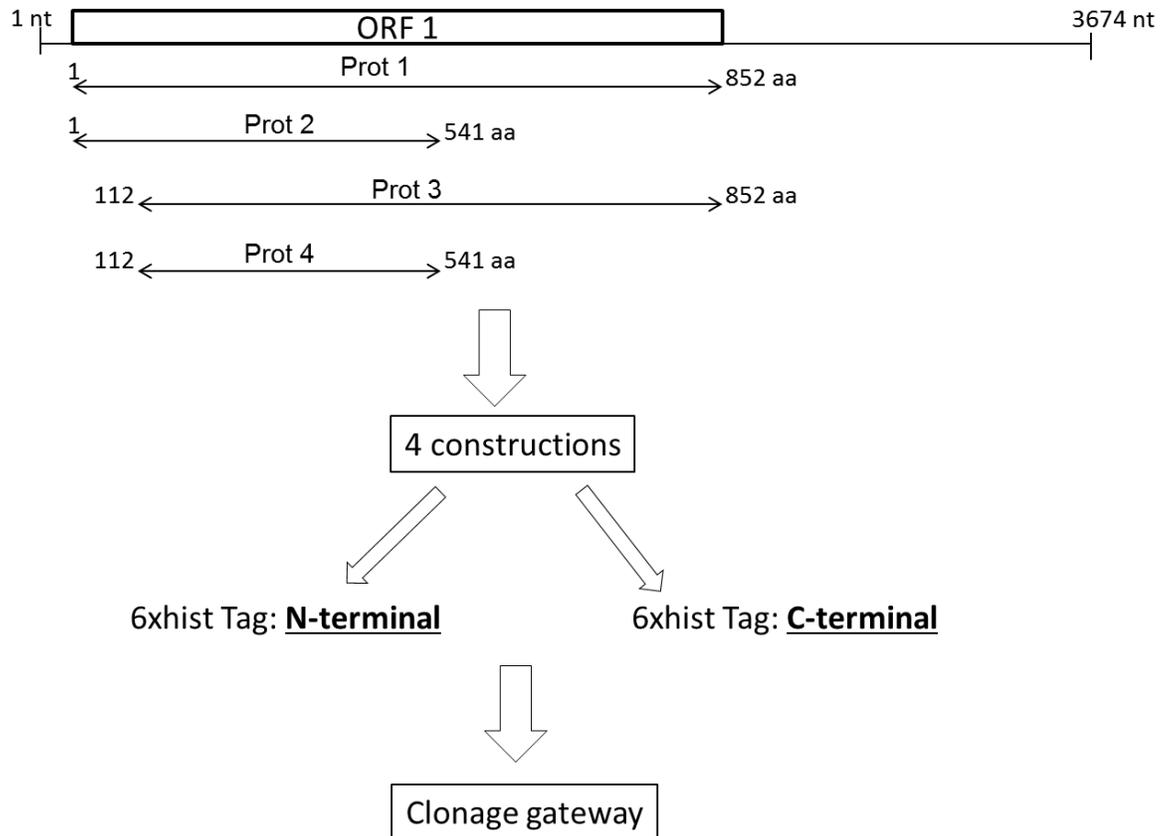
ARN 1 CBPV:

Figure 30 : Schéma montrant les différentes séquences identifiées pour le clonage. Prot 1 correspond à la séquence entière de l'ORF 1 de l'ARN 1 du CBPV, Prot 2- Prot 3 et Prot 4 correspond à la forme tronquée de l'ORF 1. Pour chaque construction, on rajoute un tag-6xhistidine soit du côté N-terminal soit du côté C-terminal. Par conséquent on aura huit séquences à cloner en utilisant le système gateway.

B. Résultats

Les séquences d'intérêts de l'ORF 1 de l'ARN 1 du CBPV ont été déterminées par une analyse prédictive avec le logiciel Medor. En effet, cette analyse a montré que la région entre l'acide aminé 94 et l'acide aminé 112 correspond à un domaine transmembranaire, pour cela nous avons fait des constructions sans cette partie. De même, cette analyse montre une région désordonnée à partir de l'acide aminé 541 jusqu'à la fin de la séquence, ainsi deux constructions de la protéine tronquées ont été faites en éliminant cette région. Par la suite nous avons amplifié les différents domaines par PCR à l'aide des amorces du tableau 12. Un épitope 6-His a été rajouté en N ou en C terminal des domaines et les gènes ont été clonés dans des vecteurs d'expression bactériens utilisant la technologie « Gateway » (Figure 30).

I. Clonage Gateway

Durant ce travail, les séquences correspondantes au domaine MTase-GTase putative du CBPV (entière et tronquée) ont été clonées dans un vecteur d'expression par recombinaison via le système « Gateway ». Ce système permet de cloner facilement et rapidement la séquence d'intérêt dans une grande variété de systèmes d'expression et ainsi d'avoir la possibilité d'exprimer les protéines dans différents systèmes cellulaires. Dans cette étude, le vecteur d'expression utilisé était le plasmide pDEST 14 qui est spécifique au système d'expression bactérien.

Les 8 plasmides recombinants portant les séquences (de la protéine complète ou tronquée, marquée à l'extrémité N- ou C-terminale) ont été vérifiés par digestion enzymatique et par séquençage.

II. Expression protéiques

Afin de d'identifier les conditions expérimentales permettant l'expression des protéines, plusieurs conditions ont été testées :

- deux souches bactériennes : *E. coli* C41 et *E. coli* IQ T7 express ;
- deux milieux de culture : TB et LB ;
- deux concentrations d'induction à l'IPTG (50 et 500 μ M) ;
- et trois conditions d'incubation des bactéries pour la production des protéines :
 - o à 17°C toute la nuit ;
 - o à 37°C pendant 4h ;
 - o et incubation à 4°C pendant 1 heure après l'induction et ensuite à 17°C pendant la nuit.
- Modification du tampon de la lyse (changement de la concentration d'imidazole, changement de la concentration en sels, ajout de Triton X 100) ;
- Modification du tampon d'éluion (changement de la concentration en sels)

Malgré de toutes ces conditions testées pour les 8 clones, aucun profil d'électrophorèse ne montrait la production spécifique de la protéine (avec ou sans purification). Dans le cas de la protéine entière, des peptides qui pouvaient correspondre à un éventuel clivage de la protéine étaient détectés. Dans les autres cas, des bandes non spécifiques ont été détectées dans la fraction soluble de la protéine.

III. Formation de la liaison covalente GTase-GP

Bien que lors des tests d'expression en bactérie, aucune protéine correspondant aux protéines complètes n'ait été observée, nous avons détecté la présence de bandes qui pourraient correspondre à des fragments des protéines. Nous avons donc tenté de rechercher si un de ces fragments pourrait porter les domaines GTase et MTase. Pour cela, la formation de la liaison covalente entre l'enzyme et une molécule de GMP a été recherchée en incubant les *élutions de colonnes de cobalts avec du GTP* marqué.

L'[alpha-P32] GTP a été utilisé pour détecter la liaison de la guanidine mono phosphate (Gp) au domaine catalytique GTase pour former la GTase-Gp (Figure 19). De plus, la réaction a été également réalisée en présence du donneur du groupement méthyl (SAM) afin d'évaluer la capacité du domaine catalytique à se lier au ^{N7}Gp.

Aucune liaison n'a été détectée après séparation des produits de la réaction sur gel d'électrophorèse des protéines et révélation par autoradiographie.

IV. Analyse Western blot

La liaison entre l'enzyme et le GTP n'ayant pas été détectée, une vérification de la présence des protéines d'intérêt marquées par un tag 6-His a été faite par Western blot. Le conjugué anti-Histidine n'a permis de révéler aucun peptide portant le tag 6-Hist.

V. Transcription/Traduction in vitro

Par la suite, une transcription et une traduction *in vitro* a été réalisée en utilisant les différents plasmides obtenus dont les deux plasmides recombinants (pcDNA3) portant la séquence entière de l'ARN 1 et de l'ARN 2 afin de regarder le profil protéique issu de ces deux segments génomiques. Les protéines ont été marquées à la Méthionine S³⁵ et ont été révélées par autoradiographie. Bien que le témoin positif (la luciférase) ait été détecté, aucune autre protéine traduite à partir de ces plasmides n'a été observée.

C. Discussion :

Durant cette études, je me suis intéressé à l'activité MTase-GTase prédite par analyse d'homologies de séquences (Ahola and Karlin, 2015; Kuchibhatla et al., 2014). Les auteurs avaient prédit que le domaine porté par l'ORF 1 de l'ARN 1 du CBPV ressemblait au domaine MTase-GTase des Alphavirus.

Dans le but de mieux caractériser ce domaine catalytique impliqué dans la formation de la coiffe, la formation de la liaison entre l'enzyme et le GTP a été recherchée *in vitro* en présence et en absence du donneur du groupement méthyl (le SAM). En effet, plusieurs processus de coiffage ont été précédemment décrits : le processus conventionnel (pour la plupart des virus d'eucaryotes) et un non conventionnel notamment décrit chez les Alphavirus (Decroly et al., 2012). Ainsi, l'addition ou l'absence de SAM devait permettre de conclure sur la présence de l'une de ces activités GTase et MTase. La Figure 27 indique le mécanisme de synthèse des structures coiffe chez les Alphavirus. Dans une première étape l'enzyme de « capping » recrute le GTP et méthyle la position N7 du GTP en présence d'une molécule de S-adenosyl-méthionine SAM. Par la suite, après hydrolyse du GTP, la GTase forme un lien covalent avec la molécule de ^{N7}GMP. Ce mécanisme contraste avec le mécanisme « canonique de formation de la coiffe, dans lequel on observe un lien covalent GMP-GTase en absence de méthylation du GTP.

Huit séquences de l'ORF1 ont été clonées dans le vecteur d'expression bactérien pDEST14. Aucune protéine entière n'a pu être purifiée. Cela a été confirmé par l'analyse en Western blot. L'absence de réactivité enzymatique testée *in vitro* suggère que les peptides purifiés ne contenaient pas le domaine de la GTase. Ainsi, les résultats indiqueraient que les bandes observées sur gel correspondaient à des contaminants bactériens.

Bien qu'aucune protéine n'ait été purifiée malgré tous les essais d'optimisation des conditions d'expression protéique, les clones obtenus représentent un nouveau matériel et un outil pour poursuivre cette étude.

Afin de réaliser la traduction *in vitro*, un Kit commercial composé des lysats acellulaires des cellules d'insecte SF9 complété par tous les éléments nécessaires à la transcription et la traduction a été utilisé. Toutefois, ce kit recommande l'utilisation de plasmides différents de ceux que nous avons utilisés pour le clonage (pDEST14 ou pcDNA3). Les vecteurs recommandés contiennent la région 5'-UTR du gène polyhedrine du *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus (MnNPV) du côté N-terminal. Du côté C-terminal, ils contiennent une queue poly-A. En effet, il a été montré l'augmentation de l'efficacité de la traduction en utilisant ces vecteurs (Ezure et al., 2006; Suzuki et al., 2006). Par conséquent, cela pourrait expliquer l'échec de la traduction *in vitro* des protéines issues des clones pcDNA3 et pDEST 14. Ces derniers ne contiennent ni la région 5'-UTR polyhedrine ni la queue poly-A.

Partie 3 : Conclusions générales et perspectives

Le CBPV est un virus mondialement répandu, responsable d'une maladie infectieuse et contagieuse chez les abeilles. Cette maladie est marquée par des signes cliniques bien décrits : tremblements, dépilation, incapacité à voler qui conduit à la mortalité des abeilles. Depuis sa découverte en 1963, plusieurs études ont été menées afin de mieux caractériser ce virus. Cependant, les éléments constitutifs du virus et le mécanisme d'infection ainsi que les facteurs de virulence ne sont encore que partiellement décrits.

Cette thèse menée au sein de l'unité pathologie de l'abeille, Anses, Sophia-Antipolis en collaboration avec différentes équipes de recherche (INRA de Jouy-en-Josas et CNRS de Marseille), avait pour but d'apporter des connaissances fondamentales supplémentaires sur le CBPV. Mon travail a porté plus particulièrement sur l'étude du pouvoir infectieux des ARN majoritaires, ainsi que sur le clonage du génome viral et sur le développement d'un système de génétique inverse dans le but de mieux caractériser ce virus.

Ce dernier chapitre présente les conclusions générales sur les résultats acquis. Il ouvre également des perspectives afin de poursuivre les travaux initiés lors de cette étude.

A. Pouvoir infectieux des ARN majoritaires du CBPV

En l'absence de culture cellulaire permettant d'étudier la réplication *in vitro* des virus d'abeille, les expérimentations ont été réalisées *in vivo*, par des injections intrathoraciques.

Afin de définir les éléments génétiques essentiels à la réplication du CBPV, nous avons inoculé des abeilles avec 10^9 copies d'ARN majoritaire du CBPV purifié sur gel. Nous avons observé les signes cliniques de la maladie 6 jours après inoculation. Par des RT-qPCR ciblant les deux segments d'ARN, nous avons montré l'augmentation du nombre de copie d'ARN viral. Des particules virales identiques au CBPV ont été visualisées par microscopie électronique. Ces résultats confirment la réplication du génome, la traduction des protéines virales et l'assemblage en virions.

En 1982, Overton et ses collaborateurs ont décrit que le génome du CBPV contenait cinq fragments d'ARN simple brin dont les deux majeurs ont été complètement séquencés 26 années plus tard (Olivier et al., 2008). Les 3 fragments minoritaires : ARN 3a, 3b et 3c, qui semblaient posséder une taille de 1.100 nt chacun, n'ont pas été visualisés lors du séquençage du génome du CBPV. Ces ARN minoritaires n'ont pas été visualisés par électrophorèse des ARN viraux, et n'étaient pas présents dans la banque d'ADNc. En complément des résultats obtenus par inoculation des deux ARN, il serait intéressant de déterminer si les ARN minoritaires, décrits par Overton (Overton et al., 1982) ne correspondraient pas à des ARN subgénomiques. La caractérisation de ces petits ARN pourrait être faite par Northern blot après la transfection du virus à des cellules qui permettraient la réplication virale. Ceci renforce l'intérêt d'identifier un modèle cellulaire pour cette étude mais aussi dans la perspective d'études complémentaires sur la réplication du CBPV.

B. Recherche du modèle cellulaire pour la réplication du CBPV *in vitro*

Toutes les études moléculaires du CBPV sont faites *in vivo*, sur les abeilles adultes. Cependant, ces expérimentations sont limitées par la disponibilité des abeilles (saison apicole ou utilisation d'un rucher hivernal) et leur statut sanitaire (risque de contaminations par différents virus et d'autres pathogènes de l'abeille).

Récemment, des cellules embryonnaires d'abeille nommé AME-711 ont été décrites (Goblirsch et al., 2013). J'ai entretenu des échanges pour recevoir et cultiver ces cellules dans l'objectif d'évaluer leur sensibilité voire permissivité au CBPV. Cela permettrait d'étudier *in vitro* le CBPV, une méthode beaucoup plus simple et efficace qu'*in vivo* (sur abeilles).

La mise en culture de ces cellules au sein du laboratoire a été un échec. Après confrontation de nos résultats avec ceux de l'équipe qui a créé cette lignée cellulaire, nous avons identifié que le problème n'est pas lié à une contamination ou toxicité du milieu préparé au laboratoire, mais plutôt soit au lot de cellules conservé par congélation qui était non satisfaisant, soit à la sensibilité de ces cellules à la décongélation.

Dans l'objectif de contourner ce problème, il serait envisageable de réaliser la mise en primo-culture de ces cellules au laboratoire de Sophia-Antipolis selon la technique développée par Golbrish et al. En poursuivant la collaboration avec cette équipe, et si besoin envisagé un séjour dans ce laboratoire.

Afin de compenser le manque de cultures de cellules d'abeille, il serait intéressant d'étudier la réplication virale dans des cellules d'autres insectes afin de trouver des cellules permissives pour le CBPV. La capacité du génome à se répliquer et à former des particules virales pourrait être suivie par RT-PCR en temps réel, RT-PCR dirigée contre l'ARN viral négatif, microscopie électronique et immunofluorescence.

C. Clonage du génome du CBPV

Suite aux résultats obtenus concernant le pouvoir infectieux des ARN majoritaires, nous avons réalisé plusieurs clonages des deux segments ARN 1 et ARN 2 du CBPV selon deux stratégies :

1. clonage dans un vecteur portant le promoteur procaryote, permettant d'inoculer les ARN transcrits *in vitro* aux abeilles ;
2. clonage dans un vecteur ayant un promoteur eucaryote, afin d'inoculer les plasmides recombinants directement aux abeilles.

Le clonage des séquences homologues aux ARN majoritaires du CBPV dans le vecteur bactérien puC57 n'a pas permis de produire d'ARN (coiffée ou non) infectieux chez l'abeille. Les séquences homologues aux ARN majoritaires du CBPV ont alors été clonées dans le vecteur pcDNA3 qui contient le promoteur eucaryote CMV et le promoteur bactérien T7.

Tout d'abord nous avons inoculé les plasmides recombinants contenant l'ADNc 1 et l'ADNc 2 du CBPV aux abeilles en testant différentes concentrations. Aucune d'elles n'a provoqué les signes cliniques de la paralysie chronique ni montré une réplication des ARN transcrits similaire à celle obtenues après l'inoculation des ARN viraux ou avec le virus purifié.

L'hypothèse a été soulevée d'une erreur dans la séquence du CBPV prise comme référence au clonage du génome (Olivier et al., 2008). Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons réalisé des tests de complémentation des ARN viraux purifiés et des ARN transcrits *in vitro*, en testant aussi le pouvoir infectieux ARN transcrits *in vitro* issu du clone pcDNA3.

Nous avons montré que les ARN transcrits *in vitro* provoquaient une augmentation du nombre de copies d'ARN par abeille après 5 jours d'inoculation. Ces résultats semblent rejeter l'hypothèse d'une mutation dans la séquence clonée. Ainsi, ils valideraient, dans un premier temps, la validité du système de génétique inverse. Une reproductibilité de l'expérience en optimisant les conditions comme la durée de l'expérimentation sur abeille (supérieure à 5 jours), la concentration inoculée des ARN transcrits, le coiffage des ARN transcrits, serait nécessaire pour confirmer ces résultats préliminaires. Par conséquent, ce système permettrait de mieux étudier le génome du CBPV par mutagenèse dirigée, faciliter l'étude des ORF, définir les fonctions des protéines virales voire permettre la production d'anticorps monoclonaux afin de développer un test rapide de diagnostic pour le CBPV.

Grâce aux plasmides recombinants, les protéines structurales et non structurales pourraient être taguées et suivies dans les compartiments cellulaires et dans le virion. Le marquage des protéines du virion pourrait également constituer un outil d'étude de la localisation des particules chez l'abeille.

La production de l'ARN polymérase du CBPV suivrait un mécanisme de frameshift entre l'ORF 1 et l'ORF3 de l'ARN 1. Afin d'élucider ce mécanisme de traduction, les ORF putatifs du CBPV pourraient être substitués par un gène rapporteur (exemple luciférase). Les séquences chimères serviraient à la production d'ARN qui seraient soit injectés à des abeilles soit transfectées dans des cellules permissives d'insecte. En plus, le site catalytique de l'ARN polymérase du CBPV pourrait être modifié par mutagenèse dirigée, puis injecté aux abeilles avec le transcrit obtenu en complément de l'ARN 2 afin de voir si la réplication virale et la production des particules infectieuses sont maintenues.

Les protéines structurales, quant à elles, sont codées par l'ARN 2 du CBPV (Chevin et al., 2015). Il est d'un intérêt majeur de produire ces protéines à partir du plasmide recombinant contenant la séquence homologue à l'ARN 2 du CBPV. Ces dernières (isolées ou assemblées en particules virales) seraient purifiées pour la production d'anticorps monoclonaux qui pourraient être utilisés à des fins de diagnostic rapide pour le CBPV.

Les symptômes d'une infection par le CBPV sont variés et les facteurs de la virulence ne sont pas connus. Le séquençage des génomes de différentes souches de CBPV permettrait orienter vers les mutations associées à la virulence. Celles-ci seraient évaluées par mutation dirigée à partir des clones infectieux.

D. Etude du domaine MTase-GTase codée par l'ARN 1 du CBPV

Récemment, des analyses d'homologies de séquences (Ahola and Karlin, 2015; Kuchibhatla et al., 2014) ont mis en évidence la présence putative d'un domaine de MTase-GTase codé par l'ORF 1 de l'ARN 1 du CBPV, qui est homologue à celui retrouvé chez les Alphavirus. Afin de vérifier l'activité de ce domaine, nous avons cloné par recombinaison homologue la protéine correspondante à ce domaine sous forme entière et tronquée. Après la production de la protéine recombinante, nous avons étudié la formation de la liaison covalente entre l'enzyme et le GTP radioactif.

Malgré tous les essais d'optimisation des conditions de purification et d'expression, nous n'avons pas réussi à poursuivre nos expériences. Le rajout d'un tag de solubilisation à l'extrémité N-terminale paraît nécessaire pour aider à l'expression de la protéine. De plus, un screening à grande échelle, pour trouver les bonnes conditions de l'expression de la protéine serait essentiel. Cela peut être fait en ciblant différents systèmes d'expression bactériens ou autre comme le système cellules d'insecte/baculovirus, en testant différentes conditions d'expression, notamment en variant les tampons utilisés pour la purification de la protéine. Cela permettrait d'enrichir les connaissances fondamentales sur le mécanisme de réplication du CBPV.

Références Bibliographiques

- Adams J. R. and Bonami J. R., 1991. Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca Raton.<2009_Gallai et al_estimation pollination.pdf>.
- Ahola, T., Karlin, D.G., 2015. Sequence analysis reveals a conserved extension in the capping enzyme of the alphavirus supergroup, and a homologous domain in nodaviruses. Biol Direct 10, 16.
- Almazan, F., Dediego, M.L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuniga, S., Alonso, S., Moreno, J.L., Nogales, A., Capiscol, C., Enjuanes, L., 2006. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. J Virol 80, 10900-10906.
- Almazan, F., DeDiego, M.L., Sola, I., Zuniga, S., Nieto-Torres, J.L., Marquez-Jurado, S., Andres, G., Enjuanes, L., 2013. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. MBio 4, e00650-00613.
- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L., 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. J Virol 78, 12683-12688.
- Bahuon, C., Despres, P., Pardigon, N., Panthier, J.J., Cordonnier, N., Lowenski, S., Richardson, J., Zientara, S., Lecollinet, S., 2012. IS-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus. PLoS One 7, e47666.
- Bailey, L., 1965. Paralysis of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. J. Invert. Pathol 7, 132-140.
- 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., 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). Virol 21, 390-395.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D., 1968. The purification and properties of chronic bee-paralysis virus. J. Gen. Virol 2, 251-260.
- Balint, A., Farsang, A., Zadori, Z., Hornyak, A., Dencso, L., Almazan, F., Enjuanes, L., Belak, S., 2012. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. J Virol 86, 6258-6267.

- Ball, B.V., 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., Bailey, L. 1997. Viruses, In: Morse, R.A., Flottum, K. (Eds.) *Honey bee pests, predators, & diseases*. A.I. Root Company, Medina, 11-32.
- Becher, M.A., Osborne, J.L., Thorbek, P., Kennedy, P.J., Grimm, V., 2013. Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. *J Appl Ecol* 50, 868-880.
- Bergem, M., Norberg, K., Aamodt, R.M., 2006. Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. *BMC Dev Biol* 6, 17.
- Biacchesi, S., 2011. The reverse genetics applied to fish RNA viruses. *Vet Res* 42, 12.
- Blackburn, R.V., Racaniello, V.R., Righthand, V.F., 1992. Construction of an infectious cDNA clone of echovirus 6. *Virus Res* 22, 71-78.
- 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.
- Blaney, J.E., Jr., Hanson, C.T., Firestone, C.Y., Hanley, K.A., Murphy, B.R., Whitehead, S.S., 2004. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg* 71, 811-821.
- Bredenbeek, P.J., Kooi, E.A., Lindenbach, B., Huijkman, N., Rice, C.M., Spaan, W.J., 2003. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol* 84, 1261-1268.
- Brierley, I., 1995. Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J. Gen. Virol* 76 (Pt 8), 1885-1892.
- Brutscher, L.M., Daughenbaugh, K.F., Flenniken, M.L., 2015. Antiviral Defense Mechanisms in Honey Bees. *Curr Opin Insect Sci* 10, 71-82.
- Campbell, M.S., Pletnev, A.G., 2000. Infectious cDNA clones of Langkat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence. *Virology* 269, 225-237.
- 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 Res* 133, 280-284.

- Chauzat, M.P., Faucon, J.P., 2007. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Management Science* 63, 1100-1106.
- Chauzat, M.P., Faucon, J.P., Martel, A.C., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M., 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology* 99, 253-262.
- Chen, L., Gui, C., Luo, X., Yang, Q., Gunther, S., Scandella, E., Drosten, C., Bai, D., He, X., Ludewig, B., Chen, J., Luo, H., Yang, Y., Yang, Y., Zou, J., Thiel, V., Chen, K., Shen, J., Shen, X., Jiang, H., 2005a. Cinanserin is an inhibitor of the 3C-like proteinase of severe acute respiratory syndrome coronavirus and strongly reduces virus replication in vitro. *J Virol* 79, 7095-7103.
- Chen, L.J., Su, Y.C., Hong, J.R., 2009. Betanodavirus non-structural protein B1: A novel anti-necrotic death factor that modulates cell death in early replication cycle in fish cells. *Virology* 385, 444-454.
- Chen, W., Kawano, H., Men, R., Clark, D., Lai, C.J., 1995. Construction of intertypic chimeric dengue viruses exhibiting type 3 antigenicity and neurovirulence for mice. *J Virol* 69, 5186-5190.
- Chen, Y., Pettis, J.S., Feldlaufer, M.F., 2005b. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J. Invertebr. Pathol* 90, 118-121.
- Chevin, A., Coutard, B., Blanchard, P., Dabert-Gay, A.S., Ribiere-Chabert, M., Thiery, R., 2015. Characterisation of Structural Proteins from Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) Using Mass Spectrometry. *Viruses* 7, 3329-3344.
- Chevin, A., Schurr, F., Blanchard, P., Thiery, R., Ribiere, M., 2012. Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): Infectivity of naked CBPV RNAs. *Virus Research* 167, 173-178.
- Cohen, J.I., Ticehurst, J.R., Feinstone, S.M., Rosenblum, B., Purcell, R.H., 1987. Hepatitis A virus cDNA and its RNA transcripts are infectious in cell culture. *J Virol* 61, 3035-3039.
- Coley, S.E., Lavi, E., Sawicki, S.G., Fu, L., Schelle, B., Karl, N., Siddell, S.G., Thiel, V., 2005. Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J Virol* 79, 3097-3106.
- Cook, S., Chung, B.Y., Bass, D., Moureau, G., Tang, S., McAlister, E., Culverwell, C.L., Glucksman, E., Wang, H., Brown, T.D., Gould, E.A., Harbach, R.E., de Lamballerie, X., Firth, A.E., 2013. Novel virus discovery and genome reconstruction from field RNA samples reveals highly divergent viruses in dipteran hosts. *PLoS One* 8, e80720.

- Dasmahapatra, B., Dasgupta, R., Saunders, K., Selling, B., Gallagher, T., Kaesberg, P., 1986. Infectious RNA derived by transcription from cloned cDNA copies of the genomic RNA of an insect virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 63-66.
- de Miranda, J.R., Cordoni, G., Budge, G., 2010a. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology* 103.
- 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.). *Journal of General Virology* 91, 2524-2530.
- 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.
- Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J., Canard, B., 2012. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol* 10, 51-65.
- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., Pennacchio, F., 2016. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3203-3208.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, J., Evans, J.D., Chen, Y., 2011. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology* 92, 151-155.
- Dreher, T.W., Miller, W.A., 2006. Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology* 344, 185-197.
- Dridi, M., Van Den Berg, T., Lecollinet, S., Lambrecht, B., 2015. Evaluation of the pathogenicity of West Nile virus (WNV) lineage 2 strains in a SPF chicken model of infection: NS3-249Pro mutation is neither sufficient nor necessary for conferring virulence. *Vet Res* 46, 130.
- Ezure, T., Suzuki, T., Higashide, S., Shintani, E., Endo, K., Kobayashi, S., Shikata, M., Ito, M., Tanimizu, K., Nishimura, O., 2006. Cell-free protein synthesis system prepared from insect cells by freeze-thawing. *Biotechnol Prog* 22, 1570-1577.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., 2005. *Virus Taxonomy, eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, London.
- Fett, C., DeDiego, M.L., Regla-Nava, J.A., Enjuanes, L., Perlman, S., 2013. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal

- respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J Virol* 87, 6551-6559.
- Flatz, L., Bergthaler, A., de la Torre, J.C., Pinschewer, D.D., 2006. Recovery of an arenavirus entirely from RNA polymerase I/II-driven cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4663-4668.
- Galan, C., Sola, I., Nogales, A., Thomas, B., Akoulitchev, A., Enjuanes, L., Almazan, F., 2009. Host cell proteins interacting with the 3' end of TGEV coronavirus genome influence virus replication. *Virology* 391, 304-314.
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68, 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.
- Gauthier, L., Cornman, S., Hartmann, U., Cousserans, F., Evans, J.D., de Miranda, J.R., Neumann, P., 2015. The *Apis mellifera* Filamentous Virus Genome. *Viruses* 7, 3798-3815.
- Ge, F., Luo, Y., Liew, P.X., Hung, E., 2007. Derivation of a novel SARS-coronavirus replicon cell line and its application for anti-SARS drug screening. *Virology* 360, 150-158.
- 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.
- Goblirsch, M.J., Spivak, M.S., Kurtti, T.J., 2013. A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues. *PLoS One* 8, e69831.
- 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. *Virology* 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.
- Gritsun, T.S., Gould, E.A., 1998. Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. *J Virol Methods* 76, 109-120.

- Gritsun, T.S., Gould, E.A., 2007. Origin and evolution of flavivirus 5'UTRs and panhandles: trans-terminal duplications? *Virology* 366, 8-15.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Hobom, G., Webster, R.G., Kawaoka, Y., 2000. "Ambisense" approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology* 267, 310-317.
- Hotard, A.L., Shaikh, F.Y., Lee, S., Yan, D., Teng, M.N., Plemper, R.K., Crowe, J.E., Jr., Moore, M.L., 2012. A stabilized respiratory syncytial virus reverse genetics system amenable to recombination-mediated mutagenesis. *Virology* 434, 129-136.
- Inoue, T., Yamaguchi, S., Saeki, T., Sekiguchi, K., 1990. Production of infectious swine vesicular disease virus from cloned cDNA in mammalian cells. *J Gen Virol* 71 (Pt 8), 1835-1838.
- Ishikawa, T., Yamanaka, A., Konishi, E., 2014. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* 32, 1326-1337.
- Ito, Y., Okinaka, Y., Mori, K., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M., Nakai, T., 2008. Variable region of betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. *Dis Aquat Organ* 79, 199-205.
- Iwamoto, T., Mise, K., Mori, K., Arimoto, M., Nakai, T., Okuno, T., 2001. Establishment of an infectious RNA transcription system for Striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodaviruses. *J Gen Virol* 82, 2653-2662.
- Khromykh, A.A., Westaway, E.G., 1994. Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *J Virol* 68, 4580-4588.
- Klein, A.M., Vaissiere, 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 Biol Sci* 274, 303-313.
- Kreissl, S., Bicker, G., 1992. Dissociated neurons of the pupal honeybee brain in cell culture. *J Neurocytol* 21, 545-556.
- Kuchibhatla, D.B., Sherman, W.A., Chung, B.Y., Cook, S., Schneider, G., Eisenhaber, B., Karlin, D.G., 2014. Powerful sequence similarity search methods and in-depth manual analyses can identify remote homologs in many apparently "orphan" viral proteins. *J. Virol* 88, 10-20.
- Kulincevic, J.M., Rothenbuhler, W.C., 1975. Selection for resistance and susceptibility to hairless-black syndrome in the honeybee. *J Invertebr Pathol* 25, 289-295.

- Kunieda, T., Kubo, T., 2004. In vivo gene transfer into the adult honeybee brain by using electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 25-31.
- Lamirande, E.W., DeDiego, M.L., Roberts, A., Jackson, J.P., Alvarez, E., Sheahan, T., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Baric, R., Enjuanes, L., Subbarao, K., 2008. A live attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus is immunogenic and efficacious in golden Syrian hamsters. *J Virol* 82, 7721-7724.
- Laurent, S., Masson, C., Jakob, I., 2002. Whole-cell recording from honeybee olfactory receptor neurons: ionic currents, membrane excitability and odourant response in developing workerbee and drone. *Eur J Neurosci* 15, 1139-1152.
- Leat, N., Ball, B., Govan, V.A., Davison, S., 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen. Virol* 81, 2111-2119.
- Lei, L., Ying, S., Baojun, L., Yi, Y., Xiang, H., Wenli, S., Zounan, S., Deyin, G., Qingyu, Z., Jingmei, L., Guohui, C., 2013. Attenuation of mouse hepatitis virus by deletion of the LLRKxGxKG region of Nsp1. *PLoS One* 8, e61166.
- Lieutaud, P., Canard, B., Longhi, S., 2008. MeDor: a metasever for predicting protein disorder. *BMC Genomics* 9 Suppl 2, S25.
- Mandl, C.W., 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res* 111, 161-174.
- 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.
- Meng, T., Kiener, T.K., Kwang, J., 2012. RNA polymerase I-driven reverse genetics system for enterovirus 71 and its implications for vaccine production. *Virol J* 9, 238.
- Mizutani, S., Colonno, R.J., 1985. In vitro synthesis of an infectious RNA from cDNA clones of human rhinovirus type 14. *J Virol* 56, 628-632.
- Monceau, K., Bonnard, O., Thiéry, D., 2014. *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal of Pest Science* 87, 1-16.
- Moritz, R.F.A., De Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P., Paxton, R.J., 2010. Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* 41, 227-242.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.

- 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.
- 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.
- Polo, S., Ketner, G., Levis, R., Falgout, B., 1997. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J Virol* 71, 5366-5374.
- Puri, B., Polo, S., Hayes, C.G., Falgout, B., 2000. Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific,74 strain. *Virus Genes* 20, 57-63.
- Racaniello, V.R., Baltimore, D., 1981. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 214, 916-919.
- 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., 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.
- Ribiere, M., Olivier, V., Blanchard, P., 2010. Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other? *Journal of Invertebrate Pathology* 103.
- Rice, C.M., Grakoui, A., Galler, R., Chambers, T.J., 1989. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol* 1, 285-296.
- Roby, J.A., Pijlman, G.P., Wilusz, J., Khromykh, A.A., 2014. Noncoding subgenomic flavivirus RNA: multiple functions in West Nile virus pathogenesis and modulation of host responses. *Viruses* 6, 404-427.
- Roos, R.P., Stein, S., Routbort, M., Senkowski, A., Bodwell, T., Wollmann, R., 1989. Theiler's murine encephalomyelitis virus neutralization escape mutants have a change in disease phenotype. *J Virol* 63, 4469-4473.
- 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.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schuessler, A., Funk, A., Lazear, H.M., Cooper, D.A., Torres, S., Daffis, S., Jha, B.K., Kumagai, Y., Takeuchi, O., Hertzog, P., Silverman, R., Akira, S., Barton, D.J., Diamond, M.S., Khromykh, A.A., 2012. West Nile virus noncoding subgenomic RNA contributes to viral evasion of the type I interferon-mediated antiviral response. *J Virol* 86, 5708-5718.
- Schuster, S., Zirkel, F., Kurth, A., van Cleef, K.W., Drosten, C., van Rij, R.P., Junglen, S., 2014. A unique nodavirus with novel features: mosinovirus expresses two subgenomic RNAs, a capsid gene of unknown origin, and a suppressor of the antiviral RNA interference pathway. *J Virol* 88, 13447-13459.
- Scobey, T., Yount, B.L., Sims, A.C., Donaldson, E.F., Agnihothram, S.S., Menachery, V.D., Graham, R.L., Swanstrom, J., Bove, P.F., Kim, J.D., Grego, S., Randell, S.H., Baric, R.S., 2013. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16157-16162.
- Shatkin, A.J., 1976. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9, 645-653.
- Souto, S., Merour, E., Biacchesi, S., Bremont, M., Oliveira, J.G., Bandin, I., 2015. In vitro and in vivo characterization of molecular determinants of virulence in reassortant betanodavirus. *J Gen Virol* 96, 1287-1296.
- Stokes, H.L., Baliji, S., Hui, C.G., Sawicki, S.G., Baker, S.C., Siddell, S.G., 2010. A new cistron in the murine hepatitis virus replicase gene. *J Virol* 84, 10148-10158.
- Su, Y.C., Wu, J.L., Hong, J.R., 2009. Betanodavirus non-structural protein B2: A novel necrotic death factor that induces mitochondria-mediated cell death in fish cells. *Virology* 385, 143-154.
- Suzuki, T., Ito, M., Ezure, T., Kobayashi, S., Shikata, M., Tanimizu, K., Nishimura, O., 2006. Performance of expression vector, pTD1, in insect cell-free translation system. *J Biosci Bioeng* 102, 69-71.
- Takizawa, N., Adachi, K., Kobayashi, N., 2008. Establishment of reverse genetics system of betanodavirus for the efficient recovery of infectious particles. *J Virol Methods* 151, 271-276.
- Taniguchi, T., 1978. [Site-directed mutagenesis on bacteriophage Qbeta RNA (author's transl)]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 23, 159-169.
- Tekes, G., Spies, D., Bank-Wolf, B., Thiel, V., Thiel, H.J., 2012. A reverse genetics approach to study feline infectious peritonitis. *J Virol* 86, 6994-6998.

- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., Siddell, S.G., 2001. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol* 82, 1273-1281.
- Usme-Ciro, J.A., Lopera, J.A., Enjuanes, L., Almazan, F., Gallego-Gomez, J.C., 2014. Development of a novel DNA-launched dengue virus type 2 infectious clone assembled in a bacterial artificial chromosome. *Virus Res* 180, 12-22.
- van den Worm, S.H., Eriksson, K.K., Zevenhoven, J.C., Weber, F., Zust, R., Kuri, T., Dijkman, R., Chang, G., Siddell, S.G., Snijder, E.J., Thiel, V., Davidson, A.D., 2012. Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination. *PLoS One* 7, e32857.
- Watson, J.D., Crick, F.H., 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Yamshchikov, V.F., Wengler, G., Perelygin, A.A., Brinton, M.A., Compans, R.W., 2001. An infectious clone of the West Nile flavivirus. *Virology* 281, 294-304.
- Yang, C.C., Hu, H.S., Wu, R.H., Wu, S.H., Lee, S.J., Jiaang, W.T., Chern, J.H., Huang, Z.S., Wu, H.N., Chang, C.M., Yueh, A., 2014. A novel dengue virus inhibitor, BP13944, discovered by high-throughput screening with dengue virus replicon cells selects for resistance in the viral NS2B/NS3 protease. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 110-119.
- Yoshii, K., Igarashi, M., Ito, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R., Takashima, I., 2011. Construction of an infectious cDNA clone for Omsk hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5. *Virus Res* 155, 61-68.
- Youssef, I., Schurr, F., Goulet, A., Cougoule, N., Ribiere-Chabert, M., Darbon, H., Thiery, R., Dubois, E., 2015. RNA 1 and RNA 2 Genomic Segments of Chronic Bee Paralysis Virus Are Infectious and Induce Chronic Bee Paralysis Disease. *J Immunol Res* 2015, 423493.
- Yun, S.I., Kim, S.Y., Rice, C.M., Lee, Y.M., 2003. Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. *J Virol* 77, 6450-6465.
- Zhang, R., Li, Y., Cowley, T.J., Steinbrenner, A.D., Phillips, J.M., Yount, B.L., Baric, R.S., Weiss, S.R., 2015. The nsp1, nsp13, and M proteins contribute to the hepatotropism of murine coronavirus JHM.WU. *J Virol* 89, 3598-3609.
- Zibert, A., Maass, G., Strebel, K., Falk, M.M., Beck, E., 1990. Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol* 64, 2467-2473.
- Zimmermann, H., Eggers, H.J., Zimmermann, A., Kraus, W., Nelsen-Salz, B., 1995. Complete nucleotide sequence and biological properties of an infectious clone of prototype echovirus 9. *Virus Res* 39, 311-319.

Annexes

Communications orales

RNA 1 and RNA 2 genomic segments of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) are sufficient to recover an infectious virus

Ibrahim Youssef, Frank Schurr, Adeline Goulet, Nicolas Cougoule, Magali Ribière-Chabert, Hervé Darbon, Richard Thiéry and Eric Dubois

Xth international congress for veterinary virology, August 31st- September 3rd 2015

Le Corum, Montpellier, France

Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes an infectious and contagious disease of adult honey bees. The CBPV is a positive single-stranded RNA virus and its genome is composed of two major RNAs, RNA 1 (3674 nucleotides long) and RNA 2 (2305 nucleotides long). The three minor RNAs that have been described in a first study of the viral particles were not detected in subsequent studies. The complete genome sequence of major RNAs did not allow its classification among the existing virus families. Consequently, the determination of the essential genetic element for the virus replication is an important concern. Recently, it has been reported that the inoculation of purified CBPV RNA (naked genome) generates the chronic paralysis of bees. In this study, we present the results of experimental *in vivo* inoculations of the two major CBPV RNAs. Our results showed that CBPV major RNAs induce the chronic paralysis. Bees inoculated with purified CBPV major RNAs developed paralysis symptoms within 5 days post inoculation. Using quantitative RT-PCR, we showed that RNA copies number increase significantly during the infection. Moreover, we detected the negative strand form of CBPV RNA, showing the replication of the virus. These results provide essential and useful tools to develop the first reverse genetic system of CBPV in order to manipulate its genome and to study its proteins functions.

ARN 1 et ARN 2 du virus de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV) sont infectieux et induisent la réplication du virus

Ibrahim Youssef, Frank Schurr, Adeline Goulet, Nicolas Cougoule, Magali Ribière-
Chabert, Hervé Darbon, Richard Thiéry and Eric Dubois

**Les journées des doctorants et post-doctorants ANSES, 18 et 19 novembre 2015,
Maisons-Alfort, Paris, France**

Le virus de la paralysie chronique (Chronic Bee Paralysis Virus : CBPV) est responsable d'une maladie infectieuse et contagieuse de l'abeille adulte. C'est un virus à ARN simple brin positif à génome segmenté. Sa particule virale est anisométrique et de taille comprise entre 30 et 60 nm de long et 20 nm de large. Son génome se compose de deux ARN majoritaires l'ARN1 de 3674 bases et l'ARN2 de 2305 bases. Il serait également composé de trois ARN minoritaires. Cependant, ces trois ARN minoritaires n'ont pas été identifiés lors du séquençage du génome de CBPV. Les précédents travaux réalisés au laboratoire ont également montré que les ARN nus de CBPV sont directement infectieux. Toutefois, les auteurs n'ont pas pu conclure sur le rôle des ARNs minoritaires dans la réplication. Afin de définir les éléments indispensables à la réplication du CBPV, nous avons évalué le pouvoir infectieux des deux ARN majoritaires. Après leur purification par électrophorèse sur gel agarose dénaturant, les ARN majoritaires ont été inoculés à des abeilles émergentes. Six jours après inoculation, on a observé les symptômes de la maladie de paralysie chronique chez les abeilles inoculées par les ARNs majoritaires. En plus, les abeilles inoculées par les ARNs majoritaires montrent une augmentation de nombre de copies d'ARN de façon similaire aux abeilles inoculées avec le virus complet. Le brin anti-génomique de l'ARN 1 du CBPV a été détecté dans ces abeilles par RT-PCR conventionnelle, indiquant la réplication du génome du CBPV. En outre, par microscopie électronique, on a visualisé les particules virales du virus. Par conséquent, ces résultats montrent que les ARN majoritaires du CBPV sont infectieux et suffisants pour permettre la réplication du virus. Cette information est cruciale pour le développement d'un système de génétique inverse afin d'étudier le génome du CBPV.

ARN 1 et ARN 2 du virus de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV) sont infectieux et induisent la réplication du virus

Ibrahim Youssef, Frank Schurr, Adeline Goulet, Nicolas Cougoule, Magali Ribière-
Chabert, Hervé Darbon, Richard Thiéry and Eric Dubois

**XVIII^{es} Journées Francophones de virologie, 24 et 25 mars 2016,
Institut Pasteur, Paris, France**

Le virus de la paralysie chronique (Chronic Bee Paralysis Virus : CBPV) est responsable d'une maladie infectieuse et contagieuse de l'abeille adulte. C'est un virus à ARN simple brin positif à génome segmenté. Sa particule virale est anisométrique et de taille comprise entre 30 et 60 nm de long et 20 nm de large. Son génome se compose de deux ARN majoritaires l'ARN1 de 3674 bases et l'ARN2 de 2305 bases. Il serait également composé de trois ARN minoritaires. Cependant, ces trois ARN minoritaires n'ont pas été identifiés lors du séquençage du génome de CBPV. Les précédents travaux réalisés au laboratoire ont également montré que les ARN nus de CBPV sont directement infectieux. Toutefois, les auteurs n'ont pas pu conclure sur le rôle des ARNs minoritaires dans la réplication. Afin de définir les éléments indispensables à la réplication du CBPV, nous avons évalué le pouvoir infectieux des deux ARN majoritaires. Après leur purification par électrophorèse sur gel agarose dénaturant, les ARN majoritaires ont été inoculés à des abeilles émergentes. Six jours après inoculation, on a observé les symptômes de la maladie de paralysie chronique chez les abeilles inoculées par les ARNs majoritaires. En plus, les abeilles inoculées par les ARNs majoritaires montrent une augmentation de nombre de copies d'ARN de façon similaire aux abeilles inoculées avec le virus complet. Le brin anti-génomique de l'ARN 1 du CBPV a été détecté dans ces abeilles par RT-PCR conventionnelle, indiquant la réplication du génome du CBPV. En outre, par microscopie électronique, on a visualisé les particules virales du virus. Par conséquent, ces résultats montrent que les ARN majoritaires du CBPV sont infectieux et suffisants pour permettre la réplication du virus. Cette information est cruciale pour le développement d'un système de génétique inverse afin d'étudier le génome du CBPV.

Toward a reverse genetic system for Chronic Bee Paralysis Virus molecular studies

Ibrahim Youssef, Frank Schurr, Nicolas Cougoule, Magali Ribière-Chabert, Hervé Darbon, Richard Thiéry, Stéphane Biacchesi, Michel Bremont and Eric Dubois

Eurbee 2016, 7th congress of apidology, 7th-9th September 2016

Cluj-Napoca, Romania

Chronic bee paralysis virus (CBPV) causes an infectious and contagious disease of honeybees (trembling, crawling and death). Its segmented genome is composed of two major positive single-stranded RNAs, RNA 1 (3,674 nucleotides) and RNA 2 (2,305 nucleotides). Three minor RNAs (about 1,000 nucleotides each) were described in early studies but were not confirmed by sequencing of the CBPV genome (Olivier et al., 2008). In this study, we demonstrate that the CBPV major RNAs are infectious *in vivo*. Honeybees inoculated with 10^9 RNA copies per bee developed paralysis symptoms within 6 days post inoculation. The number of CBPV RNA copies increased significantly throughout the infection. CBPV particles were visualized by electronic microscopy in inoculated honeybees. These results show that the CBPV major RNAs are sufficient to induce virus replication and produce CBPV particles. In the interest of establishing the first reverse genetic system for CBPV, cDNAs encoding the two major RNAs were cloned into the pcDNA3.1 plasmid under the control of the CMV and T7 promoters. In order to induce viral replication in emerging honeybees, several conditions using different inoculums were tested. Preliminary results will be discussed.

Communications affichées

Infectivity of major Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) RNAs

Ibrahim Youssef, Frank Schurr, Magali Ribière-Chabert, Richard Thiéry and Eric Dubois

Les journées des doctorants et post-doctorants ANSES,

27 et 28 novembre 2014

Maisons-Alfort, Paris, France

Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes an infectious and contagious disease of adult honey bees. The responsible factors of the clinical signs of the disease are still unknown. CBPV is a positive single-stranded RNA virus and its genome is composed of two major RNAs, RNA 1 (3674 nucleotides long) and RNA 2 (2305 nucleotides long). The three minor RNAs described in a first study of the viral genome were not detected in subsequent studies. Recently, it has been reported that the inoculation of naked CBPV genome generates the chronic paralysis of bees. Here, we present the results of the experimental in vivo inoculation of the two major CBPV RNAs. Using quantitative RT-PCR, we showed that purified RNA 1 and RNA 2, inoculated together, induce the multiplication of the virus (Fig.1). Even though, no clinical symptoms have been observed. These preliminary results show that the three minor CBPV RNAs are not essential for the viral multiplication and support the hypothesis that they could be experimental artefacts. Future studies will be performed to characterize CBPV proteins by reverse genetics.



Introduction

Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), a worldwide virus, causes an infectious and contagious disease of adult honey bees. CBPV is a positive single-stranded RNA virus, its genome is composed of two major RNAs. RNA 1 (3674 nucleotides long) and RNA 2 (2305 nucleotides long) encode three and four open reading frames (ORFs) respectively [1] (Figure 1). RNA1-ORF3 is predicted to encode the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) whereas RNA2-ORF3 encodes a predicted structural protein (pSP) [2]. The three minor RNAs described in the first study of the viral genome were not detected in subsequent studies, supporting the hypothesis that they could be experimental artefacts.

Recently, it has been reported that the inoculation of naked CBPV genome generates the chronic paralysis of bees [3]. In this study, we present the preliminary results of the experimental *in vivo* inoculation of the two major CBPV RNAs.

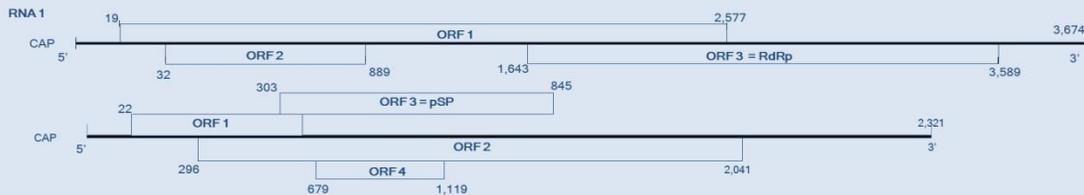


Figure 1: Diagram of the predicted genome organization of CBPV RNA 1 (A) and RNA 2 (B). Seven putative ORFs are indicated with their position.

Methods



Results

- Set up of CBPV RNA 2 real time PCR.
- Four bees (red circles) inoculated with purified CBPV RNAs 1+2 (10^4 copies/ μ l) present a significant increase of RNA1 and RNA2 copy number (Figure 2). However, no clinical symptoms have been observed.
- Detection of the replicative form of the virus in these four bees and those inoculated with CBPV particles.
- The non-inoculated bees (Tni) and those inoculated with one RNA segment (RNA 1 or RNA 2) did not show any RNA replication.

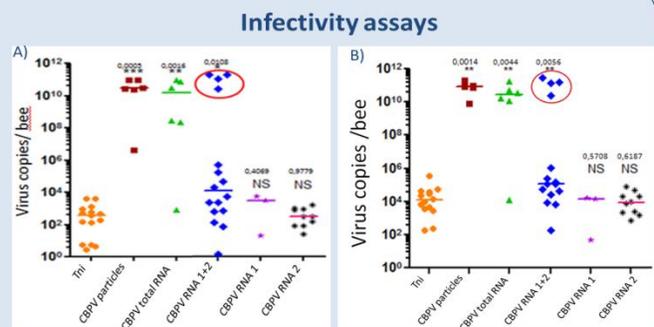


Figure 2: Comparison of virus multiplication in the different conditions (Tni, CBPV particles, CBPV total RNA, CBPV RNA 1+2, CBPV RNA 1, CBPV RNA 2) using RNA1 (A) and RNA2 (B) quantitative PCR.

Conclusion

These preliminary results show that the two major CBPV RNAs are probably sufficient for the viral RNA replication. The recent production of viral cDNA transcripts will be very useful to reproduce this study. Moreover, they are essential, as a preliminary steps for setting up a reverse genetic system of the CBPV genome. Site-directed mutagenesis will be used to better understand the function of the viral genes and their role in virulence.

Etudes préliminaires de la réplication des ARN majoritaires du virus de la paralysie chronique de l'abeille

Ibrahim Youssef, Frank Schurr, Magali Ribière-Chabert, Richard Thiéry and Eric Dubois

XVII^{es} Journées Francophones de virologie, 9 et 10 avril 2015,

Institut Pasteur, Paris, France

Le virus de la paralysie chronique (Chronic Bee Paralysis Virus : CBPV) est responsable d'une maladie infectieuse et contagieuse de l'abeille adulte. Cette maladie se manifeste au niveau de la colonie par des abeilles tremblantes, trainantes, incapables de voler. Le CBPV est un virus à ARN simple brin positif à génome segmenté. Sa particule virale est anisométrique et de taille comprise entre 30 et 60 nm de long et 20 nm de large (Bailey et al., 1968). Son génome se compose de deux ARN majoritaires l'ARN1 de 3674 bases et l'ARN2 de 2305 bases (Olivier et al., 2008). Il serait également composé de trois ARN minoritaires (Overton et al., 1982). Cependant, ces trois ARN minoritaires n'ont pas été identifiés lors du séquençage du génome de CBPV. Sept cadres ouverts de lectures (ORF) chevauchants ont été déduits du séquençage des deux ARN majoritaires, trois ORF sur l'ARN1 et quatre sur l'ARN2. Trois protéines ont été identifiées. L'ARN polymérase ARN dépendante serait traduite par un mécanisme de changement de cadre de lecture (frame-shift) entre l'ORF 1 et l'ORF 3 de l'ARN1. Deux protéines structurales (pSP et hSP) seraient codées par l'ARN2. Malgré ces études, le CBPV ne peut encore actuellement pas être assigné à une famille virale. Il se positionne entre les familles Nodavirus et Tombusvirus (Olivier et al., 2008). Les précédents travaux réalisés au laboratoire ont également montré que les ARN nus de CBPV sont directement infectieux (Chevin et al., 2012). Après inoculation d'abeilles avec ces ARN purifiés, les brins anti-génomiques (négatifs) ont été détectés par RT-PCR et des particules virales ont été visualisées par microscopie électronique. Afin de définir les éléments indispensables à la réplication du CBPV, nous avons évalué le pouvoir infectieux des deux ARN majoritaires. Après leur purification par électrophorèse sur gel agarose dénaturant, les ARN majoritaires ont été inoculés à des abeilles émergentes. Cinq jours après inoculation, la charge virale par abeille a été estimée par RT-PCR en temps réel. Quatre abeilles inoculées montrent une augmentation de nombre de copies d'ARN de façon similaire aux abeilles inoculées avec le virus complet. Le brin anti-génomique de l'ARN 1 du CBPV a été détecté dans ces quatre abeilles par RT-PCR conventionnelle, (Celle et al., 2008) indiquant la réplication du génome du CBPV. Cependant, aucun des symptômes de la maladie n'a été observé.



Introduction

Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), a worldwide virus, causes an infectious and contagious disease of adult honey bees. CBPV is a positive single-stranded RNA virus, its genome is composed of two major RNAs. RNA 1 (3674 nucleotides long) and RNA 2 (2305 nucleotides long) encode three and four open reading frames (ORFs) respectively [1] (Figure 1). RNA1-ORF3 is predicted to encode the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) whereas RNA2-ORF3 encodes a predicted structural protein (pSP) [2]. The three minor RNAs described in the first study of the viral genome were not detected in subsequent studies, supporting the hypothesis that they could be experimental artefacts.

Recently, it has been reported that the inoculation of naked CBPV genome generates the chronic paralysis of bees [3]. In this study, we present the preliminary results of the experimental *in vivo* inoculation of the two major CBPV RNAs.

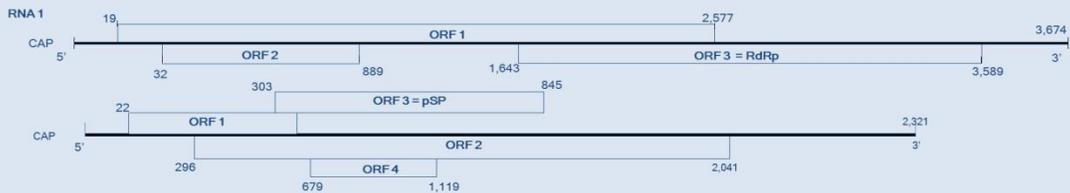


Figure 1: Diagram of the predicted genome organization of CBPV RNA 1 (A) and RNA 2 (B). Seven putative ORFs are indicated with their position.

Methods



Results

- Set up of CBPV RNA 2 real time PCR.
- Four bees (red circles) inoculated with purified CBPV RNAs 1+2 (10^4 copies/ μ l) present a significant increase of RNA1 and RNA2 copy number (Figure 2). However, no clinical symptoms have been observed.
- Detection of the replicative form of the virus in these four bees and those inoculated with CBPV particles.
- The non-inoculated bees (Tni) and those inoculated with one RNA segment (RNA 1 or RNA 2) did not show any RNA replication.

Infectivity assays

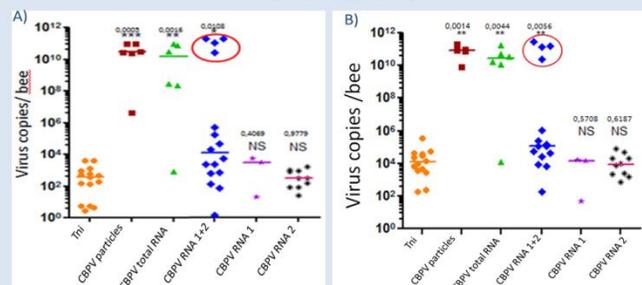


Figure 2: Comparison of virus multiplication in the different conditions (Tni, CBPV particles, CBPV total RNA, CBPV RNA 1+2, CBPV RNA 1, CBPV RNA 2) using RNA1 (A) and RNA2 (B) quantitative PCR.

Conclusion

These preliminary results show that the two major CBPV RNAs are probably sufficient for the viral RNA replication. The recent production of viral cDNA transcripts will be very useful to reproduce this study. Moreover, they are essential, as a preliminary step for setting up a reverse genetic system of the CBPV genome. Site-directed mutagenesis will be used to better understand the function of the viral genes and their role in virulence.

RNA 1 and RNA 2 genomic segments of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) are sufficient to recover an infectious virus

Ibrahim Youssef, Frank Schurr, Adeline Goulet, Nicolas Cougoule, Magali Ribière Chabert, Hervé Darbon, Richard Thiéry and Eric Dubois

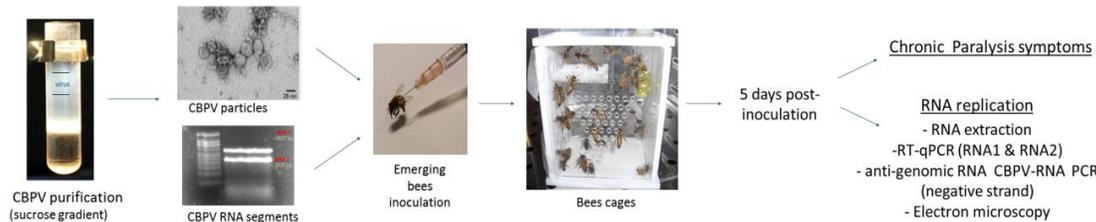
23rd Annual meeting of the doctoral school in biology and health science,

June 4 and 5 2015, Marseille, France

Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes an infectious and contagious disease of adult honeybees. Its segmented genome is composed of positive single-stranded RNAs. The two major RNAs, RNA 1 and RNA 2, are 3,674 and 2,305 nucleotides long, respectively. Three minor RNAs (about 1,000 nucleotides long each) have been described earlier but they were not detected by sequencing the CBPV genome. In this study, we present the results of in vivo inoculation of the two purified CBPV major RNAs. Our results showed that RNA 1 and RNA 2 are infectious. Honeybees inoculated with purified CBPV major RNAs (at 10⁹ RNA copies per bee) developed paralysis symptoms within 6 days post inoculation. The number of CBPV RNA copies increased significantly throughout the experiment. Moreover, the detection of the negative strand of CBPV RNA, and the formation of CBPV particles, confirmed the replication of the virus. These results show that RNA 1 and RNA 2 segments are sufficient to recover an infection virus. Therefore, the three minor RNAs are not essential for virus replication. These data are crucial for the development of the first reverse genetic system in CBPV studies.

Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes an infectious and contagious disease of adult honeybees. Its segmented genome is composed of positive single-stranded RNAs. The two major RNAs, RNA 1 and RNA 2, are 3,674 and 2,305 nucleotides long, respectively. Three minor RNAs (about 1,000 nucleotides long each) have been described earlier but they were not detected by sequencing the CBPV genome. In this study, we present the results of *in vivo* inoculation of the two purified CBPV major RNAs. Our results showed that RNA 1 and RNA 2 are infectious. Honeybees inoculated with purified CBPV major RNAs (at 10⁹ RNA copies per bee) developed paralysis symptoms within 6 days post inoculation. The number of CBPV RNA copies increased significantly throughout the experiment. Moreover, the detection of the negative strand of CBPV RNA, and the formation of CBPV particles, confirmed the replication of the virus. These results show that RNA 1 and RNA 2 segments are sufficient to recover an infectious virus. Therefore, the three minor RNAs are not essential for virus replication. These data are crucial for the development of the first reverse genetic system in CBPV studies.

METHODS



RESULTS

1) Validation of the CBPV RNA 2 RT-qPCR

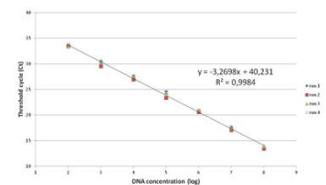


Figure 1. DNA standard curve of CBPV RNA 2 RT-qPCR obtained with a 10-fold serial dilution (10⁷ to 10¹ DNA copies per reaction) of a 2,710 kb plasmid including the coding sequence of the predicted structural protein pSP on RNA 2-ORF3. Four independent runs were performed and allowed to obtain the linear regression analysis of the Ct measured for each amplification (Y axis) vs. the log₁₀ of DNA concentration of each dilution (X axis). The equation of the linear regression and the correlation coefficient (R²) are indicated.

2) Clinical signs of chronic bee paralysis throughout the infection

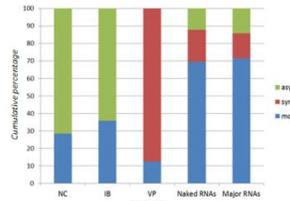


Figure 2. Cumulative percentage of dead, symptomatic and asymptomatic bees in the different conditions tested 6 days post inoculation: Negative control (NC), Inoculation Buffer CBPV-free (IB), positive control: CBPV particles (VP), CBPV naked RNAs and CBPV major RNAs.

3) CBPV major RNAs cause the multiplication of the virus

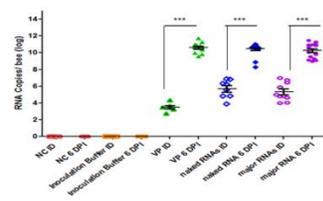


Figure 3. CBPV RNA 1 quantification in inoculated bees. NC: negative control, VP: bees inoculated with CBPV viral particles, CBPV naked RNAs and CBPV major RNAs. This graph shows the results of the RT-qPCR of CBPV RNA 1. Significant differences between Inoculation Day (ID) and 6 Day Post Inoculation (dpi) for each condition are indicated (***) (p-value < 0.001, Mann-Whitneytest).

4) Correlation between the results of CBPV RNA 1 RT-qPCR and those of CBPV RNA 2 RT-qPCR

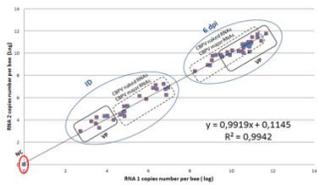


Figure 4. Correlation between the results of CBPV RNA 1 RT-qPCR and those of CBPV RNA 2 RT-qPCR. The standard curve was obtained by linear regression analysis of the results of CBPV RNA 1 and RNA 2 RT-qPCR. The equation of the curve and the correlation coefficient are indicated. The results at inoculation day (ID) and those at 6 days post inoculation (6 dpi) are represented in a blue circle. The RNA copies number of bees inoculated with CBPV viral particles (VP) is represented by a rectangle, bees inoculated with naked RNAs and major RNAs by a dotted rectangle and bees not inoculated as negative control (NC) by a red circle.

5) The infection with major RNAs induces the replication of CBPV

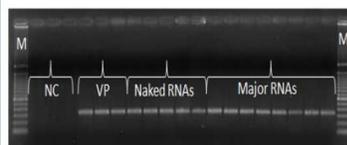


Figure 5. Anti-genomic RNA detection by specific RT-PCR. 1.2% agarose gel electrophoresis of the PCR products (amplicons): Three samples of negative control (NC), purified CBPV particles (NCP), and three samples of bees inoculated with the buffer free in CBPV, with CBPV particles (VP), five samples of bees inoculated with CBPV naked RNAs and eight samples of bees inoculated with CBPV major RNAs were tested. M: 100 bp DNA marker (TrackIT™, Invitrogen).

6) CBPV major RNAs recover an infectious virus

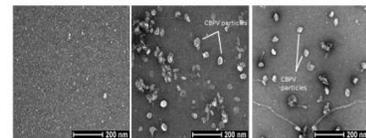


Figure 6. Transmission electron microscopy of homogenates from experimented bees. a) Negative control bees, b) positive control bees (inoculated with CBPV particles), c) Bees inoculated with CBPV major RNAs.

CONCLUSION

Our study showed that CBPV RNA 1 and RNA 2 are infectious and sufficient to induce genomic replication, virus production and the chronic paralysis disease in honeybee. Therefore, the three minor RNAs described in earlier studies are not essential for CBPV infection, and are not part of the CBPV genome. Whether minor RNAs were subgenomic RNAs remains to be determined. It should be noticed that they were identified as the genome of a the small virus-like particles associated with chronic bee paralysis virus, and thus may result from satellite virus contamination. Altogether, these results are crucial to develop a reverse genetic system in order to study CBPV genome.

RNA 1 and RNA 2 genomic segments of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) are sufficient to recover an infectious virus

Ibrahim Youssef, Frank Schurr, Adeline Goulet, Nicolas Cougoule, Magali Ribière
Chabert, Hervé Darbon, Richard Thiéry and Eric Dubois

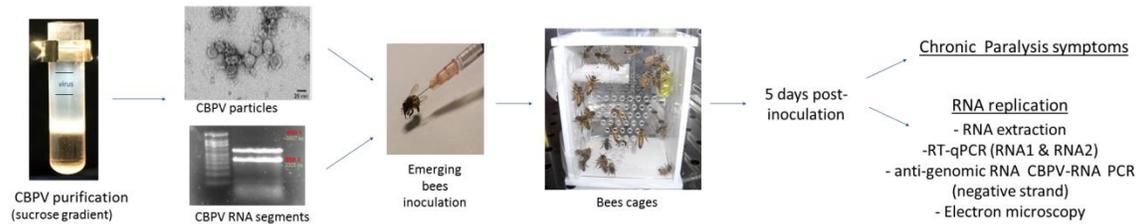
9th Annual meeting of Epizone, August 31st- September 3rd 2015

Le Corum, Montpellier, France

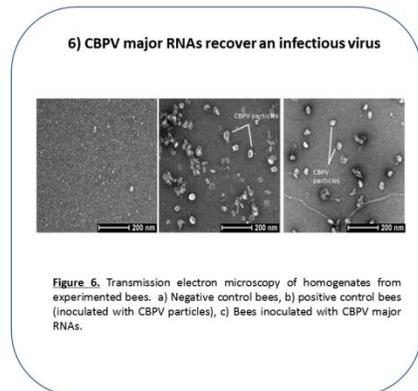
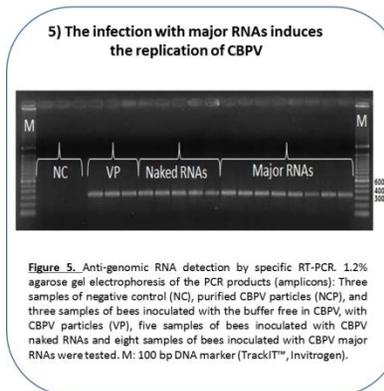
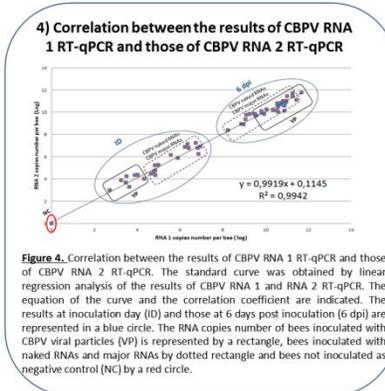
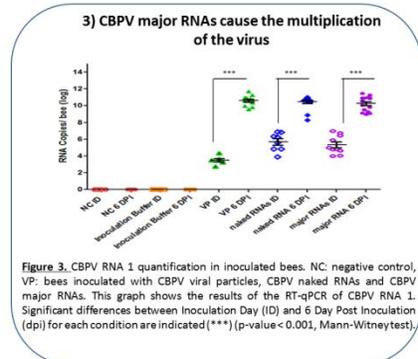
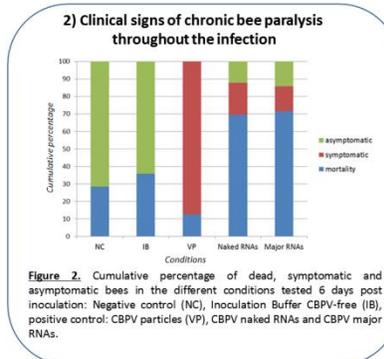
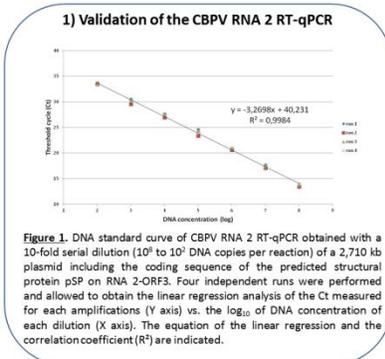
Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes an infectious and contagious disease of adult honeybees. Its segmented genome is composed of positive single-stranded RNAs. The two major RNAs, RNA 1 and RNA 2, are 3,674 and 2,305 nucleotides long, respectively. Three minor RNAs (about 1,000 nucleotides long each) have been described earlier but they were not detected by sequencing the CBPV genome. In this study, we present the results of in vivo inoculation of the two purified CBPV major RNAs. Our results showed that RNA 1 and RNA 2 are infectious. Honeybees inoculated with purified CBPV major RNAs (at 10⁹ RNA copies per bee) developed paralysis symptoms within 6 days post inoculation. The number of CBPV RNA copies increased significantly throughout the experiment. Moreover, the detection of the negative strand of CBPV RNA, and the formation of CBPV particles, confirmed the replication of the virus. These results show that RNA 1 and RNA 2 segments are sufficient to recover an infection virus. Therefore, the three minor RNAs are not essential for virus replication. These data are crucial for the development of the first reverse genetic system in CBPV studies.

Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes an infectious and contagious disease of adult honeybees. Its segmented genome is composed of positive single-stranded RNAs. The two major RNAs, RNA 1 and RNA 2, are 3,674 and 2,305 nucleotides long, respectively. Three minor RNAs (about 1,000 nucleotides long each) have been described earlier but they were not detected by sequencing the CBPV genome. In this study, we present the results of *in vivo* inoculation of the two purified CBPV major RNAs. Our results showed that RNA 1 and RNA 2 are infectious. Honeybees inoculated with purified CBPV major RNAs (at 10⁹ RNA copies per bee) developed paralysis symptoms within 6 days post inoculation. The number of CBPV RNA copies increased significantly throughout the experiment. Moreover, the detection of the negative strand of CBPV RNA, and the formation of CBPV particles, confirmed the replication of the virus. These results show that RNA 1 and RNA 2 segments are sufficient to recover an infection virus. Therefore, the three minor RNAs are not essential for virus replication. These data are crucial for the development of the first reverse genetic system in CBPV studies.

METHODS



RESULTS



CONCLUSION

Our study showed that CBPV RNA 1 and RNA 2 are infectious and sufficient to induce genomic replication, virus production and the chronic paralysis disease in honeybee. Therefore, the three minor RNAs described in earlier studies are not essential for CBPV infection, and are not part of the CBPV genome. Whether minor RNAs were subgenomic RNAs remains to be determined. It should be noticed that they were identified as the genome of a the small virus-like particles associated with chronic bee paralysis virus, and thus may result from satellite virus contamination. Altogether, these results are crucial to develop a reverse genetic system in order to study CBPV genome.