

République de Côte d'Ivoire

Année Universitaire 1985-1986

Ministère de l'Education Nationale
Chargé de l'Enseignement secondaire
et supérieur

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)

**Recherches sur une virose de *Pteroteinon laufella*,
Lépidoptère Hesperidae,
défoliateur du palmier à huile en Côte d'Ivoire**

présenté par

Roger Kankoé KOUEVIDJIN

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

AVANT PROPOS

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

Que Monsieur le Professeur **B. TOURE**, Recteur de l'Université Nationale de Côte d'Ivoire soit assuré de ma très profonde gratitude pour avoir accepté mon inscription au D.E.A.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **N. KOUASSI**, Responsable du D.E.A. 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. Son soutien constant et ses encouragements ont été pour moi une aide décisive. Qu'il veuille bien croire à ma très respectueuse reconnaissance.

Je tiens également à exprimer une particulière reconnaissance envers MM. **T. DIOMANDE** et **R. VUATTOUX**, Maîtres de Conférences au département de Zoologie de la Faculté des Sciences et Techniques d'Abidjan.

Que Monsieur **G. FEDIERE**, Chargé de Recherches à l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), Responsable du laboratoire d'Entomovirologie du Centre d'Adiopodoumé et Responsable du stage, trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude.

Il m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire et c'est à son instigation que je me suis tourné vers la virologie des insectes dont il a su me montrer tout l'intérêt. Qu'il veuille bien croire à ma très respectueuse reconnaissance.

Ma reconnaissance va également à Monsieur **R. PHILIPPE**, entomologiste à l'Institut de Recherches pour les Huiles et les Oléagineux (IRHO) pour ses conseils et son aide sur le terrain.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur **J.C. VEYRUNES**, Ingénieur à l'Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.), à la Station de recherche de Pathologie Comparée de St-Christol-les-Alès (France). Qu'il soit assuré de ma gratitude pour sa collaboration dans les prises de vue en microscopie électronique.

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

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

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Chapitre I : BIOLOGIE ET PATHOLOGIE VIRALE DES HESPERIDAE ET DE *PTEROTEINON LAUFELLA* EN PARTICULIER

- 1.1. Systématique
- 1.2. Morphologie
- 1.3. Biologie
- 1.4. Dégâts sur palmacées
- 1.5. Pathologie virale
 - 1.5.1. Introduction
 - 1.5.2. Les Iridoviroses
 - 1.5.3. Les polyédroses nucléaires
 - 1.5.4. Conclusion

Chapitre II : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LES PETITS VIRUS ICOSAEDRIQUES D'INSECTES

- 2.1. Introduction
- 2.2. Virus à ADN les Densovirus
 - 2.2.1. Anatomo-histo et physio-pathologie
 - 2.2.2. Structure et propriétés physico-chimiques des VDN
 - 2.2.3. Classification des virus à ADN
- 2.3. Virus à ARN
 - 2.3.1. Picornaviridae
 - 2.3.2. Nodaviridae
 - 2.3.3. Famille du groupe Nudaurelia β
 - 2.3.4. Autres virus

Chapitre III : MATERIEL ET METHODES

- 3.1. Le matériel vivant
- 3.2. Techniques de Pathologie expérimentale
 - 3.2.1. Recherche et isolement du virus
 - 3.2.2. Technique d'infection
- 3.3. Techniques de Purification du virus
 - 3.3.1. Broyage et clarification
 - 3.3.2. Purification en gradient de densité
- 3.4. Techniques de Caractérisation du virus
 - 3.4.1. Caractérisation biophysique
 - 3.4.1.1. Structure du virus
 - 3.4.1.2. Dosages spectrophotométriques
 - 3.4.2. Caractérisation biochimique
 - 3.4.2.1. Mise en évidence de la nature de l'acide nucléique
 - 3.4.2.1.1. Neutralisation de la suspension par les enzymes
 - 3.4.2.1.2. Centrifugation
 - 3.4.2.1.3. Hydrolyse
 - 3.4.2.1.4. Recherche de l'ARN
 - 3.4.2.1.5. Recherche de l'ADN
 - 3.4.2.2. Electrophorèse des protéines virales
 - 3.4.3. Caractérisation immunologique
 - 3.4.3.1. Préparation des antisérums
 - 3.4.3.2. Immunodiffusion en gel d'agarose

Chapitre IV : ETUDE D'UN PETIT VIRUS A ARN CHEZ *PTEROTEINON LAUFELLA*

- 4.1. Introduction
- 4.2. Symptômes et déroulement de la maladie
- 4.3. Pathologie expérimentale
- 4.4. Recherche de l'agent pathogène
- 4.5. Caractérisation du virus
 - 4.5.1. Purification
 - 4.5.2. Structure du virus
 - 4.5.3. Spectre d'absorption en lumière ultra-violette
 - 4.5.4. Nature de l'acide nucléique viral
 - 4.5.5. Analyse électrophorétique des protéines virales
 - 4.5.6. Caractérisation immunologique

DISCUSSION ET CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

PLANCHES HORS TEXTE

INTRODUCTION

La culture industrielle des palmacées, en particulier du cocotier *Cocos nucifera* et du palmier à huile *Elaeis guineensis* revêt une grande importance économique dans toutes les zones intertropicales du globe. Le grand développement des cultures de ces oléagineux (11 millions d'hectares) s'est accompagné de la colonisation rapide de ces nouvelles niches écologiques par un grand nombre d'insectes ravageurs.

Tous les organes de la plante peuvent être attaqués, mais la plupart des espèces vivent cependant aux dépens des feuilles, qu'elles soient juvéniles ou déployées.

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

En Côte d'Ivoire, où se situent nos recherches, une espèce, *Pteroteinon laufella*, pullule fréquemment sur le palmier à huile et il est alors nécessaire d'intervenir à l'aide d'insecticides.

Pour trouver une alternative à la lutte chimique presque exclusivement employée jusqu'à présent, les recherches ont été réorientées vers la lutte biologique, en particulier à partir de microorganismes.

Ces recherches ont conduit, à reconnaître les germes entomopathogènes, notamment les virus, comme l'un des facteurs naturels les plus efficaces, intervenant dans la régulation des populations à fortes densités, par des épizooties qu'ils déclenchent.

Alors que pendant longtemps, seuls les Baculovirus ont été pris en considération dans la lutte microbiologique, des travaux récents ont mis en lumière le rôle tout aussi efficace de petits virus icosaédriques à ADN ou à ARN.

C'est dans le but de mettre en évidence et d'étudier les maladies virales exploitables en lutte biologique contre les insectes ravageurs que

l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) a initié un programme de prospection d'agents pathogènes.

Nos travaux, qui se situent dans le cadre de ce programme ont porté sur l'étude d'une virose chez le Lépidoptère Hesperidae *Pteroteinon laufella*. Hewitson.

Après avoir présenté les grands traits de la biologie des Hesperidae, les dégâts qu'ils occasionnent sur les Palmacées et les données bibliographiques concernant la pathologie virale de cette famille (Chapitre I), le second chapitre sera consacré à l'exposé des propriétés comparées des petits virus icosaédriques à ADN et ARN d'insectes, groupe auquel se rattache le virus que nous avons découvert.

Le troisième chapitre concerne les techniques virologiques auxquelles nous nous sommes initiés au cours de ce travail.

Enfin, la présentation de nos résultats fera l'objet du dernier chapitre.

CHAPITRE I

BIOLOGIE ET PATHOLOGIE VIRALE DES HESPERIDAE ET DE *Pteroteinon laufella* EN PARTICULIER

1.1. SYSTEMATIQUE

C'est STEPHENS qui attribua le statut de famille aux Hesperidae en 1829 (GRASSE, 1951). Cette famille de Macrolépidoptères appartient au groupe des Rhopalocères, papillons diurnes, caractérisés par de fines antennes se terminant toujours par un renflement. Chez les Hesperidae, les antennes, bien écartées à leur base, présentent un renflement terminé en crochet (ROTH, 1974). Les Hesperidae sont caractérisés par des palpes maxillaires grands et larges, une trompe longue et bien développée. Toutes les pattes sont complètement développées ; les tibias postérieurs sont normalement munis de quatre éperons. La nervation est complète; aux ailes antérieures, les nervures 2 à 12 (C_{u2} à S_c) sont présentes.

1.2. MORPHOLOGIE

L'adulte est un papillon au corps robuste, de taille moyenne (entre 5 et 6 cm), aux ailes relativement petites, de coloration souvent brun-rougeâtre maculée de sombre ou noire maculée de blanc.

AURIVILLIUS (1925) donne de *Pteroteinon laufella* la description suivante : "Dessus des ailes brun-foncé, avec un reflet bleu foncé ou verdâtre, qui recouvre presque entièrement les ailes antérieures et une large plage marginale aux ailes postérieures. Nervures plus foncées. Dessous des ailes antérieures brun au bord intérieur dans les intervalles 1a et 1b. Eclat verdâtre ou bleuâtre dans la cellule et dans la partie basale des intervalles 2 et 3. Ensuite, ces ailes sont brun-noir avec les nervures foncées. Dessous des ailes postérieures verdâtre clair avec les nervures foncées.

MARIAU (1981) précise que la tête, la base des ailes et la face inférieure de l'extrémité de l'abdomen sont rouge orangé [Fig.2]. Les larves des Hesperidae, allongées, glabres ou légèrement velues, sont reconnaissables à leur grosse tête et à leur thorax réduit formant un cou. La chenille de *P. laufella*, arrivée en fin de développement mesure 5 cm de

longueur.

L'abdomen, lisse et glabre, est de couleur tendre. Le vaisseau dorsal est visible par transparence sur toute la longueur du corps. La capsule céphalique est jaune ocre, largement bordée de noir. Le premier segment thoracique forme deux colliers, un blanc se juxtaposant à la capsule céphalique, puis un noir [Fig.1]. La chrysalide, de couleur brune, mesure 4 cm de longueur et présente une corne bifide à l'extrémité de l'abdomen.

1.3. BIOLOGIE

La plupart des papillons de la famille des Hesperidae ont une activité diurne et un vol saccadé. Les adultes ont généralement au repos, une posture bien caractéristique, les ailes antérieures dressées, les ailes postérieures à plat.

La femelle pond des œufs presque sphériques, de 15 mm de diamètre, par groupe, sur la face inférieure des folioles. La durée d'incubation est de 5 à 6 jours. Le développement larvaire dure environ 4 à 5 semaines.

Les chenilles vivent isolément en s'abritant dans un cornet qu'elles forment en réunissant les bords d'une foliole à l'aide de fil de soie. C'est à l'intérieur de ce cornet que s'effectue la nymphose qui dure 1 mois environ. La chrysalide est fixée à la foliole par une ceinture de soie.

1.4. DEGATS SUR PALMACEES

Les larves de nombreuses espèces d'Hesperidae sont phyllophages de plantes cultivées.

C'est ainsi qu'en Asie du Sud-Est, deux espèces du genre *Erionota* ravagent le bananier (DENNIS et HILL, 1983). En Afrique plusieurs espèces sont citées sur le riz : *Pelopidas mathias* et *Gegenes niso* au Cameroun (DESCAMPS, 1956), *Borbo borbonica* en Tanzanie (APPERT, 1967) *Borbo fanta* en Sierra Léone (GRIST et LEVER, 1969) et *Borbo factuclus* en Côte d'Ivoire (CHHANNIS, 1975).

Mais c'est surtout en tant que défoliatrices des Palmacées en

plantations industrielles, que les larves de ces Lépidoptères sont essentiellement connues. Les chenilles, en se tenant sur la face inférieure des folioles dévorent le limbe sur toute son épaisseur. Les attaques peuvent se produire sur les palmiers de tous âges, y compris les jeunes plants de moins d'un an. Ces attaques commencent souvent en lisière des plantations. [Fig.4]

En Amérique latine, une espèce s'est bien adaptée à la culture intensive du palmier à huile, en particulier en Colombie, En Equateur et au Pérou ; il s'agit de *Saliana severus* (GENTY et al., 1978).

En Asie du Sud-Est, DESMIER DE CHENON (1984) décrit deux espèces sur le cocotier en Malaisie et en Indonésie : *Hidari irava* et *Cephrenes chryosoma*.

En Afrique de l'Ouest, c'est LEPESME (1947) qui, le premier, cite deux espèces causant des dégâts au palmier à huile : *Phopalocampta bixae* et *Pyrrhocalcia iphio*.

En Côte d'Ivoire, lieu de nos investigations, les pullulations d'Hesperidae sont quasi-annuelles.

La plupart du temps, il s'agit de l'espèce *Pteroteinon laufella* sur le palmier à huile. Une deuxième espèce, *Zophopetes cerymica* apparaît également sur le palmier à huile mais se rencontre le plus souvent sur le cocotier.

PHILIPPE (1986) signale que les périodes critiques où l'on observe ces attaques sont les mois de juillet-août, décembre-janvier, et mars-avril.

Quelques chiffres récents sur les surfaces traitées chimiquement contre *P. laufella* nous montrent l'étendue des dégâts causés par ce ravageur.

Plantation industrielle Palmin industrie de TAMABO	:	1983	764 ha
Plantation industrielle Palmin industrie de TIEGBA	:	1982/1983	300/444 ha
Plantation industrielle Palmin industrie de YOCOBOUE	:	1981	237 ha
Station IRHO de LAME	:	1980/81/1985	63/52/300 ha

1.5. PATHOLOGIE VIRALE

1.5.1. Introduction

Les données bibliographiques sur la pathologie des Hesperidae sont très succinctes et ne concernent que des maladies virales. Ainsi, seules deux familles de virus ont été signalées comme agents pathogènes des Hesperidae. Il s'agit des Baculovirus de polyédrose nucléaire et des Iridovirus.

Les différentes espèces d'Hesperidae hébergeant ces virus sont mentionnées dans le tableau 1.

TYPE DE VIROSE	ESPECE HOTE	REFERENCE
Iridovirose	<i>Parnara guttata</i>	Martignoni et Iwai 1981
	<i>Potanthus flavum</i>	Martignoni et Iwai 1981
Polyédrose nucléaire	<i>Epargyreus clarus</i>	Martignoni et Iwai 1981
	<i>Thymelicus lineola</i>	Martignoni et Iwai 1981

Tableau 1 : Les viroses des Hesperidae.

1.5.2. Les Iridoviroses

Les maladies virales dues aux Iridovirus sont très répandues chez les invertébrés. Leur appellation sous le vocable d'iridoviroses stigmatise l'iridescence bleutée ou verdâtre caractéristique que prennent les larves infectées ; celle-ci est due à la diffraction de la lumière à travers les édifices paracrystallins des particules virales qui s'accumulent en grand nombre dans les tissus atteints, inhibant rapidement la synthèse des macromolécules chez l'hôte.

La particule virale, non enveloppée, de forme icosaédrique mesure entre 125 et 300 nm de diamètre avec un site de replication cytoplasmique.

Le matériel génétique est constitué d'une molécule linéaire d'ADN bicaténaire d'un poids moléculaire de l'ordre de 100 à 250.10⁶ daltons. (KELLY et ROBERTSON, 1973).

Il existe deux genres d'Iridovirus chez les insectes, regroupés au sein de la famille des Iridoviridae.

Le premier est celui des Iridovirus proprement dits qui regroupe les virus de 130 nm de diamètre ayant pour espèce-type le virus de *Tipula*

paludosa , diptère Tipulidae (XEROS,1954) ; le second est celui des Chloriridovirus, composé des virus de 180 nm de diamètre dont l'espèce-type est le virus irisant type 3 des moustiques du genre *Aedes* (BELLET, 1968).

MARTIGNONI et IWAI signalent en 1981, deux iridoviroses chez deux espèces d'Hesperidae, *Potanthus flavum* et *Parnara guttata*.

1.5.3. Les polsyédroses nucléaires

Ces maladies sont dûes aux virus du sous-groupe A du grand groupe des Baculovirus (du latin *Baculum* = petit bâton, évoquant la forme des virions). Les baculovirus sont des virus en forme de bâtonnet mesurant environ 250 à 400 nm de long sur 40 à 70 nm de diamètre. Ils sont constitués par un corps central dense aux électrons, la nucléocapside, entouré par une enveloppe trilamellaire.

Chaque nucléocapside contient une molécule d'ADN bicaténaire, circulaire et de haut poids moléculaire de l'ordre de $95 \text{ à } 120.10^6$ daltons (SUMMERS, 1978).

Les virus de polyédrose ont la propriété d'être intégrés en fin de morphogenèse dans des structures cristallines protéiniques appelées polyédres, 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).

Il existe d'autres sous-groupes de Baculoviridae dont le sous-groupe B des virus de granulose où les virus sont inclus individuellement dans de petits corps d'inclusion protéiques ovoïdes appelés granules avec pour espèce-type le virus de *Trichoplusia ni*, Lépidoptère Noctuidae (SUMMERS et ARNOTT, 1969) et le sous-groupe C dans lequel sont provisoirement rangés, les virus ne produisant pas de corps d'inclusion. L'espèce-type étant le virus d'*Oryctes rhinoceros* , Coléoptère Scarabaeidae (MONSARRAT et al., 1973).

Deux polyédroses nucléaires sont signalées chez les Hesperidae : *Epargyreus clarus* et *Thymelicus lineola*.

1.5.4. Conclusion

Chez l'espèce *P. laufella* , aucun virus n'avait été signalé jusqu'à présent. De plus, il n'a jamais été décrit de petit virus icosaédrique chez les Hesperidae.

CHAPITRE II

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LES PETITS VIRUS ICOSAEDRIQUES D'INSECTES

2.1. INTRODUCTION

La mise en évidence de petits virus icosaédriques chez les insectes remonte à une vingtaine d'années seulement. Leur faible taille a rendu leur découverte difficile. Ce chapitre exposera l'évolution des recherches et l'état des connaissances actuelles sur ces virus qui se caractérisent par leur petite taille, ne dépassant guère 40 nm de diamètre.

Selon la nature ADN ou ARN de leur acide nucléique, ils sont divisés en deux groupes.

2.2. VIRUS ADN : Les Densovirus

A partir de larves du Lépidoptère Pyralidae *Galleria mellonella* L. sujettes à des épizooties foudroyantes dans les élevages massifs de cet insecte en Haute-Savoie (France), une nouvelle affection pathologique, la denonucléose a été mise en évidence à la Station de recherches de Pathologie comparée de Saint-Christol-les-Alès (MEYNADIER et al., 1964). C'est à partir de ce matériel que l'étiologie virale de la maladie a été établie et le premier virus de denonucléose (VDN) découvert (VAGO et al., 1964).

L'appellation de cette maladie trouve son explication dans la propriété que possèdent les VDN de former, dans le noyau hypertrophié des cellules infectées, des plages fortement colorées par la réaction nucléaire de FEULGEN, correspondant à l'accumulation massive des virions (VAGO et al., 1964).

2.2.1. Anatomo-histo et physio-pathologie

L'affection se caractérise par une paralysie progressive des larves s'accompagnant d'une décoloration de leur tégument. La mort survient rapidement 4 à 5 jours après l'apparition des premiers symptômes. Les

altérations affectent les noyaux des cellules adipeuses de l'hypoderme, des cellules pérित्रachéales, des hemocytes, les cellules de la glande séricigène, l'épithélium de l'intestin antérieur et de l'intestin postérieur, les tubes de Malpighi et les muscles (AMARGIER et al., 1965 ; BERGOIN et BRES, 1968). Chez cet insecte, aucune lésion n'a jamais été décelée au niveau de l'intestin moyen.

Par contre, les densonucléoses décrites chez *Bombyx mori* (SHIMIZU, 1975) et *Sibine fusca* (MEYNADIER et al., 1977) révèlent une infection localisée au niveau des cellules de l'intestin moyen de ces insectes (WATANABE et al., 1976 ; MAEDA et WATANABE, 1978 ; MEYNADIER et al., 1977).

2.2.2. Structure et propriétés physico-chimiques des VDN

Les agents des densonucléoses se présentent comme des particules parasphériques, non enveloppées, mesurant entre 20 et 23 nm de diamètre. Leur capsidie ayant la forme d'un icosaèdre est formée de 32 capsomères (BACHMAN et al., 1975). L'examen au microscope électronique montre parfois à côté des particules pleines, les particules creuses sans acide nucléique.

La densité des VDN, calculée après ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium varie entre 1,39 et 1,42 . L'étude du génome du VDN a montré qu'il est constitué d'ADN monocaténaire de poids moléculaire variant entre 1,5 et 2.10^6 daltons.

La capsidie de VDN renferme quatre protéines (PV₁, PV₂, PV₃, PV₄), celle de plus faible poids moléculaire étant toujours majoritaire (cf. Tableau 2).

VDN	PV ₁	PV ₂	PV ₃	PV ₄	Références
<i>Galleria mellonella</i>	98.000-1 pc	69.000-15 pc	58.500-15 pc	49.000- 69 pc	TJJSSEN et al., 1976
<i>Junonia coenia</i>	109.600-15,2 pc	70.800-22,7 pc	58.700-24,1 pc	41.900-38,2 pc	KELLY et al., 1980
<i>Bombyx mori</i>	77.000-9,5 pc	73.000-25 pc	55.000-29 pc	53.000-36 pc	MAEDA ET AL., 1982

Tableau 2 : Protéines de structure de trois VDN

Il a été mis en évidence que les VDN ne contiennent pas de lipides, mais résistent à de nombreux solvants organiques comme l'éther et le chloroforme ; de plus ils sont thermo-résistants : une heure à 60°C ne suffit pas à les inactiver (BOEMARE et al., 1970).

2.2.3. Classification des virus à ADN

Par l'ensemble de leurs propriétés physico-chimiques, en particulier leur petite taille, la nature ADN monocaténaire de leur génome, leur site de replication nucléaire, les VDN ont été rapprochés du groupe des Parvovirus, pathogènes à l'homme et aux vertébrés. Ils sont regroupés actuellement dans le genre Densovirus, au sein de la famille des Parvoviridae (BACHMAN et al., 1975 ; MATTHEWS, 1982).

2.3. VIRUS à ARN

Il a été mis en évidence ces dernières années chez les insectes une trentaine de virus icosaédriques à ARN dont le diamètre ne dépasse pas 35 nm (LONGWORTH, 1978). Ils ont en commun la propriété d'une capsid non enveloppée de symétrie cubique et un génome constitué d'ARN monocaténaire. Ces virus sont répartis en 3 familles principales, selon la nature segmentée ou non de leur génome et selon le nombre de protéines capsidaires (MATTHEWS, 1982).

2.3.1. Picornaviridae

Cette famille renferme essentiellement des virus de vertébrés comme le genre Enterovirus dont fait partie le virus humain de la poliomyélite.

Trois virus d'insectes, (n'étant rattachés à aucun genre) y sont inclus (MATTHEWS, 1982) : le virus du Lépidoptère *Gonometa podocarp* (HARRAP et al., 1966), le virus de la paralysie du grillon (Crpv) de l'orthoptère *Teleogryllus oceanicus* (REINGANUM et al., 1970) et le virus C de *Drosophila melanogaster* (DCV) (JOUSSET et al., 1972).

Les Picornavirus se présentent comme des particules icosaédriques de 30 nm de diamètre dont le génome est formé d'un brin, simple chaîne d'ARN, de poids moléculaire de l'ordre de 3.10^6 daltons

représentant 30 pc de la masse totale du virion. La densité de la particule virale en chlorure de césium est de 1,34 .

La composition polypeptidique de la capside montre trois protéines majeures (PV_1 , PV_2 , PV_3) dont les poids moléculaires sont regroupés entre 33.000 et 28.000 daltons et deux protéines mineures (PV_0 et PV_4). Les trois protéines majeures sont en proportion équimoléculaire. Les Picornavirus se multiplient dans le cytoplasme des cellules des différents tissus de leur hôte en particulier dans les cellules hypodermiques.

Les particules virales apparaissent le plus souvent arrangées en réseau paracristallin à l'intérieur de vésicules.

2.3.2. Nodaviridae

C'est une nouvelle famille, créée seulement en 1982 par MATTHEWS et regroupant uniquement des virus d'invertébrés. Ils se caractérisent par un génome constitué de deux molécules d'ARN monocaténaire de poids moléculaire 1 et 0,5. 10^6 daltons enfermées dans la même capside. La particule virale, de forme icosaédrique, mesure 30 nm de diamètre et a une densité en chlorure de césium de l'ordre de 1,34. La composition polypeptidique de la capside révèle une protéine majeure de poids moléculaire 40.000 daltons et deux protéines mineures. L'espèce type est le Nodamura virus isolé d'un Diptère du Japon *Culex tritaeniorhynchus* (SCHERER et HURLBUT, 1967).

2.3.3. Famille du groupe *Nudaurelia* β

Cette famille regroupe une quinzaine de virus ne possédant qu'une seule protéine capsidaire (PM : 60 - 70.10³ daltons) mais n'ayant pas encore reçu de nom approprié (MATTHEWS, 1982). L'espèce-type est le virus β découvert chez le Lépidoptère Saturnidae *Nudaurelia cytherea capensis* en Afrique du Sud (JUCKES, 1970). La particule virale, de forme icosaédrique mesure 35 nm de diamètre et possède une densité de l'ordre de 1,27 à 1,29. Le génome est constitué par une molécule d'ARN monocaténaire de P.M. : 1,8.10⁶ daltons représentant 10 pc de la masse totale du virion.

2.3.4. Autres virus

Il s'agit d'un certain nombre de virus icosaédriques à ARN, avoisinant les 35 nm de diamètre, et n'ayant pas été classés dans les trois familles précitées. Chacun d'eux présentent des caractéristiques les excluant des familles bien connues.

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

3.1. LE MATERIEL VIVANT

Notre étude a porté sur *Pteroteinon laufella*, Lépidoptère Hesperidae, dont la larve apparaît régulièrement en pullulation dans les palmeraies industrielles du sud de la Côte d'Ivoire.

Nos chenilles ont été prélevées sur la plantation de palmier à huile de La Mé. Les larves sont récoltées sur les folioles après abattage d'une palme à la faucille ; elles sont disposées dans des boîtes aérées et transportées jusqu'au laboratoire.

3.2. TECHNIQUES DE PATHOGENIE EXPERIMENTALE

3.2.1. Recherche et isolement du virus

Le processus de recherche et d'isolement de l'agent infectieux s'est déroulé en plusieurs étapes :

- observation quotidienne des mortalités et des anomalies du comportement des larves prélevées en période d'épizootie dans la nature et maintenues en quarantaine au laboratoire ;
- contrôle en microscopie à contraste de phase de frottis d'hémolymphe, de tissu adipeux, d'hypoderme et d'intestin moyen ;
- contrôle direct en microscopie électronique du broyat de larves malades en contraste négatif ;
- purification des particules d'allure virale observées en microscopie électronique.

3.2.2. Technique d'infection

Les chenilles présumées saines sont regroupées par 25 dans des cages aux armatures de bois et dont les faces sont faites de tulle. On réalise l'infection per os de ces larves par badigeonnage des folioles de palme avec des broyats de larves infectées.

3.3. TECHNIQUES DE PURIFICATION DU VIRUS

3.3.1. Broyage et clarification

Les larves infectées sont broyées dans un tampon phosphate 0,5 M contenant 0,08 p.c. de désoxycholate de sodium, pH : 7,4. Le broyat est filtré sur mousseline, clarifié par ultracentrifugation pendant 2 h à 145.000 g. Le culot, repris dans le même tampon, est dispersé aux ultra sons, puis clarifié à 8.000 g pendant 10 min. Le surnageant est alors déposé sur gradient de densité.

3.3.2. Purification en gradient de densité

Les suspensions virales partiellement purifiées sont déposées sur des gradients de saccharose 15 p.c. - 45 p.c. (poids-poids) préparés dans du tampon phosphate pH : 7,4 et centrifugées à 7°C pendant 2 h à 100.000 g.

Le tracé absorptiométrique du profil du gradient est obtenu à 260 nm de longueur d'onde à l'aide d'un analyseur relié à la cuve d'un spectrophotomètre BECKMAN UV. 5230. Le saccharose contenu dans les bandes de virus prélevées dans les gradients, est éliminé par remise au culot dans du tampon phosphate. Deux à trois gradients sont nécessaires pour obtenir une suspension virale d'un haut degré de pureté.

3.4. TECHNIQUES DE CARACTERISATION DU VIRUS

3.4.1. Caractérisation biophysique

3.4.1.1. Structure du virus

La suspension virale purifiée est observée au microscope électronique. Une goutte de suspension est déposée sur une grille recouverte d'un film de collodion carboné et contrasté négativement à l'acétate d'uranyl à 2 p.c. ou à l'acide phosphotungstique à 1 p.c., pH 7,4 selon BRENNER et HORNE (1959).

Cette observation nous révèle la structure et la taille des particules virales.

3.4.1.2. Dosages spectrophotométriques

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

3.4.2. Caractérisation biochimique

3.4.2.1. Mise en évidence de la nature de l'acide nucléique du virus par dosage colorimétrique

L'ADN est dosé par la réaction à la diphenylamine selon la méthode de DISCHE (1930) modifiée par GILES et MYERS (1965). L'ARN est dosé par la méthode à l'orcinol selon MEJBAUN (1939).

3.4.2.1.1. Neutralisation de la suspension par les enzymes

a) Action de la RNase

1 volume de suspension virale (3 ml)
+ 1/10 volume de Tampon Tris
+ 1/10 volume de RNase (2 mg/ml H₂O distillée)
- laisser 2 h à 4°C

b) Action de la DNase

- reprendre la même suspension
+ 1/10 volume de MgCl₂ à M/100 = 0,95 g/l

- + 1/10 volume de DNase (0,4 mg/ml H₂O distillée)
- laisser 12 h à 4°C

3.4.2.1.2. Centrifugation

- 1 h à 41.000 Tours/min sur rotor Ti 50
- reprendre le culot dans du Tampôn Tris (2 ml)

3.4.2.1.3. Hydrolyse

- 1 volume de suspension virale (2 ml)
- + 1 volume d'acide perchlorique à 20 p.c.

3.4.2.1.4. Recherche de l'ARN (MEJBAUM, 1939)

- 1 volume de suspension virale dans l'acide perchlorique (2 ml)
- + 1 volume de réactif orcinol
(0,1 g orcinol dans 10 ml HCl pur + 0,05 g de FeCl₃ ou 0,05 g FeCl₃ 6H₂O)
- laisser 20 minutes au bain-marie à 100°C
- lecture au colorimètre dans des cuves de 0,4 cm.

3.4.2.1.5. Recherche de l'ADN (GILES et MYERS, 1965)

- 1 volume de suspension virale dans l'acide perchlorique (2 ml)
 - + 1 volume de Diphénylamide à 4 p.c. dans l'acide acétique glacial
 - + 0,2 volume d'acétaldéhyde (1,8 mg/ml H₂O)
 - lecture au colorimètre dans des cuves de 0,4 cm
- Faire un tube témoin pour chaque réaction.

3.4.2.2. Electrophorèse des protéines virales

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS selon la méthode de WEBER et OSBORN (1969) nous a permis de déterminer le nombre et le poids moléculaire des protéines virales.

Des gels de 6 p.c., 7 p.c., 8 p.c. et 9 p.c. de polyacrylamide sont coulés entre deux plaques de verre. La technique de préparation des gels est la suivante :

- Composition des tampons

Tampon de migration		Tampon d'électrophorèse	
TRIS	1,876 M	TRIS	0,025 M
SDS	0,5 p.c.	Glycine	0,192 M
pH 8,8		SDS	0,1 p.c.
		pH 8,3	
Tampon de dépôt			
	TRIS		0,125 M
	SDS		4 p.c.
	β mercaptoéthanol		5 p.c.
	Glycérol		20 p.c.
	Bleu de Bromophénol		0,005 p.c.
	pH 6,8		

- Préparation des gels

Les proportions des différentes solutions nécessaires à la préparation des gels en fonction de leur concentration en polyacrylamide sont consignées dans le tableau 3.

Concentration du gel	6 p.c.	7 p.c.	8 p.c.	9 p.c.
Solution mère Acrylamide 30 p.c. et Bis-acrylamide 0,8 p.c.	20 ml	23,5 ml	26,5 ml	30 ml
Filtration (0,45 μ)				
Tampon migration	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
H ₂ O distillée	59 ml	55,5 ml	52,5 ml	49 ml
Persulfate d'ammonium à 10 p.c.	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
TEMED	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl

Tableau 3 : Protocole de préparation des gels

Après une pré-électrophorèse d'une demi-heure pour éliminer d'éventuelles protéines du gel, les échantillons sont déposés dans des puits préparés au préalable dans le gel. Les suspensions virales utilisées sont traitées par une solution dénaturante : le tampon de dépôt.

Le mélange, volume à volume est chauffé à 100°C pendant 10 minutes. Nous avons utilisé six protéines de référence, la phosphorylase b (P.M : 94.000), la séralbumine de boeuf (P.M. : 67.000), l'ovalbumine (P.M. : 43.000), l'anhydrase carbonique (P.M. : 30.000), l'inhibiteur de trypsine (P.M. : 20.100 et la lactalbumine (P.M. : 14.400) permettant d'établir un étalonnage reliant la mobilité relative des protéines (Rf) au logarithme de leur poids moléculaire.

L'électrophorèse se déroule à température ambiante sous une tension de 100 mV.

Une fois séparés, les polypeptides sont fixés par une solution d'acide trichloracétique (T.CA) à 25 p.c. pendant 30 minutes, puis le gel coloré pendant 12 heures par une solution contenant 0,1 p.c. de bleu brillant de Coomassie, 25 p.c. de méthanol et 10 p.c. d'acide acétique, le tout filtré avant utilisation.

Les gels sont ensuite décolorés par plusieurs bains successifs de solution décolorante contenant 25 p.c. de méthanol et 10 p.c. d'acide acétique. Les gels sont alors photographiés.

3.4.3. Caractérisation immunologique

3.4.3.1. Préparation des antisérums

Les techniques sérologiques nécessitent la préparation d'immun-sérums spécifiques préparés à partir de lapin. Le lapin reçoit lors de l'immunisation initiale, puis en rappel 7 jours plus tard, 1 ml de suspension virale à 1,5 D.O/_{260nm} par injection dans la veine marginale de l'oreille. Une troisième inoculation est faite 12 jours plus tard par injection intramusculaire d'un mélange comprenant 1 ml de suspension virale et 1 ml d'adjuvant complet de FREUND.

Le lapin est saigné 10 jours après le dernier rappel. Le sérum recueilli après rétraction du caillot (1 heure à 37°C ou 12 heures à 10°C) est centrifugé pendant 10 minutes à 5000 g. Il est conservé au congélateur sans adjonction de glycérol ou d'azoture de sodium jusqu'au moment de l'utilisation.

3.4.3.2. Immunodiffusion en gel d'agarose

La technique 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 diverses origines). Un gel de 1,5 mm d'épaisseur d'agarose peu concentré (1 p.c.) dans un tampon phosphate 0,05 M pH 7,5, est coulé sur une lame histologique. Sept puits sont pratiqués après refroidissement du gel, aux sommets et au centre d'un hexagone à l'aide d'un emporte-pièce de 4 mm de diamètre muni d'un dispositif d'aspiration sous vide. Les antigènes et les immunsérums sont déposés dans les puits à raison de 20 µl par puits. Les lames stockées dans une chambre humide sont mises à incuber à 37°C pendant 24 heures. Après obtention des précipités, les plaques de gélose sont lavées dans 4 bains d'eau physiologique (NaCl 0,9 p.c.) pour éliminer toutes les protéines non précipitées. Un dernier lavage à l'eau distillée élimine 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 par immersion de la lame dans une solution aqueuse contenant 0,5 p.c. de bleu de Coomassie, 45 p.c. d'éthanol et 10 p.c. d'acide acétique, filtré avant usage.

Après deux heures, les plaques sont décolorées dans une solution aqueuse contenant 45 p.c. d'éthanol et 10 p.c. d'acide acétique.

CHAPITRE IV

ETUDE D'UN PETIT VIRUS à ARN CHEZ *PTEROTEINON LAUFELLA*

4.1. INTRODUCTION

Les contrôles sanitaires de routine effectués dans les plantations industrielles Palmindustrie de palmiers à huile de l'IRHO ont permis aux entomologistes de signaler d'importants dégâts causés par les larves du Lépidoptère Hesperidae *P. laufella*. Ces pullulations s'accompagnent parfois de mortalités anormales affectant une partie de la population de ce ravageur.

Nous avons étudié les symptômes de la maladie sur des larves malades prélevées en plantation et des larves infectées expérimentalement par des broyats de cadavres.

Puis, afin de déterminer l'étiologie, nous avons recherché l'agent pathogène responsable.

4.2. SYMPTOMES ET DEROULEMENT 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^{er} et le 3^e jour après la contamination, alors que les chenilles s'immobilisent complètement. Au cours de l'évolution de la maladie, nous remarquons un changement de couleur des téguments. Initialement, vert pâle, les larves deviennent jaune puis marron. Avant la mort des secrétions buccales et anales de couleur brune s'écoulent, marquant des altérations notables du système digestif. Le corps de la larve devient alors très flasque.

4.3. PATHOLOGIE EXPERIMENTALE

Nous n'avons pas réussi à maintenir un élevage de larves saines au laboratoire. Nous avons donc comparé les mortalités observées chez des larves récoltées en plantation, en période d'épizootie et chez des larves du même stade ayant été infectées per os. [Tableau IV, Fig.7].

Nombre de jours après la mise en observation	250 larves infectées per os	250 larves récoltées en plantation
1	23 p.c.	0 p.c.
2	53 p.c.	16p.c.
3	66 p.c.	21p.c.
4	82 p.c.	34p.c.
5	92 p.c.	54p.c.
6	95 p.c.	64p.c.
7	95 p.c.	82 p.c.
8	95 p.c.	82 p.c.

Tableau IV. Pourcentages cumulés de mortalité chez des larves récoltées en plantation en période d'épizootie et chez des larves infectées au laboratoire.

Une semaine après la mise en observation, nous constatons 82% 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. Ce même chiffre (82 p.c.) se retrouve après 4 jours chez les larves infectées et il augmente jusqu'à 95 p.c. 6 jours après l'infection.

Nous sommes donc en présence d'un agent particulièrement pathogène.

4.4. RECHERCHE DE L'AGENT PATHOGENE

Différentes recherches en microscopie photonique s'étant révélées négatives, nous avons écarté l'hypothèse d'un protozoaire, d'une bactérie ou même d'un virus inclus dans un polyèdre de type Baculovirus ou Réovirus.

Nous avons alors examiné en microscopie électronique des broyats de larves malades. Cette étude nous a révélé la présence de trois types de particules [Fig. 5, 6a, 6b].

Nous avons observé de nombreuses petites particules isométriques de 8 à 9 nm de diamètre. Leur origine virale reste à démontrer. Elles ne sont peut-être constituées que de protéines.

Nous observons également un petit virus de 30 nm de diamètre icosaédrique et non enveloppé. Il nous a été impossible par la suite de le caractériser car nous les perdions au cours des différentes étapes de purification.

Enfin, ces examens nous ont permis de mettre en évidence un virus de 40 nm de diamètre dont nous avons entrepris la purification en vue de sa caractérisation.

4.5. CARACTERISATION DU VIRUS

4.5.1. Purification

Les larves malades ou mortes de *P. lauffella* sont broyées dans un tampon phosphate 0,5 M contenant du désoxycholate de Na à 0,08 p.c. pH 7,4. Le virus présent dans le broyat est purifié après plusieurs cycles de centrifugation en gradient de saccharose selon les techniques exposées dans le Chapitre III. La suspension ainsi purifiée est alors contrôlée en microscopie électronique.

4.5.2. Structure du virus

Ce virus de *P. lauffella* apparaît sous forme de particule sans enveloppe, de forme icosaédrique et mesurant 40 nm de diamètre. Certaines particules présentent un centre dense.

4.5.3. Spectre d'absorption en lumière ultra-violette

Le spectre d'absorption dans le proche ultra-violet d'une suspension virale purifiée est caractéristique des nucléoprotéines présentant un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm [Fig.8]. Les rapports $D_{0_{260}}/D_{0_{280}}$ et $D_{0_{260}}/D_{0_{240}}$ sont respectivement 1,40 et 1,12.

4.5.4. Nature de l'acide nucléique viral

La nature de l'acide nucléique constituant le génome du virus a été déterminée par des méthodes biochimiques. Nous avons obtenu une réaction positive à l'orcinol. En revanche, aucune coloration n'a été obtenue avec le réactif à la diphénylamine. [Fig.9 et 10]. Le génome du virus est donc

constitué d'ARN.

4.5.5. Analyse électrophorétique des protéines virales

Le nombre et le poids moléculaire des protéines capsidaires du virus ont été déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS à 6 p.c., 7 p.c., 8 p.c. et 9 p.c. selon la méthode de WEBER et OSBORN (1969).

Le profil électrophorétique [Fig.11 et 12] des gels fait apparaître trois protéines (PV₁, PV₂ et PV₃) dont une majeure (PV₂) de poids moléculaire 53.000 daltons et deux mineures (PV₁ et PV₃) de poids moléculaires 65.000 et 34.000 daltons respectivement [Tableau V et Fig.13].

Protéines	Concentration du gel en polyacrylamide	6 p.c.	7 p.c.	8 p.c.	9 p.c.
Phosphorylase b :	94.000	0,20	0,18	0,14	0,11
Sérum albumine de bœuf :	67.000	0,36	0,28	0,22	0,18
Ovalbumine :	43.000	0,50	0,41	0,35	0,30
Anhydrase carbonique:	30.000	0,66	0,59	0,51	0,43
Inhibiteur de trypsine	20.000	0,88	0,82	0,76	0,61
a- lactalbumine :	14.400	-	-	-	-
PV ₁		0,34	0,29	0,23	0,19
PV ₂		0,41	0,35	0,29	0,24
PV ₃		0,51	0,52	0,45	0,38

Tableau V. Valeur moyenne des Rf pour chacune des protéines de référence et des trois protéines capsidaires du virus de *P. lauffella* aux différentes concentrations du gel en polyacrylamide.

4.5.6. Caractérisation immunologique

Par la technique de double diffusion en gel d'agarose (OUCHTERLONY, 1948), nous avons recherché les parentés immunologiques pouvant exister entre les deux virus de *P. lauffella* (le virus de 30 nm de

diamètre non caractérisé et le virus de 40 nm de diamètre, objet de notre étude) et quelques virus de même type déjà connus.

Nous avons utilisé le Densovirus de *Casphalia extranea* , (FEDIERE, 1981, 1983), le Picornavirus de *Latoia viridissima*, (FEDIERE, 1983, 1984), le Picornavirus de *Teinorhyncha umbra* (FEDIERE, 1985a), le Picornavirus de *Teleogryllus oceanicus* (Crpv) et le virus de *Turnaca rufisquamata* (FEDIERE 1985b).

Un antisérum de lapin a été préparé par injection d'une suspension contenant les deux virus de *P. laufella* . Ce sérum a réagi avec les deux antigènes homologues en donnant deux arcs de précipitation [Fig.14].

En revanche, aucun arc de précipitation n'a été observé entre cet antisérum et les autres virus précités. Ce résultat nous suggère l'absence de communauté antigénique entre les virus de *P. laufella* et les virus déjà connus du laboratoire.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'Ensemble des résultats présentés ci-dessus conduit à considérer le virus de 40 nm de diamètre isolé de *P. laufella* comme un petit virus icosaédrique à ARN, qui, par ses propriétés biophysiques, biochimiques et immunologiques ne se rapproche véritablement d'aucune famille de virus à ARN.

En effet, son diamètre la différence des Picornaviridae et des Nodaviridae dont les représentants présentent un diamètre de 30 nm. D'autre part, le fait que sa capsid ne soit pas constituée d'une seule protéine (PV₂ majoritaire) mais contienne également deux protéines minoritaires (PV₁ et PV₃) l'exclut provisoirement du groupe des virus de type β Nudaurelia.

Une caractérisation plus approfondie au niveau génomique, nous permettra alors de le classer avec plus de précision. Le fait que le microscope électronique du GERME ne soit plus en état de marche nous a posé de nombreux problèmes et en particulier nous a empêché d'aborder l'étude cytologique ultrastructurale.

Les tests de pathogénicité en laboratoire nous indique le caractère hautement pathogène de ce virus.

Les épizooties qu'il s'avère capable de déclencher dans les conditions naturelles nous permettent de fonder des espoirs pour son utilisation future en lutte biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- AMARGIER (A.) ; VAGO (C.) ; MEYNADIER (G.)- 1965. Etude histopathologique d'un nouveau type de virose mise en évidence chez le Lépidoptère *Galleria mellonella* . Arch. ges. Virusforsch., 15, 659-667.
- APPERT (J.)- 1967. Les insectes nuisibles aux cultures de Madagascar. Agronomie Tropicale, 2-9, 1-177.
- BACHMAN (P.A.) ; HOGGAN (M.D.) ; MELNICK (J.L.) ; PEREIRA (H.G.) ; VAGD (C.), 1975. Parvoviridae. Intervirology, 5, 83-92.
- BELLET (A.J.D.)- 1968. The iridescent virus group. Adv. Virus Res., 13, 225-246.
- BERGOIN (M.) ; BRES (N.)- 1968. Lésions tissulaires chez la larve du Lépidoptère *Galleria mellonella* L.. atteinte du virus de la denonucléose. Bull. apicole, 11, 5-12.
- BOEMARE (N.) ; CROIZIER (G.) ; VEYRUNES (J.C.)- 1970. Contribution à la connaissance des propriétés du virus de la denonucléose. Entomophaga, 15, 327-332.
- BRENNER (S.) ; HORNE (R.W.)- 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of virus. Biochem. Biophys. Acta, 34, 103-110.
- CHHANNIS (S.)- 1975. Les ravageurs du riz en Côte d'Ivoire. III. Etudes préliminaires sur le riz pluvial en Basse Côte d'Ivoire. ORSTOM, 48p.
- DENNIS (S.) ; HILL (M.)- 1983. Agricultural insect pests of the tropics and their control, 2, 346-347.
- DESCAMPS (M.)- 1956 . Insectes nuisibles au riz dans le Nord_Cameroun. Agron. tropicale, 11, 732-755.
- DESMIER DE CHENON (R.)- 1984. Field guide for coconut and plantation sanitary protection. Rapport IRHO, 270p.
- DISCHE (Z.)- 1930. Über einige neue charakterische farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine mikromethod zur bertimmung derselben in tierischen organen mit Hilfe dieser reaktionen. Mikrochemie, 8,

4-32.

FEDIERE (G.) ; DESMIER DE CHENON (R.) ; MARIAU (D.) ; MONSARRAT (P.). 1981. Mise en évidence de maladies à épizooties de type densonucléose chez deux chenilles de Limacodidae. Lépidoptères phyllophages du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire. Communication au Colloque International de la Protection des Cultures Tropicales Lyon, France. (8-10 Juillet 1981).

FEDIERE (G.).- 1983. Recherche sur les viroses épizootiques de Lépidoptères Limacodidae ravageurs de Palmacées. Thèse de Doctorat 3e cycle U.S.T.L., Montpellier, 130p., 28 pl.

FEDIERE (G.) ; MONSARRAT (P.) ; PHILIPPE (R.).- 1984. Biological control of a Limacodid, oil palm pect in Ivory Coast ; by use of a small isometric virus. Communication au "First Regional Symposium of Biological Control" : Serdang Malaisie (3-5 Sept. 1984)

FEDIERE (G.) ; MONSARRAT (P.).- 1985 a. Mise en évidence d'un virus épizootique chez *Teinorhyncha umbra* (Lépidoptera Limacodidae) défoliateur du bananier en Côte d'Ivoire. Communication à la 4e Conf. Internationale sur l'impact des maladies à virus sur le développement des pays d'Afrique. Rabat, Maroc (14-19 Avril 1985).

FEDIERE (G.).- 1985 b. Contribution à l'étude de la pathogénie de trois virus libres de Lépidoptères Limacodidae sur *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). Mise en évidence de nouveaux virus entomopathogènes. Rapport de mission ORSTOM, 9p., 3 pl.

GENTY (P.) ; DESMIER DE CHENON (R.) ; MORIN (J.P.).- 1978. Les ravageurs du palmier à huile en Amérique Latine. Lépidoptera (Hesperidae). Oléagineux, 33, 358-359.

GILES (K.W.) ; MYERS (A.).- 1965. An improved Diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature, London, 206, 93.

GRASSE (P.P.).- 1951. Traité de zoologie, Masson, Paris, 10, (1), 426-427.

GRIST (D.H.) ; LEVER (R.J.A.W.).- 1969.... Pest of rice. Longmans, London 520p.

HARRAP (K.A.) ; LONGWORTH (J.F.) ; TINSSLEY (T.W.) ; BROWN (K.W.).- 1966. A

noninclusion virus of *Gonometa podocarpi* (Lepidoptera : Lasiocampidae). J. Invertebr. Pathol., 8, 270-270.

JOUSSET (F.X.) ; PLUS (N.) ; CROIZIER (G.) ; THOMAS (M.).- 1972. Existence chez *Drosophila* de deux groupes de picornavirus de propriétés sérologiques et biologiques différentes. C.R. Acad. Sci., Sér. D, 275, 3043-3046.

JUCKES (I.R.M.).- 1970.- Viruses of the pine emperor moth. Bull. S. Afr. Soc. Plant Pathol., 4, 18.

KELLY (D.C.), ROBERTSON (J.S.).- 1973. Icosahedral cytoplasmic deoxyciboviruses. J. gen. Virol., 20 (Suppl.) 17-41.

KELLY (D.C.) ; MORE (N.F.) ; SPILLING (C.R.) ; BARWISE (A.H.) ; WALKER (I.O.).- 1980 . Densonucleosis virus structural proteins. J. Virol., 36, 224-235.

LEPESME (P.).- 1947. Les insectes des palmiers. Le Chevalier Paris, 903p.

LONGWORTH (J.F.).- 1978. Small isometric viruses of invertebrates. Adv. Virus Res., 23, 103-157.

MAEDA (S.) ; WATANABE (H.).- 1978. Immuno-fluorescence observation of the infection of densonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. Jap. J. appl. Ent. Zool., 22, 98-101.

MAEDA (S.) ; KAWAI (T.) ; WATANABE (H.).- 1982. Protein characteristics of a densonucleosis virus of the silkworm *Bombyx mori*. Abstr. 3rd. internation. Colloq. Invertebr. Pathol. Brighton, United Kingdom, p.222.

MARIAU (D.) ; DESMIER DE CHENON (R.) ; JULIA (J.F.).- 1981. Les ravageurs du palmier à huile et du cocotier en Afrique Occidentale, 36, 4, 192-193.

MARTIGNONI (M.E.) ; IWAI (P.J.).- 1981. A catalogue of viral diseases of insects ; mites and ticks. In : Microbial Control of Pert and Plant Diseases, 1970-1980. (H.D. Burges ed.) p. 897-911. Academic Press, London.

MATTHEWS (R.E.F.).- 1982. Classification and Nomenclature of virus. (Fourth

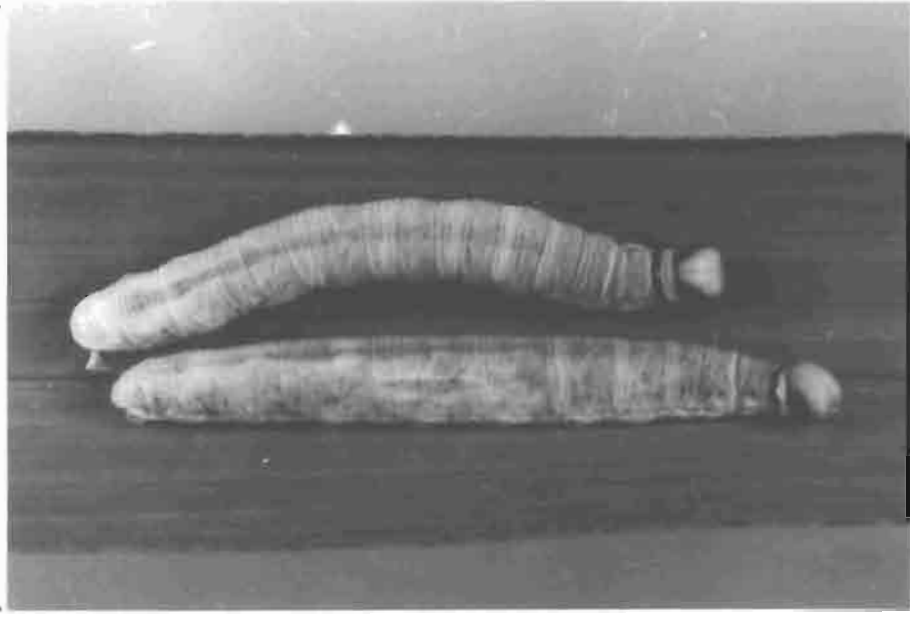
- report of the I..C.T.V.). Karger, Basel, Intervirolgy, 17, 1-199.
- MEJBAUM (W.Z.).- 1939. Über die Bertimmung kleiner Pentosemengeninsbesonder in derivaten der adenylsäure. Z. Physiol. Chem., 258, 117-120.
- MEYNADIER (G.) ; VAGO (C.) ; PLANTEVIN (G.) ; ATGER (P.).- 1964. Virose d'un type inhabituel chez le Lépidoptère *Galleria mellonella* L. Rev. Zool. agric. appl., 63, 207-208.
- MEYNADIER (G.) ; AMARGIER (A.) ; GENTY (P.).- 1977 . Un virus de type denonucléose chez le Lépidoptère *Sibine fusca* , Stoll. Oléagineux, 32, 357-361.
- MONSARRAT (P.) ; MEYNADIER (G.) ; CROIZIER (G.) ; VAGO (G.).- 1973. Recherches cytopathologiques sur une maladie virale du Coléoptère *Oryctes rhinoceros* C.R. Acad. Sci. Sér. D, 276, 2077-2080.
- OUCHTERLONY (O.).- 1948. Antigen antibody reaction in gels. Ark. Keni. Miner. Geol. B, 26, 16.
- PHILIPPE (R.)..- 1986. Essais de lutte biologique contre les chenilles défoliatrices du palmier à huile et du cocotier. Rapport IRHO, 46p.
- REINGANUM (C.) ; D'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.
- ROTH (M.).- 1974. Initiation à la morphologie, la systématique et la biologie des insectes. ORSTOM, Bondy, 119p.
- SCHERER (W.F.), HURLBUT (H.S.).- 1967. Nodamura virus from Japan : a new and unusual arbovirus resistant to ether and chloroform. Am. J. Epidemiol., 86, 271-285.
- SEITZ (A.).- 1914. Les macrolépidoptères du globe. Fauna africana. 13, (2), 512-513, Kernen Stuttgart.
- SHIMIZU (T.).- 1975. Pathogenicity of an infectious flacherie virus of the silkworm *Bombyx mori* , obtained from sericultural farmes in the ruburbs of Ina City. J. sericult. Sci., Japan, 44, 45-48.

- SUMMERS (M.D.)- 1978. Baculoviruses. *In* : Viral pesticides : present knowledge and potential effects on public and environmental health. (M.D. Summers, C.T. Kawanishi, eds.) p. 45-73. EPA Symposium, Myrthe Beach, South Carolina, March 21-23, 1977. EPA-600/9-78-026.
- 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.
- TIJSSEN (P.) ; VAN DEN HURK (J.) ; KURSTAK (E.)- 1976. Biochemical, biophysical, and biological properties of Densonucleosis virus. I. I.Structural Proteins. J. Virol., 17, 686-691.
- VAGO (C.) ; MEYNADIER (G.) ; DUTHOIT (J.L.)- 1964. Etude d'un nouveau type de maladie à virus chez les Lépidoptères. Ann. Epiphyties., 15, 475-479.
- 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., 27, 16-20.
- WATANABE (H.) ; MAEDA (S.) ; MATSUI (M.) ; SHIMIZU (T.)- 1976. Histopathology of the midgut epithelium of the silk-worm *Bombyx mori* , infected with a newly-isolate virus from the flacherie diseased larvae. J. Serricult. Sci. Japan ; 45, 29-34.
- WEBER (K.) ; OSBORN (M.)- 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. J. biol. Chem., 244, 4406-4412.
- XEROS (N.G.)- 1954. A second virus disease of the leather jacket, *Tipula paludosa* . Nature, London, 174-562.

PLANCHE I

Fig. 1 : Larves de *P. laufella* en fin de développement.

Fig. 2 : Papillon adulte.



①



②

PLANCHE II

Dégâts causés par *P. laufella* sur palmier à huile

Fig. 3 : Palmier sain.

Fig. 4 : Palmier ravagé.



3



4

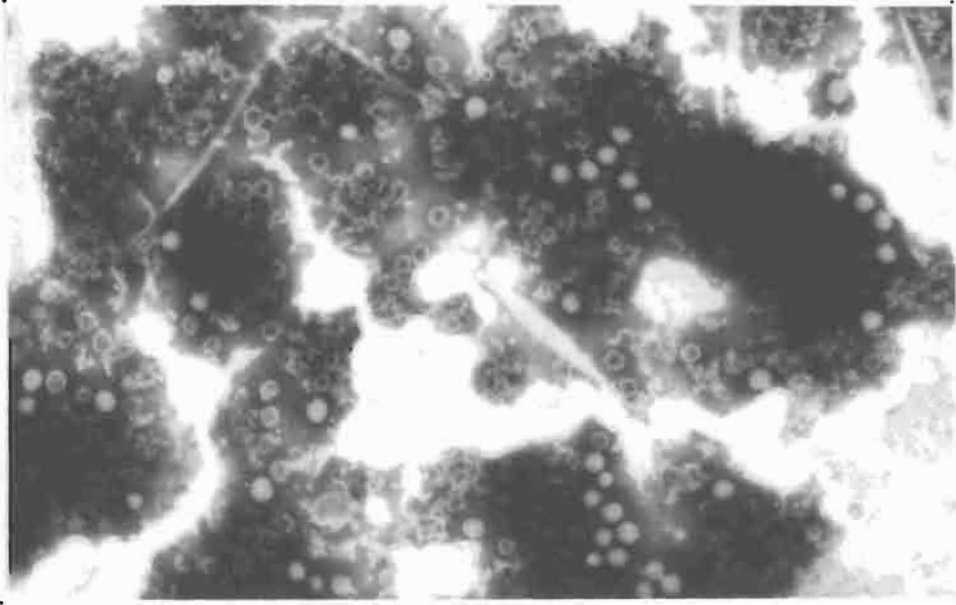
PLANCHE III

Observation x 90.000 en microscopie électronique

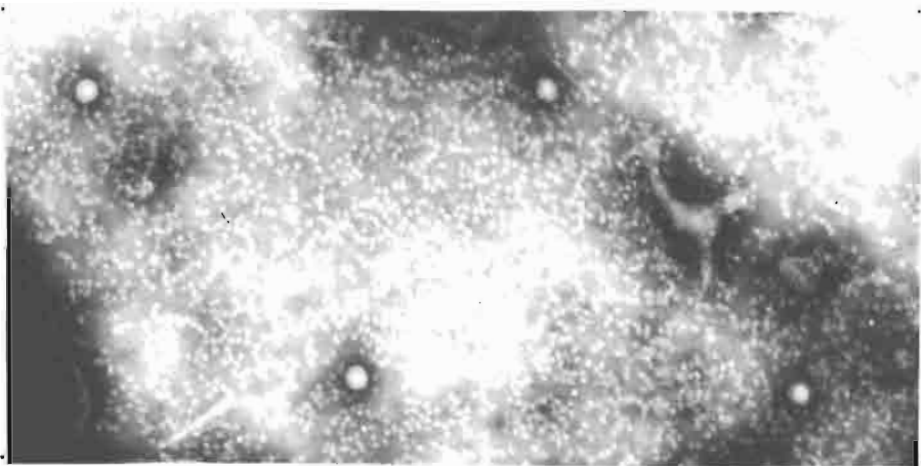
Fig. 5 : Suspension contenant simultanément les virus de 40 et 30 nm de diamètre.

Fig. 6 a: Suspension contenant simultanément le virus de 40 nm et des petites particules de 8 nm de diamètre.

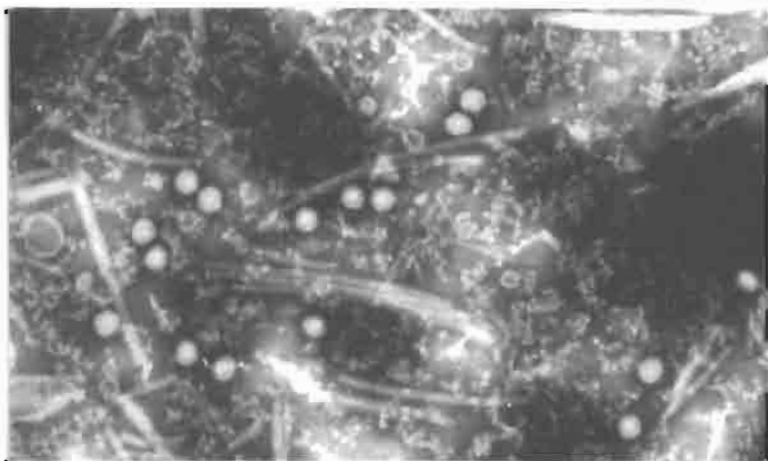
Fig. 6 b: Suspension contenant le virus de 40 nm de diamètre où certaines particules présentent un centre dense.



5



6_a



6_b

PLANCHE IV

Fig. 7 : Courbes de mortalité des larves récoltées en plantation et des larves infectées au laboratoire.

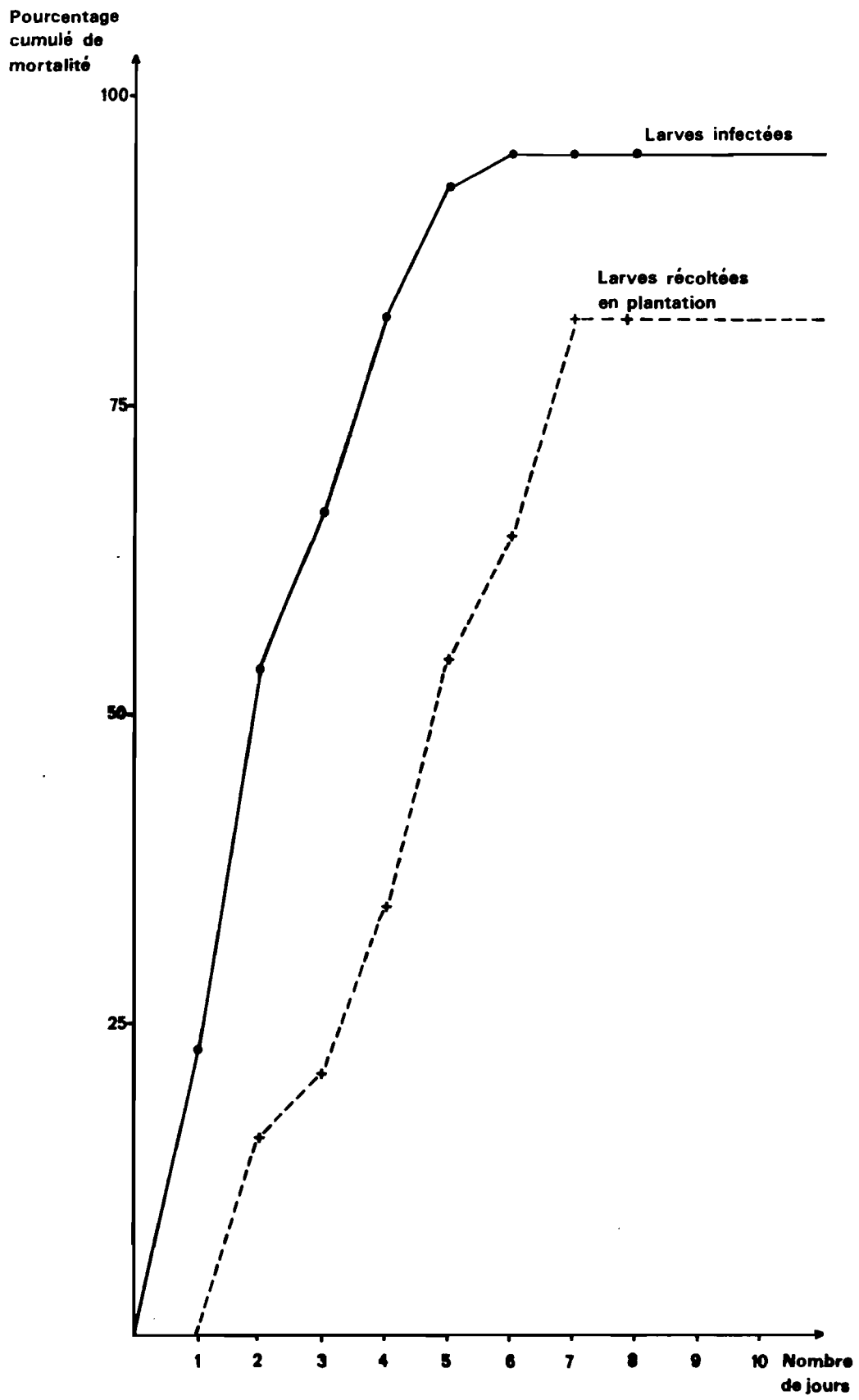


PLANCHE V

Fig. 8 : Spectre d'absorption en lumière ultra-violette
d'une suspension purifiée de *P. laufella*.

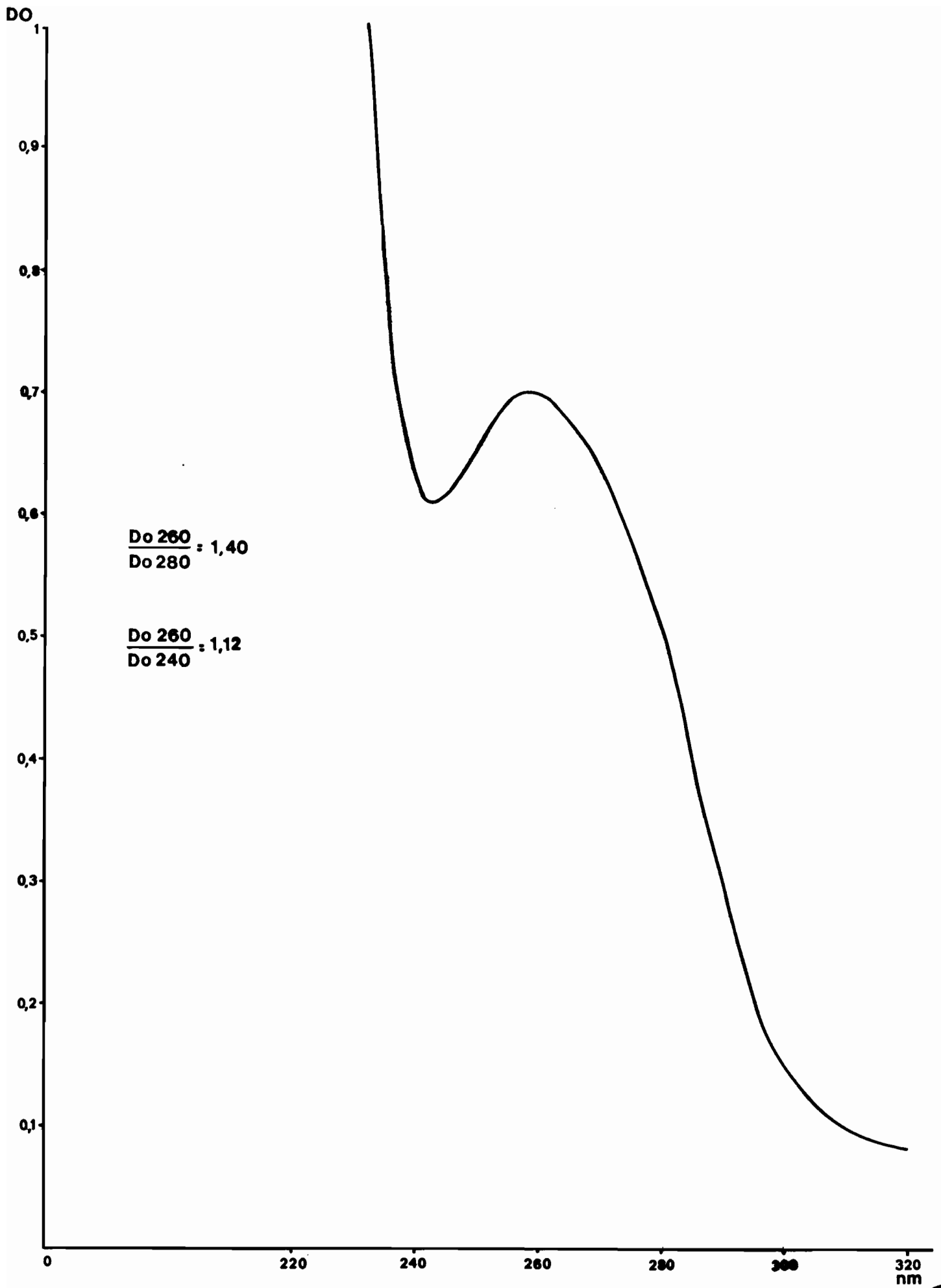
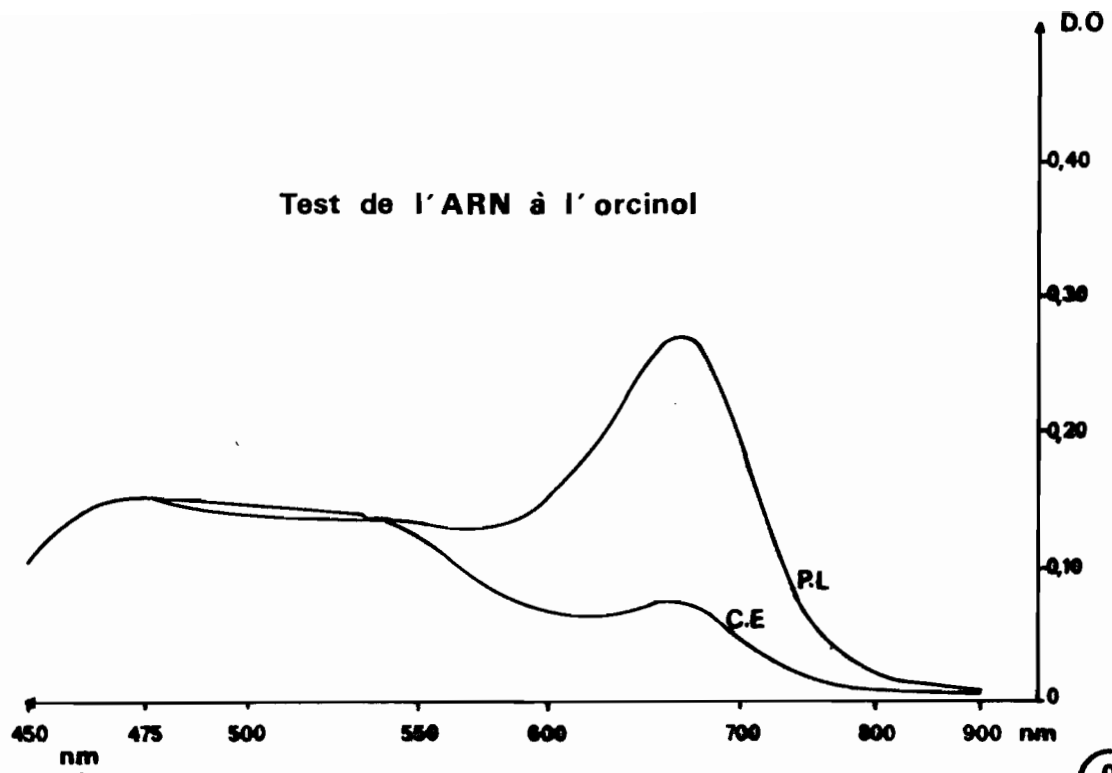


PLANCHE VI

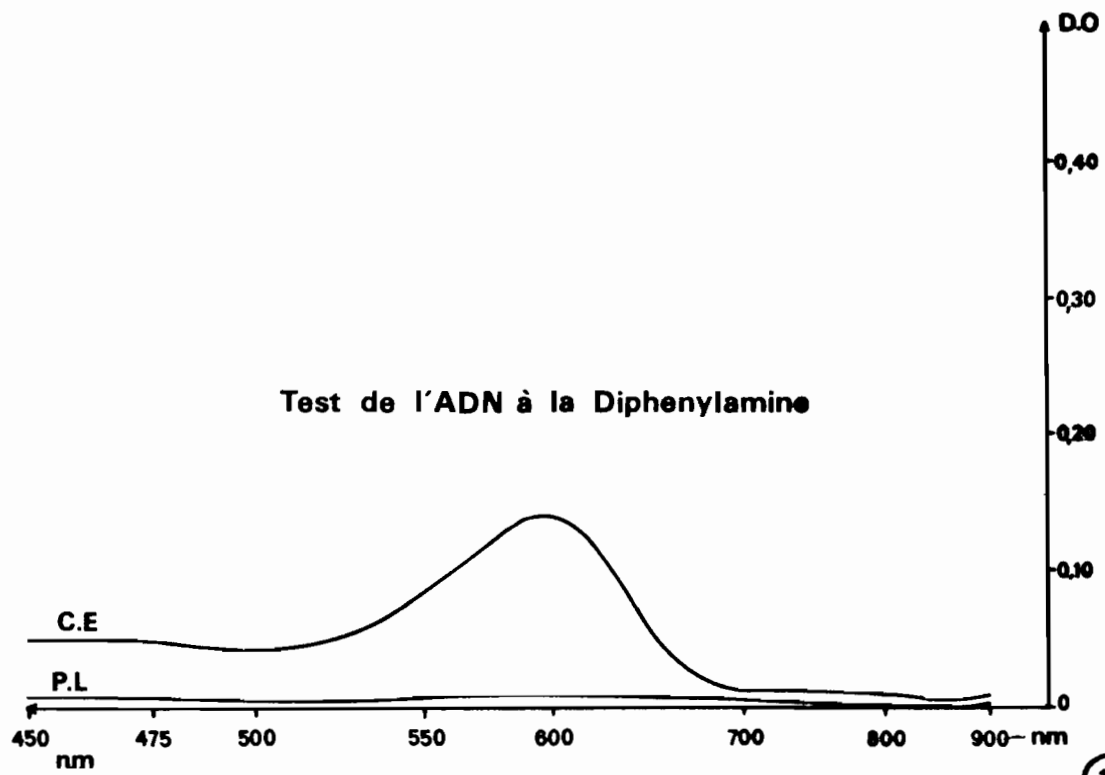
Caractérisation de l'acide nucléique viral

Fig. 9 : Test de l'ARN à l'orcinol.

Fig.10 : Test de l'ADN à la diphénylamine.



9



10

PLANCHE VII

Electrophorégramme des protéines structurales (PV₁, PV₂ et PV₃) du virus de *P. laufella* (PL), des protéines de référence (LMW) et des protéines structurales du Picornavirus de *Latoia viridissima* (LV).

Fig. 11 : Gel de polyacrylamide à 9 p.c.

Fig. 12 : Gel de polyacrylamide à 7 p.c.

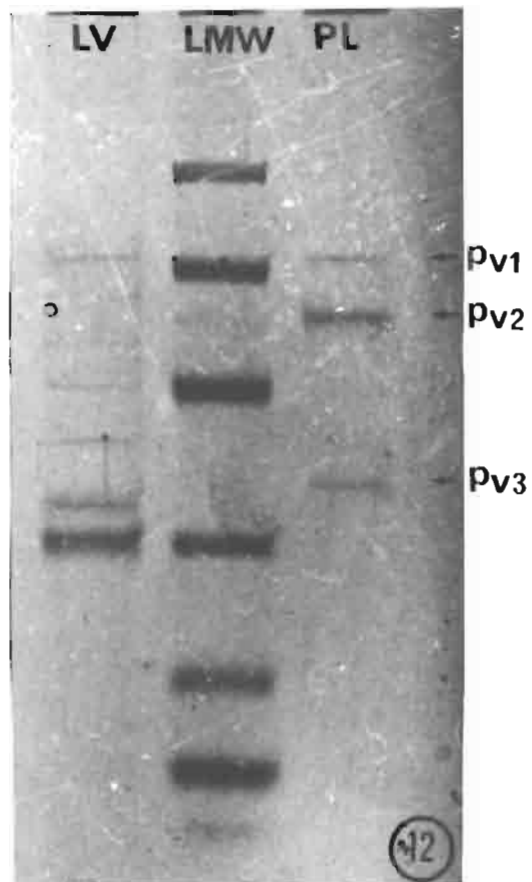
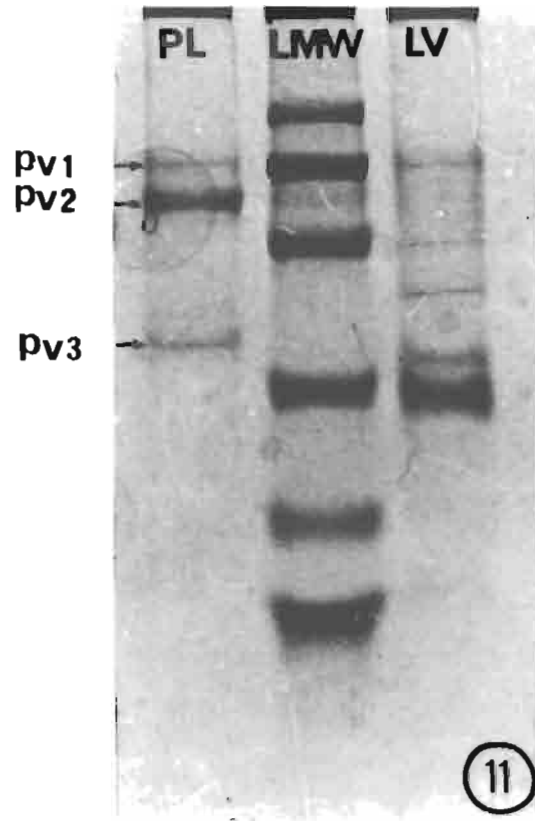


PLANCHE VIII

Fig. 13 : Détermination des poids moléculaires des protéines virales de *P. lauffella* par électrophorèse en gel de polyacrylamide de différentes concentrations.

+ 6 p.c.

o 7 p.c.

. 8 p.c.

9 p.c.

Protéines de référence

1	α lactalbumine	P.M. : 14.400
2	Inhibiteur de Trypsine	P.M. : 20.100
3	Anhydrase Carbonique	P.M. : 30.000
4	Ovalbumine	P.M. : 43.000
5	Sérum albumine de boeuf	P.M. : 67.000
6	Phosphorylase b	P.M. : 94.000

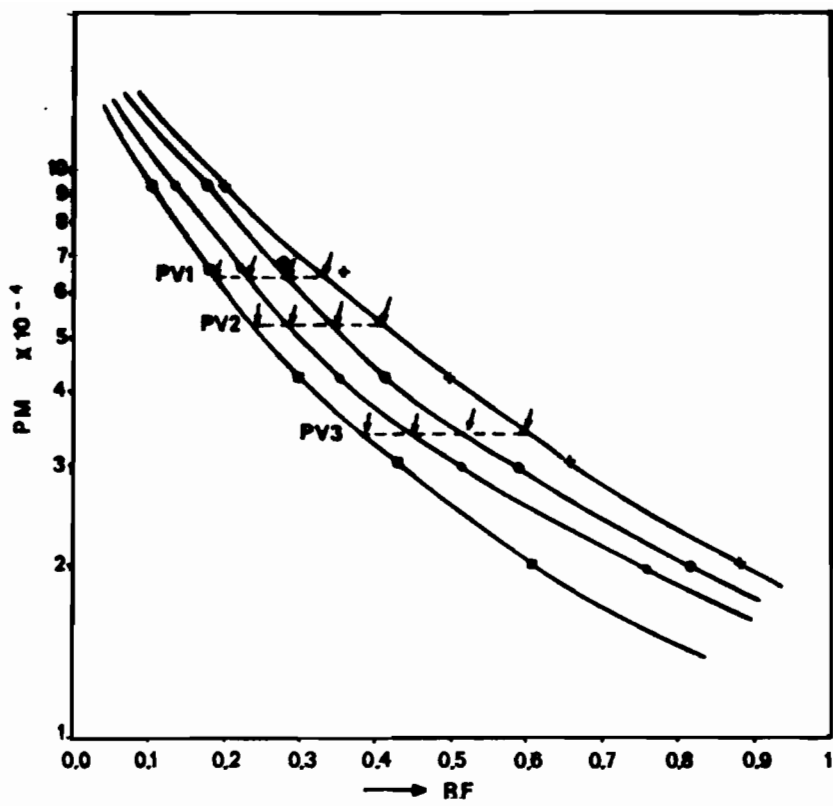


PLANCHE IX

Fig. 14 : Caractérisation immunologique des virus de *P. laufella* par immunodiffusion en gel d'agarose.

- PL : Suspension contenant les deux virus de *P. laufella*
- LV : Picornavirus de *Latoia viridissima*
- CE : Densovirus de *Casphalia extranea*
- TO : Picornavirus de *Teleogryllus oceanicus* (Crpv)
- TU : Picornavirus de *Teinorhyncha umbra*
- TR : Virus de *Turnaca rufisquamata*
- | : Antisérum de lapin antiviral de *P. laufella*
- : Arc de précipitation

