

# Un nouveau virus de granulose de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) isolé en Guyane française

D. DAUTHUILLE (1), G. CROIZIER (2), P. FERRON (3)

**RÉSUMÉ** — Un baculovirus responsable d'une granulose a été isolé chez la noctuelle *Spodoptera frugiperda* en Guyane française. L'analyse du génome de ce virus par les enzymes de restriction montre qu'il s'agit d'un virus différent de celui précédemment décrit sur le même hôte. L'estimation du poids moléculaire de son ADN est d'environ  $89 \times 10^6$  daltons. Afin de distinguer les deux virus de granulose de *S. frugiperda*, la dénomination SfGGV, G pour Guyane, est proposée pour le nouveau virus.

**Mots clés** : *Spodoptera frugiperda*, granulose, baculovirus, analyse du génome, Guyane.

La noctuelle *Spodoptera frugiperda* est considérée comme l'un des ravageurs principaux des cultures sur l'ensemble du continent américain. Les dégâts engendrés par cet insecte sont, certaines années, considérables. Aux Etats-Unis, MITCHELL (1979) estime à plus de 300 millions de dollars les pertes moyennes annuelles dues à cette noctuelle ; d'après SPARKS (1979), les pertes, pour le seul Etat de Géorgie, ont été en 1977 de 137,5 millions de dollars. En prairie guyanaise, les attaques de *S. frugiperda* se soldent par des pertes très importantes, préjudiciables à la bonne marche des exploitations. Depuis la première description d'une maladie à polyèdres chez l'insecte (CHAPMAN et GLASER, 1915), l'utilisation des virus entomopathogènes a été envisagée pour lutter contre ce ravageur. Jusqu'à présent, quatre virus, deux baculovirus responsables d'une polyédrose nucléaire et d'une granulose, un réovirus et récemment un ascovirus, ont été décrits chez l'espèce *S. frugiperda* (BERGOLD, 1963 ; HAMM *et al.*, 1985 ; IGNOFFO *et al.*, 1976 ; STEINHAUS, 1957). Un nouveau virus de granulose isolé de Guyane française est présenté dans cette note.

(1) Centre ORSTOM d'Adiopodoumé, BP U. 51, Abidjan, Côte-d'Ivoire.

(2) Station de recherches de pathologie comparée, INRA-CNRS, 30380 Saint-Christol-les-Alès, France.

(3) Station de recherches de lutte biologique, INRA, La Minière, 78280 Guyancourt, France.

## Matériel et méthodes

### Multiplication du virus

Le virus a été multiplié, après ingestion par des larves de *S. frugiperda* élevées sur milieu artificiel (POITOU et BUES, 1974). Deux populations virales ont été étudiées, la première, SfGV1, issue d'une multiplication unique, et la seconde, SfGV2, entretenue depuis quatre ans au laboratoire. Dans les deux cas, l'inoculum de départ était constitué d'une suspension purifiée de granules issus de larves récoltées sur le terrain en prairies à *Digitaria swazilandensis* Stent dans la région de Cayenne.

### Purification des granules

Les larves sont broyées à l'aide d'un broyeur mixer en tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 (tampon TP), en présence de SLS 0,1 % et de merthiolate 50 mg · l<sup>-1</sup>. Après filtration sur coton, le mélange est clarifié par une série de centrifugations. Les débris tissulaires et les grosses impuretés sont d'abord éliminés par un cycle à 2 000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est mis au culot, resuspendu en tampon TP, et centrifugé à trois reprises à 8 000 rpm pendant 10 min. Le culot final de granules est alors déposé sur gradient continu de sucre (40-60 %) et centrifugé à 30 000 rpm pendant 45 min. La bande de virus purifié est prélevée à l'aide d'une pompe péristaltique. Le sucre est éliminé par deux centrifugations à 20 000 rpm, 10 min, en tampon TP.

### Purification des virions

Les virions sont libérés par dissolution des corps d'inclusion en tampon TC, thioglycolate-carbonate de Na 0,125 M, pH 10,5. Les corps d'inclusion non digérés sont éliminés par une centrifugation à 8 000 rpm durant 5 min. Le surnageant est, après dépôt sur gradient continu de sucre (20-50 %), centrifugé à 18 000 rpm pendant 2 h. La bande de virions libres est prélevée et diluée en tampon TP M/20 et débarrassée du sucre par centrifugation à 25 000 rpm pendant 1 h. La pureté de la suspension est contrôlée par observation au microscope électronique après coloration à l'acide phosphotungstique à 1 % (BRENNER et HORNE, 1959).



## Extraction de l'ADN

L'ADN est libéré de la nucléocapside en tampon TC en présence de SLS ( $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) à  $60^\circ \text{C}$  pendant 15 min. La séparation de l'acide nucléique des protéines est réalisée par trois extractions phénoliques répétées. La phase aqueuse contenant l'acide nucléique est dialysée durant 24 h contre un tampon tris  $0,01 \text{ M}$ , EDTA  $0,001 \text{ M}$ , HCl pH 7,8. La pureté de la solution d'ADN est estimée par le calcul du rapport DO260/DO280 à partir des valeurs obtenues au spectrophotomètre. Un rapport de 1,8 atteste d'une bonne purification de la solution d'ADN.

## Analyse de l'ADN à l'aide d'enzymes de restriction

La digestion enzymatique est réalisée en 1 h à  $37^\circ \text{C}$  en tampon tris pH 7,5 (tris  $10 \text{ mM}$ ; NaCl  $50 \text{ mM}$ ;  $\text{MgCl}_2$   $10 \text{ mM}$ ; dithiothreitol  $6 \text{ mM}$ ) pour les enzymes *Eco* AI, *Bam* HI et *Hin* dIII. Le tampon d'attaque des endonucléases *Sma* I et *Sac* I était composé de tris  $6 \text{ mM}$ ;  $\text{MgCl}_2$   $6 \text{ mM}$ ; mercaptoéthanol  $60 \text{ mM}$ ; KCl  $80 \text{ mM}$ ; pH 8. L'arrêt de la réaction enzymatique est provoqué par ajout de 1 partie pour 9 d'une solution  $0,5 \text{ M}$  EDTA  $4 \text{ Na}$ , pH 7, contenant  $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  de bleu de bromophénol et 30 % de saccharose.

La migration des fragments d'ADN est réalisée en gel d'agarose sur cuve horizontale. Les gels d'une concentration en agarose de 0,8 % ont été préparés selon la technique décrite par KELLY (1977). Les électrophorèses ont été réalisées à la tension de 10 V durant 14 h. La présence des fragments d'ADN est mise en évidence après coloration au bromure d'éthydiu et révélée en lumière ultraviolette. L'analyse des électrophorégrammes ainsi que l'estimation du poids moléculaire du génome sont réalisées à partir du négatif d'une photographie instantanée du gel coloré. Deux ADN, digérés par l'enzyme de restriction *Eco* RI ont été utilisés comme référence pour l'estimation des poids moléculaires des différents fragments d'ADN générés. Il s'agit de l'ADN de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* (CROIZIER et QUIOT, 1981) et du phage Lambda coupé par *Eco* RI.

## Résultats et discussion

### Nombre de fragments du génome générés par les enzymes de restriction

La présence de bandes submolaires dans l'ensemble des électrophorégrammes réalisés atteste de l'hétérogénéité des populations de virus isolées. L'étude des seules bandes majeures permet cependant de définir dans ses grandes lignes les caractéristiques du génome du virus de la granulose de *S. frugiperda*.

L'endonucléase *Sma* I coupe la molécule d'ADN des deux populations virales étudiées en trois fragments

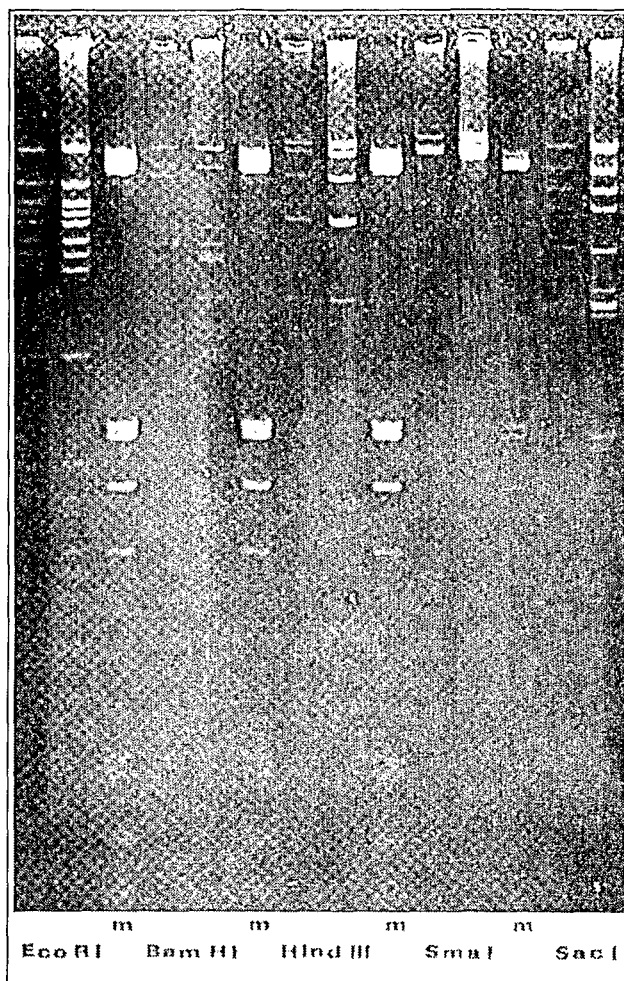


Figure 1 : Photographie de l'électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %) de l'ADN du virus de la granulose de *Spodoptera frugiperda* originaire de Guyane, après digestion par les enzymes de restriction *Eco* RI, *Bam* HI, *Hin* dIII, *Sma* I, et *Sac* I. La migration a été réalisée pour deux populations virales, *Sf*GV1 et *Sf*GV2, placée pour chaque enzyme, respectivement à gauche et à droite dans l'électrophorégramme. Le marqueur utilisé (m) au cours de l'électrophorèse est l'ADN du phage Lambda coupé par *Eco* RI.

de poids moléculaire supérieur à  $20 \times 10^6$  daltons (figure 1).

L'enzyme *Hin* dIII génère 14 fragments de poids moléculaire variant entre  $0,77$  et  $21 \times 10^6$  daltons.

Les électrophorégrammes obtenus après digestion par l'enzyme de restriction *Bam* HI font apparaître une différence entre les deux populations virales *Sf*GV1 et *Sf*GV2. Le *Sf*GV2 présente un site de restriction supplémentaire qui se traduit par l'apparition de deux bandes E et H à la place de la bande C du *Sf*GV1 (figure 2).

Après digestion de l'ADN par *Sac* I, 15 fragments sont obtenus. Les bandes GH et JK, respectivement de  $3,36 \times 10^6$  et  $5,16 \times 10^6$  daltons, comignent au cours des diverses électrophorèses réalisées.

L'endonucléase *Eco* RI génère 17 fragments d'un poids moléculaire compris entre  $0,75 \times 10^6$  et  $16,2 \times 10^6$  daltons.

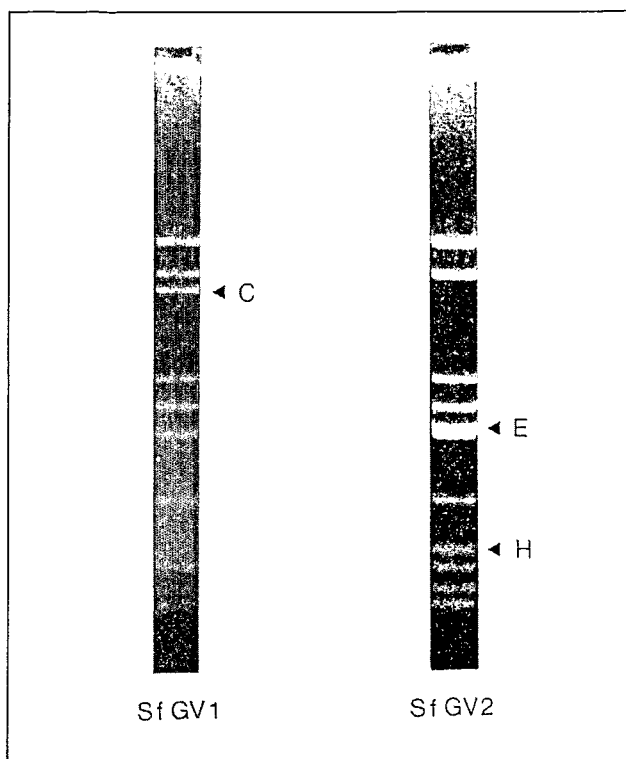


Figure 2 : Mise en évidence des différences entre les deux populations SfGV1 et SfGV2 de la granulose de *S. frugiperda* originaire de Guyane française. L'ADN du SfGV2 présente un site de restriction supplémentaire pour l'enzyme Bam HI. La bande C ( $8,8 \times 10^6$  daltons) du SfGV1 disparaît au profit de deux bandes E et H d'un poids moléculaire complémentaire dans le profil électrophorétique du SfGV2.

### Poids moléculaire du génome

Les différentes électrophorèses réalisées à l'aide des trois enzymes Bam HI, Hin dIII et Sac I donnent comme poids moléculaire moyen du génome de la granulose de *S. frugiperda* isolée de Guyane française les valeurs suivantes (tableau I) :

- Bam HI,  $90,33 \times 10^6$  daltons ;
- Hin dIII,  $85,79 \times 10^6$  daltons ;
- Sac I,  $92,91 \times 10^6$  daltons.

La meilleure estimation du poids moléculaire du génome est certainement donnée par les électrophorogrammes réalisés avec Eco RI, qui génère des fragments situés à l'intérieur du domaine couvert par les marqueurs choisis. L'estimation du poids moléculaire de la granulose de *S. frugiperda* originaire de Guyane française obtenue à partir de quatre électrophorèses est de  $88,83 \times 10^{-6}$  daltons ( $\pm 0,74 \times 10^6$ ).

Les électrophorogrammes obtenus au cours de la digestion enzymatique par Eco RI diffèrent de celui obtenu par SMITH et SUMMERS (1978). La valeur du poids moléculaire de ce nouveau virus est supérieure de  $10 \times 10^6$  daltons à celle donnée par les deux auteurs américains. L'hypothèse d'une délétion entre deux virus très semblables ne peut être envisagée en raison des différences très marquées observées entre les deux SfGV guyanais et américain.

Tableau I Poids moléculaire moyen des segments d'ADN du virus de granulose (SfGV) de *Spodoptera frugiperda*, obtenus après digestion par les enzymes de restriction Eco RI, Bam HI, Hin dIII et Sac I.

S	Poids moléculaire (en millions de daltons)			
	Eco RI	Hin dIII	Bam HI	Sac I
A	16,16	17	21	21
B	9,66	11	14	12
C	8,77	10	10,5	9,60
D	8,02	7,70	8,03	8,56
E	7,52	6,80	8,03	6,80
F	6,95	6,45	5,26	5,53
G	6,47	5,25	3,76	5,16
H	6,07	4,50	3,13	5,16
I	4,40	4,40	2,76	4,93
J	3,02	4,15	2,76	3,36
K	2,30	3,60	2,43	3,36
L	2,15	2,75	1,90	3,20
M	1,97	2,45	1,46	1,75
N	1,67	2,02	0,77	1,45
O	1,50	1,30		1,05
P	1,45	0,96		
Q	0,75			
Σ	88,83	90,33	85,79	92,91

S : symbole des segments d'ADN ou de bandes d'électrophorèse.

La présence de deux granuloses distinctes chez l'espèce *S. frugiperda* implique d'attribuer à chacun de ces virus une dénomination différente. Le nouveau virus de granulose pourrait être nommé SfGGV, par opposition au virus déjà décrit qui pourrait être baptisé SfUGV (U pour USA), suivant en ceci l'exemple rencontré chez l'espèce *Pseudaletia unipuncta* (HARVEY et TANADA, 1985).

Les résultats obtenus montrent combien le recours à l'analyse du génome par les enzymes de restriction est essentiel à la bonne définition des virus. La vérification des identités sérologiques ou génomiques des deux virus isolés d'un même hôte dans des zones géographiques différentes est d'autant plus nécessaire que la simple étude morphologique ou pathologique ne suffit pas à distinguer ces pathogènes. Ainsi, si dans le cas de *S. frugiperda* il se vérifie, après analyse du génome par les enzymes de restriction, que les polyédroses nucléaires isolées de Guyane française et de Guadeloupe ne diffèrent pas entre elles, aux particularités des différents isolats géographiques près, du virus déjà décrit (DAUTHUILLE, 1986 ; LOH *et al.*, 1981 ; MARUNIAK *et al.*, 1984), il n'en va pas de même pour la granulose. L'application systématique de cette technique à tout virus isolé permettrait sans nul doute la reconnaissance de souches pathogènes nouvelles. Cette étape de constitution d'un stock de virus utilisables et bien caractérisés est essentielle au développement de la lutte biologique par des entomopathogènes.

Reçu le 16 novembre 1987.  
Accepté le 5 février 1988.

## Références bibliographiques

BERGOLD G.H., 1963. Fine structure of some insect viruses. *J. Insect Pathol.*, 5 : 111-128.

BRENNER S., HORNE R.W., 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta*, 34 : 103-110.

BURGESS S., 1983. Eco RI restriction endonuclease fragment patterns of eight lepidopteran baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 42 : 401-404.

CHAPMAN J.W., GLASER R.W., 1915. A preliminary list of insects which have wilt, with a comparative study of their polyhedra. *J. Econ. Entomol.*, 8 : 140-149.

CRAWFORD A.M., SHEEHAN C., 1983. Persistent baculovirus infections : *Spodoptera frugiperda* NPV and *Autographa californica* NPV in *Spodoptera frugiperda* cells. *Arch. Virol.*, 78 : 65-79.

CROIZIER G., QUIOT J.M., 1981. Obtention and analysis of two genetic recombinants of baculoviruses of Lepidoptera, *Autographa californica* Speyer and *Galleria mellonella* L. *Ann. Virol.*, 132 : 3-10.

DAUTHUILLE D., 1986. Etude écopathologique de deux baculovirus pathogènes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lépidoptère : Noctuidae) en prairie guyanaise à *Digitalia swazilandensis* Stent. Thèse d'université, université de Paris VI, 197 p.

HAMM J.J., NORDLUND D.A., MARTI O.G., 1985. Effects of a nonoccluded virus of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) on the development of a parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera : Braconidae). *Environ. Entomol.*, 14 : 258-361.

HARVEY J., TANADA Y., 1985. Characterization of the DNAs of five baculoviruses pathogenic for the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 46 : 174-179.

IGNOFFO C.M., MARSTON N.L., PUTTLER B., HOSTETTER D.L., THOMAS G.D., BIEVER K.D., DICKERSON W.A., 1976. Natural biotic agents controlling insect pests of Missouri soybeans. In : Proceedings of the first World soybean research conference, Urbana, USA, 1974, p. 560-578.

KELLY D.C., 1977. The DNA contained by nuclear polyhedrosis viruses isolated from four *Spodoptera* sp. (Lepidoptera : Noctuidae) : genome size and homology assessed by DNA reassociation kinetics. *Virol.*, 76 : 468-471.

KNELL J.D., SUMMERS M., 1981. Investigation on genetic heterogeneity in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus by restriction endonuclease analysis of plaque-purified variants. *Virol.*, 112 : 190-197.

LOH L.C., HAMM J.J., HUANG E.S., 1981. *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus genome : physical maps for restriction endonucleases Bam HI and Hin dIII. *J. Virol.*, 38 : 922-931.

MARUNIAK J.E., BROWN S.E., KNUDSON D.L., 1984. Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. *Virol.*, 136 : 221-234.

MITCHELL E.R., 1979. Preface to the fall armyworm symposium. *Fla. Entomol.*, 62 : 81.

POITOUT S., BUES R., 1974. Elevage de plusieurs espèces de lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 2 : 79-91.

SMITH G.E., SUMMERS M.D., 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virol.*, 89 : 517-527.

SPARKS A.N., 1979. A review of the biology of the fall armyworm. *Fla. Entomol.*, 62 : 82-87.

STEINHAUS E.A., 1957. New records of insect-virus diseases. *Hilgardia*, 26 : 417-430.

## Summary

DAUTHUILLE D., CROIZIER G., FERRON P. - A newly isolated granulosis virus from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) in French Guyana.

A baculovirus which causes a granulosis has been isolated from the Noctuidae *Spodoptera frugiperda* in French Guyana. Genome analysis with restriction endonucleases shows that this virus differs from the one already described on the same host. The estimate of the molecular weight of the virus DNA is about  $89 \times 10^6$  daltons. To distinguish the two granulosis viruses of *S. frugiperda* we propose to call the new virus SfGGV, G for Guyana.

**Key words :** *Spodoptera frugiperda*, granulosis, baculovirus, genome analysis, French Guyana.

## Resumen

DAUTHUILLE D., CROIZIER G., FERRON P. - Un nuevo virus de granulosis de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) aislado en Guayana francesa.

Un Baculovirus causante de una granulosis ha sido aislado del noctuido *Spodoptera frugiperda* en Guayana francesa. El análisis del genoma de este virus mediante los enzimas de restricción demuestra que se trata de un virus diferente del que ha sido anteriormente descrito en el mismo hospedero. Se calcula que el peso molecular de su ADN es aproximadamente de  $89 \times 10^6$  daltons. Para distinguir los dos virus de granulosis de *S. frugiperda* se propone denominar al nuevo virus SfGGV (G por Guayana).

**Palabras-clave :** *Spodoptera frugiperda*, granulosis, baculovirus, análisis del genoma, Guayana francesa.