

ÉTUDE DE L'ACTION PATHOGÈNE ÉVENTUELLE DU *BACULOVIRUS D'ORYCTES* POUR LE PORC

J.-M. GOURREAU, CLAUDE KAISER, MARCELLE LAHELLEC, L. CHEVRIER
et P. MONSARRAT

Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires
22, rue Pierre-Curie, 94703 Maisons-Alfort, France

Station de Recherche de Pathologie Comparée I.N.R.A.-C.N.R.S.
30380 Saint-Christol, France

Centre ORSTOM d'Adiopodoume, B.P. V51, Abidjan, Côte-d'Ivoire

Après avoir étudié l'action du *Baculovirus d'Oryctes* sur cultures cellulaires de vertébrés en lignée continue, en particulier sur cellules rénales de porc, nous avons cherché à confirmer l'innocuité observée en effectuant des tests de pathogénie sur l'animal vivant en lui administrant le virus soit par intubations gastriques, **uniques ou répétées**, soit par injections intrapéritonéales répétées. Ces observations confirment les résultats obtenus sur les lignées cellulaires.

L'utilisation en lutte biologique d'un virus isolé (HUGER, 1964) du coléoptère *Oryctes rhinoceros* L. dans le cadre d'une action F.A.O. a permis une remarquable maîtrise du niveau des populations de ce ravageur. Les résultats obtenus sur le terrain par MARSCHALL (1970), BEDFORD (1973), ZELAZNY (1973), HAMMES (1974) et MONSARRAT (1974), montrent que, dans de nombreux cas, les populations d'*Oryctes* sont maintenues en dessous du seuil de nuisibilité. Ces essais, qui confirment la potentialité d'utilisation à grande échelle de ce virus en tant qu'arme biologique, ont rendu nécessaire, suivant les principes préconisés par l'Organisation mondiale de la santé, la recherche de son éventuel pouvoir pathogène pour des vertébrés.

Après avoir abordé cette étude *in vitro* sur cultures cellulaires de vertébrés en lignée continue, puis l'avoir poursuivie *in vivo* chez la souris, nous avons établi des séries de tests sur le porc.

Nous avons entrepris cette étude sur cette espèce animale, en considérant que le porc est l'une des espèces de vertébrés qui peut se trouver, par son mode de vie, en contact dans certaines régions avec le virus par l'intermédiaire des larves ou des adultes d'*Oryctes* infectés. En effet, ces animaux, qui sont utilisés pour la consommation humaine, vivent à l'état semi-sauvage dans les zones peuplées par *Oryctes* et sont en particulier très friands des larves de ce coléoptère.

D'autre part, les Suidés sont après les Simiens, les animaux qui sont le plus proche de celle de l'homme.

O.R.S.T.O.M.

Fonds Documentaire
N°: 81/19/000.64 ex 1
Cote 1 [] 10
Date 1 [] 26 MARS 1981

En l'absence de directives normalisées quant au choix des tests à effectuer sur cette espèce animale, nous nous sommes inspirés des propositions de l'United States Environmental Protection Agency pour l'évaluation de la sécurité d'emploi des agents microbiens aux États-Unis d'Amérique (Anonyme, 1973), des protocoles suivis par l'Insect Pathology Laboratory des États-Unis pour les essais d'innocuité des entomovirus (Anonyme, 1973), et d'un rapport relatant les tests de toxicité pour les mammifères du virus de la polyédrose nucléaire de *Choristoneura fumiferana* Clem. (CUNNINGHAM, 1975).

Cette étude a été conduite d'une manière analogue à celle que nous avons réalisée chez la souris. Le virus a été administré par voie orale à l'aide d'intubations gastriques, de façon unique ou répétée, et par voie parentérale sous forme d'injections intrapéritonéales répétées.

Les examens effectués ont consisté d'une part en une surveillance clinique et hématologique régulière des animaux tout au long de l'expérience et d'autre part, après sacrifice des animaux, en l'analyse anatomo-pathologique des organes et la recherche du virus dans ceux-ci à l'issue de l'expérimentation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL

Virus

Le virus a été produit sur larves du 3^e stade d'*Oryctes* et purifié en gradient de saccharose selon une technique précédemment décrite par MONSARRAT *et al.* (1973), MONSARRAT & VEYRUNES (1976).

Le virus a été suspendu en tampon phosphate 10^{-3} molaire, pH 8,5, additionné de 12 % de saccharose afin de limiter l'agrégation due à un pH plus acide. Le caractère infectieux du virus a été contrôlé périodiquement par inoculation de suspensions virales diluées à des larves d'*Oryctes*. Le titre des suspensions virales utilisées est de 10^7 DL/50/ml pour les larves de 2^e stade.

Sérum spécifique anti-virus

Le sérum a été préparé sur lapin par injection intramusculaire de virus purifié mélangé à de l'adjuvant complet de Freund, injection suivie 45 j plus tard de 3 rappels hebdomadaires d'antigène dépourvu d'adjuvant. Les animaux sont saignés 10 j après la dernière injection (CROIZIER & MONSARRAT, 1974).

Larves d'Oryctes infectées

Des larves d'*Oryctes* au 2^e et 3^e stades, élevées à la Station de recherche de lutte biologique de la Minière (I.N.R.A.), ont été infectées expérimentalement par inoculation dans l'hémolymphe de 0,05 ml d'une suspension virale titrant 10^7 DL/50. Après une période de multiplication virale de 10 à 30 j, ces larves ont servi de complément alimentaire aux porcs qui recevaient le virus par la voie orale.

Porcs

Les porcs utilisés étaient des animaux de 25 kg environ de race Large White, provenant d'un élevage de Bretagne sous surveillance sanitaire stricte. Groupés en lots aussi homogènes que possible, ils ont été élevés pendant toute la durée de l'expérience sur paille dans des loges isolées, nourris avec des aliments industriels (granulés fabriqués à partir

de mélasse, issues de germes de blé, tourteaux et composé minéral vitaminé), qui leur ont été distribués à satiété, ainsi que l'eau de boisson.

MÉTHODES

Prélèvements et conservation des organes et du sang

A l'issue de l'expérience, les porcs sont anesthésiés, saignés puis autopsiés. Les organes prélevés sont les suivants : cœur, poumon, foie, vésicule biliaire, estomac, intestin grêle, pancréas, cerveau, muscle, rein, glandes surrénales, rate, gonades, vessie, ganglions mésentériques et inguinaux. Un fragment de chacun de ces organes est fixé dans du liquide de Dubosq. D'autres, destinés à l'étude en immunofluorescence, sont conservés à -20°C .

Le sang, prélevé par ponction de la veine jugulaire au vacutainer, est recueilli sur anti-coagulant (E.D.T.A.) pour numération globulaire (hématies et leucocytes) et formule sanguine. Les dénombrements ont eu lieu à l'aide d'un appareil électronique et l'étude des formules sanguines après coloration selon la technique de May Grunwald-Giemsa.

Préparation des coupes

Après 14 h de fixation, les fragments d'organes sont déshydratés à l'éthanol, inclus dans la paraffine avant d'être coupés en rubans de $5\ \mu$ d'épaisseur, et colorés à l'hémalum-éosine-safran.

Les fragments d'organes conservés à -20°C sont coupés au cryostat. Les coupes, de $3\ \mu$ d'épaisseur, fixées à l'acétone à -20°C sont mises en contact pendant une demi-heure à 37°C en atmosphère humide avec le sérum anti-Oryctes dilué au 1/50.

Après un lavage rapide à l'eau courante, les coupes sont mises en contact pendant une 1/2 h à 37°C en atmosphère humide avec du sérum fluorescent antiglobulines de lapin (1), dilué au 1/100. Après 1 h de lavage à l'eau courante, elles sont montées dans de la glycérine tamponnée à pH 7,8 et examinées en lumière ultra-violette.

Protocoles expérimentaux

Intubation gastrique unique. L'expérience, conduite pendant 30 j, a porté sur 6 animaux ayant ingéré le virus et 4 témoins.

Avant l'intubation, les animaux sont pesés, leur température rectale est relevée. Une prise de sang précède l'administration du virus :

— d'une part, sous la forme d'une suspension virulente (25 ml), par intubation gastrique à l'aide d'une sonde métallique ;

— d'autre part, sous forme de larves d'Oryctes infectées additionnées à leur nourriture à raison de 6 larves par porc, ceci pour se rapprocher des conditions naturelles.

Les témoins ont reçu chacun 6 larves d'Oryctes non infectées et 25 ml du milieu de dilution du virus.

Les jours suivants ont lieu quotidiennement une observation clinique, une prise de température et hebdomadairement une pesée et une prise de sang sur chacun des animaux.

Deux inoculés et un témoin sont sacrifiés le 3^e et le 30^e jour après l'administration du virus, un inoculé et un témoin, le 7^e jour et le 15^e jour.

(1) Commercialisé par l'Institut Pasteur - Paris.

Intubation gastrique répétée. L'expérience, conduite pendant 60 j, a porté sur 18 animaux parmi lesquels 12 ont reçu le virus et 6 ont servi de témoins.

Pendant 21 j, après avoir relevé la température et le poids des animaux et effectué une prise de sang, ils reçoivent quotidiennement chacun, par intubation à l'aide d'une sonde œsophagienne métallique, 10 ml d'une suspension virale pour les porcs d'expérience et 10 ml de milieu de dilution du virus pour les témoins.

Les observations sont identiques à celles de l'expérience précédente.

Les animaux sont sacrifiés les 3^e, 7^e, 15^e, 21^e, 30^e et 60^e j après l'administration initiale de virus à raison de 2 inoculés et 1 témoin à chaque fois.

Injection intrapéritonéale répétée. Le nombre des animaux et la durée de l'expérience sont identiques à ceux de l'intubation gastrique répétée, mais le virus a été inoculé par voie parentérale au niveau de la ligne blanche, sous l'ombilic. Quatre inoculations ont été effectuées chacune à 7 j d'intervalle, à la dose de 1 ml de suspension virulente pour les animaux du lot expérimental et 1 ml du milieu de dilution pour les témoins.

Les observations cliniques et les prélèvements de sang sont semblables à ceux de l'expérience précédente.

Deux porcs inoculés et un témoin sont sacrifiés les 15^e et 21^e j après la première administration de virus, 4 inoculés et 2 témoins les 30^e et 60^e j.

RÉSULTATS

EXAMEN CLINIQUE

L'inoculation du virus n'a été suivie d'aucun choc apparent lors des intubations gastriques, malgré les traumatismes pouvant résulter de la contention ou de l'intervention.

Les prélèvements sanguins, délicats à réaliser chez cette espèce animale, ont en général été bien tolérés, à l'exception d'un porc de la 2^e expérience qui est mort d'un choc vagal lors de la 7^e prise de sang.

Une enzootie de toux de porcherie s'accompagnant de gastro-entérite s'est déclarée chez les animaux des 2 premières expérimentations, sans élévation thermique ni anorexie notables.

Un porc témoin est mort accidentellement au cours de la 2^e expérimentation d'une hernie abdominale consécutive à un traumatisme.

Une prostration passagère a été notée chez 2 animaux témoins au cours de la 3^e expérimentation.

Les courbes de température, établies pour chacun des animaux, ne laissent apparaître aucune manifestation anormale. Les pesées hebdomadaires individuelles des animaux et leurs valeurs moyennes par lots ont permis d'établir une courbe de croissance pour chacun des lots en utilisant l'écart quadratique moyen des valeurs obtenues. Aucune différence significative entre les 2 courbes n'a pu être notée.

EXAMEN NÉCROPSIQUE

Les lésions relevées siègent essentiellement au niveau du poumon qui présentait chez certains animaux des zones congestives avec pétéchies du foie, sur lequel nous avons

relevé des décolorations du parenchyme et une hypertrophie des ganglions mésentériques. Ces lésions, observées sur 25 % des animaux environ, se retrouvaient dans les 3 séries d'expériences aussi bien chez les témoins que chez les animaux qui avaient reçu le virus.

Des lésions moins fréquentes des reins (pétéchies, décolorations du parenchyme), des ovaires (kystes), de l'intestin grêle (hémorragies punctiformes, entérite avec présence d'*Ascaris suum* GOEZE), affectaient quelques animaux témoins et traités.

Un des porcs inoculé au cours de la dernière expérience a présenté des lésions pulmonaires purulentes. Un staphylocoque pathogène et un *Escherichia coli* ESCH. ont été isolés. La rate d'un autre porc inoculé de cette série présentait des infarctissements analogues aux lésions de la peste porcine classique. La recherche du virus de la peste a été négative.

EXAMEN HISTOLOGIQUE DES ORGANES

Les examens microscopiques confirment les observations constatées à l'autopsie. Les principales lésions anatomopathologiques relevées siègent au niveau du foie et sont de deux ordres :

— D'une part de petits infiltrats lympho-histiocytaires discrets, non systématisés et restant en nombre limité, retrouvés chez de nombreux sujets, quels que soient le mode d'inoculation et la date du sacrifice. Ces lésions peuvent vraisemblablement être d'origines diverses, toxique, bactérienne ou alimentaire et sans grande signification ; elles ont du reste été notées chez un témoin présentant une cholécystite importante.

Elles peuvent toutefois aussi être considérées comme les stades initiaux de lésions plus considérables observées à l'examen histologique d'animaux dont l'examen nécropsique avait révélé une décoloration du parenchyme hépatique. Elles se présentent alors sous forme d'infiltrats prédominants au niveau du centro-lobule qui s'insinuent, en les comprimant, entre les travées de Remak ; ils sont constitués principalement de cellules lympho-histiocytaires avec parfois quelques polynucléaires neutrophiles. Ces lésions indiquent une hépatite interstitielle. Les hépatocytes ne montrent aucun signe de dégénérescence, sauf ceux qui, comprimés par les infiltrats, présentent un cytoplasme coagulé. Les capillaires sinusoides sont légèrement congestifs, les cellules de Kupffer irritées, même à distance des foyers. Il n'y a pas de cirrhose, pas de surcharge en pigments biliaires, pas d'inclusions virales caractéristiques, nucléaires ou cytoplasmiques. Ces infiltrats lympho-histiocytaires ont été rencontrés au 15^e et 21^e j après administration de virus par voie intrapéritonéale répétée, mais aussi au 21^e j et au 60^e j, chez les sujets ayant subi une intoxication gastrique répétée. Mais il faut noter qu'ils ont aussi été observés au 21^e j chez un témoin, avec la même intensité.

Dans les poumons de quelques porcs témoins et inoculés, on a noté des altérations histopathologiques aiguës correspondant aux lésions macroscopiques et ceci principalement chez les intubés gastriques. Il s'agit soit d'infiltrats à polynucléaires collectés en abcès, soit de légions disséminées de bronchopneumonie, de congestion ou d'alvéolite. Les quelques lésions macroscopiques rénales correspondent à une néphrite interstitielle. Les zones congestives notées dans l'intestin et le pancréas sont le témoin macroscopique d'une inflammation aiguë à polynucléaires.

Les surrénales, la rate, les muscles, le myocarde et l'encéphale n'ont pas montré d'altération histologique.

IMMUNOFLUORESCENCE

Des plages de fluorescence non spécifique ont été décelées au niveau du cerveau, de l'estomac et de l'intestin des animaux témoins et inoculés des 3 expérimentations.

En revanche 4 animaux ayant reçu le virus par la voie intrapéritonéale ont présenté des plages de fluorescence dans quelques organes : poumon, pancréas, rate et cœur. Mais des plages identiques ont pu être relevées dans le muscle et la rate de l'un des témoins.

Aucune relation n'a pu être établie entre ces observations et les lésions histologiques rapportées ci-dessus.

Le foie, la vésicule biliaire, le rein, les surrénales, les gonades, la vessie et les ganglions n'ont pas présenté de fluorescence.

EXAMENS HÉMATOLOGIQUES

Sur chaque prélèvement, une formule leucocytaire portant sur 200 éléments et 3 numérations globulaires a été réalisée. Les moyennes de ces numérations n'ont permis de relever aucune différence significative entre les témoins et les traités. Il en a été de même pour les comparaisons des numérations et formules effectuées pendant la durée de l'expérience sur chacun des animaux.

Les valeurs relatives aux lymphocytes, cellules les plus aptes de par leur fonction à pouvoir présenter des modifications dans leur nombre au cours d'une infection virale, ont été examinées d'un point de vue statistique pour rechercher une variation éventuelle de leur nombre entre les animaux ayant reçu le virus et les témoins par comparaison des moyennes à l'aide du *t* de Student à 95 % de probabilité. Aucune différence significative n'est apparue entre les animaux.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les symptômes et lésions, aussi bien macroscopiques que microscopiques relevés au cours des expériences ne semblent pas, dans leur ensemble, imputables au virus d'*Oryctes*, car ils siègent aussi bien chez les animaux qui ont reçu le virus que chez les témoins : l'enzootie de « toux de porcherie » observée cliniquement retentit sur l'appareil respiratoire ce qui explique les lésions pulmonaires et certaines adénites. La confirmation en est apportée par l'examen hématologique : chez les animaux atteints, on a pu, en effet, relever une légère hyperleucocytose. L'entérite et l'adénite mésentérique peuvent être expliquées par la présence d'*ascaris*, parfois en assez grand nombre, dans le tractus intestinal. Cependant, dans la 3^e expérience en particulier, le parasitisme digestif ne suffit pas à expliquer la totalité des signes pathologiques observés. Ceux-ci peuvent être rapportés à des erreurs de conduite de notre élevage : l'alimentation à base de concentrés distribués à volonté peut expliquer les diarrhées ; par ailleurs l'espace concentrationnaire favorise les luttes entre animaux d'où l'origine des traumatismes.

Quant aux quelques lésions observées sur la partie antérieure du tube digestif chez les porcs intubés, à la fois chez les animaux traités et les témoins, elles peuvent être expliquées par les traumatismes résultant du mode d'administration du virus.

Toutefois des lésions histologiques du foie se révèlent aussi bien chez les sujets inoculés par voie intrapéritonéale que chez ceux ayant reçu le virus par intubation gastrique répétée. Ces lésions, à type d'hépatite interstitielle, ne sont certes pas des images pathognomoniques de l'atteinte hépatique par le virus expérimenté, puisqu'elles ont pu être observées chez un témoin. Elles se retrouvent cependant avec une fréquence et une intensité suffisantes pour qu'il semble que ce virus ne soit pas totalement dénué de danger pour le parenchyme hépatique.

L'objet de cette étude était de rechercher l'éventuel pouvoir pathogène du virus d'*Oryctes* chez le porc. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas cherché à déceler sa présence par inoculation du broyat des différents organes à des larves d'*Oryctes* ou à des cellules d'insecte en culture. De même nous ne nous sommes pas attachés à rechercher la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum des porcs ayant reçu le virus.

Les résultats obtenus confirment les études d'approche réalisées par inoculation du virus à des cultures cellulaires de rein de porc en lignée continue : les tentatives infructueuses de multiplication du virus, effectuées sur ces cellules à différentes températures (29°C et 37°C) et pendant des temps différents (48 h et 8 j) laissent supposer son innocuité pour le porc domestique.

SUMMARY

Pathogenicity tests of *Oryctes Baculovirus* on swine

Pathogenicity tests of *Oryctes Baculovirus* on adult pigs were carried out by contamination through different routes including unique and repeated gastric intubations and repeated intraperitoneal injections. The virus appeared to be devoid of pathogenic effect with the exception of hepatic parenchyme where lesions could be observed. These results confirm our previous studies on the safety of this virus toward different vertebrate cell lines, including pig kidney cells.

BIBLIOGRAPHIE

- ANONYME. — 1973. The use of viruses for the control of insects pests and disease vectors. — Études agricoles de la FAO, rapport n° 91, OMS rapport technique n° 531.
- BEDFORD, G. O. — 1973. Experiments with the virus *Rhabdionvirus oryctes* against the coconut palm rhinoceros beetles *Oryctes*, *Scapanes australis grossepunctatis* in New Guinea. — *J. Invertebr. Pathol.*, 22, 70-74.
- CROIZIER, G. & MONSARRAT, P. — 1974. Diagnostic d'une virose du coléoptère *Oryctes rhinoceros* L. — *Entomophaga*, 19, 1, 115-116.
- CUNNINGHAM, J. C. — 1975. Mammalian toxicity tests of the nuclear polyhedrosis virus of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana*. — *Insect Pathol. Res. Inst.*, Sault Ste Marie, Ontario, Canada, 341 pp. (Ronéotypé).
- HAMMES, C. — 1974. Étude de l'action de *Rhabdionvirus oryctes* (HUGER) sur les populations d'*Oryctes rhinoceros* L. à l'île Wallis. — *Cah. ORSTOM, Ser. Biol.*, 22, 45-91.
- HUGER, A. M. — 1966. A virus disease of the Indian rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* (LINNAEUS) caused by a new type of insect virus *Rhabdionvirus oryctes*, gen. n., sp. n. — *J. Invertebr. Pathol.*, 8, 38-51.
- MARSCHALL, K. J. — 1970. Introduction of a new virus disease of the coconut rhinoceros beetle in Western Samoa. — *Nature*, 225, 288-289.
- MONSARRAT, P. — 1974. Recherches sur *Oryctes rhinoceros* L. Comparaison du niveau des dégâts causés aux cocotiers par *Oryctes rhinoceros* L. avant et après l'introduction de *Rhabdionvirus oryctes* à Wallis. — *Cah. ORSTOM, Ser. Biol.*, 22, 91-111.
- MONSARRAT, P., VEYRUNES, J. C., MEYNADIER, G., CROIZIER, G. & VAGO, C. — 1973. Purification et étude structurale du virus du coléoptère *Oryctes rhinoceros* L. — *C. R. Acad. Sci. Paris, D*, 277, 1413-1415.
- MONSARRAT, P. & VEYRUNES, J. C. — 1976. Evidence of *Oryctes* virus in adult feces and a new data for the virus characterization. — *J. Invertebr. Pathol.*, 27, 387-389.
- ZELAZNY, B. — 1973. Studies on *Rhabdionvirus oryctes*. Effect on larvae of *Oryctes rhinoceros* and inactivation of the virus. — *J. Invertebr. Pathol.*, 20, 235-241.