

République de Côte d'Ivoire

Ministère de l'Education Nationale  
chargé de l'Enseignement Secondaire  
et Supérieur

Année Universitaire  
1987 - 1988

Université Nationale de Côte d'Ivoire

Faculté des Sciences et Techniques d'ABIDJAN

Mémoire présenté pour l'obtention du  
**DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES D'ECOLOGIE TROPICALE**  
(Option Animale)

**LE BACULOVIRUS DE *LATOIA VIRIDISSIMA***  
**LEPIDOPTERE *LIMACODIDAE***  
**RAVAGEUR DU PALMIER A HUILE ET DU COCOTIER**  
**EN COTE D'IVOIRE :**  
**CARACTERISATION ET PRODUCTION EN CULTURE DE CELLULES**

Présenté par  
**Nazaire Koffi II KOUASSI**

Travail réalisé  
au Laboratoire d'Entomovirologie de  
l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération  
(ORSTOM)  
et de l'Institut International de Recherche Scientifique pour le Développement à Adiopodoumé  
(IIRSDA)  
B.P. V- 51 ABIDJAN

## SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - BIOLOGIE ET PATHOLOGIE VIRALE DES LIMACODIDAE	
A. Systématique	3
B. morphologie	3
C. Bilologie	3
D. Dégâts sur les palmacées	4
E. Pathologie viriale des Limacodidae	5
1°) Introduction	5
2°) Les réoviroses	5
3°) Les iridoviroses	7
4°) Les viroses dus à des virus du groupe des $\beta$ Nudaurelia	7
5°) Les densonucléoses	7
6°) Les picornaviroses	8
7°) Les baculoviroses	8
a) Baculovirus de polyédrose nucléaire	8
b) Baculovirus de granulose	9
c) Baculovirus libres	9
8°) Conclusion	9
CHAPITRE II: CULTURE DE CELLULES D'INSECTES	
A. Introduction	10
B. Mise au point du milieu de culture	10
1°) La fraction organique	12
2°) Les antibiotiques et sérums	12
3°) La fraction minérale	13
4°) La fraction spéciale	13
5°) Principaux milieux utilisés en culture de cellules de Lépidoptères	14
C. Les primocultures de cellules d'insectes.	17
1°) Les différentes sortes de cellules ou de tissus cultivables	17
2°) Importances du stade de prélèvement des cellules	18
3°) Les différentes méthodes de culture cellulaire	18

a) Culture en monocouche	18
b) Culture en suspension	19
c) Les biofermenteurs	20
4°) Prélèvement et mise en culture des cellules	20
D. Les lignées cellulaires	21
1°) Introduction	21
2°) Repiquage des cellules et établissement de lignées cellulaires	21
3°) Comportement des lignées cellulaires en culture	23
4°) Conclusion	24
E. Infection et production de virus	24
1°) Introduction	24
2°) Production du virus à partir de larve en élevage	24
3°) Production de virus en culture de cellules	24
a) Choix du virus et des cellules	24
b) Infection des Primocultures et lignées cellulaires	26
c) Effet cytopathologique	26
4°) Conclusion	26
<b>CHAPITRE III - MATERIEL ET METHODES</b>	
A. Matériel	27
1°) <i>Latoia viridissima</i>	27
a) position systématique et morphologie	27
b) récolte des larves et maintien au Laboratoire	27
2°) Lignées cellulaires	28
3°) Les souches virales	28
B. Méthodes	28
I. Techniques de caractérisation du virus	2
1°) Techniques de pathologie expérimentale	28
a) Technique d'infection	28
b) Recherche et isolement du virus	29

2°) Techniques cytologiques	29
a) Microscopie photonique	29
b) Microscopie électronique	29
α) Fixation des tissus et des cultures cellulaires	29
β) Coloration des coupes	30
γ) Contraste des suspensions virales	30
3°) Techniques de purification du virus	30
a) Broyage et clarification	30
b) Purification des corps d'inclusion	30
c) Extraction et purification des virions	31
d) Extraction et purification de l'ADN virale	31
α) Attaque de la capside	31
β) Séparation de l'ADN et les protéines virales (extraction au phénol)	31
4°) Techniques biochimiques de caractérisation	32
a) Dosage spectrophotométrique	32
b) Dosage des protéines	32
c) Analyse en électrophorèse	33
α) Electrophorèse des protéines virales	33
β) Electrophorèse de l'ADN viral	34
5°) Techniques sérologiques	39
a) Préparation des antisérums	39
b) Immunodiffusion en gel d'Agarose	40
II. Techniques de production du virus en culture de cellules d'insecte	40
1°) Techniques de primocultures	40
a) Primoculture à partir d'hémolymphe de larves	41
b) Primoculture à partir d'ovarioles de nymphe	42
c) Entretien de la primoculture	42
3°) Production de Baculovirus à partir de lignées cellulaire et de primocultures	43
a) Infection des cultures cellulaires	43
b) Purification du virus produit	44
4°) Conclusion	44

## CHAPITRE IV. - RESULTATS

A. Introduction	45
B. Symptômes de déroulement de la maladie	45
C. Etude de la pathologie chez de <i>Latoia viridissima</i> .	45
1°) Parasitisme chez <i>L. viridissima</i>	46
2°) Infection expérimentale des larves	47
D. Recherche de l'agent pathogène	48
E. Caractérisation du virus	48
1°) Purification	48
2°) Structure du virus	48
3°) Spectre d'absorption en lumière ultraviolette	49
4°) Analyse électrophorétique des protéines virales	49
a) Electrophorégrammes	49
b) Poids moléculaire des protéines virales	49
5°) Caractérisation de l'ADN viral	50
a) Spectre d'absorption en lumière ultra-violette	50
b) Digestion de l'ADN	50
c) Estimation du poids moléculaire du génome	51
6°) Etude immunologique	52
F. Production du virus en culture cellulaire	52
1°) Introduction	52
2°) Infection des lignées existantes	52
3°) Mise au point d'une lignée spécifique	53
a) A partir d'ovarioles de nymphe	53
b) Lignées cellulaire à partir d'hémolymphe	54
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>58</b>
<b>PLANCHES HORS TEXTE</b>	<b>I à XIV</b>

## AVANT PROPOS

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

Que Monsieur **J. LAUNAY** Représentant de l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) en Côte d'Ivoire et Monsieur **B. BOCCAS**, Directeur Général de l'Institut International de Recherche Scientifique pour le Développement à Adiopodoumé (IIRSDA) soient assurés de ma très profonde gratitude pour m'avoir permis d'effectuer ce stage dans les laboratoires de leur institut.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **N. KOUASSI**, responsable du DEA d'Ecologie Tropicale pour son assistance et ses encouragements.

Je remercie profondément Monsieur le professeur **A. AOUTI**, chef du département de Zoologie de la Faculté des Sciences et Techniques d'Abidjan. Ces encouragements ont été pour moi une aide décisive.

Je tiens également à exprimer une particulière reconnaissance envers Monsieur **R. VUATTOUX**, Maître de conférence au département de Zoologie de la Faculté des Sciences et Techniques d'Abidjan. Il m'a fait l'honneur de me guider et de me suivre tout au long de ce travail.

Que Monsieur **G. FEDIERE**, chargé de Recherche à l'Institut International de Recherche Scientifique pour le Développement à Adiopodoumé responsable du laboratoire d'Entomovirologie et responsable de ce stage, ainsi que Monsieur **X. LERY**, chargé de Recherche dans ce laboratoire trouvent ici le témoignage de ma sincère gratitude. Ils m'ont fait l'honneur de m'accueillir dans leur laboratoire et c'est à leur instigation que je me suis tourné vers l'entomovirologie et la culture de cellules d'insectes dont ils ont su me montrer tout l'intérêt. Qu'ils veuillent bien croire à ma très respectueuse reconnaissance.

Ma reconnaissance va également à Monsieur **R. PHILIPPE**, responsable du laboratoire d'Entomologie sur la station de La Mé de l'Institut de Recherche pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) et à Monsieur **N. N'GORAN** chef du service de défense des cultures à la Palmindustrie grâce auxquels j'ai pu effectuer mon travail de terrain.

J'adresse mes vives remerciements à Monsieur le Professeur **M. BERGOIN**, chef du service de virologie moléculaire de la Station de Recherches INRA de Pathologie comparée de St-Christol-Lès-Alès (France) . Qu'il soit assuré, ainsi que ses collaborateurs de ma profonde gratitude.

Je remercie le personnel scientifique et technique du Groupe d'Etude et de Recherche pour la Microscopie Electronique (GERME) pour l'aide efficace qu'ils m'ont procuré.

Je ne saurais oublier de remercier les préparateurs **J. M. N'GUESSAN**, **J. N'GORAN**, **D. COULIBALY** et **Y. ADON** du laboratoire d'Entomovirologie pour l'aide matérielle qu'ils n'ont cessé de m'apporter.

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

## INTRODUCTION

La culture industrielle des Palmacées, en particulier du cocotier (*Cocos nucifera*) et du palmier à huile (*Elaeis guineensis*) revêt une grande importance dans l'économie de la zone intertropicale du globe.

Le grand développement de ces oléagineux s'est accompagné de la colonisation rapide de ces nouvelles niches écologiques par un grand nombre d'insectes ravageurs.

Bien que toutes les parties de la plante peuvent être attaquées, c'est surtout au dépend des feuilles juvéniles ou déployées que vivent la majorité des insectes ravageurs.

Parmi les insectes nuisibles, nous pouvons citer les Coléoptères, bien représentés par les Dynastidae, en particulier les genres *Oryctes* et *Augosoma* qui forent le cœur des palmiers et les Chrysomelidae avec le genre *Coelaenomenodera* qui mine les folioles. C'est cependant, parmi les Lépidoptères que l'on rencontre le plus grand nombre d'espèces 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.

Pour trouver une alternance à la lutte chimique, 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. Elles ont conduit à reconnaître les germes entomopathogènes, notamment les virus, comme un des facteurs naturels les plus efficaces, intervenant dans la régulation des populations à forte densité, de par les épizooties qu'ils déclenchent. Ainsi ont-ils contribué au développement de la lutte microbiologique contre les insectes ravageurs.

A l'heure actuelle, des travaux ont mis en lumière le rôle tout aussi efficace des petits virus icosaédriques à ADN ou à ARN alors que pendant longtemps, seuls les Baculovirus ont été pris en considération dans la lutte microbiologique du fait de constituer une famille spécifique au invertébrés.

L'analyse moléculaire du génome des entomovirus a montré qu'il était possible de les utiliser comme vecteur d'expression et de leur faire exprimer des molécules à haute valeur ajoutée par insertion d'un génome étranger dans les séquences codantes de leur génome et dans le cas particulier des Baculovirus à la place du gène de synthèse de la polyédrique ou celui du polypeptide *p* 10. (SMITH et al., 1983 ; GONNET et DEVAUCHELLE, 1987)

Il est également possible d'envisager l'utilisation de Baculovirus de polyédrose nucléaire, ne provoquant pas une infection létale chez leur hôte pour la sécrétion d'un pesticide protéique par intégration d'un nouveau gène .

Nos travaux, qui se situent dans le programme de prospection de virus entomopathogènes des ravageurs de palmacées de l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), ont porté sur l'étude d'un Baculovirus de polyédrose nucléaire chez *Latoia viridissima* (Lépidoptère : Limacodidae).

Après avoir présenté les grands traits de la biologie des Limacodidae, leur pathologie virale et donné les généralités sur les Baculoviroses au chapitre I, le second chapitre sera consacré aux cultures de cellules d'insectes et production du virus. Le 3<sup>ème</sup> chapitre concerne la description du matériel vivant, et des méthodes de caractérisation du virus et de sa production en culture de cellules. Enfin, la présentation de nos résultats obtenus fera l'objet du dernier chapitre (Chapitre IV).



## CHAPITRE I

### BIOLOGIE ET PATHOLOGIE VIRALE DES LIMACODIDAE

#### A . Systématique

C'est WALKER qui attribua le statut de famille aux Limacodidae en 1855. Cette famille de Macrolépidoptère changea ensuite souvent de nom : Eucleidae - DYAR, 1894, Heterogeneidae - MEYRICK, 1895, puis Cochlididae - DYAR, 1902, avant de reprendre son appellation d'origine désormais seule reconnue.

Les Limacodidae sont avec les Zygaenidae regroupés dans la superfamille des Zygaenoidea - GRAVENHORST, 1843. Ils sont caractérisés 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 : 1C (Cu<sub>2</sub>) et aux ailes antérieures, la nervure média est conservée mais non bifurquée à l'intérieur de la cellule discoïdale (GRASSE, 1951 ; BALACHOWSKY, 1972 ; ROTH, 1974).

#### B . Morphologie

L'adulte est un papillon au corps robuste, de taille moyenne (entre 20 et 50 mm d'envergure). Les ailes sont larges, arrondies, abondamment écaillées, de coloration brune souvent partiellement teintées de vert comme chez *Latoia viridissima*. Les antennes sont bipectinées chez le mâle et filiformes chez la femelle. Les larves (chenilles) sont limaciforme ou testudiforme, à la tête retractile, possédant des pattes réduites et 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 tubercule 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 verte (*Latoia viridissima*) ou bleue.

#### C . 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 vie imaginale est d'une quinzaine de jours. La femelle pond ses œufs 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 *Latoia vivida* (FOURIE et HULL, 1980).

Chez *Latoia viridissima*, caractérisé par 8 stades larvaires dont la durée s'étend de 2 à 3 mois, les larves vivent en colonie durant les 4 premiers stades. La nymphose a lieu dans un cocon, collé sur la face inférieure des folioles, protégé par un revêtement urticant. Chez cette espèce, 3 générations peuvent se succéder en un an. Son cycle biologique a été comparé à celui décrit en Colombie chez *Sibine fusca* par GENTY et al., en 1978 ( Tableau 1).

Tableau 1 : Durée des différentes étapes du cycle biologique chez *L. viridissima* et *Sibine fusca*

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

\* D'après MARIAU. D. et al., 1981

\*\* D'après GENTY et al., 1978

Après la nymphose, la sortie de l'imago s'effectue par un opercule situé au pôle antérieur du cocon, préparée par la chenille et que repousse l'insect en émergence.

#### D . Dégâts sur les Palmacées

Les Limacodidae possèdent plusieurs espèces phyllophages de plantes cultivées. En Afrique de l'Ouest par exemple de nombreux genres sont cités sur le cacaoyer : *Afronarosa*, *Cosuma*, *Niphadolepis*, *Phlebodicha*, *Stroteroïdes*, *Teinorhyncha*, *Zinaria* (SMITH, 1965). En Afrique du Sud *Homosusica eugrapha* se rencontre fréquemment sur les 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 surtout en tant que défoliateurs des Palmacées en plantations industrielles, que les larves de ces Lépidoptères sont essentiellement connues. 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 particulièrement l'espèce *Sibine fusca* qui pullule périodiquement en Colombie (GENTY, 1972).

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

En Afrique de l'Ouest, c'est LEPESME (1947) qui le premier cite deux espèces causant des dégâts au palmier à huile : *Ctenocompa hilda*, *Thosea chrysoparala* et *Parasa carpani*. En Côte d'Ivoire, lieu de nos investigations, les pullulations de Limacodidae sur Palmacées sont signalées par HOUILLER (1961) qui étudie l'espèce *Latoia pallida*. Les entomologistes de l'Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) signalent régulièrement les dégâts causés par deux espèces : *Latoia viridissima* et *Caspalia extranea*. La pullulation de ces deux espèces a été particulièrement étudiée par FEDIERE, 1983. L'une de *L. viridissima* sur la plantation de cocotiers IRHO de Port-Bouët, l'autre de *C. extranea* sur la plantation de palmier à huile Palmindustrie d'Eloka. Deux importantes épizooties ont été étudiées au cours de ces pullulations. Depuis cette date, des générations plus ou moins importantes de ces deux dernières espèces se succèdent dans les plantations de palmier à huile et de cocotier de la basse Côte d'Ivoire qui constitue notre zone d'étude.

## E. 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 les pullulations (GENTY et MARIAN, 1975; TIONG et MUNROE, 1976). Des représentants de six familles de virus ont été identifiés comme agent pathogène des Limacodidae : des Baculovirus de polyédrose nucléaire et de granulose, des Iridovirus, des Densovirus, des Réovirus de polyédrose cytoplasmique, des virus du groupe virus  $\beta$  *Nudaurelia* et enfin des Picornavirus. Les différentes espèces de Limacodidae hébergeant ces virus sont mentionnées dans le tableau n°2.

### 2°) Les réoviroses

Les réoviroses sont essentiellement représentées chez les insectes par des maladies connues sous le nom de polyédroses cytoplasmiques, caractérisées par la présence de polyèdres dans le cytoplasme des cellules de l'intestin moyen. Les agents de ces maladies sont constitués d'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  $3,0 \times 10^6$  daltons (PAYNE et RIVERS, 1976). L'espèce type de cette virose est le virus du lépidoptère Bombycidae, *Bombyx mori* (ISHIMORI, 1934). Deux polyédroses cytoplasmiques sont signalées chez les Limacodidae (*Setothosea asigna*, *Sibine apicalis*).

Tableau 2 : LES VIROSES DES LIMACODIDAE

TYPE DE VIROSE	ESPECE HOTE ET PLANTES RAVAGEES	ORIGINE	REFERENCES
DENSONUCLEOSE	<i>Sibine fusca</i> (palmier) <i>Casphalia extranea</i> (palmier, cocotier)	Colombie Côte d'Ivoire	MEYNADIER & al., 1977a FEDIERE, & al., 1981
GRANULOSE	<i>Darna nararia</i> (cocotier) <i>D. trima</i> (palmier, cocotier) <i>Parasa lepida</i> (cocotier)	Sri Lanka Malaisie Indonésie	SMITH & XEROS, 1954 THOMAS & POINAR, 1973 GINTING & DESMIER de CHENON, 1987 .
IRIDOVIROSE	<i>Apoda dentatus</i> <i>Microleon longipalpis</i>	Etats-Unis	MARTIGNONI & IWAI , 1981
POLYEDROSE CYTOPLASMIQUE	<i>Setothosea asigna</i> (palmier, cocotier) <i>Sibine apicalis</i>	Indonésie Amérique Lat	MONSARRAT & al., (com.pers.) MARTIGNONI & IWAI , 1981
POLYEDROSE NUCLEAIRE	<i>Natada pucara</i> (palmier) <i>Setora tagalog</i> (palmier, cocotier ) <i>Thosea boreocaerulea</i> (cocotier) <i>Parasa consocia</i> <i>Setora stimulea</i>	Colombie Philippines Philippines Chine Amérique Lat	GENTY et al., 1978 COCK, 1985 COCK, 1985 TING-WEI et al., 1980 VAN DER GEEST & VAN DER LAAN, 1971
VIRUS DU GROUPE β NUDAURELIA	<i>Darna trima</i> (palmier, cocotier) <i>D. sordida</i> (palmier) <i>Parasa lepida</i> (cocotier) <i>Serotoria nitens</i> (palmier, cocotier) <i>Setothosea asigna</i> (palmier, cocotier) <i>Birthosea bisura</i> (palmier, cocotier) <i>Latoia vivida</i> (café, cacao) <i>Teinorhyncha umbra</i> (bananier)	Malaisie Indonésie Indonésie Pakistan Malaisie Indonésie Côte d'ivoire Côte d'ivoire	REINGANUM et al., 1978 MONSARRAT & DESMIER de CHENON, (com. pers. ) GINTING & DESMIER de CHENON, 1987. GREENWOOD & MOORE, 1982 REINGANUM et al., 1978 MONSARRAT & DESMIER de CHENON, (com. pers.) FEDIERE, 1985 FEDIERE & MONSARRAT, 1985
PICORNAVIROSE	<i>Darna trima</i> (palmier, cocotier) <i>Latoia pallida</i> (cocotier) <i>L. viridissima</i> (palmier, cocotier) <i>Sibine fusca</i> (palmier)	Indonésie Côte d'Ivoire Côte d'Ivoire Colombie	MONSARRAT & DESMIER de CHENON, (com. pers.) FEDIERE, 1985 FEDIERE, 1983 FEDIERE, 1983

### 3°) Les iridoviroses

Ces viroses doivent leur nom à l'iridescence bleutée ou verdâtre caractéristique des insectes infectés. La particule virale est non enveloppée, icosaédrique, mesurant entre 125 et 300 nm de diamètre et à site de multiplication cytoplasmique. Le génome est composé d'ADN bicaténaire linéaire d'un poids moléculaire de 100 à 250x10<sup>6</sup> daltons (KELLY et ROBERTSON, 1973). Les Iridovirus isolés chez les insectes sont scindés en deux genres au sein de la famille des Iridoviridae (MATHEWS, 1982). Le premier est celui des Iridovirus proprement dits avec pour espèce type le virus de *Tipula paludosa*, diptère Tipulidae (XEROS, 1954). Le deuxième est celui des Chloriridovirus dont l'espèce type est le virus irisant type 3 des moustiques du genre *Aedes* (BELLET, 1968). Deux iridoviroses sont signalées chez deux espèces de Limacodidae des Etats-Unis, *A. dentatus* et *Microleon longipalpis*.

### 4°) Les viroses dues à des virus du groupe virus $\beta$ *Nudaurelia*

L'agent pathogène est un petit virus icosaédrique à ARN monocaténaire.

Une quinzaine de virus présentant la propriété de ne posséder qu'une seule protéine capsidaire (PM : 60-70x10<sup>3</sup> 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  $\beta$  du lépidoptère, Saturnidae, *Nudaurelia cytherea capensis* isolé en Afrique du sud (JUCKES, 1970). Huit virus de ce type sont signalés chez les Limacodidae (*Birthosea bisura*, *Darna trima*, *D. sordida*, *Parasa lepida*, *Setora nitens*, *Setothosea asigna*, *Latoia vivida*, *Teinorhyncha umbra* ).

### 5°) Les denonucléoses

Ce sont des viroses caractérisées essentiellement par l'hypertrophie des noyaux dans lesquels les virus se multiplient (MEYNARDIER et al., 1964). les Densovirus se présentent sous forme de particules parasphériques, sans enveloppe de 20 à 22 nm de diamètre. Le génome est constitué d'une molécule d'ADN linéaire monocaténaire de 5 à 6 Kb. Des chaînes positives et négatives sont encapsidées séparément. La capsid renferme quatre polypeptides, deux majeurs, et deux mineurs. Ce genre de virus propre aux invertébrés, appartient à la famille des parvoviridae. Une denonucléose a été décrite chez une espèce de Limacodidae, *Sibine fusca*, ravageur du palmier à huile en Colombie puis une autre chez *Casphalia extranea* défoliateur du cocotier et du palmier à huile en Côte d'Ivoire (MEYNARDIER et al., 1977a).

## 6°) Les picornaviroses

La famille des picornaviridae regroupe essentiellement des virus de vertébrés comme le genre Enterovirus dont fait partie le virus humain de la poliomyélite. Ces picornavirus se présentent comme des particules icosaédriques de 30 nm de diamètre dont le génome est formé d'une chaîne linéaire monocaténaire d'ARN positif d'une taille avoisinant 9000 bases ( $3 \times 10^6$  daltons) représentant 30 % de la masse totale du virion. La composition polypeptidique de la capsidie consiste en trois protéines majeures (PV<sub>1</sub>, PV<sub>2</sub>, PV<sub>3</sub>) et de deux protéines mineures (PV<sub>0</sub>, PV<sub>4</sub>). Deux virus d'insectes représentent les espèces types chez les invertébrés : le virus de la paralysie du grillon (Crpv) (REINGANUM et al., 1970) et le virus C de la drosophile (Dcv) (JOUSSET et al., 1972). Quatre virus de ce type ont été signalés chez les Limacodidae dont deux furent caractérisés (*Latoia viridissima*, *Sibine fusca*).

## 7°) Les baculoviroses

Certaines maladies dues aux Baculovirus sont connues depuis très longtemps chez les insectes sous le terme 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 Baculovirus (du latin baculum = petit baton, évoquant la forme du virion) sont des virus en forme de batonnet mesurant en moyenne 200 à 400 nm de long sur 40 à 70 nm de diamètre. Les virions sont constitués d'un corps central dense aux électrons et d'une nucléocapsidie, elle même, entourée d'une enveloppe trilamellaire. Le génome est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire circulaire superhélicoïdale d'un poids moléculaire de 58 à 100x10<sup>6</sup> daltons (SUMMER, 1977; MATTHEWS, 1980). La nucléocapsidie est constituée d'au moins 10 à 15 polypeptides de poids moléculaires compris entre 10.000 et 160.000 daltons.

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).

### a) Les Baculovirus de polyédrose nucléaire (sous-groupe A)

Ces virus ont les propriétés de s'inclure en fin de morphogénèse dans des structures cristallines (corps d'inclusion) de nature protéinique appelées polyèdres et renfermant de nombreuses particules virales. L'espèce type de ces virus de polyédrose nucléaire est le virus d'*Autographa californica* Lépidoptère Noctuidae (VAIL et al., 1973). Les corps d'inclusion d'environ 0,5 à 3 microns de diamètre sont constitués d'un polypeptide unique, de poids moléculaire compris entre 25.000 et 32.000 daltons : la polyédrine (CROIZIER, 1977).

Chez les Limacodidae plusieurs espèces hébergent ce type de virus : *Natada pucara*, *Parasa consocia*, *Setora stimulea*, *S. tagalog*, *Thosea boreocaerulea*.

b) Les Baculovirus de granulose (sous- groupe B)

Ces Baculovirus se caractérisent par des corps d'inclusion plus petit, ovoïdes, appelés granules, ne contenant généralement qu'une seule particule virale. L'espèce type de cette virose est le virus de *Trichoplusia ni*, Lépidoptère Noctuidae (SUMMERS et ARNOTT, 1969). Trois viroses de ce type ont été signalées chez les Limacodidae : *Darna nararia*, *D. trima*, *Parasa lepida*.

c) Baculovirus libres (sous- groupe C)

Ce troisième groupe comporte des virus possédant les mêmes caractéristiques que ceux appartenant aux deux sous-groupes précédents mais en diffèrent du fait de ne pas être inclus dans un corps protéique. L'espèce type en est le virus d'*Oryctes rhinoceros*, Coléoptère Scarabaeidae (MONSARRAT et al., 1973). Jusqu'à présent aucun virus de ce type n'a été signalé chez les Limacodidae.

8°) Conclusion

Cet inventaire des virus de Limacodidae fait apparaître un Picornavirus chez *Latoia viridissima* matériel de notre étude. A ce jour il s'agit du seul virus signalé chez cette espèce.

## CHAPITRE II

### CULTURE DE CELLULES D'INSECTES

#### A. Introduction

La réalisation de cultures cellulaires permet la production massive de germes, de vaccins et de molécules à haut potentiel biologique : interféron, anticorps monoclonaux, hormones et enzymes (BRANCHE, 1983 ; GRIFFITHS, 1985).

Les virus en particulier ne se multiplient que dans une cellule vivante. Il est alors nécessaire de réaliser des cultures de cellules pour non seulement suivre *in vitro* et à l'échelle cellulaire l'action des germes intracellulaires mais aussi en produire en quantités énormes.

Les cultures des cellules d'insectes ont été réalisées dans un premier temps avec les milieux de culture des cellules animales existants déjà. Par des améliorations successives, des milieux spécifiques aux cellules d'insectes en particulier de Lépidoptères ont été mis au point.

Les premiers milieux utilisés ont été l'hémolymphe homologue ou le liquide physiologique de Ringer ou de Locke (QUIOT, J.M. 1975). Les premières investigations étaient tournées vers le maintien et la maturation de cellules folliculaires de testicules de *Samia cecropia* L. dans un milieu constitué d'hémolymphe homologue (GOLDSCHMIDT, 1915). Les premières infections furent réalisées après migration des cellules de *Bombyx mori* après 1 ou 2 jours de culture avec le virus de la polyédrose nucléaire isolé chez ce même Lépidoptère (TRAGER, 1935).

La mise au point de culture a été pendant longtemps un problème majeur. Celui-ci doit tenir compte du fait que la composition chimique de l'hémolymphe que l'on veut imiter est variable d'un ordre à l'autre, d'une espèce à l'autre et même d'un stade larvaire à l'autre (QUIOT, J.M., 1975). La deuxième difficulté se situe aussi au niveau du choix des tissus ou organes à cultiver et surtout de la quantité de matériel à cultiver. La taille de l'animal cause aussi un problème dans le prélèvement des organes et tissus (QUIOT, 1975).

#### B. Mise au point du milieu de culture

Les cellules hors de l'organisme dont elles proviennent et libérées des tissus ou des organes qu'elles constituaient doivent, pour vivre et se multiplier retrouver *in vitro* la plupart des facteurs qui contrôlaient leur métabolisme dans l'animal.

Ces facteurs apportés *in vivo* par l'hémolymphe doivent l'être *in vitro* par le milieu de culture (QUIOT, 1975 ; VAGO, 1967). Ces facteurs sont d'ordre physique ou physico-chimique (température, isotonicité, pH).



Les invertébrés étant des organismes poikylothermes, les températures utilisées pour la culture des cellules varient de 23 à 25°C dans la majorité des cas. Pourtant on peut cultiver les cellules de lépidoptères même à 30°C (VAGO et CHASTANG, 1958a). Le pH est acide (6,3 à 6,6) chez beaucoup de Lépidoptères et Hyménoptères (VAGO, 1967). Les cultures de cellules sont sensibles aux variations, (DAY et GRACE, 1959) et une modification de 0,2 unités peut être fatale à certaines cellules (MARTIGNONI, 1962). Pour les lignées de Lépidoptères une bonne croissance peut être obtenue avec des pH variant entre 6,2 et 6,8 (ROBERTS, 1984).

Ces facteurs sont également d'ordre chimique, approchant la composition du milieu intérieur en différents éléments nécessaire au métabolisme cellulaire (rapport Na/K). Les auteurs ont essayé de reproduire le plus parfaitement possible la composition chimique de l'hémolymphe fournie par l'analyse, la perfection ne peut être obtenue dans la mise au point du milieu de culture, à cause de la grande variabilité de l'hémolymphe aussi bien d'une espèce à l'autre qu'à l'intérieur de la même espèce, d'un stade d'évolution à l'autre. Ainsi donc pour un calcul précis, il faut tenir compte du stade (embryonnaire, larvaire, nymphal, adulte) auquel se trouve l'insecte au moment du prélèvement des tissus. Par la suite, la simplification des méthodes d'établissement des milieux s'imposait. C'est alors que VAGO et QUIOT (1969) ont mis au point un principe de standardisation des milieux de culture pour invertébrés. Ces milieux devaient répondre aux exigences communes de plusieurs invertébrés. Les trois facteurs primordiaux selon ces mêmes auteurs sont : le pH qui doit être acide, la pression osmotique qui doit être en conformité avec celle de l'hémolymphe, généralement élevée chez les invertébrés et particulièrement chez les insectes. Celle-ci est difficile à déterminer dans le cas de l'hémolymphe à cause des faibles quantités disponibles. Enfin le rapport Na/K qui est le premier facteur à être déterminé, car il diffère selon les groupes. Trois groupes ont été ainsi déterminés :

- $\text{Na/K} > 1$  correspondant aux invertébrés carnivores et hématophages,
- rapport  $\text{Na/K} < 1$  correspondant aux phytophages (Lépidoptères)
- un éventuel troisième groupe composé d'animaux marins (QUIOT, 1975).

A partir de ces données, 3 types de milieux standards ont été constitués, comprenant des fractions constantes (fraction organique, antibiotiques et sérums) et des fractions variables (fraction minérale, fraction spéciale et le pH).

## 1°) La fraction organique

Cette fraction apporte essentiellement les acides aminés indispensables à la synthèse des protéines, les sucres, éléments énergétique et les vitamines. La formule de base de cette partie provient du milieu de culture de cellules de vertébrés M199 de MORGAN et al. ( 1950 ) disponible dans le commerce.

Les acides aminés, bien que les quantités soient variables dans les différentes classes d'insectes, sont en quantités très élevées par rapport aux vertébrés (supérieur sous leur forme pure et à des concentrations comparable à celles déterminées par l'analyse de l'hémolymphe (WYATT, 1956 ; KURODA et TAMURA, 1956 ; MARTIGNONI et SCALLION, 1961 ; GAY, 1963 )

## 2°) Les antibiotiques et serums

Les antibiotiques les plus utilisés sont :

Bacitracine	10,0 mg/100 ml
Penicilline	12,0 mg/100 ml
Streptomycine	5,0 mg/100 ml
Colimycine	2,5 mg/100 ml (VAGO, QUIOT, 1969).

Certains autres peuvent être utilisés de manière spécifiques. D'une façon générale, on utilise le sérum de veau fœtal, mais quelques fois des sérums homologues pouvant être recueilli en grande quantité sont employés (VAGO et QUIOT, 1969), soit seul, soit en complément du sérum de veau fœtal.

Le sérum de veau pose de nombreux problèmes au niveau de sa collecte, manque d'asepsie lors du prélèvement (endotoxine bactérienne, bactériophages) et de sa composition. Produit naturel, il est soumis à des variations biologiques (teneur en albumines, présence de gammaglobulines). (BRANCHE, 1983). Le prix de ce dernier est très élevé. Des éléments "synthétiques" jouant les mêmes rôles que les sérums naturels commencent à être mis au point (BARNES, 1987). Ils doivent apporter

- des facteurs de croissance, substances mitogéniques agissant en stimulant la synthèse du DNA cellulaire parmi lesquelles on cite : le facteur EGF (Epidermal Growth Factor), le facteur FGF (Fibroblast Growth Factor) et le facteur N.G.F. (Nerve Growth Factor),
- des hormones telles que l'insuline, les hormones corticoïdes,
- des facteurs d'adhésion ou d'attachement comme la fibronectine (exogène ou endogène), qui intervient surtout pour l'adhérence des fibroblastes. Certains substituts sont déjà au point pour certaines cellules de vertébrés, tel l'ultrosor G de chez IBF (MYARA et al., 1986).

Il semble néanmoins que le sérum de veau fœtal à très faible taux d'endotoxine a encore un bel avenir pour certains types cellulaires et que la généralisation des "sérum artificiels" pour la culture de toutes les cellules (diploïdes et hétéroploïdes) est actuellement prématurée (BRANCHE, 1983). Pourtant dans le but de la production industrielle en grande quantité, ces sérum peuvent devenir une alternative réelle.

Au laboratoire, un milieu n'utilisant pas de sérum de veau fœtal est actuellement mis au point qui permet d'ores et déjà la multiplication de plusieurs lignées de cellules de Lépidoptères (LERY, publication en cours).

### 3°) La fraction minérale

Elle est la plus variable, car elle apporte l'équilibre dans les rapports ioniques qui sont eux-mêmes très variables chez les invertébrés.

- Pour les invertébrés à  $Na/K > 1$ , la solution saline du milieu M199 pour vertébrés de MORGAN et coll. (1950) a été choisie.

- Pour les invertébrés à  $Na/K < 1$  (Lépidoptères) deux types de formules ont été préparées. L'une est la formule du milieu M199 citée plus haut modifiée en inversant les proportions des ions  $Na^+$  et  $K^+$  et en augmentant le taux du  $Mg^{++}$ . L'autre est représentée par des solutions minérales déjà mises au point pour certaines espèces d'insectes (VAGO et CHASTANG, 1958a ; GRACE, 1962a MITSUHASHI et MARAMOROSH, 1964).

- Pour les invertébrés marins cette partie est représentée par l'eau de mer.

### 4°) La fraction spéciale

Elle peut en cas de besoin, apporter des substances nécessaires pour certaines espèces :

- Hydrolysat de lactalbumine. Il peut compléter pour les insectes, la quantité d'acides aminés insuffisante dans la fraction A. Il et règle en même temps la pression osmotique.

- Glucose, cette fraction peut apporter des glucides supplémentaires pour la culture de cellules de certains Hyménoptères.

- Extrait de levure : il apporte un complément de vitamines et peut servir également au réglage de la pression osmotique (VAGO et QUIOT, 1969). L'utilisation de l'hydrolysat de Lactalbumine et/ou d'extrait de levure peut être intéressante en remplacement des fractions acides aminés et vitamines, en abaissant de façon sensible le coût de fabrication du milieu ainsi que sa facilité de fabrication.

Enfin, selon la valeur du rapport  $Na/K$ , le pH sera réglé à l'aide des solutions de  $NaHCO_3$ ,  $NaOH$  et  $KOH$  tous à 5% (VAGO et QUIOT, 1969). Jusqu'à ce jour, plusieurs milieux de culture de cellules ont été constitués et modifiés afin de répondre aux besoins des cellules *in vitro*.

5°) Principaux milieux utilisés en culture de cellules de Lépidoptères  
(tableau 3)

Il s'agit des milieux M199 (MORGAN, 1950) ; MM (MITSUHASHI, 1964) ; Grace (GRACE, 1962) ; MM modifié (MITSUHASHI, 1964) ; IPL- 41 (WEISS et VAUGHN, 1981) ; BM25 (QUIOT) ; BML.TC/7, BML.TC/10 (GARDINER, 1975) ; Wilkie 80 (WILKIE, 1980)

Tableau 3 : Composition de différents milieux pour la culture de cellules de lépidoptères en mg/l

COMPOSANTS	M199	MM	Grace	MM(mod)	IPL.41	BM25	TC/7	TC/10	WILKIE80
<b>Sels minéraux I</b>									
CH <sub>3</sub> COONa	50,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	200,00	200,00	1000,00	0,00	500,00	1000,00	1320,00	1320,00	1320,00
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KCl	400,00	200,00	240,00	3500,00	1200,00	3000,00	4610,00	2870,00	2870,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,00	0,00	0,00	270,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,00	0,00	0,00	350,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200,00	0,00	278,00	1000,00	1880,00	4000,00	2780,00	2780,00	2780,00
NaCl	6800,00	7000,00	0,00	700,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NaHCO <sub>3</sub>	1250,00	120,00	350,00	200,00	350,00	350,00	350,00	350,00	350,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	125,00	226,00	1013,00	0,00	1160,00	1200,00	1140,00	1140,00	1140,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MgCl <sub>2</sub>	0,00	100,00	2280,00	2500,00	0,00	3000,00	2280,00	2280,00	2280,00
<b>Acides aminés</b>									
DL-Alanine	50,00	0,00	225,00	0,00	300,00	0,00	0,00	225,00	225,00
L-Arginine. Hcl	70,00	0,00	700,00	0,00	800,00	0,00	0,00	550,00	550,00
DL-Aspartate	60,00	0,00	350,00	0,00	1300,00	0,00	0,00	350,00	450,00
L-Cystéine. Hcl	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
L-Cystine	20,00	0,00	22,00	0,00	100,00	0,00	0,00	22,00	75,00
DL-Glutamate	150,00	0,00	600,00	0,00	1500,00	0,00	0,00	600,00	829,00
L-Glutamine	100,00	0,00	600,00	250,00	1000,00	0,00	0,00	600,00	600,00
Glycine	50,00	0,00	650,00	0,00	200,00	0,00	0,00	650,00	650,00
L-Histidine. Hcl	20,00	0,00	2500,00	0,00	200,00	0,00	0,00	3380,00	3380,00
L-Hydroxyprol.	10,00	0,00	0,00	0,00	800,00	0,00	0,00	-	0,00
DL-Isoleucine	40,00	0,00	50,00	0,00	750,00	0,00	0,00	50,00	50,00
DL-Leucine	120,00	0,00	75,00	0,00	250,00	0,00	0,00	75,00	75,00
L-Lysine. Hcl	70,00	0,00	625,00	0,00	700,00	0,00	0,00	625,00	625,00
DL-Méthionine	30,00	0,00	50,00	0,00	1000,00	0,00	0,00	50,00	50,00
DL-Phénylalan.	50,00	0,00	150,00	0,00	1000,00	0,00	0,00	150,00	150,00
L-Proline	40,00	0,00	350,00	0,00	500,00	0,00	0,00	350,00	350,00
DL-Serine	50,00	0,00	1100,00	0,00	400,00	0,00	0,00	0,00	550,00
DL-Tréonine	60,00	0,00	175,00	0,00	200,00	0,00	0,00	175,00	175,00
DL-Tryptophane	20,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	0,00	100,00	100,00
L-Tyrosine	40,00	0,00	50,00	0,00	250,00	0,00	0,00	50,00	70,00
DL-Valine	50,00	0,00	10,00	0,00	500,00	0,00	0,00	100,00	100,00
L-Asparagine	0,00	0,00	350,00	0,00	1300,00	0,00	0,00	350,00	350,00
b-Alanine	0,00	0,00	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Complexes									
Hydrol. lactalb.	0,00	6500,00	0,00	7500,00	0,00	1000,00	10000,00	0,00	0,00
Extrait de levure	0,00	5000,00	0,00	4000,00	0,000	0,00	20000,00	0,00	0,00
Sels minéraux II									
(NH <sub>4</sub> )MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,35
ZnCl <sub>2</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44
FeSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00
Tween 80	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,00
Ethanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2ml
Sucres									
Glucose	1000,00	400,00	700,00	0,00	2500,00	10000,00	2000,00	1000,00	4000,00
D-Ribose	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Désoxyribose	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sucrose (sacch.)	0,00	0,00	26680,00	10000,00	1650,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fructose	0,00	0,00	400,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Maltose	0,00	0,00	0,00	4000,00	1000,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tryptose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5000,00	5000,00	2600,00	0,00
Methyl cellul.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acides gras									
acide malique	0,00	0,00	670,00	0,00	53,60	0,00	0,00	0,00	0,00
Ac. a k glutar.	0,00	0,00	370,00	0,00	60,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ac.succinique	0,00	0,00	60,00	0,00	4,80	0,00	0,00	0,00	0,00
Ac. fumarique	0,00	0,00	55,00	0,00	4,40	0,00	0,00	0,00	0,00
Ac. adénylique	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ac. stéarique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Ac. myristique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Ac. oléique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Ac. linoléique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Ac. linoléinique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Ac. palmitique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Ac. palmitoléique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Ac. arachidonique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,00
Ac.a am.butyrique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Trilinoléine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
Trilinolénine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
Phosph. choline	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
Tocophérol acét	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Cholestérol	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
b-sitosterol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Stigmostérol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00

<b>Bases</b>									
Sulfate d'adénine	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Adénosine Trip.	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Glutathion	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Guanine HCl	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Hypoxanthine	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,00
Thymine	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Uracile	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Xanthine	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Colorant</b>									
rouge de phénol	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Vitamines</b>									
Ac. ascorbique	0,050	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
Ph.a tocophérol	0,010	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Biotine	0,010	0,00	0,01	0,00	0,16	0,01	0,01	0,01	0,05
D.calciferol	0,100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pantothénate Ca <sup>++</sup>	0,010	0,00	0,02	0,00	0,01	0,02	0,02	0,02	1,20
Chl de choline	0,500	0,00	0,20	0,00	20,00	0,20	0,20	0,20	20,00
Cyano-cobalam	0,000	0,00	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00	0,00	1,00
Ac. folique	0,010	0,00	0,02	0,00	0,08	0,02	0,02	0,02	1,00
i. nositol	0,050	0,00	0,02	0,00	0,40	0,02	0,02	0,02	2,00
Ménadione K3	0,010	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Niacine	0,025	0,00	0,02	0,00	0,16	0,02	0,02	0,02	0,00
Niacinamide	0,025	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20
Ac.p.amin.benz.	0,050	0,00	0,02	0,00	0,32	0,02	0,02	0,02	2,00
Pyridoxal.HCl	0,025	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pyridoxine HCl	0,025	0,00	0,02	0,00	0,40	0,02	0,02	0,02	1,00
Riboflavine	0,010	0,00	0,00	0,08	0,02	0,02	0,02	0,02	0,20
Thiamine.HCl	0,010	0,00	0,02	0,00	0,08	0,02	0,02	0,02	2,00
Vitamine A	0,100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Polyamines</b>									
Putrescine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Spermidine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Spermine.4.HCl	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Carnitine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Taurine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
O.Phosp ethan.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00

Les différentes fractions utilisées habituellement varient assez nettement dans leur composition, en particulier les fractions vitaminiques et acides aminés.

Hormis les milieux employant l'extrait de levure et l'hydrolysate de lactalbumine, la concentration de certains acides aminés ou de vitamines peut varier d'un facteur 1 à 100. Les milieux les plus riches en ces 2 composants, sont ceux qui ont été utilisés pour diminuer la quantité de serums (WILKIE, 1980).

D'autres fractions communes, sels minéraux et sucres, varient très peu d'une formule à l'autre respectant le rapport Na/K et les besoins énergétiques (glucose ou dérivés).

Seuls certains macroéléments ( $ZnSO_4$ ) sont parfois apportés, améliorant l'adhérence des cellules aux parois du flacon (VAUGHN et al., 1980).

Certains milieux apportent des fractions nouvelles, tels les polyamines, dont le rôle est bien connu pour la fabrication des NADP, ainsi que des bases. Certains acides gras peuvent être ajoutés en même temps que du Cholestérol, nécessaire à la fabrication des parois cellulaires (GACHELIN, 1980).

### C. Les primocultures de cellules d'insectes

Entre la culture de tissus décrite pour la première fois en 1907 par HARRISSON et la culture des cellules isolées, il a fallu attendre les années 50 avec la découverte du pouvoir de digestion de la trypsine qui permet l'obtention de cellules isolées (MOSCONA, 1950). Depuis lors, l'amélioration constante des milieux, des supports de culture et des conditions de stérilité a permis le développement d'un grand nombre de types cellulaires cultivables (cellules épithéliales, fibroblastiques, kératinocytes, hépatocytes, chondrocytes, cellules nerveuses, etc...) (GUICHARD-BALESTRINI, 1987).

#### 1°) Les différentes sortes de cellules ou de tissus cultivables

De nos jours, les différents types de tissus sont utilisés en culture de cellules, tissus conjonctifs, embryonnaires, intestinaux qui nécessitent des conditions aseptiques strictes à cause de leur contenu bactérien et fongique. Les cellules sanguines ne sont pas toutes cultivables à cause de leur survie très limitée hors de l'organisme (QUIOT, 1975).

En ce qui concerne particulièrement les Lépidoptères, les cellules et tissus les plus utilisés en culture sont : les ovarioles (QUIOT, 1976 et 1982 ; MITSUHASHI, 1973 ; HINK et al., 1970), les tissus nymphaux (VAGO et CHASTANG, 1958), les hémocytes de larves (MITSUHASHI et al., 1985, SKATULLA, 1986), les disques imaginaux (LYNN et al., 1982 ; DAVIS et al, 1977).

Il est possible d'utiliser les tissus normaux prélevés sur un organisme vivant ou les tissus déjà transformés issus des formations tumorales ou de proliférations cellulaires chez les invertébrés (VAGO, 1975). Ce type de proliférations cellulaires a été observé chez le Lépidoptère *Sibine fusca* (VAGO, 1975) à la suite d'une infection à Parvovirus, et au cours d'une polyédrose du Lépidoptère *Agrotis segetum*. Il est de même possible d'induire des tumeurs par l'action de drogues ou des U.V et de faire démarrer une culture à partir de ces cellules déjà transformées pour obtenir une lignée de cellules Hela de carcinome de cerveaux humain (GEY, et al., 1952).

Dans la majorité des cas, les cellules cultivées sont de type fibroblastiques et épithéliales, ces dernières étant plus difficiles à maintenir (VAGO et CHASTANG, 1958 b, c ; VAGO et BERGOIN, 1963).

## 2°) Importance du stade de prélèvement des cellules

Parmi les divers tissus qui se prêtent à des cultures *in vitro*, chez les Lépidoptères, les deux types cellulaires les plus utilisés sont : les ovarioles de nymphes et l'hémolymph de larves. Ces types cellulaires prélevés à des stades spécifiques doivent présenter certains critères dont l'indifférenciation cellulaire avant le prélèvement et la mise en culture. En effet, les cellules indifférenciées se multiplient mieux *in vitro* que les cellules différenciées. Ces cellules possèdent des précurseurs de replication génétique (FRESHNEY, 1986).

Les tissus provenant de nymphes de Lépidoptères sont aussi cultivés car à ce stade l'insecte présente un état physiologique particulier (lyse tissulaire accompagnée de phagocytose et formation des organes de reproduction de l'imago (VAGO et CHASTANG, 1958a) propice à la mise en culture.

## 3°) Les différentes méthodes de culture cellulaire

On sait aujourd'hui utiliser et diriger les extraordinaires capacités de la machinerie cellulaire pour synthétiser, voire produire à l'échelle industrielle, des principes actifs rares et des produits de grande complexité chimique. Mais les cellules animales et végétales, plus "difficiles" que les microorganismes, n'ont pu être "domestiquées" que grâce à l'adaptation des techniques d'agitation, à la découverte des microsoutports, à la mise au point de milieu hautement sophistiqués. Le cell-sorter a permis le tri des cellules intéressantes, les synthétiseurs ayant automatisé les opérations d'enchainement des nucléotides, constituant le code génétique (BRANCHE, 1983 ).

Au niveau de la méthodologie, la mise en œuvre des cultures dépend d'une particularité essentielle des cellules : leur culture nécessite-t-elle ou non un support ? De ce fait, il existe 3 grandes méthodes de cultures (GUICHARD-BALESTRINI, 1987).

### a) Les cultures en monocouche

Classiquement, les cultures cellulaires sont conduites en boîte de Pétri, boîte multipuits ou flacon. Le matériau utilisé est le verre ou le plastique (usage unique), généralement du polystyrène (moins cher) très pur qui, outre l'absence de toxicité doit avoir d'excellentes qualités optiques pour permettre l'observation (GUICHARD-BALESTRINI, 1987).

Pour les quelques types cellulaires, telle que les primocultures, il est nécessaire d'avoir recours :



- soit à un plastique ayant subi un prétraitement chimique ou physique pour augmenter l'adhérence (NUNC, FALCON),

- soit d'utiliser des boîtes recouvertes d'une matrice de nature biologique : Polylysine, Collagène (Bioethica), facteurs d'adhésion. Des boîtes stériles recouvertes d'une matrice extracellulaire seront bientôt commercialisées (Eurobio).

L'adhésion cellule-support est un phénomène très sélectif qui peut être utilisé dans le tri des types cellulaires. Les cellules transformées sont ainsi les seules à proliférer sur teflon alors que le polyacrylamide permet la sélection des cellules tumorales. Les cultures de cellules adhérentes sont généralement statiques. On utilise parfois des flacons ou des tubes mis en rotation ce qui permet une adhérence des cellules sur toute la surface interne du récipient de culture (système Roller, roue ou agitateur Bioblock, Flobio) (GUICHARD-BALESTRINI, 1987).

#### b) La culture en suspension

- la culture sans support

Elle est moins pratiquée en culture de cellules d'insectes. Pourtant certaines cellules sont spécialisées dans ce type de culture représentant la culture en phase homogène (BRANCHE, 1983, GUICHARD-BALESTRINI, 1987). Les cellules diploïdes humaines par contre ne peuvent pas survivre dans ces conditions (GRIFFITHS, 1985) car ces cellules ne possèdent pas la propriété de se multiplier en suspension. La plupart du temps, c'est donc une culture en phase hétérogène, sur support (statiques ou non statiques) qui est pratiquée (BRANCHE, 1983, 1984 ; GUICHARD-BALESTRINI, 1987).

- Les cultures sur support ou en phase hétérogène

Divers supports biocompatibles permettent d'avoir une surface de culture maximale pour la production en masse. Différents types de supports sont utilisés : il s'agit soit de supports statiques (boîte de Roux) (BRANCHE, 1983) soit de supports non statiques dont l'emploi a représenté une quadruple évolution vers l'obtention de surfaces considérablement augmentées, une diminution des manipulations, une économie de milieu de culture et une production de suspension virale de titre élevé. Il s'agit des "flacons roulants", des "disques" superposés autour d'un axe central et les surfaces offertes peuvent varier de 7500 à 25000 cm<sup>2</sup>. Ceci est applicable aux cellules rénales de singes et du porc, d'embryons de poulet. Mais le système est fragile et l'observation est limitée. Il existe aussi les surfaces tubulaires, les microporteurs sur lesquelles se fixent les cellules (cytodex 1,2,3, super bead, Micarel, Lux cytosphères = billes de plastique).

Un des facteurs primordiaux est donc l'adhésion des cellules à un support de culture. La constitution du milieu peut favoriser les différentes étapes du processus d'adhésion. Il est important de savoir aussi que pour certaines cellules telles que les fibroblastes diploïdes secrètent des quantités suffisantes de fibronectine (facteur principal de l'adhésion) pour ne pas nécessiter de source de glycoprotéines exogènes. Dans les autres cas, il faut noter qu'un milieu de culture contenant 10 % de serum de veau fœtal renferme 2-3µg/ml de fibronectine qui en grande partie s'adsorbe sur le support en quelques minutes (GUICHARD-BALESTRINI, 1987).

En ce qui concerne les cultures de cellules d'insectes et principalement de Lépidoptères, c'est la culture en monocouche qui est pratiquée, car les cellules qui adhèrent au fond du flacon, support, se prettent facilement à un contact avec le virus pendant les infections réalisées sur primocultures ou lignées cellulaires

#### c) Les biofermenteurs

Du fermenteur de 2 litres au cytogénérateur de 100 litres (RHONE-MERIEUX), la technologie du cytoculteur demeure l'héritage des fermentations microbiologiques (SGI, Chenap, Biolaffite). Le préalable nécessaire était la mise sur le marché de biocapteurs performants et stérilisables *in situ*. C'est actuellement le cas pour les sondes qui mesurent le pH, les pressions partielles en O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, la température Son fonctionnement pose cependant des problèmes pour la maîtrise de certains autre paramètres comme la stérilisation du biogénérateur et de ces tuyauries. (BRANCHE, 1983 ; GUICHARD-BALESTRINI, 1987).

#### 4°) Prélèvement et mise en culture des cellules

D'une façon générale, pour limiter les risques de contamination, les prélèvements des tissus ou organes sont effectués dans des chambres stériles dans les conditions aseptiques. Les prélèvements de tissus et cellules sont effectués à l'aide de dissection simples, précises et rapides, après désinfection parfaite des surfaces externes de l'insecte.

La mise en culture de l'hémomymphe est obtenue après la section d'une fausse patte chez la larve ou même par simple blessure à l'aide d'une lame stérile et récupération des cellules isolées.

La mise en primoculture de tissus ou organes se fait par des explants découpés dans le tissu prélevé. La culture se fait par ajout de milieu dans les boîtes. D'une façon générale, pour obtenir un tapis monocellulaire des méthodes de dissociation mécanique et chimique sont utilisées. Alors que la dissociation mécanique se fait par agitation magnétique ou pipetage vif, pour des organes à faible cohésion, la dissociation chimique par des enzymes comme la trypsine est fréquemment employée (VAGO, 1967).

## D. Les lignées cellulaires

### 1°) Introduction

Les lignées cellulaires dérivent de primocultures entretenues assez longtemps pour permettre des repiquages successifs. Sous le terme de lignées cellulaires, on désigne des cellules pouvant théoriquement faire l'objet d'un nombre infini de subcultures sans montrer de signes de sénescence (GUICHARD-BALESTRINI, 1987).

En contrepartie, ces cellules présentent des modifications et sont dites "spontanément transformées". Elles montrent des altérations morphologiques, caryotypiques, et supportent de fortes densités de culture tout en réclamant un faible apport en éléments nutritifs (GUICHARD-BALESTRINI, 1987). Un progrès récent dans ce domaine a été l'établissement des collections de cultures cellulaires dont la plus importante banque est l'American type culture Collection (ATCC) où plus de 2.650 lignées de cellules sont décrites (Flao Lab, Gibco, Eurobio).

Quand aux Lépidoptères, seules une vingtaine de principales lignées sont signalées et disponibles dans divers laboratoires. Le tableau 3 donne la liste des principales lignées cellulaires existantes et leurs caractéristiques (origine cellulaire et auteurs).

### 2°) Repiquage des cellules et établissement de lignées cellulaires

En général, les primocultures renferment plusieurs types cellulaires provenant des tissus de départ, et aussi des cellules à différents stades de développement, ce qui constitue un premier niveau de sélection. Seules les cellules capables de survivre en suspension ou capables d'adhérer à un support pourront être à l'origine d'une culture primaire. La culture s'homogénéise jusqu'à ce que la totalité du support soit occupé par les cellules qui prolifèrent *in vitro* : c'est le stade de confluence (GUICHARD-BALESTRINI, 1987). Le renouvellement du milieu peut se faire dans des périodes de 5 à 15 jours.

Chez les Lépidoptères, le temps d'adhésion varie entre 24 h et 36 h. Les cellules des ovarioles de *Bombyx mori* adhèrent en 24 h (QUIOT, 1982) et les cellules arrondies à multiplication intensive apparaissent dans un temps relativement long allant de 3 semaines à plusieurs mois. C'est à partir de ce moment que les repiquages ont lieu. Les premiers repiquages de la future lignée de *Bombyx mori* a eu lieu un mois plus tard (QUIOT, 1982). alors que pour celle de *Mamestra brassicae*, il a fallu attendre près d'un an.

L'incubation dans les milieux spécifiques se fait à des températures moyennes de 26 à 28°C, mais elle peut néanmoins descendre à 23°C, voire même atteindre des valeurs élevées de 30°C (VAGO, 1967).

Après confluence, les cellules adhérentes sont décollées, diluées dans le milieu de culture neuf et réparties dans des boîtes de cultures selon le nombre de cellules et aussi la boîte de culture utilisée. Ceci constitue le premier repiquage ou premier passage. Quand la lignée n'est pas encore bien établie (multiplication constante) l'intervalle entre les premiers repiquages demeure aussi variable (1 semaine à plusieurs mois).

Tableau : 3 Principales lignées de Lépidoptères

Espèce de provenance	Nom de la lignée	Cellule ou tissus d'origine	Référence bibliographiques
<i>Spodoptera frugiperda</i>	IPLB-SF. 21	tissu ovarien	VAUGHN et al., 1977
<i>Mamestra brassicae</i>	IZD-Mb. 0503	de nymphes	MILTENBERGER et al., 1977
<i>Lymantria dispar</i>	SCLd.135	ovaires de nymphes	QUIOT, J. M., 1976
<i>Bombyx mori</i> L.	SPC Bm. 36	ovaires de nymphes	QUIOT, J. M., 1982
<i>Euxoa scandens</i>	IAFEs-1	ovarioles	BELLONCIK et al., 1985
<i>Spodoptera litoralis</i>	SPC Sl. 48	ovarioles de chry-	MIALHE et al., 1984
	SPC Sp. 52	salides	
<i>Trichoplusia ni</i>	TN- 368	tissu ovarien	HINK, W. F., 1970
<i>Choristoneura fumif.</i>	IPRi Cf. 124	tissu larvaire	SOHI, S. S., 1973
<i>Heliothis zea</i>	IMC Hz. 1	tissu ovarien	HINK, W. F., 1970
<i>Samia cynthia</i>	-----	hemocytes	CHAO, J. et al., 1971
<i>Papilio xuthus</i>	Px. 58 et 64	ovaires de chrys.	MITSUHASHI, J., 1973
<i>Malacosoma disstria</i>	IPRi. 108	hemocytes	SOHI, S. S., 1973
<i>Laspeyresia pomonella</i>	Cp-1268	-----	HINK et al., 1971
	Cp -69	-----	
<i>Chilo suppressalis</i>	-----	-----	MITSUHASHI, J., 1967
<i>Estigmene acrea</i>	EA.1174 A et H	hemocytes	GRANADOS R.R. et al., 1975
<i>Antherarea eucalypti</i>	-----	tissu ovarien	GRACE, T. D. C., 1962

C'est ainsi qu'il a fallu 2 mois et demi pour obtenir des repiquages de disques imaginaux de *Trichoplusia ni* (Lépidoptère) (LYNN et al., 1982), 2 mois pour le premier repiquage d'ovariole d'*Euxoa scandens* (Lépidoptère Noctuidae), 1 mois et demi à partir d'hémolymphe d'*Antherarea eucalypti* (Scott) (YUNKER, 1967). La période peut s'étaler de 3 semaines (QUIOT, 1982) à 9 mois (GRACE, 1967) à partir des ovarioles de *Bombyx mori*.

Il faut cependant attirer l'attention sur le fait que malgré toutes les précautions prises, le pourcentage de réussite est très faible (souvent inférieur à 1 %) comme par exemple à partir de l'hémolymphe de *Mamestra brassicae* (MITSUHASHI et al., 1985). Une lignée est considérée comme établie, lorsqu'un nombre suffisant de passage (supérieur à 20) a pu être réalisé. Cela peut durer de 3 mois à 1 ans et plus. Ce temps dépendra de l'animal utilisé.

Il a fallu 3 mois pour obtenir une lignée établie à partir d'ovarioles de chrysalides de *Spodoptera littoralis*, Lépidoptères, Noctuidae (MIALHE et al., 1984), 5 mois pour les ovaires de *Lymantria dispar* (QUIOT, 1976), 12 mois pour les ovaires de chrysalides de *Papilio xuthus* (MITSUHASHI, 1973).

### 3°) Comportement des lignées cellulaires en culture

Le comportement de l'évolution des cellules animales, en particulier des insectes peut se résumer par une courbe de croissance comportant 3 phases :

- la phase Lag : d'une durée de 2 à 36 heures parfois plus pendant lequel les cellules s'adaptent au nouveau milieu et adhèrent au support. C'est le cas des fibroblastes qui adhèrent par fixation de la fibronectine et qui s'étalent par la réorganisation des filaments d'actine (structure de la membrane cellulaire) sous l'influence de la fibronectine (BORNSTEIN et al., 1978). Pendant cette phase, les cellules non résistantes et inadaptées (40 %) meurent.

- la phase Log : phase de multiplication logarithmique des cellules qui peut durer de quelques jours à plusieurs semaines selon les cellules animales. Cette phase constitue le moment propice pour les repiquages en vue de l'obtention de lignées cellulaires (FRESHNEY, 1986). Il y a pendant ce temps 90 à 100 % de croissance. La multiplication cellulaire se fait par des mitoses successives (QUIOT, 1976, 1980, 1982); VAGO et CHASTANG (1958); GRACE (1967). Pendant cette phase on définit le temps de doublement de la population. Ce temps de doublement, terme se rapportant à un ensemble complet de cellules, indique l'intervalle pendant lequel le nombre de cellules est passé de  $1 \cdot 10^6$  à  $2 \cdot 10^6$ . Elle n'est pas synonyme au temps de génération qui correspond à l'intervalle entre deux divisions consécutives d'une cellule (Gibco, Commission de terminologie de la tissu culture association). Ce temps de doublement variable selon le type de cellules et selon l'insecte. Il est de 36 heures pour les hémocytes de larves de *Mamestra brassicae* (MITSUHASHI, 1985), entre 72 heures et 84 heures pour les cellules d'ovarioles de *Bombyx mori* (QUIOT, 1982), 80 heures pour les cellules ovariennes de *Lymantria dispar* (QUIOT, 1976).

- la 3<sup>ème</sup> phase peut être une phase de plateau (cellules de vertébrés et quelques invertébrés). Pendant cette phase, les cellules maintiennent leur nombre après confluence par inhibition de contact. Il y a pendant ce temps (0 à 10 % de croissance). Cette phase est caractéristique de lignées cellulaires (FRESHNEY, 1986). Elle peut aussi être une phase de sénescence, en particulier avec les lignées de Lépidoptères. Elle intervient quand même après un temps de confluence court (24 à 48 heures). Pour retarder cette phase, les repiquages sont nécessaires. On peut aussi augmenter la phase de plateau en renouvelant le milieu dans la dernière partie de la phase de croissance. Quoi qu'il en soit, les cultures de cellules même entretenues et repiquées finissent par dégénérer car la conservation des lignées se fait pendant un temps plus ou moins long (de quelques mois à plusieurs années) (QUIOT, 1975).

#### 4°) Conclusion

Toutes les cultures primaires n'aboutissent pas nécessairement à l'établissement d'une lignée. En effet, pour l'établissement d'une lignée, il faut préalablement établir de nombreuses primocultures. Des îlots de cellules à multiplication rapide qui vont permettre l'établissement de lignées n'apparaîtront qu'après plusieurs semaines à plusieurs mois de culture (GRACE, 1962a ; HINK, 1970 ; SOHI, 1971). Ceci nécessite le stockage, la surveillance, l'entretien et surtout la non utilisation pour d'autres travaux.

L'importance de ces lignées est qu'elle favorise les études de pathologie des invertébrés et d'autres animaux. Les lignées d'insectes ont déjà permis la production des microorganismes (virus en particulier, pathogènes des insectes ravageurs) utilisables en lutte biologique.

### E. Infection et production de virus

#### 1°) Introduction

Les infections peuvent être réalisées soit sur larves vivantes soit en culture de cellules (primocultures et lignées cellulaires). Au cours de ces quinze dernières années, le développement et le degré de perfectionnement des cultures cellulaires d'insectes ont permis de réaliser dans un certain nombre de cas l'infection *in vitro* de ces cultures par des virus, des rickettsies, des mycoplasmes et des protozoaires. D'un autre côté, des études ont été poursuivies pour mieux connaître la morphogénèse et la pathogénèse intracellulaire de ces agents, (QUIOT, 1975).

Des études biochimiques et chimiques sur le comportement des cellules infectées surtout au niveau de la différenciation cellulaire, ont été entreprises.

#### 2°) Production de virus à partir de larves en élevage

Deux types de méthodes sont le plus souvent utilisées, l'infection *per os* et l'infection par injection à partir de suspensions virales purifiées (FEDIERE, 1983)

#### 3°) Production de virus en culture de cellules

##### a) Choix du virus et des cellules

Les cultures primaires et les lignées cellulaires peuvent se prêter à une infection en vue de la production du virus par multiplication massive dans les cellules vivantes.

Une partie importante des tentatives d'infection en culture cellulaire a été relative au Baculovirus, groupe auquel appartiennent les virus de polyédrose nucléaire (NPV), les granuloses (GV) et probablement les virus *oryctes*. (QUIOT, 1975 ; TRANDER, 1986 ; GARDINER, 1975 ; VAGO et al., 1963 ; VAUGHN, 1963). L'étude des virus a surtout progressé depuis les travaux de PAILLOT et GRATIA en 1939.

Dans les essais de production par infection, il faut tenir compte du fait que les virus sont spécifiques aux insectes. C'est le cas par exemple des virus NPV de *Spodoptera* et *Autographa* qui ont un spectre très étroit d'hôte. Cependant les NPV d'*Autographa californica* (ACNPV), peuvent infecter plusieurs espèces de ravageurs. De plus, les virus issus de différentes régions peuvent montrer des degrés de virulence différente, (SHAPIRO et al., 1970 ; PRISTON, 1985). Le choix se porte souvent sur les Baculovirus de polyédrose et de granuloase en raison de leur spécificité en pathologie animale. De nos jours, beaucoup d'autres groupes de virus sont utilisés (COUCH, 1975).

Beaucoup de lignées cellulaires sont disponibles qui peuvent se prêter à ces infections en vue de la replication massive du virus. La majorité de ces lignées cellulaires proviennent de Lépidoptères ou de Diptères (PRISTON, 1985).

De même, que toutes les primocultures ne donnent pas de lignées cellulaires, toutes les lignées cellulaires ne supportent pas la multiplication des virus. Dans ce cas, il n'y aura pas de formation de corps d'inclusion (IB) comme avec la lignée cellulaire de *Heliothis zea* (IMC-Hz.1) alors que ceux-ci se forment en culture de tissu du même insecte (PRISTON, 1985).

D'autre part, GOODWIN et al. (1974) ont produit des corps d'inclusion sur une autre lignée cellulaire du même *H. zea* (IPLB-1079) et ceci seulement à partir des cellules qui adhèrent au support. Celles qui sont en suspension n'en produisent pas. Dans ces conditions, la production massive en gros volume pose beaucoup de problèmes. Ces problèmes sont d'ordre techniques et économiques qui doivent être d'abord surmontés (PRISTON, 1985).

WEISS et al., 1981 ont optimisé une procédure de production en utilisant les cellules de *Spodoptera frugiperda* en culture dans une boîte de culture de 430 cm<sup>2</sup>. Ils ont pu obtenir après 6 jours de culture des corps d'inclusion dont le nombre s'élève à  $9 \times 10^9$  par boîte (ce qui est l'équivalent du virus retiré moins de 2 larves infectées). Mais on conclut que la production pose un problème économique.

D'autres tentatives ont été réalisées dans des biofermenteurs (BRAUN, Melsugen) et microfermenteurs de 10 litres. Aux problèmes économiques, s'ajoutent les problèmes d'approvisionnement en air dans le fermenteur (RÖDER, 1982).

## b) Infection des primocultures et lignées cellulaires

Les infections de cultures cellulaires peuvent se faire soit sur les primocultures après seulement quelques heures de culture soit sur une grande quantité de cellules.

En ce qui concerne les méthodes d'infection, il faut noter que l'infection peut se faire de deux manières différentes : soit à partir du virus pur ou de son ADN soit à partir d'un inoculum préparé à partir de larves infectées *per os* (QUIOT, 1975).

Il a été démontré par VAGO et BERGOIN (1963) que les virions purifiés ont un faible degré d'infectiosité. Cependant, des résultats satisfaisants ont été obtenus quand les virions proviennent de l'hémolymphe ou lui sont mélangés. Ce qui sous entend le rôle important de l'hémolymphe dans l'infection. Cependant, les virions purifiés à partir de polyèdres cytoplasmiques ont été employés en infection avec succès sans le mélanger à l'hémolymphe (SOHI et al., 1971).

Des inoculums de différents types peuvent être utilisés. Il s'agit des inoculums préparés à partir d'extraits tissulaires de larves infectées (moins utilisé) (TRAGER, 1935) et des inoculums préparés à partir d'hémolymphe plus facile et avec lequel on obtient un taux d'infection élevé (TRAGER, 1935 ; VAUGHN, 1968 ; GRANADOS, QUIOT, 1975).

## c) Effet cytopathologique

Après une infection virale, les cellules peuvent présenter des modifications morphologiques visibles au microscope optique. Les premiers signes peuvent être détectés après quelques heures de culture (FAULKNER et HENDERSON, 1972 ; VAIL et al., 1973).

Dans le cas d'une infection par une polyédrose nucléaire, les cellules perdent leur mobilité et une hypertrophie du noyau peut être observée. Les divisions cellulaires sont inhybées et les polyèdres apparaissent (VAIL et al. 1973 ; KNUDSON et TINSLEY, 1974). A 27 ou 28°C avec 48 ou 72 heures, 100% des cellules présentent un effet cytopathique (GRANADOS, 1975 ; QUIOT, 1975)

## 4°) Conclusion

Il est important de souligner l'intérêt de ce type d'infection par rapport aux autres méthodes. En agissant ainsi, la purification du virus est facilitée car ici les particules virales sont passées directement sur gradient après ultra-sonnage pour briser les cellules hôtes contenant le virus. Ce type d'infection permet d'étudier le mode de multiplication des différents types de virus en culture et de manière générale, leur biologie, et ainsi de pouvoir en faire bon usage comme biopesticide dont l'avenir est prometteur.



## CHAPITRE III

### MATERIEL ET METHODES

#### A. Matériel

1°) *Latoia viridissima* - HOLLAND - 1893

##### a) Position systématique et morphologie

Cette espèce longtemps appelée *Parasa viridissima* est désormais rangée dans le genre *Latoia*. La description suivante a été donnée par FEDIERE, (1983). 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 adultes des deux sexes sont de coloration identique. Arrivée en fin de développement, la larve de *L. viridissima* est verte avec 4 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. I, Fig. 2).

Le cocon est de forme ellipsoïdale et mesure entre 11 et 14 mm de diamètre sur les deux axes chez la femelle et 8 à 12 mm chez le mâle. Ces cocons qui hébergent les nymphes sont blanchâtres, hérissés de soies urticantes (Pl. I, Fig. 3)

##### b) Récolte des larves et maintien au laboratoire

Les larves et cocons de *Latoia viridissima* ont été prélevés dans les plantations de palmier à huile d'Eloka, de La mé et d'Anguédedou.

Les larves et les cocons sont récoltés sur les folioles après abattage d'une palme de rang 17 ou 25 à la faucille. Les chenilles sont disposées dans des boîtes aérées et transportées jusqu'au laboratoire où elles seront maintenues groupées par 50 sur des folioles leur servant de nourriture, dans des cages (50 x 30 x 30) au armature de bois dont les faces sont faites de tulle à maillage très fin.

Un contrôle quotidien est nécessaire pour le renouvellement des folioles qui s'assèchent et pour récupérer les chenilles mortes. Ces cages sont placées en lumière naturelle à température ambiante (25 à 28°C).

L'élevage des larves et des nymphes ainsi récoltés serviront pour les cultures cellulaires, et la production du virus sur larves par infection peros.

## 2°) Lignées cellulaires

Il s'agit de lignées de cellules dont nous disposons au laboratoire et sur lesquelles nous pouvons faire des essais d'infection et de production de virus. Il s'agit de 4 lignées cellulaires différentes qui sont repiquées et entretenues régulièrement.

- Lignées de cellules de *Spodoptera littoralis* donnée par le Dr. VAUGHN, et établie à partir d'ovarioles
- Lignée cellulaire de *Spodoptera frugiperda* (IPLBSF21A Cl.15) établie par VAUGHN et al. (1977) .
- Lignée cellulaire de *Choristoneura fumiferana* donné par le Prof. DEVAUCHELLE (St. Christol-Lès-Alès)
- Lignée cellulaire de *Bombyx mori* SPC Bm40 établie à partir de gaine ovarique de *B. mori* au Laboratoire de culture cellulaire de St Christol-Lès-Alès (QUIOT, 1982)

## 3°) Les souches virales

- Densovirus de *Casphalia extranea* (FEDIERE, 1983),
- Picornavirus de *Latoia viridissima* (FEDIERE, 1983),
- $\beta$  Nudaurelia de *Teinorhyncha umbra* (FEDIERE ,et Monsarrat, 1985)
- Un petit virus à ARN isolé chez *Pteroteinion lauffella*(KOUVIDJIN, 1986)
- Picornavirus de *Turnaqua rufisquamata* (FEDIERE, 1985)

## B. Méthodes

### I - Techniques de caractérisation du virus

#### 1°) Techniques de pathologie expérimentale

##### a) Technique d'infection

Parmi les deux types d'infections pouvant se réaliser sur larves (Chapitre II), nous avons utilisé la technique d'infection *per os*. Les chenilles sont déposées sur des folioles préalablement badigeonnées d'une suspension de polyèdres purifiés. La tête de l'animal peut être trempée dans une suspension contenant des polyèdres relativement purifiés.

## b) Recherche et isolement du virus

Les virus ont été recherchés à partir de larves prélevées en période d'épizootie dans la nature et maintenues 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'hémolymphes, 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.
- purification des particules d'allure virale observées en microscopie électronique.

## 2°) Techniques cytologiques

### a) Microscopie photonique

Les frottis d'hémolymphes sont observés au microscope photonique soit en contraste de phase, soit après coloration au bleu de méthylène potassique selon LOEFFLER.

### b) Microscopie électronique

#### α) 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 tampon cacodylate,
- \* post fixation dans l'acide osmique à 1 % pendant 2 h à 4°C,
- \* déshydratation dans un gradient d'acétone 35 %, 100 %, heures
- \* préinclusion dans un mélange d'épon-cétone (V/V) pendant 12 heures
- \* inclusion finale dans l'épon pur.

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

### β) 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.

### γ) Contraste des suspensions virales

Les suspensions de virus purifiés et les broyats d'insectes sont déposés sur grille recouverte d'un film de collodion carboné, et contrastées négativement à l'acide phosphotungstique à 1 %, pH 7,4 selon BRENNER et HORNE (1959), ou l'acétate d'uranyle à 2%.

### 3°) Techniques de purification du virus

Les larves supposées mortes de virose vont subir plusieurs traitements en vue de l'isolement et de la purification des particules virales.

#### a) Broyage et clarification

Les larves infectées sont broyées dans un tampon Tris (0,05M) SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,06 %, pH 7,8. Le broyage se fait au broyeur type "Waring Blendor" pour des quantités importantes de chenilles ou au potter pour des petites quantités de larves.

Le broyat est filtré sur mousseline, puis clarifié par centrifugation à la Sorval 5 min à 500 rpm (révolution par minute) permettant d'éliminer les grosses particules (débris cuticulaires et cellulaires). Le surnageant contenant les particules virales est lavé plusieurs fois par centrifugation à 5000 rpm pendant 15 minutes en présence de tampon de broyage. Le culot contenant les polyèdres est remis en suspension dans du tampon Tris simple (0,05M), pH 7,8 puis déposé sur un gradient de densité saccharose - Tris (40 - 60 %)

#### b) Purification des corps d'inclusion

Les suspensions virales partiellement purifiées sont déposées sur des gradients de saccharose 40 - 60 % (poids-poids) préparés dans du tampon Tris 0,05M et centrifugées à 4°C pendant 30 min à 25000 rpm (ultra - centrifugeuse Beckman, Rotor SW 27.1). Les bandes de polyèdres visibles à l'œil nu sont récupérées par aspiration à la pipette pasteur. Une mise au culot à 25000 rpm pendant 40 min est nécessaire pour éliminer le sucre contenu dans les bandes de polyèdres prélevées dans les gradients. Deux à trois gradients sont nécessaires pour obtenir une suspension de polyèdres d'un haut degré de pureté.

### c) Extraction et purification des virions

Les corps d'inclusion (polyèdres nucléaires) en suspension sont dissous dans un même volume de tampon thioglycolate - carbonate de sodium (0,25M) pH 10,5 pendant 15 à 20 min. La dissociation est suivie au microscope optique. La réaction de dissolution des polyèdres (limpidité du mélange), est arrêtée afin de préserver les virions intacts, en additionnant au mélange du tampon Tris (0,05M) pH 7,8 dans la proportion 1 : 2 et en le plaçant dans la glace pendant 5 min.

Les impuretés et les polyèdres non dissous, sont éliminées par centrifugation à la Sorval à 4000 rpm pendant 4 min. Le surnageant contenant les virions est déposé sur un gradient 20 - 50 % (poids-poids) (Saccharose-Tris) et centrifugé à 18000 rpm pendant 2 heures. Les virions qui sédimentent en plusieurs bandes (3 en général) sont prélevés à la pompe péristaltique incorporée à un système analyseur (spectrophotomètre Beckmann UV. 5230), permettant de suivre le tracé absorptiométrique du profil du gradient à 260 nm. Les bandes prélevées séparément sont dilués dans le tampon Tris. Les virions sont amenés au culot par centrifugation à 20000 rpm pendant 2 heures. Le culot est ensuite dilué dans un faible volume de Tris (1 ml)

### d) Extraction et purification de l'ADN viral

#### α) Attaque de la capside virale

A 2 ml de suspension virale on ajoute 40 µl d'une solution de SDS concentré (0,25 g / ml). Le mélange est incubé 15 min au bain-marie à 60°C. Après attaque de la capside, le mélange est déposé dans la glace durant une minute.

#### β) Séparation de l'ADN et les des protéines virales (Extraction au phénol

##### Préparation du phénol saturé en tampon Tris - EDTA (TE) :

(Tris 0,01M ; EDTA 0,001M ; pH 8)

Le phénol cristallisé pur est distillé puis liquéfié en le chauffant à 50°C.

\* Ajouter 0,1 % de 8 hydroxyquinoline,

\* du tampon Tris 1M à pH 8 (V / V),

\* mélanger, laisser décanter, récupérer le phénol (phase inférieure).

\* refaire la même opération volume à volume avec un mélange Tris 0,1M PH 8 et 0,2 % de 2-mercapto-éthanol.

\* Même opération avec le t ampon TE.

\* Conserver le phénol saturé en tampon TE à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Aux 2 ml du mélange ADN-protéines sont ajoutés 2 ml de mélange phénol-chloroforme (V/V). Le tube est agité doucement par inversion pendant 15 min puis centrifugé à température ambiante à la Sorval durant 15 min à 5000 rpm. La phase supérieure aqueuse contient l'ADN, tandis que la phase inférieure phénolique contient les protéines dissoutes. Le chloroforme dénature mieux les protéines et permet une meilleure séparation des phases. On prend soin de ne pas recueillir la galette de protéines se trouvant à l'interface. Cette même extraction au phénol-chloroforme est répétée une seconde fois.

Aux 2 ml contenant l'ADN, sont ensuite ajoutés 2 ml de phénol. Le mélange est agité et centrifugé 5 min à 5000 rpm. La phase supérieure (ADN) est récupérée et additionnée de 2 ml de chloroforme pour éliminer les traces de phénol. Le mélange est agité et centrifugé 5 min à 5000 rpm. La phase supérieure (ADN) est récupérée et additionnée de 2 ml d'éther pour éliminer le chloroforme. Le mélange est agité et centrifugé 5 min à 5000 rpm. L'éther reste en phase supérieure et la phase inférieure contenant l'ADN est récupérée. Celle-ci est dialysée contre du tampon TE pendant 48 heures en changeant les bains toutes les 12 heures.

La pureté de la suspension d'ADN est contrôlée au spectrophotomètre.

#### 4°) Techniques biochimiques de caractérisation

##### a) Dosage spectrophotométrique

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

##### b) Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales du virus a été effectué selon la technique de BRADFORD (1976). Les mesures absorbométriques ont été réalisées au spectrophotomètre à 595 nm. La quantité de protéine est déterminée graphiquement sur une courbe d'étalonnage  $D.O = f(B.S.A. \text{ en } \mu\text{g/ml})$ . BSA = sérum albumine de bœuf.

c) Analyse en électrophorèse

α) Electrophorèse des protéines virales

Le nombre et le poids moléculaire des protéines virales (polyèdre et baculovirus) ont été déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS selon la méthode de WEBER et OSBORN (1969). Des gels de 7 %, 8 %, 9 % et 11 % de polyacrylamide sont coulés entre 2 plaques de verre.

Tableau n° 5 Protocole de préparation des gels

Concentration du gel	7 %	8 %	9 %	11 %
Solution mère				
Acrylamide 30 % et Bis-Acrylamide 0,8 %	23,5 ml	26,5 ml	30 ml	36,6 ml
Filtration 0,45 µm				
Tampon de migration (Tris 1,876M ; SDS 0,5%;pH8,8)	20,0ml	20,0ml	20,0ml	20,0ml
H <sub>2</sub> O distillée	55,5 ml	52,5 ml	49,0ml	42,0ml
Degazage				
Persulfate d'ammonium à 10%	1ml	1 ml	1 ml	1 ml
Temed	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Quantité pour la préparation de 2 gels de 13,8 x 8,2 x 0,27 cm.

La suspension virale est traitée par une solution dénaturante : (tampon de dépôt ). Le mélange, volume à volume, est chauffé à 100°C pendant 5 min.

Sept protéines de référence, le sérum albumine de boeuf (PM = 66.000), l'ovalbumine (PM = 45.000), le glyceraldehyde 3.P. desydrégénase. (PM = 36.000), l'anhydrase carbonique (PM = 29.000), letrypsinogène (PM = 24.000), l'inhibiteur de trypsine (PM = 20.100), la lactalbumine (PM = 14.200), permettant d'établir un étalonnage reliant la mobilité relative des protéines (Rf) au logarithme de leur poids moléculaire.

Tampon d'électrophorèse		Tampon de dépôt	
Tris	0,025 M	Tris	0,125
Glycine	0,192 M	SDS	4 %
SDS	0,1 %	b.mercapto ethanol	5 %
pH	8,3	Glycerol	20 %
		Bleu de bromophénol	0,005 %
		pH	6,8

Après une préélectrophorèse d'une demi-heure dans le tampon d'électrophorèse formule TE pour éliminer les éventuelles protéines du gel, les échantillons sont déposés dans les puits à raison de 20 µl pour le marqueur et 70 µl pour le mélange tampon de dépôt-virus dans des gels de 8 % et 9 %. L'électrophorèse se déroule à 4° sous une tension de 100 V avec un courant de 65 m pendant en moyenne 3 h 30 min. Après leur séparation, les polypeptides sont fixés par une solution d'acide Trichloroacétique (TCA) à 25 % pendant une demi-heure puis colorés pendant 6 heures par une solution filtrée 0,1 % de bleu de coomassie, 25 % méthanol et 10 % d'acide acétique. Les gels sont décolorés par plusieurs bains successifs de solution décolorante contenant 25 % de méthanol et 10 % d'acide acétique. Les gels sont alors photographiés.

### β) Electrophorèse de l'ADN viral

Nous avons étudié l'action de différentes enzymes de restriction sur la molécule d'ADN du Baculovirus et nous avons estimé le poids moléculaire de cette molécule. Ces études ont été menées en gels d'agarose horizontaux à 0,6 % ; 0,8 % et 1 %.

#### \* Enzymes de restriction utilisées

Les enzymes que nous avons utilisées reconnaissent des séquences comportant un nombre plus ou moins grand de paires de nucléotides, généralement 4 ou 6 paires.

Les fournisseurs recommandent l'utilisation de tampons spécifiques pour chaque enzyme. Nous avons utilisé les tampons d'incubation préconisés par les laboratoires BOEHRINGER d'où provenaient les enzymes (Tableau 8).



Pour simplifier les manipulations, nous avons ultérieurement suivi les recommandations qui classent les enzymes en trois groupes : celles qui sont activées à force ionique forte moyenne et faible. Selon ce schéma, 3 solutions tampon sont nécessaires (tableau 7). Tous les tampons sont préparés concentrés 10 fois (10X) et conservés à -20°C.

Tableau 6 : Enzymes de restriction utilisées et condition de digestion.

Enzyme	Tampon (1)	Température (2) d'incubation	Séquence (3)
Alu I	moyen	37°C	AG ↓ CT (3)
Bam HI	moyen	37°C	G ↓ GATCA
Bgl I	moyen	37°C	GCCNNNN ↓ NGGC
Bgl II	faible	37°C	A ↓ GATCT
Bst EII	moyen	60°C	G ↓ GTNACC
Cla I	faible	37°C	AT ↓ CGAT
Eco RI	fort	37°C	G ↓ AATTC
Hae II	faible	37°C	Pu GCGC ↓ Py
Hae III	moyen	37°C	GG ↓ CC
Hha I	moyen	37°C	GCG ↓ C
Hind II	moyen	37°C	GTPy ↓ Pu AC
Hind III	moyen	37°C - 55°C	A ↓ AGCTT
Hpa II	faible	37°C	C ↓ CGG
Pst I	moyen	21°C - 37°C	CTCGA ↓ G
Pvu I	fort	37°C	CGAT ↓ CG
Sal I	fort	37°C	G ↓ TCGAC
Sma I	(Tabl.8)	37°C	CCC ↓ GGG
Xho I	fort	37°C	C ↓ TCGAG

(1) voir tableau 7

(2) D'après MANIATIS et al., 1982

(3) la flèche indique le site de coupure.

Tableau 7 : Tampons simplifiés des enzymes de restriction (d'après MANIATIS et al. 1982)

Tampon	NaCl	Tris HCl (pH 7,5)	MgCl <sub>2</sub>	β. Mercaptoéthanol
Faible	0 mM	10 mM	10 mM	6 mM
Moyen	50 mM	10 mM	10 mM	6 mM
Fort	100 mM	50 mM	10 mM	6 mM

Tableau 8 :Solution tampon d'incubation des enzymes de restriction (d'après les données de la firme BOEHRINGER)

Enzyme	Tris HCl (mM)	NaCl (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	β.Mercaptoéthanol (mM)	pH
Alu I	6	50	6	10 (3)	7,6
Bam HI	10	100	5	1	8,0
Bgl I	20 (1)	150	20	7	9,5
Bgl II	20 (1)	-	10	7	7,6
Bst EII	100	50 (2)	5	-	8,0
Cla I	10	-	10	-	7,5
Eco RI	100	50	10	-	7,6
Hae II	6 (4)	50	6	7	7,6
Hae III	6 (4)	50	6	7	7,7
Hha I	6	75	6	7	7,6
Hind II	10	50	10	14 (3)	7,6
Hind III	10	50	10	14 (3)	7,6
Hpa II	10	-	10	5	7,5
Pst I	10 (4)	50	10	-	7,0
Pvu	6	150	6	7	7,4
Sal I	6	125	6	7	7,5
Sma I	15	15	6	6	8,5
Xho I	6 (4)	150	6	7	7,5

- (1) Le tampon Tris-HCl est remplacé par glycine-NaOH  
(2) NaCl est remplacé par KCl  
(3) Le β mercaptoéthanol est remplacé par le dithioérythritol  
(4) 0,01 % de Triton X-100 est ajouté au tampon.

### \* Digestion de l'ADN.

La digestion de l'ADN est réalisée dans un tube eppendorf stérile, à raison de 30  $\mu\text{l}$  de la suspension d'ADN (1 à 2  $\mu\text{g}$ ), 15  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 5  $\mu\text{l}$  de tampon de digestion 10X. Après homogénéisation un volume adéquat de la solution d'enzyme correspondant à au moins 2 unités /  $\mu\text{g}$  d'ADN est ajouté. Une unité d'enzyme est définie comme la quantité nécessaire pour digérer 1  $\mu\text{g}$  de l'ADN du bactériophage  $\lambda$  en 1 h, dans le tampon adéquat, à la température de 37°C dans un volume total de 20  $\mu\text{l}$ . La suspension finale est incubée à la température de 37°C pendant 1 h 30.

- Pour limiter la consommation d'enzyme, il faut minimiser les volumes réactionnels. De plus, l'apport enzymatique doit constituer moins de 1/10ème du volume final, l'activité de l'enzyme pouvant être inhibée par l'excès de glycérol dans lequel on la conserve.

- Les enzymes de restriction sont stables à -20°C dans du tampon contenant 50 % de glycérol. Dans la préparation d'une digestion, le temps de décongélation de la solution enzymatique de réserve doit être réduit au maximum. Pour cela, dès sa sortie du congélateur, la solution est placée dans la glace, la quantité d'enzyme nécessaire est prélevée avec une micropipette stérile, et immédiatement homogénéisée dans le mélange de digestion contenant déjà tous les autres constituants. La solution de réserve est immédiatement recongelée.

- Une digestion multiple peut être menée simultanément avec deux ou plusieurs enzymes si celles-ci sont actives dans le même tampon. Dans le cas contraire, l'enzyme qui nécessite le tampon de force ionique la plus faible doit être utilisée en premier lieu. La force ionique du milieu réactionnel est ensuite ajustée, la seconde enzyme ajoutée et l'incubation poursuivie.

### \* Electrophorèse en gel d'agarose

La méthode standard pour séparer, identifier et purifier les fragments d'ADN est l'électrophorèse en gel d'agarose. La technique est relativement simple et rapide à mettre en œuvre. Elle s'avère particulièrement commode pour la détermination des poids moléculaires dans le cas de mélanges de fragments d'ADN ce qui ne pourrait l'être par d'autres méthodes telles que la centrifugation de zone en gradient de densité. De plus, les bandes d'ADN dans le gel sont localisées directement par coloration au bromure d'éthidium, produit s'intercalant entre les bases puriques et pyrimidiques et émettant en lumière ultraviolette une fluorescence rouge orangée. La sensibilité de la coloration permet de déceler des quantités de l'ordre de 1 ng d'ADN.

- La vitesse de migration d'un fragment d'ADN est fonction de la concentration en agarose. L'optimum de résolution, pour une gamme de poids moléculaire donnée, dépend de cette concentration .

Rapports concentrations en agarose des gels / pouvoir séparateur des molécules linéaires d'ADN (d'après MANIATIS et al., 1982).

Quantité d'agarose dans les gels (%)	Pouvoir de séparation des molécules d'ADN linéaires (PM x 10 <sup>6</sup> daltons)
0,3	36,0 - 3,30
0,6	13,0 - 0,65
0,7	6,5 - 0,50
0,9	4,5 - 0,30
1,2	4,0 - 0,28
1,5	2,5 - 0,13
2,0	2,5 - 0,07

- Entre 4 et 30°C, température à laquelle s'effectue l'électrophorèse, la mobilité des fragments de restriction n'est pas affectée. Cependant, pour des gels de concentration inférieure à 0,5 %, il est nécessaire de maintenir une température de 4°C afin d'éviter toute déformation.

Pour préparer un gel d'agarose horizontal de 15 x 20 cm, de 150ml, on procède comme l'indique le tableau 9. Le tampon d'électrophorèse: tampon TAE (Tris-acétate 0,04M; EDTA 0,001M) conservé à 10X est ajouté dans un erlen, à une quantité d'agarose qui dépend du pourcentage du gel.

Tableau 9 : Protocole de préparation du gel d'agarose

% du gel	0,60	0,70	0,80	1,00
Quantité d'agarose (g)	0,90	1,05	1,20	1,50
Volume de TAE (ml)	150,00	150,00	150,00	150,00
bain marie à ébullition jusqu'à dissolution de l'agarose puis refroidissement pendant 15mn				
BET (1 mg/ml) (µl)	15,00			

\* BET = Bromure d'éthidium

Le gel comporte 15 puits qui ne peuvent contenir que 60 µl maximum de suspension. L'électrophorèse se déroule toute une nuit sous une tension de 40 V (32 mA), en présence de tampon d'électrophorèse contenant ou non du bromure d'éthidium servant de colorant. Lorsque l'électrophorèse est conduite en présence de bromure d'éthidium, la mobilité de l'ADN est réduite d'environ 15 % du fait de l'augmentation de masse et d'encombrement de la molécule. La durée de l'électrophorèse doit alors être augmentée. De plus, l'intensité lumineuse des bandes correspondant aux fragments de faibles poids moléculaires est peu marquée. Il est nécessaire de recolorer le gel avant observation.

Les gels colorés sont observés par transmission sur une table lumineuse en lumière ultraviolette de longueur d'onde 302 nm. Les bandes correspondant aux différents fragments de restriction sont fluorescentes. Un cliché photographique sur film Polaroid positif/négatif est pris immédiatement, car l'intensité lumineuse s'affaiblit rapidement.

- Le bromure d'éthidium se fixe sur les ADN et les ARN mono et bicaténaires. Cependant, l'affinité du colorant pour les molécules monocaténaires est peu élevée et l'intensité de la fluorescence en U.V. est très faible. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la taille des fragments.

- Les bandes multiples, constituées par plusieurs fragments de poids moléculaires très voisins, présentent une intensité lumineuse plus élevée que celle des bandes simples.

- Une bande d'intensité lumineuse très inférieure à celle des bandes voisines peut correspondre à un produit de digestion incomplète.

## 5°). Techniques sérologiques

### a) Préparation des antisérums

Des antisérums spécifiques sont préparés à partir de lapins.

Le lapin reçoit lors de l'immunisation initiale, puis en rappel 7 jours plus tard, 1 ml de suspension virale (polyèdres) concentrée (1,5 µg de protéines/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 (polyèdres) et 1 ml d'ajuvant complet de FREUND. Le lapin est saigné 10 jours après le dernier rappel.

Les sérums recueillis après retraction du caillot, à température ambiante pendant 12 h, sont centrifugés pendant 10 minutes à 5000 rpm. Ils sont conservés au congélateur jusqu'au moment de l'utilisation.

## b) 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 divers origines). Les antigènes et anticorps diffusent à travers un gel d'agarose peu concentré (1 %) dans une solution NaCl 0,9 %.

Un mélange de 1 g d'agarose avec 100 ml de solution NaCl 0,9 % est chauffé au bain -marie jusqu'à ébullition pendant 15 min en présence d'une pincée de NaN<sub>3</sub> puis coulé à raison de 1,5 ml d'épaisseur (3 ml de la solution d'agarose par lame histologique

Après 15 minutes, 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. 25 µl d'antigène ou d'anticorps sont disposés dans chaque puits. Les lames ainsi préparées sont mises à incuber pendant 24 heures à température ambiante.

La plaque de gélose est alors lavée dans 4 bains d'eau physiologique (NaCl 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.

## **II - Techniques de production du virus en culture de cellules d'insectes**

### 1°) Techniques de primoculture

Des cultures sont tentées à partir de cellules d'hémolymphes des larves (chenilles) et d'ovarioles de nymphe. Le milieu de culture utilisé est le milieu Grâce contenant 10 % de sérum de veau de fœtal (SVF). Les cultures sont mises à incuber à 28°C.

Les vitamines sont préparées à part concentrées 1000 fois. Le volume adéquat est ajouté en lieu et place du groupe C.

Le pH du milieu est ajusté à 6,2 - 6,4 avec du KOH 10N. Le milieu ainsi préparé est filtré sous la hôte et placé 24 heures à 28°C puis conservé à 4°C.

Milieu Grace modifié par LERY (publication en cours)

Groupes	COMPOSANTES	Quantité (mg/l)	Groupes	COMPOSANTES	Quantité (mg/l)
(A)	L. Alanine	225,00	(C)	D. Biotine	0,01
	L. Arginine	700,00		Chlorure de choline	0,20
	L. Asparagine	350,00		Acide folique*	0,02
	L. ac.aspartique	350,00		Ca <sup>++</sup> pantothenate	0,02
	L. cystine*	27,17		Myo Inositol	0,02
	L. ac.glutamique	600,00		Niacine	0,02
	L. Glutamine	600,00		Ac.paraminobenzoïque*	0,02
	L. Glycine	650,00		Pyridoxine	0,02
	L. Histidine	2500,00		Riboflavine	0,02
	L. Isoleucine	50,00		Thiamine	0,02
	L. Leucine	75,00		-----	
	L. Lysine	625,00		(D) Mg Cl <sub>2</sub>	2280,00
	L. Methionine	50,00		Mg SO <sub>4</sub>	2780,00
	L. Phenylalanine	150,00	KCl	2240,00	
	L. Proline	350,00	Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1092,00	
	D.L. Serine	1100,00	Na H CO <sub>3</sub>	350,00	
	L. Thréonine	175,00	-----		
	L. Tryptophane	100,00	(E) Ac.a.éetoglutarique	370,00	
L. Tyrosine*	50,00	Ac. Fumarique	55,00		
L. Valine	100,00	Ac. Malique	670,00		
		Acide Succinique	60,00		
(B)	Penicilline	100,00	(F)	Glucose	700,00
	Streptomycine	100,00		Sucrose (saccharose)	26680,00
-----					
Eau bidistillée q.s.p. 1 litre					

A : Acides aminés

B : Antibiotiques

C : Vitamines

D : Sels minéraux

E : Acides gras

F : Sucres

\* Faire dissoudre à part dans quelques gouttes de soude (NaOH) pH 8

\*\* Faire dissoudre à part dans quelques gouttes de HCl

a) Primoculture à partir d'hémolymphe de larves

La larve après passage dans deux bains désinfectant d'alcool à 70° est maintenu par la face dorsale avec une pince stérile. Une incision est pratiquée à l'aide d'une lame de scapel stérile sur la face ventrale au niveau d'une pseudopatte tout en évitant d'atteindre le tube digestif qui contient des bactéries.

Le liquide qui en sort de couleur jaunâtre ou très souvent clair est recueilli par goutte dans des boîtes de culture contenant 1 ml de milieu (une goutte par boîte de Pétri C35)

c'est la technique de la goutte pendante (QUIOT, 1975). Par ailleurs, une pipette pasteur stérile peut être utilisée pour recueillir l'hémolymphe au cas où l'écoulement n'est pas suffisant.

Après 20 à 30 min à 28°C quand les cellules ont adhéré au fond de la boîte le milieu de culture est éliminé. Les cellules sont rincées trois fois, à l'aide de tampon PBS (NaCl 8 g/l, KCL 0,4g/l glucose 1g/l bicarbonate de Na 0,35g/l, antibiotique (ATB) bicarbonate de Na 0,35 g/l, antibiotiques (ATB) : pénicilline et streptomycine à 100 µg/ml) pour éliminer d'éventuels germes infectants. On ajoute du milieu G10 (1,5 ml dans le cas des boîtes de Pétri C35 ou 4 ml dans les boîtes F30). L'incubation est réalisée à 28°C. Un contrôle au microscope optique en contraste de phase est nécessaire pour éliminer les boîtes contaminées car malgré toutes précautions prises (conditions aseptiques strictes), les cellules peuvent être infectées à partir de l'hémolymphe elle-même.

#### b) Primoculture à partir d'ovarioles de nymphe

La dissection est réalisée sous une loupe binoculaire. Afin de prélever les nymphes au stade préimaginal (yeux noirs) voulu, les lots de mâles et de femelles sont séparés. Les cocons mâles sont ouverts régulièrement afin de suivre l'évolution de la nymphose. Quand celles-ci sont au stade voulu, les cocons femelles sont ouverts et les nymphes disséquées. Les ovarioles situés dans la partie moyenne de l'abdomen sont prélevées après dissection à l'aide de microciseaux et de micropinces. Les ovarioles chez ces nymphes en forme de chapele présentent trois stades classés en fonction de leur différenciation. Il est conseillé d'utiliser les ovarioles au stade 1 car leurs cellules poussent mieux du fait de la moindre différenciation du tissu (voir chapitre II)

Ces ovarioles sont débarassées de leurs adhérences (graisse) dans une boîte contenant du milieu de culture sans sérum. Des boîtes différentes sont préparées en fonction de la partie (stade) qu'on récupère. Les ovarioles sont découpées en petits morceaux, les œufs sont brisés et dispersés par petit explant dans les boîtes de culture C35 auxquelles on ajoute 0,5 ml de milieu G10. Après incubation à 28°C pendant 1 heure, les cellules adhèrent au support, 1,5 ml de milieu G10 est ajouté. Un contrôle au microscope optique est effectué comme précédemment.

#### c) Entretien de la primoculture

Le milieu de culture dans les cas cités plus haut est renouvelé périodiquement dans un délai de 6 à 7 jours. Pour cela, on retire le milieu de culture des boîtes par un léger pipetage pour éviter de décoller les cellules adhérentes.



Les cellules du surnageant récupérées en même temps que le milieu sont mise au culot à 1500 rpm pendant 5 minutes et remis dans la même boîte avec 1,5 ml de milieu frais. constituant un premier passage. Du milieu neuf est remis dans la boîte initiale. Les boîtes sont remises à incuber à 28°C.

## 2°) Croissance et multiplication des lignées cellulaires

Après la réalisation des primocultures, l'obtention des lignées cellulaire spasse par l'entretien, et surtout la patience. Le premier passage peut intervenir au bout de plusieurs mois (voir chapitre II). Il en est de même pour le passage suivant. Ce n'est que quand la lignée est bien établie (ce qui peut arriver au bout de 10 passages qu'elle se stabilise et qu'on la repique tous les 5 jours. Ce temps étant spécifique du mode d'ensemencement que nous avons choisi.(2 millions de cellules par boîte F30 où 0,5 M de cellules par boîte C35 avec les lignées que nous utilisons). Ce temps peut ne pas être le même pour d'autres lignées.

Pour réaliser le repiquage, les cellules qui adhèrent sont décollées et récupérées par des pipetages vigoureux en même temps que le milieu de culture. Après centrifugation 5 min à 1500 rpm, les cellules sontensemencées dans les boîtes de cultures filles à savoir 1,5 à 2 millions de cellules / F30 ou 0,5 millions / C35. La numération des cellules et le test de viabilité des cellules au bleu evans 0,1 % qui colore en bleue les cellules mortes est réalisé à l'aide d'un hématimètre de THOMAS.

## 3°) Production de Baculovirus à partir de lignées cellulaires et de primocultures

### a) Infection des cultures cellulaires

Les infections sont réalisées dans les flacons F30 ou F250 sur les cultures cellulaires en phase de croissance logarithmique (3 à 4 jours après le repiquage). Les virions purifiés sont dilués dans le milieu de culture GRACE sans sérums et le mélange filtré sur 0,22  $\mu$ . Les flacons reçoivent 1 ou 2 ml de cet inoculum et sont placés à 28°C tout en étant légèrement remués pour que la suspension virale occupe toute la surface des cellules adhérentes. Après une heure de contact, le virus est éliminé et 4 ou 10 ml du milieu Grace contenant 3 % de SVF sont ajoutés suivant les boîtes utilisées, qui sont replacées à 28°C. On ajoute au milieu moins de sérum de veau foetal (3 %), pour ralentir la multiplication des cellules.

Dans le cas de primocultures une fois les boîtes suffisamment riches, on procède de la même façon. L'effet cytopathique est suivi au microscope optique tous les 2 jours.

Les virus sont récupérés après 5 jours de culture et purifiés. Des virions libres dans le milieu de culture (surnageant) peuvent être réutilisés pour réinfecter de nouvelles cellules ou purifiés.

#### b) Purification du virus produit

Les cellules contenant les polyèdres sont ultrasonnés pour les faire éclater. Les virions sont centrifugés à 18000 rpm, pendant 2 heures dans un gradient 20 - 50 % et les polyèdres à 25000 rpm dans un gradient 40 - 60 % (saccharose-Tris) pendant 30 minutes. Après leur extraction à partir de polyèdres purifiés les virions seront purifiés comme précédemment.

#### 4°) Conclusion

Un impératif sérieux pour les cultures de cellules est la manipulation dans des conditions d'asepsie stricte pour éviter les infections non souhaitées. De plus, à part les antibiotiques utilisés (dérivés de la pénicilline), des fongicides peuvent être additionnés au milieu pour empêcher la prolifération des levures et autres champignons.

## CHAPITRE IV

### A . Introduction

Les contrôles sanitaires de routine effectués dans les plantations industrielles de palmiers à huile de la Palminindustrie et de la Station La Mé de l'IRHO ont permis aux entomologistes de signaler d'importants dégâts causés par les larves du Lépidoptère Limacodidae *Latoia viridissima*.(PL.II, Fig. 6). Ces pullulations s'accompagnent parfois de mortalités anormales affectant une partie de la population de ce ravageur.

Des prélèvements d'individus moribonds furent effectués dans le but d'étudier les causes de cette mortalité. Nous avons étudié les symptômes de la maladie sur des larves malades prélevées en plantation et des larves présumées saines infectées expérimentalement au laboratoire. Puis afin de déterminer l'étiologie, nous avons recherché l'agent pathogène responsable.

### B . Symptômes de déroulement de la maladie

Les premiers symptômes consistent en une diminution d'activité et d'appétit des larves atteintes. La prise de nourriture s'arrête complètement entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>e</sup> jour après la contamination alors que les chenilles s'immobilisent sur les folioles. Les jeunes larves (jusqu'au 4<sup>e</sup> stade) meurent rapidement dès le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> jour après la 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 vif, les larves deviennent vert pâle puis jaune. Avant la mort des sécrétions buccales et annales de couleur jaunâtre s'écoulent. Le corps de la larve devient alors très flasque. Les jeunes chenilles meurent généralement collées au substrat, alors que les larves plus âgées tombent au sol.

### C . Etude de la pathologie chez *Latoia viridissima*

Début décembre 1987, suite à une pullulation de *Latoia viridissima* sur la plantation IRHO de La Mé, nous avons récolté de nombreux cocons que nous avons divisé en quatre lots. Le premier lot a servi pour les essais de primocultures tandis que les 3 autres ont fait l'objet d'une étude sur le parasitisme des cocons. Cette expérience nous servira de témoin pour les infections naturelles.

1° Parasitisme chez *Latoia viridissima* (tableau 11)

TABLEAU 11 : Etude sur le parasitisme de cocons de *Latoia viridissima*.

DATES	VIVANT		MORT		TOTAL
	ADULTE	DIPTERE	HYMENOPTERE	AUTRE	
05/01	5	7	0		7
06/01	19	29	0		29
07/01	37	34	0		34
08/01	69	39	0		39
09/01	126	57	0		57
10/01	183	69	0		69
11/01	232	75	0		75
12/01	312	81	0		81
13/01	429	82	0		82
14/01	564	83	0		83
15/01	703	85	0		85
16/01	897	96	0		86
17/01	1185	86	0		86
18/01	1478	86	0		86
19/01	1661	86	0		86
20/01	1910	86	0		86
21/01	2135	86	0		86
23/01	2307	86	0		86
24/01	2402	86	0		86
25/01	2539	86	1		87
26/01	2680	86	2		88
27/01	2771	86	6		92
28/01	2815	86	11		97
29/01	2883	86	12		98
30/01	2921	86	13		99
31/01	2946	86	14		100
01/02	2954	86	14		100
02/02	2975	86	17		103
03/02	2986	86	22		108
04/02	2987	86	23		109
05/02	2989	86	37		123
08/02	2993	86	62		148
09/02	2993	86	74	875	160
<b>TOTAL</b>	<b>2993</b>	<b>86</b>	<b>142</b>	<b>875</b>	<b>1103</b>
<b>%</b>	<b>73,07</b>	<b>2,10</b>	<b>3,47</b>	<b>21,36</b>	<b>26,93</b>

Sur les 4.096 cocons (provenant des 3 derniers lots) mis en élevage, 2.993 adultes sont sortis dont plus de la moitié présentaient des malformations. Parmi les larves mortes, 86 étaient parasitées par des diptères et 142 par des hyménoptères. Les 875 autres étaient mortes de maladie, soit 21,36%.

Les adultes ont été mis en élevage dans des cages propres. Des pontes ont été observées, mais la majorité avait lieu ailleurs que sur les feuilles. Pourtant une dizaine de ponte ont pu être récupérées et remises dans des cages séparées. Une seule ponte a aboutit à l'éclosion de chenilles qui sont mortes entre le 2<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> stade larvaire de maladie.

La mortalité importante causée par la maladie peut être due à des agents pathogènes tel que bactéries, champignons, protozoaires et virus.

## 2°) Infection expérimentale des larves

Du fait que nous n'avons pas réussi à maintenir un élevage de larves saines au laboratoire, nous avons comparé les mortalités observées chez les larves récoltées en plantation en période de pullulation et les larves du même stade infectées *per os* par une suspension obtenue après clarification d'un broyat de larves mortes (tableau 12).

TABLEAU 12 Pourcentages cumulés de mortalité chez des larves infectées *per os* et des larves récoltées en plantation

Nbre de jours	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
112 larves infectées	5	36	56	72	88	96	100			
112 larves récoltées non infectées	5	12	20	34	45	57	64	78	80	82

Une semaine après la mise en observation, nous constatons 64% de mortalité chez les larves récoltées. Une partie de ces larves était infectée naturellement et la maladie s'est ensuite rapidement propagée dans la cage. Il peut arriver aussi que des larves présumées saines, mais porteuses de l'agent causal dans les conditions naturelles s'infectent lorsqu'elles se retrouvent en conditions d'élevage. Dans ce même délai (7jours) toutes les chenilles infectées expérimentalement meurent. On remarque aussi que dès le 2<sup>e</sup> jour, le pourcentage de mortalité s'élève rapidement pour atteindre 100% le 7<sup>e</sup> jour après l'infection (PL. IV, Fig. 9) Nous sommes donc en présence d'un agent particulièrement pathogène.

## D . Recherche de l'agent pathogène

Différentes recherches en microscopie photonique sur des frottis de broyats de larves mortes ont révélé la présence de particules hexagonales ou rectangulaires faisant penser à des corps d'inclusion. Pour éliminer l'hypothèse de cristaux, les frottis ont été coloré pendant quelques secondes par le bleu de méthylène de LOEFFLER et observés en fond clair et en contraste de phase. Les particules apparaissent alors comme des polyèdres.

Au microscope électronique à transmission en plus de ces grosses particules, déjà observées au microscope photonique, d'autres particules beaucoup plus petites, en forme de bâtonnet de 300 nm de long ont été observées. Enfin, en observant à un grossissement encore plus élevé, des particules de formes icosaédrique, mesurant 30 nm de diamètre (Planche III, Fig.8) sont observées. Ces dernières ont déjà fait l'objet d'une étude (FEDIERE, 1983). Nous avons donc entrepris la purification des deux premières particules afin de les caractériser.

## E . Caractérisation du virus

### 1°) Purification

Les larves infectées et mortes de *Latoia viridissima* sont broyées dans du tampon Tris-Hcl 0,05 M de pH 7,8 contenant 0,006 M de SDS pour favoriser la dispersion des particules. Les virus présents dans le broyat sont purifiés par plusieurs cycles de centrifugation en gradients de densité de saccharose selon les techniques exposées dans le chapitre III.

Les polyèdres sont purifiés en gradient de saccharose, 40-60% (poids/poids) et sédimentent en une large bande visible à l'œil nu dans le 1/3 inférieur du gradient. Les virions eux, après extractions sont purifiés dans un gradient 20-50% (P./P) et sédimentent en plusieurs bandes (3 bandes, donc de types "multiples embedded") ainsi que le révèle l'analyse absorptiométrique à 260 nm. Ceci suppose que les virions possèdent un nombre variable de nucléocapsides.

### 2°) Structure du virus

Le Baculovirus de la polyèdrose nucléaire de *Latoia viridissima* possède une forme en bâtonnet et mesure 340 nm de long avec un diamètre de 50 nm. (PL. III, Fig.7). L'étude ultrastructurale fait apparaître au niveau du noyau des virions libres et d'autres enfermés dans une enveloppe de nature protéinique (corps d'inclusion) dont l'ensemble constitue le polyèdre de forme globuleuse (PL. XII, Fig. 22)

### 3°) Spectre d'absorption en lumière ultra-violette

Le spectre d'absorption dans le proche ultra-violet d'une suspension de Baculovirus purifiés est caractéristique des nucléoprotéines présentant un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm (PL.V, Fig. 10) . Les rapports  $DO_{260}/DO_{280}$  et  $DO_{260}/DO_{240}$  sont respectivement 1,38 et 1,07.

### 4°) Analyse électrophorétique des protéines virales

Le nombre et les poids moléculaires de la protéine du polyèdre (polyédrique) et celles des protéines capsidaires du Baculovirus de *Latoia viridissima* ont été déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 8% selon la méthode de WEBER et OSBORN (1969).

#### a) Electrophorégrammes

La migration de la polyédrique du Baculovirus de *Latoia viridissima* est visible sur la planche VI, Fig.11 (LVP), par rapport à celle du Baculovirus de *Teinorhyncha umbra* (Lépidoptère Limacodidae) ravageur du bananier, dont l'étude n'avait jamais été menée. Les polypeptides capsidaires du Baculovirus de *L. viridissima* sont visibles sur la planche VI, Fig. 12.

#### b) Poids moléculaires des protéines virales

L'analyse de ces données nous renseigne sur le poids moléculaire de la polyédrique du Baculovirus de *Latoia viridissima* qui est de 30.000 daltons (PL. VII, Fig. 13 ) ainsi que celle de *Teinorhyncha umbra* . Les poids moléculaires des principaux polypeptides de ce Baculovirus (planche VII Fig. 14) sont mentionnés sur le tableau n° 13 en comparaison avec ceux des Baculovirus de polyédrose nucléaire de deux Lépidoptères Tortricidae, *Adoxophyes orana* F.V.R., et *Pandemis heparana* (ABOL-ELA, S. 1983).

Nous sommes donc en présence d'un Baculovirus constitué de 11 polypeptides principaux, dont les poids moléculaires varient de 14.000 à 70.000 daltons. En comparaison ceux d'*A. orana* varient de 14.400 à 70.500 et ceux de *P. heparana* varient de 13.700 à 74.000 daltons.

TABLEAU 13 : Poids moléculaires des polypeptides majeurs des virions du Baculovirus de *L. viridissima*, *A. orana* et *P. heparana*

Polypeptides	VPN de <i>L. viridissima</i>	*VPN d' <i>A. orana</i>	* VPN. <i>P. hepara</i>
1	14.000	14.400	13.700
2	16.000	22.500	29.500
3	18.000	28.000	34.000
4	19.500	31.000	38.000
5	21.000	34.000	40.000
6	25.000	48.000	49.000
7	28.000	68.000	62.000
8	38.000	70.500	68.500
9	52.000	-	74.000
10	60.000	-	-
11	70.000	-	-
Polyédrine	30.000	28.000	31.000

\* D'après ABOL-ELA, S. (1983)

#### 5°) Caractérisation de l'ADN viral

L'ADN du Baculovirus purifié par extraction phénolique suivie d'une dialyse de 48 heures en tampon TE a été précipité pendant 2 heures à l'acétate de sodium 0,3 molaire final en présence de 2 volumes de méthanol absolu. Le culot obtenu après centrifugation à 15000 t/mn pendant 30 min est séché par évaporation et repris dans 1 ml de tampon TE.

##### a) Spectre d'absorption en lumière ultra-violette

La pureté des préparations est contrôlée par leur spectre d'absorption en ultraviolet. L'enregistrement de l'un d'eux, présenté sur la planche VIII (fig. 15, indique un rapport  $D_{260}/D_{280}$  égal à 1,8 mettant en évidence la pureté de l'acide nucléique.

##### b) Digestion de l'ADN

La digestion de l'ADN du Baculovirus de la polyédrose nucléaire de *L. viridissima* a été réalisée par deux endonucléases, Eco RI et Bam HI. L'électrophorégramme visible sur la planche IX, Fig.16 montre la séparation en gel d'agarose à 0,6% des segments obtenus.



Les enzymes Eco RI et Bam HI génèrent respectivement 15 et 8 fragments qui sont schématisés sur la fig.18 (PL. X) .

c) Estimation du poids moléculaire du génome

Les poids moléculaires des segments obtenus par les endonucléases de restriction Eco RI et Bam HI sont donnés dans le tableau 14. L'estimation de ces poids moléculaires s'est faite par rapport à l'ADN du bactériophage  $\lambda$  digéré par Eco RI et Hind III et qui génère des fragments de poids moléculaires suivants : 14.00, 3,40, 3,28, 2,82, 2,33, 1,34 et  $1,26 \times 10^6$  daltons (fragments visibles sur le gel d'agarose 0,6%). De cette façon, les 15 segments générés par Eco RI varient entre  $1,9 \times 10^6$  et  $11,5 \times 10^6$  daltons et les 8 segments générés par Bam HI varient entre  $1,6 \times 10^6$  et  $16 \times 10^6$  daltons.

TABLEAU 14 : Poids moléculaires des segments des ADN des Baculovirus de la polyédrose nucléaire de *L. viridissima*, obtenus par les endonucléases de restriction Eco RI et Bam HI

Symbole des segments	Eco RI	Bam HI
	x $10^6$ daltons	x $10^6$ daltons
a	11,50	16,00
b	9,00	14,00
c	6,00	9,00
d	4,70	6,60
e	4,10	4,40
f	3,70	3,70
g	3,40	3,30
h	3,30	3,10
i	3,20	
j	3,00	
k	2,70	
l	2,40	
m	2,20	
n	2,05	
o	1,90	

Ainsi le poids moléculaire de l'ADN de *L. viridissima*, estimé en faisant la somme des poids moléculaires des fragments obtenus avec Eco RI ( $63,15 \times 10^6$  daltons, soit 95.600 paires de bases), diffère très peu de celui obtenu avec les fragments générés par Bam HI ( $60,1 \times 10^6$ , soit 94.000 paires de bases).

Il en résulte que le poids moléculaire de l'ADN du Baculovirus de *L. viridissima* peut être estimé à environ  $62 \times 10^6$  daltons, soit 94.000 paires de bases.

#### 6°) Etude immunologique

Deux immunsérums de lapin ont été préparés contre les protéines des polyèdres de *L. viridissima*. Ces sérums provoquent un immunoprécipité lorsqu'ils diffusent en gel d'agarose à 1% contre la polyédrine obtenue par solubilisation des polyèdres du Baculovirus de *L. viridissima* en milieu alcalin.

Nous avons comparé, par précipitation en gel, différentes préparations virales composés de polyèdres purifiés. Nous avons fait agir le sérum antipolyédrine du Baculovirus de *L. viridissima*, contre la polyédrine de *T. umbra*, de *Spodoptera littoralis* et d'*Heliothis armigera*. Aucun précipité ne se forme contre ces trois protéines.

Ces résultats indiquent l'absence de parenté antigénique entre le Baculovirus de *L. viridissima* et les Baculovirus disponibles au laboratoire. Cette caractérisation sérologique nous pousse à penser qu'il s'agit d'un virus nouveau.

### F . Production du virus en culture cellulaire

#### 1°) Introduction

Dans le but de la production massive de virus utilisable en lutte biologique, des essais d'infection sont réalisées sur des lignées cellulaires, déjà établies et disponible au laboratoire. Il en est de même pour les lignées spécifiques et primocultures réalisées parallèlement à la caractérisation du virus.

#### 2°) Infection des lignées existantes

Des essais d'infection réalisés avec les polyèdres directement après purification, n'ont donné aucun résultat car les cultures étaient régulièrement infectées par des moisissures et des bactéries. Il a donc été nécessaire d'avoir des quantités suffisantes de virions purifiés pour renouveler les essais. Dans ce cas, le virus dilué dans du milieu de culture Grace 3% SVF peut être stérilisé par filtration sur  $0,22 \mu$ . Les premiers résultats obtenus avec les virions sur les lignées semblent indiquer que ces dernières ne sont pas permissives au virus. Ces essais ont été réalisés sur les trois lignées cellulaires suivantes

- lignée cellulaire de *Spodoptera littoralis*,
- lignée cellulaire de *Spodoptera frugiperda*,
- lignée cellulaire de *Choristoneura fumiferana*.

### 3°) Mise au point d'une lignée spécifique

#### a) A partir d'ovarioles de nymphe

Les ovarioles ont été prélevés sur les nymphes femelles issues du 1<sup>er</sup> lot (voir ci-dessus) (cocons plus gros). Les mâles qui constituent 60% de ce lot nous permettent de suivre l'évolution de la nymphose à l'intérieur du cocon, pour déterminer la date des prélèvements. Les premières primocultures furent réalisées fin décembre, quand les premières nymphes avaient atteint le stade voulu, pour le prélèvement des ovarioles (yeux noirs). 120 nymphes femelles ont été disséquées. Les ovarioles prélevées et rincées dans du milieu Grace sans sérum, sont mises en culture avec du milieu Grace contenant 10% ou 20% de sérum de veau fœtal dans des boîtes de Pétri C35, des boîtes 24 puits (NUNC) ou des boîtes F30.

Deux types de changement de milieu ont été utilisés et cela une fois par semaine. Dans un premier lot, le milieu est enlevé entièrement, centrifugé, le culot repris dans du milieu neuf et remis en culture dans un nouveau puits. Dans un deuxième lot, du milieu neuf est seulement rajouté régulièrement à la culture. Sur la totalité des mises en culture réalisées, plus de la moitié des puits se sont trouvés infectés par des moisissures. Les essais se sont poursuivis et une F30 (Grace 20% SVF), après avoir montré le boom multiplicatif décrit par QUIOT dans ses publications a pu être repiquée 2 fois (après 15 jours de primoculture et une semaine après ce premier passage). Par la suite, ces cellules se sont multipliées doucement (phase d'attente) avant de dégénérer. Deux autres cultures, en plaque de 24 trous respectivement en Grace 10% et Grace 20% se sont maintenues plus d'un mois en primoculture. En effet, aucune multiplication n'était apparente pendant les trois premières semaines sans qu'il y ait mort des cellules. Depuis ce temps, une faible activité cellulaire a été notée, mais nous étions loin d'obtenir le tapis cellulaire attendu. Cette culture a été pourtant maintenue, le milieu changé régulièrement et la primoculture a pu être conservée de nombreux mois.

Sur les boîtes restantes 3 jours après la mise en primoculture, des cellules commencent à apparaître par bourgeonnement des fragments d'ovarioles ( PL. XI, fig.19). Après une semaine, une multiplication cellulaire permet la formation de petits amas au voisinage des explants (PL. XI, fig.20) et des cellules isolées se multiplient. Après deux semaines de primoculture, des polyèdres ont commencé à apparaître dans les cellules (PL.XI, fig. 21) et cela sur la presque totalité des cultures restantes.

Sur les 120 cocons utilisés aucun n'a pu donner naissance à une lignée. Même si les cultures ont pu être maintenues pendant plusieurs semaines, l'invasion des polyèdres a abouti inexorablement à l'éclatement et à la dégénérescence des cellules. De ce fait aucune différence n'a pu être notée entre les différentes techniques de primocultures utilisées.

Etant donné les difficultés de mettre en œuvre les nouvelles lignées, nous avons fait des essais parallèles de mise en culture d'hémocytes à partir de l'hémolymphe des larves de cette même espèce.

#### b) Lignée cellulaire à partir d'hémolymphe

Les chenilles issues de 3 récoltes différentes, constituant ainsi 3 lots ont servi de matériels vivants pour cette étude. Chaque lot était constitué d'une vingtaine de chenilles et était nommé respectivement : lot n°1 du 25/06/88, lot n° 2 du 02/07/88 et enfin lot n° 3 du 04/07/88. Le premier lot a permis de réaliser l'encemencement de 4 boîtes de 4 puits chacun, à raison d'une chenille par puits. Pour les 2 premières boîtes (8 puits), le prélèvement de l'hémolymphe s'est effectué avec une pipette pasteur. Pour les deux autres boîtes on a posé directement sans aspirer les gouttes d'hémolymphe qui se formaient après incision d'une pseudopatte.

Après 4 jours de culture, les 2 premières boîtes sont infectées par des bactéries et éliminées. Quand aux deux dernières boîtes, l'une restait saine mais ne possédait presque plus de cellules, et l'autre était infectée par des moisissures. L'hémolymphe des deux derniers lots est prélevée par la technique de la goutte pendante et encemencée dans des boîtes de Pétri (C35).

Dès le 2<sup>e</sup> jour de culture sur les 20 boîtes de culture du lot n°2, 5 sont infectées par des moisissures tandis que pour le lot n°3 comportant 15 boîtes de culture, ce même nombre d'infection n'est atteint qu'après 5 jours d'incubation à 28°C dans le milieu Grace 10% SVF. Dans ce dernier cas, 2 infections par des bactéries sont notées. Pour cette même période, seules 50% des cultures du lot n°2 restent saines .

Dans les boîtes saines, on constate que dès la mise en culture, de nombreuses cellules adhèrent aux parois du flacon. deux types distincts de cellules sont observés, des cellules rondes et des cellules allongées (PL. 13, fig. 23 et 24). Après 1 semaine d'incubation à 28°C, on constate la présence de grandes cellules allongées de type fibroblastique (PL. XIV, fig.25), des petites cellules allongées et des petites cellules rondes de type hémocytaire. (PL. XIV, fig.26 et 27). A partir de ce moment, on remarque aussi que 7 boîtes sur le total des deux lots ne contiennent pratiquement pas de cellules. Elles sont quand même maintenues en culture sans changement de milieu.

Comme pour les primocultures d'ovariole, on a pu constater dans une des boîtes du 3<sup>e</sup> lot, l'apparition de polyèdres dans les cellules (PL. XIV, fig. 28). Après 15 jours d'incubation, le 2<sup>e</sup> renouvellement du milieu de culture est effectué sur un nombre très réduit de cultures. (Celles ne contenant pratiquement pas de cellules, et celles dont les cellules ont dégénéré ou ont été infectées sont éliminées).

L'observation au microscope du reste des cultures montre la présence dans les boîtes des petites cellules rondes ou allongées. Les grandes cellules allongées éclatent et se décollent dans le milieu. 5 boîtes du 3<sup>e</sup> lot et 9 boîtes du 2<sup>e</sup> lot ont été repiquées dans du milieu neuf.

Après 3 semaines de culture, les milieux des boîtes présumées contenir des polyèdres (3 boîtes) ont été recueillies et après ultrasonnage, et dépôt sur gradient 40-60% (poids/poids) ont confirmé les résultats avancés plus haut. Actuellement, seules 5 cultures sont vraiment exemptes de moisissures et de bactéries. Elles ont leur milieu renouvelé régulièrement une fois par semaine. Après 2 mois de culture, on observe que seuls 14% des cultures initiales n'ont pas été infectées par des microorganismes. Après 4 mois une seule boîte est maintenue en culture.

Par la suite, des cultures à partir d'un 4<sup>e</sup> lot de chenilles (lot du 05/09) ont été réalisées selon la technique de la goutte pendante. L'hémolymphe est recueilli après incision d'une pseudopatte dans un volume de milieu Grace 10 % SVF. Après une mise au culot des cellules par centrifugation à 1500 rpm, le milieu neuf est rajouté aux cellules qui sont réparties dans des boîtes de Pétri C35.

On observe cette fois-ci 50 % d'infection après 2 mois et demi de culture. L'autre moitié des cultures, après avoir connu un boom multiplicatif est maintenue en culture et a déjà été repiquée 4 fois.

Les essais d'infection sur ces primocultures n'ont pas encore été tentées, pour les mêmes raisons que précédemment. Néanmoins, le fait que les cellules puissent être infectées de manière endogène par des polyèdres ainsi que la lignée cellulaire spécifique de *Latoia viridissima* en cours d'établissement sont des résultats encourageants pour la suite des expériences.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble des résultats ci-dessus présentés nous permettent de classer le virus que nous venons d'identifier comme un Baculovirus. Ces virus en forme de batonnet Baculovirus de 344 nm de long et 50 nm de diamètre, constitués de 11 polypeptides de poids moléculaire variant de 14.000 à 70.000 daltons, sont pris dans une trame polypeptidique : la polyédrine constitué d'un seul polypeptide de PM de 30.000 daltons. Le génome est constitué d'une molécule d'ADN dont le poids moléculaire est estimé à  $62 \times 10^6$  daltons. Ces données sont en accord avec les caractéristiques générales de la famille des Baculoviridae et en particulier du sous groupe A des virus de polyédrose nucléaire selon MATTHEWS (1982)

L'action des enzymes Eco RI et Bam HI sur la molécule d'ADN génère respectivement 15 et 8 fragments. Ce virus ainsi caractérisé diffère des autres Baculovirus déjà caractérisés.

Dans le but de produire ce virus en gros volume, des primocultures de cellules de *L. viridissima* ont été réalisées. Après le boom multiplicatif des cellules, une nouvelle lignée cellulaire est en train de s'établir après 3 mois de primoculture. Ce dernier résultat vient renforcer nos espoirs quand à la production massive de ce virus en culture de cellules pour lutter contre ces insectes dont les dégâts sur les palmacées interviennent directement sur leur productivité. Il a été démontré la grande spécificité de ces virus, comme en témoigne l'absence de multiplication de ce Baculovirus sur d'autres lignées cellulaires. La lignée spécifique dont l'établissement est en cours, montre un pourcentage de réussite satisfaisant dans la mesure où nous nous situons largement au dessus du pourcentage habituel de 1 % comme l'annoncent MITSHASHI et al., en 1985.

Les tests de pathogénicité au laboratoire nous indique le caractère pathogène de ce virus. Les épizooties bien que lentes à démarrer qu'il s'avère capable de déclencher dans les conditions naturelles nous permettent de fonder un espoir pour son utilisation future en lutte biologique.

Les résultats obtenus lors des essais d'élevage, montrent qu'une importante partie des larves présentent des infections latentes peut penser que le stress dû au transport de ces insectes, ainsi que le confinement en cage sont des facteurs physiques de déclenchement de la maladie.

La contamination des suspensions de polyèdres par les Picornavirus caractérisés par FEDIERE (1983) a été un grand problème à surmonter dans la purification du Baculovirus. Il a été de même de la non disponibilité du microscope électronique.

Dans leur ensemble les résultats présentés dans ce mémoire apportent une contribution à la pathologie des invertébrés par non seulement la mise en évidence d'un nouveau virus mais aussi à l'inventaire des lignés cellulaire d'insectes grace à l'établissement d'une nouvelle lignée à partir d'hémocytes de *L. viridissima* .

Sur le plan de la formation , ce stage nous a permis de nous familiariser à l'ensemble des techniques virologiques, de biologie moléculaire et de cultures de cellules.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOL-ELA (S.). -1983. Recherches sur les infections virales des Lépidoptères Tortricidae, contribution à la connaissance des effets physiopathologiques des Baculovirus. *Thèse doc. d'Etat ès science, USTL, Montpellier, 341p.*
- BALACHOWSKY (A. S.). - 1972. Traité d'entomologie appliquée à l'agriculture. *Masson, Paris, II, p. 1059.*
- BARNES (D.). - 1987. Serum-free of animal cell culture. *Biotechniques*, **5**, 534-541.
- BELLET (A. J. D.). - 1968. The iridescent virus group. *Adv. virus res.*, **13**, 225-246.
- BELLONCIK (S.), QUIOT (J.M.), ARELLA (M.), LECOMTE (J.). - 1985. Etablissement d'une nouvelle lignée cellulaire (IAFES-1) à partir d'ovarioles d'*Euxoa scandens* (Lépidoptère Noctuidae). *Entomophaga*, **30**, 51-54.
- BORSNSTEIN (P.), DUSKIN (D.), BALIAN (G.), DAVIDSON (J.M.), CROUCH (E.). - 1978. Organisation of extracellular proteins on the connective tissue cell surface : relevance to cell matrice interactions *in vitro* and *in vivo*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **312**, 93-105.
- BRADFORD (M. N.). - 1976. A rapid and sensitive method, for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins dye binding. *Ann. Biochem.*, **72**, 248-258.
- BRANCHE (R.). - 1983. La production industrielle de cellules humaines et animales en vue de la fabrication de vaccins viraux. *Biofutur*, **17**, 67-70
- BRANCHE (R.). - 1984. Production industrielle des cellules humaines et animales en vue de la fabrication des vaccins viraux. *Rapport Mérieux*, **49 p.**
- BRENNER (S.), HORNE (R.W.). - 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta*, **34**, 103-110.
- CHAO (J.), BALL (G. H.). - 1971. A cell line isolated from haemocytes of *Samia cynthia pupae*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **55**, 28-32.



- COCK (M. J. W.), GODFRAY (H. C. J.). - 1985. Report on program for the biological control of selected coconut pest in the philippines CIBC, *Imperial College. UK, 75 p.*
- COUCH (J. A.), SUMMERS (M. D.), COURTNEY (L.). - 1975. Environmental significance of Baculovirus infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **266**, 528-536.
- CROIZIER (G.), CROIZIER (L.). - 1977. Evaluation du poids moléculaire de la protéine des corps d'inclusion de divers Baculovirus d'insectes. *Arch. Virol.*, **55**, 247-250.
- DAVIS (K. D.), SHEARN (A.). - 1977. *In vitro* growth of imaginal disks from *Drosophila melanogaster*. *Science*, **196**, 438-439.
- DESMIER de CHENON (R.), MARIAU (D.), MONSARRAT (P.), FEDIERE (G.), SIPAYUNG (A.). - 1988. Recherches sur les agents entomopathogènes d'origine virale. *Oléagineux*, **43**, 107-117.
- FAULKNER (P.), HENDERSON (J. F.). - 1972. Serial passage of a nuclear polyhedrosis disease virus of the cabbage looper (*Trichoplusia ni*) in a continuous tissue culture cell line. *Virology*, **50**, 920-924.
- FEDIERE (G.), DESMIER de CHENON (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. *Colloq. Intern. Protec. Cult. Trop., Lyon, France, 8-10 juillet*, p. 62.
- FEDIERE (G.). - 1983. Recherches sur des viroses epizootiques de Lépidoptères Limacodidae, ravageurs de Palmacées. *Thèse de Doctorat 3e cycle Université du Languedoc, Montpellier. 130 p.*
- FEDIERE (G.). - 1985. Mise en evidence de nouveaux virus entomopathogènes. ORSTOM. 14 p.
- FEDIERE (G.), MONSARRAT (P.). - 1985. Mise en évidence d'une virose épizootique chez *Teinorhyncha umbra*, Lépidoptère Limacodidae defoliateur du bananier en Côte d'ivoire. *4th international conference on the impact of viral diseases on the development of africa. Rabat, Maroc, 14-19 april*, p. 19.

- FOURIE (P. B.), HULL (P. R.). - 1980. Urticaria caused by the slug caterpillar *Latoia vivida*, Lepidoptera : Limacodidae. *S. Afr. J. Zool.*, **15**, 56.
- FRESHNEY (R. I.). - 1986. Introduction : principes of sterile technique and cell propagation. *in* : *Animal cell culture a practical approach*. (FRESHNEY R. I. ed), IRL Press, Oxford, p. 1-11.
- GACHELIN (G.). - 1980. Le cholestérol : un matériau pour les cellules. *La Recherche*, **11**, 725-727.
- GARDINER (G. R.), STOCKDALE (H.). - 1975. Two tissue culture media for production of Lepidopteran cells and nuclear polyedroses viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, **38**, 305-306.
- GENTY (P.). - 1972. Morphologie et biologie de *Sibine fusca* stoll. Lépidoptère défoliateur du palmier à huile en Colombie. *Oléagineux*, **27**, 65-71.
- GENTY (P. 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. Lépidoptera : Limacodidae. *Oléagineux*, **33**, 360-382.
- GEY (G. O.), COFFMAN (W. D.) , KUBICEK (M. T.). - 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer res.*, **12**, 264-265.
- GINTING (U. C.), DESMIER de CHENON (R.). - 1987. Nouvelles perspectives biologiques pour le contrôle d'un ravageur très important du cocotier en Indonésie : *Parasa lepida* CRAMER, Limacodidae, par l'utilisation de virus. *Oléagineux*, **42**, 107-118
- GOLDSCHMIDT (R.). - 1915. Some experiments on spermatogenesis in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1**, 220-222.
- GONNET (P.), DEVAUCHELLE (G.). - 1987. Obtention par recombinaison dans le gène du polypeptide p 10 d'un Baculovirus exprimant le gène de résistance à la néomycine dans les cellules d'insectes. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **305**, 111-114

- GOODWIN (R. H.), VAUGHN (J. L.), ADAMS (J. R.), LOULOUEDES (S. J.). - 19874. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in an established cell line. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, **16**, 222.
- GRACE (T. D. C.). - 1962. Establishment of four strains of cells from insect grown *in vitro*. *Nature (London)*, **195**, 788-789.
- GRACE (T. D. C.). - 1967. Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombyx mori*. *Nature (London)*, **216**, 613-614.
- GRANADOS (R. R.), NANGLITON (M.). - 1975. Replication of *amsacta moorei* entomopoxvirus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in hemocyte cell lines from *estigmene acrea*. *Abstr., Int. Conf. Invertebr. Tissue Cult., 4th, 1975*, p. 13.
- GRASSE (P. P.). - 1951. *Traité de Zoologie. Masson, Paris*, **10** (1), 392-393.
- GREENWOOD (L. K.), MOORE (N. F.). - 1982. The *Nudaurelia*  $\beta$  groupe of small RNA containing viruses of insects : serological identification of several new isolates. *J. Invertebr. Patol.*, **39**, 407-409.
- GRIFFITHS (J. B.). - 1985. Cell products : an overview. *In animal cell biotechnology, vol. 2, (SPIER, R. E. and GRIFFITHS, J. B. ed.)*, Ac. Press, Orlando, p. 3-11.
- GUELPA (B.), BERGOIN (M.), CROIZIER (G.). - 1977. La protéine d'inclusion et les protéines du virion du Baculovirus du diptère *Tipula paludosa* (MEIGEN). *C. R. Acad. Sc. Paris*, **284**, 779-782.
- GUICHARD-BALESTRINI (S.). - 1987. La culture de cellules animales. *Biofutur*, **56** (suppl.), 1-14.
- HARRISON (R. G.). - 1907. Observation on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **4**, 140-143.
- HINK (W. F.). - 1970. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature (London)*, **226**, 466-467.
- HINK (W. F.), IGNOFO (C. M.). - 1970. Establishment of a new cell line (IMC-HZ-1) from ovaries of cotton bollworm moths. *Heliothis zea* (Boddie). *Exper. Cell. Res.* **60**, 307-309.

- HINK (W. F.), ELLIS (B. J.). - 1971. Establishment and characterization of two new cell lines (CP 1268 and CP 169) from the codling moth *Carpocapsa pomonella*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, **55**, 19-28.
- HOUILLIER (M.). - 1961. Les pullulations de chenilles (*Parasa pallida* MSCHLR.) 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 serologiques et biologiques différentes. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **275**, 3043-3046
- JUCKES (I. R. M.). - 1970. Viruses of the pine emperor moth. *Bull. S. Afr. Soc. Plant Pathol.*, **4**, 18.
- JURKOVICOVA (M.). - 1979. Characterization of nuclear polyhedrosis viruses obtained from *Adoxophyes orana* and from, *Barathra brassicae*.. Thesis *pH.D. Wageningen, Holland*, 133 p.
- KELLY (D. C.), ROBERTSON (J. S.). - 1973. Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. gen. Virol.*, **20** (supl.) 17-41.
- KOUEVIDJIN (R. K.). - 1986. Recherche d'une virose de Pteroteinon laufella, Lépidoptère, Hesperidae, défoliateur du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire. *Mémoire de DEA, Université Nationale de Côte d'Ivoire*, 53 p.
- KURODA (Y.) , JAMURA (S.). - 1956. A technique for the tissue culture of melanotic tumors of *Drosophila melanogaster* in the synthetic medium. *Med. J. Osaka Univ.*, **7**, 137-144.
- LEPESME (P.). - 1947. Les insectes des palmiers. *Le chevalier, Paris*, 903 p.

- LYNN (D. E.), MILLER (S. G.), OBERLANDER (H.). - 1982. Establishment of a cell line from lepidopteran wing imaginal discs : induction of newly synthesized proteins by 20-hydroxyecdysone. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **79**, 2589-2593.
- MANIATIS (T.), FRITSCH (E.F.), SAMBROOK (J.). - 1982. Molecular cloning : a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, New York*, 545 p.
- Mc INTOSH (A. H.), MARAMOROSCH (K.), RECHTORIS (C.). - 1973. Adaptation of an insect cell line (*Agallia constricta*). in a mammalian cell culture medium. *In vitro*, **8**, 375-378.
- MARIAU (D.), DESMIER de CHENON (E. F.), JULIA (J. F.), PHILIPPE (R.). - 1981. Les ravageurs du palmier à huile et du cocotier en Afrique Occidentale. *Oléagineux*, **36**, 169-228.
- MARTIGNONI (M. E.), SCALION (R. J.). - 1961. Preparation of cell suspensions from insect tissues for in vitro cultivation. *Science*, **128**, 360-361.
- 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.),. *Ac. Press, London*. p. 897-911
- MATTHEWS (R. E. F.). - 1982. Classification and nomenclature of viruses. (Fourth report of the I. C. T. V. ). *Karger, Basel, Intervirology*, **17**, 1-199.
- MATTHEWS (R. E. F.). - 1980. Classification et nomenclature des virus. (traduit par J. MAURIN), *MASSON presses de l'Université de Laval, Québec*, 223 p.
- MEYNADIER (G.), VAGO (C.), PLANTEVIN (G.), ATGER (P.). - 1964. Virose d'un type inhabituel chez le Lepidoptère *Galleria mellonella* L. *Rev. Zool. agric. appl.*, **63**, 207-208.
- MEYNADIER (G.), AMARGIER (A.), GEMY (R.). - 1977a. Une virose de type denonucléose chez le Lépidoptère *Sibine fusca* Stoll. *Oléagineux*, **32**, 357-361.

- MIALHE (E.), QUIOT (J.M.), PARADIS (S.). - 1984. Etablissement de deux lignées cellulaires de *Spodoptera littoralis* (Lépidoptère : Noctuidae), permissives pour des virus susceptibles d'être utilisés en lutte microbiologique. *Entomophaga*, **29**, 347-350.
- MILTENBURGER (H. G.), DAVID (P.), MAHRU, ZIPP (W.). - 1977. Establishment of Lepidopteran cell lines and *in vitro* replication of insect pathogenic viruses. I. *Mamestra brassicae* cell lines and NPV replication. *Z. Angew. Entomol.* **82**, 306-323
- MITSUHASHI (J.), MARAMOROSCH (K.). - 1964. Leafhopper tissue culture : embryonic, nymphal, and imaginal tissues from aseptic insects. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **22**, 435-460.
- MITSUHASHI (J.). - 1967. Establishment of an insect cell strain persistently infected with and insect virus. *Nature (London)* **215**, 863-864.
- MITSUHASHI (J.). - 1973. Establishment of cell lines from the pupal ovaries of the swallowtail, *Papilioxithus*. Linne (Lépidoptera, Papilionidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **8**, 64-72.
- MITSUHASHI (J.), SHOZAWA (A.), 1985. Continuous cell lines from larval hemocytes of the cabbage Armyworm, *Mamestra brassicae*. *Develop. Growth and Differ.*, **27**, 599-606.
- MONSARRAT (P.), MEYNADIER (G.), CROIZIER (G.), VAGO (C.). - 1973. Recherches cytopathologique sur une maladie virale du Coléoptère *Oryctes rhinoceros* L. *C. R. Acad. Sc., Paris*, **267**, 2077-2080.
- MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.), PARKER (R. C.). - 1950. Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **73**, 1-8.
- MOSCONA. - 1952. Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. *Exp. cell res.*, **3**, 535.
- MYARA (I.), POLINI (G.), SCOTTO (J.), LEMONNIER (A.), GAUTHIER (M.) - 1986. The use of Ultrosor G. as a serum substitute in the culture of human Skin fibroblasts. *Biol. cell*, **57**, 243-248.
- OUCHTERLONY (O.). - 1948. Antigen antibody reaction in gels. *Ark. Keni. Minter. Geol. B.*, **26**, 16.

- PAILLOT (A.), GRATIA (A.). - 1939. Essai d'isolement du virus de la grasserie des vers à soie par l'ultracentrifugation. *Arch. ges. Virusforsch.*, **1**, 120-129.
- PAYNE (C. C.), RIVERS (C. F.). - 1976. A provisional classification of cytoplasmic polyhedrosis viruses based on the sizes of the RNA genome segment. *J. gen. Virol.*, **33**, 71-85.
- PRASAD (D.). - 1979. Some observations on the biology of *Latoia (parasa) Lepida* CRAM. (Lepidoptera : Cochlidiidae), a pest of mango. *Indian J. Entomol.*, **41**, 272-273.
- PRISTON (R. A. J.). - 1985. Production of insect pathogenic virus in cell line. In *Animal Cell Biotechnology*, vol. 2, (SPIER, R. E. and GRIFFITHS, J. B. ed.), Ac. Press, Orlando, p. 71-80.
- QUIOT (J. M.). - 1975. Recherches sur la culture *in vitro* de cellules d'insectes et l'action de germes Entomopathogènes en culture cellulaire. *Thèse de Doct. ès. sciences Naturelles. U. S. T. L., Montpellier, France*, 288 p.
- QUIOT (J. M.). - 1976. Etablissement d'une lignée cellulaire (SCLd 135) à partir d'ovaires du Lépidoptère *Lymanthria dispar* L. *C. R. Acad. Sc., Paris*, **282**, 465-467.
- QUIOT (J. M.). - 1982. Etablissement d'une lignée cellulaire (S. P. C. Bm 36) à partir d'ovaires de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Sericologia*, **22**, 25-31.
- REINGANUM (C.), O' LOUGHLIN (G. T), HOGAN (T. W.). - 1970. A nonoccluded 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 strain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**, 208-212.
- ROBERTS (P. L.). - 1984. Growth of insect cells in recycled medium and the use of various serum supplements. *Biotechnology letters*, **6**, 633-638.
- RÖDER (A.). - 1982. Development of a serum free medium for cultivation of insect cells. *Naturwissenschaften*, **69**, 92-93.

- ROTH (M.). - 1974. Initiation à la morphologie, la systématique et la biologie des insectes. *ORSTOM*, 119 p.
- SHAPIRO (M.), IGNOFFO (C. M.). - 1970. Nucleopolyhedrosis of *Heliothis* : Activity of isolates from *Heliothis zea*. *J. Invertebr. Pathol.*, **16**, 107-111.
- SKATULLA (V. U.). - 1986. Studies on hemocytes culture from larvae of the Nun. Moth (*L. monocha* L.) and their susceptibility to a nuclear polyhedrosis virus *in vitro*. *Anz. Schädlingskde, Lflanzenschutz, Umweltschutz*, **59**, 65-67.
- 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.
- SMITH (G. E.), SUMMERS (M. D.), FRASER (M. Y.). - 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a Baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2156-2165
- SOHI (S. S.). - 1971. *In vitro* cultivation of hemocytes of *Malacosoma disstria* HÜBNER (Lepidoptera : Lasiocampidae). *Can. J. Zool.*, **49**, 1355-1358.
- SOHI (S. S.). - 1973. *In vitro* cultivation of larval tissues of *Choristoneura fumiferana* (demens) (Lepidoptera : Tortricidae). *Proc. Int. Colloq. Invertebr. Tissue Cult.*, **3<sup>rd</sup>**, 75-92.
- 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.
- THERON (J. G.). - 1968. The larva of *Homojusica eugrapha*, Lepidoptera : Limacodidae. *J. Entomol. Soc. S. Afr.*, **31**, 231-233.
- THOMAS (G. M.), POINAR (G. O., Jr.). - 1973. Report of diagnoses of diseases insectes 1962-1972. *Hilgardia*, **42**, 261-360.



- TING-WEI (C.), LING-MEI (X.), WAN-HUA (C.), YUAN-YI (H.). - 1980. Signalement de quelques virus d'insectes forestiers. *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 guineensis* Jacq.) in Sarawak (Malaysian Bornéo). *Malaysian Internation. Agric. oil palm conf.*, p. 1-16.
- TRAGER (W.). - 1935. Cultivation of the vicun of grasserie in silkworm tissue cultures. *J. Exp. Med.*, **61**, 501-513.
- TRAMPER (J.), VLAK (J. M.). - 1986. Some engineering and economic aspects of continuous cultivation of insect cells for the production of Baculoviruses. *Biochemical Engineering IV*, 279-288.
- VAGO (C.), CHASTANG (S.). - 1958a. Obtention de lignées cellulaires en culture de tissus d'invertébrés. *Experientia*, **14**, 110-113.
- VAGO (C.), CHASTANG (S.). - 1958b. Culture *in vitro* d'un tissu nymphal de Lépidoptère. *Experientia*, **14**, 426-429.
- VAGO (C.), CHASTANG, (S.). - 1958c. La potentialité d'émigration cellulaire en culture de tissus ovariens de Lépidoptères. *C. R. Acad. Sc., Paris*, **247**, 1503-1504.
- VAGO (C.), BERGOIN (M.). - 1963. Developpement des virus à corps d'inclusion du Lépidoptère *Lymantria dispar* en cultures cellulaires. *Entomophaga*, **8**, 253-261.
- VAGO (C.). - 1967. Invertebrate tissue culture. *In Methods in Virology, vol 1, Ac. Press inc., N. Y. 1*, p. 567-602.
- 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.
- VAGO (C.). - 1975. formations tumorales et proliférations cellulaires chez les invertébrés. *C. R. des Séances de la Société de Biologie*, **169**, 778.
- 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.). - 1972. Insect pathogens available for distribution. *In : Microbial control of insects and mites (Burgess, H. D. and Hussey, N. W. ed. ) Ac. Press, London, p. 733-739*
- VAUGHN (J. L.), FAULKNER (P.). - 1963. Susceptibility of an insect tissue culture to infection by virus preparations of the nuclear polyhedrosis of the Silkworm (*Bombyx mori* L). *Virology*, **20**, 484-489.
- VAUGHN (J. L.). - 1968. Growth of insect cell lines in suspension culture. In "2<sup>nd</sup> International Colloquium on Invertebrate tissue culture, Tremezzo, Como, Culture, 1967, p. 119-125.
- VAUGHN (J. L.), GOODWIN (R. H.), THOMPSON (G. J.), Mc CAWLEY (P.). - 1977. The establishment of cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *In vitro*, **13** , 213-217.
- VAUGHN (J. L.), WEISS (S. A.), KALTER (S. A.), DOUGHERTY (E.). - 1980. Effect of nutritional, biological and biophysical parameters on insect cell culture of large scale production. *In Vitro*, **16**, 222-223.
- WEISS, (S. A.), SMITH (G. C.), KALTER (S. S.), VAUGHN (J. L.). - 1981. Improved method for the production of insect cell culture in large volume. *In Vitro*, **17**, 495-502.
- WEBER (K.), OSBORN (M.). - 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.
- WILKIE, (G. E. I.), STOCKDALE (H.), PIRT (S. V.). - 1980. Chemically-defined media for production of insect cells and viruses *in vitro*. *Develop. biol. standard.* **46**, p. 29-37.
- WOOD (B. J.). - 1968. Pest of oil palm in Malaysia and their control. *Inc. Soc. Planters, Kuala Lumpur, p. 204.*
- WYATT (S. S.). - 1956. Culture *in vitro* of tissue from the silkworm *Bombyx mori* L. *J. gen. Physiol.*, **39**, 841-852.
- XEROS (N. G.). - 1954. A second virus disease of the leather jacket Tipula paludosa. *Nature (London)*, **174**, 562.

YAMADA (K. A.), OLDSSEN (K.). - 1978. Fribronectins. Adhesive glyco proteins of cell surface and blood. *Nature*, **275**, 179-183.

YUNKER (C. E.). - 1967. Adaptation of an insect cell line. (Grace's Antherarea cells) to medium free of insect hemolymph. *Science*, **155**, 1565-1566.

## PLANCHE I

Différents stades de développement de *Latoia viridissima*

Fig. 1 - Larve au stade 3  
x 6

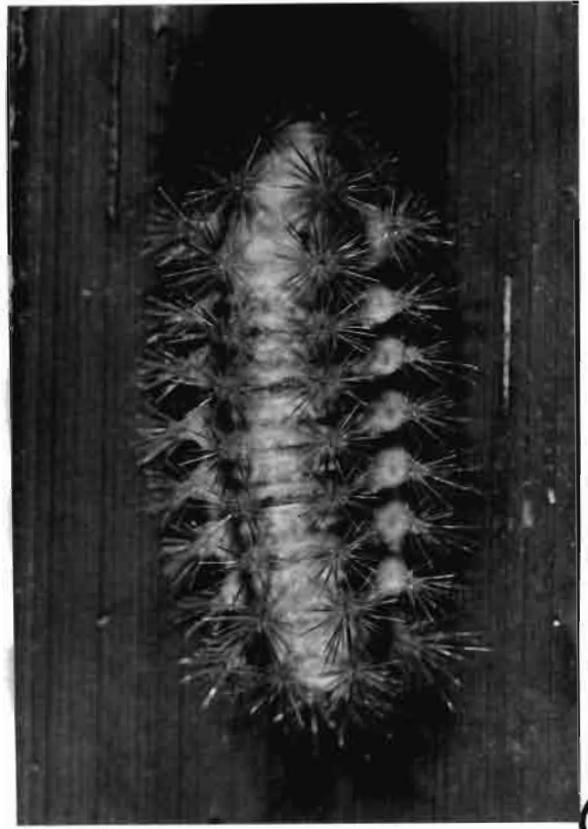
Fig. 2 - Larve au stade 8  
x 2,5

Fig. 3 - Cocons après émergence de l'imago  
x 2

Fig. 4 - Imago  
x 3



①



②



③



④

## PLANCHE II

Dégâts causés par les larves de *L. viridissima* sur palmier à huile.

Fig. 5 - Palmier non attaqué

Fig. 6 - Palmier attaqué.



5



6

### PLANCHE III

Suspensions purifiées de deux types de virus infectant la larve de *L. viridissima* : Examen en microscopie réalisé après contraste négatif à l'acétate d'uranyle.

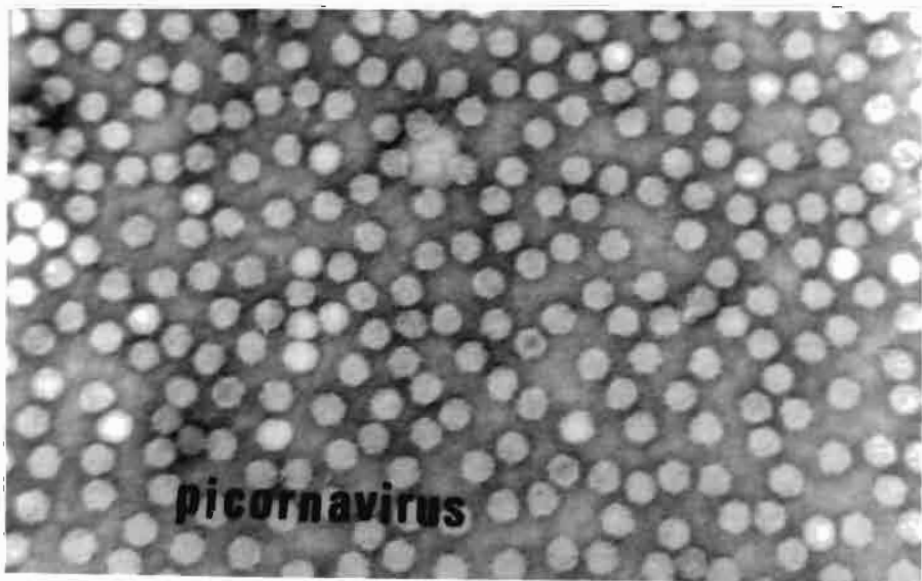
Fig. 7 - Baculovirus de la polyédrose nécléaire de *L. viridissima*  
x 40.000

Fig. 8 - Picornavirus de *L. viridissima*  
x 130.000





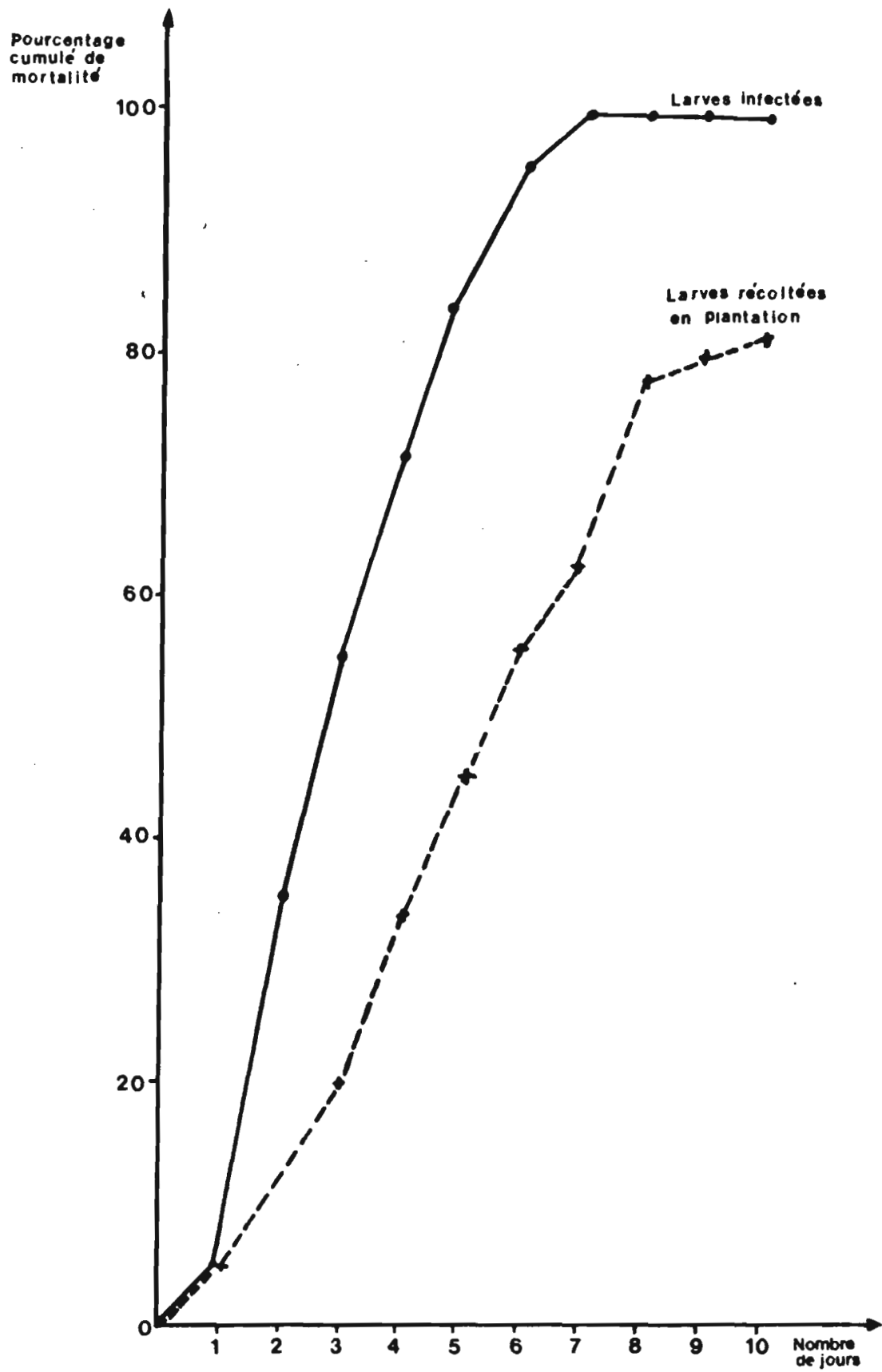
7



8

## PLANCHE IV

Fig. 9 - Courbes de mortalité des larves récoltées en plantation et des larves infectées expérimentalement (*per os*)

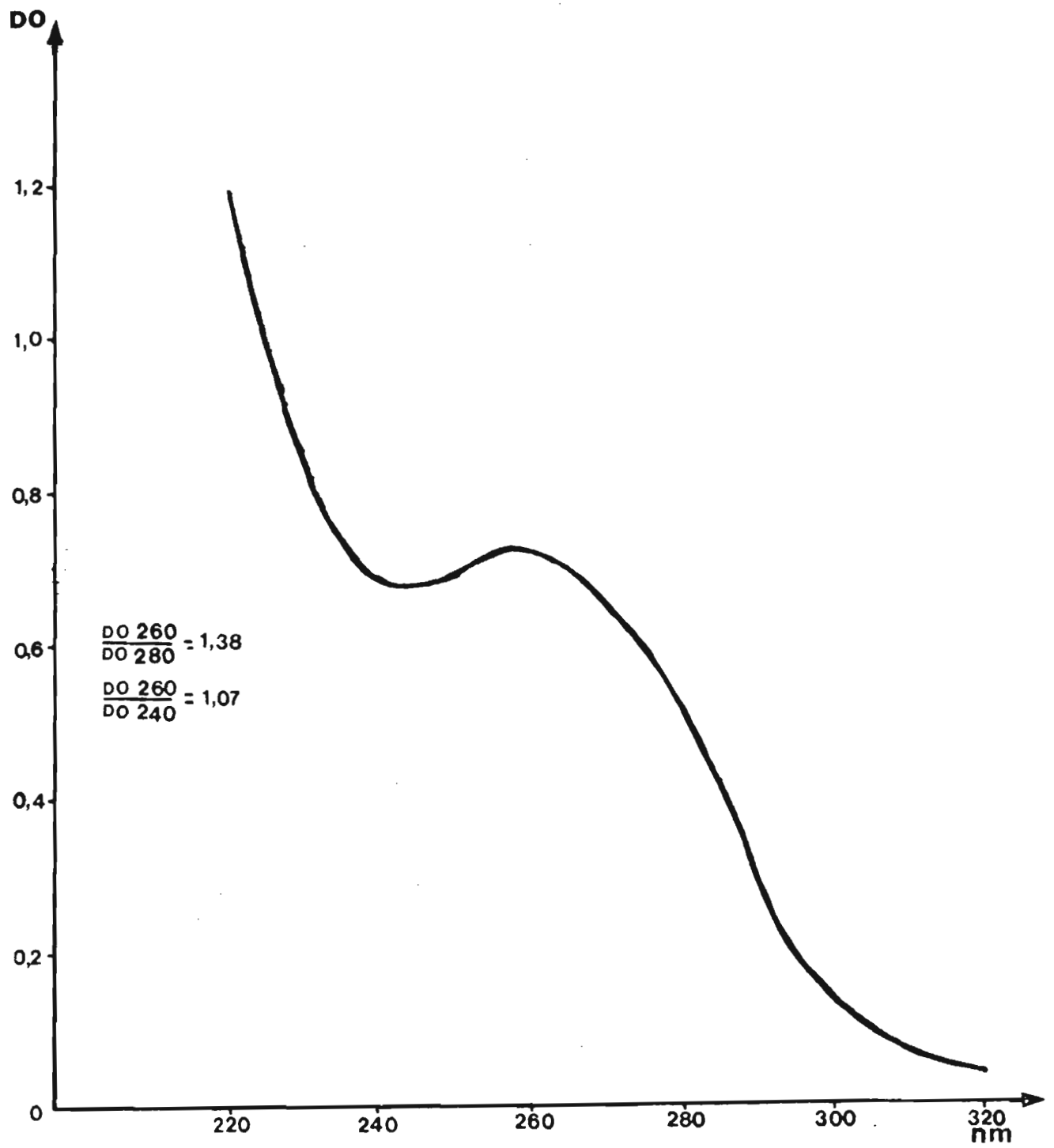


## PLANCHE V

Fig. 10 - Spectre d'absorption en ultra-violet d'une suspension purifiée de Baculovirus de polyédrose nucléaire de *L.viridissima*

$$\text{DO. 260} / \text{DO. 280} = 1,38$$

$$\text{DO. 260} / \text{DO. 240} = 1,07$$



## PLANCHE VI

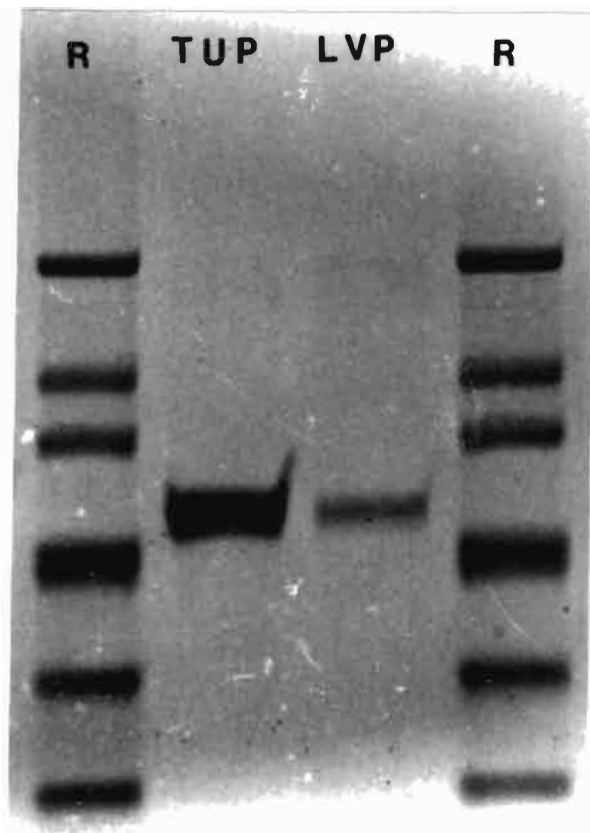
Electrophorégrammes de la polyédrique et des polypeptides du  
Baculovirus de *Latoia viridissima*

R = protéines de référence

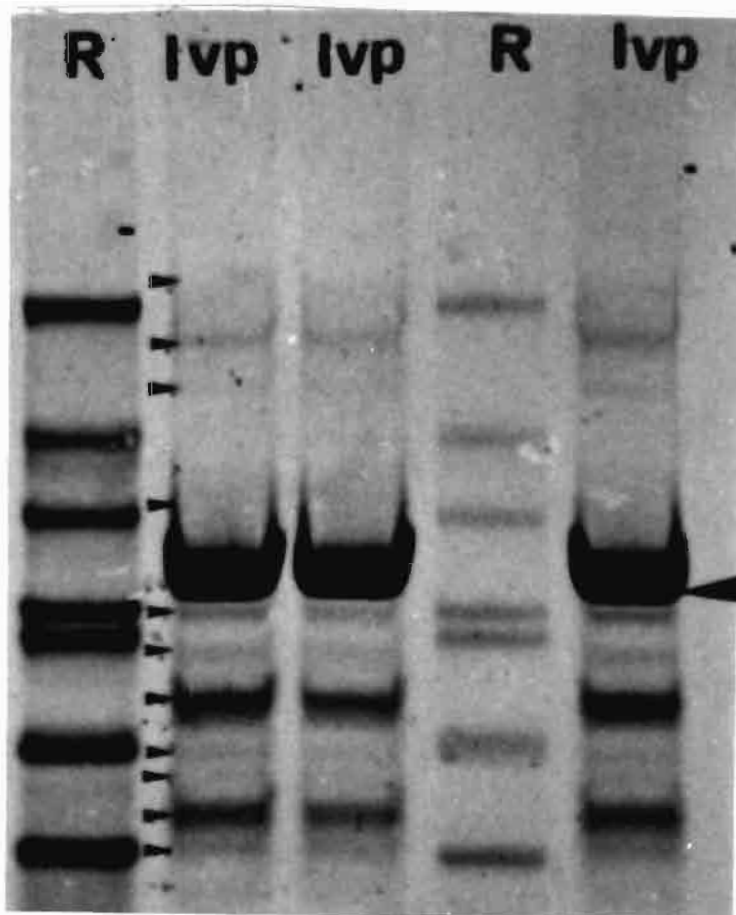
LVP = *L. viridissima*

Fig. 11 - Polyédrique  
TUP = *Teinorhyncha umbra*

Fig. 12 - Polypeptides du virion



11



12

## PLANCHE VII

Determination des poids moléculaires des protéines du Baculovirus de polyédrose nucléaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 8%

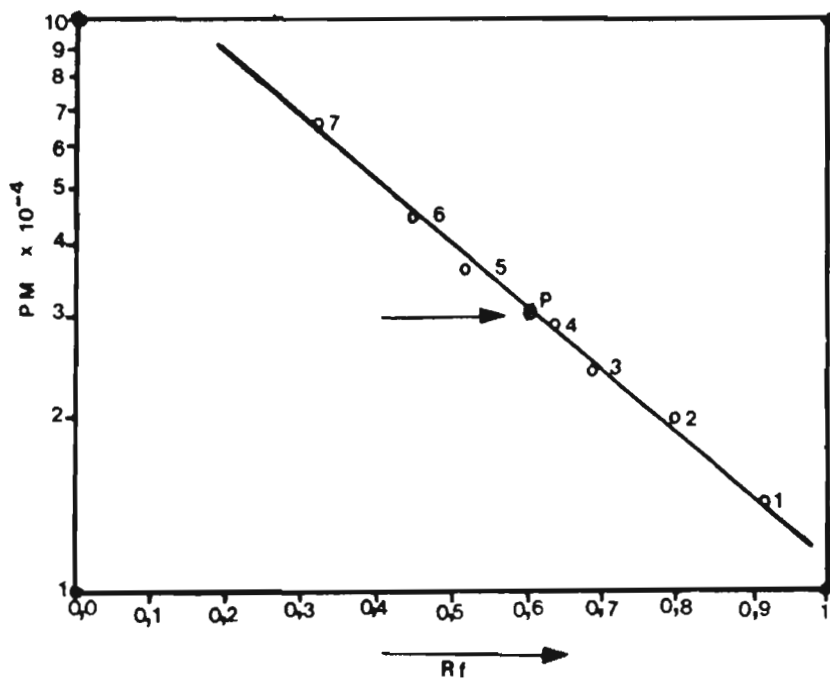
### Protéines de référence

- 1 =  $\alpha$  lactalbumine (PM : 14.200)
- 2 = Inhibiteur de la trypsine (PM : 20.100)
- 3 = Trypsinogène (PM : 24.000)
- 4 = Anhydrase carbonique (PM : 29.000)
- 5 = Glycéraldéhyde 3. P. déshydrogénase (PM : 36.000)
- 6 = Ovalbumine (PM : 45.000)
- 7 = Sérumalbumine de bœuf (PM : 66.000)
- P = Polyédrine de *L. viridissima*

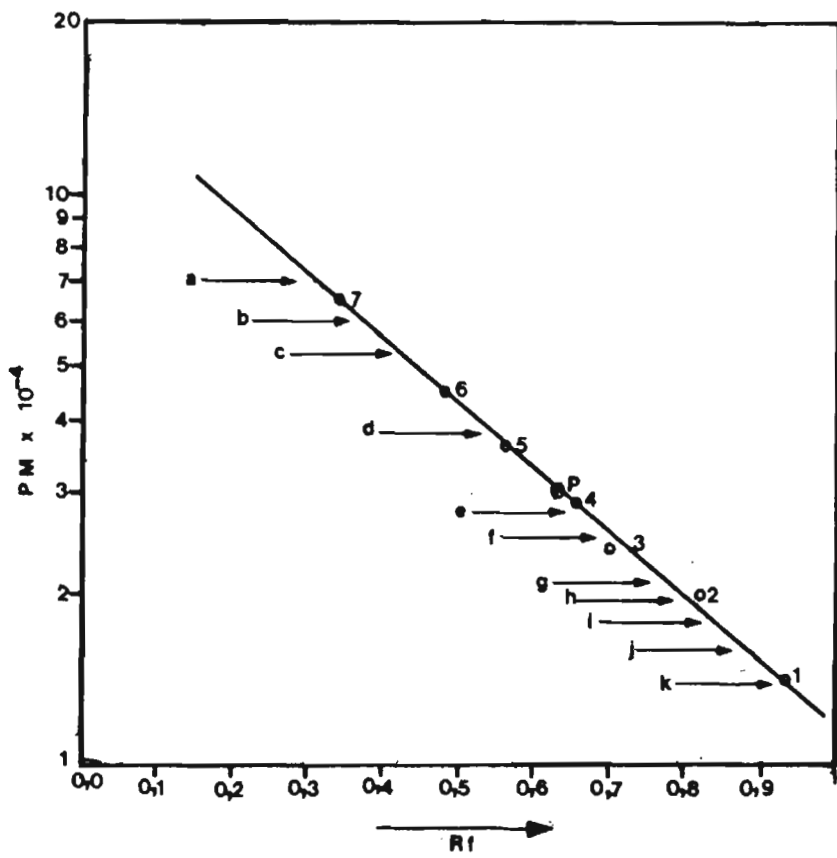
Fig. 13 - Polyédrine

Fig. 14 - Polypeptides du Baculovirus





13

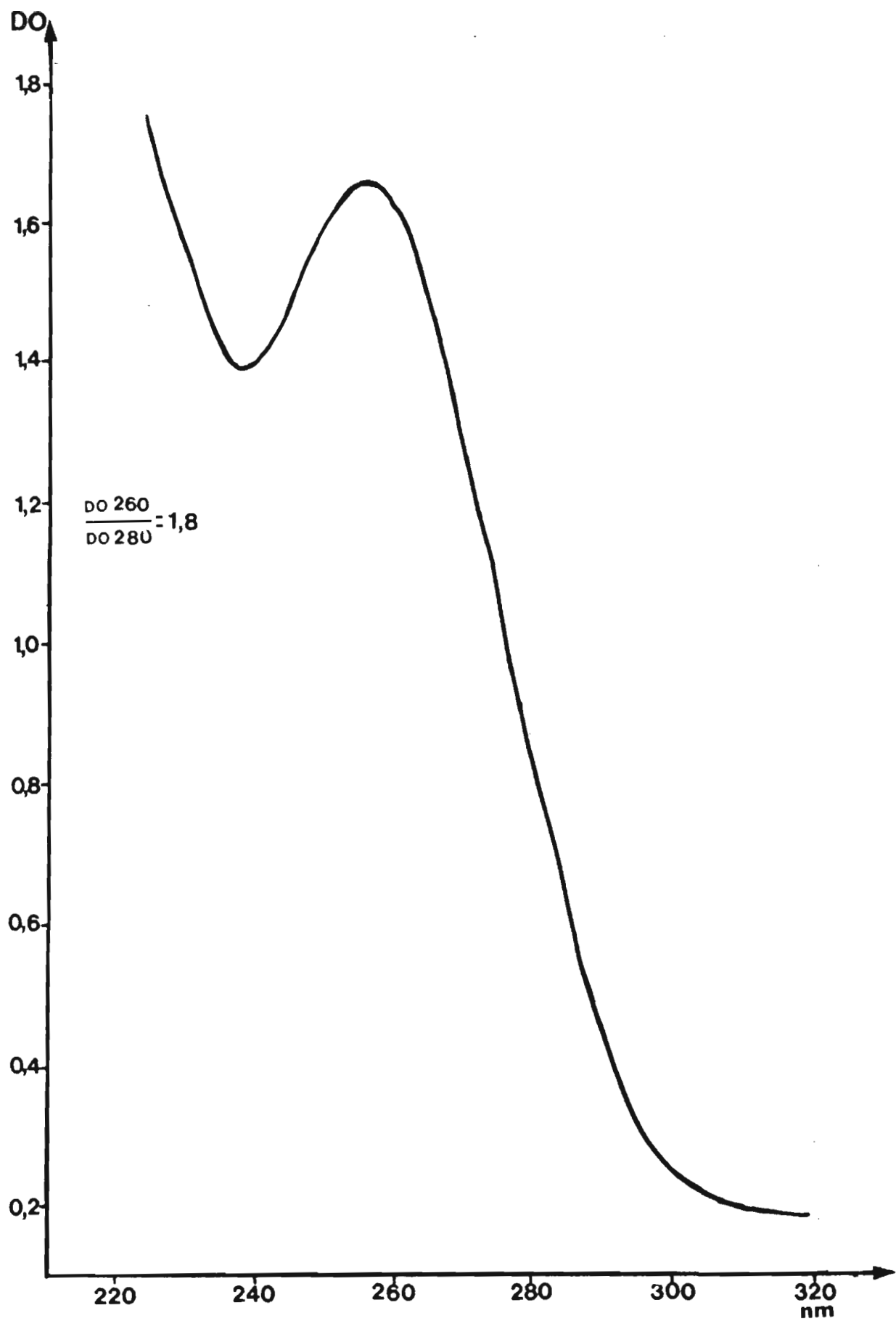


14

## PLANCHE VIII

Fig. 15 - Spectre d'absorption d'une solution d'ADN du  
Baculovirus de polyédrose nucléaire de *L.viridissima*

$$\text{DO.260} / \text{DO.280} = 1,8$$



## PLANCHE IX

Fig. 16 - Electrophorégramme de l'ADN du Baculovirus de polyédrose nucléaire de *L. viridissima*, digéré par les endonucléases Bam HI et Eco RI.

R (ADN de référence) =  $\lambda$  DNA + Hind III + Eco RI.

Fig. 17 - Détermination du poids moléculaire des fragments obtenus après digestion par Eco RI et Bam HI.

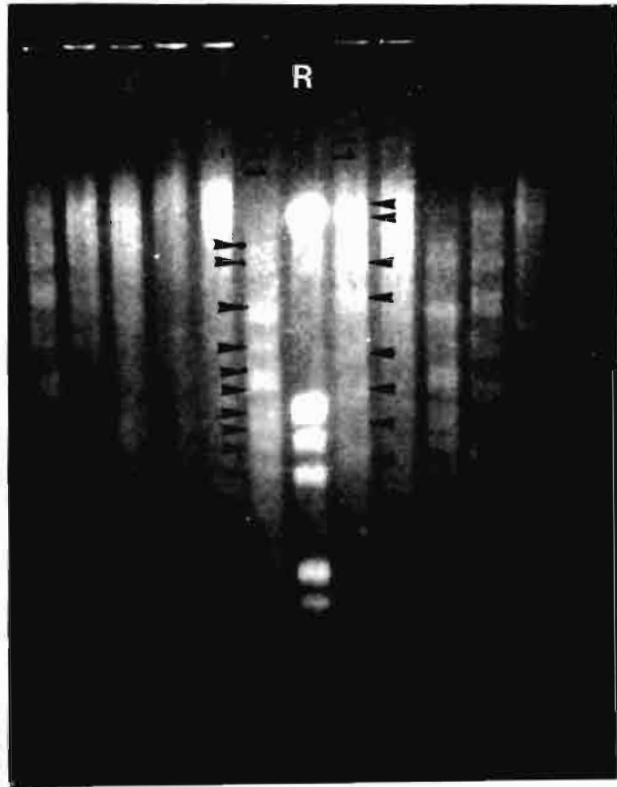
3 : Fragment de PM :  $2,33 \times 10^6$  daltons.

4 : Fragment de PM :  $2,82 \times 10^6$  daltons.

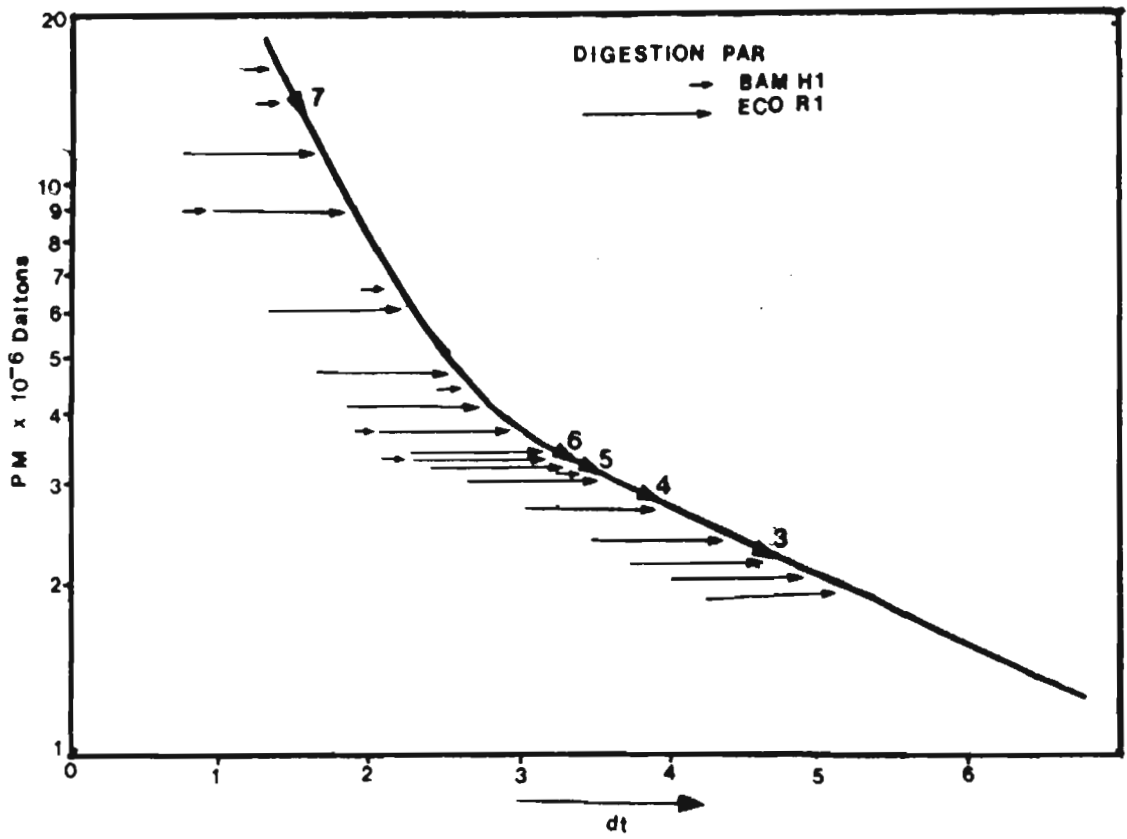
5 : Fragment de PM :  $3,28 \times 10^6$  daltons.

6 : Fragment de PM :  $3,40 \times 10^6$  daltons.

7 : Fragment de PM :  $14,00 \times 10^6$  daltons.



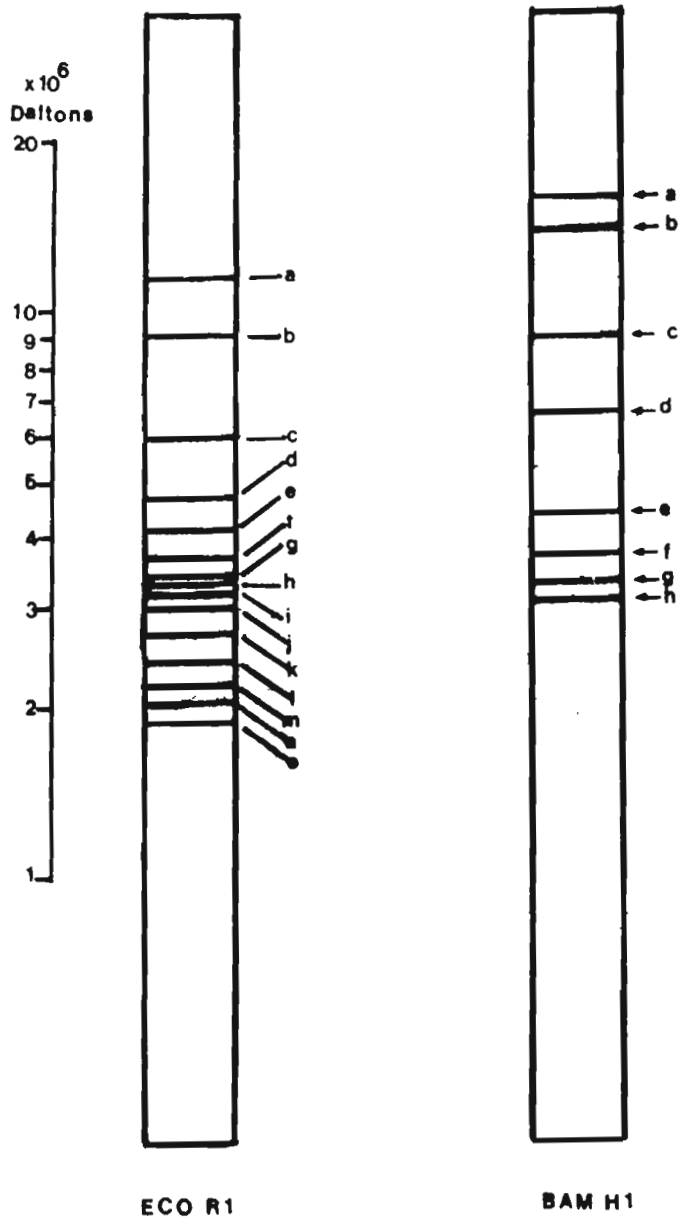
16



17

## PLANCHE X

Fig. 18 - Digestion de l'ADN du Baculovirus de polyédrose nucléaire de *L. viridissima* par Eco RI et Bam HI : électrophorégramme normalisé sur échelle logarithmique.



## PLANCHE XI

Primoculture d'ovariole : observation au microscope optique.

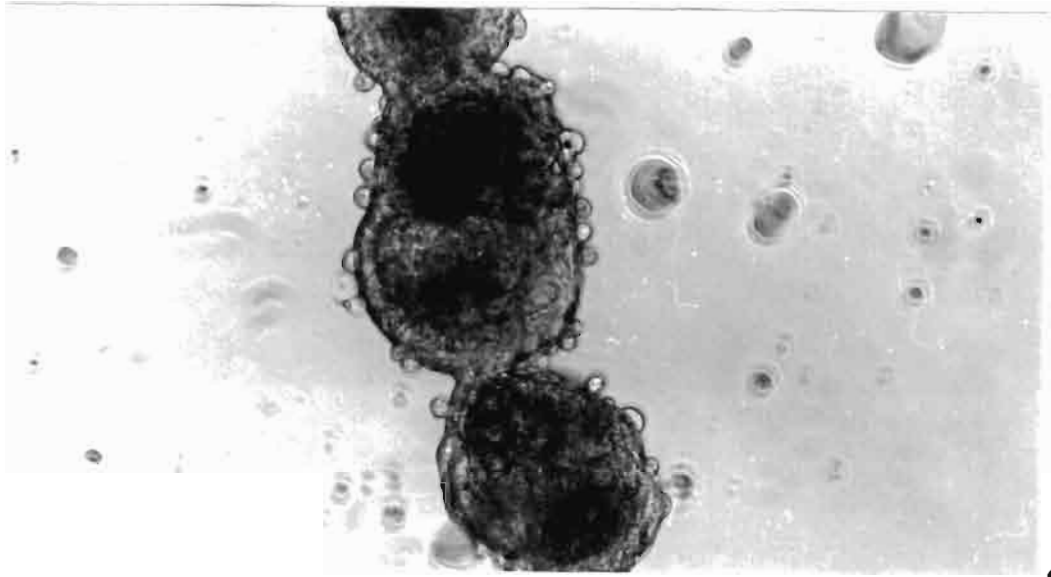
Fig. 19- Après 3 jours de culture : bourgeonnement cellulaire à partir de fragments d'ovarioles.  
x 160.

Fig. 20 - Après 7 jours de culture : prolifération en amas des cellules  
x 512

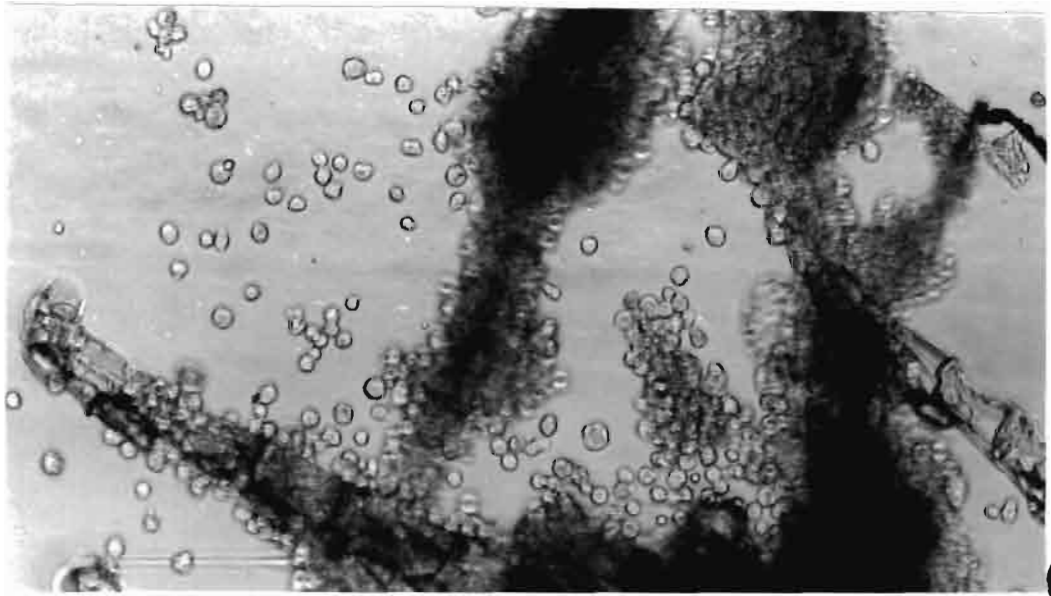
Fig. 21 - Après 2 semaines de culture : polyèdres apparaissant dans les cultures  
x 512

\* La flèche indique un polyèdre.

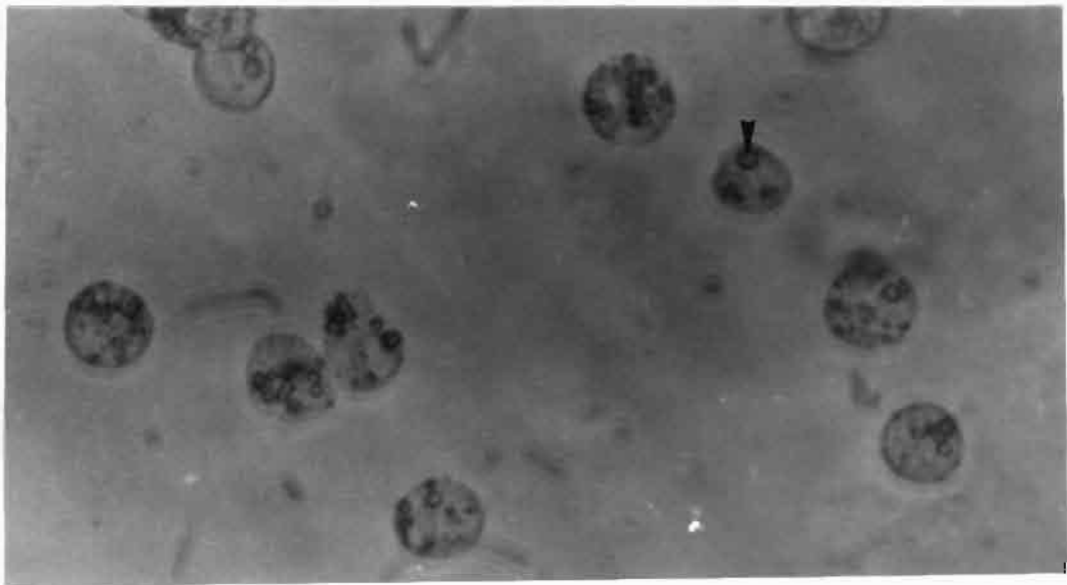




19



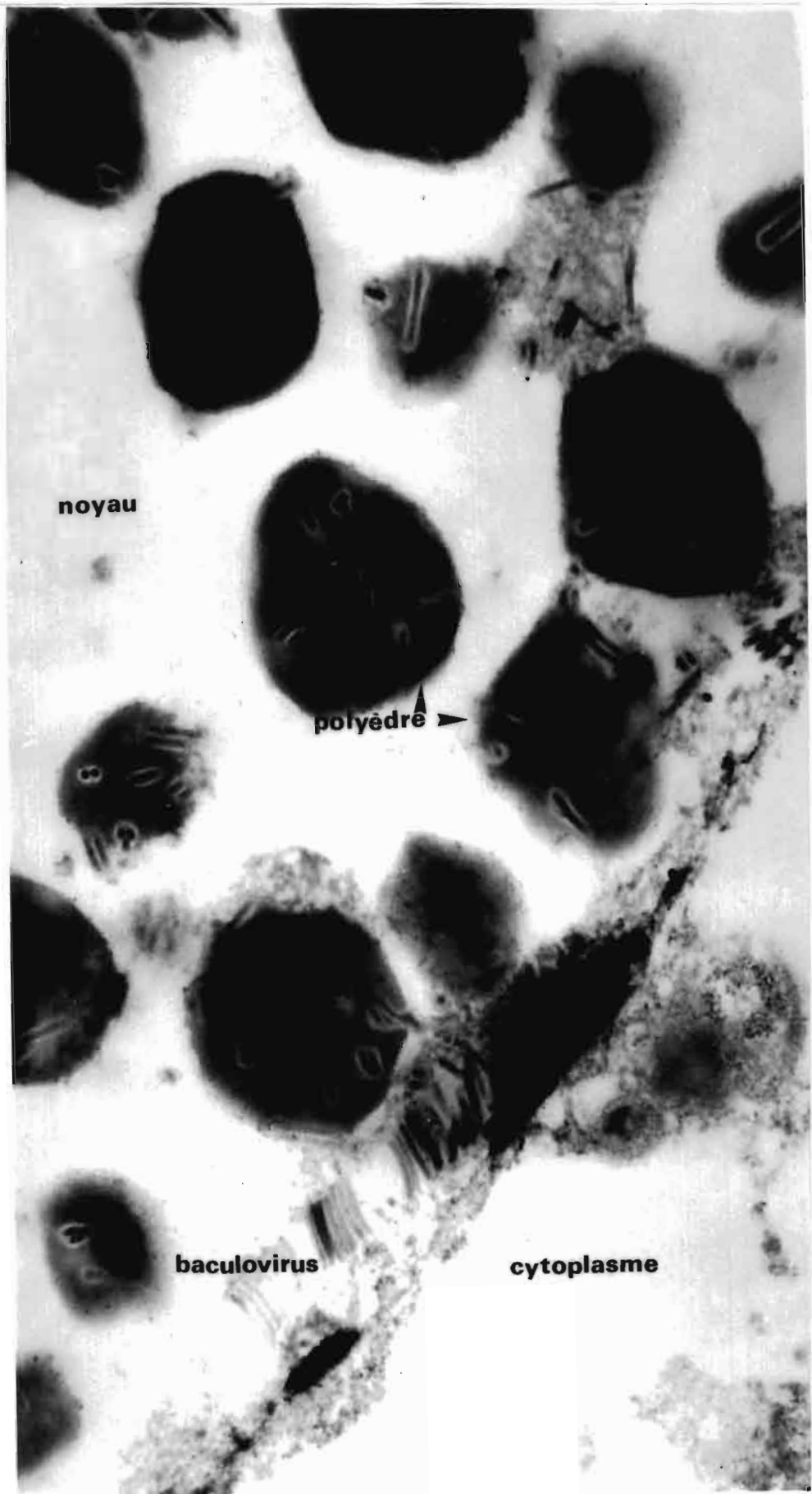
20



21

## PLANCHE XII

Fig. 22 - Polyèdres et Baculovirus observés en microscopie  
électronique à partir du broyat larvaire de *L. viridissima*.  
x 35.000



noyau

polyèdre

baculovirus

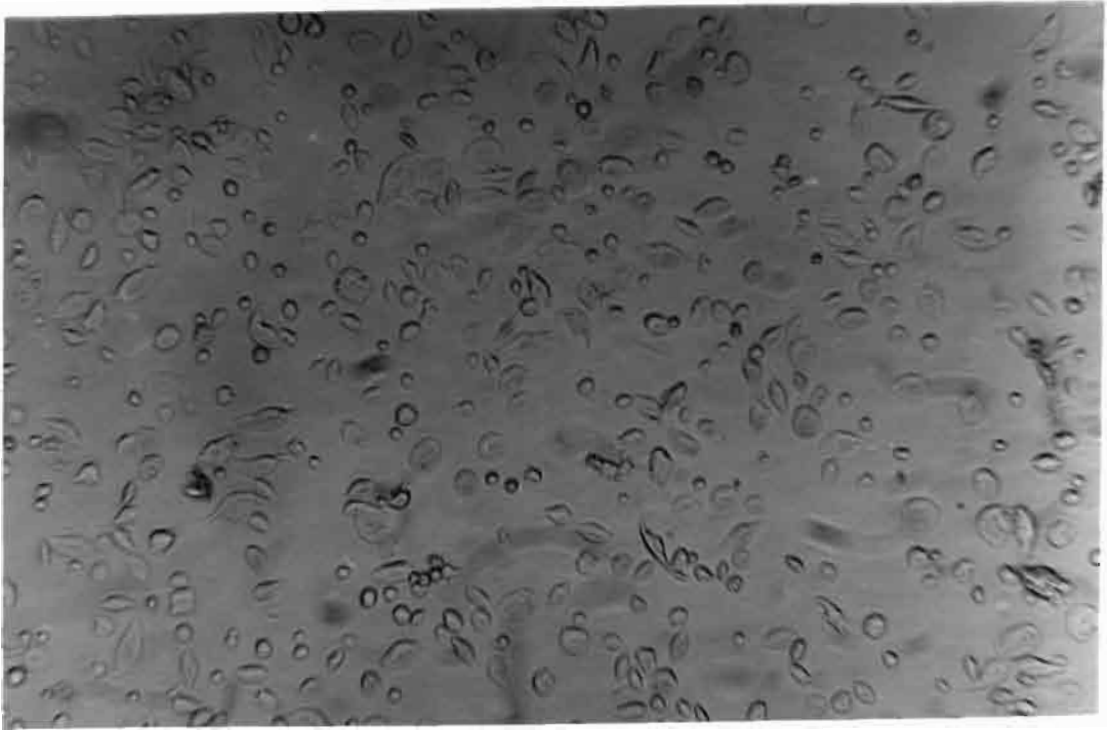
cytoplasme

## PLANCHE XIII

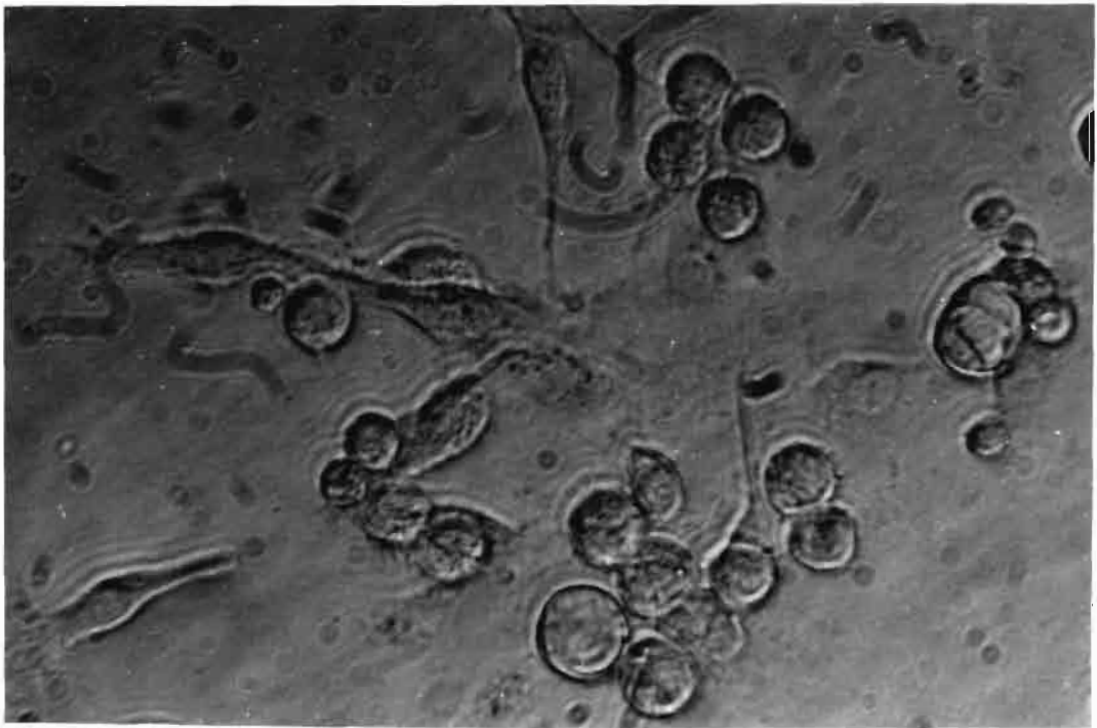
Primocultures d'hémolymphes observées au microscope optique, après 4 heures de culture. Différents types cellulaires sont observés.

Fig. 23 x 160

Fig. 24 x 512.



23



24

## PLANCHE XIV

Primocultures d'hémolymphe observées au microscope optique.

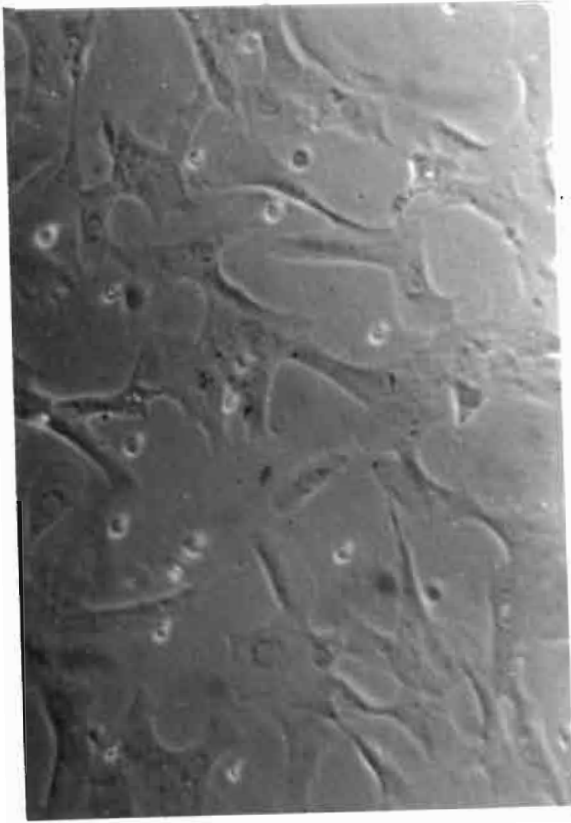
Fig. 25 - Après 4 jours de culture : grosses cellules allongées .  
x 160

Fig. 26 - Après 4 jours de culture on observe des petites cellules allongées et des petites cellules rondes.  
x 160

Fig. 27 - Après 7 jours de culture : disparition des grosses cellules allongées.  
x 160

Fig. 28 - Après 7 jours de culture, des polyèdres apparaissent dans certaines cellules.  
x 512

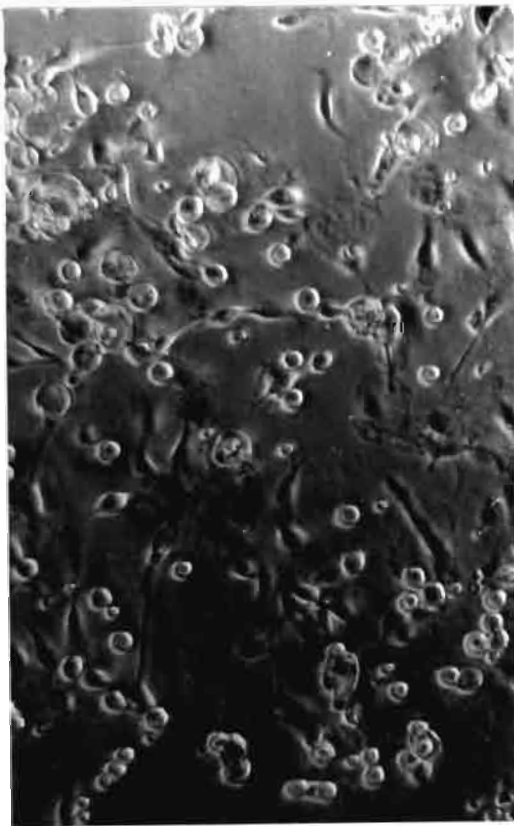
\* La flèche indique un polyèdre



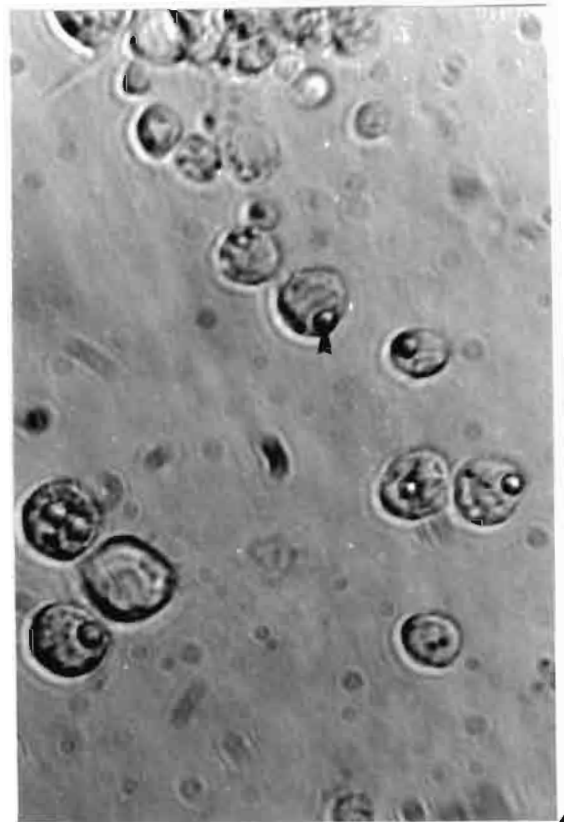
25



26



27



28