

PATHOLOGIE DES INVERTÉBRÉS. — *Recherches cytopathologiques sur une maladie virale du Coléoptère Oryctes rhinoceros L.* Note (*) de MM. **Pierre Monsarrat, Gérard Meynadier, Guy Croizier et Constantin Vago**, Membre de l'Académie (1).

La découverte d'une action virale au niveau des cellules intestinales et des organes génitaux femelles explique l'extension particulière de la maladie et son incidence éthologique. Des inclusions cytoplasmiques renfermant des virions ont été mises en évidence. Les études ultrastructurales et sérologiques permettent de rapprocher ce virus des *Baculovirus*.

L'importance économique des dégâts causés par le Coléoptère *Oryctes rhinoceros* L. dans plusieurs régions inter-tropicales a motivé de nombreuses études concernant les maladies de cet insecte pour connaître les facteurs influençant la fluctuation des populations naturelles et afin de préparer une lutte biologique. C'est ainsi qu'en dehors des infections cryptogamiques, plusieurs syndromes ont été notés pour lesquels des actions virales pourraient être impliquées. Dans une de ces affections, en Malaisie, des particules de nature virale ont été observées (2) et l'efficacité de ce germe en lutte microbiologique a été reconnue dans le Pacifique Sud [(3), (4)].

Du fait même de ces applications, plusieurs travaux ont été entrepris sur le virus, appelé *Rhabdionvirus oryctes* par Huger (5) et sur son mode d'action. Les études relatives à la dynamique des populations et à l'évolution des dégâts de ce ravageur du Cocotier ont conduit à émettre plusieurs hypothèses sur la dissémination du virus par les adultes et sur les causes de la modification du comportement alimentaire de ces derniers (6). Ainsi, des recherches plus approfondies se sont révélées indispensables, d'une part pour caractériser le virus, d'autre part pour définir le cycle et le mode de transmission de la maladie.

C'est dans ce but que nous avons étudié, en microscopie électronique et en immunofluorescence, des larves et des adultes d'*O. rhinoceros* prélevés dans la nature aux îles Wallis ou infectés avec une souche utilisée par la Commission du Pacifique Sud.

Pour l'étude histologique, les fixations au mélange de Carnoy et au mélange de Helly et les colorations à l'Hémalum-picro-indigo-carmin, de Feulgen et de Vago-Amargier ont été employées. Pour la microscopie électronique, les tissus ont été fixés au glutaraldéhyde 2 %, acide osmique 1 %, en tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4, puis inclus dans de l'« Epon ».

La technique d'immunofluorescence indirecte a été pratiquée sur frottis de différents organes avec des sérums anti-corps d'inclusion de plusieurs viroses à granules et à polyèdres nucléaires de divers Lépidoptères.

SYMPTÔMES ET LÉSIONS. — Nous retenons avant tout l'absence de symptômes caractéristiques surtout lors de l'évolution rapide de la maladie chez la larve. Le bol alimentaire est le plus souvent absent, le contenu intestinal est alors glaireux et le volume de l'ampoule rectale réduit. Il est difficile de désigner des lésions cellulaires étroitement liées à la maladie. Seuls des signes d'hypertrophie nucléaire décelés par le mélange de Feulgen ou des inclusions cytoplasmiques réagissant à la coloration de

25 MAI 1973

O. R. S. I. O. M.

Collection de Référence

n°

6134 Ewh.

Vago-Amargier peuvent être observés dans les tissus intestinaux et adipeux des larves et des adultes surtout en fin de maladie à évolution lente. En outre, dans l'épithélium intestinal et dans le tissu adipeux des larves L 3, on note souvent des plages nécrotiques mélanisées.

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE. — Des lésions nucléaires et cytoplasmiques profondes avec présence de virions ont été décelées non seulement dans le tissu adipeux où des altérations ont déjà été observées (5) mais aussi, et avec forte intensité, dans l'épithélium intestinal de larves et d'adultes. Il est particulièrement intéressant d'avoir noté la présence de virions dans les cellules de la paroi de la gaine ovarique (fig. 1 et 3) ainsi que dans les cellules nourricières de la paroi interne de la spermathèque. Des virions ont été observés dans le contenu de cet organe.

Dans les cellules atteintes, les virions se forment à l'intérieur des noyaux au sein de plages virogènes. On observe l'apparition de bâtonnets de 170 nm de long et de 45 nm de large très denses aux électrons. On note d'autres éléments de dimensions semblables mais sans opacité. On constate fréquemment dans les noyaux la présence de filaments de longueur variable, de même diamètre que celui des bâtonnets (fig. 1). Enfin de nombreux bâtonnets sont entourés d'une membrane à 2 feuillets ayant 9 nm d'épaisseur (fig. 2). Dans plusieurs noyaux on remarque des éléments membranaires à structure et à dimensions comparables à celles de l'enveloppe des virions.

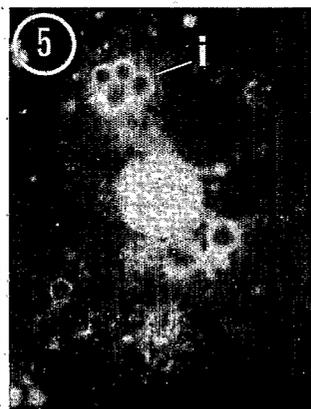
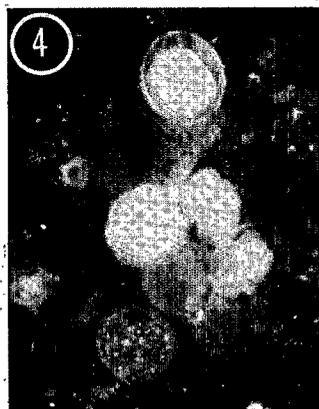
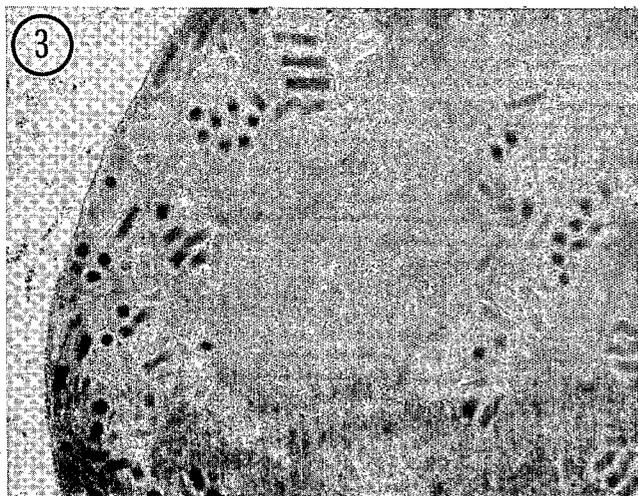
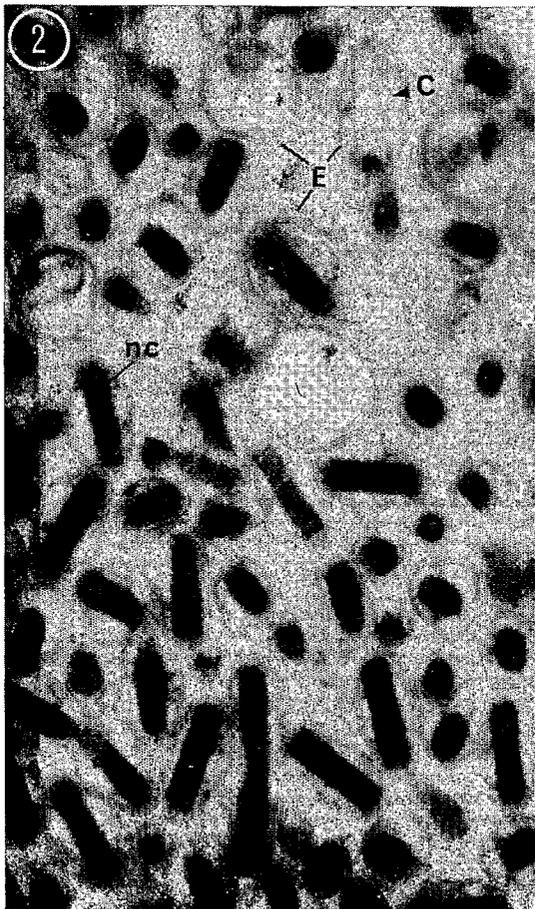
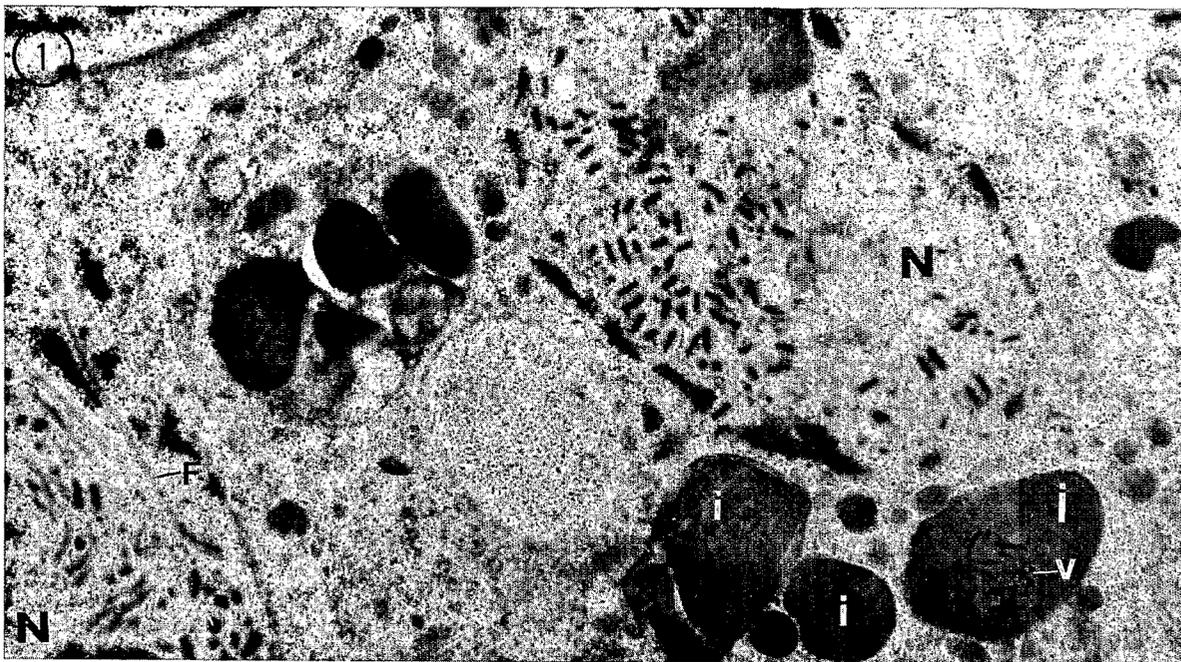
La membrane nucléaire est épaissie et désorganisée. Dans la plupart des cellules infectées dans le cytoplasme on observe des virions isolés (fig. 1) ou groupés. Ce groupement peut avoir lieu dans des structures membranaires renfermant en même temps d'autres éléments.

Une localisation particulièrement intéressante a été mise en évidence : l'inclusion des virions dans un matériel dense aux électrons (fig. 1). Il s'agit de corps mesurant jusqu'à 10 μ , à contours précis, composés d'une substance dense à structure homogène. Dans ces corps, la répartition des virions est irrégulière et leur nombre variable (fig. 3). On observe même de tels corps cytoplasmiques ne présentant aucun virion dans le plan de la coupe (fig. 1).

Ces corps d'inclusion ont été observés en microscopie électronique en plus ou moins grand nombre dans le tissu adipeux, les gaines ovariennes, la paroi interne et la spermathèque et les cellules de l'intestin moyen. En comparant ces descriptions avec celles faites en histologie on peut rapprocher ces corps de certaines inclusions

EXPLICATION DE LA PLANCHE

- Fig. 1. — Gaine ovarique d'*Oryctes rhinoceros* adulte. Micr. élect. ; F, filaments ; i, corps d'inclusion cytoplasmiques ; N, noyau ; v, virions (G \times 21 000).
 Fig. 2. — Fragment de noyau de cellule de l'intestin moyen de larve de 3^e stade. Micr. élect. ; E, enveloppe ; c, capsid ; nc, nucléocapsid (G \times 84 400).
 Fig. 3. — Fragment d'un corps d'inclusion cytoplasmique contenu dans une cellule de la paroi de la gaine ovarique. Micr. élect. (G \times 42 000).
 Fig. 4 et 5. — Immunofluorescence des cellules intestinales de larve de 3^e stade. — Fig. 4 : Présence d'antigène dans les noyaux. — Fig. 5 : Révélation des corps d'inclusion (i).



cellulaires réfringentes prenant la coloration de Vago-Amargier et dont la taille, la forme et la localisation correspondent aux leurs. Ces corps sont susceptibles de représenter aussi certaines des inclusions remarquées par Marschal (7) en microscopie photonique.

La technique d'immunofluorescence permet la mise en évidence de parenté antigénique entre le virus d'*Oryctes* et celui de la granulose de *Mamestra oleracea* L. Le sérum préparé en injectant à un lapin les granules entiers de *M. oleracea* révèle la présence d'antigènes localisés dans les cellules d'*Oryctes* infectés. La fluorescence est soit nucléaire, soit s'étend à toute la cellule (*fig. 4*). Elle est observée dans les cellules de l'intestin et dans les débris cellulaires présents en fin de maladie dans la lumière intestinale.

Cette technique permet également la mise en évidence de corps cytoplasmiques mesurant de 1 à 10 μ , chez les *Oryctes* malades (*fig. 5*). Ces corps sont non seulement révélés par le sérum anti-granule de *M. oleracea*, mais par divers autres sérums anti-*Baculovirus* et même par un sérum anti-*Rickettsiella melolonthae*. L'antigène ainsi décelé est de ce fait différent de celui défini par le sérum anti-granule de *M. oleracea* dans le noyau des cellules infectées.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Les observations décrites dans cette Note apportent des faits nouveaux concernant d'une part l'ultrastructure de ce virus encore mal connu, sa position systématique et d'autre part la pathogenèse de la maladie et ses répercussions épizootologiques.

D'après les éléments dégagés par la microscopie électronique de haute résolution, le virion a une partie centrale en forme de bâtonnet laissant parfois apparaître une structure spiralée. Cet élément peut être considéré comme la nucléocapside, les filaments tubulaires de même diamètre étant des capsides vides. Cet ensemble est entouré d'une enveloppe à double feuillet. L'espace entre la nucléocapside et l'enveloppe est variable en fonction du développement du virion et contient une substance amorphe moyennement dense aux électrons. Cette structure, à l'échelle de la virologie comparée, est proche de celle des *Baculovirus* (8) et l'interprétation donnée des divers constituants structuraux correspond à celle acceptée dans les plus récentes publications concernant ce groupe de virus [(9), (10)].

La parenté antigénique constatée entre l'agent de la granulose de *M. oleracea* et ce virus permet de rapprocher davantage le virus d'*Oryctes* du genre précité. Le sérum de *M. oleracea* reconnaît de nombreuses polyédroses et granuloses (11); compte tenu du mode d'immunisation, les déterminants antigéniques communs peuvent intéresser plusieurs constituants viraux.

La présence de longs filaments d'origine virale (*fig. 1*) rappelle ce qui a été observé dans les granuloses (9) et les polyédroses (10). La disparition de la membrane nucléaire, à la suite de l'infection virale, et l'accumulation des virions dans le cytoplasme paraissent des processus voisins de ceux observés dans les granuloses. Enfin, le travail de Gouranton (12) sur un virus de type probablement voisin, chez un Coléoptère, a mis en évidence une intense synthèse d'ADN pendant la multiplication virale.

Nous pensons ainsi que le virus d'*Oryctes* doit être classé dans les *Baculovirus*. Toutefois, la diversité des tissus atteints par la maladie, la localisation cytoplasmique et la nature des corps d'inclusion s'opposent à l'introduction de ce virus dans l'un des deux sous-groupes actuellement établis. Il paraît opportun de réunir ce virus avec celui de *Gyrinus natator* ⁽¹²⁾ dans un nouveau sous-groupe.

Certaines observations présentées dans cette Note apportent des éléments fondamentaux pour l'explication de l'influence de la virose sur les populations d'*Oryctes*. En effet, l'un des problèmes les plus importants posés après l'introduction du virus dans les biotopes où il n'existait pas (îles Wallis p. ex.), est la diffusion extrêmement rapide de la maladie. En outre, la présence de larves infectées dans des gîtes situés au sommet de stipes de cocotiers morts, avait fait pressentir un transport par les adultes. La mise en évidence en microscopie électronique du développement du virion dans les cellules intestinales des adultes jointe à la desquamation de telles cellules indique la possibilité de dissémination du virus à partir du tube digestif. Ces observations pourraient expliquer, en partie, les modifications de la qualité des dégâts des adultes sur cocotiers, ainsi que l'importance des transferts de populations vers de nouveaux biotopes ⁽⁶⁾. L'émission de virus dans les déjections de larves de 3^e stade peut assurer, en outre, dans les cas de maladie à évolution lente, le maintien d'un taux de contamination élevé à l'intérieur des gîtes larvaires.

Enfin, l'observation d'un taux d'éclosion relativement faible et d'une forte mortalité chez des néonates présentant les symptômes de la virose, plaide en faveur d'une contamination de l'œuf. Les résultats des études ultrastructurales sur les organes reproducteurs, permettent de penser que la contamination de l'œuf avant la ponte est possible.

L'ensemble de ces éléments concourt à la compréhension de la potentialité épizootiologique de ce virus dont l'extension et le maintien dans les populations paraissent peu compatibles avec sa faible rémanence.

(*) Séance du 5 mars 1973.

Ce travail a pu être réalisé grâce à la mise à notre disposition de matériel vivant de la part de la Commission du Pacifique Sud et de la Station de Lutte Biologique INRA de La Minière.

- (1) Avec la collaboration de M. J. L. Duthoit et de M^{lle} Y. Serre.
- (2) A. HUGER, *Naturwissensch.*, 52, 1965, p. 542.
- (3) C. HAMMES, *Comptes rendus*, 273, Série D, 1971, p. 1048.
- (4) Rapports semestriels du projet *Oryctes* de la CPS, Apia (Samoa).
- (5) A. HUGER, *J. Invert. Pathol.*, 8, 1966, p. 38.
- (6) P. MONSARRAT, Rapport ORSTOM, 1972.
- (7) K. J. MARSCHALL, Rapports projet CPS et FSNU/CPS, *Oryctes*.
- (8) P. WILDY, *Monographs in virology*, 5, 1971.
- (9) M. D. SUMMERS, *J. Ultrast. Res.*, 35, 1971, p. 606.
- (10) K. M. HUGHES, *J. Invert. Pathol.*, 19, 1972, p. 198.
- (11) G. CROIZIER et G. MEYNADIER (sous presse).
- (12) J. GOURANTON, *J. Ultrast. Res.*, 39, 1972, p. 281.

Station de Recherches Cytopathologiques,
INRA, CNRS, 30380 Saint-Christol ;
Services Scientifiques Centraux ORSTOM,
route d'Aulnay, 93140 Bondy.