

Des abeilles...

...aux poissons !



Camille Houdelet





Des abeilles...





aux poissons...!



Effondrement des colonies d'abeilles domestiques

Introduction

Résultats

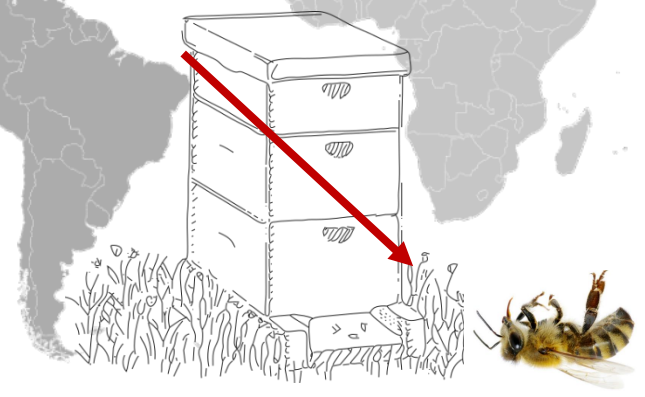
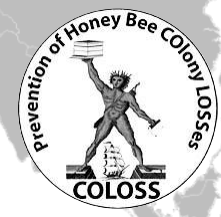
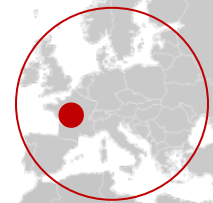
Conclusion



2007-2008
35,8% de perte
(vanEngelsdorp *et al.*, 2009)



2017-2018
29,4% de perte
(Benkirane *et al.*, 2018)



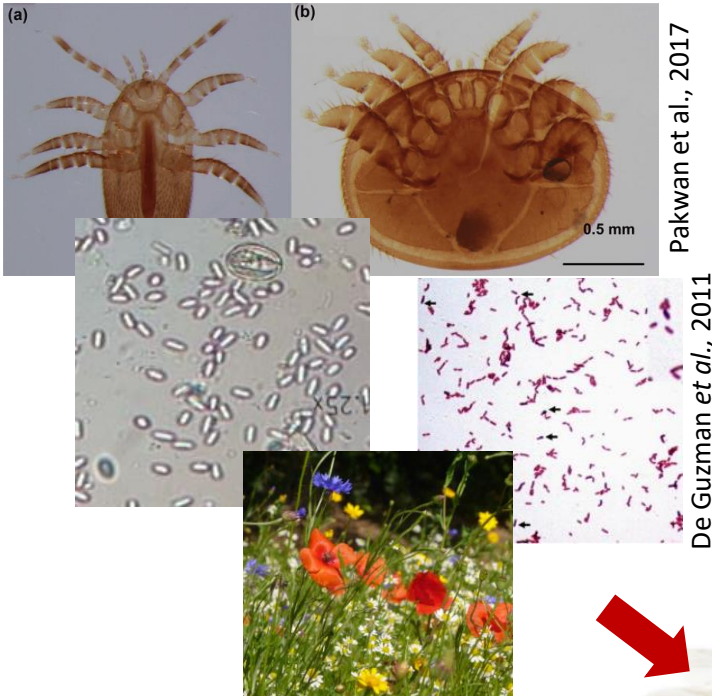
Les facteurs de stress et leurs impacts

Introduction

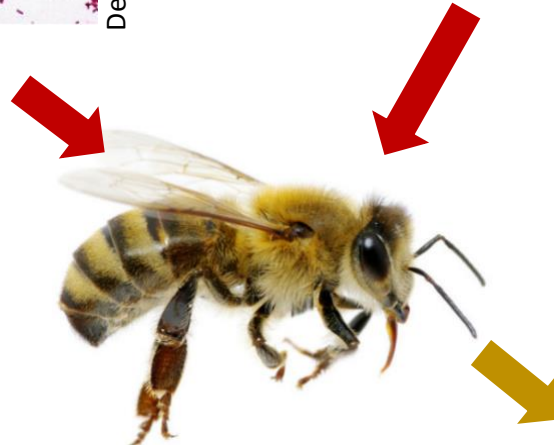
Résultats

Conclusion

Biotiques



Abiotiques



Réponses de l'abeille

- Immunité sociale
- Immunité individuelle

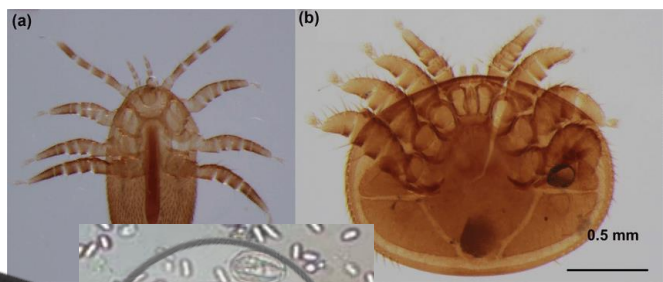
Les facteurs de stress et leurs impacts

Introduction

Résultats

Conclusion

Biotiques



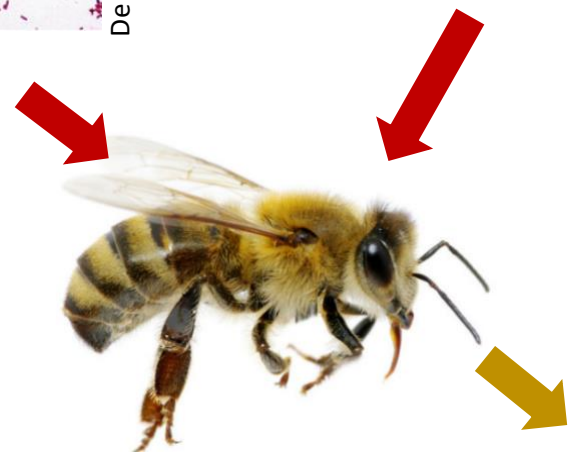
Pakwan et al., 2017

De Guzman et al., 2011

Nosema ceranae
Nosema apis

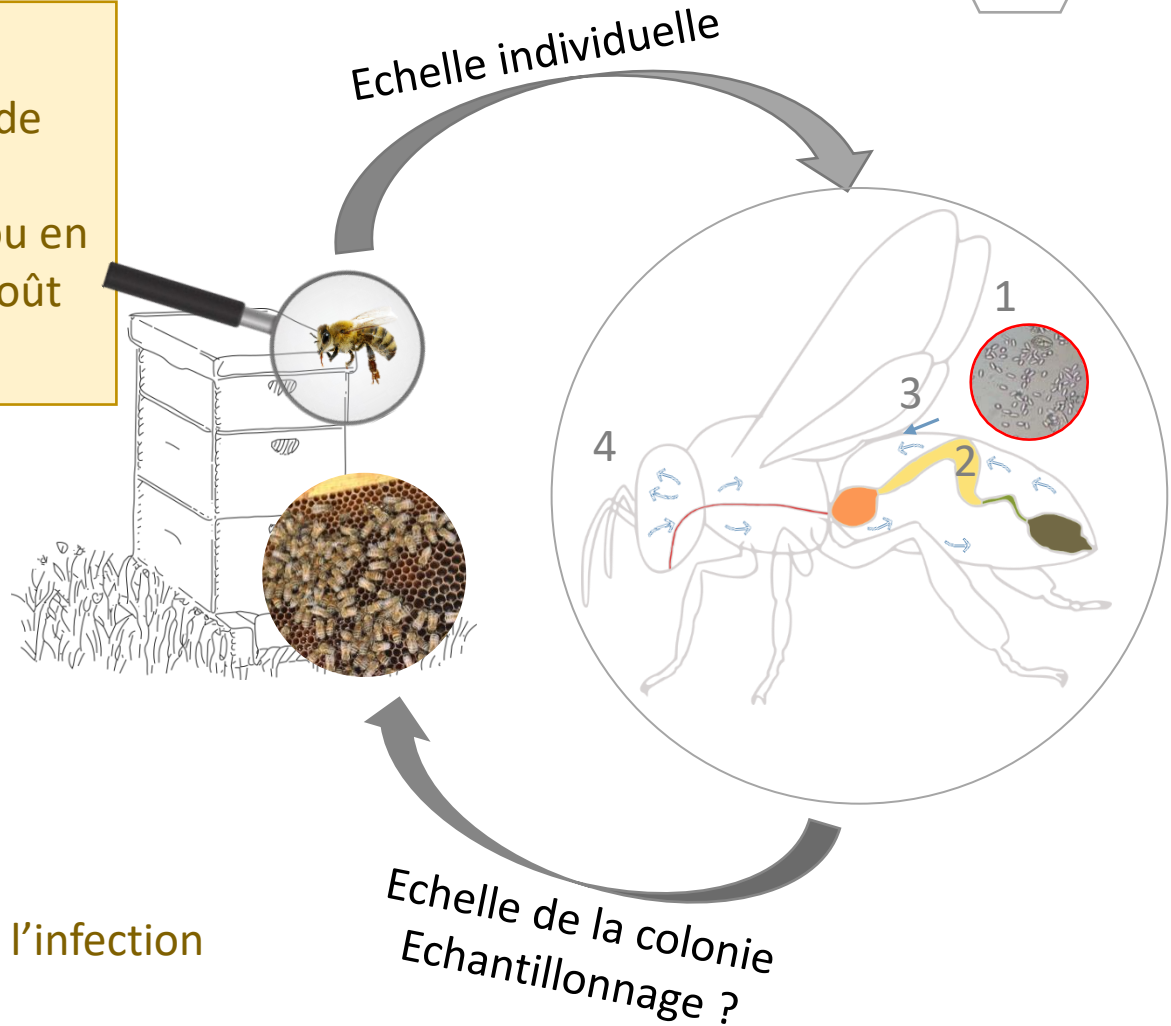


Abiotiques



- Réponses de l'abeille
- Immunité sociale
 - Immunité individuelle

Développer des outils de diagnostic/pronostic utilisables sur le terrain ou en laboratoire à moindre coût



Identifier des biomarqueurs de l'infection

J0
Emergence



Collecte (max. 24h)

Sirop



24h dans les conditions de laboratoire

J1
Jeûne

Rien
ou
Eau



15h dans les conditions de laboratoire

J2
Infection exp.



Abeilles nourries individuellement jusqu'à consommation totale

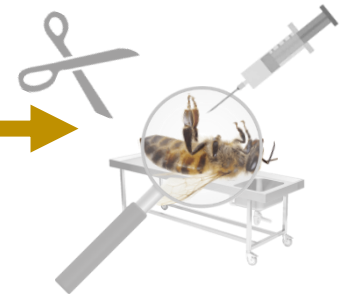
Chaque cône contient 100 μL de sirop avec 10^5 spores (sirop à 50%)

J3
Transfert dans les cages

Sirop



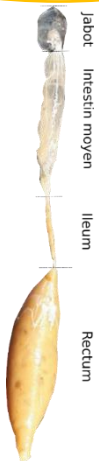
J6, J14 ou J15
Collectes tissus post-inoculation



Apport méthodologique



Dissection
Tube Digestif



Collecte
hémolymph



Collecte
corps entier



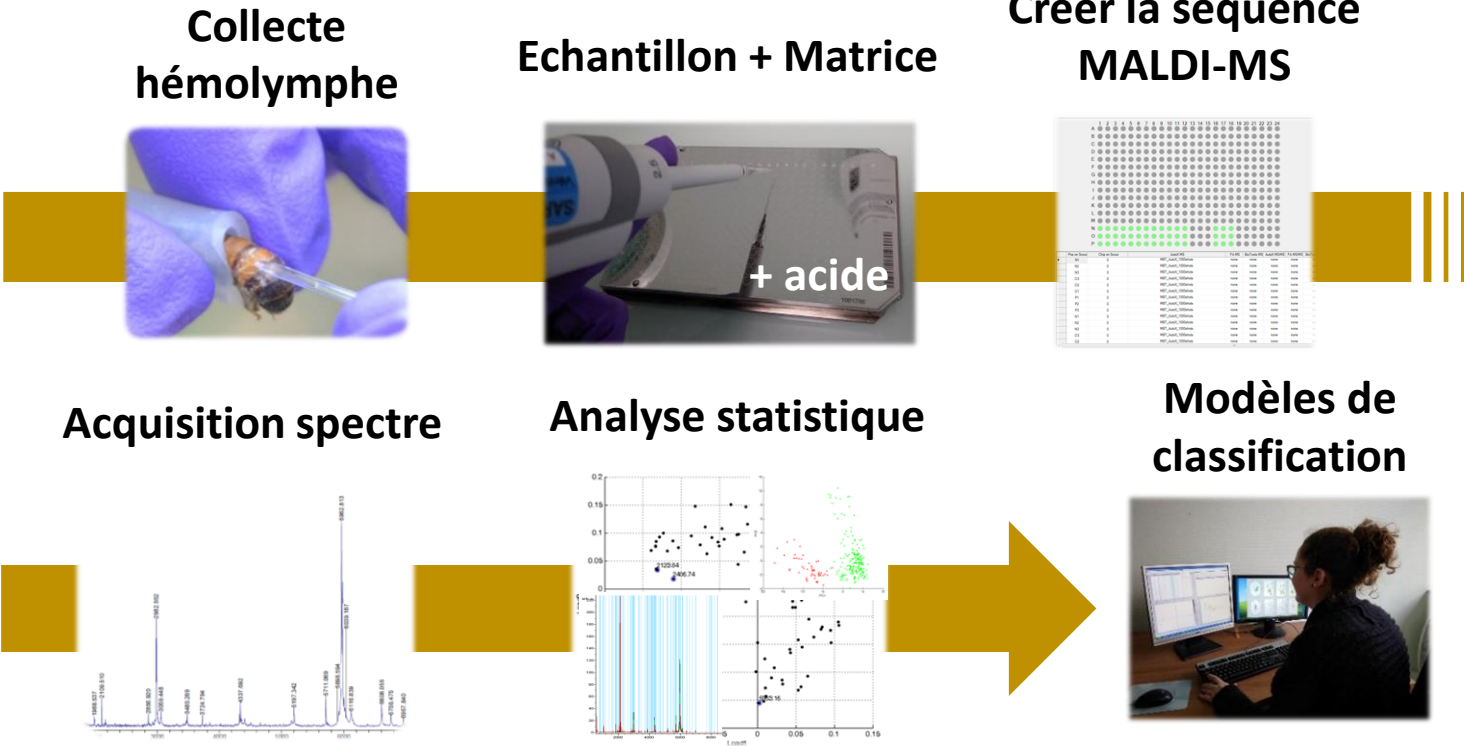
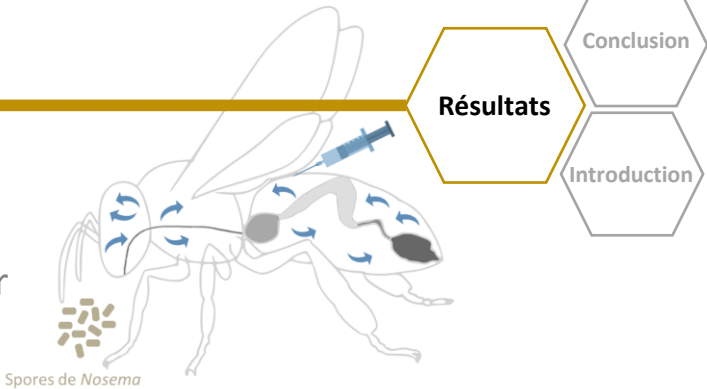
Approches de spectrométrie de masse :

- LC-ESI-MS/MS
- MALDI-BeeTyping®
- Imagerie MALDI (IMS)

Principe de MALDI BeeTyping®



2013-2016 : Projet HBT
5 partenaires
Financé par FEAGA* et France Agrimer
Arafah et al., Proteomics 2019



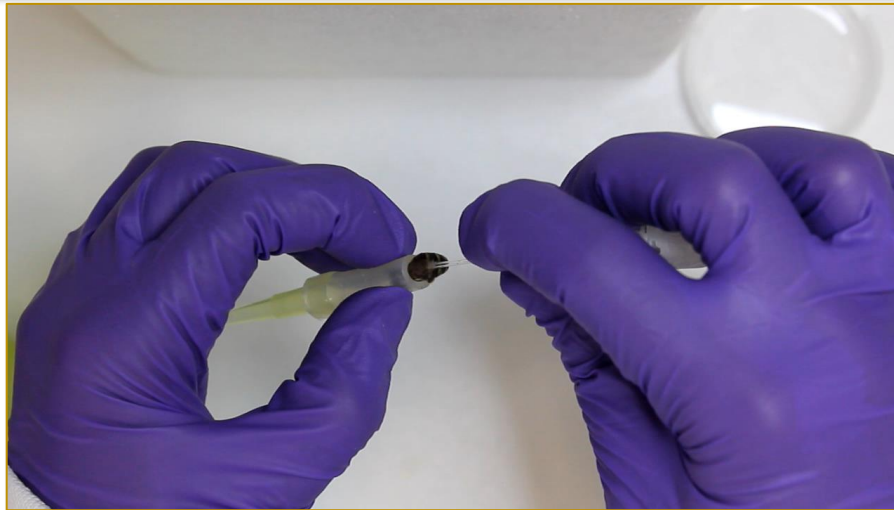
* Fonds européen agricole de garantie

Démonstration d'un prélèvement d'hémolymphe

Résultats

Conclusion

Introduction

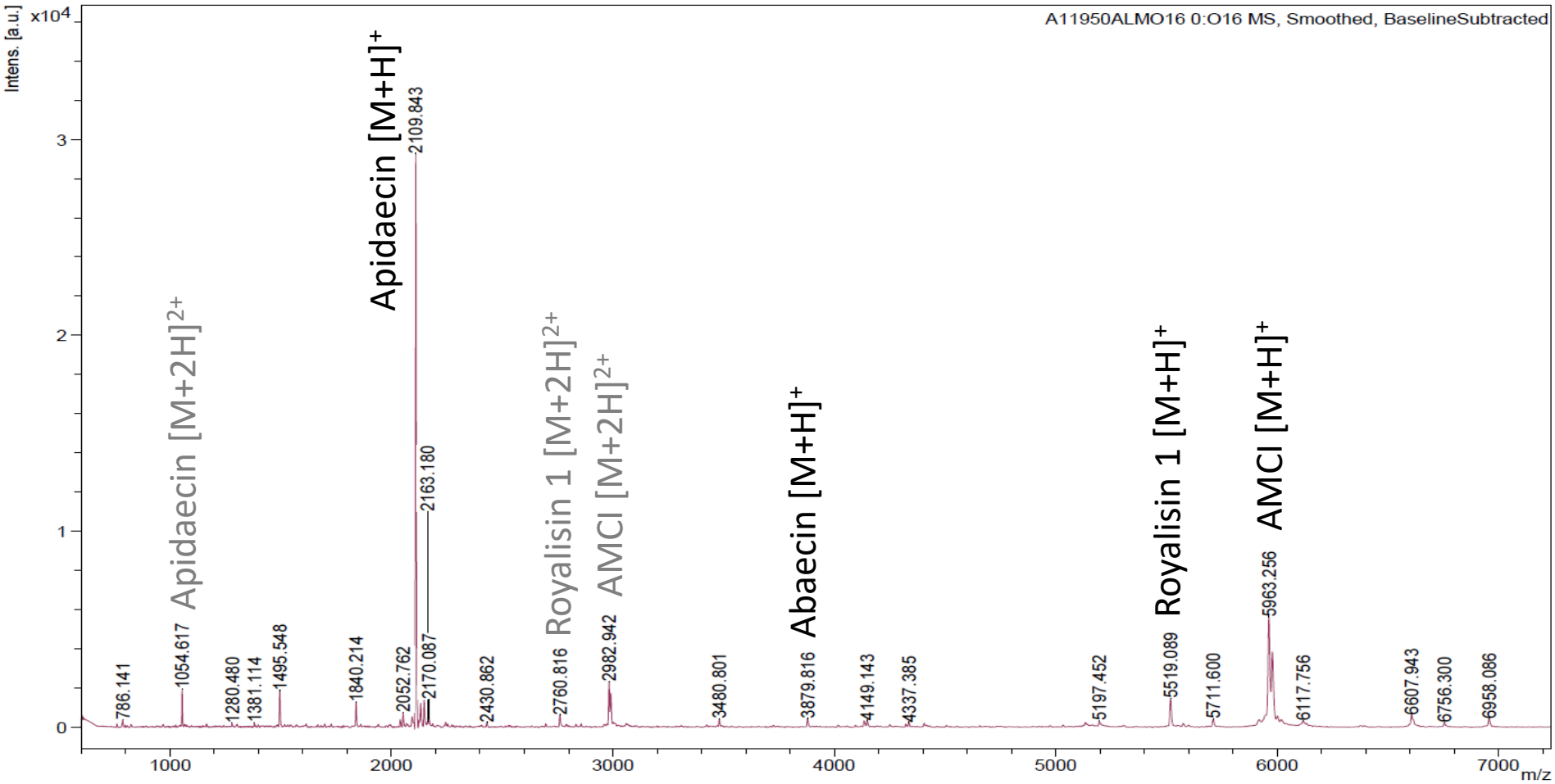


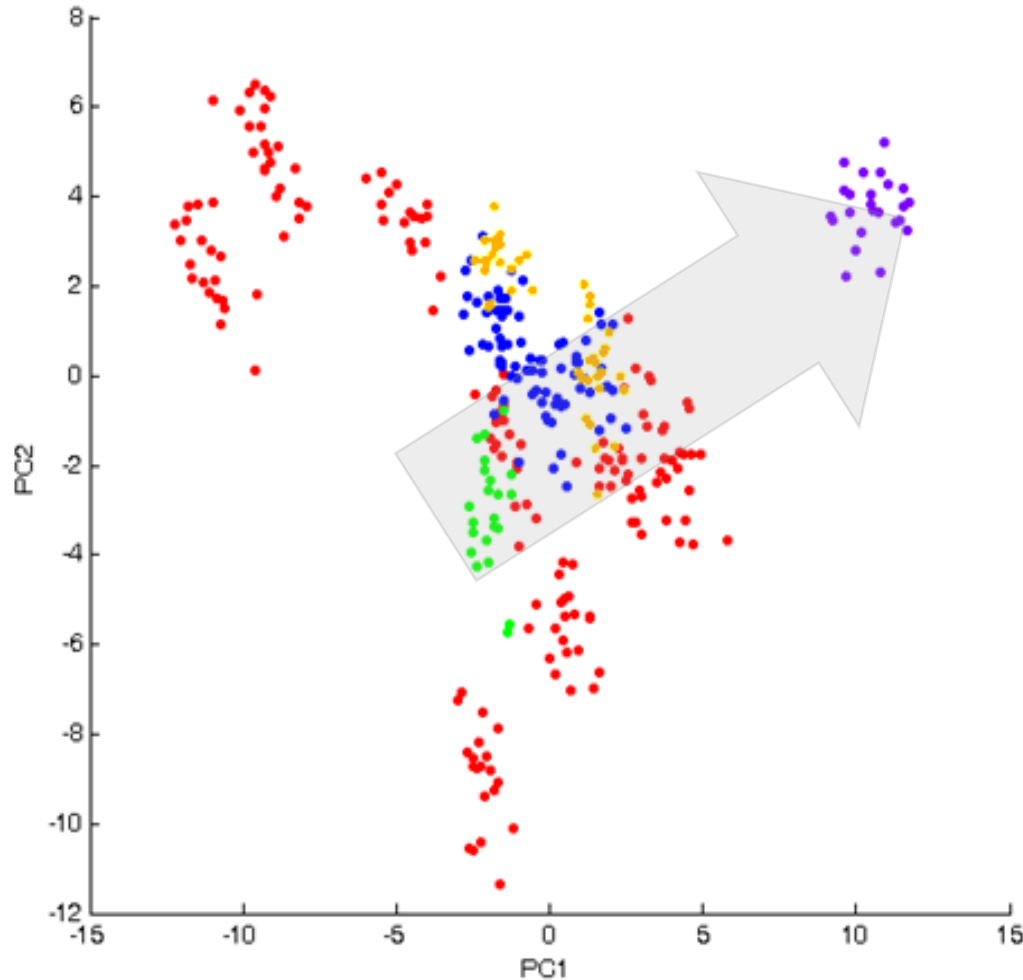
Spectre de masse d'un échantillon d'hémolymphe

Résultats

Conclusion

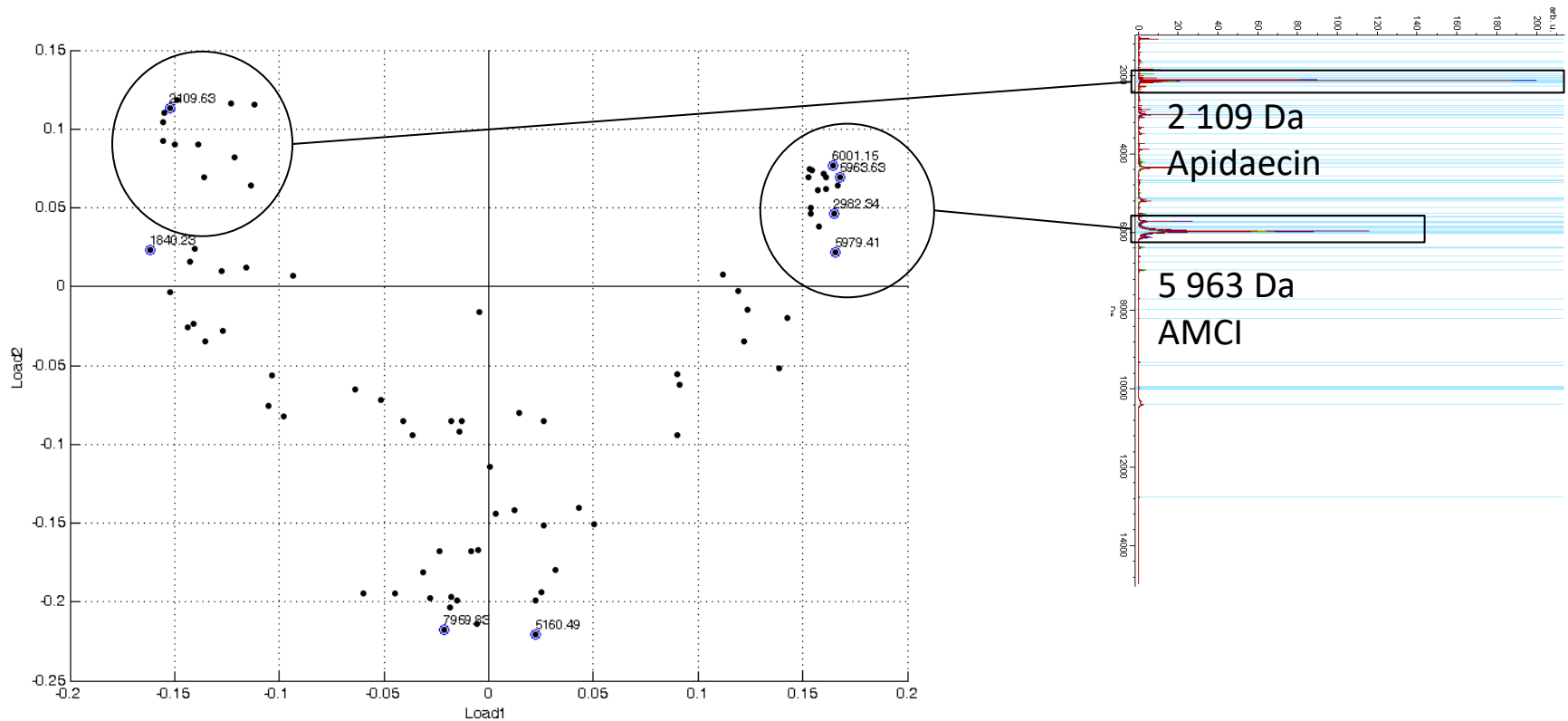
Introduction



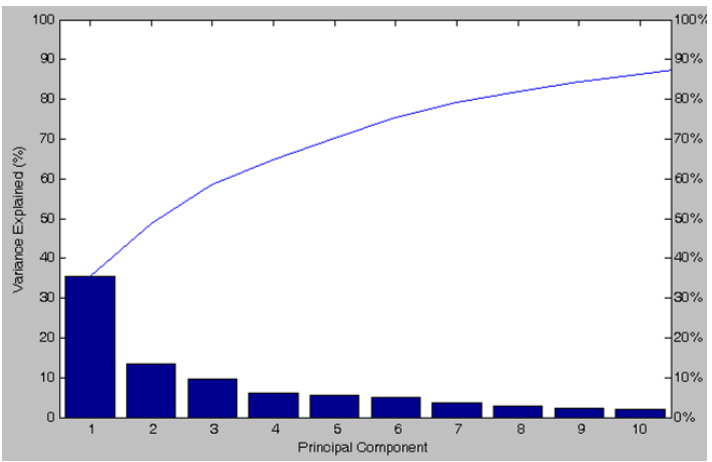
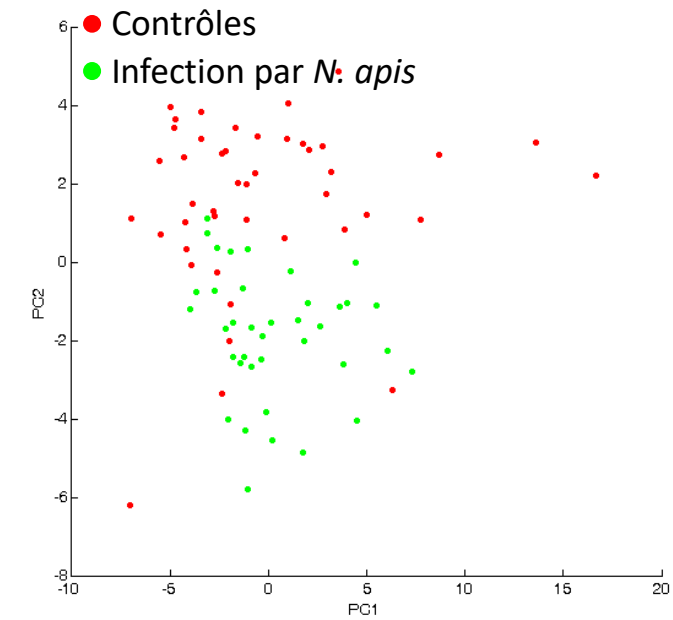


- Contrôles
- $< 1.10^5$ spores/abeille
- $2-6.10^5$ spores/abeille
- $10-22.10^5$ spores/abeille
- $> 40.10^5$ spores/abeille

Pools d'hémolymphe
Infection *N. ceranae*



Impact de *N. apis* sur le système circulant 13 Jp.i.



Masses (Da)	Différence entre les moyennes	Intensité moyenne (u.a) Contrôle	Intensité moyenne (u.a) Infectée	p-value T-test	p-value Mann-Whitney	p-value Anderson Darling
1055,22	1,3	2,49	3,79	0,0253	0,000539	< 0,000001
2069,26	0,6	4,04	4,63	0,325	0,0116	0,000101
2125,73	15,21	11,11	26,32	0,00122	< 0,000001	< 0,000001
2991,23	1,38	10,03	11,41	0,412	0,0153	< 0,000001
3005,19	2,46	4,52	6,98	0,000182	0,0000315	< 0,000001
3350,06	1,62	4,64	3,02	0,00317	0,00446	< 0,000001
4362,58	1,11	5,96	4,84	0,0253	0,0138	0,414
5200,51	0,73	1,97	2,7	0,00118	0,0000387	0,0108
5210,8	0,85	1,92	2,77	0,000202	< 0,000001	0,0106
5605,53	0,44	1,46	1,9	0,0562	0,0121	0,00000522
5750,11	1,21	4,4	3,18	0,00118	0,000757	0,0736
5772,46	0,64	2,61	1,97	0,000872	0,000478	0,414
5791,44	0,69	2,37	1,69	0,0000843	0,0000387	0,0425
5921,1	4,54	16,05	11,51	0,000182	0,000108	0,388
5965,4	20,71	70,87	50,16	0,000986	0,000757	0,209
5981,03	15,64	68,82	53,17	0,00317	0,00325	0,38
6121,77	1,07	5,96	4,89	0,027	0,0116	0,233
6289,1	0,67	1,47	0,8	0,0000966	0,0000387	0,0000027
6304,27	0,66	1,46	0,79	0,0000657	0,0000315	0,0000061
8192,09	0,13	0,54	0,67	0,0881	0,000283	< 0,000001
9344,49	0,07	0,36	0,44	0,0253	0,0114	0,38
9375,55	0,09	0,33	0,41	0,000986	0,000757	0,228
9396,36	0,1	0,34	0,44	0,000719	0,000392	0,0604
11951,58	0,05	0,38	0,33	0,0388	0,0264	0,414

Mise en place d'un dosage colorimétrique



Substrat de la réaction

***N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide** + H₂O

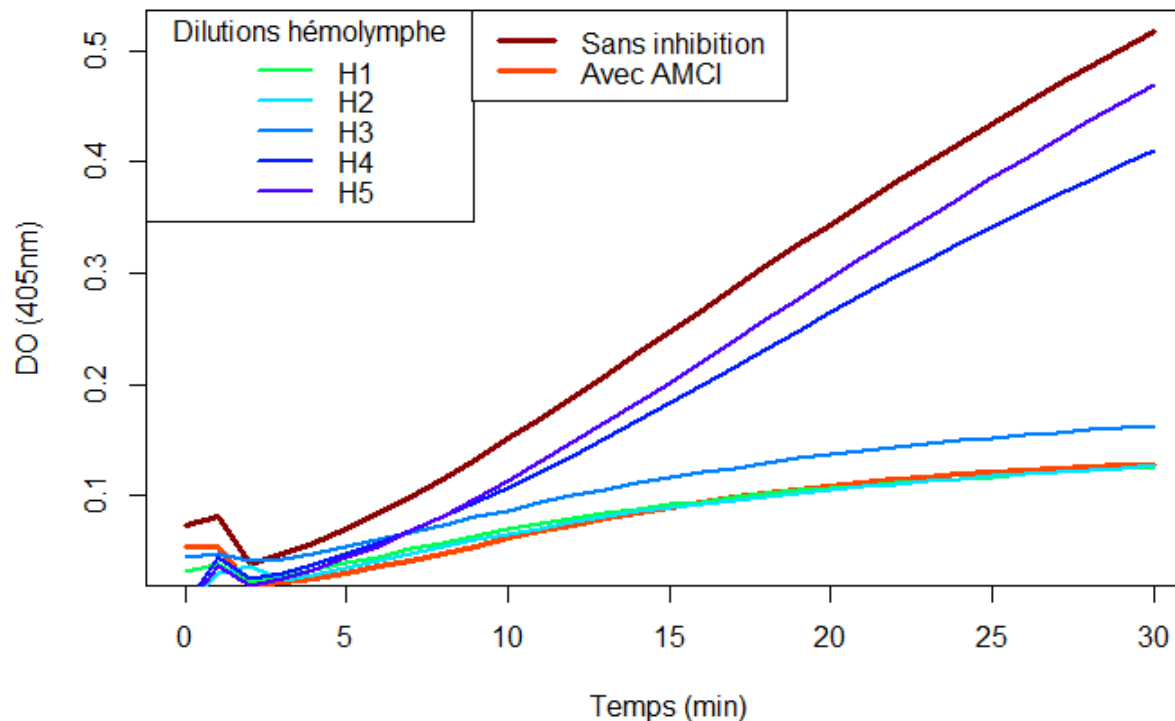
Enzyme

Chymotrypsine

Produits de la réaction
Apparition d'une coloration jaune

4-nitroaniline + ***N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe**

Bania *et al.*, 1999



H1 : non diluée

H2 : dilution 1/5

H3 : dilution 1/10

H4 : dilution 1/100

H5 : dilution 1/1000

— : AMCI purifié

— : Sans inhibition

Développement d'un kit colorimétrique

- 1 Compléter notre base de données microsporidies
Suspensions microsporidies
MALDI Biotyping

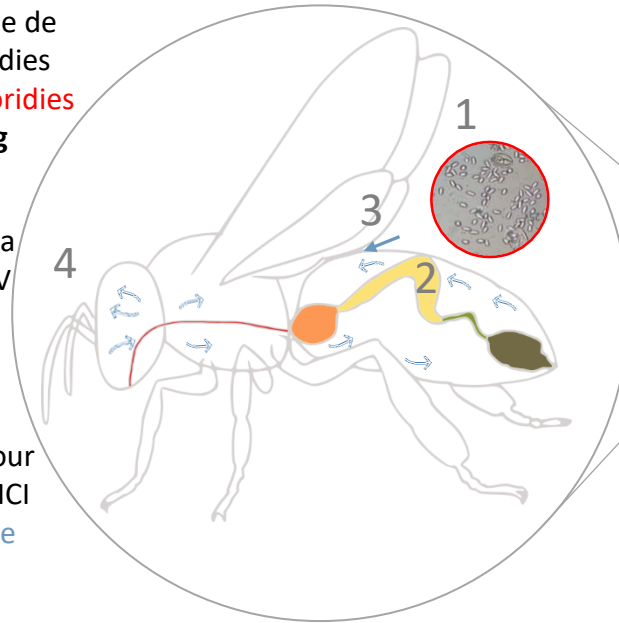
- 2 Développer un kit de pronostic sur la base de l'expression du Collagène IV
Broyat de TD
LC-ESI-MS/MS et LFQ

- 3 Approfondir les analyses pour comprendre le rôle de l'AMCI
Hémolymphe d'une abeille
MALDI BeeTyping®

- 4 Acquérir de nouvelles images d'abeilles infectées par *Nosema spp.*
Corps entier
MALDI-IMS

Développement des kits de pronostic/diagnostic

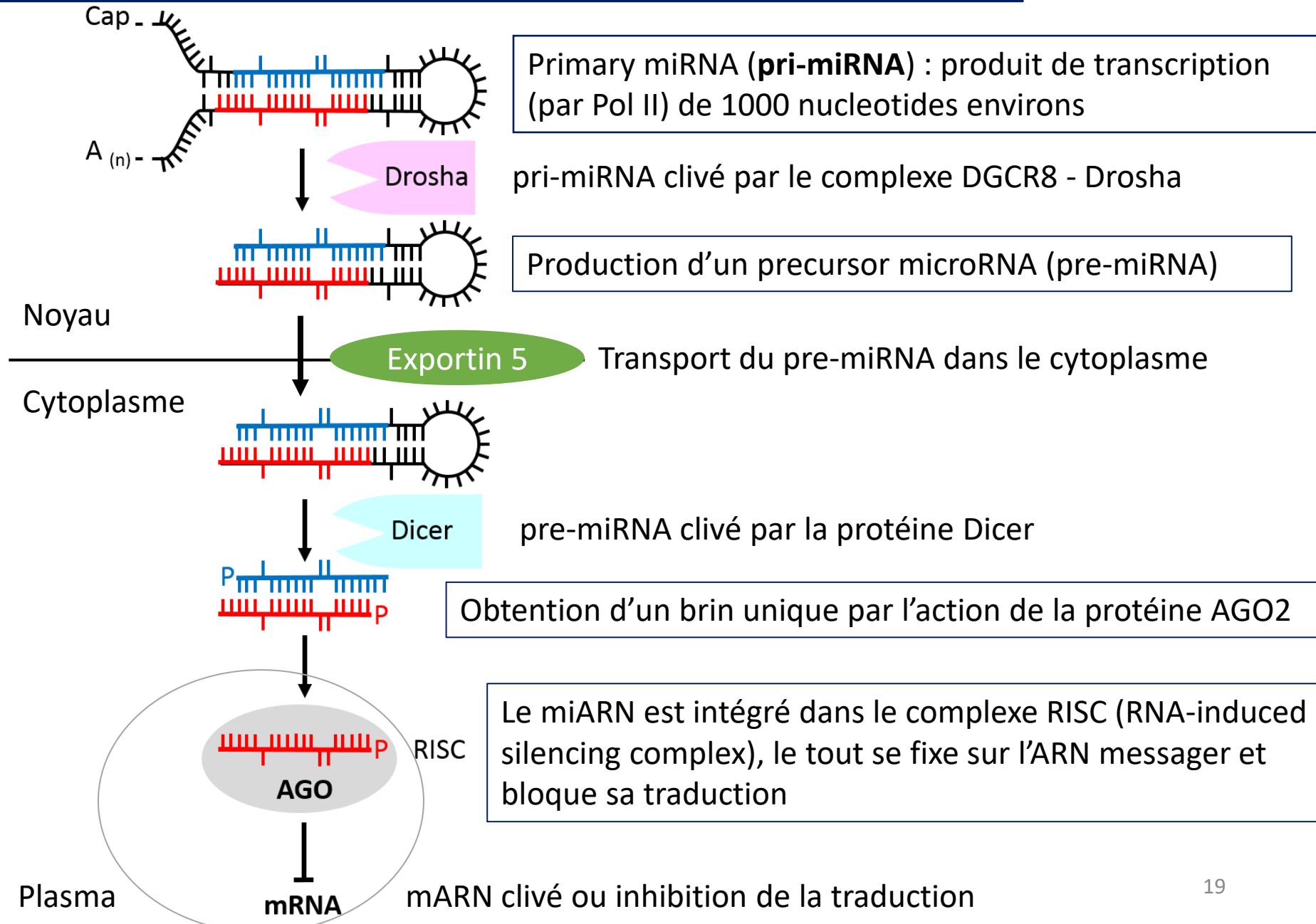
Application au suivi de la santé d'une colonie





Projet FEAMP porté par Dr Benjamin Geffroy

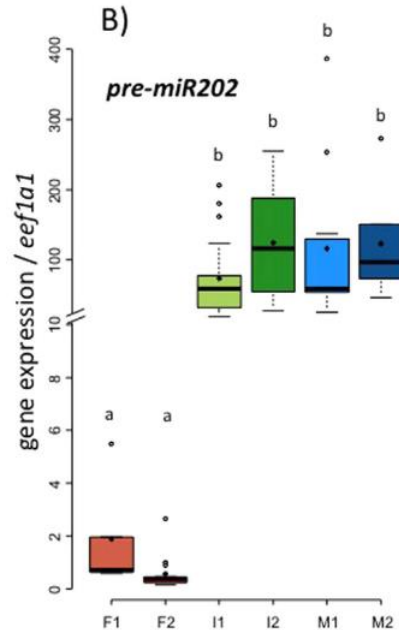
Les miARN – biogénèse et mode d'action



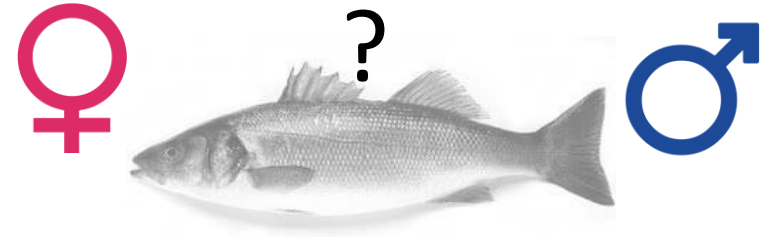
Les miARN – marqueur du sexe

Il existe des miARN différentiellement exprimés d'un tissu à l'autre :

- Chez l'anguille pre-mir202 (Geffroy et al., 2016)



- mir202-3p retrouvé chez le flétan (Bizuayehu *et al.*, 2012)
- autres candidats (let-7a et miR-143), chez medaka miR-202-5p (Qiu *et al.*, 2018)



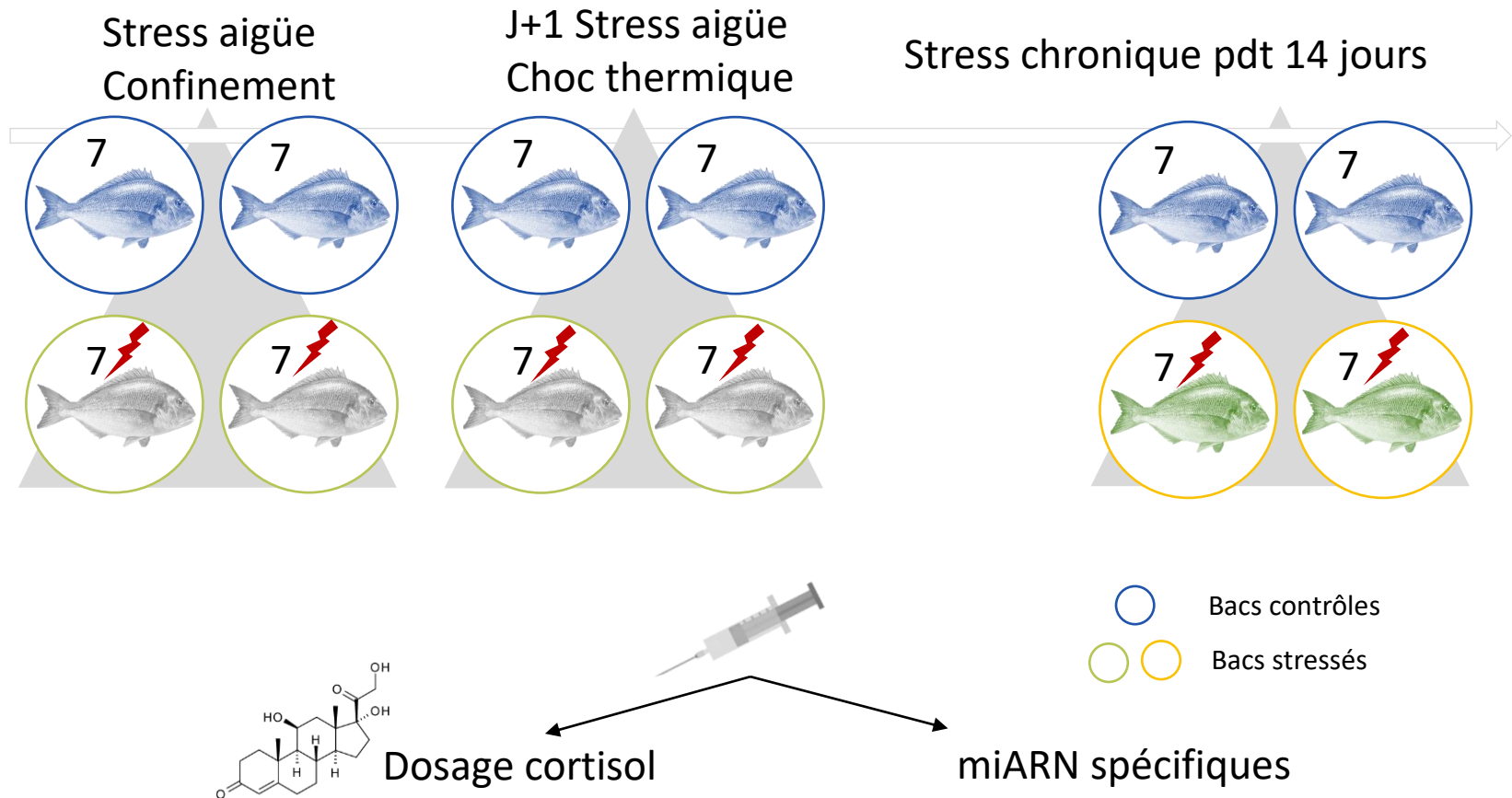
miARN dans le plasma?



Premiers candidats identifiés chez le bar

Les miARN – marqueur de stress

Impact du stress sur la croissance, la reproduction, le système immunitaire...



Intérêt pour problématiques Aquacoles & Halieutiques !



Six espèces



Bar



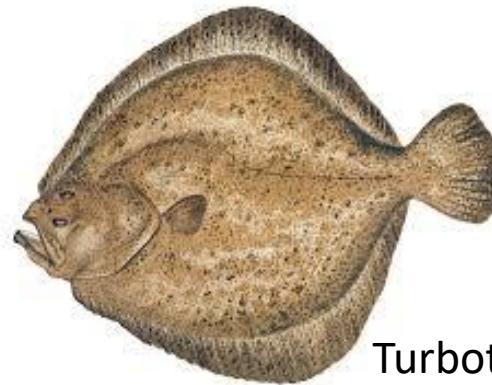
Esturgeon



Daurade



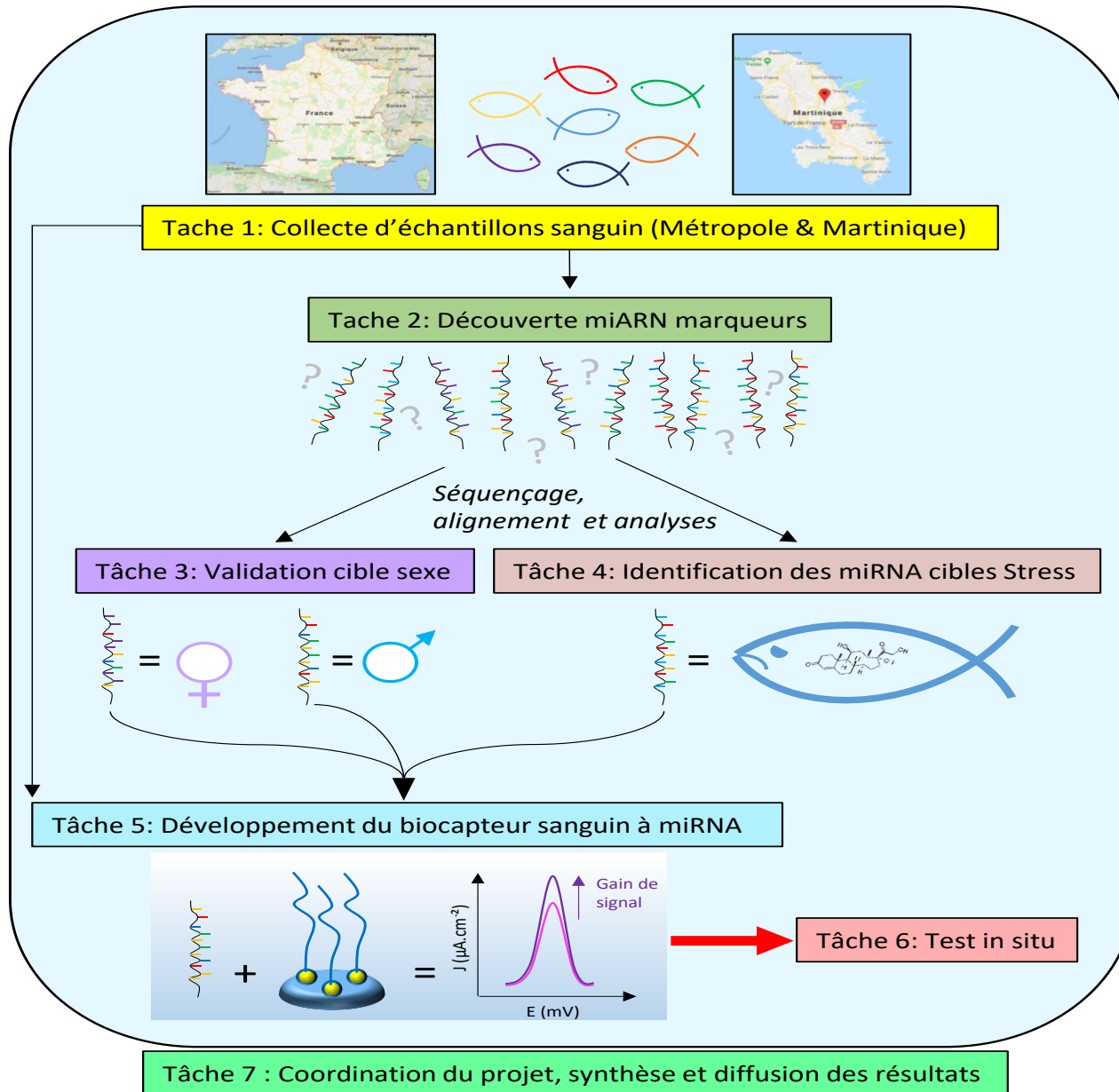
Maigre



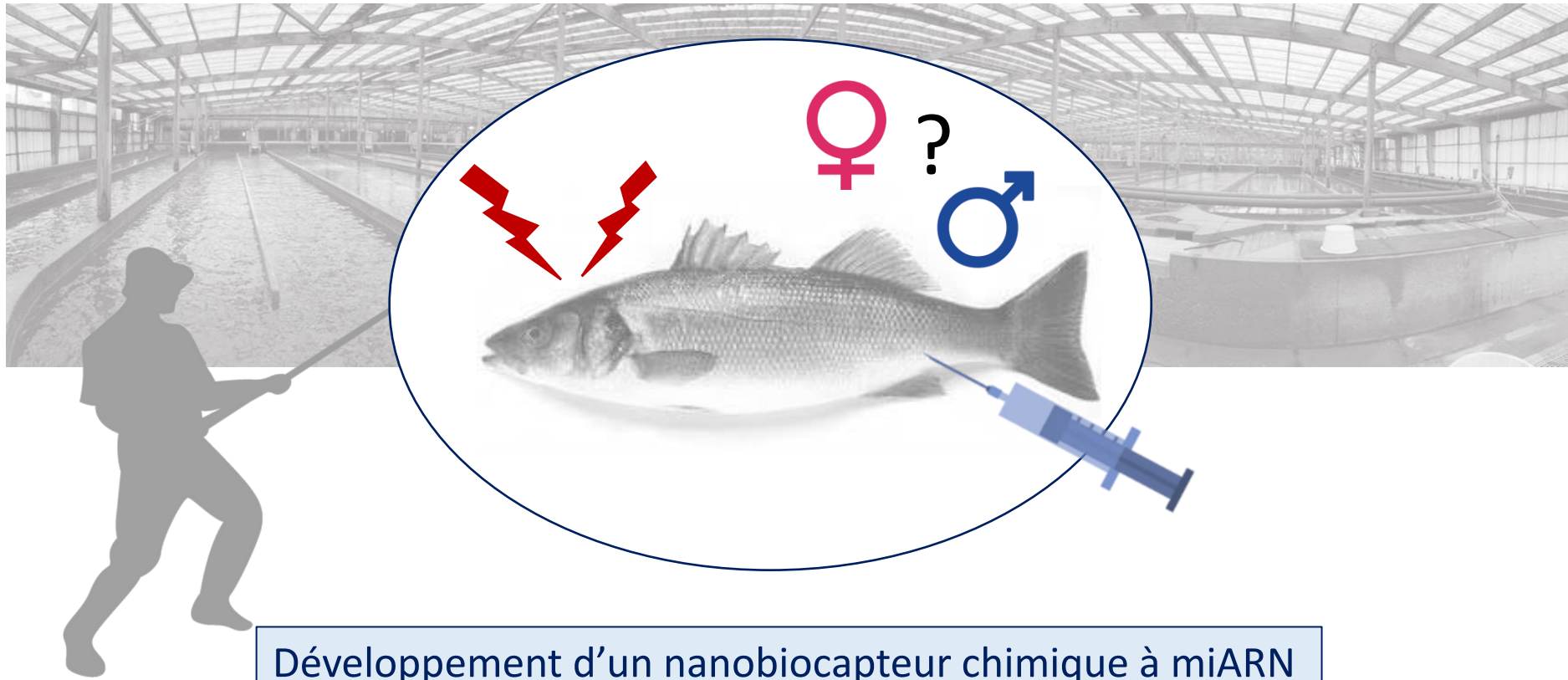
Turbot



Ombrine



Objectif final



Développement d'un nanobiocapteur chimique à miARN

- Identification du sexe
- Evaluation du stress

=> rapide, peu coûteux et utilisable sur le terrain

Remerciements, équipe BioPark, partenaires, financeurs



Equipe de la plateforme BioPark d'Archamps
dirigée par Philippe Bulet



SmartBee team dirigée par
Panuwat Chantawannakul



Sophie Hermet
(UM)



Benjamin Geffroy
(Ifremer)



Eva Blondeau Bidet
(CNRS)



Alexander Goikoetxea
(Ifremer)





Merci pour votre attention...

Camille Houdelet
Post-Doctorante



Laboratoire IFREMER « Adaptation et Adaptabilité des Animaux et des Systèmes » (3AS)
Station Expérimentale d'Aquaculture Ifremer Palavas-les-Flots
camille.houdelet@ifremer.fr

©Camille Houdelet