

## **Analisi del trascrittoma della risposta delle api da miele a *Nosema ceranae* e insetticidi**

**Di J. Aufauvre, B. Misme-Aucouturier, B. Viguès, C. Texier, F. Delbac, N. Blot [tratto da *Plos One* – pubblicato 19 marzo 2014]**

**Abstract (Traduzione):** Le api (*Apis mellifera*) sono costantemente esposte ad una vasta gamma di fattori di stress ambientali, come parassiti e pesticidi. Tra questi, *Nosema ceranae* e gli insetticidi neurotossici [i cosiddetti neonicotinoidi N.d.T.] possono agire in combinazione e portare ad una maggiore mortalità delle api. Abbiamo studiato la risposta molecolare delle api esposte a *N. ceranae*, agli insetticidi (fipronil o imidacloprid) e ad una combinazione di entrambi i fattori di stress. I cambiamenti trascrizionali indotti a livello dell'intestino di mezzo (*midgut*) da questi fattori di stress sono stati misurati in due esperimenti indipendenti, che conciliano un approccio globale della trascrizione di sequenze del RNA con la proiezione dell'espressione di geni selezionati mediante RT-PCR [La **PCR real-time**, denominata anche **PCR quantitativa** o **PCR quantitativa in tempo reale** (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione (reazione a catena della polimerasi o PCR) e quantificazione simultanee del DNA. N.d.T.]. Sebbene le combinazioni *N. ceranae*-insetticidi abbiano indotto una significativa mortalità nelle api, abbiamo osservato che essi non portano ad un effetto sinergico. Secondo i profili dell'espressione genica, l'esposizione cronica a insetticidi non ha avuto un impatto significativo sui geni preposti alla detossificazione, ma reprime l'espressione di geni legati all'immunità. Le api trattate con *N. ceranae*, da solo o in combinazione con un insetticida, hanno mostrato una forte alterazione della risposta immunitaria nell'intestino di mezzo, nonché eventuali modifiche che interessano i rivestimenti della cuticola ed il metabolismo del trealosio [nel metabolismo delle api è lo zucchero fondamentale preposto all'attivazione della muscolatura delle api e quindi parte in gioco fondamentale nella termoregolazione dell'alveare N.d.T.]. Un crescente impatto dei trattamenti sui profili dell'espressione genica è stato identificato con il tempo suggerendo l'assenza di recupero dallo stress che potrebbe collegarsi ai tassi di mortalità più elevati osservati.

**Introduzione (Traduzione):** Le api (*Apis mellifera*), come ogni organismo vivente, sono costantemente esposte ad una ampia gamma di fattori di stress biotici e abiotici. Tra questi, gli agenti patogeni e i pesticidi rappresentano importanti variabili

che influenzano la sopravvivenza delle api. Il parassita microsporidio *Nosema ceranae*, uno dei patogeni più comuni delle api, è un eucariote unicellulare e un parassita intracellulare invasivo che infetta l'intestino di mezzo [*midgut* in inglese]. Il sistema digerente delle api è suddiviso in tre tratti: intestino anteriore, mediano e posteriore. L'infezione di *N. ceranae* interessa principalmente il tratto di mezzo, ove avvengono determinate risposte immunitarie, come vedremo anche nello studio qui proposto. N.D.T.] di *A. mellifera* e induce una malattia denominata nosemiasi. Questo parassita, diffuso a livello mondiale, presenta un'elevata prevalenza nelle colonie d'api [è stato osservato anche su impollinatori selvatici, probabilmente trasmesso ad essi dalle api da miele, che presentano il carico più elevato di questo tipo di patogeno a livello planetario N.d.T.]. È stato dimostrato che le infezioni di *N. ceranae* sono in grado di influenzare lo stato di salute delle api attraverso la soppressione del sistema immunitario, lo stress energetico, la degenerazione delle cellule epiteliali dell'intestino e la riduzione della durata della vita, ragione per cui potrebbe portare allo spopolamento degli alveari. Le api sono inoltre spesso esposte a neonicotinoidi e insetticidi fenilpirazoli, cioè composti neurotossici intensamente utilizzate sulle colture di tutto il mondo [in UE esiste una parziale sospensione cautelativa circa l'utilizzo dei neonicotinoidi N.d. T.] contro i parassiti artropodi. All'interno delle proprie colonie, le api possono essere esposte per via topica o orale a questi insetticidi attraverso diverse matrici (ad esempio polline, miele, cera) e possono così risultare contaminate da basse concentrazioni di questi composti. Tuttavia, l'esposizione cronica a basse dosi di neonicotinoidi e di fenilpirazoli può avere effetti sub letali sulle api, come la perdita di capacità cognitive e anomalie nel comportamento di volo. Inoltre, basse dosi del fenilpirazolo o del neonicotinoide imidacloprid possono portare ad una diminuzione significativa della sopravvivenza delle api in seguito ad esposizione cronica. Fattori di stress ambientali potrebbero interagire tra di loro e potenziare il loro effetto sulla salute e la sopravvivenza degli organismi. Le interazioni tra fattori di stress nelle api possono essere in parte responsabili delle gravi perdite di colonie registrate in tutto il mondo per più di dieci anni. È stata dimostrata la capacità di azione sinergica di *N. ceranae* e insetticidi volta a ridurre l'aspettativa di vita delle api. L'interazione sinergica è definita come una combinazione di fattori di stress che si traduce in un effetto maggiore del previsto rispetto alla cumolazione di esposizioni indipendenti. Un effetto sinergico sulla mortalità è stato osservato in api co-esposte a spore di *Nosema* spp e imidacloprid. Combinazioni di *N. ceranae* e fipronil portano anche ad un effetto sinergico sulla mortalità delle api, qualunque sia la sequenza di esposizione a fattori di stress. Solo pochi dati sono stati raccolti in riferimento alla risposta molecolare delle api a *N. ceranae* e insetticidi e nessun dato sulla risposta molecolare era disponibile circa la

loro combinazione. Negli insetti il sistema immunitario e detossificante risponde rapidamente alle sollecitazioni chimiche e biologiche, e queste risposte avvengono normalmente nell'intestino, dato che questo è l'organo più esposto a molti fattori di stress. Nelle api l'intestino di mezzo è il luogo di infezione da *N. ceranae* ma anche quello esposto principalmente per via orale ai prodotti chimici somministrati. Il nostro obiettivo era quello di indagare la risposta delle api a fattori di stress ambientali biotici e abiotici da misurarsi nell'intestino medio attraverso cambiamenti trascrizionali indotti dal parassita *N. ceranae* e da un insetticida neurotossico (fipronil o imidacloprid), da soli o in combinazione. A questo scopo, abbiamo eseguito due esperimenti indipendenti, che conciliano l'approccio globale alla trascrizione della sequenza RNA con la proiezione dell'espressione dei geni selezionati mediante RT-PCR. L'approccio globale sequenza RNA ha permesso l'identificazione di diversi geni interessanti che sono stati ulteriormente analizzati attraverso RT-PCR, insieme con i geni già segnalati dalla letteratura disponibile.

**Discussione (Traduzione):** Giovani api appena sfarfallate sono state esposte a infezione di *N. ceranae* o esposizione cronica ad un insetticida (fipronil o imidacloprid) o alla combinazione di entrambi, parassita e insetticida. È interessante notare che le concentrazioni previste per il nostro studio di fipronil e imidacloprid si trovavano nelle matrici di polline e miele prese a campione nell'alveare. In questo studio sono stati osservati diversi impatti di fipronil e *N. ceranae* rispetto alle indagini scientifiche precedenti. Le infezioni indotte dal parassita hanno avuto un impatto più severo sulla sopravvivenza delle api rispetto al nostro studio precedente in cui l'infezione di api appena sfarfallate ha comportato una mortalità del 39% degli individui 22 giorni dopo l'infezione. Questo maggiore impatto è stato particolarmente evidente nell'esperimento 2 dove la mortalità ha raggiunto un massimo del 51% di api dopo solo 12 giorni di infezione. Inoltre, abbiamo osservato un impatto significativo sulla sopravvivenza delle api in gruppi esposti a concentrazioni di fipronil di 1,3 mg/L o 2 mg/L. Pertanto le dosi di insetticida ricevuto non erano sub letali, contrariamente ai precedenti studi effettuati con un'esposizione di fipronil paragonabile alla cronica. Nessuna sinergia tra *N. ceranae* e fipronil è stata osservata in questo studio mentre ha portato ad un effetto sinergico relativo alla mortalità delle api in studi precedenti. L'assenza di sinergia potrebbe essere legata alla già alta incidenza dei singoli trattamenti, che avrebbe potuto prevenire ulteriori potenziamenti, e tutti questi effetti potrebbero essere dovuti al ciclo biologico delle api ed ad altri elementi come le risorse, altri contaminanti e agenti patogeni che potrebbero avere un impatto sulla durata di vita delle api. Infatti, una contaminazione

di virus veicolati da *Varroa destructor* è stato rilevato nei dati della RNA-Seq e altri due virus, il virus della cella reale nera e il virus delle ali deformi, sono stati identificati mediante RT-PCR in campioni di RNA. La presenza di virus nelle api durante gli esperimenti potrebbe essere più comune di quanto si pensi, considerato che anche altri studi hanno rilevato la contaminazione del RNA da parte di virus. Rispetto al fipronil, l'esposizione a imidacloprid (2mg/L) non ha portato ad un significativo aumento della mortalità individuale, cosa che implica che le dosi assorbite dalle api potrebbero essere considerate come sub letali. Questo risultato è conforme ai dati di Alaux et al (2010), in cui la sinergia tra i parassiti *Nosema ceranae* e imidacloprid è avvenuta solo con un'alta concentrazione (70mg/L) ma non con 0,7 0 7 mg/L di imidacloprid. La risposta dell'intestino di mezzo delle api al parassitismo e all'esposizione ad insetticidi è stata analizzata in due esperimenti indipendenti utilizzando RNA-Seq e RT-PCR. Una forte correlazione è stata riscontrata tra cambiamenti di espressione genica in entrambi gli esperimenti. Un forte effetto di invecchiamento delle api è stato riscontrato sulla base dei profili di espressione genica delle componenti principali sulla base dei dati di RNA-Seq. Queste analisi hanno anche suggerito che parassita e insetticidi avevano un bassissimo impatto sull'espressione genica globale un giorno dopo l'inizio dell'esperimento, mentre sono risultati influenti a partire dal 7° giorno. Inoltre, un numero maggiore di geni mostrava cambiamenti di espressione da RT-PCR al 11° giorno rispetto che al 7° giorno, suggerendo così che parassita e insetticidi hanno un impatto crescente sull'espressione genica con l'andare del tempo. In generale, i primi cambiamenti di espressione genica potrebbero riflettere la risposta iniziale delle api ad una perturbazione moderata dell'omeostasi intestinale, indotta dal parassita e/o dai trattamenti insetticidi. Nei giorni successivi, le amplificazioni relative ai cambiamenti di espressione genica potrebbero riflettere l'impossibilità nelle api di recuperare questa perdita di equilibrio, con conseguente crescente squilibrio che può portare alla morte prematura. Una sotto-regolazione significativa di diversi geni potenzialmente implicati nella risposta immunitaria è stata rilevata in api infette da *N. ceranae* a 7 o a 11 giorni dall'infezione. Tra questi geni erano inclusi i serina-proteasi SP22 e SP40, glucosio deidrogenasi 2, lisozima 1, hymenoptaecin e GMC ossido riduttasi 3. In aggiunta alla sua funzione di digestione del cibo, serina-proteasi partecipa negli insetti alla cascata di regolamentazione delle reazioni legate alle risposte immunitarie con conseguente attivazione rapida di Toll e profenolossidasi. I peptidi antimicrobici come hymenoptaecin sono elementi chiave nell'immunità innata degli insetti contro batteri e funghi. Hymenoptaecin è stato l'unico peptide antimicrobico significativamente influenzato dall'infezione di *N. ceranae* nel nostro studio, mentre abecina, apidecina e defensina, sono risultati inibiti in altri studi. Glucosio

deidrogenasi è una componente del sistema immunitario umorale associato alla risposta cellulare per incapsulamento. Geni correlati sono sovra-regolati in risposta a quattro diversi agenti patogeni e l'alterazione di questi geni influenza il tasso di sopravvivenza degli individui infetti. Altri geni sono stati individuati per essere sotto-regolati nell'intestino di mezzo delle api infette da *N. ceranae* in studi precedenti, ma non in quello attuale. Complessivamente questi dati suggeriscono una compromissione delle difese immunitarie dell'ape che possono favorire lo sviluppo del parassita. I pesticidi possono anche agire sul sistema immunitario degli insetti e fungicidi ed acaricidi hanno rivelato un'azione di sotto-regolazione dei geni correlati al sistema immunitario delle api. Nel nostro studio la trascrizione dei livelli di hymenoptaecina e lisozima erano sotto-regolati in seguito ad esposizione cronica a fipronil e a imidacloprid. Pertanto fenilpirazoli e insetticidi neonicotinoidi potrebbero alterare la risposta del sistema immunitario delle api. Una significativa sovra-espressione del gene codificante chitinasi era rilevato in api esposte a *N. ceranae*, da solo o in combinazione con insetticida, e due geni codificanti le proteine cuticolari sono stati attivati nelle api esposte a trattamenti insetticidi. Questi dati suggeriscono che i rivestimenti della cuticola, che costituiscono un'importante barriera difensiva negli insetti, potrebbero subire modifiche significative in risposta ad un'infezione prodotta dal parassita. Si dovrebbe anche considerare che la membrana peritrofica che circonda il bolo alimentare e protegge le cellule epiteliali contiene chitina, quindi l'infezione da *N. ceranae* potrebbe portare ad un'alterazione della membrana peritrofica. Nell'intestino di mezzo dell'insetto una risposta immunitaria localizzata può essere attuata dalla produzione dei ROS [*reactive oxygen species* ovvero specie di ossigeno reattivo. Sono i radicali liberi a maggiore diffusione. N.d.T.]. Poiché i ROS possono anche avere effetti citotossici sui tessuti ospitanti, un equilibrio tra la produzione e l'eliminazione dei ROS deve essere mantenuto. Altre reazioni coinvolgono enzimi antiossidanti come glutazione perossidasi, catalasi e glutazione-S-trasferasi che sono anche coinvolti nella detossificazione di xenobiotici e in particolare nel metabolismo dei pesticidi. Nel nostro studio, l'espressione di uno dei geni di codifica delle api, catalasi, è stato significativamente ridotto nell'intestino 11 giorni dopo l'infezione da *N. ceranae*. Al contrario, sono state osservate 7 giorni dopo l'infezione da *N. ceranae* da Dussaubat et al (2012) la sovra-espressione dello stesso gene (catalasi), così come altri geni codificanti (glutazione perossidasi monoossigenasi-like 2 e due geni del citocromo P450). Poiché il genoma delle api contiene vari omologhi di questi geni, l'impatto di *N. ceranae* sui processi antiossidanti e disintossicanti appare poco chiaro, anche se sembra che esista una riorganizzazione tra trascrizioni. La misurazione delle attività enzimatiche nell'intestino infettato da *N. ceranae* ha suggerito che tale espressione genica di

arrangiamento porterebbe ad una diminuzione della glutatione perossidasi ed a un aumento dell'attività di glutatione-S-transferasi. Nel nostro studio, né l'insetticida né la combinazione insetticida-parassita portano a cambiamenti significativi nell'espressione dei geni correlati alla detossificazione. Al contrario, una sovraesposizione di 9 geni che codificano CYP/P450s è stato rilevato in larve di api esposte per via orale a imidacloprid (2mg/L) per 15 giorni. Negli insetti, CYP/P450s risultano coinvolti nella resistenza ai pesticidi. Modifiche dovute ad attività di detossificazione erano osservate anche nelle api dopo un'esposizione acuta e topica a dosi sub letali del neonicotinoide thiamethoxam. La bassa espressione di questi geni, che non ha superato lo screening statistico di prova nel nostro lavoro, potrebbe essere collegato all'elevata mortalità osservata in api esposte a fipronil. Modificazioni dell'espressione di numerosi geni correlati al metabolismo del trealosio è stato osservato nel nostro studio. Il gene trehalase-encoding è stato pesantemente sotto-regolato in api infettate da *N. ceranae* all'11° giorno come prevedibile sulla base dei dati precedenti. Questo gene che codifica il trealosio, insieme ad altri due che ne facilitano il trasporto, è stato inibito nelle api esposte alla combinazione *N.ceranae*-fipronil. I geni Trehalases idrolizzano il trealosio e lo inducono a generare glucosio che può essere poi catabolizzato per glicolisi o per via dei pentoso fosfati. Si è dimostrato che nell'emolinfia di bottinatrici infette da *N. ceranae* l'importo di trealosio è risultato inferiore rispetto ai soggetti non infetti, mentre la quantità di glucosio è rimasta stabile, il che suggerisce che l'azione del parassita ha aumentato nelle api il fabbisogno energetico. Trehalases sono anche coinvolti in vari altri processi fisiologici degli insetti come la biosintesi della chitina, il metabolismo collegato al volo o la tolleranza al freddo. La regolazione del gene trealasi può quindi essere collegato a un complessa risposta metabolica, ma ciò avrebbe bisogno di una conferma attraverso l'attività di monitoraggio della trealasi. Diversi geni codificanti fattori di trascrizione erano significativamente sotto-regolati in risposta al parassita e/o al trattamento insetticida, tra cui tre contenenti homeobox proteine, come la proteina Hox. Le proteine Hox sono fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni coinvolti nella crescita e differenziazione durante i processi di sviluppo degli animali, dalle mosche ai mammiferi. Le proteine Hox svolgono anche un ruolo nella risposta immunitaria innata come modulatori del fattore NF-kB e come mediatori di cellule apoptotiche. Un altro fattore di trascrizione (annotato come POU dominio, classe 2, fattore di trascrizione 3-like) è risultato significativamente represso in risposta al fipronil. POU contiene fattori di trascrizione che funzionano come coordinatori di sviluppo e le proteine POU si sono rivelate, insieme ad altri regolatori, come espressione costitutiva di peptidi anti-microbici, promuovendo così una prima linea di difesa contro l'infezione. Gli effetti pleiotropici dei fattori di trascrizione

HOX e POU rendono difficile interpretare la loro regolamentazione, in quanto questa potrebbe essere collegata sia ad una risposta dell'ospite ai fattori di stress (ad esempio protezione, riparazione dei danni, prevenzione dello sviluppo del parassita) o, nel caso di infezione, come una conseguenza dell'azione del parassita ospitato.

**Conclusioni (Traduzione):** I risultati della nostra ricerca mostrano che le combinazioni N. ceranae-fipronil e N. ceranae- imidacloprid non sistematicamente portano ad un effetto sinergico sulla mortalità delle api. Tale variabilità di impatto sulla mortalità potrebbe essere collegato ad ulteriori imprevisi fattori di stress che fanno parte della storia delle api campionate. Nei profili da noi studiati, l'espressione genica dell'intestino di mezzo dell'ape ha rivelato che i trattamenti insetticidi non hanno avuto un impatto sui geni detossificanti delle api, ma hanno indotto ad una sotto-regolazione significativa dei geni collegati al sistema immunitario, suggerendo una possibile immunotossicità dei neonicotinoidi e fenilpirazoli nel caso di esposizione cronica. Le api trattate con N. cerane, da solo o in combinazione con un insetticida, hanno mostrato una forte alterazione dell'immunità dell'intestino di mezzo visibile dopo 7 giorni, con significative modifiche che interessano le barriere di difesa e il metabolismo del trealosio. La sempre maggiore incidenza dei trattamenti con l'andare del tempo suggerisce un crescente squilibrio del trascrittoma delle api che potrebbe riflettere una mancanza di recupero dallo stress e potrebbe spiegare i più elevati tassi di mortalità osservati.

(Traduzione a cura di Luca Tufano)