

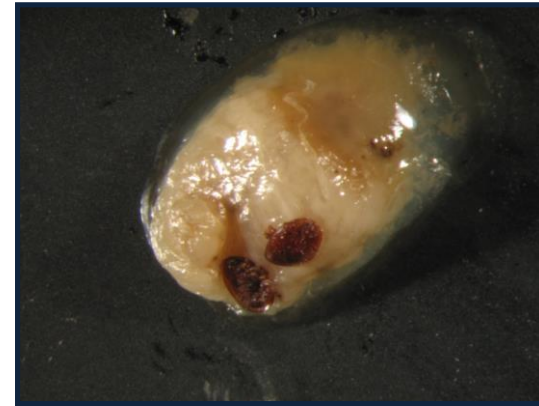
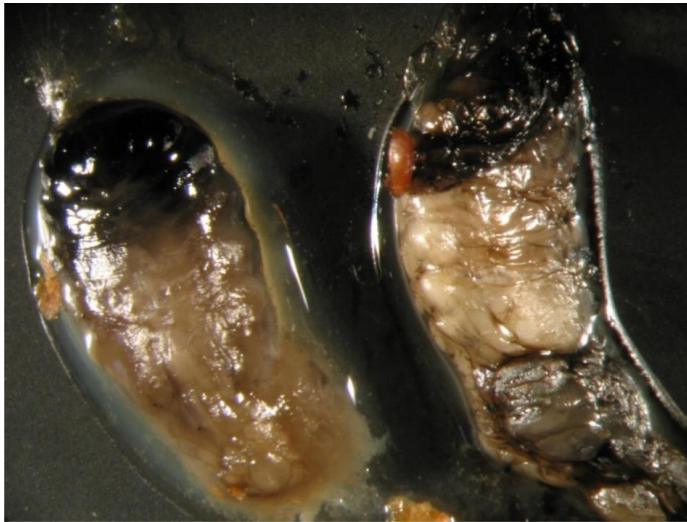
# Diagnostic moléculaire des viroses d'abeilles (*Apis mellifera*)

**Eric DUBOIS et Stéphanie Franco**

**Anses Sophia Antipolis**  
Unité Pathologie de l'Abeille  
Laboratoire de Référence National, Européen et OIE  
[eric.dubois@anses.fr](mailto:eric.dubois@anses.fr)

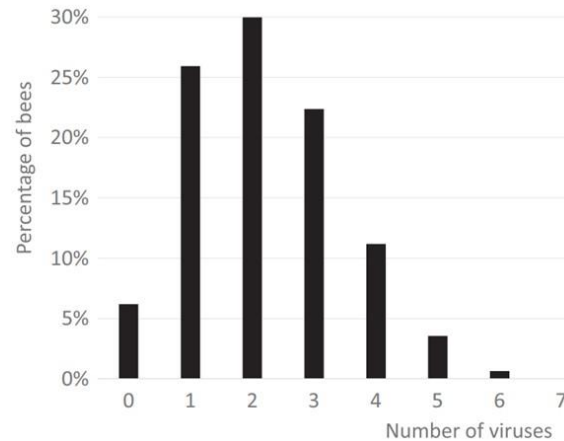
# Difficultés pour identifier l'étiologie des troubles sanitaires

Ici larves victimes de varroose :  
DWV, ABPV ou autres ?



# Détection d'un virus ≠ Etiologie d'une virose

- Très fréquemment **plusieurs virus détectés** dans la même colonie voire dans une seule abeille



(D'Alvise et al., 2019)

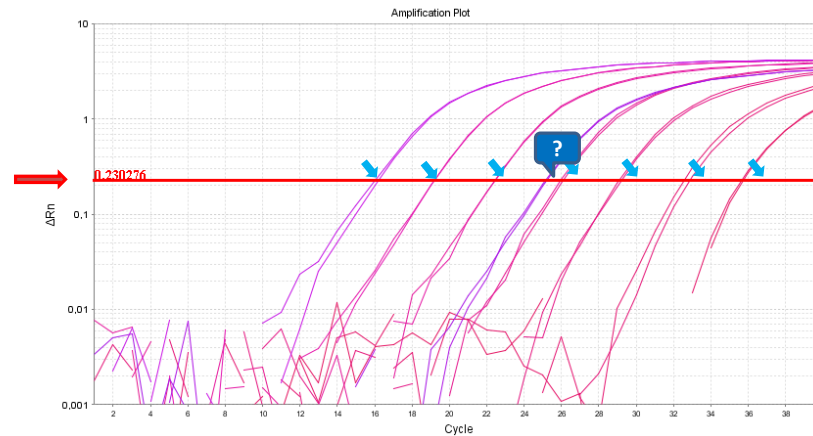
Ici : dans 75% des abeilles, plus de 2 virus ont été détectés...

- Quelle interprétation donner à ces résultats ?
- Plusieurs informations peuvent être nécessaires à l'interprétation
  - Nature et origine du prélèvement (contexte)
  - Signes cliniques observés sur les colonies (fréquence)
  - Espèce virale (voire le génotype)
  - **Charge virale**

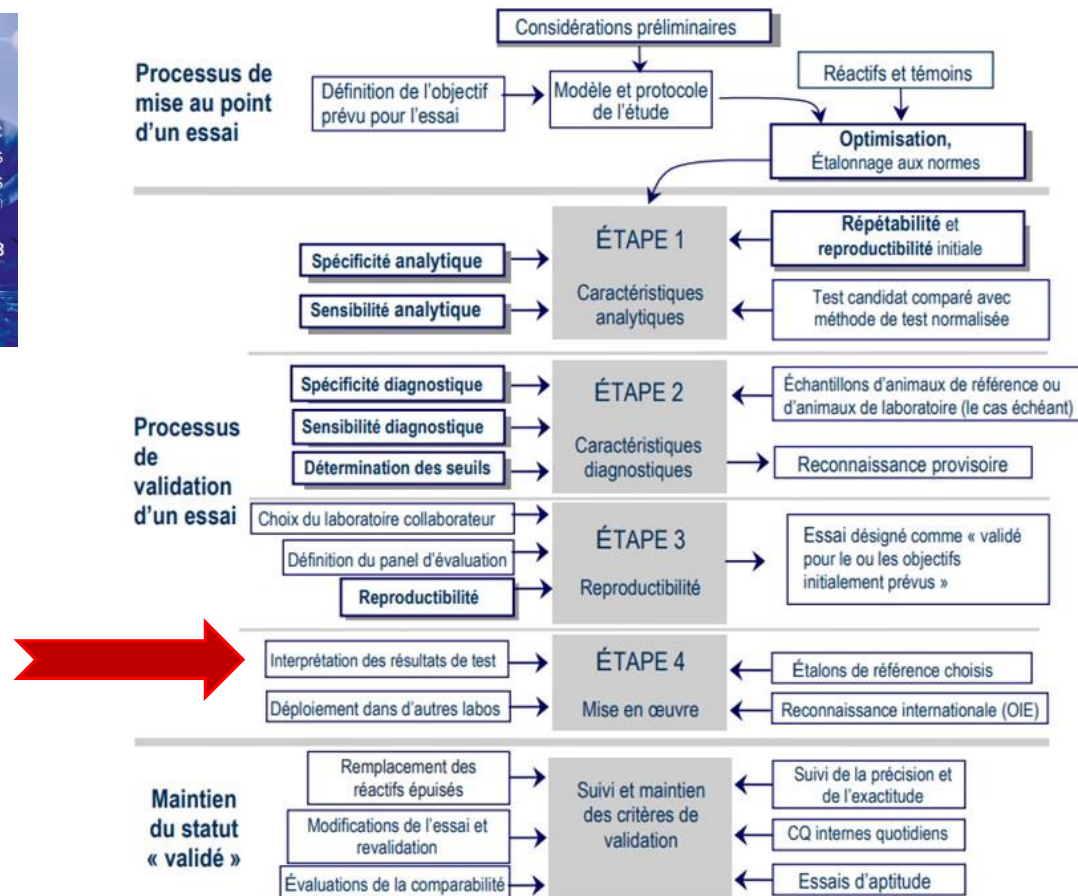
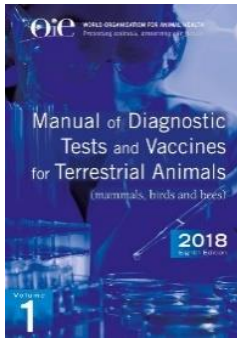
# Méthode de quantification des virus



- **Détection et identification moléculaire**
  - Cible le génome viral : ARN (1 copie/virus)
  - Réaction de transcription inverse et d'amplification en chaîne : RT-PCR
- **Suivi de la cinétique d'amplification en temps réel**
  - Délai d'apparition d'un signal (variation significative de fluorescence) →
  - Délai comparé à des signaux obtenus avec des échantillons de charge connue ↴
  - **Nombre de copies de génome viral par abeille** ?

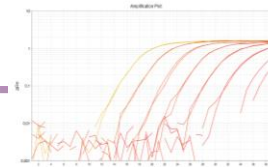


# Interprétation des résultats du diagnostic virologique

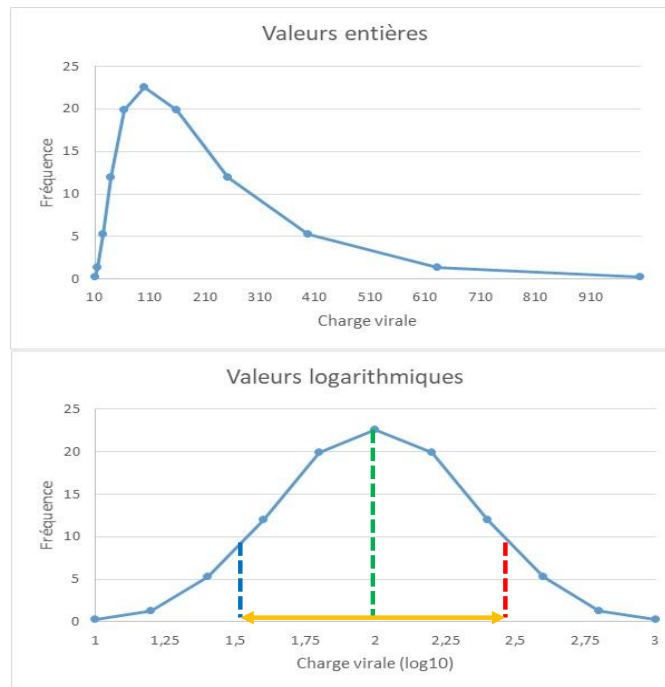


(OIE, 2018)

# Unité de mesure des quantifications par PCR



- Les valeurs de mesures par PCR ont une distribution normale sur une échelle logarithmique (log-normales)



**Les résultats d'analyses  
sont présentés en  
logarithme décimal**

Analyse statistique :

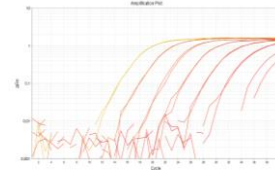
Moyenne

+2 Ecart-type

-2 Ecart-type

95% de la distribution

# Comprendre une valeur logarithmique



1 copie de génome/virus (exemple ABPV)

En logarithme  
décimal



100 000	ABPV/abeille
= $10^5$	ABPV/abeille
= $5 \log_{10}$	ABPV/abeille

# Diagnostic de la paralysie chronique

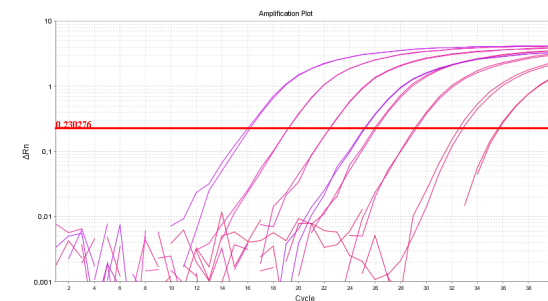
- **Signes cliniques chez l'abeille <sup>1</sup> :**

- **Tremblantes**
- Mortes devant la ruche
- Noires dépilées
- Rejetées par les gardiennes



- **Charge virale mesurée par une technique de biologie moléculaire (RT-qPCR) :**

> 8 log<sub>10</sub> copies de génome viral par abeille <sup>2</sup>

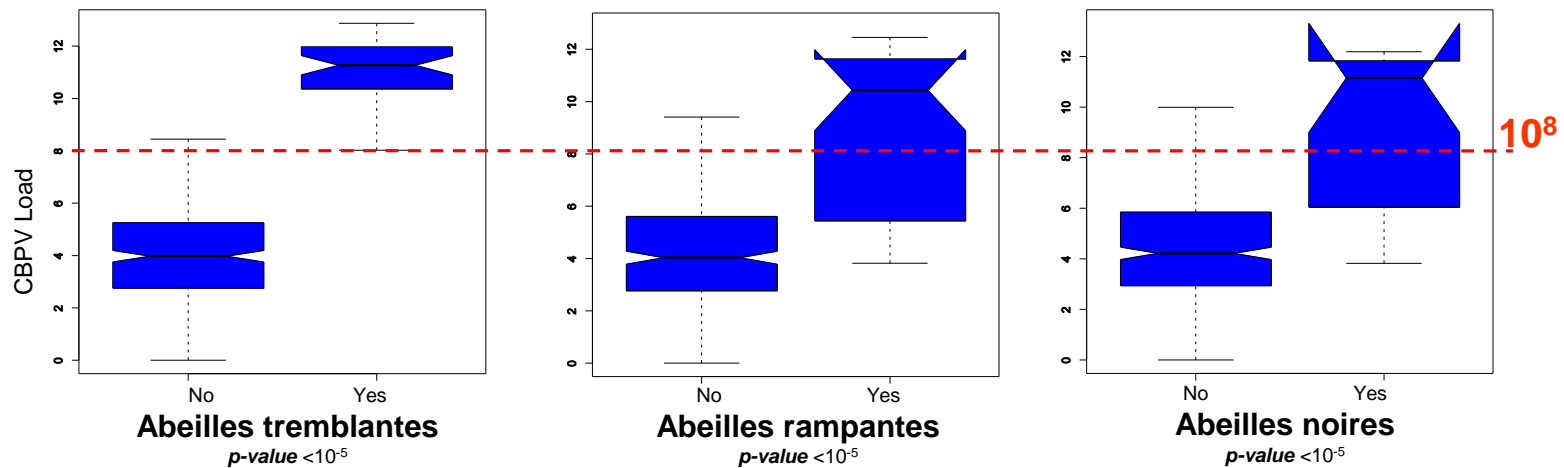


1 : Ball & Bailey, 1997 ; 2 : Blanchard et al., 2012

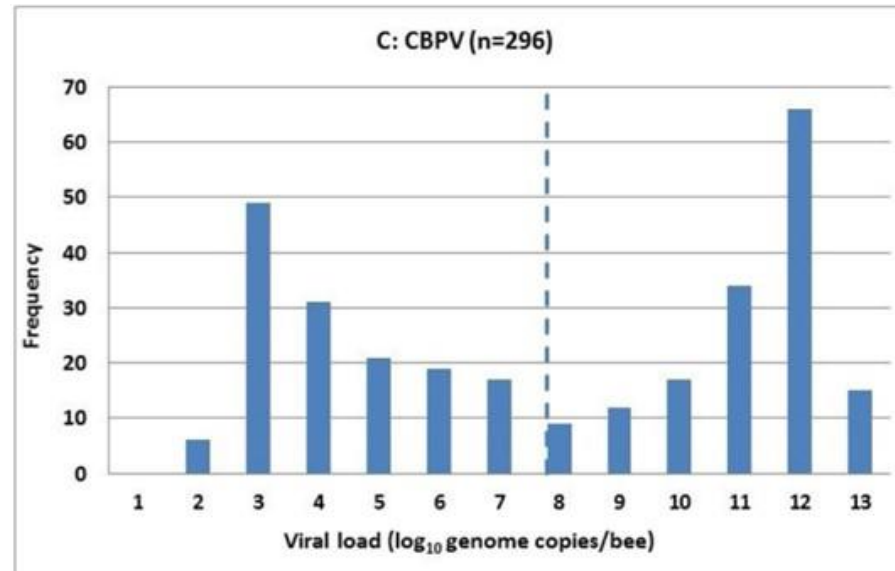


# CBPV charges virales vs signes cliniques

- 400 échantillons envoyés pour diagnostic par des apiculteurs ou les services vétérinaires (France)
- 2 groupes d'échantillons :
  - Échantillons issus de colonies avec troubles (220)
  - Échantillons issus de colonies sans troubles (180)



# Distribution bimodale des charges de CBPV



**Echantillons  $\geq 8 \log_{10}$  / abeille (n=134) :**

90% mortalités d'abeilles

87% troubles neurologiques

47% abeilles noires

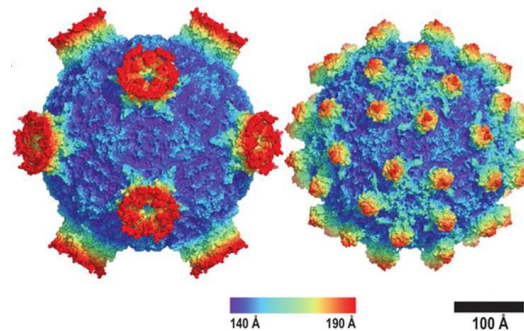
**→ Au delà du seuil (8,0 log<sub>10</sub> CBPV/abeille) :**

**Rupture de l'équilibre hôte/parasite, rupture de la TOLERANCE**

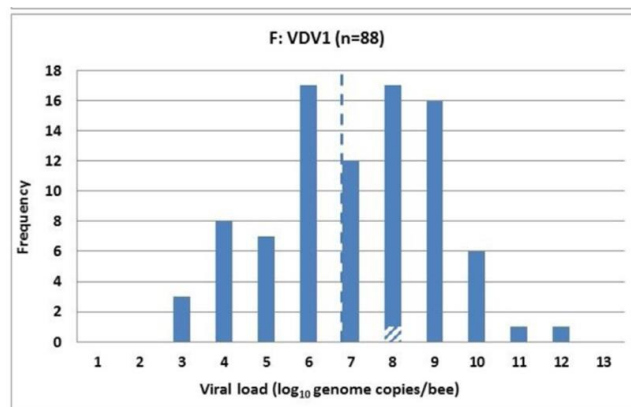
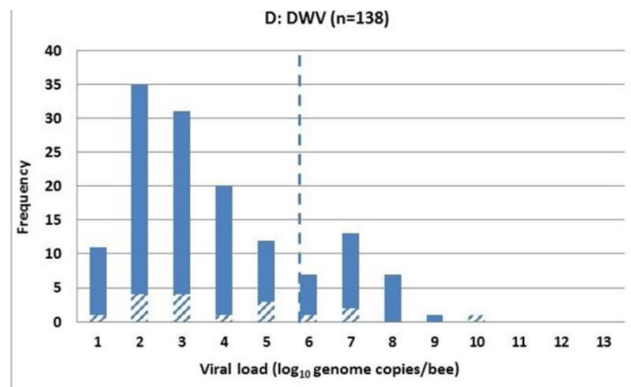
# Principales viroses de l'abeille

## En Europe :

- Paralysie aigue : Acute bee paralysis virus (ABPV)
- Cellule royale noire : Black queen cell virus (BQCV)
- Couvain sacciforme : Sacbrood virus (SBV)
- **Ailes déformées : Deformed wing virus (DWV type A et B)**



# Les DWV-A/DWV-B et seuils diagnostics



## DWV-A

Echantillons  $\geq 6 \log_{10}$ /abeille (n=17)

53% troubles du couvain

35% dépopulation

35% ailes déformées

24% mortalité d'abeilles

47% *V. destructor*

## DWV-B

Echantillons  $\geq 7 \log_{10}$ /abeille (n=29)

52% dépopulation

31% troubles du couvain

10% ailes déformées

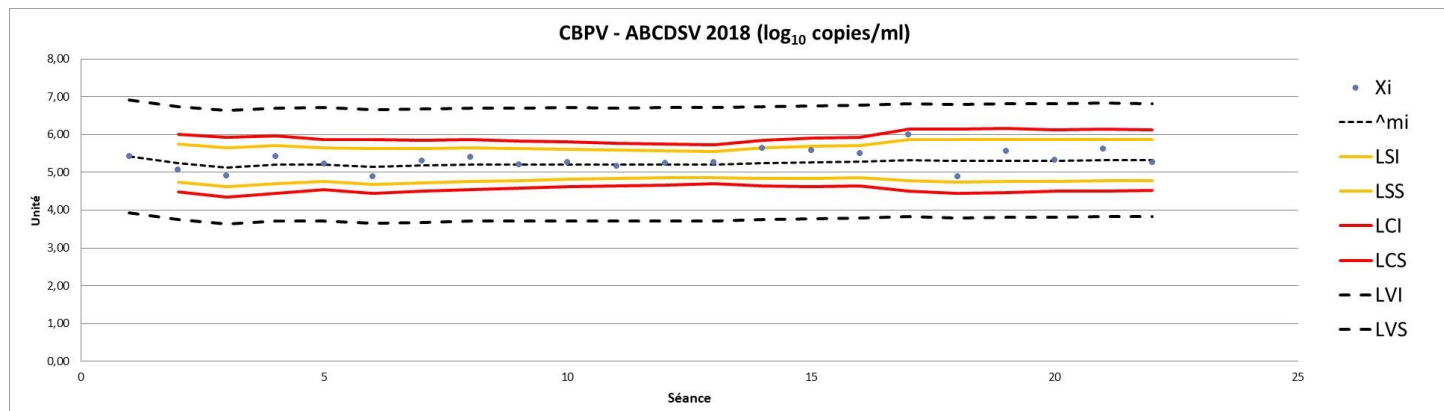
10% mortalité d'abeilles

41% *V. destructor*

Le DWV-A serait plus virulent que le DWV-B (Kevill et al., 2019)

# L'incertitude de mesure des charges virales

- Réduire les sources d'incertitudes
  - 5M : matrice, méthode, matériel, milieu, main-d'œuvre
- Mesurer l'incertitude
  - $U = 2 \times \text{Ecart-type de reproductibilité}$



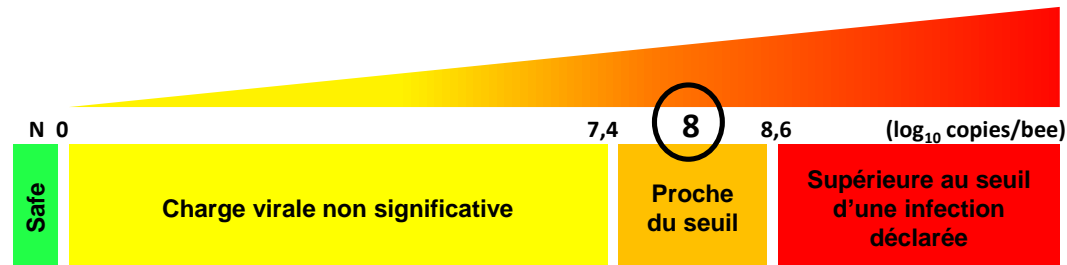
# Impact de l'incertitude de mesure (U)

- Norme ISO 17025 : L'incertitude a-t-elle un impact sur la conclusion (oui ou non) ?

Exemple : diagnostic de la paralysie chronique / CBPV (U = 0,6)

Seuil =  $8,0 \pm 0,6 \log_{10}$  copies/abeille

- Mini =  $7,4 \log_{10}$  copies/abeille
- Maxi =  $8,6 \log_{10}$  copies/abeille



## Diagnostic virologique : conclusion analytique

Virus détecté	Seuil d'interprétation (log10 copies/abeille)	Virus non détecté	Charge virale < Seuil-U	Seuil-U ≤ Charge virale ≤ Seuil+U	Seuil+U < Charge virale
ABPV	5,0	Virus non détecté dans l'échantillon	Virus détecté à une charge virale non significative	Virus détecté à une charge virale proche du seuil associé à une infection déclarée	Virus détecté à une charge virale évocatrice d'une infection déclarée
BQCV	8,0				
CBPV	8,0				
DWV-A	6,0				
DWV-B	7,0				
SBV	9,0				

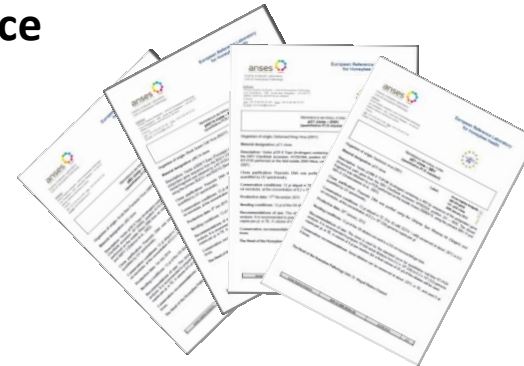
### Importance de replacer ces résultats/conclusions dans le contexte « terrain » :

(signes cliniques observés, autres résultats d'analyses, commémoratifs, contexte épidémiologique...)

Dans un contexte souvent multifactoriel et de co-exposition...

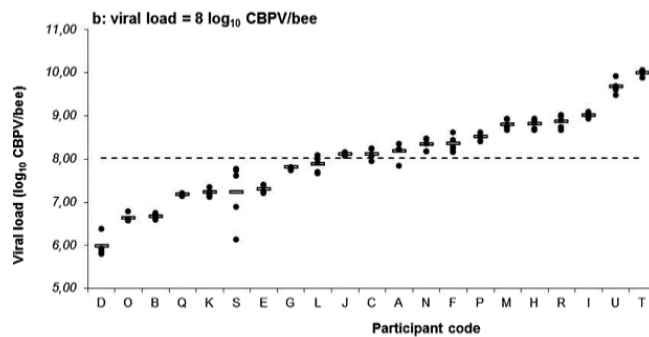
# Un réseau de laboratoires français

- **Méthodes et matériaux de référence**



- **Essais inter-laboratoires d'aptitude**

Exemple du CBPV<sup>1</sup>



**Objectifs :**  
Garantir la fiabilité,  
et l'homogénéité des  
résultats entre laboratoires  
... et la qualité des données  
collectées dans le cadre  
d'études, et de dispositifs de  
surveillance

1 : Schurr et al., 2017



## Anses Sophia Antipolis : les virologistes de l'abeille

**Eric Dubois**

**Frank Schurr**

**Amandine Tison**

