

VIROLOGIE DES INVERTÉBRÉS. — *Purification et étude structurale du virus du Coléoptère Oryctes rhinoceros L.* Note (*) de MM. Pierre Monsarrat, Jean-Claude Veyrunes, Gérard Meynadier, Guy Croizier et Constantin Vago, Membre de l'Académie.

Le virus d'*Oryctes* a été purifié à partir de plusieurs organes de larves et d'adultes contaminés. L'acide nucléique du virus s'est révélé être un ADN. Des caractères structuraux de l'enveloppe et de la nucléocapside ont été mis en évidence en coloration négative.

Nous avons développé dans deux Notes récentes [(¹), (²)] l'étude de la pathogénèse et du cycle intracellulaire d'un virus observé au cours d'une maladie du Coléoptère *Oryctes rhinoceros* L., décrite en Malaisie [(³), (⁴)]. Les essais d'emploi de ce virus dans la lutte biologique contre ce ravageur du cocotier [(⁵), (⁶)], confèrent un intérêt particulier à l'étude de cet agent pathogène dont la caractérisation est par ailleurs importante pour la virologie comparée.

En vue de cette caractérisation, il était avant tout indispensable d'obtenir le virus à l'état pur, et de définir ses propriétés ultrastructurales ainsi que la nature de son acide nucléique.

PURIFICATION DU VIRUS. — Le matériel infecté est obtenu à partir des intestins moyens de larves de début de 3^e stade et de différents tissus d'adultes contaminés *per os*. Ces organes sont broyés à 4 °C, en tampon phosphate M/500, pH 8,5, dont le Δt est ajusté à 0,90 °C par adjonction de saccharose. Le broyat est clarifié par deux centrifugations successives, respectivement de 10 mn à 1 000 g et de 45 mn à 5 000 g. Le surnageant est sédimenté à 20 000 g pendant 60 mn. Le culot obtenu, dispersé dans un tampon phosphate M/1 000, pH 8,5, contenant 12 % de saccharose, est déposé sur gradient de saccharose 15-50 % de pH 8,5 qui est centrifugé pendant 3 h à 72 000 g.

La bande contenant le virus se situe au niveau correspondant à environ 40 % de saccharose.

La purification est achevée en répétant les séries de centrifugations avec la bande contenant le virus.

Ces précautions particulières ont été nécessaires à cause de la fragilité du virus et de sa tendance à l'agrégation, notamment en fonction des conditions de pH et de pression osmotique.

Au microscope électronique, le virus est observé après coloration négative par une solution de molybdate d'ammonium à 2 %, pH 7,2, dont le Δt est ajusté à 0,90 °C par adjonction d'acétate d'ammonium.

Dans la bande à 40 % de saccharose, et après plusieurs passages sur gradients, le virus a été obtenu à un degré de pureté satisfaisant (*fig. 1*), pour une caractérisation de l'acide nucléique. En effet, cette bande renferme uniquement des virions de forme et de taille homogènes ne présentant que de faibles différences individuelles précisées plus loin.

26 NOV. 1973

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

Collection de Référence

n° 6474 Cul. 1/30

CARACTÉRISATION DE L'ACIDE NUCLÉIQUE. — La suspension virale obtenue après centrifugation en gradient de densité est dialysée pendant 48 h contre deux fois 3 litres de tampon phosphate M/1 000, pH 7,8, contenant 1,5 % de chlorure de sodium. L'échantillon est ensuite incubé dans le même tampon avec de la ribonucléase à la concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$ à 4 °C pendant 2 h, puis avec de la désoxyribonucléase à la concentration de 80 $\mu\text{g/ml}$ en présence de chlorure de magnésium 0,002 M à 20 °C pendant 3 h. Ces opérations ont pour but d'éliminer les acides nucléiques libres pouvant contaminer les préparations.

La nature de l'acide nucléique viral a été recherchée par les méthodes colorimétriques. La réaction à l'orcinol selon Meijbaum (7), qui permet de déceler l'ARN, a donné un résultat négatif. Par contre, l'essai à la diphenylamine selon Giles et Myers (8) a été positif.

Ces résultats mettent en évidence la nature ADN du génome viral. L'étude quantitative et structurale de l'acide nucléique est en cours.

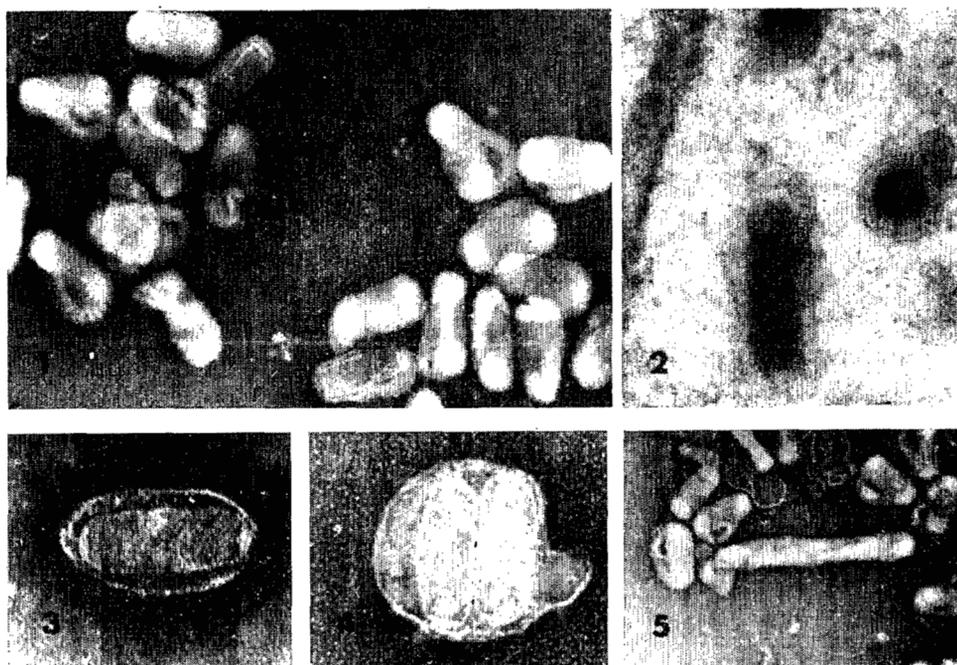


Fig. 1. — Particules virales purifiées à partir d'une larve d'*Oryctes rhinoceros* atteinte de la maladie de « Malaisie » [Micr. électr., col. nég. au molybdate d'ammonium ($G \times 58\ 000$)].

Fig. 2. — Coupe d'une cellule intestinale de larve. Virions présentant des élargissements latéraux et apicaux de l'enveloppe [Micr. électr. ($G \times 115\ 000$)].

Fig. 3. — Particule après dégradation progressive. Séparation de l'enveloppe et de la nucléocapside à extrémités épaissies [Micr. électr., col. nég. ($G \times 115\ 000$)].

Fig. 4. — Deux nucléocapsides dans une enveloppe [Micr. électr., col. nég. ($G \times 100\ 000$)].

Fig. 5. — Forme longue de virion parmi des particules de taille normale [Micr. électr., col. nég. ($G \times 35\ 000$)].

STRUCTURE DES VIRIONS. — Les particules obtenues par purification se présentent sous forme de bâtonnets assez trapus à extrémités arrondies, mesurant 110×235 nm en moyenne. Quelques particules exceptionnellement longues (2 ou

3 fois la longueur de la particule normale) ont été notées (*fig. 5*). Sur de nombreuses particules on observe un élargissement dissymétrique. Sur certaines particules cette irrégularité est accentuée, probablement par suite d'une légère altération superficielle. Un prolongement apical de l'enveloppe, replié latéralement, confère au virion un aspect caractéristique. Il est vraisemblable que cette particularité, limitée essentiellement à l'enveloppe, bien que révélée par les opérations de purification, constitue un caractère du virion. En effet, des figures d'élargissements latéraux et apicaux de l'enveloppe peuvent être reconnues sur coupes ultrafines sur certains virions observés *in situ* dans les noyaux cellulaires (*fig. 2*).

En provoquant une dégradation progressive des virions on peut distinguer au sein d'une enveloppe une nucléocapside en forme de bâtonnet droit. Dans quelques cas la présence de deux nucléocapsides au sein d'une même enveloppe a été notée (*fig. 4*). Les extrémités de la nucléocapside sont aplaties et épaissies et on distingue deux feuilletts superposés à cet endroit (*fig. 3*). Par cette méthode on peut également séparer nettement la nucléocapside de l'enveloppe et même obtenir des capsides isolées. Une structure à sous-unités peut être reconnue sur certaines capsides ainsi que sur certaines enveloppes.

CONCLUSIONS. — L'obtention de particules purifiées du virus d'*Oryctes* a permis la détermination de la nature de l'acide nucléique, ADN, élément essentiel de la caractérisation et de la classification des virus.

En même temps la purification a rendu possible l'étude des virions en coloration négative et, en utilisant le principe de la dégradation progressive, plusieurs particularités de l'enveloppe et de la nucléocapside ont pu être montrées. Ces éléments confirment une certaine analogie avec les Baculovirus tout en mettant en évidence des différences structurales par rapport à ce groupe.

Enfin, le fait de disposer de suspensions de virus purifiés ouvre directement la voie à l'étude sérologique et par conséquent à la mise au point du diagnostic essentiel pour la connaissance de l'écologie de cet agent potentiel de lutte biologique.

(*) Séance du 3 septembre 1973.

(1) P. MONSARRAT, G. MEYNADIER, G. CROIZIER et C. VAGO, *Comptes rendus*, 276, Série D, 1973, p. 2077.

(2) J. M. QUIOT, P. MONSARRAT, G. MEYNADIER, G. CROIZIER et C. VAGO, *Comptes rendus*, 276, Série D, 1973, p. 3229.

(3) A. M. HUGER, *Naturwissenschaften*, 52, 1965, p. 542.

(4) A. M. HUGER, *J. Invert. Pathol.*, 8, 1966, p. 38.

(5) C. HAMMES, *Comptes rendus*, 273, Série D, 1971, p. 1048.

(6) K. J. MARSCHALL, Rapports projet CPS et FSNU/CPS, *Oryctes*.

(7) W. MEJBAUM, *Z. Physiol. Chem.*, 258, 1939, p. 117.

(8) K. W. GILES et A. MYERS, *Nature*, 206, (4979), 1965, p. 93.

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