

A C A D É M I E D E M O N T P E L L I E R

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur de 3ème Cycle
Option : PARASITOLOGIE (PATHOLOGIE COMPARÉE)

RECHERCHES SUR DES VIROSES EPIZOOTIQUES DE LEPIDOPTERES

LIMACODIDAE RAVAGEURS DE PALMACEES

par

Gilles **FEDIERE**

Soutenue le 14 Juin 1983 devant la Commission d'Examen

JURY : MM. C. VAGO, Membre de l'Institut, **Président**

L. EUZET

P. CASSIER

P. MONSARRAT

M. BERGOIN

Station de Recherches de Pathologie Comparée U.S.T.L. - C.N.R.S. - I.N.R.A. - E.P.H.E. Montpellier - Saint-Christol
et
Centre O.R.S.T.O.M. d'Adiopodoumé, Abidjan, Côte d'Ivoire.

A *Véronique*

A V A N T - P R O P O S

C'est avec plaisir que je remercie tous ceux qui m'ont encouragé et aidé dans la réalisation de ce travail.

Que Monsieur le Professeur C. VAGO, Membre de l'Institut, qui me fait l'honneur de présider ce jury soit assuré de ma très profonde gratitude. En m'accueillant à la Station de Recherches de Pathologie Comparée de Saint-Christol, en me faisant bénéficiaire de sa grande expérience et en me dispensant de nombreux conseils, il m'a permis de réaliser ce travail dans les conditions les meilleures.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur P. CASSIER, dont j'ai été l'élève à l'Université Pierre et Marie CURIE - PARIS VI, pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Je lui suis infiniment reconnaissant pour l'attention bienveillante avec laquelle il m'a toujours reçu et lui adresse l'expression de toute ma déférence.

Monsieur le Professeur L. EUZET me fait l'honneur de juger ce travail. Qu'il me soit permis de l'en remercier et de lui exprimer ma déférente gratitude.

Je remercie profondément Monsieur P. MONSARRAT, Président du Comité Technique de Phytopathologie et Zoologie appliquée de l'O.R.S.T.O.M., d'avoir accepté de participer à ce jury. C'est à son instigation que je me suis tourné vers la virologie des insectes dont il a su me montrer tout l'intérêt.

J'adresse mes vifs remerciements à mes collègues du Centre O.R.S.T.O.M. d'Adiopodoumé, M.M. J.C. THOUVENEL, Maître de Recherche, C. FAUQUET et M. NICOLE, Chargés de Recherche, pour m'avoir fait bénéficier de leur compétence, ainsi que Madame A. MONSARRAT et Monsieur P. VENARD pour leur précieuse collaboration technique.

Mes remerciements vont également à Monsieur D. MARIAU, Directeur du département entomologie de l'I.R.H.O et R. DESMIER DE CHENON, Entomologiste, pour leurs conseils et leur aide sur le terrain dans les plantations de Port-Bouët et d'Eloka.

Je ne saurais oublier de remercier tous mes collègues et amis, Stagiaires, Ingénieurs, Techniciens ou Agents administratifs de la Station de Saint-Christol pour l'aide morale et matérielle qu'ils n'ont cessé de me prodiguer et leur esprit d'équipe. J'ai une particulière reconnaissance envers Monsieur G. KUHL pour son aide dans le domaine de la microscopie électronique et sa contribution aux illustrations photographiques, et envers Mademoiselle C. ROURE et Y. SERRE, Mesdames C. BENU, N. BRES et A.M. TRAVIER et Messieurs J.L. DUTHOIT et J. LUCIANI qui ont contribué à mener à bien les travaux exposés dans ce mémoire.

Ce travail a été entrepris dans le cadre d'un programme concerté sur la pathologie virale des ravageurs de palmacées entre l'Université Nationale de Côte d'Ivoire, l'Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux et l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer. Que Monsieur le Professeur A. AOUTI, Monsieur P. BOYER, Représentant permanent de l'I.R.H.O en Côte d'Ivoire et Monsieur B. POUVAUD, Directeur de l'O.R.S.T.O.M. en Côte d'Ivoire, coordinateurs de ce programme, trouvent ici l'expression de ma gratitude pour l'accueil toujours bienveillant qu'ils m'ont réservé.

Enfin mes pensées vont vers ma famille dont l'affection a été un soutien permanent.

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. - BIOLOGIE et PATHOLOGIE VIRALE DES <i>LIMACODIDAE</i>	4
A. INTRODUCTION	4
B. SYSTEMATIQUE	4
C. MORPHOLOGIE	5
D. BIOLOGIE	6
E. AIRE de REPARTITION	6
F. DEGATS sur PALMACEES	7
G. PATHOLOGIE VIRALE des <i>LIMACODIDAE</i>	9
1°/ Introduction	9
2°/ Les baculoviroses	10
3°/ Les réoviroses	11
4°/ Les iridoviroses	12
5°/ Les viroses dues à des virus du groupe virus β <i>Nudaurelia</i>	13
6°/ Les Densonucléoses	13
7°/ Conclusion	14
CHAPITRE II. - ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LES PETITS VIRUS ICOSAEDRIQUES D'INSECTES ...	15
A. INTRODUCTION	15

B. VIRUS à ADN : Les Densovirus	15
1°/ Anatomo-histo et physiopathologie	16
2°/ Spectre d'hôte	19
3°/ Structure et propriétés physico- chimique du virus	20
4°/ Sérologie	22
5°/ Infection expérimentale de cultures cellulaires	22
6°/ Classification	23
C. VIRUS à ARN	23
1°/ <i>Picornaviridae</i>	24
2°/ <i>Nodaviridae</i>	25
3°/ Famille du groupe virus <i>Nudaurelia</i> β ..	26
4°/ Autres virus	27
CHAPITRE III. - MATERIEL et METHODES	29
A. LE MATERIEL VIVANT	29
1°/ Position systématique et morphologie ..	29
a/ <i>Casphalia extranea</i>	29
b/ <i>Latoia viridissima</i>	30
c/ <i>Sibine fusca</i>	30
2°/ Récolte des larves	31
3°/ Maintien au laboratoire	31

B. TECHNIQUES DE PATHOLOGIE EXPERIMENTALE	32
1°/ Techniques d'infection	32
a/ Infection <i>per os</i>	32
b/ Infection par injection	32
c/ Infection de cultures cellulaires .	32
2°/ Recherche et isolement des virus	33
C. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES	34
1°/ microscopie photonique	34
a/ Les frottis	34
b/ Les coupes de tissus	34
c/ Les cultures cellulaires	34
2°/ microscopie électronique	35
a/ fixation des tissus et des cultures cellulaires	35
b/ coloration des coupes	36
c/ contraste des suspensions virales .	36
d/ techniques de visualisation des molécules d'ADN viral.....	37
D. TECHNIQUES de CULTURE de CELLULES d'INSECTES	37
1°/ les lignées cellulaires	37
2°/ méthode de culture	37

E. TECHNIQUES de PURIFICATION des VIRUS	38
1 ^o / broyage et clarification	38
2 ^o / purification sur colonne chromatographique	38
a/ filtration sur gel	38
b/ échange d'ions	39
3 ^o / purification en gradients de densité	39
F. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	39
1 ^o / Dosages colorimétriques	39
2 ^o / Dosages spectrophotométriques	40
3 ^o / Analyses en électrophorèse	40
a/ Electrophorèse des protéines virales	40
b/ Electrophorèse de l'ARN viral	43
4 ^o / Mesure de la densité du virus à l'équilibre	44
5 ^o / Extraction de l'ADN viral	44
6 ^o / Mesure de la T ^o de fusion de l'ADN viral ...	45
7 ^o / Réactivité de l'ADN viral au formaldéhyde .	45
G. TECHNIQUES SEROLOGIQUES	46
1 ^o / Préparation des antisérums	46
2 ^o / Immunodiffusion en gel d'agarose	47

CHAPITRE IV. - ETUDE D'UNE DENSONUCLEOSE CHEZ CASPHALIA EXTRANEA	49
A. INTRODUCTION	49
B. CONTRIBUTION à l'ETUDE du CYCLE BIOLOGIQUE de l'HOTE	50
1°/ Introduction	50
2°/ Morphologie	50
a/ Stade imaginal	50
b/ Stades larvaires	51
c/ Stade nymphal	51
3°/ Biologie et dégâts	52
4°/ Observations sur un arrêt de développement au stade prénympal	54
5°/ Discussion	55
C. MISE EN EVIDENCE de la VIROSE	56
1°/ Introduction	56
2°/ Symptômes et déroulement de la maladie	56
3°/ Histopathologie	57
4°/ Cytologie ultrastructurale	58
5°/ Discussion	59

D. CARACTERISATION du VIRUS	60
1°/ Purification	60
2°/ Structure du virus	61
3°/ Spectre d'absorption en lumière ultra violette	61
4°/ Mesure de la densité du virus à l'équilibre	62
5°/ Composition chimique	62
6°/ Analyse électrophorétique des protéines virales	62
7°/ Caractérisation de l'ADN viral ...	64
a/ Spectre d'absorption en lumière ultra violette ...	64
b/ Réactivité au formaldéhyde .	64
c/ Température de fusion	66
d/ Examen des molécules du génomme au microscope électronique	66
8°/ Etude immunologique	68
9°/ Discussion	68
E. INFECTION EXPERIMENTALE de CULTURES CELLULAIRES	70
1°/ Introduction	70
2°/ Etude en microscopie photonique ..	70
3°/ Etude ultrastructurale	71
4°/ Discussion	72

CHAPITRE V. - ETUDE DE PETITS VIRUS ICOSAEDRIQUES à ARN chez <i>LATOIA VIRIDISSIMA</i> et <i>SIBINE FUSCA</i>	73
A - INTRODUCTION	73
B - DONNEES SUR LA BIOLOGIE DES HOTES	74
C - CARACTERISATION DES DEUX VIRUS	75
1°/ Purification	75
2°/ Structure des virus	76
3°/ Spectre d'absorption en lumière ultra violette	76
4°/ Mesure de la densité à l'équilibre	76
5°/ Nature de l'acide nucléique viral	76
6°/ Analyse électrophorétique des protéines virales	77
7°/ Analyse électrophorétique de l'ARN viral	78
8°/ Caractérisation immunologique ...	79
9°/ Discussion	80
RESUME et CONCLUSIONS	82
BIBLIOGRAPHIE	87
PLANCHES HORS TEXTE	I à XXVIII

I N T R O D U C T I O N

Les recherches ayant pour objectif la mise en évidence de facteurs biotiques susceptibles de limiter les populations naturelles d'insectes ravageurs ont connu au cours de ces dernières années un essor considérable, dans la perspective de trouver des solutions de remplacement à la lutte purement chimique.

Elles ont conduit à reconnaître les maladies infectieuses, notamment les viroses, comme l'un des facteurs naturels les plus efficaces intervenant dans la régulation de ces populations et ont ainsi contribué au développement de la lutte microbiologique contre les insectes ravageurs.

Des études récentes témoignent des larges possibilités que recèle une telle orientation dès lors que les travaux sont menés en parallèle au laboratoire pour déterminer les propriétés fondamentales des agents pathogènes et sur le terrain pour en estimer l'impact. Un exemple particulièrement probant de l'efficacité de telles recherches est celui du contrôle du Coléoptère *Oryctes rhinoceros* ravageur du cocotier dans les îles du Pacifique par un Baculovirus.

Alors que pendant longtemps seuls les Baculovirus ont été pris en considération dans la lutte microbiologique, des travaux récents ont mis en lumière le rôle tout aussi efficace de petits virus icosaédriques à ADN ou à ARN dans le déclenchement naturel ou provoqué d'épizooties.

C'est dans le but de mettre en évidence et d'étudier des maladies virales exploitables en lutte biologique contre les insectes ravageurs des palmacées que l'Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (I.R.H.O.) et l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (O.R.S.T.O.M.) ont initié un programme de prospection d'agents pathogènes de ces insectes. Le grand développement des cultures industrielles de ces oléagineux dans les zones intertropicales du globe (11 millions d'hectares) s'est en effet accompagné de la colonisation rapide de ces nouvelles niches écologiques par plusieurs insectes nuisibles, notamment les Lépidoptères phyllophages. En Côte d'Ivoire, où se situent nos recherches sur le terrain, les Lépidoptères de la famille des *Limacodidae* sont les défoliateurs les plus fréquemment observés dans les plantations industrielles de palmiers à huile et de cocotiers.

Nos recherches ont porté sur l'étude de deux viroses épizootiques découvertes chez deux espèces de cette famille, *Casphalia extranea* et *Latoia viridissima*, et sur la caractérisation des virus responsables.

Après avoir présenté les grands traits de la biologie et de la pathologie virale des *Limacodidae* (Chapitre I), le second chapitre sera consacré à l'exposé des propriétés comparées des petits virus icosaédriques à ADN et ARN d'insectes, groupes auxquels se rattachent les virus que nous avons découverts.

Le 3^e chapitre concerne la description du matériel vivant et des techniques virologiques utilisées au cours de ce travail.

La présentation des résultats fera l'objet des deux chapitres suivants.

Ainsi, après un bref exposé de la biologie de *C. extranea*, sera décrit au chapitre IV comment, à partir d'une épizootie survenue dans une population de ce ravageur, nous avons isolé un petit virus à ADN. Les données de la pathologie ultrastructurale et les propriétés biophysiques et biochimiques du virus et de son génome nous amèneront à proposer son rattachement au genre *Densovirus*.

Le dernier chapitre sera consacré à la caractérisation d'un petit virus icosaédrique à ARN isolé de *L. viridissima* au cours d'une épizootie survenue à l'occasion d'une pullulation de cette espèce dans des cocoteraies. Les propriétés de ce virus et de son génome seront comparées à celles d'un virus de même type isolé à partir de larves d'un *Limacodidae* sud-américain *Sibine fusca* et leur appartenance au groupe des Picornavirus sera discutée.

C H A P I T R E I

BIOLOGIE et PATHOLOGIE VIRALE DES *LIMACODIDAE*

A - INTRODUCTION	4
B - SYSTEMATIQUE	4
C - MORPHOLOGIE	5
D - BIOLOGIE	6
E - AIRE de REPARTITION	6
F - DEGATS sur PALMACEES	7
G - PATHOLOGIE VIRALE des <i>Limacodidae</i>	9
1°/ Introduction	9
2°/ Les baculoviroses	10
3°/ Les réoviroses	11
4°/ Les iridoviroses	12
5°/ Les viroses dues à des virus du groupe <i>virus</i> β <i>Nudaurelia</i>	13
6°/ Les Densonucléoses	13
7°/ Conclusion	14

C H A P I T R E I

BIOLOGIE et PATHOLOGIE VIRALE des *LIMACODIDAE*

A - INTRODUCTION

Parmi les Lépidoptères inféodés aux zones équatoriales et tropicales les représentants de la famille des *Limacodidae* ont été considérés pendant longtemps comme des espèces d'intérêt agronomique mineur.

Le développement récent des cultures industrielles, en particulier de palmacées, en créant de nouvelles niches écologiques, a favorisé la pullulation de certaines espèces de cette famille.

A l'heure actuelle les *Limacodidae* sont considérés avec certaines familles de Coléoptères comme les défoliateurs les plus importants des palmeraies industrielles.

Nous développons dans ce chapitre les principales caractéristiques de cette famille en particulier leur biologie et leur écologie. D'autre part nos travaux ayant abouti à la mise en évidence de nouvelles viroses chez certaines espèces, nous présentons les données bibliographiques concernant la pathologie virale des *Limacodidae*.

B - SYSTEMATIQUE

C'est WALKER qui attribua le statut de famille aux *Limacodidae* en 1855. Cette famille de Macrolépidoptères changea

ensuite souvent de nom : *Eucleidae* - DYAR - 1894, *Heterogeneidae* - MEYRICK - 1895, puis *Cochlidiidae* - DYAR - 1902, avant de reprendre son appellation d'origine désormais seule reconnue.

Les *Limacodidae* sont regroupés avec les *Zygaenidae* dans la super famille des *Zygaenoidea* - GRAVENHORST-1843, caractérisée par des palpes maxillaires très réduits, une trompe atrophiée, des tibias postérieurs à éperons très courts et une nervation alaire relativement primitive. Les quatre ailes possèdent une troisième nervure anale : 1 C (Cu₂) et aux ailes antérieures, la nervure media est conservée mais non bifurquée à l'intérieur de la cellule discoïdale (GRASSE, 1951 ; BALACHOWSKY, 1972 ; ROTH, 1974).

Les *Limacodidae* se différencient des *Zygaenidae* par plusieurs critères : les palpes labiaux sont réduits, la trompe est souvent nulle et des variations apparaissent dans la nervation alaire comme par exemple les nervures 7, 8 et 9 des ailes antérieures qui se présentent sur une tige commune (SEITZ, 1928).

C - MORPHOLOGIE

L'adulte est un papillon au corps robuste, de taille moyenne (entre 20 et 50 mm d'envergure), aux ailes larges, arrondies, abondamment écaillées, de coloration fréquemment brune souvent partiellement teintées de vert. Les antennes sont bipectinées chez le mâle et filiformes chez la femelle.

Le caractère commun des larves est leur forme gibbeuse. La chenille, limaciforme ou testudiforme, a la tête rétractile, les pattes réduites et les fausses pattes nulles, remplacées par des ventouses.

L'animal rampe sur sa face ventrale aplatie d'où son nom de " chenille limace ". La présence fréquente de tubercules et d'appendices coniques latéraux, recouverts de soies urticantes donne aux chenilles un aspect caractéristique. La larve est de plus ornée de couleurs vives, le plus souvent vertes ou bleues.

D - BIOLOGIE

L'adulte a une activité essentiellement nocturne avec une alimentation très réduite en rapport avec ses pièces buccales pour la plupart atrophiées. La durée de la vie imaginale est d'une quinzaine de jours.

La femelle pond ses oeufs groupés en ooplaque sur la face inférieure d'une feuille.

Six à dix stades larvaires se succèdent, les jeunes larves restant grégaires. Dès son jeune âge la chenille peut être urticante ; les toxines responsables de cet urticaire ont été caractérisées chez une espèce d'Afrique du Sud, *Latoia vivida* (FAURIE et HULL, 1980). La vie larvaire s'étale sur 2 ou 3 mois. La larve de dernier stade peut, selon les espèces, se laisser tomber au sol ou rester sur le feuillage, pour tisser un cocon de soie très épais, ovoïde ou subsphérique, qui peut être également recouvert de poils urticants. Chez les espèces dont la biologie a été étudiée, la nymphose se déroule en un mois environ. La sortie de l'imago s'effectue par un opercule situé au pôle antérieur du cocon, préparé par la chenille et que repousse l'insecte à l'émergence.

E - AIRE de REPARTITION

Cette famille de lépidoptères est inféodée presque exclusivement aux zones intertropicales humides du globe. Ainsi les *Limacodidae* sont particulièrement abondants en espèce et en nombre dans les régions équatoriales d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie du Sud-Est.

Les pays tempérés en sont presque dépourvus ; seules trois espèces sont signalées en France, *Apoda limacoides*, *Heterogenea asella* et la dernière très récemment : *Hoyosia codeti* (DUFAY, 1978).

F - DEGATS sur PALMACEES

Plusieurs espèces de *Limacodidae* sont phyllophages de plantes cultivées. En Afrique de l'Ouest de nombreux genres sont cités sur le cacaoyer : *Afronarosa*, *Cosuma*, *Niphadolepis*, *Phlebo-dicha*, *Stroteroides*, *Teinorrhyncha*, *Zinaria*, SMITH, 1965). En Afrique du Sud *Homosusica eugrapha* se rencontre fréquemment sur des légumineuses (THERON, 1968). L'espèce *Parasa consocia* est signalée comme insecte ravageur en Chine (TING-WEI et al., 1980).

En Inde *L. lepida* ravage le manguier (PRASAD, 1979).

Mais c'est en tant que défoliateurs des palmacées en plantations industrielles que les larves de ces lépidoptères sont essentiellement connues.

L'extension de cette culture industrielle s'est en effet accompagnée d'une colonisation progressive par différentes espèces de *Limacodidae*.

En Amérique latine plusieurs genres se sont bien adaptés à la culture intensive du palmier à huile (*Elaeis guineensis*) : *Episibine*, *Euclea*, *Euprosterna*, *Natada*, *Phobetron*, *Sibine*, *Talima*, (GENTY et al., 1978). Nous citerons plus particulièrement l'espèce *S. fusca* qui pullule périodiquement en Colombie. Ainsi GENTY (1972) signale une pullulation ayant affecté plus de 1 000 ha sur la plantation Indupalma de San Alberto en 1969.

En Asie du Sud-Est, WOOD (1968) décrit plusieurs espèces de *Limacodidae* ravageurs du palmier à huile : *Darna trima*, *Ploneta diducta*, *Setora nitens*, *Susica pallida*, *Thosea asigna* et *T. bisura*.

En 1975 à Bornéo dans la province du Sarawak 2000 ha furent dévastés sur les plantations de Bukit Peninjau et de Sungei Tangit par l'espèce *D. trima*. Lors de cette infestation on a pu dénombrer jusqu'à 2000 larves par palme (TIONG et MUNROE, 1976).

En Afrique de l'Ouest, c'est LEPEŞME (1947) qui le premier cite trois espèces causant des dégâts au palmier à huile : *Ctenocompa hilda*, *Thosea chrysoparala*, et *Parasa carpani*.

En ce qui concerne plus particulièrement la Côte d'Ivoire, lieu de nos investigations, les premières pullulations de *limacodidae* sur palmacées sont signalées par HOUILLIER (1961) qui étudie l'espèce *L. pallida*.

Cet auteur rend compte de plusieurs foyers d'attaque affectant des dizaines d'hectares de palmier à huile sur les plantations de MOPOYEM en 1957, puis de COSROU et YOKOBOUE en 1959. Depuis cette époque les entomologistes de l'Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (I.R.H.O) signalent régulièrement les dégâts causés par deux espèces : *L. viridissima* et *L. pallida*. Nous avons particulièrement étudié deux pullulations, l'une de *L. viridissima* sur la plantation de cocotiers I.R.H.O de PORT-BOUET en juin 1979, l'autre d'une espèce non signalée jusqu'alors, *Casphalia extranea*, sur la plantation de palmier à huile Palminindustrie d'Eloka en septembre 1980. Comme nous le préciserons aux chapitres IV et V, d'importantes épizooties se sont déclarées au cours de ces pullulations.

Durant l'année 1982 c'est l'espèce *L. pallida* qui a causé d'importantes défoliations sur les plantations de GLIKE et de GRAND-LAHOU.

G - PATHOLOGIE VIRALE des LIMACODIDAE

1°/ Introduction

La pathologie des *Limacodidae* a été longtemps négligée en dépit de la reconnaissance déjà ancienne de leur importance économique.

Les données bibliographiques souvent très succinctes concernent presque exclusivement des maladies virales. La plupart du temps ces viroses furent décelées lors d'épizooties apparaissant durant des pullulations (GENTY et MARIAN, 1975 ; TIONG et MUNROE, 1976). Des représentants de cinq familles de virus ont été identifiés comme agents pathogènes des *Limacodidae* : des baculovirus de polyédrose nucléaire et de granulose, des Iridovirus, des Densovirus, des Réovirus de polyédrose cytoplasmique et enfin des virus du groupe virus Nudaurelia β . Les différentes espèces de *Limacodidae* hébergeant ces virus sont mentionnées dans le tableau I.

TABLEAU I : LES VIROSES DES LIMACODIDAE

Type de virose	Espèce hôte	origine	Référence
densonucléose	<i>S. fusca</i>	Colombie	MEYNADIER et al., (1977 a)
granulose	<i>D. trima</i> <i>N. nararia</i>	Malaisie Ceylan	THOMAS et POINAR, (1973) SMITH et XEROS, (1954)
iridovirose	<i>Apoda dentatus</i> <i>Microleon longipalpis</i>	Etats-Unis "	MARTIGNONI et IWAI (1981) "
polyédrose cytoplasmique	<i>S. apicalis</i>	Amérique latine	MARTIGNONI et IWAI (1981)
polyédrose nucléaire	<i>N. pucara</i> <i>P. consocia</i> <i>S. Stimulea</i>	Amérique latine Chine Amérique latine	GENTY et al., (1978) TING-WEI et al., (1980) VAN DER GEEST et VAN DER LAAN, (1971)
Virose du groupe virus Nudaurelia β	<i>D. Trima</i> <i>S. nitens</i> <i>T. asigna</i>	Malaisie Pakistan Malaisie	REINGANUM et al., (1978) GREENWOOD et MOORE (1982) REINGANUM et al., (1978)

2°/ Les baculoviroses

Les maladies dues aux Baculovirus sont le plus anciennement connues chez les insectes sous le terme général de polyédroses nucléaires. Cette appellation reflète la propriété de ces agents d'induire dans les noyaux où ils se multiplient la formation d'inclusions polyédriques de grande taille facilement reconnaissables au microscope photonique.

Les agents de ces maladies sont des virus en forme de bâtonnets mesurant entre 200 et 400 nm de long sur 40 à 70 nm de diamètre, constitués d'un corps central dense aux électrons, la nucléocapside, elle-même entourée d'une enveloppe trilamellaire. Chaque nucléocapside contient une molécule d'ADN bicaténaire circulaire superhélicoïdale d'un poids moléculaire de 95 à 120 . 10⁶ daltons (SUMMERS, 1978).

Les Baculovirus sont divisés en plusieurs sous-groupes selon qu'ils produisent ou non des corps d'inclusion et selon la nature de ces inclusions ; ils sont regroupés dans la famille des *Baculoviridae* (MATTHEWS, 1982). Les virus de polyédroses nucléaires constituent le sous-groupe A avec pour espèce type le virus d'*Autographa californica*, lépidoptère *Noctuidae*, (VAIL et al., 1973) Ces virus ont la propriété de s'inclure en fin de morphogénèse dans des corps protéiniques (polyèdres) contenant de nombreuses particules virales.

Chez les *Limacodidae*, plusieurs espèces hébergent ce type de virus. En Amérique latine, VAN DER GEEST et VAN DER LAAN (1971) signalent cette virose chez *N. pucara*. En Chine, TING-WEI et al. (1980) mettent en évidence une polyédrose nucléaire chez *P. consocia*.

Les virus de granuloses constituent le sous-groupe B avec pour espèce type le virus de *Trichoplusia ni*, lépidoptère *Noctuidae*, (SUMMERS et ARNOTT, 1969). Dans ce sous-groupe les virions sont inclus individuellement dans de petits corps d'inclusion protéiques ovoïdes appelés granules.

Deux viroses de ce type ont été signalées chez les *Limacodidae*. En 1954, SMITH et XEROS identifient une granulose dans un lot de larves de l'espèce *N. nararia* récoltées en 1951 par G.D. AUSTIN dans une plantation de thé à Ceylan.

Effectuant des contrôles sanitaires dans les plantations de palmier à huile de Malaisie durant l'année 1963, B.J. WOOD s'aperçoit qu'une épizootie s'est déclarée lors d'une pullulation de l'espèce *D. trima* ; le diagnostic effectué sur des cadavres de larves malades met en évidence une granulose (THOMAS et POINAR, 1973).

Il existe d'autres sous-groupes de Baculovirus dont le sous-groupe C dans lequel sont provisoirement rangés les virus ne produisant pas de corps d'inclusion. L'espèce type en est le virus d'*Oryctes rhinoceros*, Coléoptère *Scarabaeidae*, (MONSARRAT et al., 1973), mais jusqu'à présent ces virus n'ont pas été signalés chez les *Limacodidae*.

3°/ Les réoviroses

Les réoviroses sont essentiellement représentées chez les insectes par des maladies connues sous le nom de polyédrose cytoplasmique. Elles se caractérisent par la présence dans le cytoplasme des cellules infectées de corps d'inclusion appelés polyèdres. Les polyédroses cytoplasmiques affectent presque exclusivement l'intestin moyen des lépidoptères.

Les agents de ces maladies sont constitués par une capsidie icosaédrique de 60 à 80 nm de diamètre, sans enveloppe, portant douze spicules disposées au sommet de l'icosaèdre. Le génome viral se compose d'ARN bicaténaire linéaire segmenté en 10 ou 12 fragments dont les poids moléculaires se répartissent entre

0,2 et 3,0. 10^6 daltons. (PAYNE et RIVERS, 1976).

Les virus de polyédroses cytoplasmiques dont l'espèce type est le virus de *Bombyx mori*, lépidoptère *Bombycidae* (ISHIMORI, 1934) constituent un genre dans la famille des *Réoviridae* (MATTHEWS, 1982). Une maladie virale de ce type est signalée chez une espèce de *Limacodidae* d'Amérique latine, *S. apicalis* (MARTIGNONI et IWAI, 1981).

4°/ Les iridoviroses

Ces viroses très répandues chez les invertébrés doivent leur nom à l'iridescence bleutée ou verdâtre caractéristique que prennent les insectes infectés ; celle-ci est due à la diffraction de la lumière à travers les édifices paracrystallins des particules, qui s'accumulent en grand nombre dans les tissus atteints.

La particule virale est non enveloppée, icosaédrique, mesurant entre 125 et 300 nm de diamètre et à site de multiplication cytoplasmique.

Le génome se compose d'une molécule d'ADN bicaténaire linéaire d'un poids moléculaire de 100 à 250 . 10^6 daltons (KELLY et ROBERTSON, 1973). Les Iridovirus isolés chez les insectes sont scindés en deux genres au sein de la famille des *iridoviridae* (MATTHEWS, 1982).

Le premier est celui des Iridovirus proprement dits qui regroupe les virus de 130 nm avec pour espèce type le virus de *Tipula paludosa*, diptère *Tipulidae*, (XEROS, 1954) ; le deuxième est celui des Chloriridovirus qui regroupe les virus de 180 nm dont l'espèce type est le virus irisant type 3 des moustiques du genre *Aedes* (BELLETT, 1968). Deux iridoviroses sont signalées par MARTIGNONI et IWAI en 1981 chez deux espèces de *Limacodidae* des

Etats-Unis, *A. dentatus* et *M. longipalpis* sans qu'il ne soit donné de précisions quant à l'appartenance des virus responsables de ces maladies à un des genres cités précédemment.

5°/ Les viroses dues à des virus du groupe virus β

Nudaurelia

L'agent pathogène responsable de ces maladies est un petit virus icosaédrique à ARN monocaténaire. Les caractéristiques de la particule virale seront développées en détails dans le chapitre suivant. Ces viroses sont à l'origine de vastes épizooties dans les populations des espèces hôtes.

Elles ne sont connues que chez les lépidoptères.

Des virus de ce type ont été mis en évidence chez trois espèces de *Limacodidae* ravageurs du palmier à huile dans le Sud-Est asiatique ; deux proviennent de Malaisie, *D. trima* et *T. asigna* (REINGANUM et al., 1978), la troisième du Pakistan : *S. nitens* (GREENWOOD et MOORE, 1982).

6°/ Les denonucléoses

Ce sont des viroses caractérisées essentiellement par l'hypertrophie des noyaux atteints, correspondant à l'accumulation de particules virales dans le nucléoplasme (MEYNADIER et al., 1964).

Les agents de ces maladies sont des petits virus à ADN (VAGO et al., 1964) dont les caractéristiques seront exposées dans le chapitre suivant.

Une denonucléose a été décrite chez une espèce de *Limacodidae*, *S. fusca*, ravageur du palmier à huile en Colombie (MEYNADIER et al., 1977 a).

7°/ Conclusion

Cette revue des maladies à étiologie virale des *Lamacodidae* reflète à la fois la diversité des virus signalés dans cette famille et le peu de précisions sur les propriétés des agents responsables.

Il est intéressant de souligner le fait qu'en dépit du grand nombre d'espèces de *Lamacodidae* d'Afrique, aucun cas de virose n'a été à ce jour signalé sur ce continent.

C H A P I T R E I I

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LES PETITS
VIRUS ICOSAEDRIQUES D'INSECTES

A -	INTRODUCTION	15
B -	VIRUS à ADN : Les Densovirus	15
	1°/ <i>Anatomo-histo et physiopathologie</i> .	16
	2°/ <i>Spectre d'hôte</i>	19
	3°/ <i>Structure et propriétés physico- chimique du virus</i>	20
	4°/ <i>Sérologie</i>	22
	5°/ <i>Infection expérimentale de cultures cellulaires</i>	22
	6°/ <i>Classification</i>	23
C -	VIRUS à ARN	23
	1°/ <i>Picornaviridae</i>	24
	2°/ <i>Nodaviridae</i>	25
	3°/ <i>Famille du groupe virus Nudaurelia β</i>	26
	4°/ <i>Autres virus</i>	27

C H A P I T R E II

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LES PETITS
VIRUS ICOSAEDRIQUES D'INSECTES

A - INTRODUCTION

La recherche et l'étude des virus entomopathogènes ont connu ces dernières décennies un regain d'intérêt en raison de la nécessité de compléter ou de remplacer les pesticides chimiques pour réguler les populations d'insectes ravageurs.

La mise en évidence de petits virus icosaédriques chez les insectes remonte à une vingtaine d'années seulement ; leur faible taille ayant rendu leur découverte difficile. Dans ce chapitre nous exposons l'évolution des recherches et l'état de nos connaissances actuelles sur ces virus qui se caractérisent par leur petite taille, ne dépassant pas 35 nm de diamètre.

Ils sont divisés en deux groupes selon la nature ADN ou ARN de leur acide nucléique, ces derniers étant les plus nombreux.

B - VIRUS à ADN : LES DENSOVIRUS

C'est à la station de recherches de Pathologie comparée de Saint-Christol-lez-Alès qu'un nouveau syndrome pathologique, la denonucléose, a été mis en évidence (MEYNADIER et al., 1964) à partir de larves du Lépidoptère *pyralidae Galleria mellonella* L. sujettes à des épizooties foudroyantes dans les élevages massifs de cet insecte pratiqués en Haute-Savoie.

A partir de ce matériel l'étiologie virale de la maladie a été établie et le premier virus de denonucléose (VDN) a été découvert (VAGO et al., 1964).

Depuis cette date des affections comparables ont été reconnues chez plusieurs espèces appartenant à différents ordres d'insectes : Diptères, Dictyoptères, Lépidoptères, Odonates, Orthoptères, et provenant de diverses régions du globe, (cf Tableau II).

Les denonucléoses ont en commun un certain nombre de propriétés histo-pathologiques et ultrastructurales qui sont présentées ci-dessous.

1°/ Anatomo-histo et physiopathologie

La denonucléose de *G. mellonella* se caractérise par une paralysie progressive des larves s'accompagnant d'une décoloration de leur tégument. La mort survient rapidement 4 à 5 jours après l'apparition des premiers symptômes (MEYNADIER et al., 1964). L'appellation de cette maladie stigmatise la propriété qu'ont les VDN de former dans le noyau hypertrophié des cellules qu'ils infectent des plages fortement colorées par la réaction nucléaire de FEULGEN, correspondant à l'accumulation massive de virions (VAGO et al., 1964).

Chez *G. mellonella* ce phénomène est particulièrement net dans les noyaux des cellules adipeuses (VAGO et al., 1966 a) mais les altérations affectent également les noyaux d'autres tissus larvaires tels l'hypoderme, les cellules pérित्रachéales, les hémocytes, les cellules de la glande séricigène, l'épithélium de l'intestin antérieur et de l'intestin postérieur, les tubes de Malpighi et les muscles (AMARGIER et al., 1965 ; BERGOIN et BRES, 1968). Il est à remarquer qu'aucune lésion n'a jamais été décelée au niveau de l'épithélium de l'intestin moyen chez cet insecte. Par opposition, les denonucléoses décrites chez *B. mori* (SHIMIZU, 1975) et chez *S. fusca* (MEYNADIER et al., 1977 a) ne concernent que les cellules de l'intestin moyen de ces insectes (WATANABE et al., 1976 ; MUEDA et WATANABE, 1978 ; MEYNADIER et al., 1977 a). Un état pathologique

TABLEAU II : Différentes souches de VDN

Ordre	Espèce	Pays d'origine	Référence
Dictyoptères	<i>Periplaneta fuliginosa</i>	Japon	SUTO et al., 1979
Diptères	<i>Aedes aegypti</i>	U.R.S.S.	LEBEDEVA et al., 1973
	<i>Simulium vittatum</i> <i>Aedes pseudo-scutellaris</i> (lignée cellulaire)	Etats-Unis Venezuela	FEDERICI, 1976 GORZIGLIA et al., 1980
Lépidoptères	<i>Agraulis vanillae</i>	Grande-Bretagne	KELLY et al., 1980 a
	<i>B. mori</i> - VDN ₁	Japon	SHIMIZU, 1975
	<i>B. mori</i> - VDN ₂	Japon	MAEDA et al., 1982
	<i>B. mori</i> - VDN ₃	Chine	LI-REN et al., 1982
	<i>Diatraea saccharalis</i>	Guadeloupe	MEYNADIER et al., 1977 b
	<i>Euxoa auxiliaris</i>	Etats-Unis	SUTTER, 1973
	<i>G. mellonella</i>	France	MEYNADIER et al., 1964
	<i>Junonia coenia</i>	Etats-Unis	RIVERS et LONGWORTH, 1972
	<i>Lymantria dispar</i> (lignée cellulaire)	France	GRIGNON, 1982
<i>Pieris rapae</i>	Chine	FULIN et al., 1981	
<i>S. fusca</i>	Colombie	MEYNADIER et al., 1977 a	
Odonates	<i>Leucorrhinia dubia</i>	Suède	CHARPENTIER, 1979
Orthoptères	<i>Acheta domestica</i>	France	MEYNADIER et al., 1977 c

se traduisant par la formation de masse d'allure tumorale a été observé chez *P. fuliginosa* (SUTO et al., 1978) et chez *S. fusca* (AMARGIER et al., 1979). Chez ces deux insectes le VDN est à l'origine de prolifération cellulaire à caractère tumorigène au niveau de l'intestin. Un virus de type VDN serait également à l'origine de tumeurs expérimentales chez *Leucophea maderae* (MATZ et BERGOIN, communication personnelle).

La plupart des denonucléoses présentent un caractère polytrope des lésions tissulaires, c'est le cas d'*A. domestica* (MEYNADIER et al., 1977 c), d'*A. aegypti* (LEBEDEVA et al., 1973), d'*A. vanillae* (KELLY et al., 1980 a), de *D. saccharalis* (MEYNADIER et al., 1977 b), d'*E. auxiliaris* (SUTTER, 1973), de *L. dubia* (CHARPENTIER, 1979) et de *P. rapae* (FULIN et al., 1981).

Des études ultrastructurales ont mis en évidence les différentes étapes de la morphogénèse du virus de denonucléose chez *G. mellonella* (VAGO et al., 1966 a ; COTE, 1969 ; GARZON et KURSTAK, 1976).

Les premières modifications ultrastructurales sont observées six à douze heures après l'infection, dans le noyau. Le nucléole subit une rapide hypertrophie accompagnée d'une ségrégation de ses composants fibrillaires et granulaires ; puis un stroma virogène apparaît au centre du noyau qui repousse vers la périphérie le nucléole et la chromatine. 24 à 48 h après l'infection, des corpuscules intranucléaires apparaissent au centre du stroma virogène et des particules virales commencent à s'individualiser à sa périphérie. Quatre à cinq jours après le début de l'infection, le stroma virogène a envahi la totalité du noyau causant son hypertrophie, le nucléole ayant complètement disparu. A l'intérieur du stroma virogène des virions s'individualisent et se regroupent en îlots. Graduellement ces inclusions virales se rejoignent et remplacent le stroma virogène. Au dernier stade de l'infection, l'hypertrophie du noyau est telle, que le cytoplasme est considérablement réduit. La production

de virions par cellule est énorme ; la masse virale peut provoquer la rupture de la membrane nucléaire en plusieurs points permettant le passage de virions dans le cytoplasme. Des inclusions virales peuvent alors être reconnues aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme ; ces dernières s'observent généralement à l'intérieur de vésicules dans lesquelles les particules s'agencent souvent de façon paracristalline. De telles accumulations cytoplasmiques ont été observées lors de plusieurs infections à VDN : chez *Spodoptera littoralis* infecté avec le VDN de *J. coenia* (DIALLO, 1978) chez *A. aegypti* (BUCHATSKY, 1979), chez *L. dubia* (CHARPENTIER, 1979) et dans des infections spontanées de deux lignées cellulaires : d'*A. pseudoscutellaris* (GORZIGLIA et al., 1980) et de *L. dispar* (GRIGNON, 1982).

2°/ Spectre d'hôte

Le spectre d'hôte de divers VDN est variable : le VDN de *G. mellonella* semble très spécifique ; en effet, jusqu'à maintenant aucune action létale n'a pu être notée chez d'autres Lépidoptères, chez les Coléoptères, Diptères, et Orthoptères contaminés par voie buccale ou par injection dans la cavité générale (GIRAN, 1966).

En revanche le VDN de *J. coenia* possède un spectre d'hôte étendu à plusieurs espèces de Lépidoptères : *A. urticae* (*nymphalidae*), *L. dispar* (*lymantriidae*), *B. mori* (*bombylidae*), *Mamestra brassicae* (*noctuidae*) (RIVERS et LONGWORTH, 1972) et *S. littoralis* (*noctuidae*) (DIALLO, 1978).

Le VDN isolé à partir d'une culture de cellules de *L. dispar* provoque 50 % de mortalité en 10 jours chez *B. mori* et 100 % durant la même période chez *S. littoralis* (GRIGNON, 1982).

SUTO et al., (1979) signale à propos du VDN de *P. fuliginosa* que trois autres espèces de blattes y sont sensibles *P. australasiae*, *P. brunnea*, et *P. japonica*.

Le VDN d'*E. auxiliaris* semble pathogène pour 2 autres noctuelles : *Pseudaletia unipuncta* et *Heliothis zea* (SUTTER, 1973).

3°/ Structure et propriétés physico-chimiques du virus

Les agents des denonucléoses se présentent comme des particules parasphériques, sans enveloppe, mesurant entre 20 et 23 nm de diamètre. Leur capsid, ayant l'apparence d'un icosaèdre, serait formée de 32 capsomères (BACHMAN et al., 1975). L'examen au microscope électronique de suspensions virales purifiées a révélé un mélange de virions complets (particules pleines) ayant un coefficient de sédimentation de 117 - 119 S et de capsides sans acide nucléique (particules creuses) de 59. 60 S (LONGWORTH et TINSLEY, 1968). En outre, de petits éléments de 7 à 9 nm de diamètre ont été observés en association avec les VDN de *Galleria*, *Junonia*, et *Periplaneta* (KURSTAK et COTE, 1968 ; HOGGAN, 1971 ; SUTO et al., 1979). Ces éléments sont désignés sous l'appellation de " particules associées."

La densité des VDN, calculée après ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium varie entre 1,39 et 1,42 g/cm³. L'étude du génome du VDN de *G. mellonella* a montré qu'il est constitué d'ADN représentant 1/3 de la masse totale du virion. L'extraction de l'acide nucléique en milieu tamponné de force ionique élevée aboutit à l'obtention d'un ADN bicaténaire d'un poids moléculaire de $3,2 \cdot 10^6$ daltons (TRUFFAUT et al., 1967).

Cependant la réactivité au formaldéhyde des virions et leur coloration à l'acridine orange montrent que l'ADN est sous forme monocaténaire dans la capsid et d'un poids moléculaire égal à la moitié de celui de l'ADN extrait à forte force ionique (BARWISE et WALKER, 1970).

Il a d'autre part été mis en évidence que les suspensions de virus sont constituées de deux types de particules en proportion stoechiométrique contenant chacune une molécule d'ADN simple brin linéaire de P.M. de $1,6 \cdot 10^6$ daltons et de polarité positive ou négative (KURSTAK et al., 1971).

L'extraction globale de l'ADN d'une suspension de virions à forte force ionique met en présence les deux types de molécule d'ADN monocaténaire qui s'associent alors pour donner des molécules bicaténaires. Ces observations caractérisant le génome du VDN de *G. mellonella* furent confirmées par l'étude de l'ADN des VDN de *J. cænia*, *P. fuliginosa* et de *B. mori* (KELLY et al., 1977 ; SUTO, 1979 ; NAKAGAKI et KAWASE, 1980 a).

La composition polypeptidique de la capsidie des VDN consiste en quatre protéines virales (PV_1 , PV_2 , PV_3 , PV_4) ; celle de plus faible poids moléculaire étant toujours majoritaire (cf. Tableau III). Pour le VDN de *G. mellonella* les données de la littérature sont toujours en désaccord sur les valeurs respectives des poids moléculaires des quatre protéines de structure (TIJSSSEN et al., 1976 ; KELLY et al., 1980 b).

En outre les VDN ne contiennent pas de lipides et ils résistent à de nombreux solvants organiques comme l'éther et le chloroforme ; de plus ils sont thermorésistants : une heure à 60°C ne suffit pas à les inactiver (BOEMARE et al., 1970)

TABLEAU III : Protéines de structure des différents VDN

V D N	PV ₁	PV ₂	PV ₃	PV ₄	Référence
<i>G. mellonella</i>	98 000 - 1 %	69 000 - 15 %	58 500 - 15 %	49 000 - 69 %	TIJSSEN et al., 1976
<i>G. mellonella</i>	107 300-11,9%	70 900-28,9 %	61 100 -22,1%	42 600-37,1 %	KELLY et al., 1980 b
<i>J. coenia</i>	109 600-15,2%	70 800 22,7 %	58 700 -24,1%	41 900-38,2 %	KELLY et al., 1980 b
<i>A. vanillae</i>	110 000-	72 000	62 000	43 000	KELLY et al., 1980 a
<i>B. mori</i> VDN ₁	77 000 - 4 %	70 000 - 20 %	57 000 - 11 %	50 000-65 %	NAKAGAKI et KAWASE, 1980 b
<i>B. mori</i> VDN ₂	77 000 -9,5%	73 000 - 25 %	55 000 - 29 %	53 000-36 %	MAEDA et al., 1982

4°/ Sérologie

Des études immunologiques, utilisant la technique de double diffusion en gel d'agarose, ont montré que les VDN de *G. mellonella*, de *J. coenia* et d'*A. vanillae* sont virtuellement identiques sérologiquement (KELLY et al., 1980 a).

5°/ Infection expérimentale de cultures cellulaires

L'infection *in vitro* de cultures cellulaires d'invertébrés avec un virus d'insecte purifié a été réalisée pour la première fois grâce au VDN de *G. mellonella* (VAGO et al., 1966 b). La pathogénèse de la maladie a été étudiée sur primo cultures de cellules de gaines ovariennes prélevées sur des chrysalides de *B. mori*. Les lésions nucléaires et cytoplasmiques sont identiques à celles décrites pour les différents tissus d'individus virosés. C'est grâce à l'infection de cultures identiques avec le VDN de *J. coenia* purifié qu'a pu être précisé la multi-

plication du virus dans les cellules au cours de l'évolution de la pathogénèse, grâce à la coloration à l'acridine orange (QUIOT et al., 1973).

6°/ Classification :

Par l'ensemble de leurs propriétés physico-chimiques, en particulier leur petite taille, la nature ADN monocaténaire de leur génome, leur site de répllication nucléaire, les VDN ont été rapprochés du groupe des Parvovirus, pathogènes à l'homme et aux vertébrés. Ils partagent avec les virus Adeno associés (AAV) appartenant à ce groupe, la propriété de posséder des génomes de polarité complémentaire encapsidés séparément, mais contrairement à ces derniers, ils ne sont pas défectifs.

Ils sont regroupés actuellement dans le genre Densovirus, au sein de la famille des *Parvoviridae* (BACHMAN et al., 1975 ; MATTHEWS, 1982).

C - VIRUS à A R N

Chez les insectes une trentaine de virus icosaédriques à ARN et ne dépassant pas 35 nm de diamètre ont été mis en évidence, la plupart ces dernières années (LONGWORTH, 1978).

Ils présentent en commun la propriété de posséder une capsid non enveloppée de symétrie cubique et un génome constitué d'ARN monocaténaire. Ces virus sont répartis sur trois familles principales, selon la nature segmentée ou non de leur génome et selon le nombre de protéines capsidaires (MATTHEWS, 1982).

1°/ Picornaviridae

Cette famille regroupe essentiellement des virus de vertébrés comme le genre Enterovirus dont fait partie le virus humain de la poliomyélite.

Trois virus d'insectes, sans constituer de genre, y sont inclus (MATTHEWS, 1982). Le virus du Lépidoptère *Gonometa podocarpí* (Harrap et al., 1966), le virus de la paralysie du grillon (Crpv) de l'Orthoptère *Teleogryllus oceanicus* (REINGANUM et al., 1970) et le virus C de *Drosophila melanogaster* (DCV) (JOUSSET et al., 1972).

Ces Picornavirus se présentent comme des particules icosaédriques de 30 nm de diamètre dont le génome est formé d'un brin simple chaîne d'ARN de poids moléculaire : $3 \cdot 10^6$ daltons représentant 30 % de la masse totale du virion. La densité de la particule virale en chlorure de césium est de $1,34 \text{ g/cm}^3$.

La composition polypeptidique de la capside consiste en trois protéines majeures (PV_1 , PV_2 , PV_3) et deux protéines mineures (PV_0 , PV_4). Les trois protéines virales majeures étant en proportions équimoléculaires. Quelques caractéristiques physico-chimiques de ces trois virus sont exposées dans le tableau IV. Les Picornavirus se multiplient dans le cytoplasme des cellules des différents tissus de leur hôte, en particulier dans les cellules hypodermiques.

Les particules virales apparaissent le plus souvent arrangées en réseau paracristallin à l'intérieur de vésicules.

Le Crpv et le Dcv se multiplient en culture de cellules d'invertébrés (SCOTTI, 1976 ; PLUS, 1978) en particulier dans la lignée cellulaire 1 de *D. melanogaster* (SCHNEIDER, 1972).

TABLEAU IV : Caractéristiques physico-chimiques
de trois Picornavirus d'insectes

Virus	diamètre	densité	Protéines virales			Référence
			PV ₁	PV ₂	PV ₃	
Crpv	27 nm	1,34 g/cm ³	33 000	31 000	30 000	REINGANUM, 1973
DcV	30 nm	1,34 g/cm ³	31 000	30 000	28 000	JOUSSET et al., 1977
Virus de <i>Gonometa</i>	32 nm	1,35 g/cm ³	36 500	32 000	29 000	LONGWORTH et PAYNE 1973

2°/ Nodaviridae

Cette famille nouvellement créée (MATTHEWS, 1982) regroupe des virus d'invertébrés se caractérisant par un génome composé de deux molécules d'ARN monocaténaire de poids moléculaire 1,0 et 0,5.10⁶ daltons renfermées dans la même capsid.

La particule virale, icosaédrique, mesure 30 nm de diamètre et sa densité en chlorure de césium est de 1,34 g/cm³. La composition polypeptidique de la capsid consiste en une protéine majeure et deux protéines mineures. L'espèce type est le virus *Nodamura* isolé d'un Diptère du Japon *Culex tritaeniorhyncus* (SCHERER et HURLBUT, 1967). Un virus très voisin a été mis en évidence en Nouvelle-Zélande chez le scarabée noir *Heteronychus arator* (LONGWORTH et ARCHIBALD, 1975). Les caractéristiques physico-chimiques de ces deux Nodavirus sont exposées dans le tableau V.

Contrairement au *Nodamura* virus qui se multiplie aussi bien dans des cultures cellulaires de vertébrés que d'invertébrés (BAILEY et al., 1975), le virus d'*H. arator* ne se reproduit que dans une culture de cellules d'insecte : la lignée cellulaire 1 de drosophile (FRIESEN et al., 1980).

TABLEAU V : Caractéristiques physico-chimiques de deux Nodavirus

Virus	diamètre	densité	Protéines	R N A 2 molécules	Référence
<i>Nodamura</i> virus	29 nm	1,34 g/cm ³	majeure : 40 000 mineures: 43 000 39 000	1, 15.10 ⁶ 0, 46.10 ⁶	NEWMAN et BROWN, 1977
<i>H. arator</i>	30 nm	1,33 g/cm ³	majeure : 40 000 mineures: 45 000 33 000	1,0.10 ⁶ 0,5.10 ⁶	LONGWORTH et CAREY, 1976

3°/ Famille du groupe virus *Nudaurelia* β

Une quinzaine de virus caractérisés par la propriété de ne posséder qu'une seule protéine capsidaire (PM : 60 - 70.10³ daltons) ont été regroupés récemment pour former une famille n'ayant pas encore reçu de nom approprié (MATTHEWS, 1982).

L'espèce type est le virus β du Lépidoptère *Saturnidae Nudaurelia Cytherea capensis* isolé en Afrique du Sud (JUCKES, 1970). La particule virale, icosaédrique, mesure 35 nm de diamètre et sa densité est de 1,27 à 1,29 g/cm³. Le génome est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de P.M : 1,8.10⁶ daltons représentant 10 % de la masse du virion.

Les caractéristiques physico-chimiques de quelques virus de cette famille sont exposées dans le tableau VI. Ces virus ont un site de multiplication cytoplasmique et parasitent les cellules intestinales de plusieurs Lépidoptères. Jusqu'à présent il n'a pas été possible d'infecter des cultures de cellules d'invertébrés avec ce type de virus.

TABLEAU VI : Caractéristiques physico-chimiques de quelques virus du type *Nudaurelia* β

virus	diamètre	densité	Protéine	Référence
Virus <i>Nudaurelia</i> B	35 nm	1,298 g/cm ³	62 600	STRUTHERS et HENDRY, 1974
<i>D. trima</i>	35 nm	1,289 g/cm ³	62 100	REINGANUM et al., 1978
<i>T. asigna</i>	35 nm	1,275 g/cm ³	60 800	REINGANUM et al., 1978
<i>Dasychira</i> <i>pudivunda</i>	38 nm	1,310 g/cm ³	66 000	GREENWOOD et MOORE, 1981

4°/ Autres virus

Plusieurs virus icosaédriques à ARN ne dépassant pas 35 nm de diamètre ne sont classés dans aucune des trois familles de virus précédemment citées. Chacun d'eux présente des caractéristiques les excluant des familles connues. Parmi les mieux connus nous citerons le virus de la paralysie aiguë,

le virus Arkansas et le virus X chez les abeilles (BAILEY, 1976), les virus P et A chez la drosophile (PLUS et al., 1976) et le " Kelp fly virus " du diptère australien *Chaetocoelopa sydneyensis* se multipliant chez *G. mellonella* (SCOTTI et al., 1976). Les caractéristiques physico-chimiques de ces différents virus sont exposées dans le tableau VII.

TABLEAU VII : Caractéristiques physico-chimiques de différents virus icosaédriques à ARN n'étant classés dans aucune famille.

Virus	diamètre	densité	protéines virales	Référence
" Kelp fly virus "	29 nm	1,42 g/cm ³	73 000 29 400	SCOTTI et al., 1976
Drosophila P virus	25 - 30 nm	1,36 g/cm ³	48 000 29 400 26 000	PLUS et al., 1976
Drosophila A virus	25 - 30 nm	1,37 g/cm ³	72 900 41 200 31 600	PLUS et al., 1976
Virus de la paralysie aiguë	28 nm	1,34 g/cm ³	31 500 23 500	BAILEY, 1976
Virus Arkansas	30 nm	1,37 g/cm ³	41 000	BAILEY, 1976
Virus X	35 nm	1,36 g/cm ³	54 500	BAILEY, 1976

Enfin nous mentionnerons deux petits virus à ARN, l'un découvert chez l'abeille, le virus de la paralysie chronique, (BAILEY et al., 1968) et l'autre chez la drosophile, le virus RS, (PLUS et al., 1975) caractérisés par leur capsidе piriforme ou en forme de citron, atteignant 32 nm dans son grand axe. Par leur architecture tout à fait originale, ces deux virus constituent un groupe à part au sein des petits virus à ARN d'insectes.

C H A P I T R E I I I

MATERIEL et METHODES

A - LE MATERIEL VIVANT	29
1°/ <i>Position systématique et morphologie</i>	29
a/ <i>Casphalia extranea</i>	29
b/ <i>Latoia viridissima</i>	30
c/ <i>Sibine fusca</i>	30
2°/ <i>Récolte des larves</i>	31
3°/ <i>Maintien au laboratoire</i>	31
B - TECHNIQUES de PATHOLOGIE EXPERIMENTALE	32
1°/ <i>Techniques d'infection</i>	32
a/ <i>Infection per os</i>	32
b/ <i>Infection par injection</i>	32
c/ <i>Infection de cultures cellulaires</i>	32
2°/ <i>Recherche et isolement des virus</i>	33

C - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES	34
1°/ <i>microscopie photonique</i>	34
a/ <i>Les frottis</i>	34
b/ <i>Les coupes de tissus</i>	34
c/ <i>Les cultures cellulaires</i>	34
2°/ <i>microscopie électronique</i>	35
a/ <i>fixation des tissus et des cultures cellulaires</i>	35
b/ <i>coloration des coupes</i>	36
c/ <i>contraste des suspensions virales</i>	36
d/ <i>techniques de visualisation des molécules d'ADN viral</i>	37
D - TECHNIQUES de CULTURE de CELLULES d'INSECTES	37
1°/ <i>les lignées cellulaires</i>	37
2°/ <i>méthode de culture</i>	37
E - TECHNIQUES de PURIFICATION des VIRUS	38
1°/ <i>broyage et clarification</i>	38
2°/ <i>purification sur colonne de chromatographie</i>	38
a/ <i>filtration sur gel</i>	38
b/ <i>échange d'ions</i>	39
3°/ <i>purification en gradients de densité</i>	39

F -	TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	39
	1°/ Dosages colorimétriques	39
	2°/ Dosages spectrophotométriques	40
	3°/ Analyses en électrophorèse	40
	a/ Electrophorèse des protéines virales	40
	b/ Electrophorèse de l'ARN viral .	43
	4°/ Mesure de la densité du virus à l'équilibre	44
	5°/ Extraction de l'ADN viral	44
	6°/ Mesure de la T° de fusion de l'ADN viral	45
	7°/ Réactivité de l'ADN viral au formaldéhyde	45
G -	TECHNIQUES SEROLOGIQUES	46
	1°/ Préparation des antisérums	46
	2°/ Immunodiffusion en gel d'agarose	47

C H A P I T R E III

MATERIEL et METHODES

A - LE MATERIEL VIVANT

La présente étude a porté sur trois espèces de Lépidoptères *Limacodidae*, ravageurs des palmacées, des régions tropicales humides.

Les espèces *C. extranea* et *L. viridissima* proviennent du sud de la Côte d'Ivoire tandis que l'espèce *S. fusca* est originaire de Colombie.

1°/ Position systématique et morphologie

a/ *Casphalia extranea* - WALKER - 1869 -

(Proc. Nat. Hist. soc. Glasgow, 1, p. 335)

HERING (1928) donne de l'imago la description suivante : " Corps jaune d'ocre. Dessus du thorax gris brun. *Tegulae* blanches avec une tache noire au bord antérieur. *Patagia* jaune rouge en avant. Tête noirâtre. Ailes antérieures gris brun. Nervures blanches vers la base dans la partie antérieure. D.C. largement foncée. Au-delà une bande oblique blanchâtre transparente. Ailes postérieures jaune d'ocre, avec une bande marginale brun foncé et une tache noire médiane. " (Pl.I, fig.5).

b/ *Latoia viridissima* - HOLLAND - 1893

(Entom. News. Philad. p. 102)

Cette espèce longtemps appelée *Parasa viridissima* est désormais rangée dans le genre *Latoia*.

Nous en avons donné (FEDIERE et al., 1981) la description suivante : " L'imago est un papillon de taille moyenne (3 à 4 cm d'envergure) ; le corps et les ailes ont une teinte générale vert pomme. Les ailes antérieures présentent une partie basale brune. Les franges des ailes postérieures sont brunes. Les deux sexes sont de coloration identique. (Pl. XXI, fig.49). Arrivée en fin de développement la larve de *L. viridissima* est verte avec quatre rangées longitudinales de touffes de soies, deux dorsales et une de chaque côté ; à la partie postérieure on observe deux touffes de soies courtes et serrées de couleur rouge-orangé (Pl. XXI, fig. 47).

Le cocon est de forme ellipsoïdale et mesure 11 et 14 mm de diamètre sur les deux axes chez la femelle et 8 à 12 mm chez le mâle. Il est de couleur blanchâtre, hérissé de soies urticantes. " (Pl. XXI, fig. 48).

c/ *Sibine fusca* - STOLL

Ce Lépidoptère sud-américain a été étudié par GENTY (1972) qui en donne la description suivante : " Au stade imaginal les deux sexes sont de coloration identique ; les ailes antérieures sont brun - rouge dorsalement et les postérieures brun clair. La face inférieure des deux paires d'ailes est incolore brun clair. Dorsalement, sur les ailes antérieures, on observe deux séries d'écailles dorées formant deux taches sur les radiales R_3 et R_4 , la seconde toujours plus grande que la première (Pl. XXII, fig.52).

Au dernier stade la larve est de coloration vert clair ; les segments thoraciques et le premier segment abdominal sont bleu pastel, recouverts d'un duvet de poils noirs très courts. Sur le segment prothoracique on remarque un écusson de couleur gris clair. " (pl. XXII, fig.50).

2°/ Récolte des larves

Les larves de *C. extranea* ont été récoltées sur la plantation de palmiers à huile d'Eloka ; les chenilles de l'espèce *L. viridissima* ont été prélevées sur la plantation de cocotiers de Port-Bouët. Les larves sont récoltées sur les folioles après abattage d'une palme à la faucille ; elles sont placées individuellement dans des boîtes aérées pour leur transport jusqu'au laboratoire.

3°/ Maintien au laboratoire

Les chenilles sont maintenues regroupées par dix dans des cages (50 x 30 x 30 cm) aux armatures de bois et dont les faces sont faites de tulle. Le fond est recouvert de 15 cm de terre afin de permettre la nymphose. Après plusieurs essais infructueux d'élevage sur milieux artificiels, les larves ont été nourries de folioles de palmier à huile ou de cocotier renouvelées tous les jours.

Les cages sont placées en lumière naturelle et à température ambiante (25 à 28° C).

A l'émergence des imagos, les femelles sont disposées individuellement dans des cages avec un ou plusieurs mâles ; ceci afin de permettre le dénombrement d'oeufs pondus, et surtout, à

l'éclosion de ces derniers, de limiter le nombre de larves néonates qui ne peuvent être manipulées. Les adultes sont alimentés avec une solution d'eau sucrée à 10 % imbibant un coton.

B - TECHNIQUES de PATHOLOGIE EXPERIMENTALE

1°/ Techniques d'infection

a/ Infection *per os*

L'infection *per os* des larves présumées saines est réalisée par badigeonnage de folioles de palmes avec des suspensions virales purifiées, à la concentration de 0,05 unité de densité optique à 260 nm (U.D.O.₂₆₀) par ml dans du tampon Tris-Hcl Ph 7,8 ; ceci correspond à 5 µg de virus par ml.

b/ Infection par injection

Pour l'injection de suspensions virales purifiées dans la cavité viscérale des larves, nous avons utilisé un micro-inoculateur Braun équipé d'une seringue stérile de 1 ml. Il s'agit d'injection sous-épidermique pour éviter de léser le tube digestif. La dose injectée est de 18 µl par larve, d'une suspension virale à 1 U.D.O.₂₆₀/ml. Les témoins reçoivent par inoculation dans les mêmes conditions du tampon phosphate M/20 à PH 7,4 ayant servi à préparer la suspension virale.

c/ Infection de cultures cellulaires

Les infections de cultures cellulaires sont réalisées par introduction de 0,5 ml de suspension de virus

purifiés à 1 U.D.O.₂₆₀/ml par fiole de 50 ml et de 0,2 ml par boîte de PETRI de 35 mm de diamètre. Cette suspension est préalablement filtrée sur membrane de nitrate de cellulose de 0,45 μ m de porosité.

Transfection de la lignée cellulaire SPC Bm 40

Nous avons infecté cette culture de cellules avec une suspension d'ADN du Densovirus de *C. extranea*, selon la méthode de GRAHAM et VAN DER EB (1973) adaptée par QUIOT (communication personnelle).

La concentration finale de la suspension d'ADN utilisée est de 11 μ g/ml.

2°/ Recherche et isolement des virus

Les virus ont été recherchés à partir d'animaux prélevés en période d'épizootie dans la nature et maintenus en quarantaine au laboratoire. L'observation quotidienne des anomalies de leur comportement et des mortalités, a été la première étape du processus de recherche et d'isolement des agents infectieux.

Dans tous les cas nous avons suivi le protocole suivant :

- contrôle en microscopie à contraste de phase de frottis d'hémolymphe, de tissu adipeux, d'hypoderme et d'intestin moyen.

- contrôle direct en microscopie électronique du broyat de larves malades en contraste négatif.

- fixation des différents tissus de l'insecte et de larves entières pour l'observation en microscopie électronique et photonique.

- purification des particules d'allure virale observées en microscopie électronique.

C - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

1^o/ Microscopie photonique

a/ Les frottis

Les observations sont réalisées soit en contraste de phase, soit après coloration au bleu de méthylène potassique selon LOEFFLER.

b/ Les coupes de tissus

Des fragments de tissus ou des larves entières sectionnées aux deux extrémités sont fixés au Carnoy. Après 24 h à 4° C dans ce fixateur les pièces sont déshydratées par 2 bains de 24 heures dans l'alcool éthylique, puis 3 bains de 24 heures dans l'alcool butylique. Elles sont alors incluses dans la paraffine. Des coupes de 7 μ m d'épaisseur sont réalisées. Elles sont déparaffinées et hydratées par 2 bains de toluène, 3 bains d'alcool éthylique de degrés décroissants (100 - 90 - 70) suivis par un bain d'eau distillée.

Les coupes sont colorées suivant deux techniques pour la détection des acides nucléiques : la coloration à la gallocyanine et la coloration de FEULGEN et ROSSENBECK spécifique de l'ADN.

Les photographies sont prises sur un microscope Leitz orthoplan équipé du dispositif Orthomat.

c/ Les cultures cellulaires

Les sites de la replication virale sont localisés dans les cultures cellulaires à l'aide de deux méthodes. D'une

part la coloration à l'acridine orange et d'autre part la technique d'immunofluorescence indirecte.

La coloration à l'acridine orange permet de localiser au niveau cellulaire les zones de replication virale par la détection et la différenciation des acides nucléiques.

Les cellules sont fixées pendant 5 minutes au Carnoy, hydratées par passages successifs de une minute dans des bains d'alcool de concentration décroissante (100 % - 95 % - 60 % - 30 %) puis rincées au tampon de M^C ILVAINE. Les cellules sont mises au contact de la solution d'acridine orange pendant 5 minutes puis rincées 2 fois avec le tampon M^C ILVAINE.

Nous avons également utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte selon le protocole suivant : les cellules sont mises en contact avec le sérum de lapin anti protéines virales homologue. L'excès de sérum est éliminé et les lamelles lavées avec un tampon phosphate 0,5 M PH 7,4. Les cellules sont ensuite recouvertes de sérum de mouton anti globulines de lapin conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) pendant 30 minutes puis la préparation est rincée abondamment avec le même tampon.

Pour ces deux techniques l'examen des cellules est fait en lumière ultra-violette pour révéler la fluorescence.

2°/ Microscopie électronique

a/ Fixation des tissus et des cultures cellulaires.

Les fragments de tissus destinés à l'examen au microscope électronique sont traités de la façon suivante :

- fixation dans le glutaraldéhyde à 2 % en tampon cacodylate de sodium 0,1 M à PH 7,4 pendant 2 h à 4° C.
- rinçage dans le tampon cacodylate
- post fixation dans l'acide osmique à 1 % pendant 2 h à 4° C.
- deshydratation dans un gradient d'acétone 35 % 100 %.
- pré-inclusion dans un mélange d'épon et d'acétone (V/V) pendant 12 heures
- inclusion finale dans l'épon pur.

Seule la fixation au glutaraldéhyde a été effectuée en Côte d'Ivoire ; la post-fixation à l'acide osmique est intervenue après un mois de conservation dans le tampon cacodylate.

Les cultures cellulaires sont fixées dans des conditions identiques mais à chaque étape les cellules sont sédimentées par centrifugation à 160 g pendant 5 minutes.

b/ Coloration des coupes

Les coupes ultrafines sont colorées et contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb selon REYNOLDS (1963). Les préparations sont observées au microscope électronique Hitachi HU II C ou Siemens elmiskop 102.

c/ Contraste des suspensions virales.

Les suspensions de virus purifiés et les broyats d'insectes sont déposés sur grilles recouvertes d'un film de collodion carboné, et contrastées négativement à l'acide phosphotungstique à 1 % PH 7,4 selon BRENNER et HORNE (1959).

d/ Techniques de visualisation des molécules d'ADN viral.

Les molécules d'ADN sont étalées suivant la technique de DAVIS et al. (1971) en utilisant une hypophase contenant 17 % de formamide. Après coloration à l'acétate d'uranyle alcoolique, les grilles sont ombrées par évaporation sous vide d'or - palladium. Les longueurs des molécules d'ADN du Densovirus de *Casphalia* et de celles des bactériophages PM₂ et ϕ X174, utilisées comme marqueurs internes, sont mesurées sur photographies à l'aide d'un intégrateur de courbes couplé à un ordinateur.

D - TECHNIQUES de CULTURE de CELLULES d'INSECTES :

1^o/ Les lignées cellulaires

Les cellules utilisées proviennent de deux lignées cellulaires :

- La lignée SCLd 135 établie à partir de gaines ovariennes de jeunes chrysalides de *L. dispar* (QUIOT, 1976).

- La lignée SPC Bm40 récemment établie (20^e passage) à partir de gaines ovariennes de *B. mori* au laboratoire de cultures cellulaires de Saint-Christol (HINK, 1983).

2^o/ Méthode de culture

Les cellules sont cultivées soit dans le milieu GM 15 (QUIOT, 1976) basé sur le principe de la standardisation des milieux de culture pour invertébrés (VAGO et QUIOT, 1969), soit dans le milieu de GRACE (1962). Ces 2 milieux sont additionnés, soit de 20 % de sérum de veau foetal, soit de 10 % de sérum de *B. mori* et 10 % de sérum de veau foetal.

Les essais ont été réalisés à 28° C soit dans des fioles en plastique de 50 ml, soit dans des boîtes de PETRI en plastique de 35 mm de diamètre contenant une lamelle de verre sur laquelle se fixent les cellules en vue de la réalisation des colorations histologiques.

E - TECHNIQUES de PURIFICATION des VIRUS

1°/ Broyage et clarification

Les larves infectées sont broyées dans un tampon tris - Hcl 0,05 M contenant 0,002 M de Dodecyl sulfate de sodium (SDS) PH 7,8. Le broyat est filtré sur mousseline, clarifié par centrifugation de 10 minutes à 8 000 g et mis au culot par ultracentrifugation pendant 2 h à 145 000 g. Les culots repris dans le même tampon sont dispersés aux ultrasons puis clarifiés 10 minutes à 8 000 g. Le surnageant est, soit passé sur colonne de chromatographie, soit déposé sur gradients de densité.

2°/ Purification sur colonne de chromatographie

a/ filtration sur gel

elles sont menées sur une colonne Pharmacia K 16-40, munie d'adaptateurs, et chargée de Sepharose 2 B ; elle est équilibrée avec le tampon Tris - Hcl 0,05 M pH 7,8.

La sortie de colonne est raccordée à un analyseur enregistreur ISCO U A 5.

Les mesures d'absorption sont effectuées à 254 nm de longueur d'onde.

b/ échange d'ions

La colonne est chargée de cellulose Ecteola échangeuse d'anions et équilibrée avec le tampon Tris - Hcl. Elle est raccordée au système de détection décrit ci-dessus.

3°/ Purification en gradients de densité

Les suspensions virales partiellement purifiées sont déposées sur des gradients de saccharose 10 % - 50 % (Poids-Poids) préparés dans du tampon Tris - Hcl et centrifugées à 7° C pendant 2 h à 200 000 g.

Le tracé absorptiométrique du profil du gradient est obtenu à 260 nm de longueur d'onde à l'aide d'un analyseur relié à la cuve d'un spectrophotomètre Beckman U V 5230.

Le saccharose contenu dans les bandes de virus prélevées dans les gradients est éliminé par dialyse à 4° C contre du tampon phosphate 0,05 M pH 7,4 pendant 48 heures avec renouvellement toutes les 8 heures du tampon. 2 à 4 gradients successifs sont nécessaires pour obtenir des suspensions virales d'un haut degré de pureté. La purification est achevée par dépôt de la suspension sur un gradient préformé de chlorure de césium 15 % - 45 % P.P. et centrifugation à 20° C pendant 6 heures à 200 000 g.

F - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1°/ Dosages colorimétriques

L'ADN est dosé par la réaction à la Diphénylamine selon la méthode de DISCHE (1930) modifiée par GILES et MYERS (1965).

L'ARN est dosé par la méthode à l'orcinol selon MEJBAUM (1939).

Le dosage des protéines est effectué avec le réactif de FOLIN selon la méthode de LOWRY et al. (1951) modifiée par HARTREE (1972). Les mesures absorptiométriques ont été réalisées au spectrophotomètre Beckman DK 2 A.

2°/ Dosages spectrophotométriques

Le spectre d'absorption des suspensions de virus purifiés ou d'acide nucléique est obtenu dans le proche U.V. (220 à 320 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau Beckman U V 5230. On utilise des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

3°/ Analyses en électrophorèse

a/ Electrophorèse des protéines virales.

Le nombre et le poids moléculaire des protéines virales ont été déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS selon la méthode de WEBER et OSBORN (1969). Des gels à 7 %, 9 % et 11 % de polyacrylamide sont coulés entre 2 plaques de verre. La technique de préparation des gels est la suivante :

- Composition des tampons

Tampon de migration		Tampon de tassement	
Tris	1,876 M	Tris	1,251 M
SDS	0,5 %	SDS	1 %
	PH 8,8		PH 6,8

Tampon d'électrophorèse	Tampon de dépôt
Tris 0,025 M	Tris 0,125 M
Glycine 0,192 M	SDS 4 %
SDS 0,1 %	β .mercaptoéthanol 5 %
PH 8,3	glycérol 20 %
Tampon d'extraction	Bleu de Bromophénol
Tris 0,012 M	0,005 %
Na cl 0,172 M	PH 6,8
SDS 0,5 %	
PH 7,6	

- Préparation des gels

Les proportions des différentes solutions nécessaires à la préparation des gels en fonction de leur concentration en polyacrylamide sont consignées dans le tableau VIII.

Seuls les gels de migration dont la concentration en polyacrylamide est supérieure ou égale à 9 % sont surmontés d'un gel de tassement à 5 %.

La suspension virale est traitée par une solution dénaturante : le tampon de dépôt. Le mélange, volume à volume, est chauffé à 100° C pendant 5 minutes. Cinq protéines de référence, la phosphorylase b (PM : 94 000), le sérum albumine de boeuf (PM : 67 000), l'ovalbumine (PM : 43 000), l'anhydrase carbonique (PM : 20 100), permettent d'établir un étalonnage reliant la mobilité relative des protéines (Rf) au logarithme de leur poids moléculaire. Après une pré-électrophorèse d'une 1/2 heure et dépôt des échantillons, l'électrophorèse se déroule à température ambiante sous une tension de 100 V. Après leur séparation les polypeptides sont fixés par une solution d'acide trichloroacétique (T.C.A.) à 25 % pendant 1/2 heure puis colorés 12 heures par une solution, filtrée avant utilisation, contenant 0,1 % de bleu de Coomassie, 25 % de méthanol, et 10 % d'acide acétique. Les gels sont décolorés par plusieurs bains successifs

TABLEAU VIII : Protocole de préparation des gels.

Nature et Concentration du gel	Gel de tassement	gel de migration		
	5 %	7 %	9 %	11 %
Solution mère { Acrylamide 30 % et } Bis-Acrylamide 0,8 %	7,5 ml	23,5 ml	30,0 ml	36,6 ml
Filtration 0,45 μ m				
Tampon : T.migration (T.m.) ou T.tassement (T.T.)	T.T. 4,5 ml	T.m. 20 ml	T.m. 20 ml	T.m. 20 ml
H ₂ o distillée	32,4 ml	55,5 ml	49,0 ml	42,0 ml
Dégazage				
Persulfate d'Ammonium à 10 %	0,45 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Temed	45 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Quantités pour 1 gel de 17,8 x 13,8 x 0,27 cm ou 2 gels de 13,8 x 8,2 x 0,27 cm ou 4 gels de 8,2 x 8,2 x 0,27 cm				

de solution décolorante contenant 25 % de méthanol et 10 % d'acide acétique. Les gels sont alors photographiés, puis un enregistrement densitométrique est effectué au moyen d'un photomètre intégrateur Vernon.

b/ Electrophorèse de l'ARN viral.

L'ARN viral est libéré des particules par la méthode de HILZ et al. (1975). A 40 μ l de suspension de virus purifiés (200 μ g/ml), on ajoute 160 μ l d'un tampon Tris 0,01 M, EDTA 0,004 M, Na cl 0,1 M (TEN), PH 8, puis 20 μ l de proteinase K à 1 mg/ml et 14 μ l de lauroyl sarcosinate de sodium à 30 %.

L'action de l'enzyme et du détergent est poursuivie 2 heures à 37° C.

Les électrophorèses sont réalisées en plaques verticales (13,8 x 8,2 x 0,27 cm) en utilisant des gels à 2,5 % de polyacrylamide selon la méthode de PEACOCK et DINGMAN (1968) légèrement modifiée. Dans cette méthode le tampon de migration (10 X) contient : Tris 0,9 M, borate 0,9 M, EDTA 0,02 M, PH 8,2.

La composition du gel à 2,5 % de polyacrylamide est la suivante pour 100 ml :

- Solution mère

Acrylamide	40 %	
Bis-Acrylamide	2 %	6 ml
- Urée 10 M dans tampon 10 X 60 ml
- Tampon 10 X 10 ml

- H₂ O distillée 23 ml
- persulfate d'ammonium 10 % : 1 ml
- Temed 100 μ l

Nous utilisons comme tampon d'électrophorèse le tampon tris-borate - EDTA dilué 10 fois (x).

L'électrophorèse se déroule dans une cuve réfrigérée par un courant d'eau, sous une tension de 100 V pendant 15 heures.

Les fragments d'ARN sont révélés en lumière ultraviolette après coloration avec le bromure d'éthydiuim (0,005 % dans acétate de sodium 20 mM pH 7,7).

Nous avons utilisé plusieurs ARN monocaténares standard. Les ARN ribosomiaux 28 S et 18 S des cellules de la lignée BHK, l'ARN du virus de la paralysie du grillon (CrpV) estimé à $2,8 \cdot 10^6$ daltons (EATON et STEACIE, 1980) et l'ARN du virus C de drosophile (DCV) estimé à $3,0 \cdot 10^6$ daltons (JOUSSET et al. 1977).

4°/ Mesure de la densité du virus à l'équilibre.

La densité apparente du virus est déterminée après centrifugation en gradient de chlorure de césium 15 % - 45 % P.P. pendant 16 heures à 250 000 g. Elle est calculée d'après l'indice de réfraction mesuré à 25° C au réfractomètre de ABBE.

5°/ Extraction de l'ADN viral

La suspension de virus purifiés, dialysée contre le tampon Tris 0,01 M, EDTA 0,004 M, Na cl 0,1 M (TEN) PH 8, est

traitée par le lauroyl sarcosinate de sodium à 2 % et la protéinase K à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ pendant 2 heures à 37° C.

La déprotéinisation de la solution d'ADN est parachevée par deux extractions au phénol saturé de tampon TEN.

Après une lente agitation, puis une incubation de 15 minutes à 37° C, suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 6 000 g, la phase aqueuse est prélevée et dialysée contre du tampon Tris 0,01 M, EDTA 0,001 M, Na cl 0,1 M, PH 8.

La concentration de la solution d'ADN est calculée d'après sa densité optique à 260 nm.

6°/ Mesure de la température de fusion de l'ADN viral.

La solution d'ADN viral est dialysée contre du tampon Na cl 0,15 M, citrate trisodique 0,015 M (SSC), PH 7.

La courbe de dénaturation thermique est réalisée au spectrophotomètre Perkin Elmer.

Le pourcentage de G + C de l'ADN est calculé à partir de la température de fusion (T_m) d'après la relation de MARMUR et DOTY (1962).

Les ADN d'*Escherichia coli*, de *Clostridium perfringens* et de thymus de veau ont été utilisés comme témoins.

7°/ Réactivité de l'ADN viral au formaldéhyde.

La suspension de virus purifiés est mélangée avec un volume égal de formol à 3,6 % (SINSHEIMER, 1959). Le spectre d'absorption en lumière ultraviolette est tracé au temps zéro,

puis après 24 heures d'incubation à température ambiante. Ensuite le mélange est porté à 100° C pendant 10 minutes puis refroidi dans la glace et le spectre est tracé à nouveau.

La solution d'ADN viral a subi également le traitement au formol selon le même protocole.

G - TECHNIQUES SEROLOGIQUES

1°/ Préparation des antisérums

Des antisérums spécifiques sont préparés à partir de lapins et de souris.

Le lapin reçoit lors de l'immunisation initiale, puis en rappel 7 jours plus tard, 1 ml de suspension virale à 1,5 UDO₂₆₀/ml par injection dans la veine marginale de l'oreille. Une troisième inoculation est faite 14 jours plus tard par injection intramusculaire d'un mélange émulsionné comprenant 1 ml de suspension virale à 1,5 UDO₂₆₀/ml et 1 ml d'adjuvant complet de FREUND.

Le lapin est saigné 10 jours après le dernier rappel par ponction intracardiaque.

Des immunsérums spécifiques sont également préparés à partir de souris ascitiques.

Une souris saine adulte reçoit lors de l'immunisation initiale 0,1 ml de suspension virale à 1,5 UDO₂₆₀/ml par injection sous-cutanée derrière l'oreille, 0,1 ml de la même suspension par injection intramusculaire dans la cuisse, puis 0,2 ml d'un mélange contenant 0,1 ml de la suspension virale et 0,1 ml d'adjuvant complet de FREUND par injection intrapéritonéale.

Une inoculation intrapéritonéale identique est pratiquée en rappel 2 jours plus tard.

Au bout de 15 jours la souris reçoit d'une part un deuxième rappel par injection intraveineuse dans la queue de 0,2 ml de suspension virale et d'autre part une injection intrapéritonéale de 0,5 ml de liquide ascitique dilué 10 fois dans du sérum physiologique.

La saignée doit avoir lieu 9 à 10 jours plus tard par ponction intrapéritonéale, la souris succombant au bout de 11 à 12 jours.

Les sérums recueillis après rétraction du caillot (1 h à 37° C ou 12 h à 10° C) sont centrifugés pendant 10 minutes à 5 000 g. Ils sont conservés au congélateur sans adjonction de glycérol ou d'azide de sodium, jusqu'au moment de l'utilisation.

2°/ Immunodiffusion en gel d'agarose

Cette méthode de double diffusion (OUCHTERLONY, 1948) est qualitative et se prête particulièrement bien à l'étude de systèmes antigéniques complexes (parentés immunologiques existant entre antigènes de diverses origines).

Antigènes et anticorps diffusent à travers un gel d'agarose peu concentré (1 %) dans un tampon phosphate 0,05 M PH 7,4.

Un gel de 1,5 mm d'épaisseur est coulé sur une lame histologique. 7 puits disposés aux sommets et au centre d'un hexagone sont pratiqués à l'aide d'un emporte-pièce de 4 mm de diamètre muni d'un dispositif d'aspiration sous vide. 20 μ l d'antigène ou d'anticorps sont disposés dans chaque puits.

Les lames stockées dans une chambre humide sont mises à incuber à 37° C pendant 24 heures.

La plaque de gélose est alors lavée dans 4 bains d'eau physiologique (Na cl 0,9 %) de 10 minutes chacun afin d'éliminer les protéines non précipitées, puis dans 2 bains d'eau distillée pour entraîner l'excédent de sel. Entre chaque bain la plaque est pressée pendant 15 minutes sous une bande de papier filtre humide et plusieurs épaisseurs de papier absorbant. La plaque est alors séchée à l'étuve. (50° C). La coloration se fait dans une solution aqueuse contenant 0,5 % de bleu de Coomassie, 45 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique, filtrée avant usage. Après 15 minutes les plaques sont décolorées dans une solution aqueuse contenant 45 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique.

RESULTATS

C H A P I T R E I V

ETUDE d'une DENSONUCLEOSE chez CASPHALIA EXTRANEA

A -	INTRODUCTION	49
B -	CONTRIBUTION à l'ETUDE du CYCLE BIOLOGIQUE de l'HOTE	50
	1°/ Introduction	50
	2°/ Morphologie	50
	a/ stade imaginal	50
	b/ stades larvaires	51
	c/ stade nymphal	51
	3°/ Biologie et dégâts	52
	4°/ Observations sur un arrêt de dévelop- pement au stade prénympgal	54
	5°/ Discussion	55
C -	MISE EN EVIDENCE de la VIROSE	56
	1°/ Introduction	56
	2°/ Symptômes et déroulement de la maladie	56
	3°/ Histopathologie	57
	4°/ Cytologie ultrastructurale	58
	5°/ Discussion	59

D - CARACTERISATION du VIRUS	60
1°/ Purification	60
2°/ Structure du virus	61
3°/ Spectre d'absorption en lumière ultra violette	61
4°/ Mesure de la densité du virus à l'équilibre	62
5°/ Composition chimique	62
6°/ Analyse électrophorétique des protéines virales	62
7°/ Caractérisation de l'ADN viral	64
a/ Spectre d'absorption en lumière ultra violette	64
b/ Réactivité au formaldéhyde	64
c/ Température de fusion	66
d/ Examen des molécules du génome au microscope électronique	66
8°/ Etude immunologique	68
9°/ Discussion	68
E - INFECTION EXPERIMENTALE de CULTURES CELLULAIRES	70
1°/ Introduction	70
2°/ Etude en microscopie photonique	70
3°/ Etude ultrastructurale	71
4°/ Discussion	72

C H A P I T R E IV

ETUDE D'UNE DENSONUCLEOSE chez *CASPHALIA EXTRANEA*

A - INTRODUCTION

Lors de contrôles sanitaires de routine effectués dans les plantations de palmacées en Côte d'Ivoire, les entomologistes de l'IRHO signalèrent au cours du mois d'Août 1980 d'importants dégâts causés dans la plantation d'Eloka par les larves d'un Lépidoptère *Límacodidae*, appartenant à une espèce non déterminée, apparue pour la première fois en forte densité. Cette pullulation s'accompagna de mortalités anormales affectant une partie de la population de cet insecte.

Des prélèvements d'individus moribonds furent effectués dans le but d'étudier les causes de cette mortalité.

Parallèlement aux recherches entreprises au laboratoire d'Adiopodoumé pour déterminer la nature de l'agent causal de la maladie, une étude sur la biologie de l'hôte fut entreprise afin d'effectuer une diagnose précise de ce dernier et de connaître les caractéristiques essentielles de son cycle biologique.

Nous présentons en première partie de ce chapitre les résultats concernant le cycle biologique de l'hôte, puis dans une deuxième partie ceux ayant trait à la mise en évidence d'une virose et à la caractérisation du virus responsable.

B - CONTRIBUTION à l'ETUDE du CYCLE BIOLOGIQUE de l'HOTE

1°/ *Introduction*

Il existe très peu d'ouvrages de systématique permettant la détermination d'une espèce de Lépidoptère basée sur la description des stades larvaires.

Nous avons donc été amenés à réaliser un élevage des larves prélevées dans la plantation d'Eloka afin d'obtenir l'imago et de déterminer ainsi à quelle espèce nous avons affaire. Cet élevage, joint à des observations sur le terrain nous ont permis de préciser le cycle biologique de ce Lépidoptère.

2°/ *Morphologie*a/ *Stade imaginal*

La diagnose que nous avons réalisée sur les imagos issus de l'élevage nous a conduit à les identifier comme appartenant au genre *Casphalia* et à l'espèce *extranea*. La description complète de l'imago de cette espèce décrite par WALKER en 1869 est donnée au chapitre III.

Les deux sexes sont de coloration identique mais on les différencie par les caractères suivants :

- chez le mâle : l'envergure varie de 32 à 34 mm.
Les antennes sont fasciculées, épaisses sur le premier tiers, et fines sur les deux tiers apicaux.
- chez la femelle : l'envergure varie de 43 à 45 mm et les antennes sont filiformes (Pl.I, fig. 5).

b/ Stades larvaires

Nous avons observé 8 stades larvaires, distincts essentiellement par la taille.

A l'éclosion la larve néonate mesure en moyenne 1,5 mm de long. Elle est de couleur entièrement jaune paille. Ainsi que la plupart des *Límacodidae*, la capsule céphalique est invaginée dans un repli du segment prothoracique (Pl. I, Fig. 1).

La larve de dernier stade mesure environ 28 mm de long. Elle a une teinte générale vert pâle et possède quatre rangées longitudinales de tubercules coniques ornés de soies jaunes urticantes. Nous remarquons certains tubercules, plus gros, hérissés de soies noires. Ils sont au nombre de 10 dans la partie antérieure et de 4 dans la partie postérieure (Pl. I, Fig. 2 et 3).

En fin de développement cette larve change de teinte, devant jaunâtre, la cuticule ayant pris un aspect gras (Pl. III, Fig. 10).

c/ Stade nymphal

La prénymphe et plus tard la nymphe, sont enfermées dans un cocon très épais, brun, de forme ovoïde. Les cocons présentent un dimorphisme sexuel. Les cocons des femelles mesurent 16 à 18 mm de long et pèsent 0,9 à 1,2 g, ceux des mâles mesurent 12 à 14 mm et pèsent 0,3 à 0,6 g (Pl. I, Fig. 4). Ils sont formés de 2 couches de soie différentes. La première, d'un tissage grossier très serré, à la partie externe, la deuxième, d'un tissage très fin et lisse, à la partie interne.

3°/ Biologie et dégâts

L'adulte, qui a une durée de vie d'environ 15 jours, a une **activité essentiellement nocturne**. La femelle pond ses oeufs groupés en ooplaque sur la face inférieure d'une foliole. Chaque ponte est constituée d'une centaine d'oeufs. La période d'incubation est de 6 à 7 jours.

Les larves néonates restent grégaires (Pl.II, Fig. 8). Ce regroupement s'observe jusqu'au 4^o stade larvaire. Pendant cette période on a pu constater que les larves, isolées d'une colonie et placées individuellement sur une autre foliole, ne s'alimentent plus, s'immobilisent et meurent.

Les larves des quatre premiers stades s'attaquent à de petites zones où elles ne consomment que les cellules de l'épiderme inférieur de la foliole ; le reste de l'épaisseur foliaire se dessèche rapidement et prend une teinte grisâtre qui permet la localisation rapide des jeunes colonies (Pl.II, Fig. 8). A partir du 5^e stade l'instinct grégaire disparaît. Les larves consomment la foliole sur toute son épaisseur ne laissant que la nervure centrale (Pl III, Fig. 9). C'est durant le dernier stade que la larve consomme la plus grande quantité de tissu foliaire.

Sur la plantation d'Eloka, durant les mois d'Août et de Septembre 1980, la pullulation de *C. extranea* occasionna de sévères défoliations sur plus d'une centaine d'hectares.

Les huit stades larvaires couvrent une période de 80 jours environ.

La larve, en fin de développement, se laisse tomber au sol depuis la feuille. Elle s'enfouit à faible profondeur pour se confectionner un cocon. Parvenu au stade prénymphal, l'insecte subit un arrêt de développement qui s'étend sur sept mois. Ce phénomène sera détaillé dans le paragraphe suivant. La nymphose dure ensuite trente jours environ. La sortie de l'imago s'effectue par un opercule que repousse l'insecte à un des pôles du cocon. Quelques heures après l'émergence le papillon prend son envol vers la couronne du palmier.

Les étapes du cycle biologique de *C. extranea* sont consignées dans le tableau IX.

TABLEAU IX : Les étapes du cycle biologique de *C. extranea*.

SAISONS	M O I S	Stade de développement
Petite saison des pluies	Octobre	Prénympe en diapause
	Novembre	
Grande saison sèche	Décembre	
	Janvier	
	Février	
	Mars	
Grande saison des pluies	Avril	Nympe Adulte oeuf Stades larvaires
	Mai	
	Juin	
	Juillet	
Petite saison sèche	Août	
	Septembre	

4°/ *Observations sur un arrêt de développement
au stade prénymphal*

La prénympe de *C. extranea* subit un arrêt de développement de sept mois recouvrant la grande saison sèche qui s'étend du mois de Décembre au mois d'Avril en basse Côte d'Ivoire.

La diminution de l'hygrométrie qui s'observe dès la petite saison sèche, aux mois d'Août et de Septembre pourrait être le facteur inducteur de cet arrêt de développement qui agirait sur un des derniers stades larvaires de l'insecte.

Des mécanismes physiologiques permettant à l'insecte de faire coïncider ses périodes d'activité avec les périodes de l'année favorables et ses périodes de ralentissement métabolique avec les saisons pendant lesquelles il ne peut s'alimenter est une des constantes des définitions de la diapause.

De plus, des examens anatomiques effectués chez des larves de dernier stade, étant sur le point de tisser le cocon, nous ont permis de constater l'ampleur du développement du tissu adipeux, bien que ces insectes soient dans une phase préparatoire à la nymphose.

Ce phénomène, pouvant correspondre à une accumulation de réserves métaboliques, caractérise une période de prédiapause telle qu'on l'observe chez les insectes (MANSINGH, 1971).

D'autre part, cet arrêt de développement semble levé par l'arrivée de la grande saison des pluies au mois d'avril.

Le terme de diapause, réservé aux arrêts prolongés, à des stades fixes du développement, et pouvant se terminer avec la disparition du facteur inducteur, peut s'appliquer à l'arrêt de développement affectant la prénymphe de *C. extranea*.

5°/ Discussion

Les observations de laboratoire nous ont conduit à identifier le Lépidoptère *Limacodidae C. extranea* comme nouveau ravageur des plantations industrielles de palmiers en Côte d'Ivoire.

En effet cette espèce n'avait pas été signalée auparavant comme étant économiquement importante. Cette situation peut s'expliquer soit par le fait qu'il s'agit d'une colonisation récente de ces plantations, soit par la biologie inhabituelle de ce *Limacodidae*. En effet, contrairement à de nombreux Lépidoptères tropicaux, notamment les *Limacodidae*, l'espèce *C. extranea* ne présente qu'une seule génération par an.

Nous avons montré l'existence chez cet insecte d'un arrêt de développement en saison sèche.

Ce phénomène qui se manifeste à chaque génération au même stade de prénymphe et qui semble induit par un facteur défavorable présente toutes les caractéristiques d'une véritable diapause.

Le déclenchement des diapauses, généralement induit par des variations de photopériode ou de température dans les zones tempérées, aurait plus vraisemblablement pour origine dans le cas présent des variations de l'hygrométrie, les deux premiers paramètres ne fluctuant presque pas au cours

de l'année en zone subéquatoriale.

C - MISE EN EVIDENCE de la VIROSE

1°/ Introduction

Nous avons étudié les symptômes de la maladie sur des larves infectées expérimentalement par des broyats de cadavres et recherché l'agent responsable en soumettant d'une part ces larves à des examens histopathologiques et d'autre part les tissus lésés à une étude ultrastructurale.

2°/ Symptômes et déroulement de la maladie

Les premiers symptômes consistent en une diminution d'activité et d'appétit des larves atteintes. Les jeunes larves perdent leur instinct grégaire se dispersant sur le feuillage tandis qu'elles cessent de s'alimenter.

Suivant le stade larvaire, la prise de nourriture s'arrête complètement entre le 1^{er} et le 3^e jour après la contamination alors que les chenilles s'immobilisent sur les folioles.

Les jeunes larves (jusqu'au 4^e stade) meurent rapidement dès le 2^e ou 3^e jour post-contamination tandis que les larves plus âgées survivent jusqu'à 6 à 8 jours.

Au cours de l'évolution de la maladie nous remarquons un changement de couleur des téguments. Initialement vert pâle les larves deviennent jaune puis marron. Avant la mort, des sécrétions buccales et anales de couleur brune s'écoulent, marquant des altérations notables du système digestif. Le corps de la larve devient alors très flasque (Pl. III, Fig. 11). Les jeunes chenilles meurent généralement collées au substrat, alors que les larves plus âgées tombent au sol.

Des modifications apparaissent dès la dissection. En effet, chez la larve saine, la paroi de celui-ci, mince, laisse apercevoir par transparence le contenu intestinal. Par contre, chez la larve malade, l'intestin dépourvu de bol alimentaire est opaque, à paroi très épaissie. Ce symptôme interne est le plus caractéristique de la maladie.

3°/ Histopathologie

Le tissu adipeux est réduit à l'état de cordons ou de bandelettes (Pl. IV, (fig. 13)). Il présente des noyaux hypertrophiés, parfois denses, non plus étoilés mais arrondis. Les lobes sont rétractés, le cytoplasme entourant le noyau d'une mince couche.

L'hypoderme est modifié et montre par endroits un empilement de cellules faisant suite à l'assise cellulaire unique qui tapisse la cuticule.

Les cellules musculaires ont l'aspect connu chez des larves ayant jeuné ; leur cytoplasme est vacuolisé et certaines présentent un noyau anguleux très dense (Pl. IV, fig. 13). Il en est de même pour les cellules des glandes séricigènes. Certains noyaux, sans présenter d'hypertrophie, sont occupés par une masse dense et de nombreuses vacuoles apparaissent dans le cytoplasme (Pl. IV, fig. 14). La glande a perdu son aspect turgescent et on ne retrouve plus la striation rayonnante due aux épaisissements cytoplasmiques. Ces observations rejoignent la description des lésions subies par l'appareil séricigène de *G. mellonella* atteint de denonucléose (AMARGIER, 1966).

Les modifications les plus importantes apparaissent toutefois au niveau de l'intestin moyen. Dès l'apparition des premiers symptômes, les cellules de l'épithélium intestinal commencent à se multiplier activement, certaines

se détachent et sont expulsées dans la lumière intestinale (pl. V, fig. 16). La prolifération anormale de cellules s'accroît et l'on observe un élargissement de la paroi intestinale.

A la place de l'épithélium intestinal à une assise cellulaire des larves saines (pl. V fig. 15) apparaît un tissu constitué de cellules imbriquées qui finit par obstruer la lumière intestinale (pl. V, fig. 18 et pl. IV, fig. 12).

De forme arrondie, les cellules ont souvent un noyau légèrement hypertrophié, renfermant une masse centrale très dense teintée par la galloxyanthrone et le réactif de SCHIFF lors de la coloration de FEULGEN. Le cytoplasme se vacuolise, une grosse vacuole repoussant souvent le noyau à la périphérie (pl. V, fig. 17). Dans la zone centrale de la lumière les cellules ne présentant plus de cohésion et les membranes cellulaires sont rompues.

L'état pathologique que nous venons de décrire, se traduisant par la formation de masses d'allure tumorale résultant de la modification de la paroi de l'intestin moyen, s'apparente au syndrome dû à une infection parvovirale décrit chez le Lépidoptère *S. fusca* (AMARGIER et al. 1979).

4°/ Cytologie ultrastructurale

Les examens histopathologiques ayant révélé que les lésions les plus notoires se situent au niveau de l'intestin moyen, nos observations ont essentiellement porté sur les cellules épithéliales et plus précisément au niveau des cellules libérées dans la lumière intestinale qui présentent les altérations les plus caractéristiques.

Ces cellules fortement vacuolisées possèdent un noyau dont le matériel chromatinien a complètement disparu.

Celui-ci est remplacé par une masse volumineuse, de forte opacité aux électrons, occupant une position centrale (Pl. VI, fig. 19).

A la périphérie de ce matériel dense semblent se détacher des particules virales isométriques de petite taille voisine de 20 nm. L'individualisation de virions s'observe également au sein du stroma virogène amorphe auquel ils se substituent progressivement (Pl. VII, fig. 20).

Outre ces formations, les noyaux présentent de profondes altérations de leur double membrane caractérisées par la délamination des feuillettes interne et externe, et des contours festonnés.

Ces altérations conduisent parfois à la rupture de l'enveloppe nucléaire et peuvent expliquer les accumulations de particules virales dans les régions du cytoplasme avoisinant le noyau (Pl. VI, Fig. 19).

5°/ Discussion

L'hypertrophie affectant les noyaux de plusieurs tissus et s'accompagnant de l'apparition de masses nucléaires denses fortement FEULGEN positives est caractéristique des maladies de type denonucléose connues chez de nombreux insectes (voir chapitre II).

La prolifération des cellules épithéliales de l'intestin moyen et leur accumulation dans la lumière intestinale évoquent les formations de masses d'allure tumorale décrites dans le cas des denonucléoses de *P. fuliginosa* (SUTO et al., 1978) et de *S. fusca* (AMARGIER et al., 1979).

D'autre part, la mise en évidence, en microscopie électronique, dans les noyaux atteints, de plages viroplasmiques dans lesquelles s'individualisent des particules isométriques d'environ 20 nm permet de rapprocher l'agent causal de cette maladie du groupe des Densovirus.

D - CARACTERISATION du VIRUS

1°/ Purification

La purification du virus est réalisée à partir de broyats de larves infectées.

Après clarification des extraits bruts, le virus est concentré par ultracentrifugation et une purification partielle est réalisée soit par passage de la suspension virale sur colonne chromatographique (Sepharose 2 B ou Ecteola cellulose, soit par centrifugation en gradient de densité de saccharose.

Cette première étape est généralement laborieuse car elle nécessite plusieurs cycles avant de débarrasser la suspension virale de certains contaminants cellulaires ayant des propriétés de sédimentation voisines de celles des virus.

Le spectre d'absorption dans l'ultra violet et le contrôle de la suspension au microscope électronique permettent d'apprécier le degré de pureté.

La purification est achevée par dépôt de la suspension sur un gradient préformé de chlorure de césium 15 % - 45 % P.P.

Après centrifugation à l'équilibre (16 h) le virus se concentre dans une fine bande d'opalescence bleutée située à mi-hauteur du tube et qui correspond sur l'enregistre-

ment absorptiométrique à 260 nm à un pic très symétrique.

C'est à partir de suspensions ainsi purifiées que nous avons étudié la structure fine du virion et réalisé sa caractérisation biochimique.

2°/ Structure du virus

L'examen, après contraste négatif à l'APT d'une suspension de virus purifiés comme indiqué ci-dessus, révèle que la préparation est virtuellement exempte de contaminants cellulaires. Les virions se présentent sous la forme de particules parasphériques, sans enveloppe, mesurant 22 nm de diamètre (Pl. VII, Fig. 21). Leurs contours hexagonaux sont particulièrement bien visibles dans les arrangements compacts des particules en monocouches ou en édifices paracristallins résultant de la superposition des virions (Pl. VII, Fig. 22).

Bien qu'à la limite de la résolution, on distingue clairement les capsomères à la périphérie des particules.

Si la plupart des virions sont clairs aux électrons et correspondent donc à des particules pleines, on observe quelques particules creuses pénétrées par le colorant.

3°/ Spectre d'absorption en lumière ultra violette

Le spectre d'absorption dans le proche ultra violet d'une suspension de virus purifiés est caractéristique de nucléoprotéines présentant un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm (Pl. VIII, Fig. 23). Le rapport D_{260}/D_{280} et D_{260}/D_{240} sont respectivement de 1,50 et 1,40.

4°/ Mesure de la densité du virus à l'équilibre

La densité apparente du virus déterminée après centrifugation en gradient de chlorure de césium 15 % - 45 % P.P. pendant 16 heures à 250 000 g. est de 1,38 (Pl. VIII, Fig. 24)

5°/ Composition chimique

Nous avons cherché à déterminer le type d'acide nucléique constituant la génome, et son pourcentage par rapport aux protéines structurales.

Une suspension de virus purifiés a donné une réaction positive à la diphénylamine selon la méthode de DISCHE (1930) modifiée par GILES et MYERS (1965). Par contre, aucune coloration n'a été observée avec le réactif à l'orcinol spécifique des ARN (MEJBAUM, 1939). L'acide nucléique viral est donc un ADN. Le pourcentage d'acide nucléique a été établi en dosant les protéines par la méthode de HARTREE (1972) et l'ADN par la méthode de GILES et MYERS (1965). Pour une suspension de 4 D.O₂₆₀/ml, nous avons trouvé une teneur en ADN de 164,14 µg/ml et en protéines de 352,80 µg/ml. Le pourcentage d'ADN déduit de ces valeurs est de 32 %.

6°/ Analyse électrophorétique des protéines virales

L'électrophorèse en gels de polyacrylamide - SDS de différentes concentrations, des protéines virales après dénaturation des virions, révèle 4 polypeptides structuraux (Pl. IX, Fig. 25). L'enregistrement densitométrique des gels (Pl. IX, Fig. 26) permet d'évaluer les proportions relatives des polypeptides. Leur poids moléculaire a été déterminé selon la méthode de WEBER et OSBORN (1969) d'après la migration de protéines de référence (Pl. X, Fig. 27). Ces valeurs sont consignées dans le tableau X.

TABLEAU X : Poids moléculaire et proportions relatives
des protéines de structure du virus de *C. extranea*

	PV ₁	PV ₂	PV ₃	PV ₄
Poids moléculaire	82 000	74 000	54 000	49 000
Proportion relative	8 %	27 %	6 %	59 %

Une étude comparée du Densovirus de *J. coenia* et du virus de *C. extranea* a montré une similitude des profils électrophorétiques de leurs polypeptides (Pl. IX, Fig. 25) et de leurs poids moléculaires (Tableau XI). En effet la composition polypeptidique de la capsidie consiste, pour ces deux virus, en quatre protéines, celle de plus faible poids moléculaire (PV₄) étant toujours majoritaire.

TABLEAU XI : Comparaison électrophorétique des protéines virales du Densovirus de *J. coenia* et du virus de *C. extranea*.

	PV ₁	PV ₂	PV ₃	PV ₄
<i>J. coenia</i>	101 000 - 14 %	68 000 - 26 %	58 000 - 21 %	49 000 - 39 %
<i>C. extranea</i>	82 000 - 8 %	74 000 - 27 %	54 000 - 6 %	49 000 - 59 %

7°/ Caractérisation de l'ADN viral

Nous avons extrait l'ADN du virus de *C. extranea* dans le but d'étudier les propriétés physico-chimiques du génome, élément essentiel de la caractérisation et de la classification du virus.

a/ Spectre d'absorption dans l'ultraviolet

Le spectre d'absorption de l'acide nucléique présente un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm (Pl. XI, Fig. 28). Les rapports $D.O._{260} / D.O._{280}$ et $D.O._{260} / D.O._{240}$ sont respectivement de 1,82 et 1,76.

b/ Réactivité au formaldéhyde

Nous avons recherché la structure de l'ADN viral en étudiant sa réactivité avec le formaldéhyde à la concentration finale de 1,8 % et à la température de 37° C. (SINSHEIMER, 1959).

- effet du formaldéhyde sur le spectre d'absorption de la suspension de virus purifiés :

L'addition de formaldéhyde provoque une augmentation lente de l'absorption à 260 nm et un déplacement du spectre au cours du temps vers de plus grandes longueurs d'ondes, l'absorption maximale se situant alors vers 265 nm (Pl. XII, fig. 29). L'hyperchromicité est de 6 % à 260 nm et de 10 % au maximum, au bout de 24 heures. Elle est due à une fixation progressive du formaldéhyde sur les groupements aminés libres des bases de l'acide nucléique.

Ces valeurs de l'effet hyperchrome et le déplacement du maximum sont compatibles avec une structure monocaténaire de l'ADN.

Pour confirmer celle-ci nous avons fait subir au mélange virus-formaldéhyde un chauffage de 10' à 100° C. Après ce traitement l'hyperchromicité à 260 nm a augmenté de 9 %. Cette valeur semble un peu élevée pour un ADN monocaténaire ; elle est cependant très nettement inférieure à celle qu'aurait produite un ADN bicaténaire. L'ensemble de ces observations nous amène à conclure que la structure de l'acide nucléique viral à l'intérieur de la particule est monocaténaire.

- effet du formaldéhyde sur le spectre d'absorption de l'ADN extrait

Lorsque l'ADN viral extrait dans le tampon TEN extraction (Tris 0,01 M, EDTA 0,004 M, NaCl 0,1 M) est traité par le formaldéhyde dans les mêmes conditions que précédemment (concentration finale HcHo : 1,8 %, 3,7° C), on observe un effet hyperchrome très faible, ne dépassant pas 2 % au bout de 24 heures (Pl XII, Fig. 30). Par contre le chauffage à 100° C de la préparation entraîne une hyperchromicité de 20%. Cet effet hyperchrome important traduit la brusque réactivité au formaldéhyde d'un ADN bicaténaire après sa dénaturation thermique. Ces résultats nous conduisent donc à conclure que l'ADN est sous forme monocaténaire dans le virion et bicaténaire après extraction dans des conditions de force ionique élevée. Une telle conclusion implique que des chaînes de polarités complémentaires sont encapsidées séparément dans les virions et s'apparient dans certaines conditions d'extraction. Cette propriété est bien connue dans le groupe des Densovirus.

La particularité de l'ADN viral de former des chaînes bicaténaires sous certaines conditions d'extraction est en relation avec l'augmentation anormale de l'effet hyperchrome que nous avons constatée après chauffage à 100° C du virus en

présence de formaldéhyde. Ce phénomène peut être interprété par le fait que la suspension virale utilisée contenait probablement une faible proportion de particules dégradées après décongélation. L'ADN libéré de ces particules, dans un milieu de force ionique élevée, se trouvait donc sous forme bicaténaire, et sa dénaturation thermique est vraisemblablement responsable de l'effet hyperchrome observé.

Une autre interprétation fait intervenir la présence dans le génome viral monocaténaire de séquences complémentaires susceptibles de former en certaines régions des configurations bicaténaires.

c/ Température de fusion

La courbe de fusion de l'ADN du virus de *C. extranea* a été réalisée selon la méthode décrite au chapitre III en utilisant l'ADN bicaténaire d'*Escherichia coli* comme référence.

Le profil de dénaturation thermique de l'ADN viral (Pl. XIII, Fig. 31) est caractéristique d'un ADN bicaténaire. On observe un effet hyperchrome important (28 %) dans une zone étroite de température et la valeur de la température de fusion qui correspond au point d'inflexion de la courbe est de 84,5° C.

Le pourcentage en G + C calculé à partir de cette valeur en utilisant la relation de MARMUR et DOTY (1962) modifiée (VEYRUNES, communication personnelle) : $G + C \% = (T_m - 69,4) / 2,386$ est de 36 %.

d/ Examen des molécules du génome au microscope électronique

Nous avons examiné au microscope électronique des préparations d'ADN viral, extrait dans des conditions de force

ionique élevée (Tampon TEN). Les étalements sont réalisés selon la méthode de DAVIS et al. (1971) en présence de molécules d'ADN circulaire bicaténaire du bactériophage PM₂ et d'ADN circulaire monocaténaire du bactériophage Ø X 174, servant de références.

L'examen de ces préparations révèle essentiellement des molécules linéaires bicaténaires (Pl. XIV, Fig. 32 à 35) dont l'histogramme des longueurs (Pl. XV, Fig. 36), réalisé sur 41 molécules, fait apparaître un pic très net entre 2,0 et 2,1 µm donnant une longueur moyenne de 2,04 µm.

Les histogrammes de longueurs de 38 molécules d'ADN du bactériophage PM₂ et de 45 molécules d'ADN du bactériophage Ø X 174 sont représentés sur la figure 36. La longueur moyenne de ces molécules est de 3,48 µm pour l'ADN de PM₂ et 1,80 µm pour celui de Ø X 174. Sachant que les poids moléculaires de ces ADN sont respectivement de $6,4 \cdot 10^6$ daltons (ESPEJO et al., 1969) et $1,7 \cdot 10^6$ daltons (SINSHEIMER, 1959), celui de l'ADN du virus de *C. extranea* peut être déduit du rapport des longueurs des molécules. En utilisant comme référence l'ADN de PM₂, le poids moléculaire de l'ADN du virus de *C. extranea* peut être estimé à $3,8 \cdot 10^6$ daltons sous sa forme bicaténaire, soit $1,90 \cdot 10^6$ daltons pour l'ADN monocaténaire. En prenant comme référence l'ADN de Ø X 174, on trouve une valeur très voisine de $1,93 \cdot 10^6$ daltons pour la forme monocaténaire.

A côté des molécules circulaires monocaténaires d'ADN de Ø X 174 dont la taille se situe toujours dans une zone très étroite de longueur, entre 1,79 et 1,82 µm, nous avons observé quelques molécules ayant la même conformation mais de taille plus élevée comprise entre 1,9 et 2,1 µm. Une telle molécule circulaire est illustrée sur la figure 35. Il ne peut s'agir vraisemblablement que de molécules monocaténaires d'ADN du virus de *C. extranea* qui se sont circularisées soit par un artefact soit parce qu'elles possèdent des extrémités cohésives.

8°/ Etude immunologique

Des immunsérums de lapin et de souris ont été préparés contre les protéines capsidaires des virions de *C. extranea*.

Ces sérums réagissent avec l'antigène homologue en donnant un seul arc de précipitation en immunodiffusion (Pl. XVI, Fig. 37 A). Toutefois l'arc très fin, obtenu contre l'immunsérum de lapin, est plus net que celui, assez diffus, observé après précipitation avec l'immunsérum de souris.

Afin de rechercher les parentés immunologiques pouvant exister entre le virus de *C. extranea* et les Densovirus de *G. mellonella* et de *J. coenia*, nous l'avons fait réagir avec des immunsérum préparés contre ces deux Densovirus.

Aucun arc de précipitation n'a été observé, suggérant l'absence de communauté antigénique entre le virus de *C. extranea* et les deux Densovirus (Pl. XVI, Fig. 37 A). Nous avons d'autre part réalisé les réactions croisées en utilisant l'immunsérum de lapin anti virus de *C. extranea* contre les Densovirus de *G. mellonella* et de *J. coenia*. Comme précédemment nous n'avons obtenu aucun arc de précipitation entre cet immunsérum et les antigènes étudiés (Pl. XVI, Fig. 37 B).

Ces résultats indiquent nettement l'absence de parenté antigénique entre le virus de *C. extranea* et les Densovirus de *G. mellonella* et de *J. coenia*.

9°/ Discussion

Par l'ensemble de ses propriétés biophysiques et biochimiques, le virus isolé de *C. extranea* présente les

principales caractéristiques du genre Densovirus telles que nous les avons précisées au chapitre II. En effet, sa petite taille de 22 nm, sa densité apparente en chlorure de césium de 1,38, la composition polypeptidique de sa capside constituée de 4 protéines et la nature ADN monocaténaire de son génome de P.M. $1,93 \cdot 10^6$ daltons sont autant de propriétés qu'il partage avec ce groupe de virus (LONGWORTH, 1978 ; MATTHEWS, 1982 ; TIJSEN et al., 1982).

La comparaison détaillée des poids moléculaires des polypeptides structuraux (voir tableau II et XI) fait apparaître quelques différences entre le virus de *C. extranea* et les autres Densovirus. Toutefois, comme chez ces derniers c'est la protéine de plus faible poids moléculaire (PV_4) qui est la plus abondante. La réactivité différente au formaldéhyde de l'ADN viral selon qu'il est encapsidé ou qu'il a été extrait dans un tampon de force ionique élevée met en évidence une autre propriété fondamentale des Densovirus : celle d'avoir un génome constitué de chaînes de polarités différentes encapsidées séparément. En ce qui concerne le poids moléculaire du génome viral, la valeur de $1,93 \cdot 10^6$ daltons, calculée d'après la longueur des molécules, est voisine de celles déterminées pour les VDN de *G. mellonella*, *J. coenia* et *B. mori* (KELLY et al., 1977 ; NAKAGAKI et KAWASE, 1980 a) en utilisant la même technique.

La capacité de codage d'un tel génome est compatible avec la somme des poids moléculaires des polypeptides structuraux sans qu'il soit nécessaire de faire intervenir le chevauchement de gènes comme le suggèrent TIJSEN et KURSTAK (1981) pour le VDN de *G. mellonella*.

Si le Densovirus de *C. extranea* est très voisin des autres membres de ce genre par ses propriétés biophysiques

et biochimiques, il s'en distingue nettement par ses propriétés antigéniques. En effet, nous n'avons pu mettre en évidence aucune parenté immunologique entre ce virus et les VDN de *J. coenia* et de *G. mellonella* par la technique de double diffusion, ce qui nous amène à conclure qu'il s'agit d'un nouveau Densovirus.

E - INFECTION EXPERIMENTALE DE CULTURES CELLULAIRES

1°/ Introduction

Nous avons poursuivi notre étude en utilisant les possibilités de la culture cellulaire d'invertébrés.

Cette démarche avait pour but de trouver un système *in vitro* permissif nécessaire d'une part pour des études des différentes étapes de la pathogénèse du Densovirus de *C. extranea* au niveau cellulaire et d'autre part pour la production de virus étant donné les difficultés d'élevage de l'hôte.

Ainsi nous avons tenté l'infection de deux lignées de Lépidoptères, l'une de *L. dispar* : SCLd 135, l'autre de *B. mori* : SPCBm 40, soit à partir de virus purifié, soit par transfection à partir de l'ADN extrait du virus. Cette deuxième méthode ayant l'avantage de supprimer certaines barrières cellulaires et ainsi de favoriser l'infection.

2°/ Etude en microscopie photonique

L'observation des cellules en contraste de phase, 15 jours après l'introduction de suspension de virus purifiés, ne nous a pas permis de déceler d'effet cytopathogène net. De ce fait nous avons eu recours à la technique de coloration par l'acridine orange et à celle d'immunofluorescence indirecte.

Dans les 2 cas, on observe des masses intensément fluorescentes dans le noyau ainsi que dans la partie périnucléaire du cytoplasme (Pl. XVI, Fig. 28). Ceci suggère la localisation nucléaire mais aussi cytoplasmique du matériel viral. Pour préciser la nature de ces sites fluorescents, nous avons entrepris une étude en microscopie électronique.

3°/ Etude ultrastructurale

Dans les deux lignées, l'observation de coupes ultrafines révèle effectivement des localisations cytoplasmiques et nucléaires du Densovirus de *C. extranea*.

Dans le cytoplasme les virions apparaissent sous forme d'amas, délimités ou non par une membrane vacuolaire (Pl. XVIII, Fig. 41), souvent localisés à proximité du noyau (Pl. XX, Fig. 43). Par endroit la superposition de virions apparaît sous forme d'arrangements paracrystallins (Pl. XIX, Fig. 42). Dans ces cellules où l'infection apparaît cytoplasmique, on constate que la plupart des noyaux sont en dégénérescence. Celle-ci est caractérisée par une concentration de la chromatine en masses denses localisées essentiellement au contact de la membrane nucléaire et accompagnée d'un éclaircissement du nucléoplasme.

Quand les symptômes de l'infection apparaissent au niveau du noyau, on note une hypertrophie nucléaire importante. La chromatine progressivement dissociée est remplacée par un stroma virogène au sein duquel apparaissent d'importantes accumulations de virions se dispersant ensuite dans tout le nucléoplasme (Pl. XVII, Fig. 40 et Pl. XX, Fig. 43).

Dans le cas des transfections seules des observations de surnageants de cultures cellulaires après

contraste négatif à l'APT ont été réalisées à ce jour. Ces surnageants se sont avérés positifs et on a pu observer dans certains débris cellulaires une très forte concentration en virions suggérant une infection généralisée de la culture (Pl. XVI, Fig. 39).

4°/ *Discussion*

Il ressort de ces essais que les deux lignées utilisées permettent la multiplication du Densovirus de *C. extra-nea*, aussi bien par transfection que par infection par virions.

Il est à noter qu'il s'agit du premier cas d'infection de lignée cellulaire par un Densovirus, les infections rapportées dans la littérature ayant été réalisées uniquement sur primo-culture (VAGO et al., 1966 b ; QUIOT et al., 1973).

L'infection de ces lignées cellulaires, tout en confirmant la présence de virus à la fois dans le cytoplasme et le noyau offre une voie d'approche particulièrement favorable pour élucider cette localisation cytoplasmique des Densovirus dont le site de répllication est considéré comme étant uniquement nucléaire.

Enfin, l'infection de lignées cellulaires est nécessaire pour le clonage de populations virales en vue d'études génétiques ainsi que pour la production permanente de virus, l'élevage de l'hôte étant très difficile à réaliser.

C H A P I T R E V

ETUDE DE PETITS VIRUS ICOSAEDRIQUES à ARN CHEZ LATOIA.
VIRIDISSIMA et SIBINE FUSCA

A - INTRODUCTION	73
B - DONNEES SUR LA BIOLOGIE DES HOTES	74
C - CARACTERISATION DES DEUX VIRUS	75
1°/ Purification	75
2°/ Structure des virus	76
3°/ Spectre d'absorption en lumière ultra violette	76
4°/ Mesure de la densité à l'équilibre	76
5°/ Nature de l'acide nucléique viral	76
6°/ Analyse électrophorétique des protéines virales	77
7°/ Analyse électrophorétique de l'ARN viral	78
8°/ Caractérisation immunologique	79
9°/ Discussion.	80

C H A P I T R E V

ETUDE de PETITS VIRUS ICOSAEDRIQUES à ARN CHEZ
LATOIA VIRIDISSIMA et *SIBINE FUSCA*

A - INTRODUCTION

Au cours du mois de juin 1979 nous avons observé sur la plantation de cocotiers I.R.H.O. de Port-Bouët située en basse Côte d'Ivoire une importante pullulation du Lépidoptère *Limacodidae L. viridissima*, espèce fréquemment signalée comme défoliatrice en plantations industrielles de palmacées. Cette pullulation causa des dégâts sur plus de 50 hectares. On dénombra alors plus de 50 chenilles par palme.

Au bout de quinze jours une très forte mortalité apparut dans la population suggérant le déclenchement d'une épizootie. Des larves mortes ou malades furent alors congelées en vue d'identifier l'agent pathogène responsable de cette maladie. Les premiers examens au microscope électronique des broyats de ces larves révélèrent la présence de petits virus isométriques d'environ 30 nm de diamètre. Leur purification fut alors entreprise en vue de les caractériser.

D'autre part, à notre arrivée à la station de Saint-Christol un lot de larves du *Limacodidae Sibine fusca*, espèce Sud-Américaine, chez laquelle un Densovirus avait été décrit par MEYNADIER et al. en 1977, venait d'être reçu. L'examen d'un broyat de ces larves révéla, à côté de quelques virions

de type Densovirus d'environ 20 nm de diamètre, de nombreuses particules virales isométriques d'environ 30 nm (Pl. XXIII, Fig. 55).

La purification de ces dernières, nettement plus abondantes, fut alors entreprise en vue de réaliser une étude comparative de ce virus et de celui de *L. viridissima*.

Après une description de la biologie des hôtes, nous rapportons dans ce chapitre les résultats de cette étude.

B - DONNEES SUR LA BIOLOGIE DES HOTES

A partir d'un élevage réalisé en laboratoire, nous avons pu déterminer les différentes étapes du cycle biologique de *L. viridissima* (Cf. Tableau XII). De l'oeuf jusqu'au stade prénymphal ce cycle est très semblable à celui présenté au chapitre IV pour *C. extranea* et se caractérise par 8 stades larvaires dont la durée totale est comprise entre 67 et 87 jours.

Les larves vivent en colonies durant les premiers stades puis perdent cet instinct grégaire à partir du 4^e stade. La nymphose a lieu dans un cocon, collé sur la face inférieure des folioles, protégé par un revêtement urticant. Nous n'avons pas observé d'arrêt de développement et trois générations peuvent se succéder en douze mois.

Un cycle biologique tout à fait comparable a été décrit en Colombie chez *S. fusca* par GENTY et al. en 1978 (Cf. Tableau XII).

TABLEAU XII : Durée des différentes étapes du cycle biologique chez *L. viridissima* et *S. fusca*

ESPECE	Incubation de l'oeuf	Stades larvaires	Stade nymphal	TOTAL
<i>L. viridissima</i>	5 à 6 j.	8 stades : 67 à 87 j.	32 à 35 j.	104 à 129 j.
<i>S. fusca</i> *	6 à 8 j.	10 stades : 40 à 55 j.	32 à 40 j.	78 à 103 j.

* D'après GENTY et al. (1978).

Ces deux espèces présentent donc une biologie différente de celle de *C. extranea*, caractérisée en particulier par l'absence de diapause avec pour conséquence la potentialité de pullulations fréquentes.

C - CARACTERISATION DES DEUX VIRUS

1°/ Purification

Les larves infectées de *L. viridissima* et de *S. fusca* sont broyées séparément dans un tampon Tris-HCl 0,05 M de Ph : 7,8 contenant 0,002 M de S.D.S. pour favoriser la dispersion des particules. Les virus présents dans les broyats sont purifiés par plusieurs cycles de centrifugation en gradients de densité de saccharose selon les techniques exposées dans le chapitre III. La purification est achevée par centrifugation à l'équilibre en gradients préformés de chlorure de césium. Dans

ces conditions chacun des deux virus se concentre vers le milieu du gradient en une bande homogène ainsi que le révèle l'analyse absorptiométrique à 260 nm.

2°/ Structure des virus

L'examen après contraste négatif à l'APT des deux suspensions virales purifiées révèle des particules, sans enveloppe, de forme icosaédrique, mesurant 30 nm de diamètre dans le cas du virus de *L. viridissima* (Pl. XXIII, Fig. 53) et 29 nm pour celui de *S. fusca* (Pl. XXIII, Fig. 54).

3°/ Spectre d'absorption en lumière ultra violette

Les spectres d'absorption dans le proche ultra-violet de suspensions des deux virus purifiés sont caractéristiques de nucléoprotéines présentant dans les deux cas un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm (Pl. XXIV, Fig. 56 et 57). Les rapports D_{260}/D_{280} et D_{260}/D_{240} sont respectivement de 1,72 et 1,41 pour le virus de *L. viridissima* et de 1,49 et 1,20 pour celui de *S. fusca*.

4°/ Mesure de la densité à l'équilibre

Les densités apparentes des deux virus déterminées après centrifugation à l'équilibre (250 000 g., 16 h) en gradient de chlorure de césium 15 % - 45 % P.P. sont de 1,34 pour le virus de *L. viridissima* et de 1,36 pour celui de *S. fusca*.

5°/ Nature de l'acide nucléique viral

Nous avons déterminé la nature de l'acide

nucléique constituant le génome de ces deux virus par les méthodes biochimiques conventionnelles.

Pour chacun d'eux nous avons obtenu une réaction positive à l'orcinol (MEJBAUM, 1939). Par contre aucune coloration n'a été observée avec le réactif à la diphénylamine selon la méthode de DISCHE (1930) modifiée par GILES et MYERS (1965). Le génome de ces deux virus est donc constitué d'ARN.

6°/ Analyse électrophorétique des protéines virales

Le nombre, les proportions relatives et le poids moléculaire des protéines capsidaires des deux virus ont été déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7 %, 9 % et 11 % selon la méthode de WEBER et OSBORN (1969).

Les profils électrophorétiques (Pl. XXV, Fig. 58 et 60) et les enregistrements densitométriques des gels (Pl. XXV, Fig. 59 et 61) font apparaître des différences significatives entre les 2 virus, tant en ce qui concerne le nombre de polypeptides, que leurs poids moléculaires (Pl. XXVI, Fig. 62 et 63) et leurs proportions. Ces valeurs sont consignées dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII : Comparaison électrophorétique des protéines capsidaires des virus de *L. viridissima* et de *S. fusca*.

	PV ₁	PV ₂	PV ₃	PV ₄	PV ₅
<i>L. viridissima</i>	51 000 - 9 %	44 000 - 8 %	39 000 - 8 %	31 000 - 20 %	30 000 - 55 %
<i>S. fusca</i>	49 000 - 44 %	34 000 - 28 %	30 000 - 28 %		

Ainsi la composition polypeptidique du virus de *L. viridissima* consiste en deux protéines majeures de faible poids moléculaire (PV_4 : 31 000 et PV_5 : 30 000 daltons) et en trois protéines mineures (PV_1 , PV_2 et PV_3) de poids moléculaire 51 000, 44 000 et 39 000 daltons respectivement.

Par contre, pour le virus de *S. fusca* l'analyse électrophorétique révèle trois polypeptides (PV_1 , PV_2 , et PV_3) en quantités grossièrement équimoléculaires de poids moléculaire 49 000, 34 000 et 30 000 respectivement, celle de plus fort poids moléculaire (PV_1) étant légèrement majoritaire.

7°/ Analyse électrophorétique de l'ARN viral

L'ARN des deux virus est libéré par traitement des particules à la protéinase K et au sarkosyl selon la méthode de HILZ et al. (1975).

Le nombre et le poids moléculaire des fragments d'ARN constituant le génome viral sont déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 2,5 % selon la méthode de PEACOCK et DINGMAN (1968).

Les profils électrophorétiques des génomes des deux virus, examinés en lumière ultra-violette après coloration au bromure d'éthyldium, montrent dans chaque cas un seul fragment d'ARN (Pl. XXVII, Fig. 64), celui de *L. viridissima* migrant nettement plus vite que celui de *S. fusca*.

En prenant pour référence plusieurs ARN standards, en particulier celui du virus de la paralysie du grillon (P.M.: $2,8 \cdot 10^6$) et celui du virus C de drosophile (P.M. : $3,0 \cdot 10^6$), le poids moléculaire de l'ARN viral de *L. viridissima* est estimé à $2,9 \cdot 10^6$ daltons (Pl. XXVII, Fig. 65). Il est

beaucoup plus faible que celui du brin d'ARN du virus de *S. fusca* évalué dans les mêmes conditions à $5,4 \cdot 10^6$ daltons.

8°/ Caractérisation immunologique

Nous avons recherché les parentés immunologiques pouvant exister entre les antigènes capsidaires des Picornavirus DCV et CrPV et ceux des virus de *L. viridissima* et de *S. fusca* par la technique de double diffusion en gel d'agarose (OUCHTERLONY, 1948). Pour cela des immunsérums de lapin et de souris ont été préparés contre le virus de *L. viridissima* et un immunsérum de souris contre le virus de *S. fusca*.

Ces sérums réagissent avec l'antigène homologue en donnant un seul arc de précipitation (Pl. XXVIII, Fig. 66 et 68).

L'immunsérum antiviral de *L. viridissima* ne forme pas d'arc de précipitation avec le virus de *S. fusca* et réciproquement (Pl. XXVIII, Fig. 67 et 68).

De même aucun arc de précipitation n'a été observé entre les immunsérums anti virus de *L. viridissima* et de *S. fusca* et les Picornavirus DCV et CrPV (Pl. XXVIII, Fig. 67 et 68).

Ces résultats indiquent l'absence de parenté antigénique d'une part entre le virus de *L. viridissima* et celui de *S. fusca* et d'autre part entre ces virus et les deux Picornavirus de référence.

9°/ Discussion

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus conduit à considérer les deux virus isolés de *L. viridissima* et de *S. fusca* comme de petits virus icosaédriques à ARN qui, par leurs propriétés biophysiques, biochimiques et immunologiques, diffèrent nettement l'un de l'autre. Etant donné l'éloignement géographique des deux espèces hôtes, ces différences n'ont rien de surprenant.

Aucun des deux ne se rapproche véritablement des Picornavirus d'insectes les mieux connus, celui de DCV (JOUSSET et al., 1972) et celui de CrPV (REINGANUM et al., 1970).

Le virus de *S. fusca* a une composition polypeptidique et une densité apparente qui le font ressembler au virus P de la drosophile (PLUS et al., 1976). Toutefois en l'absence de données sur le génome de ce dernier il est difficile de pousser plus loin la comparaison.

Quant au virus de *L. viridissima*, si sa densité apparente et le poids moléculaire de son génome sont voisins de ceux déterminés pour les virus CrPV et DCV, sa composition polypeptidique est nettement différente.

Ces deux virus doivent donc être provisoirement rangés dans le groupe hétéroclite des petits virus icosaédriques à ARN d'invertébrés non classés (MATTHEWS, 1982). Alors que de nombreux Picornavirus d'invertébrés sont peu ou pas pathogènes pour leurs hôtes naturels ou que leur pathogénicité ne se manifeste qu'après inoculation, le virus isolé de *L. viridissima* s'avère capable de déclencher d'importantes épizooties dans les

conditions naturelles . D'autre part des infections expérimentales *per os* ont entraîné des mortalités élevées (Résultats non rapportés ici) indiquant le caractère hautement pathogène du virus. Quant au virus isolé de *S. fusca*, son abondance dans les échantillons reçus de Colombie suggère sa multiplication active dans l'hôte, parallèlement à celle du Densovirus.

RESUME et CONCLUSIONS

Les recherches sur la pathologie des Lépidoptères *Limacodidae* ravageurs de palmacées en Côte d'Ivoire exposées dans ce mémoire nous ont conduit à mettre en évidence deux viroses à caractère épizootique : une denonucléose chez *Casphalia extranea* et une picornavirose chez *Latoia viridissima*. Les agents responsables ont été isolés et caractérisés. Il s'agit des deux premiers cas de viroses décrites chez des *Limacodidae* africains. Nous avons également étudié un troisième virus isolé de *Sibine fusca*, *Limacodidae* d'Amérique du Sud.

La virose de *Casphalia extranea*

L'étude histopathologique de larves de *C. extranea* révèle une infection typique des viroses connues sous l'appellation de denonucléoses. Elle est en effet caractérisée par l'hypertrophie des noyaux s'accompagnant de l'apparition de masses nucléaires denses fortement FEULGEN positives. L'affinité tissulaire de l'agent pathogène, particulièrement nette pour l'intestin moyen est comparable à celle observée chez *S. fusca*, *Periplaneta fuliginosa* et *Bombyx mori* mais diffère du caractère polytropique excluant l'intestin moyen, décrit chez *Galleria mellonella*.

Sur coupes ultrafines des amas de particules virales sont observés dans le noyau mais aussi dans le cytoplasme. Ce phénomène, rarement décrit, a été signalé chez *Spodoptera littoralis* infecté par le Densovirus de *Junonia coenia*. La présence de virus dans le cytoplasme laisse supposer le passage des virions à travers la membrane nucléaire puis leur accumulation au sein de vacuoles.

La prolifération de l'épithélium de l'intestin moyen et l'accumulation de cellules dans la lumière intestinale rappellent les formations de masses d'allure tumorale décrites dans le cas des denonucléoses de *S. fusca* et *P. fuliginosa*.

Le virus, icosaédrique, sans enveloppe, de 22 nm de diamètre, a une densité apparente en chlorure de césium de 1,38, légèrement plus faible que celle des autres Densovirus. La capsid virale est constituée comme celle des Densovirus de quatre polypeptides dont les poids moléculaires et les proportions sont toutefois différents.

Le génome viral est un ADN et son pourcentage par rapport aux protéines virales est de 32 %. La réactivité différente au formaldéhyde de l'ADN viral selon qu'il est encapsidé ou qu'il a été extrait dans un tampon de force ionique élevé nous amène à conclure qu'il est sous forme monocaténaire dans le virion et que des chaînes de polarités complémentaires encapsidées séparément peuvent s'apparier sous certaines conditions d'extraction pour former une molécule bicaténaire. L'encapsidation en proportion stoechiométrique de chaînes + et - est une propriété commune aux Densovirus et aux Dependovirus dans la famille des *Parvoviridae*.

La température de fusion de l'ADN viral dans sa configuration bicaténaire est de 84,5° C. Le pourcentage en G + C déduit de cette valeur est de 36 %.

L'examen au microscope électronique de la forme bicaténaire de l'ADN viral révèle des molécules linéaires mesurant 2,04 μ m en moyenne. Le poids moléculaire du génome viral (forme monocaténaire), déduit de cette valeur, est estimé à $1,93 \cdot 10^6$ daltons. La capacité de codage d'un tel génome est compatible avec la somme des poids moléculaires des polypeptides capsidaires.

Par l'ensemble de ses propriétés le virus isolé de *C. extranea* présente les principales caractéristiques des virus du genre Densovirus.

Une comparaison détaillée des propriétés biophysiques et biochimiques des Densovirus et du virus de *C. extranea* fait toutefois apparaître des différences suffisantes pour considérer ce dernier comme un nouveau membre du genre. Cette différence se retrouve nettement au niveau des propriétés antigéniques du virus. En effet, nous n'avons pu mettre en évidence aucune parenté immunologique entre ce virus et les Densovirus de *J. coenia* et de *G. mellonella*.

Deux lignées cellulaires de Lépidoptères ont été infectées par le virus de *C. extranea*. Nous avons obtenu la multiplication du virus dans les cellules SCLd 135 de *Lymantria dispar* et SPC Bm 40 de *B. mori* aussi bien par infection à partir d'une suspension virale que par transfection avec l'ADN extrait du virus. Ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'il s'agit de la première infection de lignée cellulaire par un Densovirus. De plus, la transfection à partir d'ADN extrait d'un Densovirus n'avait jusqu'à ce jour jamais été réussie. Le succès de ces infections offre des perspectives nouvelles pour la multiplication massive du virus étant donné que l'élevage de son hôte naturel est difficilement réalisable. De même il ouvre la voie à l'analyse précise du cycle de réplication du virus et à l'étude de sa génétique.

Depuis la découverte du premier Densovirus chez *G. mellonella* en 1964 plusieurs membres de ce genre ont été mis en évidence dans diverses régions du globe. En élargissant au continent africain l'aire de répartition du Densovirus, nos travaux démontrent l'ubiquité des virus de ce groupe.

Les virus de *Latoia viridissima* et *Sibine fusca*

Ces deux virus morphologiquement très semblables ont été isolés, l'un à partir de larves malades récoltées lors d'une épizootie de *L. viridissima* en Côte d'Ivoire, l'autre de broyats de *S. fusca* provenant de Colombie. Ils sont tous deux icosaédriques, mesurent environ 30 nm de diamètre et ont un génome ARN. Ils diffèrent sensiblement l'un de l'autre tant par leurs propriétés biophysiques que biochimiques. Ainsi alors que le virus de *L. viridissima* a une densité apparente de 1,34 et que l'analyse électrophorétique révèle cinq polypeptides structuraux, celui de *S. fusca* avec une densité de 1,36, ne possède que trois polypeptides de structure. De même, le génome du virus de *L. viridissima* a un poids moléculaire voisin de $2,9 \cdot 10^6$ daltons tandis que celui de *S. fusca* est estimé à $5,4 \cdot 10^6$ daltons.

Par leur taille, leur symétrie cubique et la nature ARN de leur génome ces deux virus présentent des affinités avec les membres de la famille des *Picornaviridae*. Toutefois aucune communauté antigénique n'ayant pu être mise en évidence entre ces virus, le virus C de la drosophile et le virus de la paralysie du grillon, Picornavirus d'invertébrés les mieux connus, leur position systématique demeure incertaine.

Contrairement à la plupart des petits virus icosaédriques à ARN connus chez les insectes qui sont peu ou pas pathogènes, notre étude a montré que celui de *L. viridissima* est à l'origine d'épizooties foudroyantes, quant à celui de *S. fusca* il se trouve associé en forte proportion à un Densovirus dans un complexe de viroses entraînant une mort rapide des insectes atteints suggérant son rôle actif dans la mortalité.

Dans leur ensemble, les résultats présentés dans ce mémoire apportent une contribution à la pathologie des *Limacodidae* dans la mesure où aucune virose n'était connue auparavant chez les espèces africaines et où les deux virus à ARN isolés de *L. viridissima* et *S. fusca* sont d'un type nouveau dans cette famille de Lépidoptères.

Bien que succinctes, nos observations sur le plan épizootiologique en Côte d'Ivoire, à la suite de fortes mortalités en période de pullulation des espèces *C. extranea* et *L. viridissima*, suggèrent le fort impact de ces viroses dans les populations naturelles de ces ravageurs et permettent d'envisager leur utilisation dans le cadre d'un programme de lutte intégrée. Ainsi les résultats des recherches fondamentales que nous venons de présenter pourront servir de base à des études tant sur le terrain afin de définir les modalités de la persistance de ces virus dans la nature et les conditions d'apparition des épizooties qu'en laboratoire pour l'étude expérimentale de la virulence et du spectre d'hôtes de ces virus et la mise au point de méthodes rapides de diagnostic.

B I B L I O G R A P H I E

- AMARGIER (A.). - 1966. Action de la denonucleose du Lépidoptère *Galleria mellonella* L. sur la sécrétion et l'émission de substance soyeuse. *Arch. ges. Virusforsch.*, 19, 13-22.
- AMARGIER (A.), VAGO (C.), MEYNADIER (G.). - 1965. Etude histopathologique d'un nouveau type de virose mis en évidence chez le Lépidoptère *Galleria mellonella*. *Arch. ges. Virusforsch.*, 15, 659-667.
- AMARGIER (A.), VAGO (C.), DUTHOIT (J.L.), MEYNADIER (G.). - 1979. Formation tumorale d'origine parvovirale chez *Sibine fusca* (Lep. Limacodidae). *Entomophaga*, 24, 259-271.
- BACHMANN (P.A.), HOGGAN (M.D.), MELNICK (J.L.), PEREIRA (H.G.), VAGO (C.) - 1975. *Parvoviridae*. *Intervirology*, 5, 83-92.
- BAILEY (L.). - 1976. Viruses attacking the honey-bee. *Adv. Virus Res.*, 20, 271-304.
- BAILEY (L.), GIBBS (A.J.), WOODS (R.D.). - 1968. The purification and properties of chronic bee-paralysis virus. *J. gen. Virol.*, 2, 251-260.
- BAILEY (L.), NEWMAN (J.F.E.), PORTERFIELD (J.S.). - 1975. The multiplication of Nodamura virus in insect and mammalian cell cultures. *J. gen. Virol.*, 26, 15-20.

- BALACHOWSKY (A.S.). - 1972. Traité d'entomologie appliqué à l'agriculture. MASSON, Paris, II, (2), p. 1059.
- BARWISE (A.H.), WALKER (I.O.). - 1970. Studies on the DNA of a virus from *Galleria mellonella* L. FEBS Lett., 6, 13-16.
- BELLETT (A.J.D.). - 1968. The iridescent virus group. Adv. Virus Res., 13, 225-246.
- BERGOIN (M.), BRES (N.). - 1968. Lésions tissulaires chez la larve du Lépidoptère *Galleria mellonella* L. atteinte du virus de la denonucléose. Bull. apicole, 11, 5-12.
- BOEMARE (N.), CROIZIER (G.), VEYRUNES (J.C.). - 1970. Contribution à la connaissance des propriétés du virus de la denonucléose. Entomophaga, 15, 327-332.
- BRENNER (S.), HORNE (R.W.). - 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochem. Biophys. Acta, 34, 103-110.
- BUCHATSKY (L.P.), RAIKOVA (A.P.). - 1979. Electron microscope study of mosquito denonucleosis virus maturation. Acta. Virol., 23, 170-172.
- CHARPENTIER (R.). - 1979. A nonoccluded virus in nymphs of the dragonfly *Leucorrhinia dubia* (Odonata Anisoptera) (Libellulidae). J. Invertebr. Pathol., 34, 95-98.
- COTE (J.R.). - 1969. Réplication et morphologie du virus de la denonucléose. Thèse Doct. Univ., Fac. Sci., Univ. Montpellier, 173 p.

- DAVIS (R.N.), SIMON (M.), DAVIDSON (N.). - 1971. Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. *In* : Methods in Enzymology, 21 D, (L. Grosman, éd.), p. 413-428, Academic Press, New-York.
- DIALLO (B.). - 1978. Etude de l'infection à Densovirus chez le Lépidoptère *Spodoptera littoralis* Boisduval. *Thèse Doct. spéc., Univ. Sci. Tech. Languedoc*, Montpellier 141 p.
- DISCHE (Z.) - 1930. Über einige neue charakteristische farbreaktionen der Thymonukleïnsäure und eine mikromethod zur bestimmung derselben in tierischen organen mit Hilfe dieser reaktionen. *Mikrochemie*, 8, 4-32.
- DUFAY (C.). - 1978. *Hoyosia codeti* (Oberthür), espèce nouvelle pour la faune française (Lep. Limacodidae). *Alexandria*, 10, 282-285.
- EATON (B.T.), STEACIE (A.D.). - 1980. Cricket paralysis virus RNA a 3' terminal poly (A). *J. gen. Virol.*, 50, 167-171.
- ESPEJO (R.T.), CANELO (E.S.), SINSHEIMER (R.L.). - 1969. DNA of bacteriophage PM₂ : A closed circular double stranded molecule. *Proc. nat. Acad. Sc. USA*, 63, 1164.
- FEDERICI (B.A.). - 1976. Pathology and histochemistry of a Denonucleosis virus in larvae of the blackfly *Simulium vittatum*. *Proc. 1st. Internation. Colloq. Invertebr., Pathol., Kingston, Canada*, p. 341-342.
- FEDIERE (G.), DESMIER DE CHESNON (R.), MARIAU (D.), MONSARRAT (P.) - 1981. Mise en évidence de maladies à épizootie de type denonucléose chez deux chenilles de *Limacodidae* Lépidoptères phyllophages du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire. *Abstr. Colloq. Internation. Proct. Cult. trop., Lyon, France*, p. 62.

- FOURIE (P.B.), HULL (P.R.). - 1980. Urticaria caused by the slug caterpillar *Latoia vivida*, *Lepidoptera* : *Limacodidae*. *S. Afr. J. Zool.*, 15, 56.
- FRIESEN (P.), SCOTTI (P.D.), LONGWORTH (J.F.), RUECKERT (R.) - 1980. Black beetle virus : propagation in *Drosophila* line 1 cells and an infection - resistant subline carrying endogenous black beetle virus - related particles. *J. Virol.*, 35, 741-747.
- FULIN (S.), GUIHUI (M.), MINGSHU (C.). - 1981. A new insect virus of *Pieris rapas* L. I. Isolation and characterization of the virus. *Acta microbiol. Sinica*, 21, 41-44.
- GARZON (S.), KURSTAK (E.). - 1976. Ultrastructural studies in the morphogenesis of the Densonucleosis Virus (Parvovirus). *Virology*, 70, 517-531.
- GENTY (P.). - 1972 - Morphologie et biologie de *Sibine fusca* Stoll. Lépidoptère défoliateur du palmier à huile en Colombie. *Oléagineux*, 27, 65-71.
- GENTY (P.), MARIAU (D.). - 1975. Utilisation d'un germe entomopathogène dans la lutte contre *Sibine fusca* (Limacodidae). *Oléagineux*, 30, 349-354.
- GENTY (P.), DESMIER de CHENON (R.), MORIN (J.P.). - 1978. Les ravageurs du palmier à huile en Amérique latine - *Lepidoptera Limacodidae*. *Oléagineux*, 33, 360-381.
- GILES (K.W.), MYERS (A.). - 1965. An improved Diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature, London*, 206, 93.

- GIRAN (F.). - 1966 - Action de la " Densonucléose " de
Lépidoptères sur les mammifères. *Entomophaga*, 11, 405-407.
- GORZIGLIA (M.), BOTERO (L.), GIL (F.), ESPARZA (J.). - 1980.
Preliminary characterization of virus like particles
in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line (mos.61)
Intervirology, 13, 232-240.
- GRACE (T.D.C.). - 1962. Establishment of four strains of cells
from insect groud *in vitro*. *Nature*, London, 195, 788-789.
- GRAHAM (F.L.), VAN DER EB (A.J.). - 1973. A new technique for
the assay of infectivity of human Adenovirus 5 DNA.
Virology, 52, 456-467.
- GRASSE (P.P.). - 1951. Traité de zoologie. MASSON, Paris, 10, (1),
392-393.
- GREENWOOD (L.K.), MOORE (N.F.). - 1981. A single protein Nudaure-
lia β like virus of the pale tussok moth, *Dasychira pudí-
bunda*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38, 305-306.
- GREENWOOD (L.K.), MOORE (N.F.). - 1982. The Nudaurelia β group
of Small RNA containing viruses of insects : Serological
identification of several new isolates. *J. Invertebr.
Pathol.*, 39, 407-409.
- GRIGNON (N.). - 1982. Recherches sur une infection virale
chronique dans une lignée cellulaire de Lépidoptère.
Thèse Doct. 3^e cycle, Univ. Sci. Tech. Languedoc,
Montpellier 109 p.
- HARRAP (K.A.), LONGWORTH (J.F.), TINSLEY (T.W.), BROWN (K.W.). -
1966. A noninclusion virus of *Gonometa podocarpí* (Lepidop-
tera : *Lasiocampidae*). *J. Invertebr. Pathol.*, 8, 270-272.

- HARTREE (E.F.). - 1972. Determination of protein : a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48, 422-427.
- HERING (M.). - 1926. *Limacodidae*. In : les macrolépidoptères du globe. *Fauna africana*. A. SEITZ, éd. 14, (2), 448-475, Kernen, Stuttgart.
- HILZ (H.), WIEGERS (U.), ADAMIETZ (P.). - 1975. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents : Application to the isolation of nucleic acids and the degradation of "washed" proteins. *Eur. J. Biochem.*, 56, 103-108.
- HINK (W.F.). - 1983. The 1983 compilation of invertebrate cell lines and culture Media. (In press).
- HOGGAN (M.D.). - 1971. Small DNA viruses. In : Comparative virology, (K. Maramorosch, E. Kurstak, eds), p. 43-79. Academic Press, New-York.
- HOUILLIER (M.). - 1961. Les pullulations de chenilles (*Parasa pallida* mschl) dans les palmeraies de savane en 1960. *Cah. ORSTOM*, 15, 1-5.
- ISHIMORI (N.). - 1934. Contribution à l'étude de la grasserie du ver à soie (*Bombyx mori*). *C.R. Soc. Biol.*, 116, 1169-1170.
- JOUSSET (F.X.), PLUS (N.), CROIZIER (G.), THOMAS (M.). - 1972. Existence chez *Drosophila* de deux groupes de picornavirus de propriétés sérologiques et biologiques différentes. *C.R. Acad. Sci. Sér. D*, 275, 3043-3046.
- JOUSSET (F.X.), BERGOIN (M.), REVET (B.). - 1977 - Characterization of the *Drosophila* C virus. *J. gen. Virol.*, 34, 269-285.

- JUCKES (I.R.M.). - 1970. Viruses of the pine emperor moth.
Bull. S. Afr. Soc. Plant Pathol., 4, 18.
- KELLY (D.C.), ROBERTSON (J.S.). - 1973. Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. gen. Virol.*, 20 (suppl.) 17-41.
- KELLY (D.C.), BARWISE (A.H.), WALKER (I.O.). - 1977. DNA contained by two denonucleosis viruses. *J. Virol.*, 1977, 396-407.
- KELLY (D.C.), AYRES (M.D.), SPENCER (L.K.), RIVERS (C.F.). - 1980a
Densonucleosis virus 3 : a recent insect parvovirus isolate from *Agraulis vanillae* (Lepidoptera : Nymphalidae).
Microbiologica, 3, (4), 455-460.
- KELLY (D.C.), MOORE (N.F.), SPILLING (C.R.), BARWISE (A.H.), WALKER (I.O.). - 1980 b. Densonucleosis virus structural proteins. *J. Virol.*, 36, 224-235.
- KURSTAK (E.), COTE (J.R.). - 1968. Présence de particules associées avec le virus à ADN de la denonucléose (V.D.N.) chez un invertébré. *Rev. can. Biol.*, 27, 357-359.
- KURSTAK (E.), VERNOUX (J.P.), NIVELEAU (A.), ONJI (P.A.). - 1971. Visualisation du DNA du virus de la denonucléose (VDN) à chaînes monocaténaïres complémentaires de polarités inverses plus ou moins. *C.R. Acad. Sci, Sér.D*, 272, 762-765.
- LEBEDEVA (O.P.), KUZNETZOVA (M.A.), ZELENKO (A.P.), GUDZGORBAN (A.P.). - 1973. Investigation of a virus disease of the denonucleosis type in a laboratory culture of *Aedes aegypti*. *Acta Virol.*, 17, 253-256.

- LEPESME (P.). - 1947. Les insectes des palmiers. Lechevalier, Paris, 903 p.
- LI-REN (Z.), DI-HUA (C.), HUAI-YU (C.), SHENG-LIANG (C.). - 1982. Isolation, purification and structure of flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Virol. sinica*, 1, 55-61.
- LONGWORTH (J.F.). - 1978. Small isometric viruses of invertebrates. *Adv. Virus Res.*, 23, 103-157.
- LONGWORTH (J.F.), TINSLEY (T.W.). - 1968. Purification of a non - occluded virus of *Galleria mellonella*. *J. gen. Virol.*, 3, 167-174.
- LONGWORTH (J.F.), PAYNE (C.C.). - 1973. Studies on a virus isolated from *Gonometa podocarp* (Lepidoptera : Lasio-campidae). *J. gen. Virol.*, 18, 119-125.
- LONGWORTH (J.F.), ARCHIBALD (R.D.). - 1975. A virus of black beetle *Heteronychus arator* (F) (Coleoptera : Scarabaeidae). *N.Z.J.Zool.*, 2, 233-236.
- LONGWORTH (J.F.), CAREY (G.P.). - 1976. A small RNA virus with a divided genome from *Heteronychus arator* (F) (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. gen. Virol.*, 33, 31-40.
- LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.C.), RANDALL (R.J.). - 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MAEDA (S.), WATANABE (H.). - 1978. Immunofluorescence observation of the infection of denonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Jap. J. appl. Ent. Zool.*, 22, 98-101.

- MAEDA (S.), KAWAI (T.), WATANABE (H.). - 1982. Protein characteristics of a denonucleosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *Abstr. 3 rd. internation. Colloq. Invertebr. Pathol, Brighton, United Kingdom*, P. 222.
- MANSINGH (A.). - 1971. Physiological classification of dormancies in insects. *Can. Entomol.*, 103, 983-1009.
- MARMUR (J.), DOTY (P.). - 1962. Determination of the base composition of desoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J.mol. Biol.*, 5, 109-118.
- MARTIGNONI (M.E.), IWAI (P.J.). - 1981. A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. *In : Microbial Control of Pest and Plant Diseases, 1970-1980*. (H.D. Burges ed.) p. 897-911. Academic Press, London.
- MATTHEWS (R.E.F.). - 1982. Classification and Nomenclature of viruses. (Fourth report of the I.C.T.V.). Karger, Basel, *Intervirolology*, 17, 1 - 199.
- MATTHEWS (R.E.F.), MAURIN (J.). - 1981. Classification et nomenclature des virus : résumé des décisions du Comité International de Taxonomie des Virus. *Ann. Virol., Inst. Pasteur*, 132 E, 563-573.
- MEJBAUM (W.Z.). - 1939. Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in derivaten der adenylsaure. *Z. Physiol. Chem.*, 258, 117-120.
- MEYNADIER (G.), VAGO (C.), PLANTEVIN (G.), ATGER (P.). - 1964. Virose d'un type inhabituel chez le Lépidoptère *Galleria mellonella* L. *Rev. Zool. agric. appl.*, 63, 207-208.

- MEYNADIER (G.), AMARGIER (A.), GENTY (P.). - 1977 a. Une virose de type denonucléose chez le Lépidoptère *Sibine fusca*, Stoll. *Oléagineux*, 32, 357-361.
- MEYNADIER (G.), GALICHET (P.F.), VEYRUNES (J.C.), AMARGIER (A.). 1977 b. Mise en évidence d'une denonucléose chez *Diatraea saccharalis* (Lep. *Pyralidae*). *Entomophaga*, 22, 115-120.
- MEYNADIER (G.), MATZ (G.), VEYRUNES (J.C.), BRES (N.). - 1977 c. Virose de type denonucléose chez les orthoptères. *Ann. Soc. ent. Fr.*, 13, 487-493.
- MONSARRAT (P.), MEYNADIER (G.), CROIZIER (G.), VAGO (C.). - 1973. Recherches cytopathologiques sur une maladie virale du Coléoptère *Oryctes rhinoceros* L. *C.R. Acad. Sci, Ser.D*, 276, 2077-2080.
- NAKAGAKI (M.), KAWASE (S.). 1980 a. DNA of a new Parvo-like virus isolated from the silkworm *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, 35, 124-133.
- NAKAGAKI (M.), KAWASE (S.). - 1980 b. Structural proteins of denonucleosis virus isolated from the silkworm *Bombyx mori* infected with the flacherie virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 36, 166-171.
- NEWMAN (J.F.E.), BROWN (F.). - 1977. Further physicochemical characterization of Nodamura virus. Evidence that the divided genome occurs in a single component. *J. gen. Virol.*, 38, 83-95.
- OUCHTERLONY (O.). - 1948. Antigen antibody reaction in gels. *Ark. Keni. Miner. Geol. B.*, 26, 16.

- PAYNE (C.C.), RIVERS (C.F.). - 1976. A provisional classification of cytoplasmic polyhedrosis viruses based on the sizes of the RNA genome segments. *J. gen. Virol.*, **33**, 71-85.
- PEACOCK (A.C.), DINGMAN (C.W.). - 1968. Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose acrylamide composite gels. *Biochemistry*, **7**, 668-674.
- PLUS (N.). - 1978. Endogenous viruses of *Drosophila melanogaster* cell lines : their frequency, identification and origin. *In vitro*, **14**, 1015-1021.
- PLUS (N.), CROIZIER (G.), DUTHOIT (J.L.), DAVID (J.), ANZOLABEHÈRE (D.), PERIQUET (G.). - 1975. Découverte, chez la drosophile, de virus appartenant à trois nouveaux groupes. *C.R. Acad. Sci, Sér. D*, **280**, 1051-1054.
- PLUS (N.), CROIZIER (G.), VEYRUNES (J.C.), DAVID (J.). - 1976. A comparison of buoyant density and polypeptides of *Drosophila* P, C and A viruses. *Intervirology*, **7**, 346-350.
- PRASAD (D.). - 1979. Some observations on the biology of *Latoia (Parasa) lepida* - CRAM - (*Lepidoptera Cochlididae*), a pest of mango. *Indian J. Entomol.*, **41**, 272-273.
- QUIOT (J.M.). - 1976. Etablissement d'une lignée cellulaire à partir d'ovaires du Lépidoptère *Lymantria dispar* L. *C.R. Acad. Sci., Sér. D*, **282**, 465-467.

- QUIOT (J.M.), ODIER (F.), BERGOIN (M.), VAGO (C.). - 1973.
Etude de la pathogénèse et du titrage d'un virus de
densonucléose en culture de cellules de Lépidoptères.
C.R. Acad. Sci., Sér. D, 273, 2997-2999.
- REINGANUM (C.). - 1973. Studies on a nonoccluded virus of the
field cricket *Teleogryllus* spp. M. Sc. Thesis, Monash
Univ., Melbourne, Australia.
- REINGANUM (C.), O'LOUGHLIN (G.T.), HOGAN (T.W.). 1970. A nonocclu-
ded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus*
and *T. commodus* (Orthoptera : Gryllidae). *J. Invertebr.*
Pathol., 16, 214-220.
- REINGANUM (C.), ROBERTSON (J.S.), TINSLEY (T.W.). - 1978. A new
group of RNA viruses from insects. *J. gen. Virol.*, 40,
195-202.
- REYNOLDS (E.S.). - 1963. The use of lead citrate at high PH as
an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell.*
Biol., 17, 208-212.
- RIVERS (C.F.), LONGWORTH (J.F.). - 1972. A nonoccluded virus of
Junonia coenia, Nymphalidae : Lepidoptera. *J. Invertebr.*
Pathol., 20, 369-370.
- ROTH (M.). - 1974. Initiation à la morphologie, la systématique,
et la biologie des insectes. *O.R.S.T.O.M.*, Bondy, 119 p.
- SCHERER (W.F.), HURLBUT (H.S.). - 1967. Nodamura virus from
Japan : a new and unusual arbovirus resistant to ether
and chloroform. *Am. J. Epidemiol.*, 86, 271-285.

- SCHNEIDER (I.). - 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. exp. Morphol.*, 27, 353 - 365.
- SCOTTI (P.D.). - 1976. Cricket paralysis virus replicates in cultured *Drosophila* cells. *Intervirology*, 6, 333-342.
- SCOTTI (P.D.), GIBBS (A.J.), WRIGLEY (N.G.). - 1976. Kelp fly virus. *J. gen. Virol.*, 30, 1-9.
- SEITZ (A.). - 1926. Les macrolépidoptères du globe. *Fauna africana*. 14, (2), p. 447-448, Kernen, Stuttgart.
- SHIMIZU (T.). - 1975. Pathogenicity of an infectious flacherie virus of the silkworm *Bombyx mori*, obtained from sericultural farms in the suburbs of Ina city. *J. sericult. Sci. Japan*, 44, 45-48.
- SINSHEIMER (R.L.). - 1959. A single stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage ϕ X 174. *J. mol. Biol.*, 1, 43-53.
- SMITH (K.M.), XEROS (N.). - 1954. A comparative study of different types of viruses and their capsules in the polyhedroses and granuloses of insects. *Parasitology*, 44, 400-406.
- SMITH (M.R.). - 1965. A list of Lepidoptera associated with cocoa in west Africa with notes on identification and biology of species in Ghana. *Tech. Bull. Cocoa Res. Inst.*, 9, 14-28.
- STRUTHERS (J.K.), HENDRY (D.A.). - 1974. Studies of the protein and nucleic acid components of *Nudaurelia capensis* β virus. *J. gen. Virol.*, 22, 355-362.

- SUMMERS (M.D.). - 1978. Baculoviruses. In : Viral pesticides : present knowledge and potential effects on public and environmental health. (M.D. Summers, C.T. Kawanishi, eds.), p. 45-73. EPA Symposium, Myrtle Beach, South Carolina, March 21-23, 1977. EPA - 600 /9.78-026.
- SUMMERS (M.D.), ARNOTT (H.J.). - 1969. Ultrastructural studies on inclusion formation and virus occlusion in nuclear polyhedrosis and granulosis virus - infected cell of *Trichoplusia ni* (Hübner). *J. Ultrastruct. Res*, 28, 462-480.
- SUTO (C.). - 1979. Characterization of a virus newly isolated from the smoky-brown cockroach, *Periplaneta fuliginosa* (SERVILLE). *Nagoya J. Med. Sci.*, 42, 13-25.
- SUTO (C.), KAWAMOTO (F.), KUMADA (N.). - 1978. Pathological studies on the cockroach. I. Spontaneous occurrence of hindgut ulcer in the smoky - brown Cockroach, *Periplaneta fuliginosa* (Serville). *Jap. J. Sanit. Zool.*, 29, 197-204.
- SUTO (C.), KAWAMOTO (F.), KUMADA (N.). - 1979. A new virus isolated from the cockroach, *Periplaneta fuliginosa* (Serville). *Microbiol. Immunol.*, 23, 207-211.
- SUTTER (G.R.). - 1973. A nonoccluded virus of the army cutworm. *J. Invertebr. Pathol.*, 21, 62-70.
- THERON (J.G.). - 1968. The larva of *Homosusica eugrapha*, *Lepidoptera Limacodidae*. *J. Entomol. Soc. S. Afr.*, 31, 231-233.
- THOMAS (G.M.), POINAR (G.O., Jr.). - 1973. Report of diagnoses of diseased insects 1962-1972. *HILGARDIA*, 42, 261-360.

- TIJSSSEN (P.), VAN DEN HURK (J.), KURSTAK (E.). - 1976.
Biochemical, biophysical, and biological properties of
Densonucleosis virus. I. Structural Proteins. *J. Virol.*,
17, 686-691.
- TIJSSSEN (P.), KURSTAK (E.). - 1981. Biochemical, Biophysical,
and Biological properties of Densonucleosis virus (Parvo-
virus). III Common sequences of structural proteins.
J. Virol., 37, 17-23.
- TIJSSSEN (P.), KURSTAK (E.), SU (T.M.), GARZON (S.). - 1982.
Densonucleosis viruses : unique pathogens of insects.
Proceed. IIIrd, int. Coll. invertebr. Pathol., Brighton,
United Kingdom, PP. 148-153.
- TING-WEI (C.), LING-MEI (X.), WAN-HUA (C.), YUAN-YI (H.) - 1980
(Signalement de quelques virus d'insectes forestiers)
(en langue chinoise). *K'un Ch'ung Hsueh Pao*, 23, 443-444.
- TIONG (R.H.C.), MUNROE (D.D.). - 1976. Microbial control of an
outbreak of *Darna trima* (Moore) on oil palm (*Elaeis gui-
neensis* Jacq.) in Sarawak (Malaysian Bornéo). *Malaysian
internation. agric. Oil Palm Conf.*, p. 1-16.
- TRUFFAUT (N.), BERGER (G.), NIVELEAU (A.), MAY (P.), BERGOIN (M.),
VAGO (C.). - 1967. Recherches sur l'acide nucléique du
virus de la densonucléose du Lépidoptère *Galleria mello-
nella* L. *Arch. ges. Virusforsch.*, 21, 467-474.
- VAGO (C.), MEYNADIER (G.), DUTHOIT (J.L.). - 1964. Etude d'un
nouveau type de maladie à virus chez les Lépidoptères.
Ann. Epiphyties, 15, 475-479.

- VAGO (C.), DUTHOIT (J.L.), DELAHAYE (F.). - 1966 a. Les lésions nucléaires de la " virose à noyaux denses " du Lépidoptère *Galleria mellonella*. *Arch. ges. Virusforsch.*, 18, 344-349.
- VAGO (C.), QUIOT (J.M.), LUCIANI (J.). - 1966 b. Infection de culture de tissus de Lépidoptères avec le virus purifié de la denonucléose. *C.R. Acad. Sci.*, 263, 799-800
- VAGO (C.), QUIOT (J.M.). - 1969. Recherches sur la composition des milieux pour culture de cellules d'invertébrés. *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 1, 281-288.
- VAIL (P.V.), JAY (D.L.), HUNTER (D.K.). - 1973. Infectivity of a nuclear polyhedrosis virus from the alfalfa looper *Autographa californica* after passage through alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 21, 16-20.
- VAN DER GEEST (L.P.S.), VAN DER LAAN (P.A.). - 1971. Insect pathogens available for distribution. In : Microbial control of insects and mites. (H.D. Burges, N.W. Hussey, eds), p. 733-739. Academic press, London.
- WATANABE (H.), MAEDA (S.), MATSUI (M.), SHIMIZU (T.). - 1976. Histopathology of the midgut epithelium of the silkworm *Bombyx mori*, infected with a newly-isolated virus from the flacherie - diseased larvae. *J. sericult. Sci. Japan*, 45, 29-34.
- WEBER (K.), OSBORN (M.). - 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.*, 244, 4406 - 4412.

- WOOD (B.J.). - 1968. Pests of oil palm in Malaysia and their control. Inc. Soc. Planters, Kuala Lumpur. p. 204.
- XEROS (N.G.). - 1954. A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature*, London, 174, 562.

PLANCHES HORS TEXTE

P L A N C H E I

DIFFERENTS STADES de DEVELOPPEMENT de *Casphalia extranea*

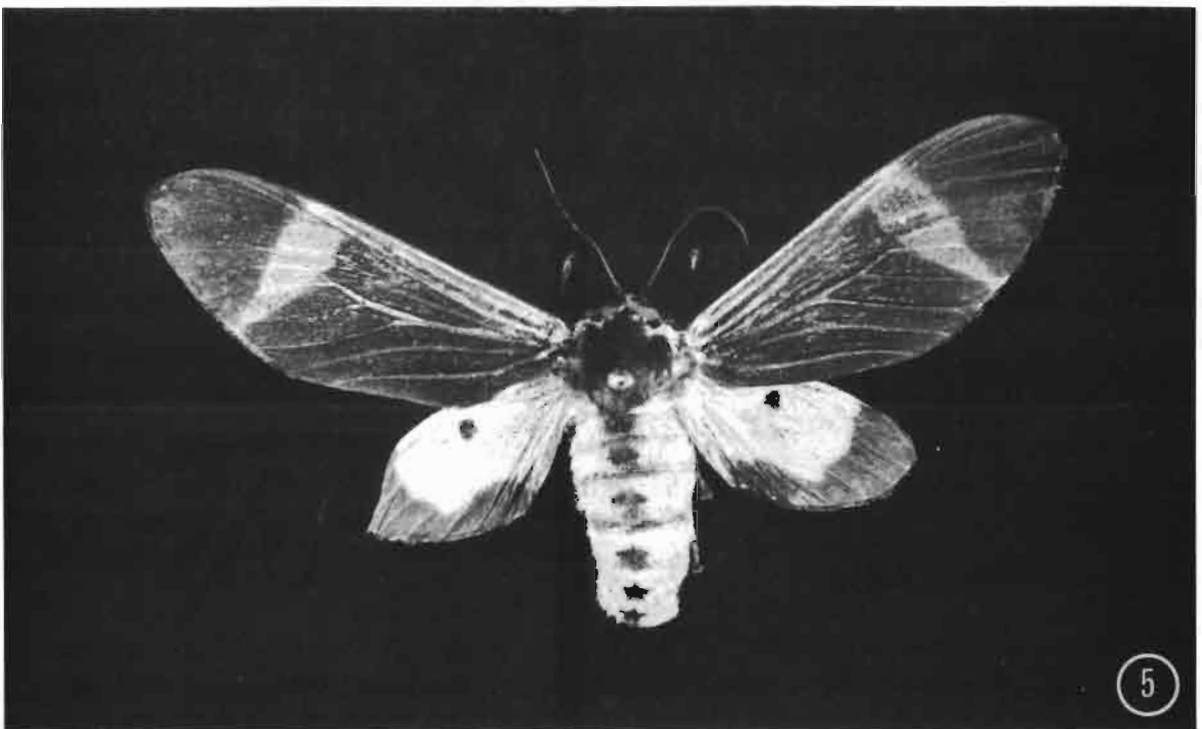
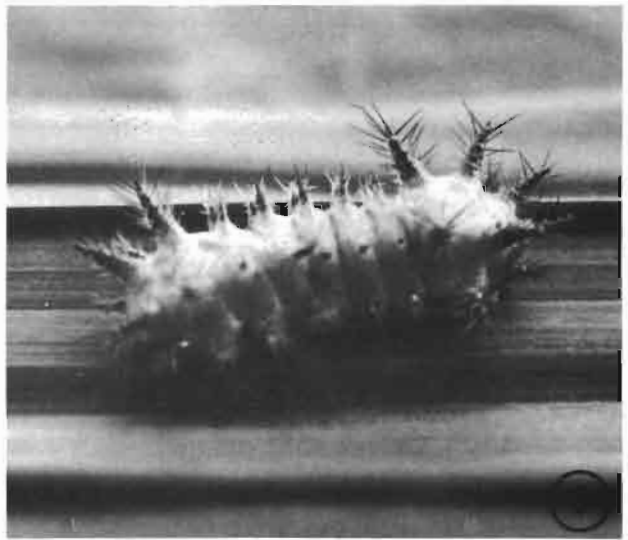
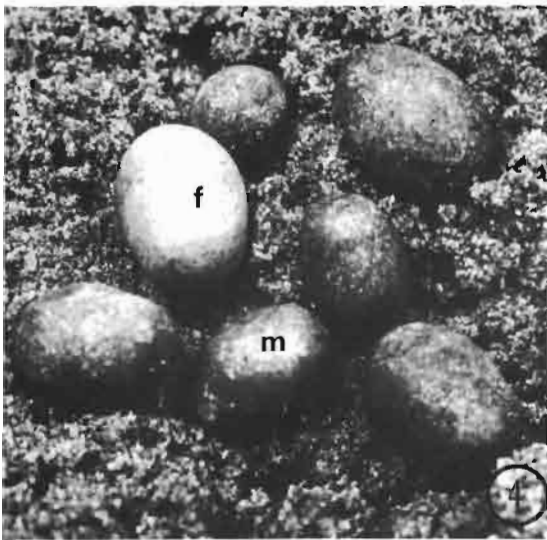
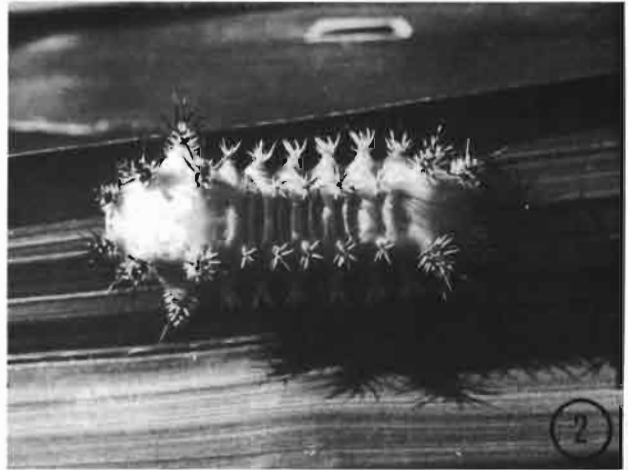
Fig. 1 - Larves de 1^e et 2^e stade
x 3,5

Fig. 2 - Larve de 8^e stade. vue dorsale
x 1,7

Fig. 3 - Larve de 8^e stade - vue de profil
x 1,7

Fig. 4 - Cocons mâles (m) et femelles (f)
x 1,2

Fig. 5 - Imago femelle
x 2,8



P L A N C H E I I

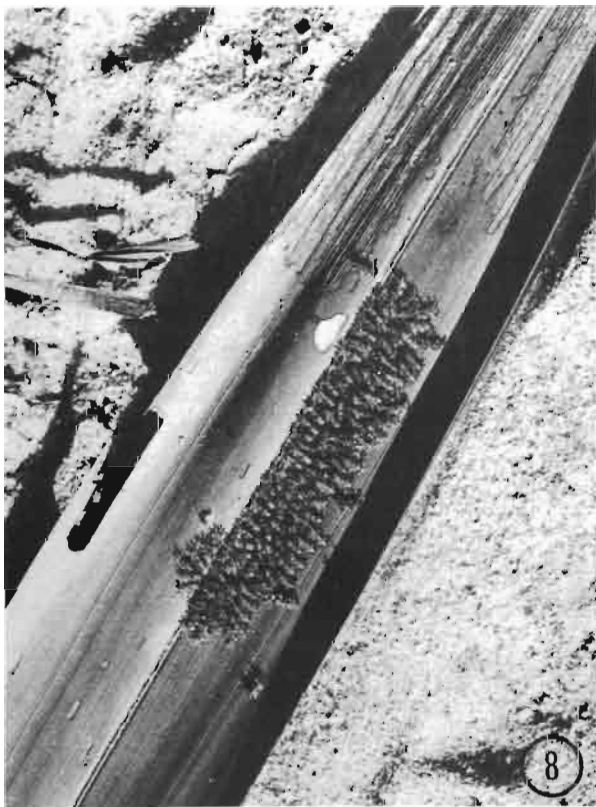
DEGATS CAUSES PAR *C. extranea* SUR PALMIER à HUILE

Fig.6 - palmier non attaqué

Fig.7 - palmes présentant des folioles apicales
fortement attaquées

Fig.8 - attaque de l'épiderme inférieur d'une foliole
par des larves de premier stade

Fig.9 - foliole consommée sur toute son épaisseur par
une larve de dernier stade.



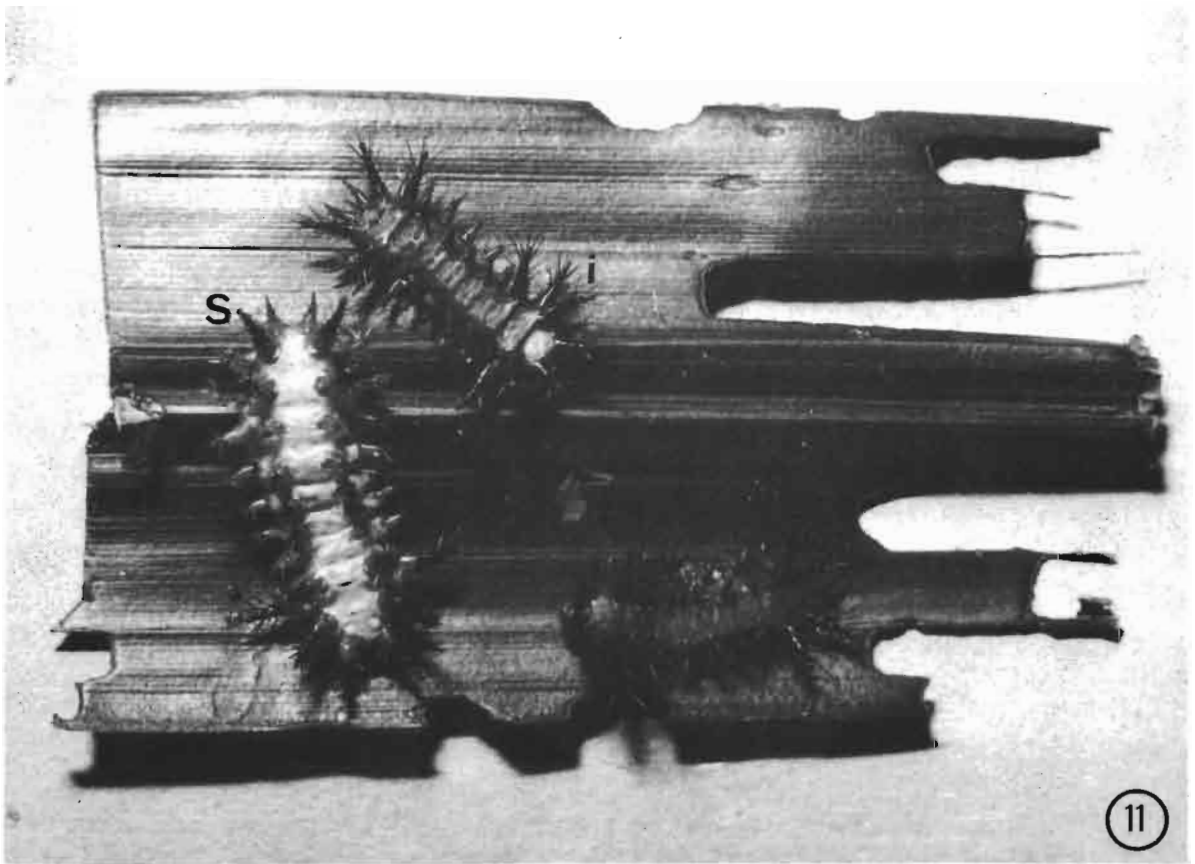
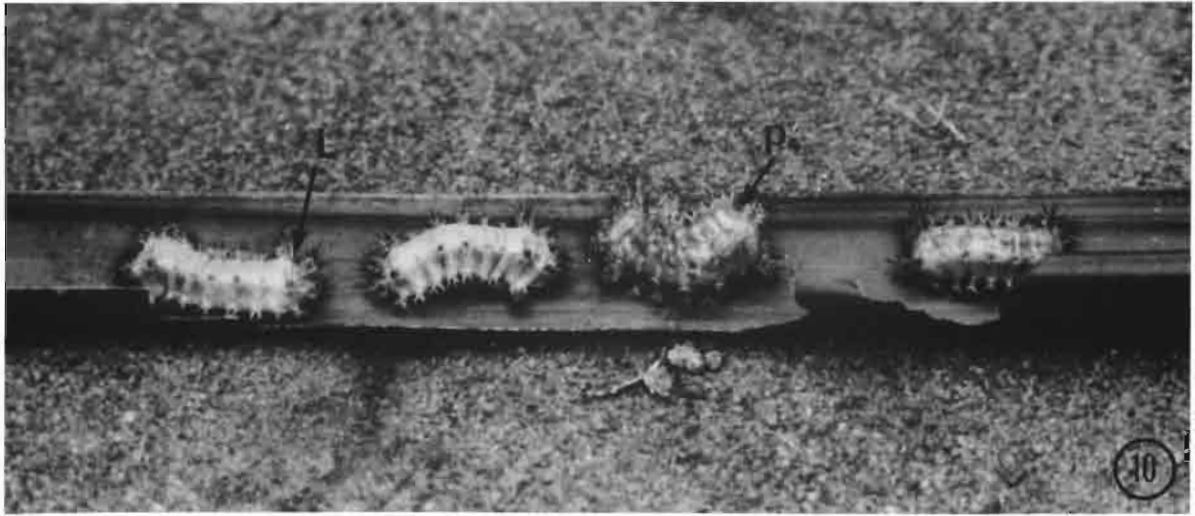
P L A N C H E I I I

Fig.10 - Larves de *C. extranea* : dernier stade (L)
et début de prénymphose (P)

x 0,8

Fig.11 - Larves de *C. extranea* au dernier stade. Larve
saine (S) et infectées par le virus de denso-
cléose (I)

x 1,6



P L A N C H E IV

HISTOPATHOLOGIE de LARVES de *C. extranea* ATTEINTES de
DENSONUCLEOSE

- Coloration à la Gallocyanine

Fig.12 - Intestin moyen à un stade avancé de la pathogénèse. La lumière (Lum) est remplie de cellules détachées de la paroi intestinale

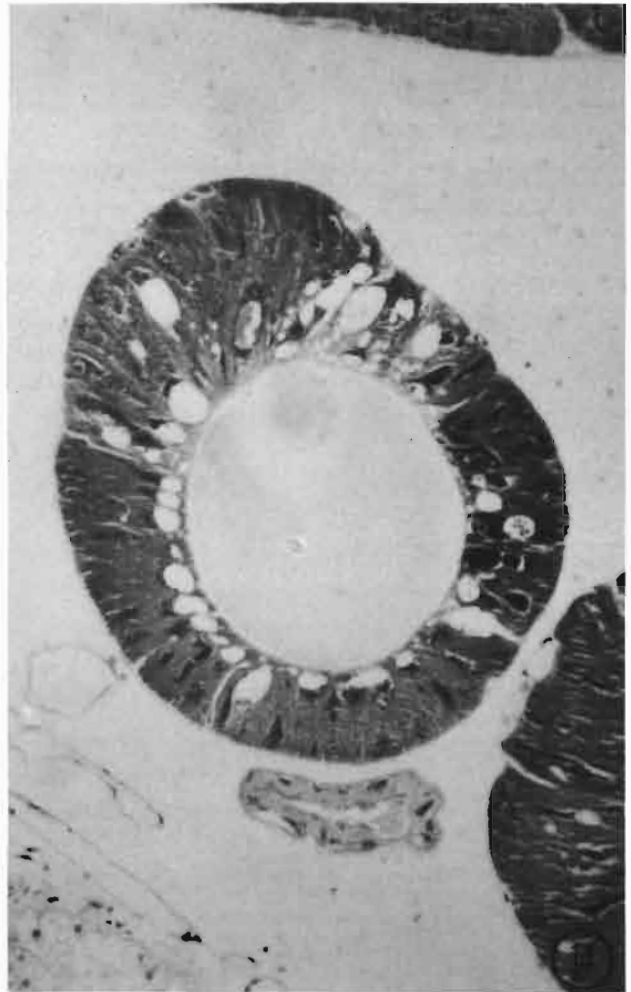
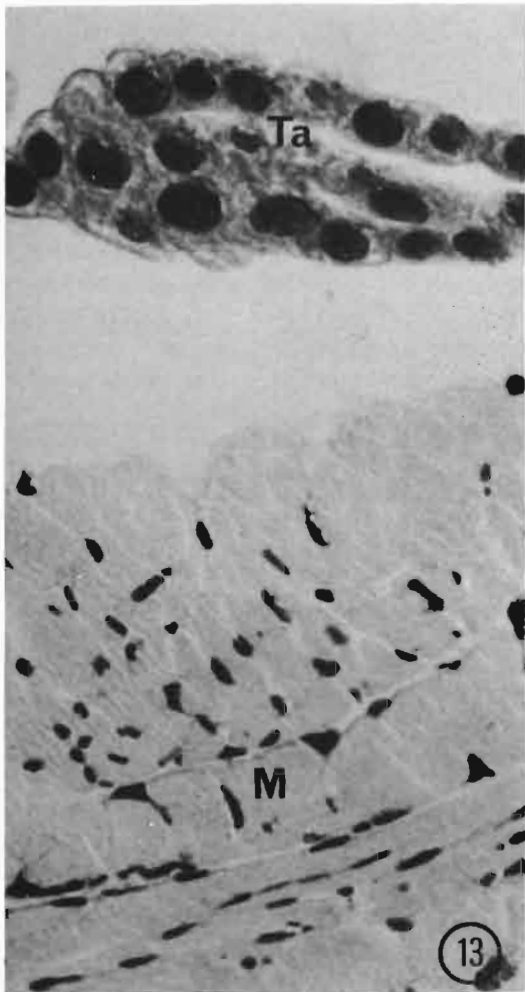
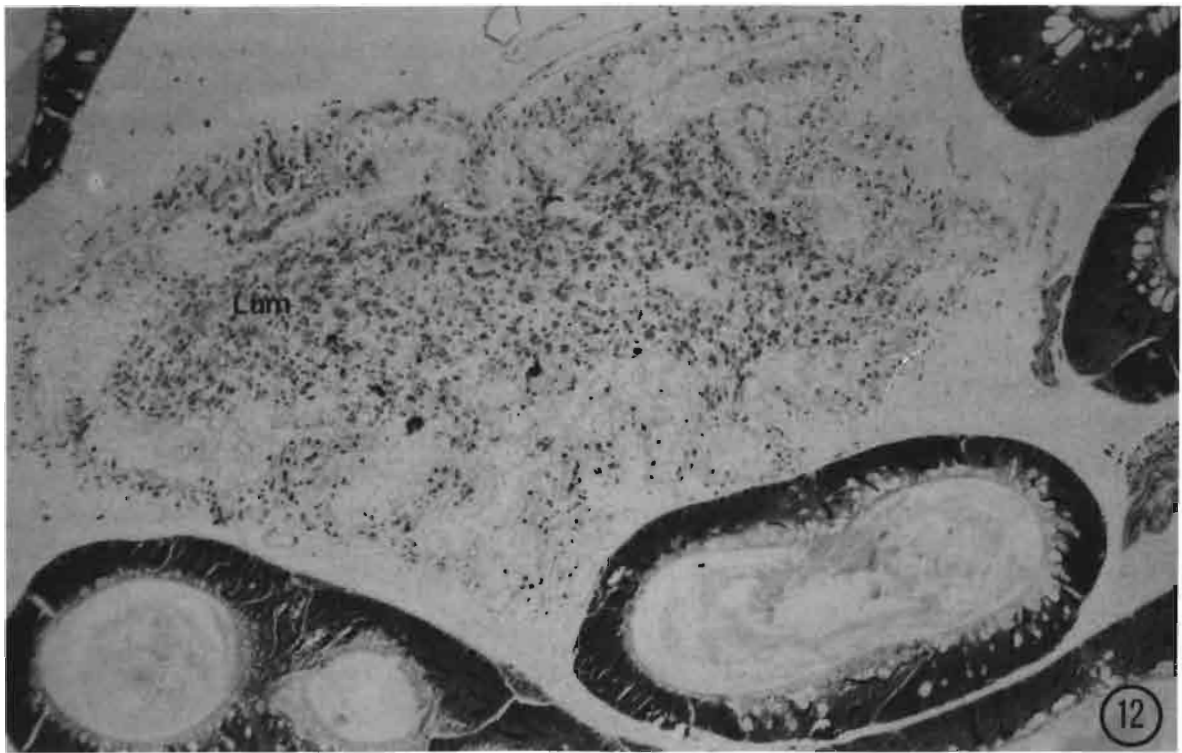
x 60

Fig.13 - Lobe de tissu adipeux (T.a.) et muscle (M) présentant des noyaux denses et hypertrophiés

x 450

Fig.14 - Coupe transversale d'une glande séricigène. L'hypertrophie nucléaire n'affecte que quelques cellules mais toutes présentent des vacuoles cytoplasmiques importantes.

x 120



P L A N C H E V

PATHOGENESE de l'INTESTIN MOYEN de LARVES de *C. extranea*
ATTEINTES de DENSONUCLEOSE

- Coloration de FEULGEN - ROSSENBECK

Fig.15 - Epithélium intestinal sain

x 450

Fig.16 - Stade précoce de l'infection caractérisé
par l'apparition de noyaux denses (flèches)

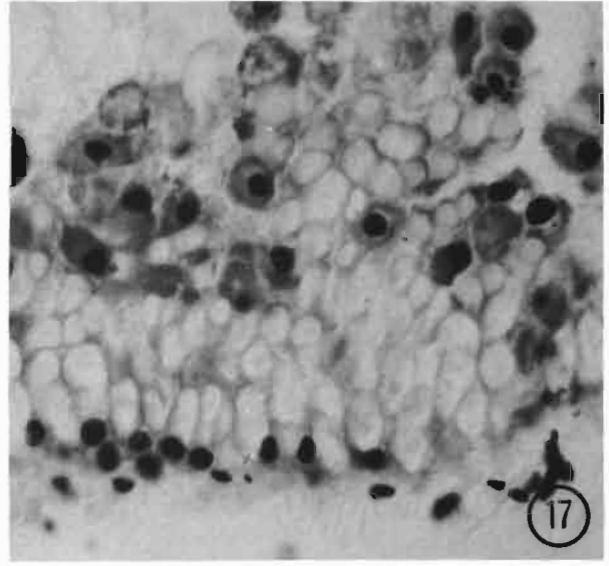
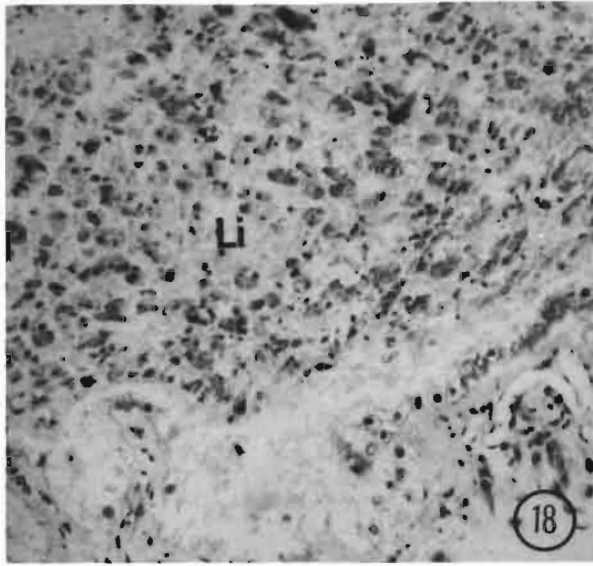
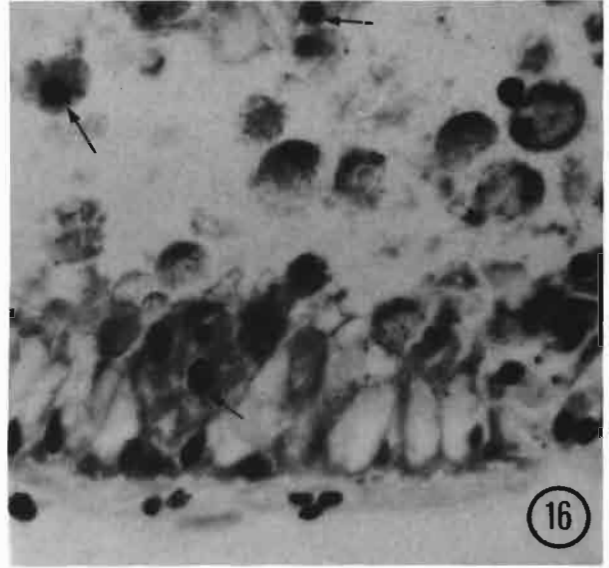
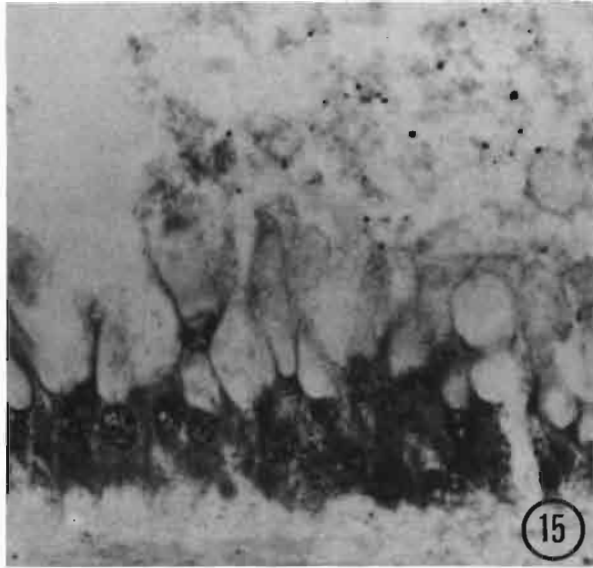
x 450

Fig.17 - Début de prolifération de l'épithélium intestinal

x 450

Fig.18 - Stade final de l'infection. La lumière intes-
tinale (LI) est obstruée par l'accumulation de
cellules épithéliales

x 120



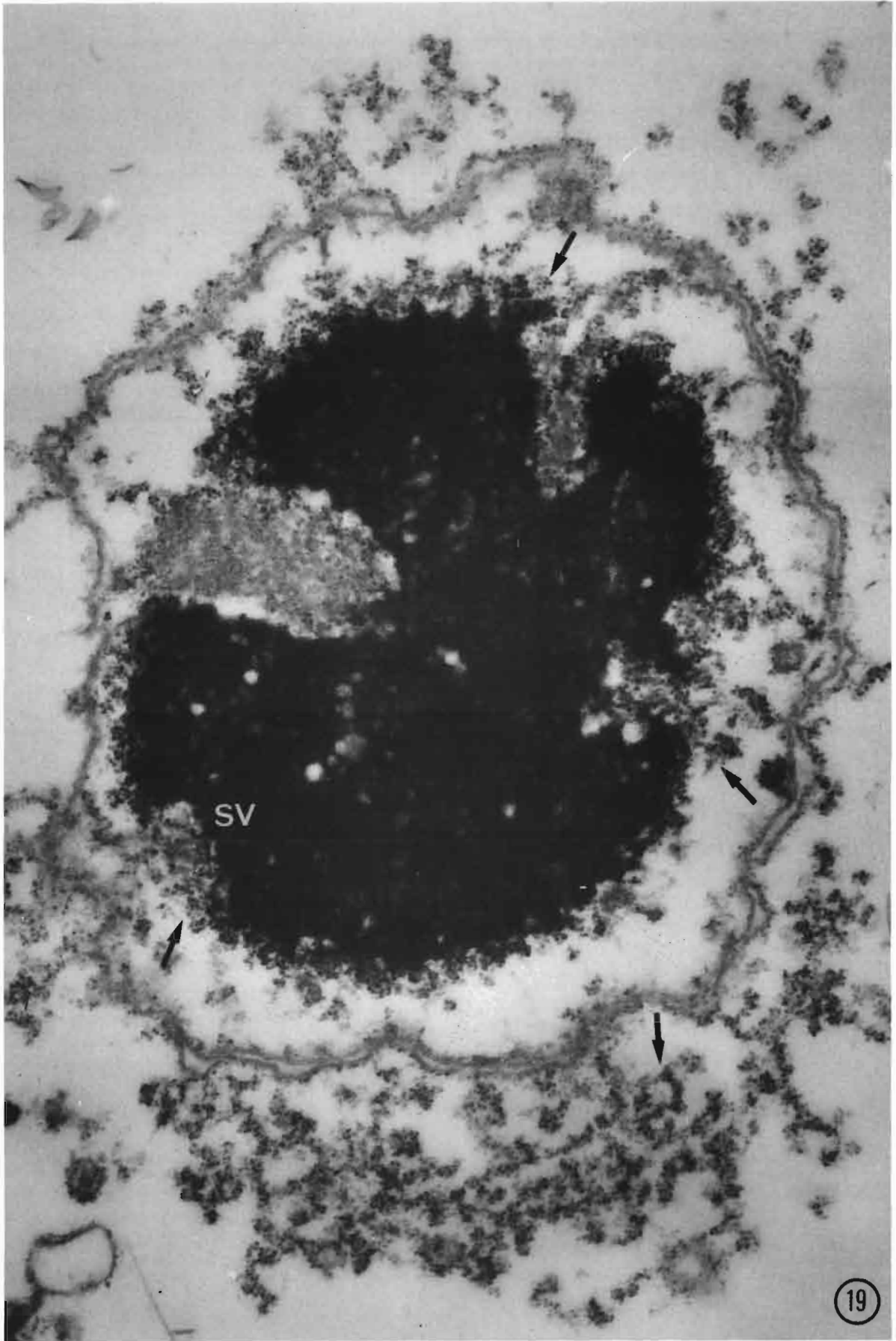
P L A N C H E VI

Fig.19 - Noyau fortement infecté d'une cellule
intestinale de *C. extranea*, détachée dans
le lumen.

x 50 000

SV : stroma virogène

flèches : particules virales accumulées à la
périphérie du stroma virogène et dans le cyto-
plasma. On notera la délamination des membranes
de l'enveloppe nucléaire.



P L A N C H E VII

Fig.20 - Détail d'un noyau infecté dans une cellule de l'épithélium intestinal de *C. extranea*. Particules virales individualisées au sein d'un stroma virogène amorphe.

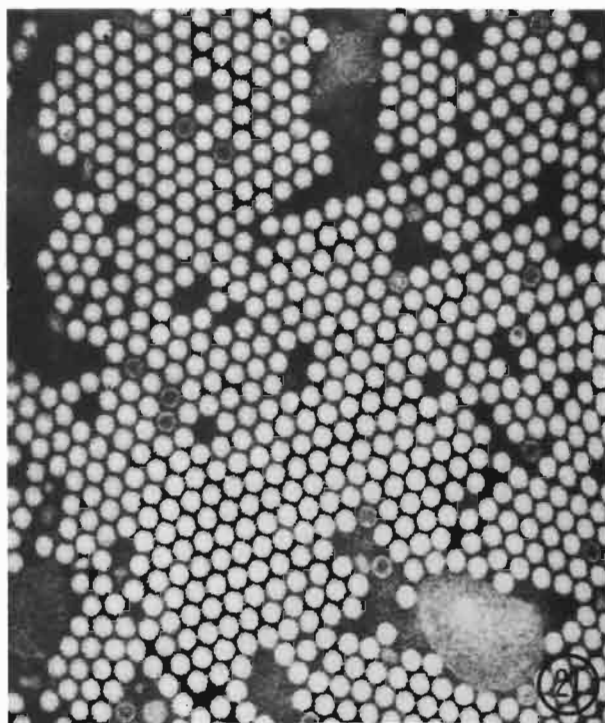
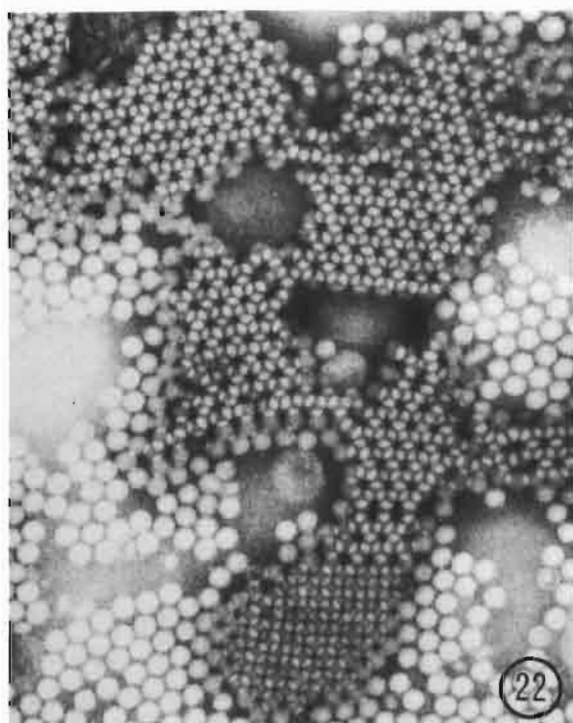
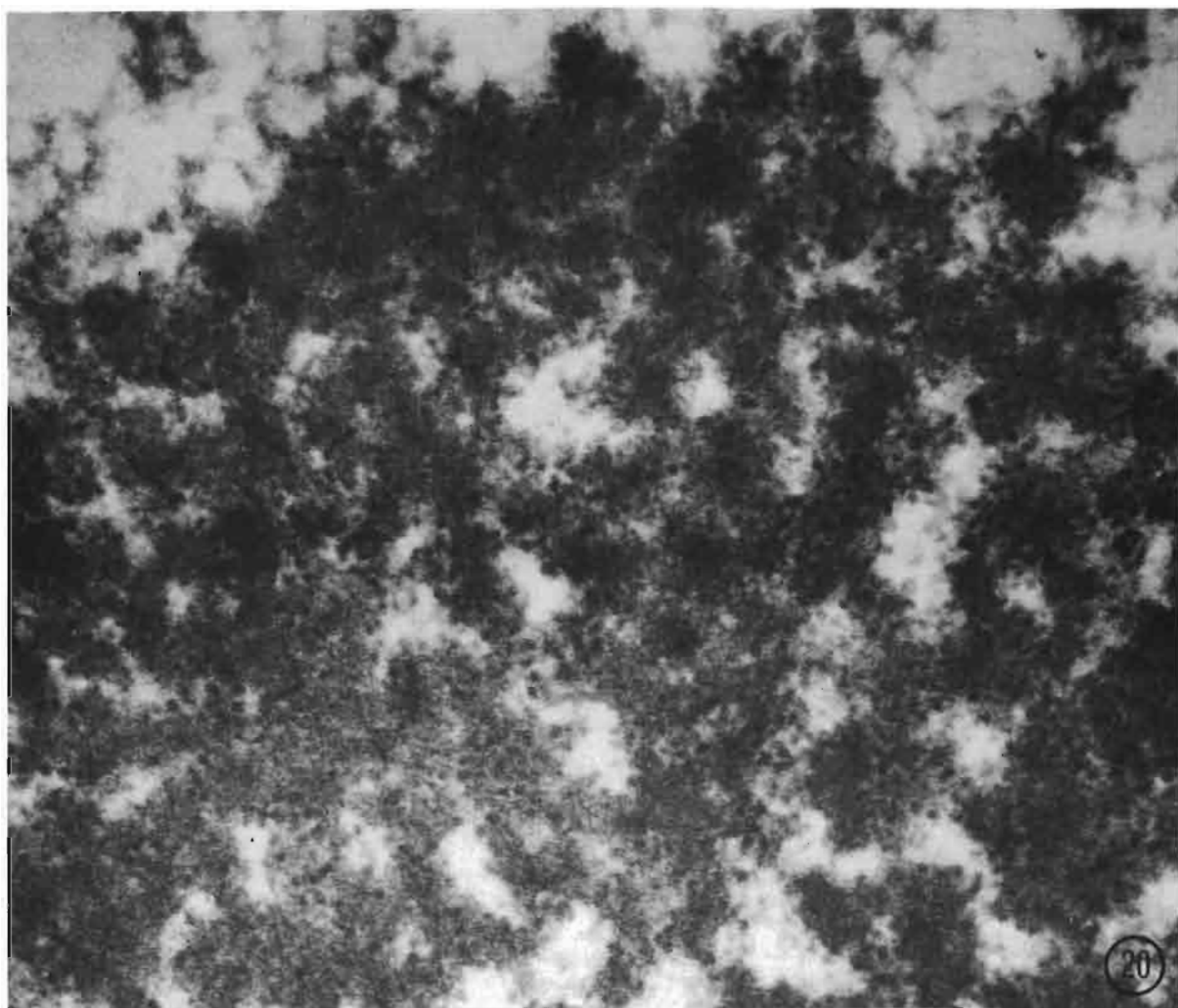
x 90 000

Fig.21 - Suspension purifiée du Densovirus de *C. extranea* examinée après contraste négatif à l'acide phosphotungstique

x 145 000

Fig.22 - Arrangements paracrystallins dus à la superposition des virions. Contraste négatif à l'APT.

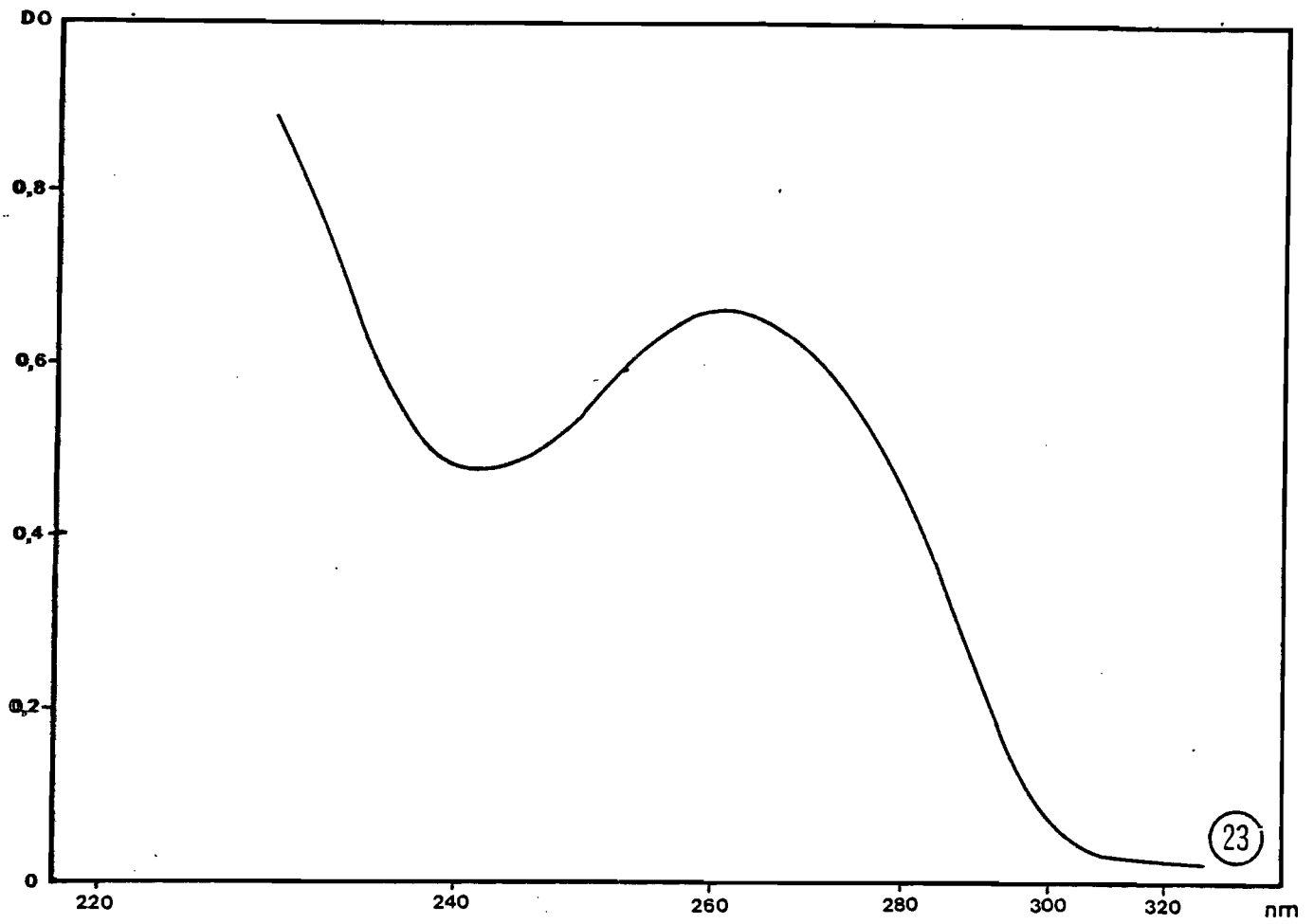
x 160 000



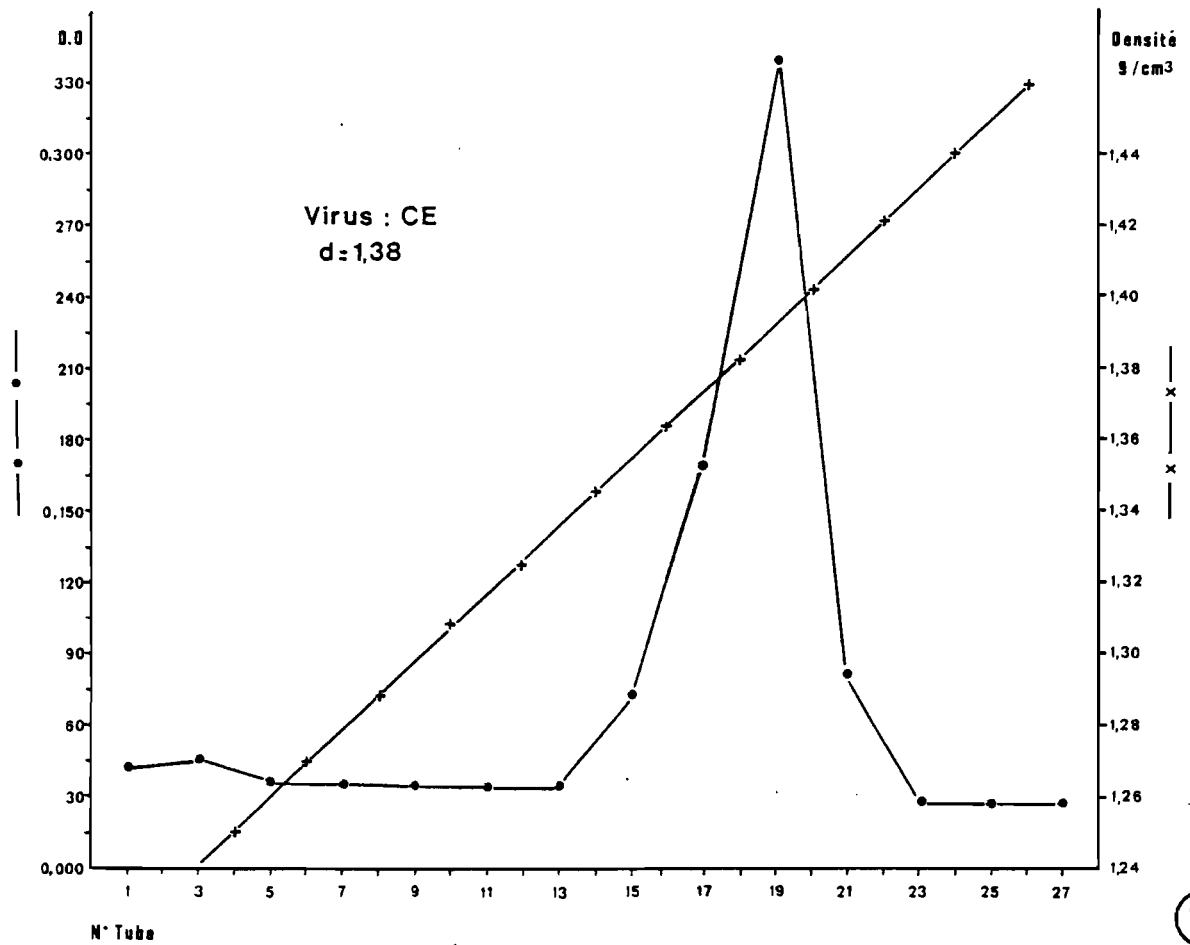
P L A N C H E VIII

Fig.23 - Spectre d'absorption dans l'ultraviolet
d'une suspension purifiée du Densovirus de
C. extranea.

Fig.24 - Profil de sédimentation en gradient isopycnique
de chlorure de césium du Densovirus de *C.extranea*.



23



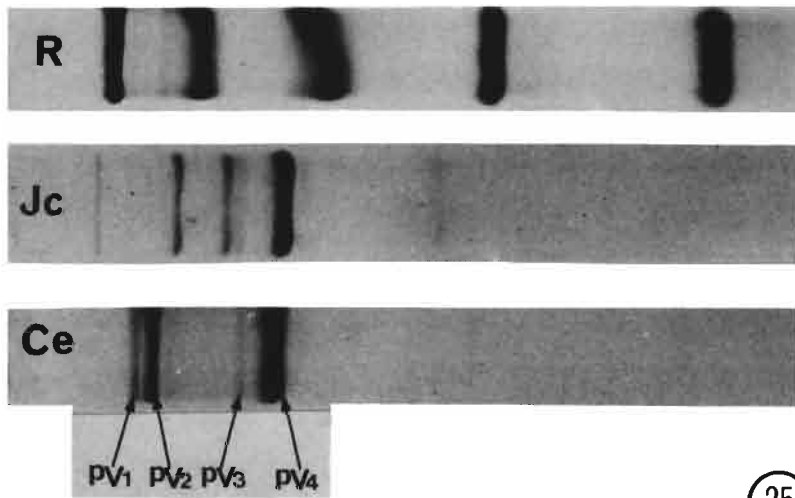
24

P L A N C H E IX

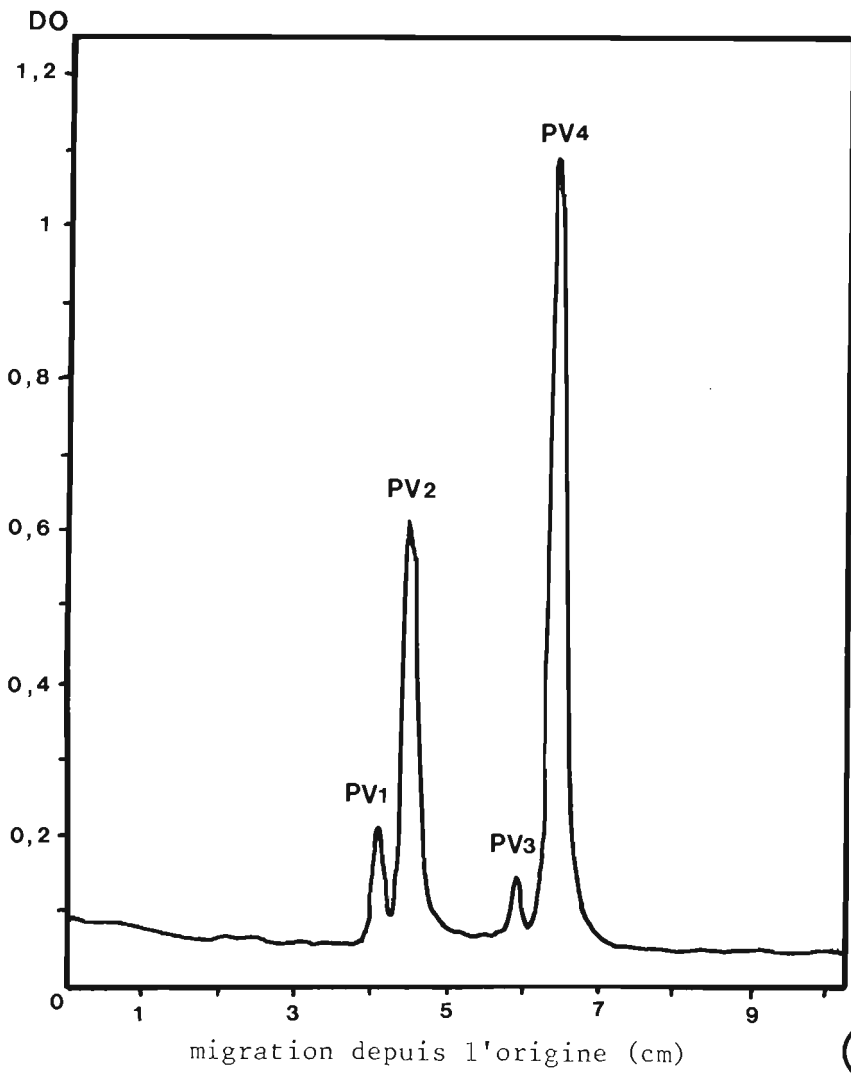
Fig.25 - Electrophorégramme des protéines structurales du Densovirus de *C. extranea* (C.e), du Densovirus de *J. coenia* (J.c) et des protéines de référence (R).

- gel de polyacrylamide à 11 %

Fig.26 - Enregistrement densitométrique des protéines structurales du Densovirus de *C.extranea* après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7 %.



25



26

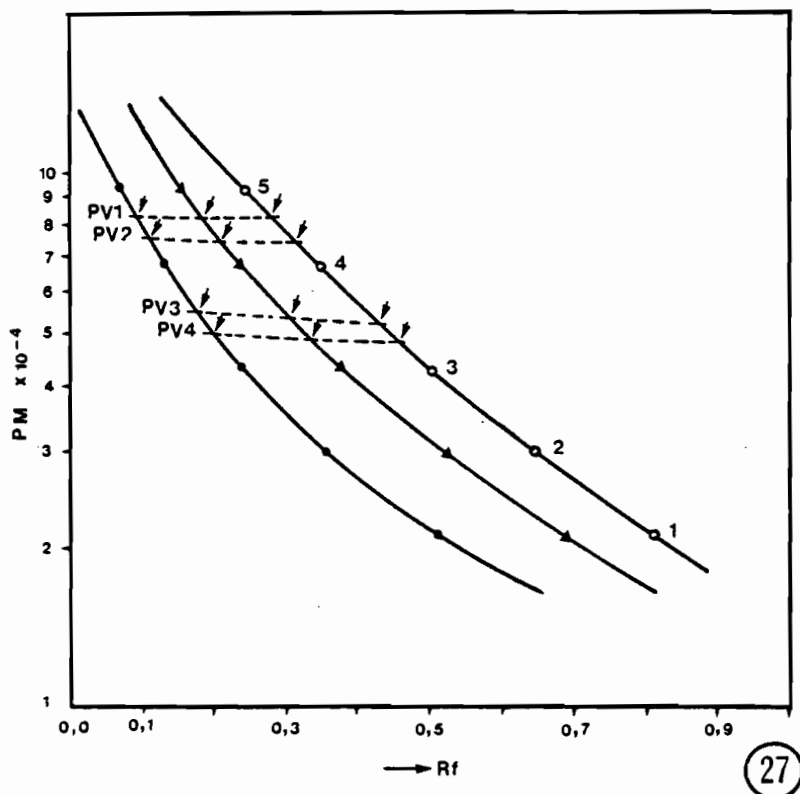
P L A N C H E X

Fig.27 - Détermination des poids moléculaires des protéines virales du Densovirus de *C. extranea* par électrophorèse en gel de polyacrylamide de différentes concentrations :

o 7 % ▶ 9 % • 11 %

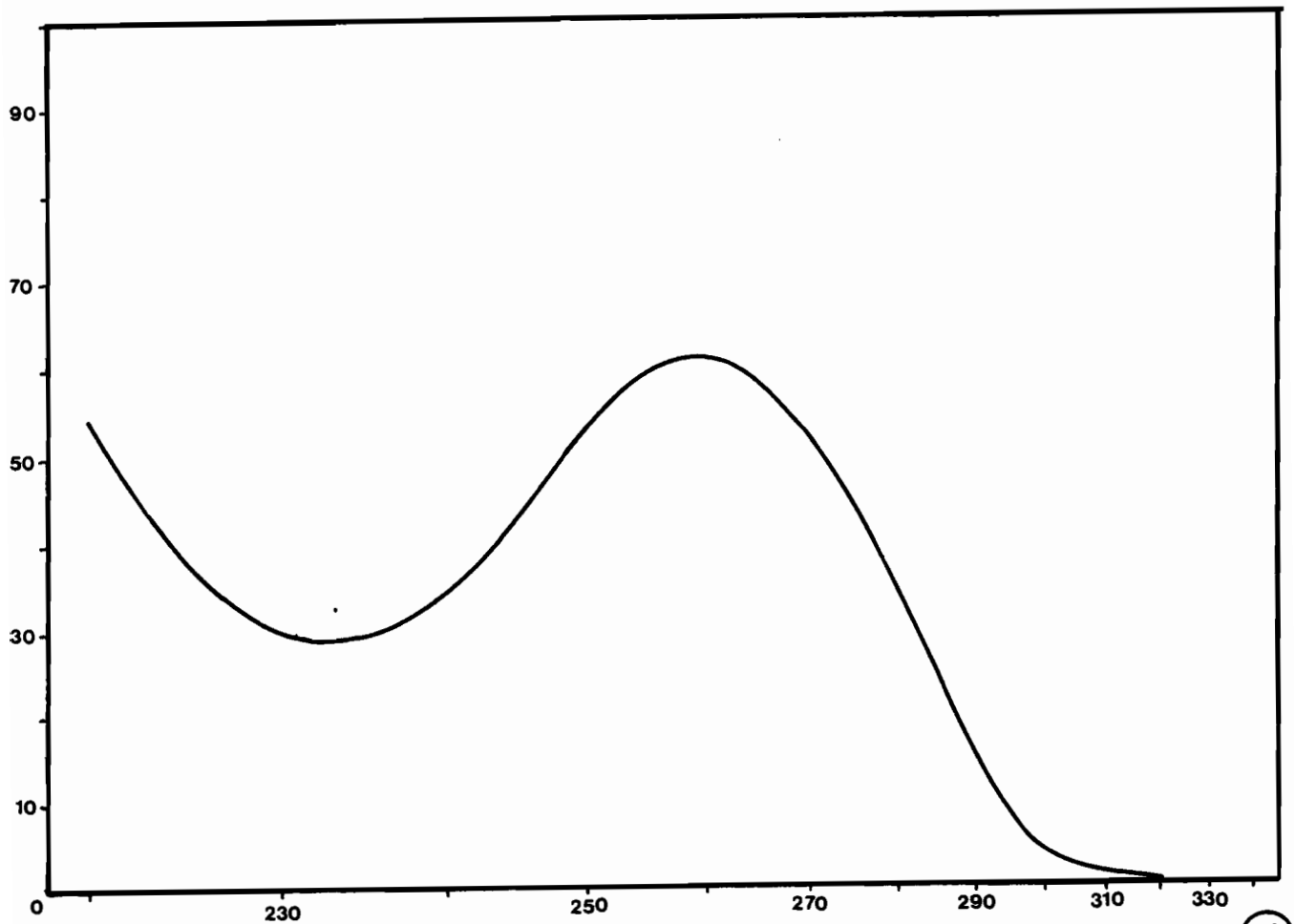
- Protéines de référence :

- 1 Inhibiteur de trypsine (P.M. 20.100)
- 2 Anhydrase carbonique (P.M. 30.000)
- 3 Ovalbumine (P.M. 43.000)
- 4 Sérum albumine de boeuf (P.M. 67 000)
- 5 Phosphorylase b (P.M. 94 000)



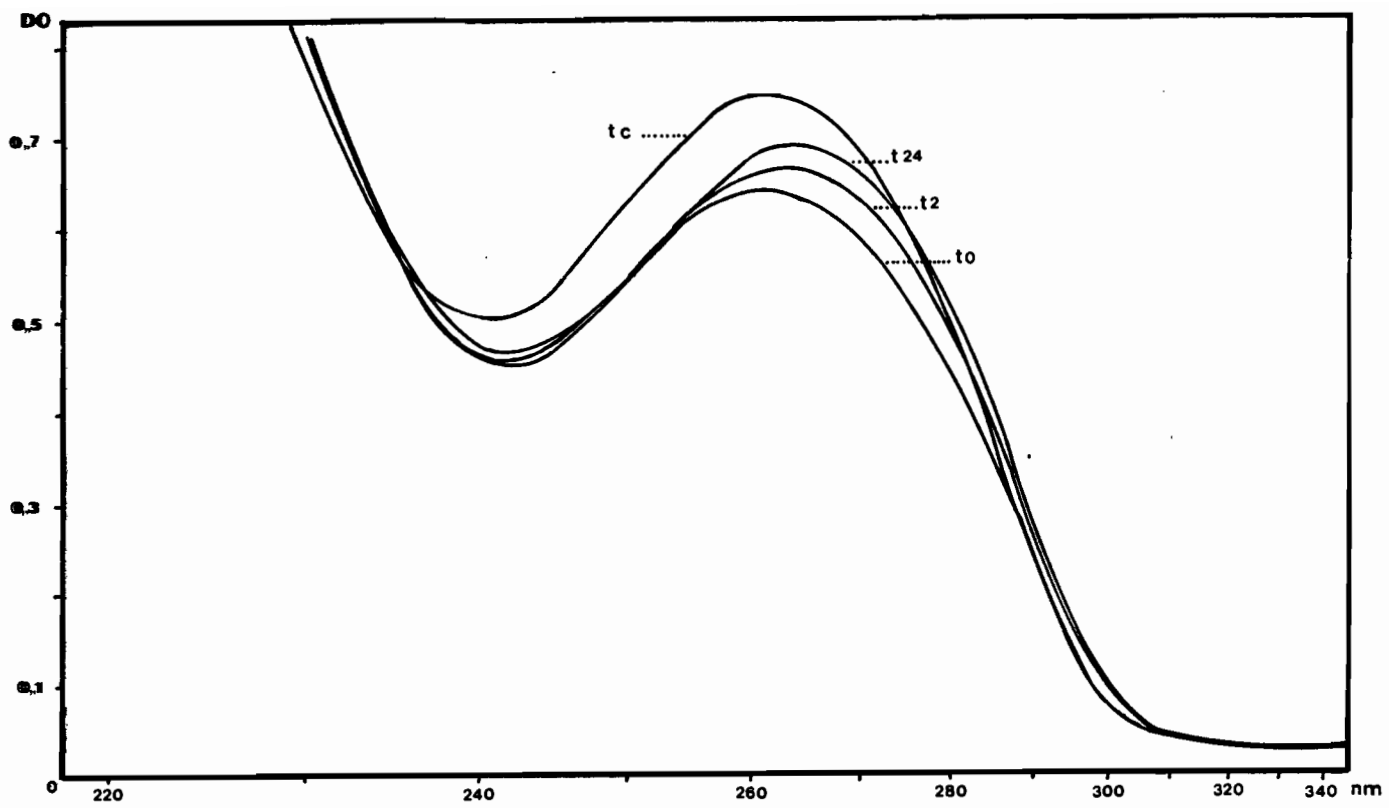
P L A N C H E X I

Fig.28 - Spectre d'absorption dans l'ultraviolet de
l'ADN extrait du Densovirus de *C. extranea*

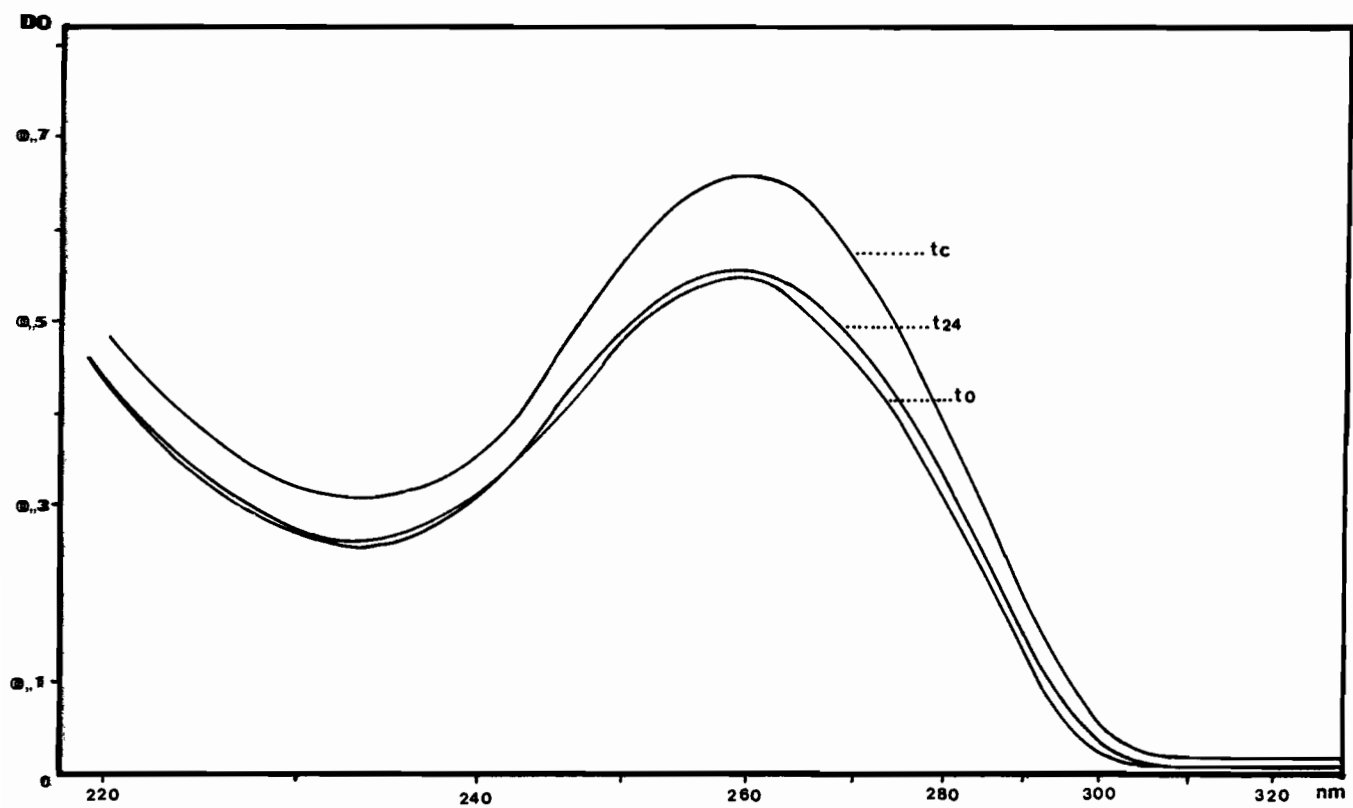


P L A N C H E X I I

- Fig.29 - Effet du formaldéhyde sur le spectre d'absorption du Densovirus de *C. extranea*. Enregistrements effectués au moment de l'addition (t_0), au bout de 2 et 24 heures (t_2 et t_{24}), puis après chauffage pendant 10 minutes à 100° C (t_c).
- Fig.30 - Effet du formaldéhyde sur le spectre d'absorption de l'ADN extrait du Densovirus de *C. extranea* dans un tampon de forte molarité. Enregistrements effectués au moment de l'addition (t_0), au bout de 24 heures (t_{24}) puis après chauffage à 100° C (t_c).



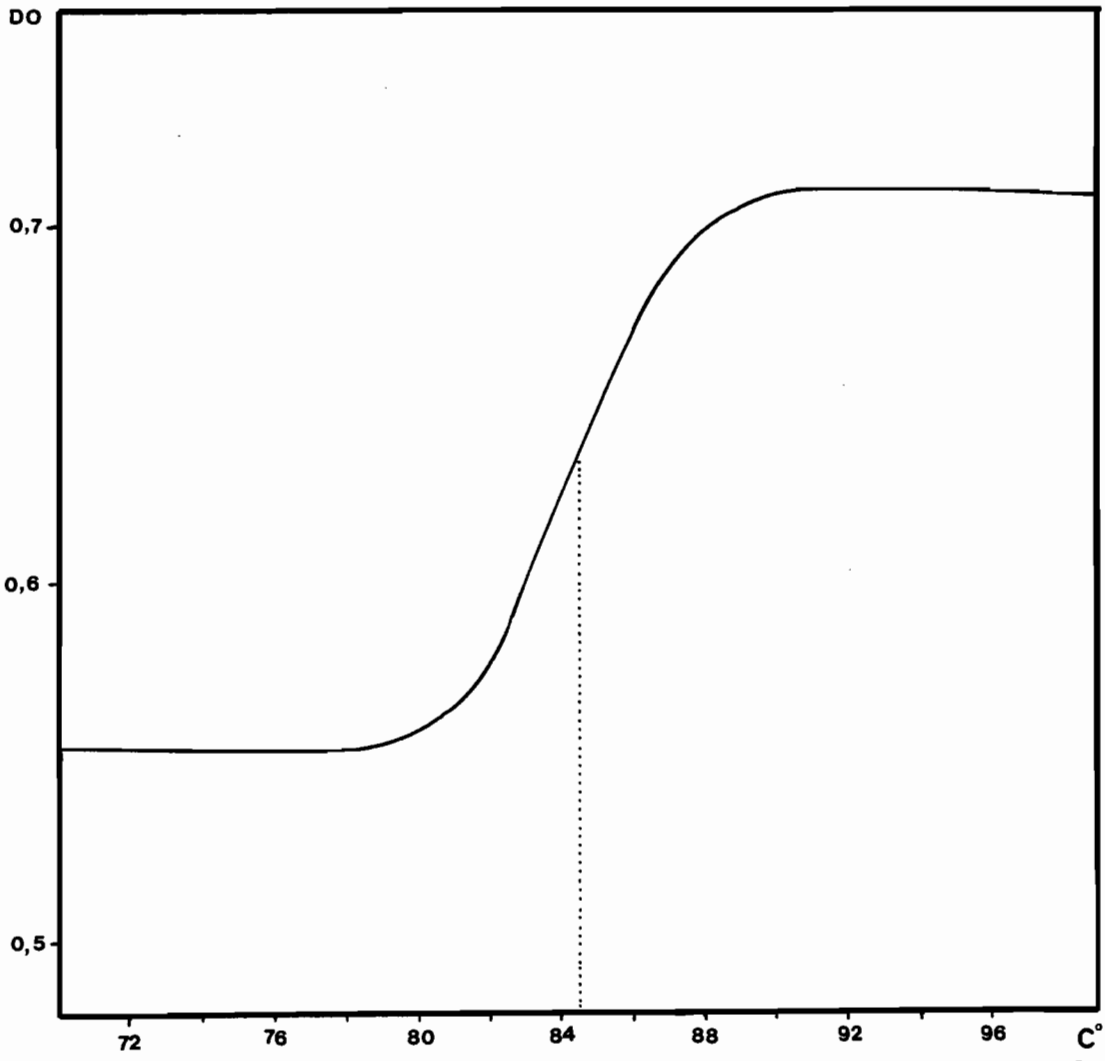
29



30

P L A N C H E X I I I

Fig.31 - Courbe de dénaturation thermique de l'ADN
extrait du Densovirus de *C. extranea* dans un
tampon de forte molarité.



P L A N C H E XIV

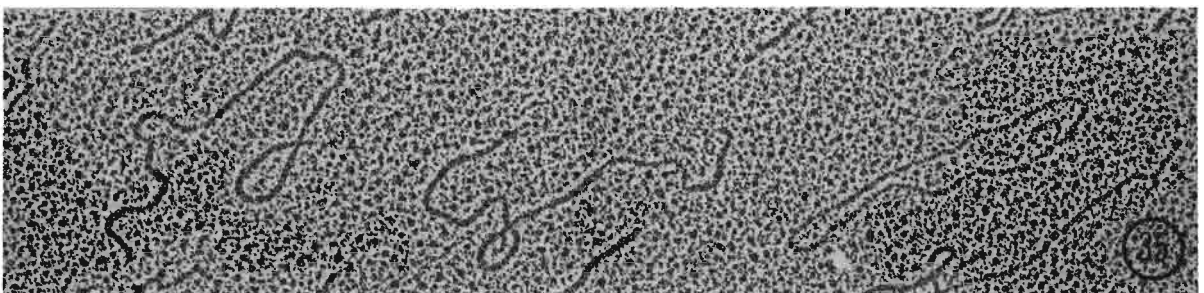
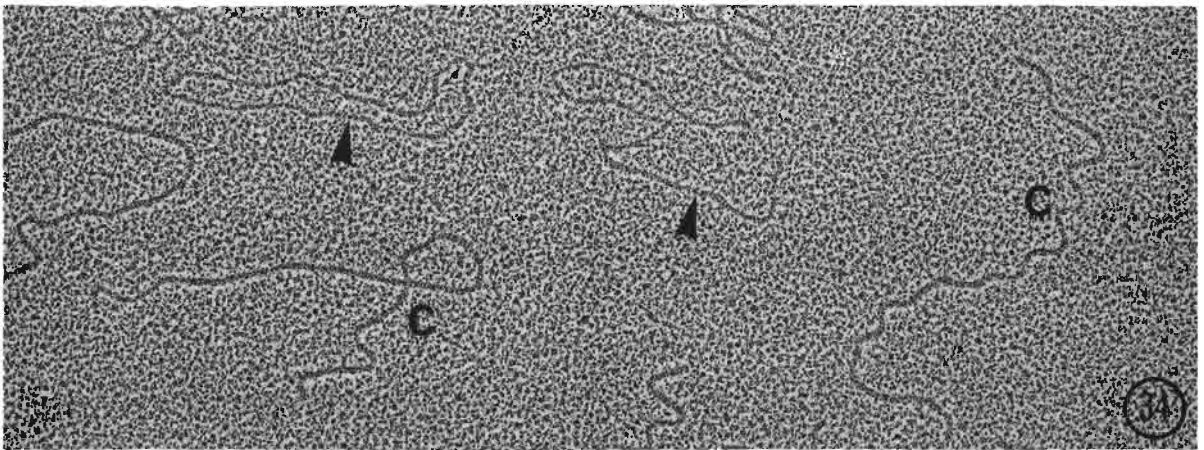
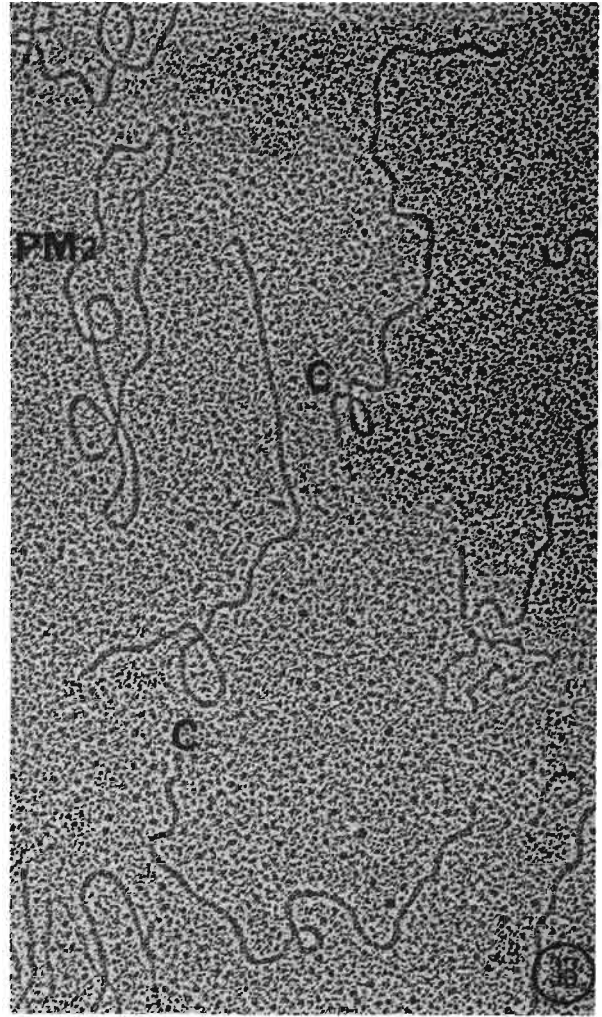
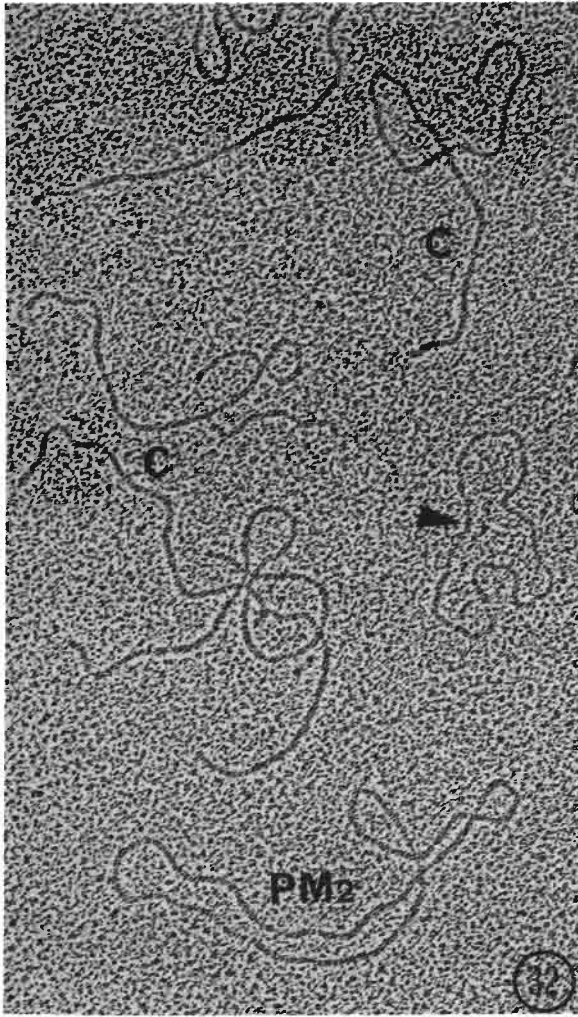
VISUALISATION des MOLECULES d'ADN APRES ETALEMENT SELON
LA TECHNIQUE de DAVIS et al., (1971) et OMBRAGE ROTATIF AU
PLATINE - PALLADIUM

Fig.32 - 34 - Molécules d'ADN linéaires bicaténaires
du Densovirus de *C. extranea* (c) étalées
en présence d'ADN circulaire bicaténaire
du bactériophage PM₂ et d'ADN circulaire
monocaténaire du bactériophage Ø X 174
(flèches)

x 48 000

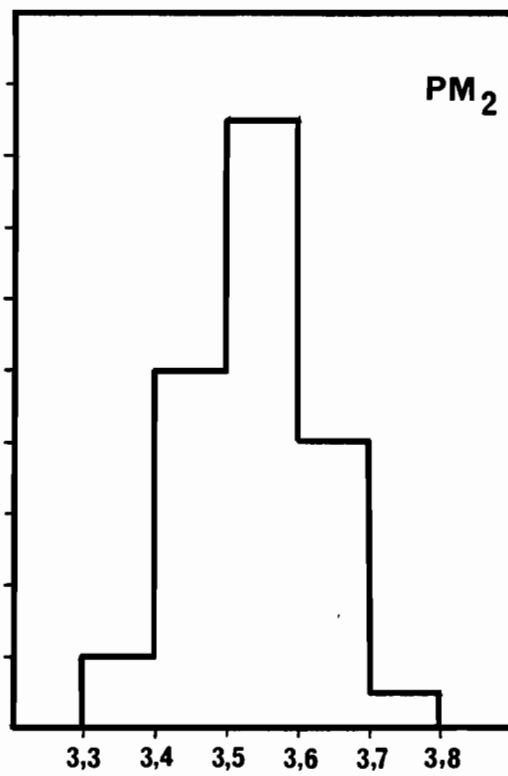
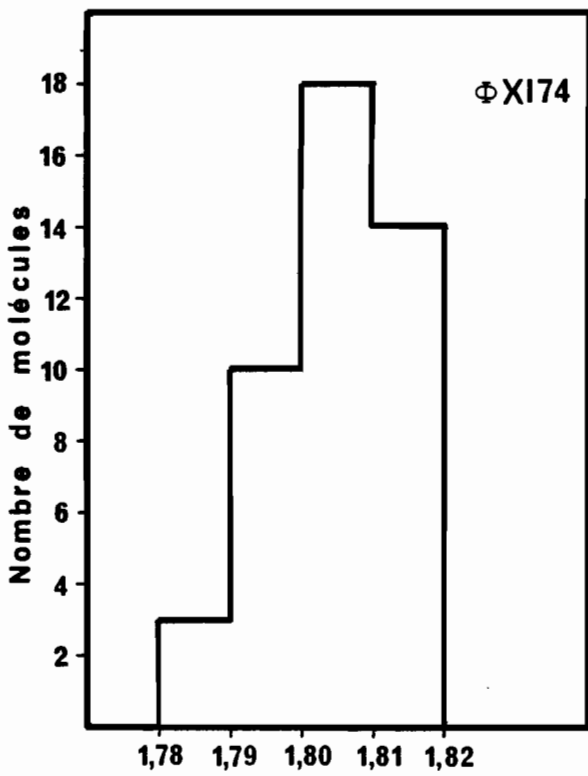
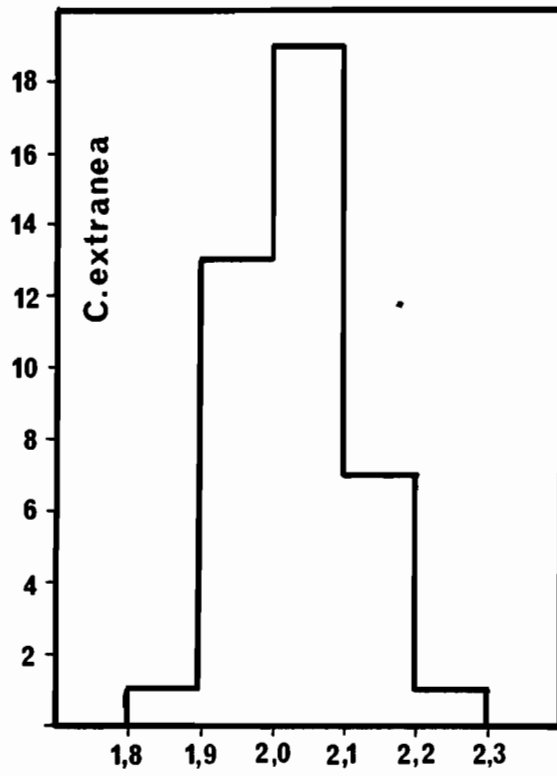
Fig.35 - Molécules d'ADN linéaire bicaténaire et
circulaire monocaténaire du Densovirus de
C. extranea

x 48 000



P L A N C H E X V

Fig. 36 - Histogrammes des longueurs des molécules d'ADN.



Longueur (μm)

P L A N C H E XVI

Fig.37 - Caractérisation immunologique du Densovirus de *C. extranea* par immunodiffusion en gel d'agarose.

- a. antisérum de souris anti VDN de *C. extranea*
- b. antisérum de lapin anti VDN de *C. extranea*
- c. antisérum de lapin anti VDN de *G. mellonella*
- d. antisérum de lapin anti VDN de *J. coenia*

- 1. Densovirus de *C. extranea*
- 2. Densovirus de *G. mellonella*
- 3. Densovirus de *J. coenia*
- 4. Broyat de *S. littoralis* infectés avec le Densovirus de *J. coenia*.

A - Précipitation avec le Densovirus de *C. extranea*

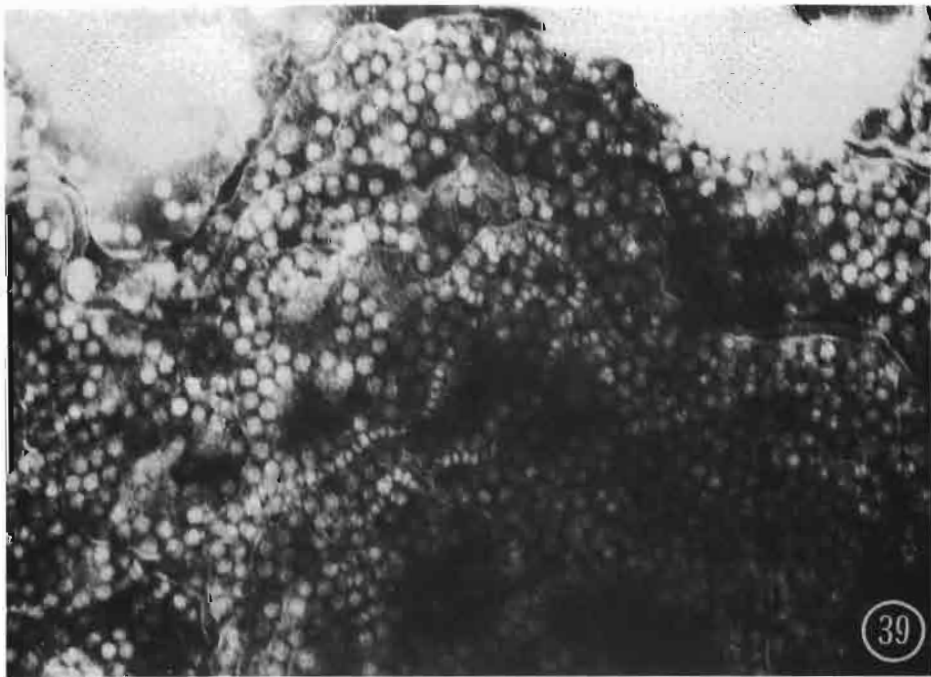
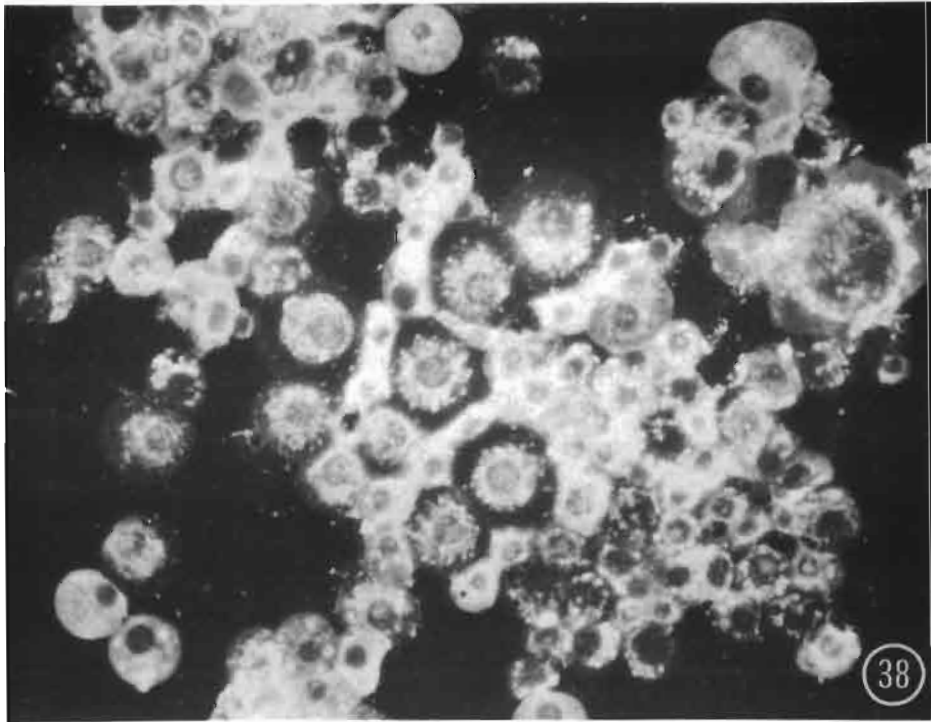
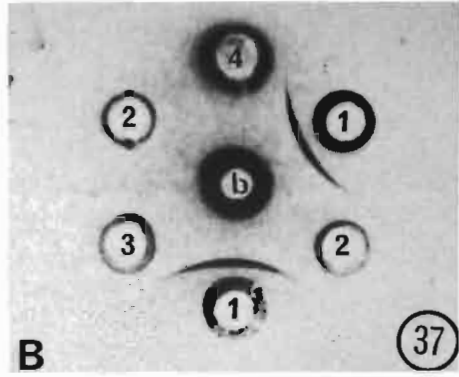
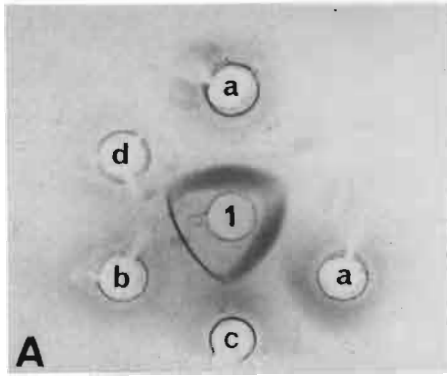
B - Précipitation avec l'antisérum de lapin anti VDN de *C. extranea*.

Fig.38 - Infection de cellules, de la lignée SCL d 135 de *L. dispar* par le Densovirus de *C. extranea*, révélée par immunofluorescence indirecte.

x 800

Fig.39 - Examen après contraste négatif à l'APT de particules virales dans des débris de cellules provenant de la lignée SPC Bm 40 de *B. mori* après transfection par l'ADN purifié du Densovirus de *C. extranea*.

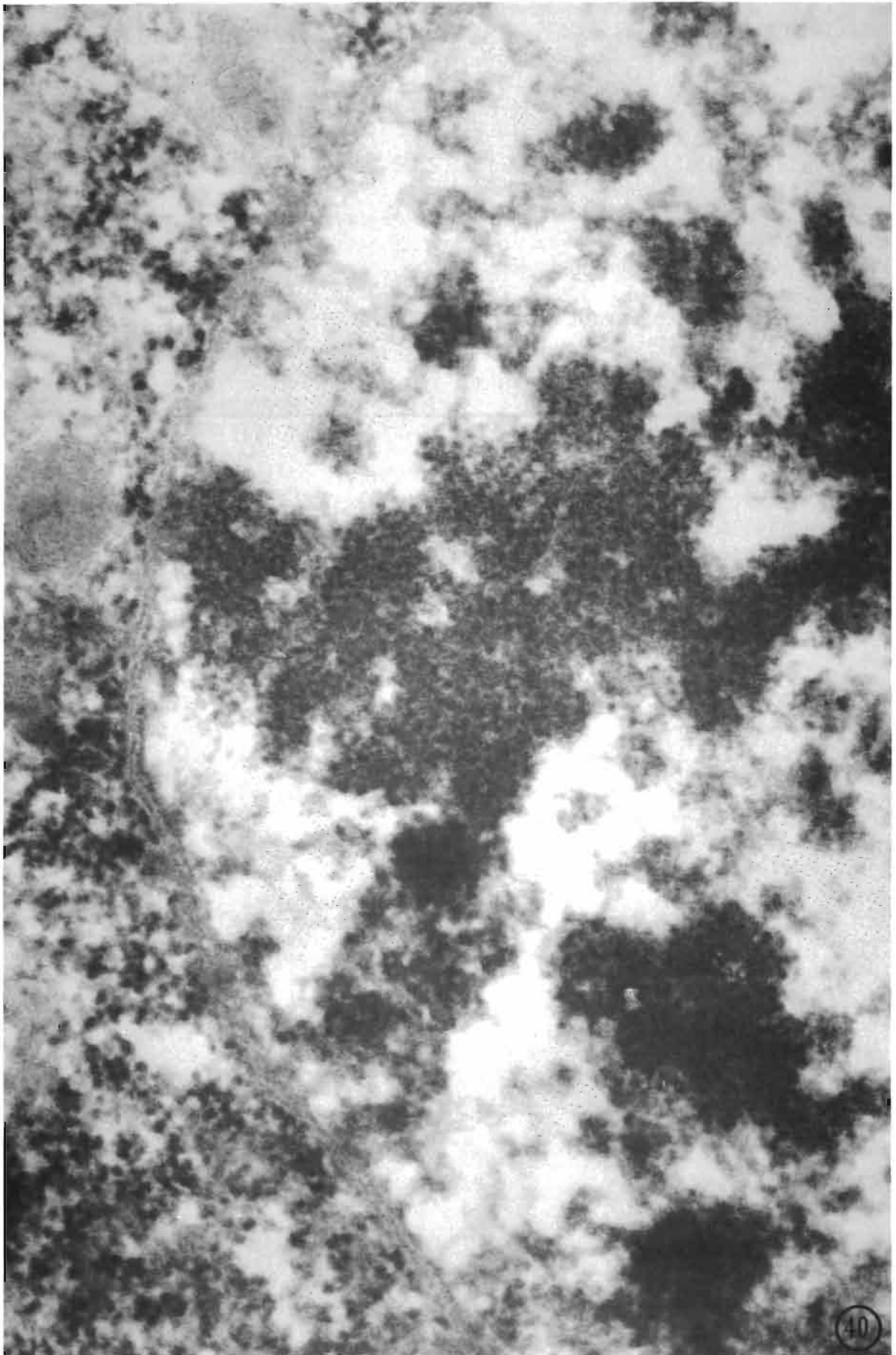
x 90 000



P L A N C H E X V I I

Fig.40 - Particules virales dans le noyau d'une
cellule de la lignée SPC Bm 40 de *B. mori*
infectée par le Densovirus de *C. extranea*.

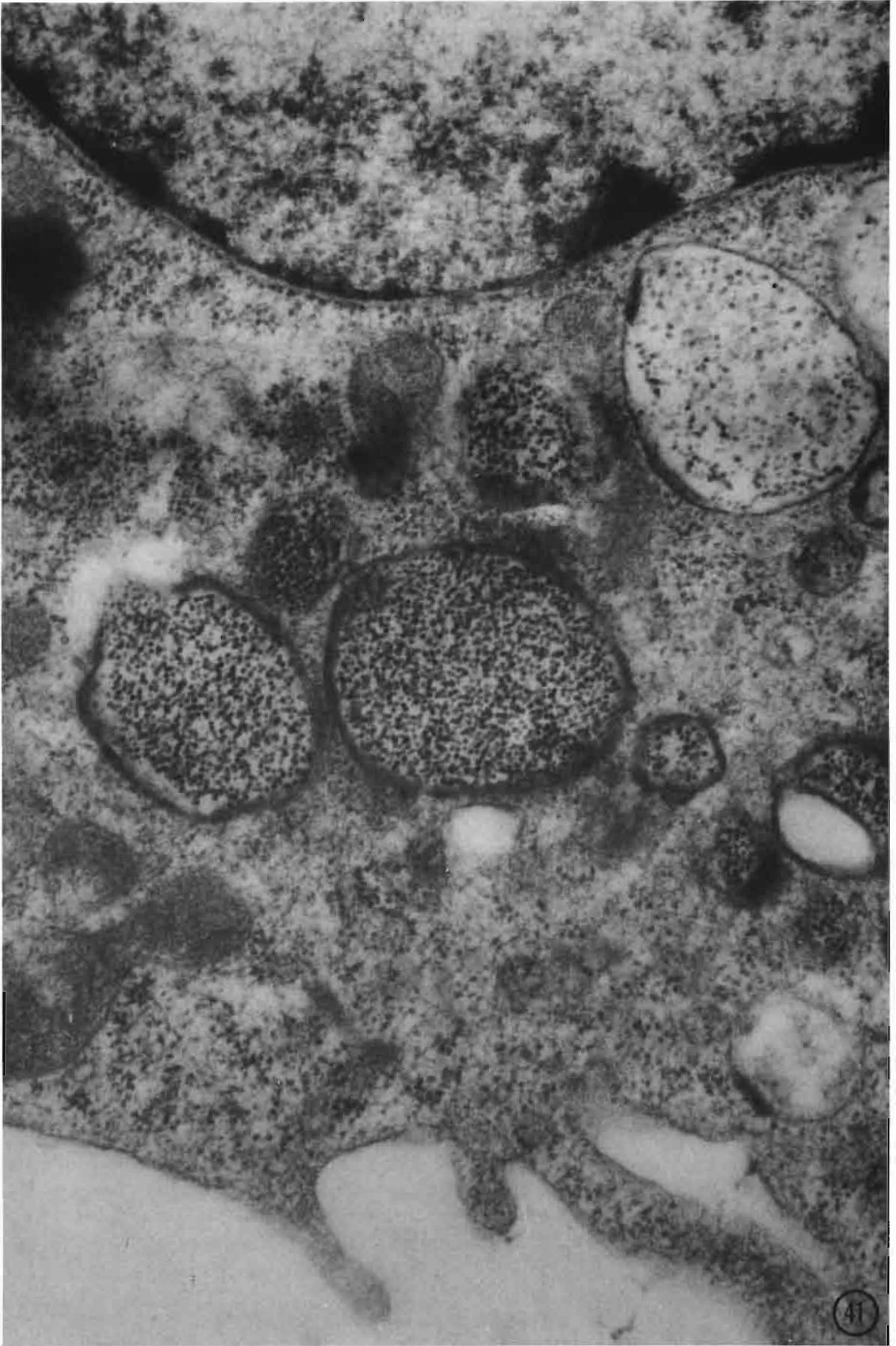
x 90 000



P L A N C H E XVIII

Fig.41 - Cellule de la lignée SPC Bm 40 de *B. mori* infectée par le Densovirus de *C. extranea*. Vacuoles cytoplasmiques contenant de nombreuses particules virales.

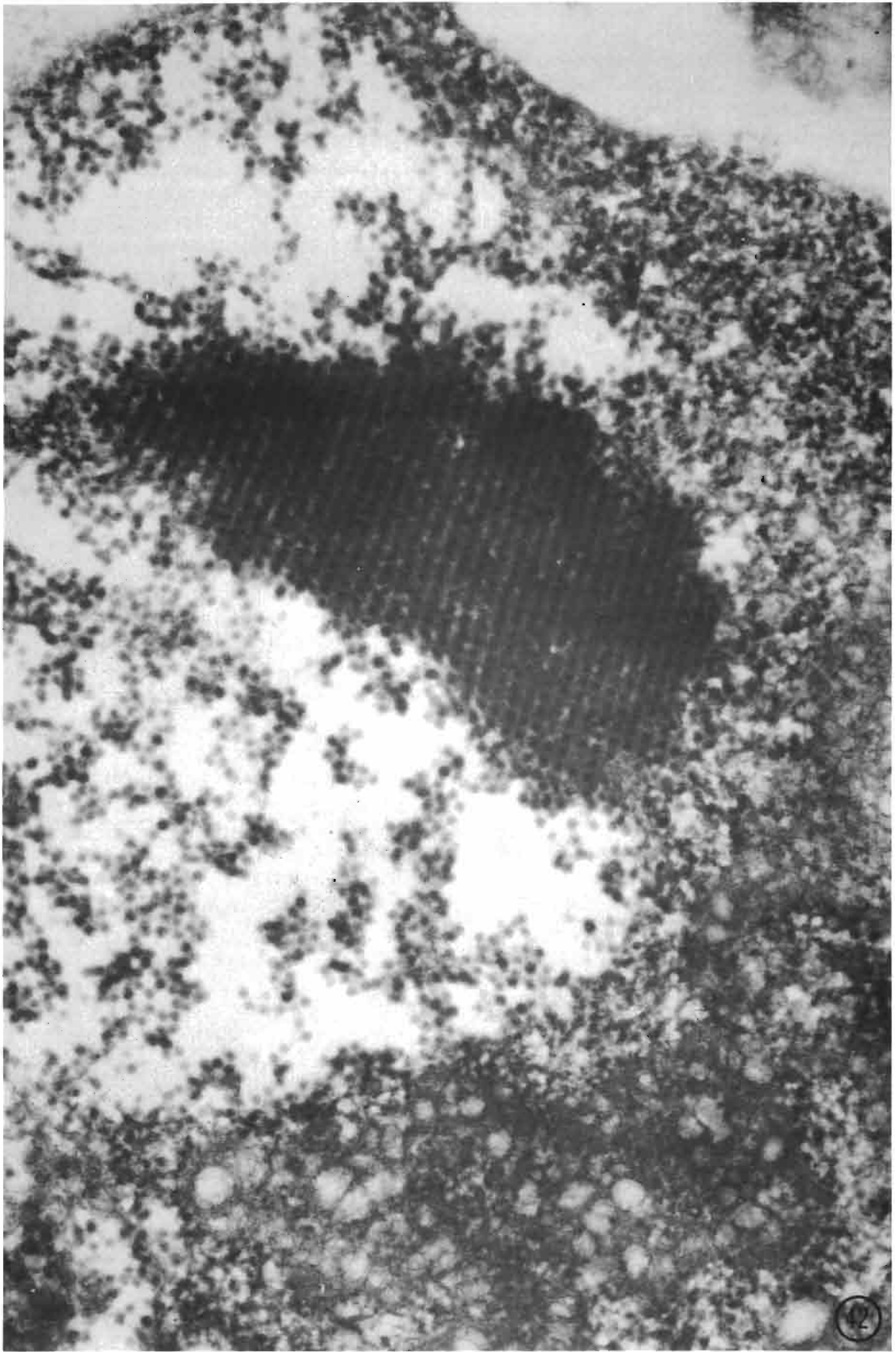
x 55 000



P L A N C H E X I X

Fig.42 - Arrangement paracristallin de particules virales dans le cytoplasme d'une cellule de la lignée SPC Bm 40 de *B. mori* infectée par le Densovirus de *C. extranea*.

x 90 000



P L A N C H E XX

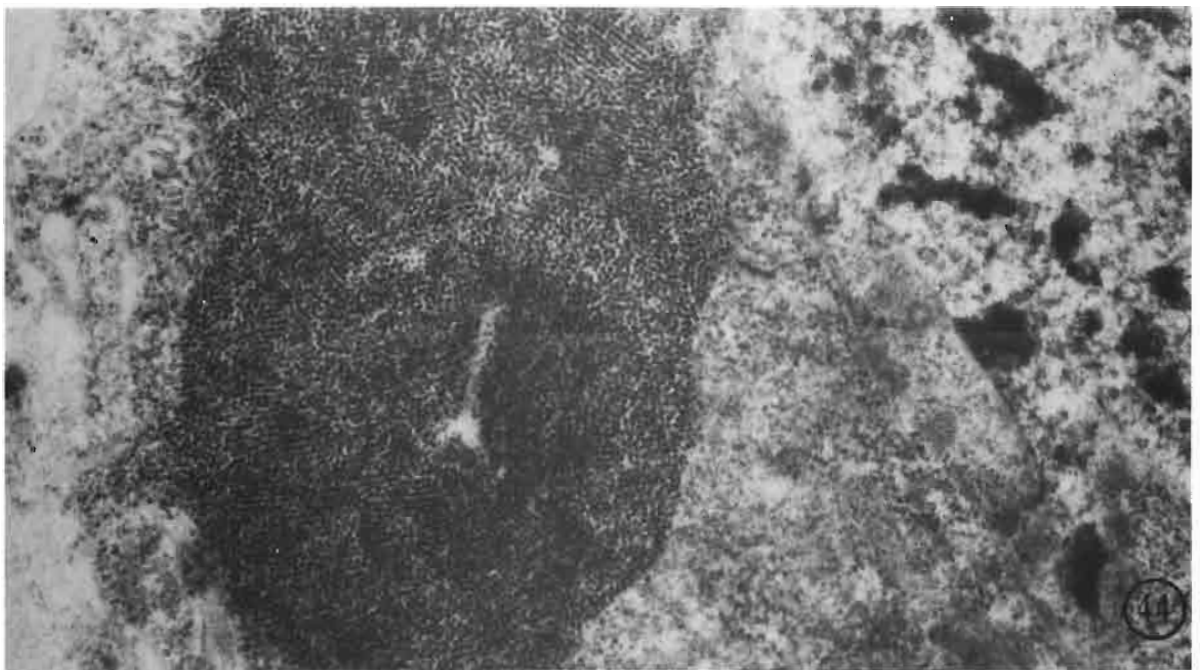
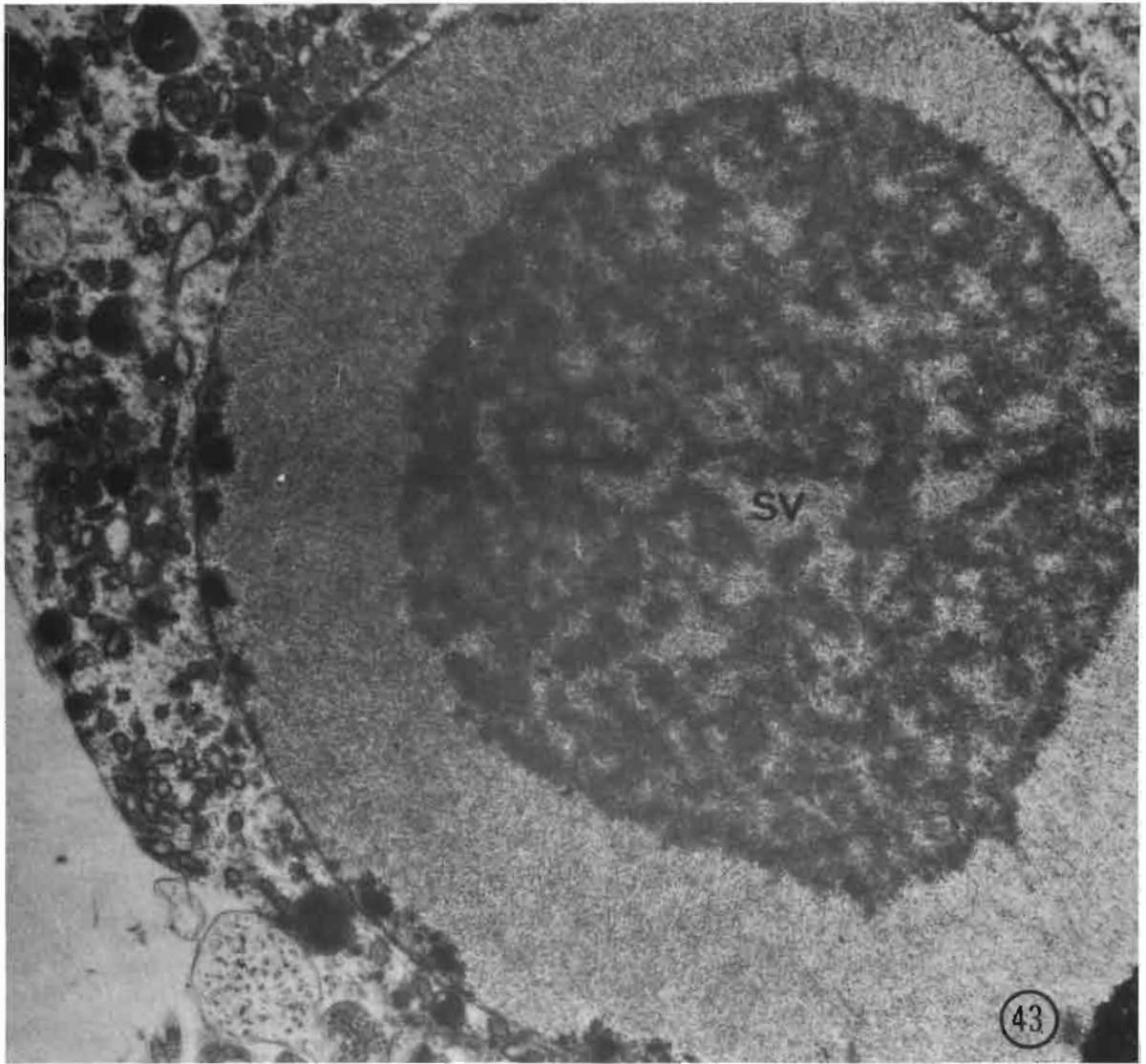
CELLULES de la LIGNEE SCLd 135 de *L. dispar* INFECTEES
par le DENSOVIRUS de *C. extranea*

Fig.43 - Noyau hypertrophié avec chromatine marginée
et stroma virogène (SV)dense aux électrons.

x 13 000

Fig.44 - Amas cytoplasmique de virions à proximité
de la membrane nucléaire.

x 35 000



P L A N C H E XXI

DIFFERENTS STADES de DEVELOPPEMENT de *Latoia viridissima*

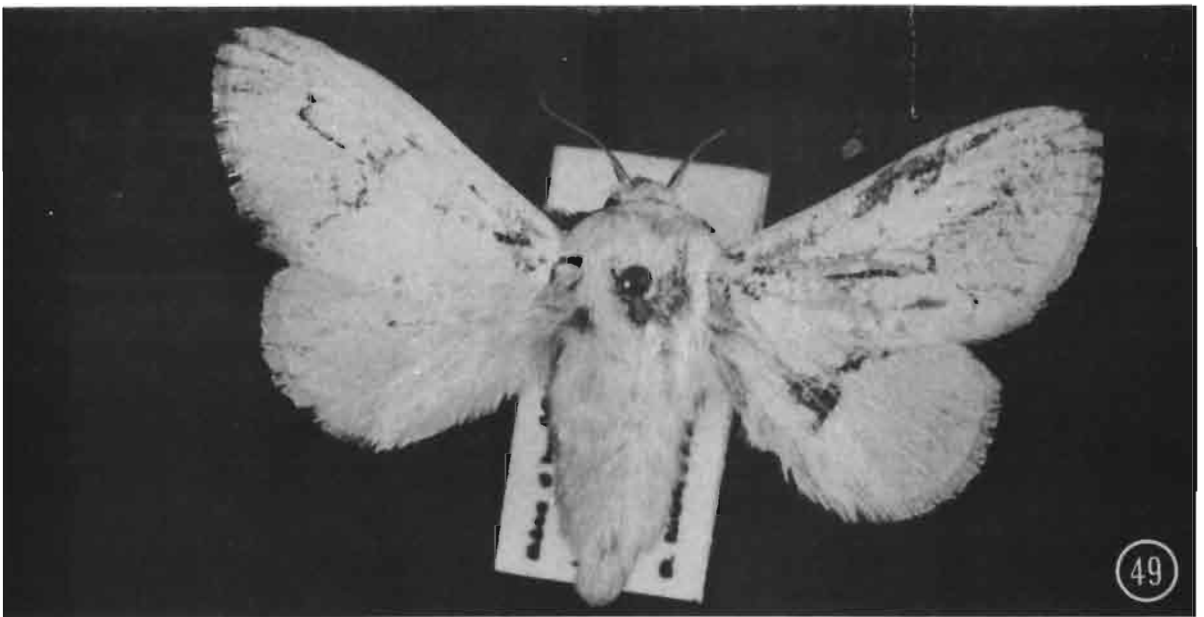
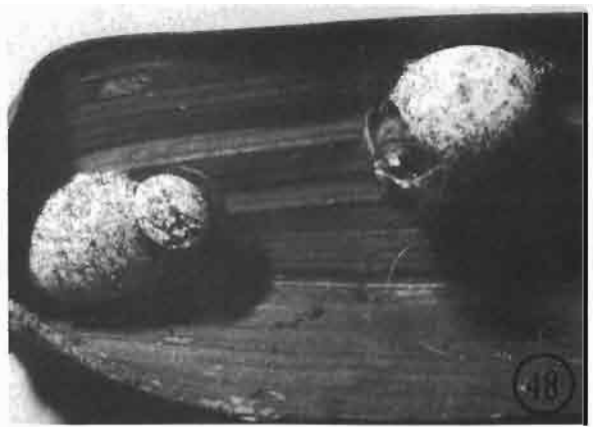
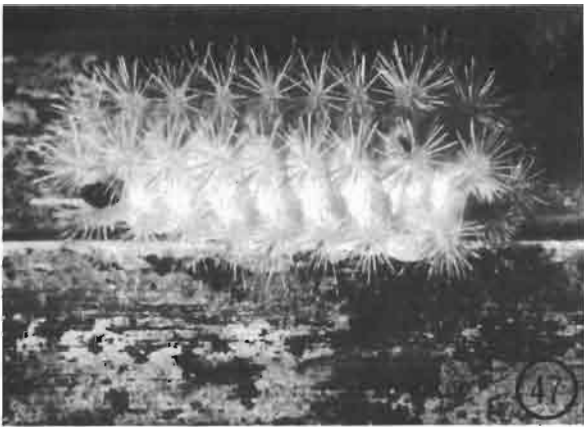
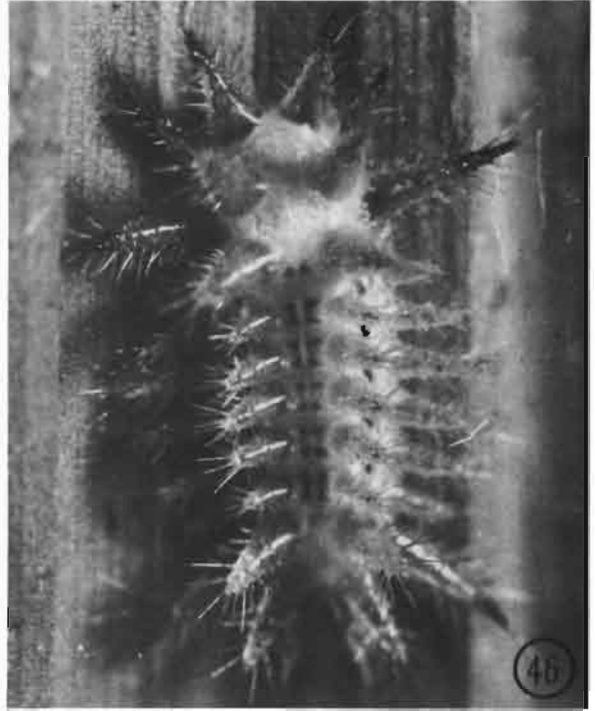
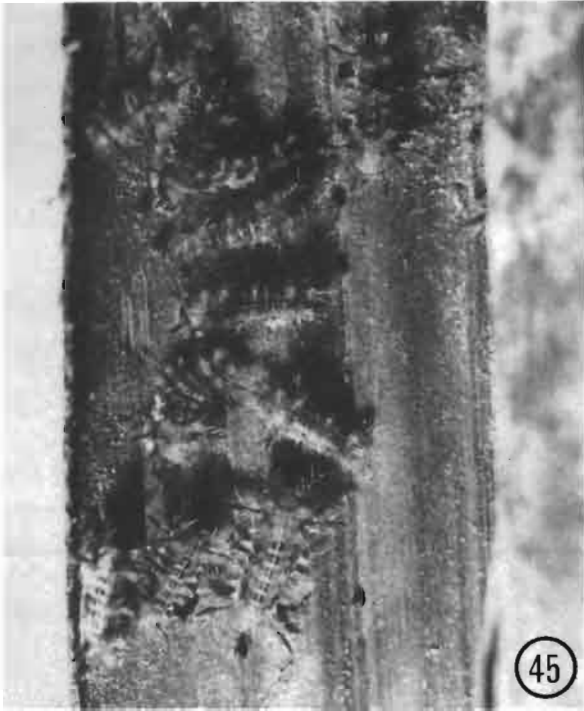
Fig.45 - Larves de 2^e stade
 x 3

Fig.46 - Larve de 3^e stade
 x 9

Fig.47 - Larve de 8^e stade
 x 2,5

Fig.48 - Cocons après émergence de l'imago
 x 1,5

Fig.49 - Imago mâle
 x 3,5



P L A N C H E XXII

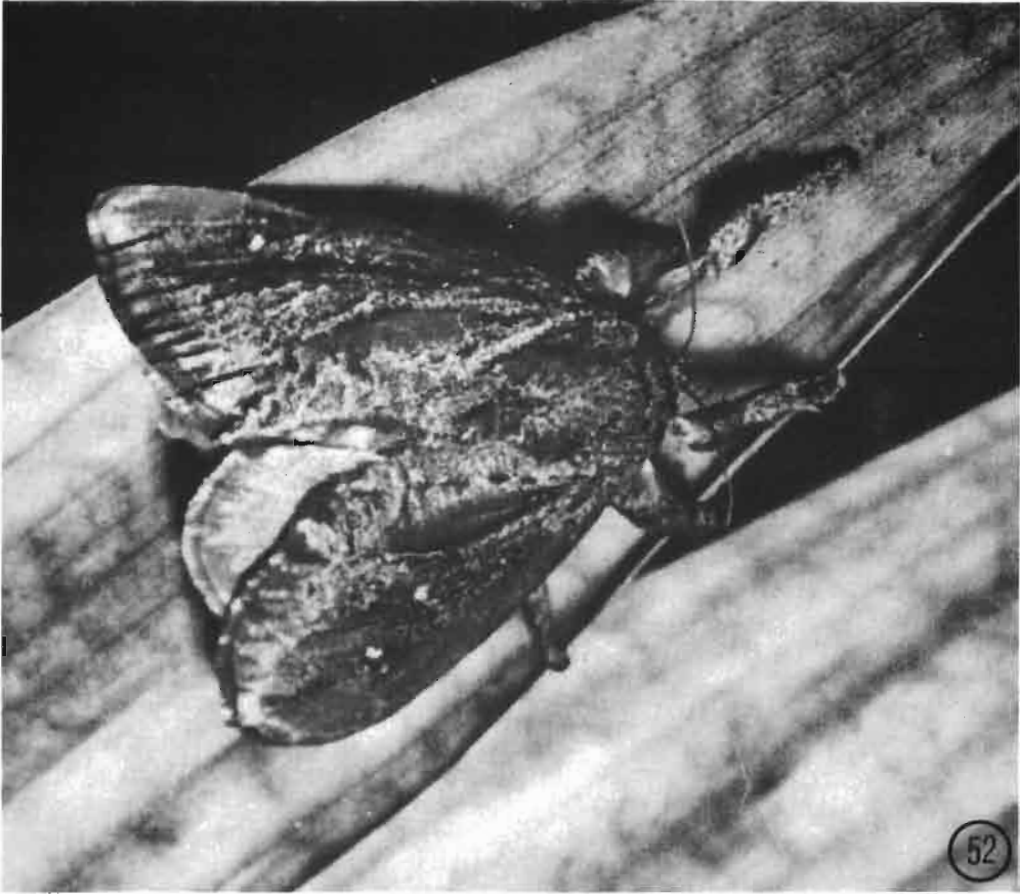
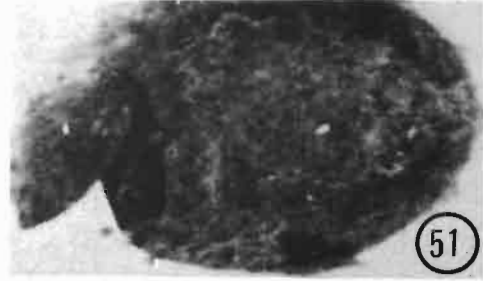
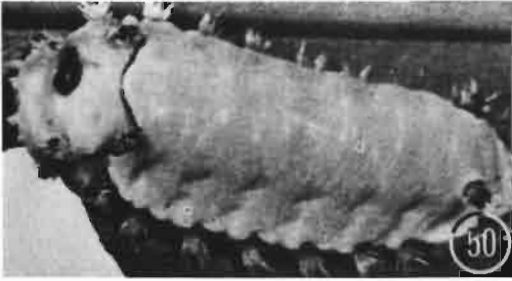
DIFFERENTS STADES de DEVELOPPEMENT de *Sibine fusca*

(D'après GENTY et al., 1978)

Fig.50 - Larve de 8^e stade
x 3

Fig.51 - Cocon après émergence de l'imago
x 3,5

Fig.52 - Imago femelle
x 2,5



- P L A N C H E XXIII

Fig.53 - Suspension purifiée du virus de *L. viridissima*
examinée après contraste négatif à l'acide phosphotungstique.

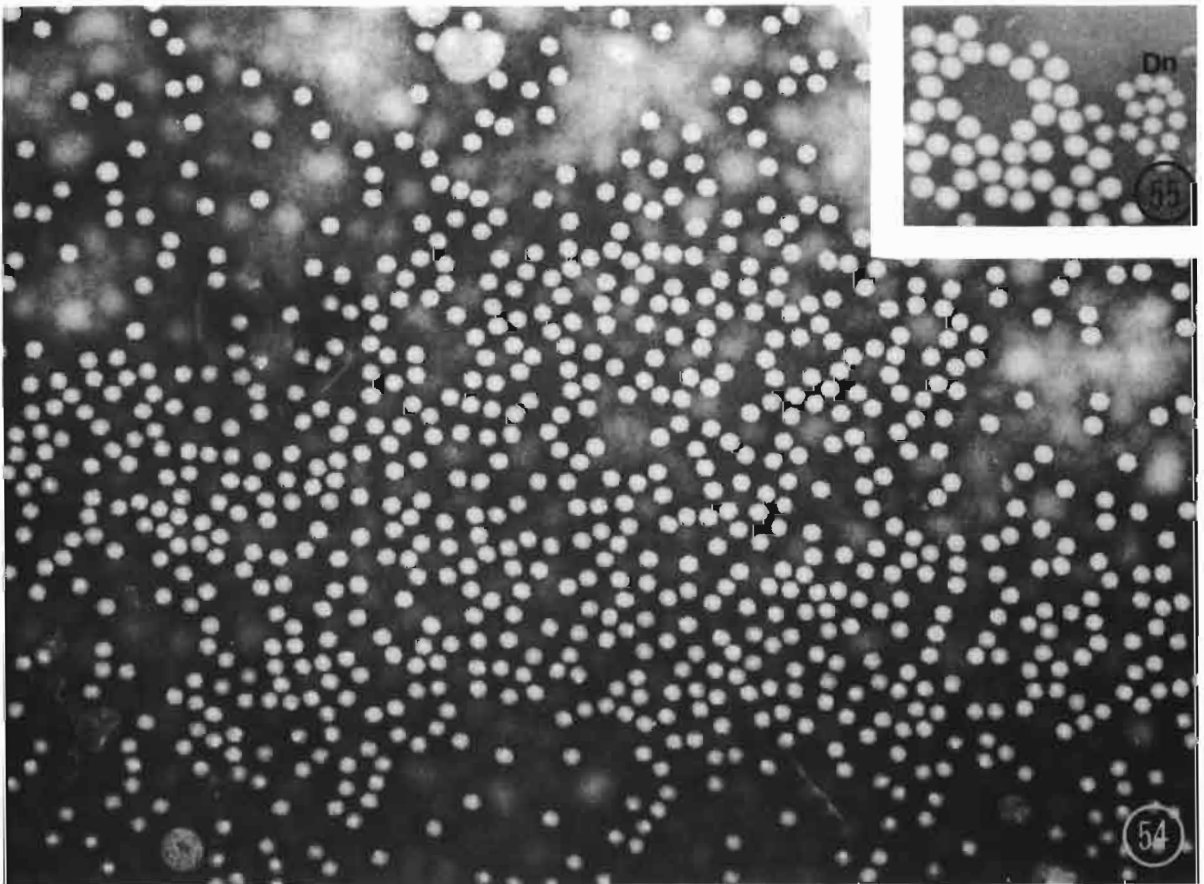
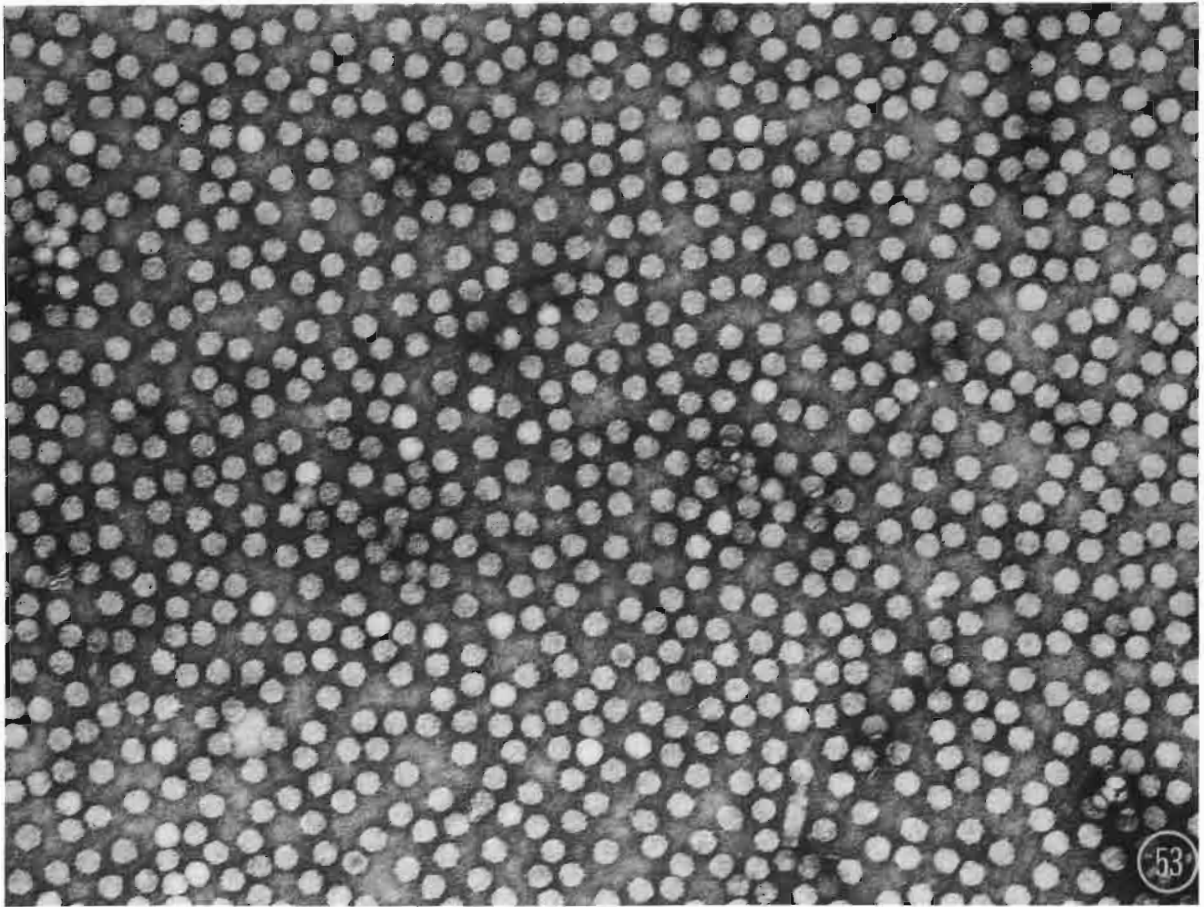
x 120 000

Fig.54 - Suspension purifiée du virus de *S. fusca*
examinée après contraste négatif à l'acide phosphotungstique.

x 85 000

Fig.55 - Suspension contenant simultanément le virus
étudié et le Densovirus (Dn) de *S. fusca*

x 120 000

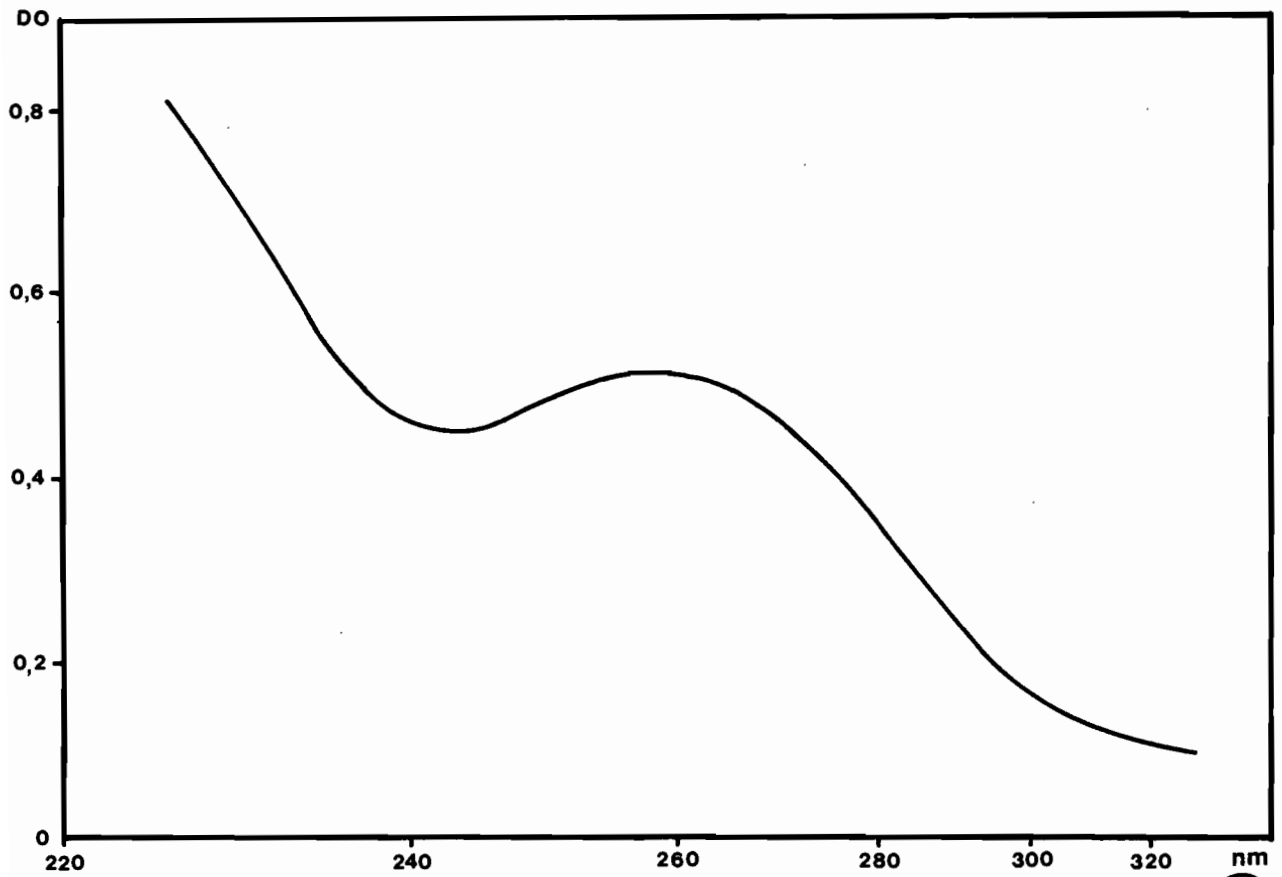


P L A N C H E XXIV

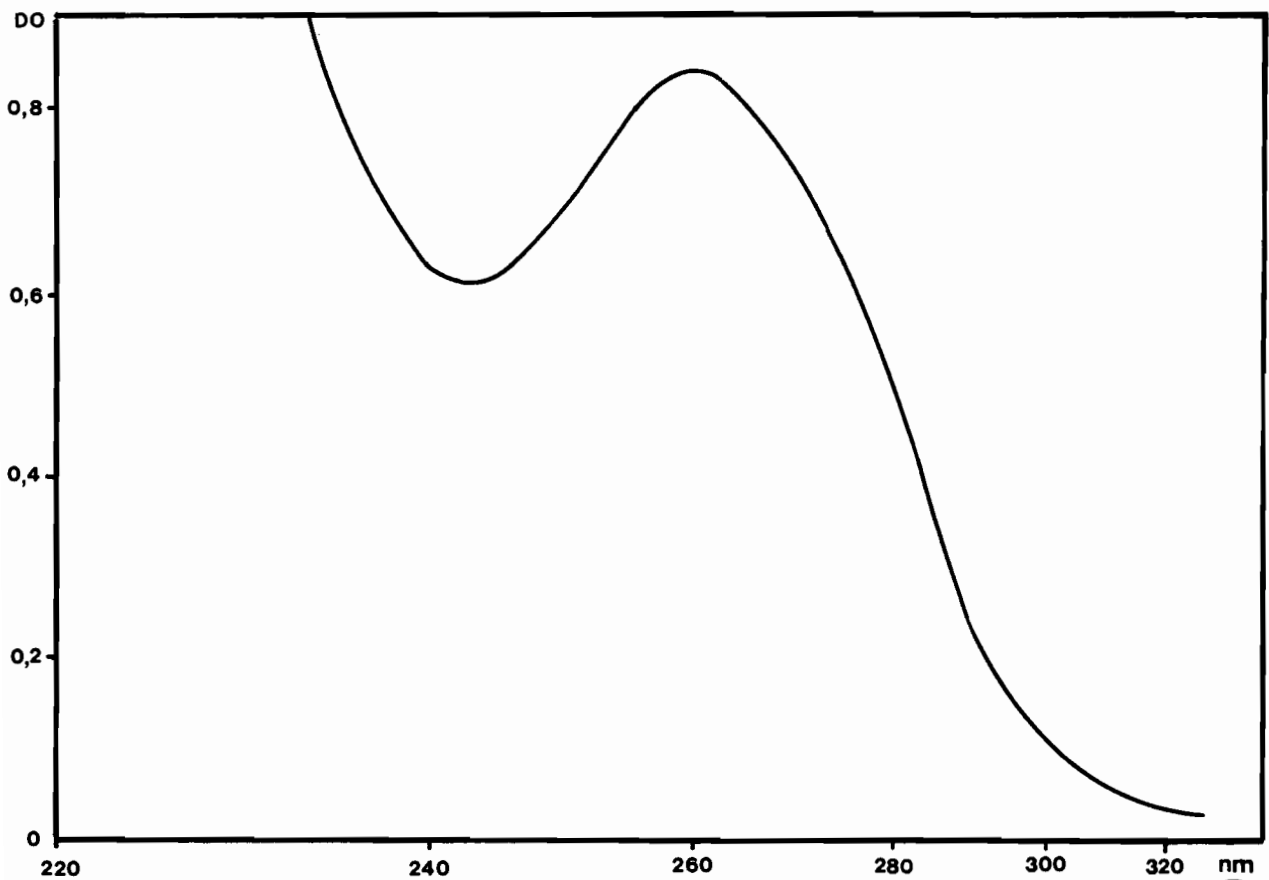
SPECTRES d'ABSORPTION dans l'ULTRAVIOLET de SUSPENSIONS
VIRALES PURIFIEES

Fig. 56 - Virus de *S. fusca*

Fig. 57 - Virus de *L. viridissima*



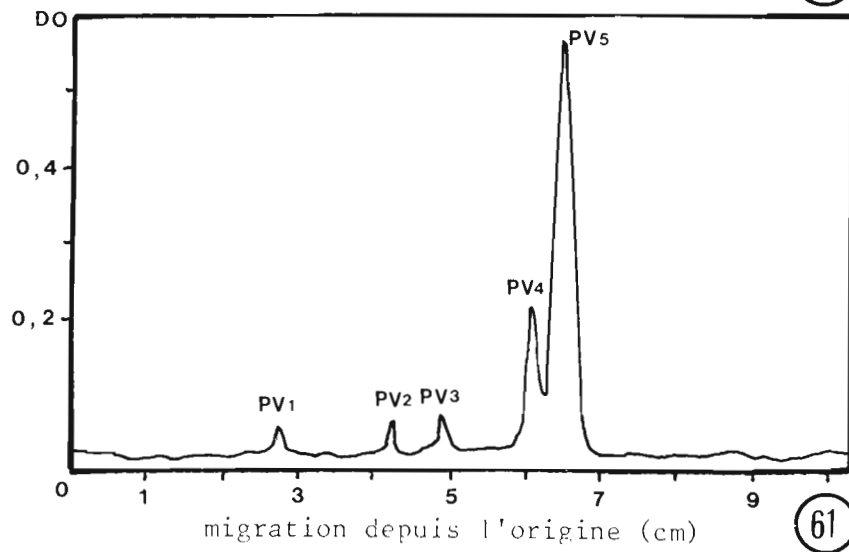
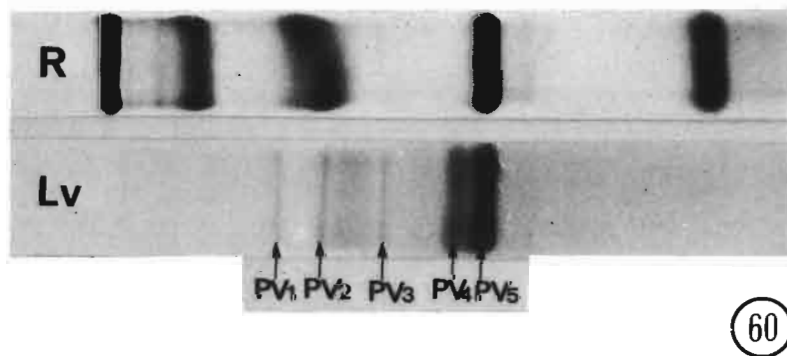
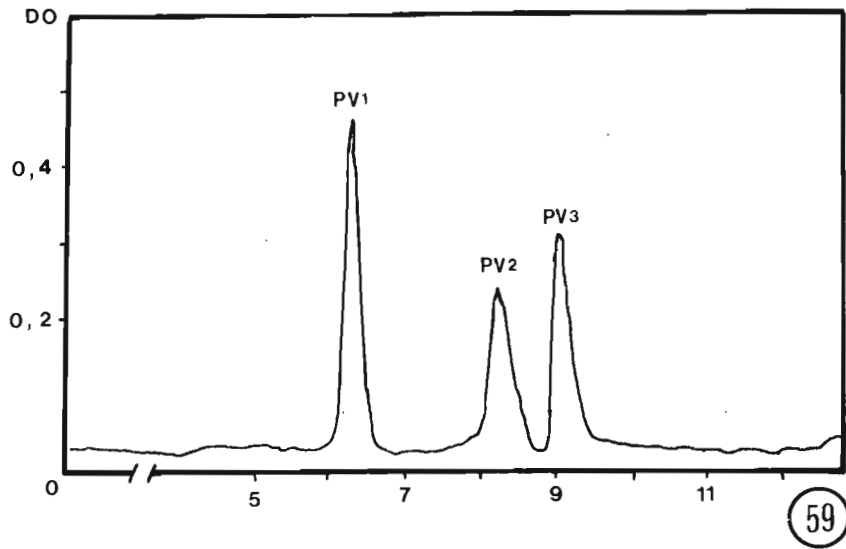
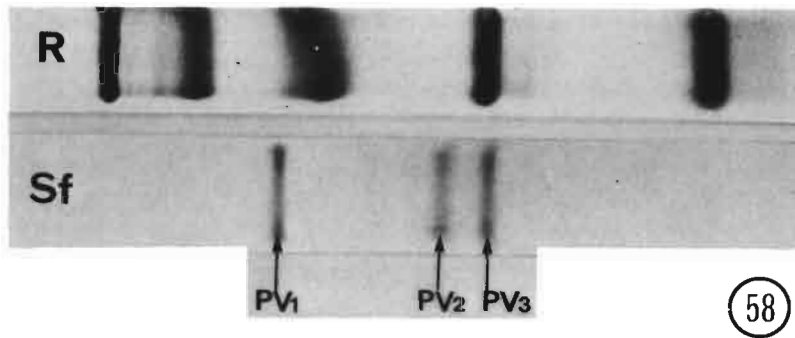
56



57

P L A N C H E XXV

- Fig.58 - Electrophorégramme des protéines structurales du virus de *S. fusca* (S.f.) et des protéines de référence (R)
- gel de polyacrylamide à 11 %
- Fig.59 - Enregistrement densitométrique des protéines structurales du virus de *S. fusca* après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7 %
- Fig.60 - Electrophorégramme de protéines structurales du virus de *L. viridissima* (L.v) et des protéines de référence (R)
- gel de polyacrylamide à 11 %
- Fig.61 - Enregistrement densitométrique de protéines structurales du virus de *L. viridissima* après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 9 %



P L A N C H E XXVI

DETERMINATION des POIDS MOLECULAIRES de PROTEINES
VIRALES par ELECTROPHORESE en GEL de POLYACRYLAMIDE DE
DIFFERENTES CONCENTRATIONS :

o 7 %

▶ 9 %

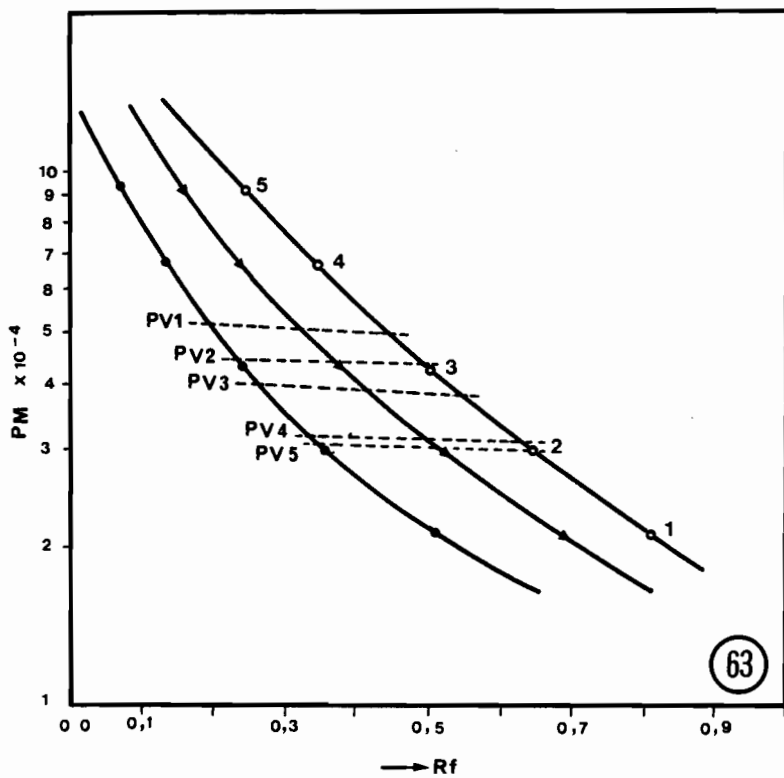
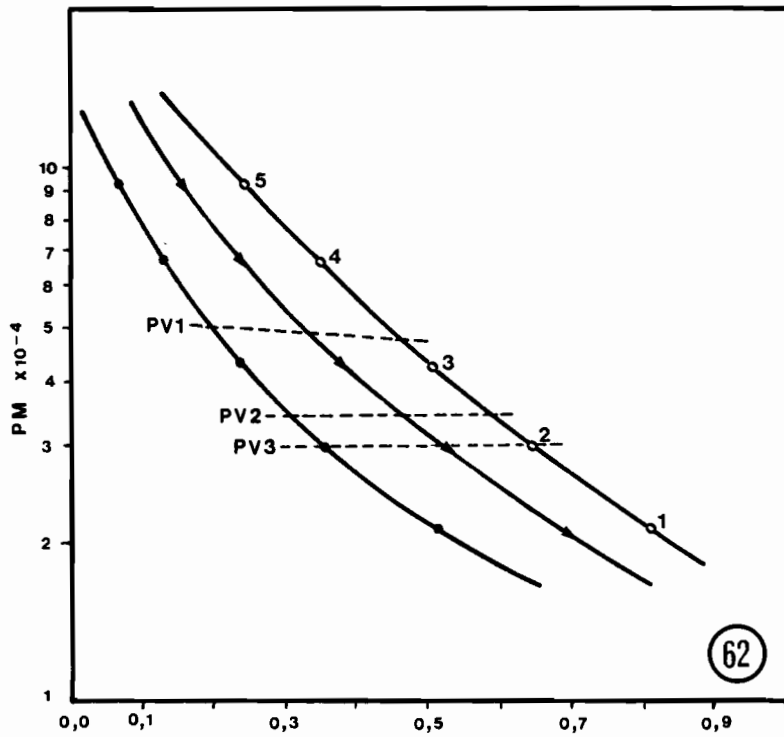
• 11 %

Protéines de référence :

- 1 Inhibiteur de trypsine (P.M. 20 100)
- 2 Anhydrase carbonique (P.M. 30 000)
- 3 Ovalbumine (P.M. 43 000)
- 4 Sérum albumine de boeuf (P.M. 67 000)
- 5 Phosphorylase b (P.M. 94 000)

Fig.62 - Virus de *S. fusca*

Fig.63 - Virus de *L. viridissima*



P L A N C H E XXVII

Fig.64 - A et B Electrophorégramme des ARN viraux de *L. viridissima* (L.v), de *S. fusca* (S.f) et d'ARN de référence :

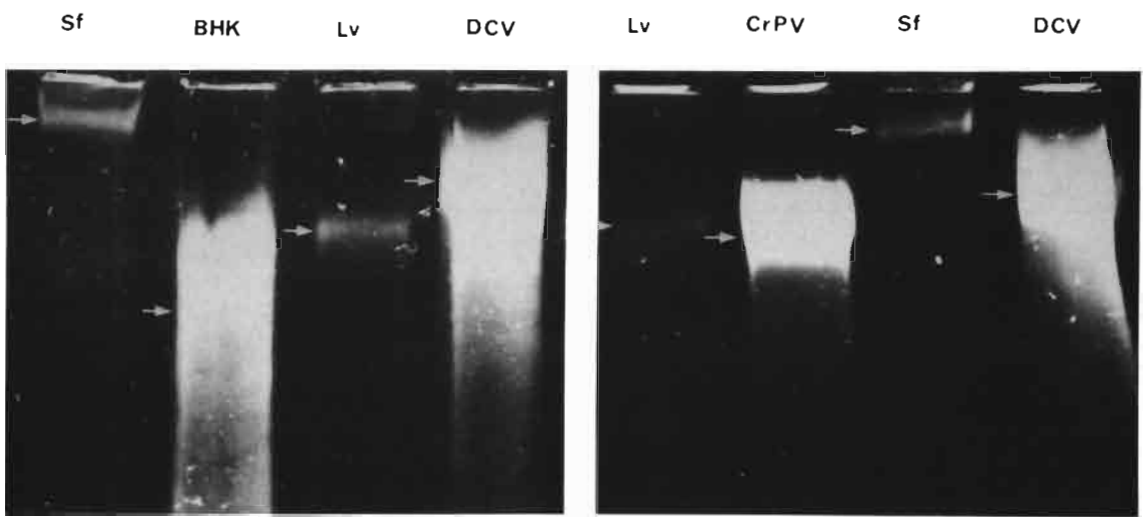
- ARN ribosomal 28 S de cellules de la lignée BHK
- ARN du virus de la paralysie du grillon (CrPV)
- ARN du virus C de la drosophile (DCV)

- gel de polyacrylamide à 2,5 %

Fig.65 - Détermination des poids moléculaires des ARN viraux de *L. viridissima* et de *S. fusca* après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 2,5 %.

- marqueurs de référence :

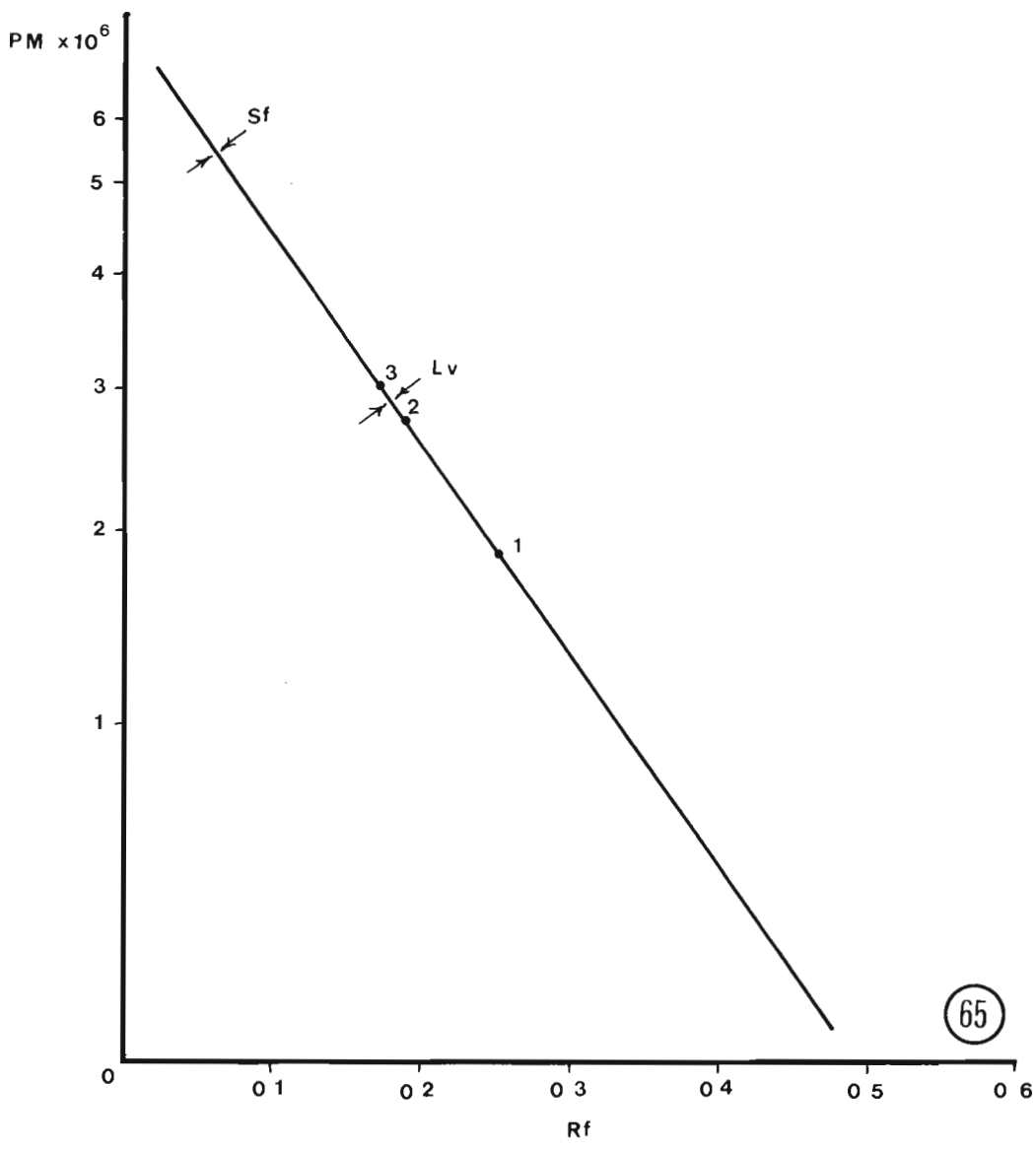
1. ARN ribosomal 28 S de cellules BHK (P.M. $1,9 \cdot 10^6$)
2. ARN viral de CrPV (P.M. $2,8 \cdot 10^6$)
3. ARN viral de DCV (P.M. $3,0 \cdot 10^6$)



A

B

64



65

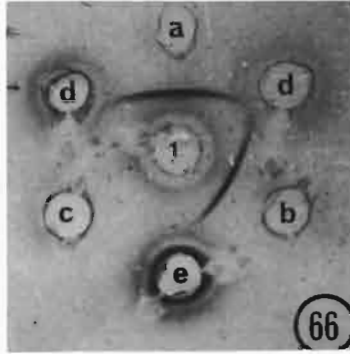
P L A N C H E XXVIII

CARACTERISATION IMMUNOLOGIQUE des VIRUS de *L. viridissima*
et de *S. fusca* par immunodiffusion en gel d'agarose

Fig.66 - Précipitation avec le virus de *L. viridissima*

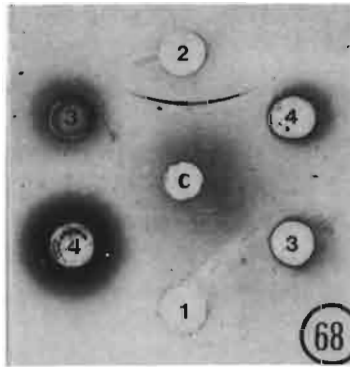
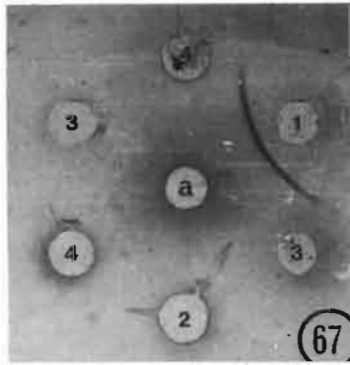
Fig.67 - Précipitation avec l'immunsérum de lapin anti
virus de *L. viridissima*

Fig.68 - Précipitation avec l'immunsérum de souris anti
virus de *S. fusca*



1. Virus de *L. viridissima*
2. Virus de *S. fusca*
3. CrPV
4. DCV

- a. Antisérum de lapin antiviral de *L. viridissima*
- b. Antisérum de souris antiviral de *L. viridissima*
- c. Antisérum de souris antiviral de *S. fusca*
- d. Antisérum de lapin anti CrPV
- e. Antisérum de lapin anti DCV



ANNEE : 1983

NOM de l'auteur : FEDIERE Gilles

Université des Sciences et Techniques du Languedoc
(MONTPELLIER II)

RESUME :

Deux viroses épizootiques sont décrites respectivement chez *Casphalia extranea* et *Latoia viridissima*, Lépidoptères *Limacodidae* ravageurs de palmacées en Côte d'Ivoire.

L'infection observée chez *C. extranea* présente les caractéristiques histopathologiques et ultrastructurales d'une virose de type denonucléose. L'agent causal est un petit virus icosaédrique de 22 nm renfermant de l'ADN. Par ses propriétés biophysiques et biochimiques et celles de son génome, ce virus est considéré comme appartenant au genre *Densovirus* (*Parvoviridae*).

Chez *L. viridissima* l'infection est due à un virus également icosaédrique de 30 nm possédant un génome à ARN. Une étude comparée de ce virus et d'un autre semblable, isolé du *Limacodidae Sibine fusca* de Colombie, permet de les rapprocher du groupe des Picornavirus.

MOTS-CLES :

Lépidoptères	Viroses
<i>Limacodidae</i>	<i>Densovirus</i>
<i>Casphalia extranea</i>	<i>Parvoviridae</i>
<i>Latoia viridissima</i>	Picornavirus
<i>Sibine fusca</i>	Ultrastructure
Ravageurs de Palmacées	ADN
Côte d'Ivoire	ARN
Epizootie	Polypeptides structuraux
Cultures cellulaires	