

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE  
DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

(ORSTOM)

Laboratoire d'Entomovirologie

Coopération Scientifique ORSTOM-IRHO-PALMINDUSTRIE

Convention ORSTOM-IRHO n° 466

LUTTE BIOLOGIQUE PAR VIRUS ENTOMOPATHOGENES CONTRE  
LES RAVAGEURS DU PALMIER A HUILE  
ET DU COCOTIER

- Résultats des recherches en 1985, 1986 et mi-87
- Opérations prévues pour fin 87 et 1988

Gilles FEDIERE

Juin 1987

#2 50062  
2ep. Fed

Ø 76  
RAYPLAØ7  
FED



F 24054

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

### I. ETAT D'AVANCEMENT DES TRAVAUX SUR LES PRINCIPAUX RAVAGEURS A LA MI-87

#### A. *LATOIA VIRIDISSIMA* ET *CASPHALIA EXTRANEA*

1. Premiers essais de traitement en plantation à partir du Picornavirus de *L. viridissima* et du Densovirus de *C. extranea*
2. Suivi épidémiologique des maladies et diagnostic sérologique par la technique ELISA
3. Etablissement de lignées cellulaires d'insectes et production de virus en culture de cellules
4. Travaux de biologie moléculaire

#### B. *COELAENOMENODERA MINUTA*

#### C. *PTEROTEINON LAUFELLA*

1. 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
2. Etude d'un petit virus à ARN chez *Pteroteinon laufella*
  - 2.1. Introduction
  - 2.2. symptômes et déroulement de la maladie
  - 2.3. Pathologie expérimentale
  - 2.4. Recherche de l'agent pathogène
  - 2.5. Caractérisation du virus
3. discussion et conclusion

D. *TURNACA RUFISQUAMATA*

E. *LATOIA PALLIDA*

F. CONCLUSION

II. CALENDRIER DES OPERATIONS PREVUES POUR 1988 ET PREVISIONS  
POUR 1989 ET 1990

A. OPERATIONS PREVUES POUR 1988

B. PREVISIONS POUR 1989 ET 1990

BIBLIOGRAPHIE

MEMOIRES ET PREVISIONS DE DEPENSES

PLANCHES HORS-TEXTE

## INTRODUCTION

Les plantations industrielles sont des biotopes relativement stables qui abritent des populations de divers insectes ravageurs. Ces populations sont sujettes à d'importantes fluctuations. Les virus entomopathogènes constituent un des principaux facteurs de contrôle naturel de ces populations en milieu tropical humide.

Une des principales utilisations possibles de ces virus est la mise au point de pesticides biologiques.

**Le programme original développé en coopération par l'ORSTOM, l'IRHO et la PALMINDUSTRIE porte sur l'identification, la production et l'utilisation de virus pathogènes isolés à partir d'insectes défoliateurs du palmier à huile et du cocotier.**

Les recherches menées sur le *Baculovirus* libre d'*Oryctes rhinoceros* ont abouti au contrôle de ce Dynastidae, ravageur du cocotier dans l'Océan Indien (MONSARRAT, 1978).

Fort de ce succès, les essais de transmission de ce virus à deux espèces d'*Oryctes* de Côte d'Ivoire (*O. boas*, *O. monoceros*) effectués par FEDIERE en 1979 n'ont pas été concluants. Le virus passe chez les larves et les adultes, sans être réellement pathogène. Les études ont alors porté sur des viroses épizootiques de Lépidoptères Limacodidae dont les chenilles défoliatrices pullulent périodiquement.

Deux espèces causant régulièrement des dégâts ont été étudiées. *Latoia viridissima*, ravageur de première importance, car il présente plusieurs cycles biologiques dans l'année. *Casphalia extranea*, dont le cycle s'étale sur un an, les larves se développant en août et septembre et la prénymphe restant en diapause d'octobre à juin. Deux maladies virales responsables d'épizooties ont été mises en évidence (FEDIERE *et al.*, 1981).

Les virus (un Picornavirus chez *L. viridissima* et un Densovirus chez *C. extranea*) furent caractérisés (FEDIERE, 1983).

Simultanément, des recherches furent initiées sur une autre espèce de Lépidoptère, *Latoia pallida* mais également sur le Coléoptère Chrysomelidae *Coelaenomenodera minuta*, ravageur principal du palmier à huile en Côte d'Ivoire.

## I. ETAT D'AVANCEMENT DES TRAVAUX SUR LES PRINCIPAUX RAVAGEURS A LA MI-87

### A/ *Latoia viridissima* et *Casphalia extranea*

#### 1) Premiers essais de traitement en plantation à partir du Picornavirus de *L. viridissima* et du Densovirus de *C. extranea*

Travaux de G. FEDIERE en collaboration avec R. PHILIPPE, et ayant fait l'objet de deux communications à des conférences en Malaisie (FEDIERE *et al.*, 1984 et FEDIERE *et al.*, 1986a).

Parmi les défoliateurs les plus importants du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire, deux espèces de Lépidoptères Limacodidae pullulent périodiquement sur les plantations industrielles. Il s'agit de *Latoia viridissima* et de *Casphalia extranea*.

Les virus que nous avons mis en évidence chez ces deux ravageurs ont été purifiés à partir de larves malades ou mortes récoltées aux champs lors d'épizooties naturelles. Les extraits d'insectes sont utilisés aussi bien pour les essais aux champs que pour la caractérisation du virus.

Des antiserums spécifiques ont été fabriqués sur lapins pour chacun des deux virus.

#### \* Picornavirus de *L. viridissima*

L'examen de la suspension virale purifiée révèle des particules sans enveloppe, de forme icosaédrique, mesurant 30 nm de diamètre.

Le spectre d'absorption dans le proche ultra-violet est caractéristique de nucléoprotéines avec des rapports de  $D_{0260}/D_{0280} = 1,72$  et  $D_{0260}/D_{0240} = 1,41$ .

Les réactions positive à l'orcinol et négative à la diphénylamine montrent que le génome est constitué d'ARN.

La densité apparente déterminée après centrifugation en gradient de chlorure de césium est de 1,34.

La composition polypeptidique consiste en deux protéines majeures de faibles poids moléculaires, PV1 de 30.000 daltons (55%), PV2 de 31.000 daltons (20%) et en trois protéines mineures (PV3, PV4 et PV5) dont les poids moléculaires sont respectivement 39.000 (8%), 44.000 (8%) et 51.000 (9%).

Les études sérologiques indiquent l'absence de parenté antigénique entre ce virus et les deux Picornavirus de référence. CRPV (Picornavirus du criquet) et DCV (Picornavirus de drosophile).

Le virus de *Latoia viridissima*, par ses caractéristiques biophysiques, biochimiques et immunologiques se rapproche des Picornavirus d'insectes les mieux connus.

Une parcelle de la Station IRHO de palmiers à huile de La Mé présentait un petit foyer bien localisé de ce ravageur. Dans ce bloc, les palmiers étaient âgés de 3 ans, hauts de 4 m et ne possédaient pas un volume foliaire important.

Le traitement a été réalisé par voie terrestre à l'aide d'un pulvérisateur mécanique à dos, à jet projeté qui permet d'avoir un débit constant par palme et de déduire la dose de chenilles mortes à l'hectare.

Sur les différentes lignes de palmier, nous avons considéré les 5 arbres au nord de la parcelle sur lesquels nous avons compté les larves des palmes des niveaux 25, 17 et 9.

	Ligne 1 425g/ha	Ligne 5 Témoin	Ligne 9 1092g/ha	Ligne 13 Témoin	Ligne 17 3704g/ha	Ligne 21 Témoin
Pourcentage de mortalité une semaine après le traitement	11	7.8	44.2	40.9	61.4	49.2
Pourcentage de mortalité deux semaines après le traitement	83.5	85.4	96.6	99.5	97.2	97.1

Il est intéressant de noter qu'une semaine après le traitement, un gradient de mortalité augmente de 11 à 61% selon la dose utilisée. Deux semaines après la pulvérisation du virus, l'épizootie causa la mort de 92% des larves sur la parcelle traitée.

La mortalité observée sur les lignes témoins provient d'une rapide dispersion de l'infection virale. Les virus répandus par les larves malades ou libérés des cadavres des insectes morts pourront être dispersés par le vent, la pluie ou la faune associée.

Durant la génération suivante, le nombre de chenilles sur cette parcelle fut presque nul car le virus peut rester infectieux plusieurs mois dans le corps des hôtes qui adhèrent à la plante et dans le sol.

Il est maintenant nécessaire de déterminer la dose minimum de virus requise.

\* **Densovirus de *Casphalia extranea***

Le virus, icosaédrique, sans enveloppe, mesure 22 nm de diamètre.

Le spectre d'absorption présente des rapports de  $D_{0260}/D_{0280}$  et  $D_{0260}/D_{0240}$  respectivement de 1.50 et 1.40.

La densité apparente est de 1.38.

Le génome est un ADN.

La capside est constituée de quatre polypeptides (PV1, PV2, PV3 et PV4) dont les poids moléculaires sont respectivement de 49.000 (59%), 54.000 (6%), 74.000 (27%) et 82.000 (8%).

Les études sérologiques indiquent l'absence de parenté immunologique entre ce virus et les Densovirus de *Galleria mellonella* et de *Junonia coenia*.

Par l'ensemble de ses propriétés, le virus de *Casphalia extranea* présente les caractéristiques du genre Densovirus (Parvoviridae).

Une pullulation de ces insectes se déclencha sur la plantation industrielle PALMINDUSTRIE d'Eloka (palmiers à huile) sur les blocs C5 et D5 de 80 hectares chacun. La surface attaquée étant supérieure à 100 ha, il a été décidé d'un traitement aérien par hélicoptère.

	A	B	C	D
PARCELLES	Chenilles mortes 50 g/ha	Chenilles mortes 100 g/ha	Témoin	Deltamétrine 9 g/ha
Nombre de chenilles par palme, un jour avant le traitement	25	26	25	28
Une semaine après le traitement	7	5	18	1
(% mortalité)	(72)	(80)	(28)	
Deux semaines après le traitement	2	2	5	0.1
(% mortalité)	(92)	(92,3)	(80)	

Deux semaines après le traitement, l'épizootie causa la mort de 92% des larves sur les parcelles traitées A et B. La parcelle C, adjacente à A et B, fut progressivement envahie par le virus et le déclin de la population d'insectes fut plus lent.

L'effet de la deltaméthrine fut presque instantané, mais son coût élevé et certains inconvénients comme sa non spécificité doivent être pris en compte pour comparer les différents résultats.

Ces premiers essais réalisés par voie terrestre ou aérienne n'ayant pas toujours abouti aux résultats escomptés, nous avons décidé, avant de les reproduire, de procéder à une nouvelle approche des phénomènes régissant le développement en plantation de ces deux maladies virales.

Lors de ces différentes manipulations, deux documents audio-visuels furent réalisés :

- film scientifique 16 mm de 45 minutes  
"Les Lépidoptères Limacodidae ravageurs du palmier à huile et du cocotier"
- film vidéo de 15 minutes  
"Lutte biologique par virus entomopathogènes contre les ravageurs des palmeraies".

## **2. Suivi épidémiologique des maladies et diagnostic sérologique par la technique ELISA**

En 1986, nous avons commencé une étude épidémiologique de la Picornavirose de *L. viridissima* par tests sérologiques selon la technique immuno-enzymatique pour la détection des antigènes. Ces recherches ont nécessité la mise en place au laboratoire d'une chaîne ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) où ont été testées les différentes méthodes, directes et indirectes, à la phosphatase alcaline et à la peroxydase. (Travaux de J.L. ZEDDAM dirigé par G. FEDIERE et R. PHILIPPE).

Le suivi épidémiologique a porté sur une pullulation de *L. viridissima* dans la plantation de La Mé en octobre et novembre 1986, puis sur une pullulation de la même espèce dans la plantation d'Eloka en mai 1987.

A partir du mois de juillet 1987, une étude du même type sera initiée sur la Densonucléose de *C. extranea*. En effet, chaque année, à la même époque, les larves de ce défoliateur sont signalées sur la plantation d'Eloka. (Travaux de G. FEDIERE et D. DAUTHUILLE en collaboration avec R. PHILIPPE).

Les résultats de ces recherches nous permettront de mieux appréhender l'apparition naturelle des maladies virales dans les populations de ravageurs, d'élucider les phénomènes de persistance de l'agent pathogène dans le biotope, de prévoir l'extension de la maladie et donc de savoir quand il sera nécessaire d'intervenir.

### **3. Etablissement de lignées cellulaires d'insectes et production de virus en culture de cellules**

Depuis novembre 1986, une unité de culture de cellule d'insectes a été créée au laboratoire. Dans le cadre de notre convention, les objectifs de cette unité sont de mettre en place de nouvelles lignées cellulaires à partir des principaux insectes ravageurs des palmacées et de multiplier les virus en culture cellulaire, en vue d'une production à grande échelle.

Les recherches menées actuellement portent sur l'établissement de lignées cellulaires à partir d'ovarioles de nymphes de *L. viridissima* et de *C. extranea*.

Des essais d'infection sont tentés sur des lignées déjà connues (*Spodoptera littoralis* par exemple) par le Picornavirus de *L. viridissima* et le Densovirus de *C. extranea*. (Travaux de X. LERY).

### **4. Travaux de biologie moléculaire**

L'identification et la caractérisation précise des différentes souches virales nécessite le recours à des techniques modernes de biologie moléculaire.

La reconnaissance des souches sélectionnées pour leur virulence nécessite une étude approfondie d'une part, de leur protéine capsidaire, et d'autre part, de leur génome en ayant recours aux enzymes de restriction.

Ces méthodes en électrophorèse permettront également le contrôle de la production en grand volume des virus en culture cellulaire.

Les recherches sur l'ADN des différentes souches du Densovirus de *C. extranea* sont commencées. (Travaux de D. DAUTHUILLE et G. FEDIERE).

L'étude de l'ARN du Picornavirus de *L. viridissima* débutera en août 1987 au laboratoire de virologie de la Station INRA-CNRS de Saint Christol-lès-Alès, en vue de préparer une sonde moléculaire de DNA (Travaux de J.L. ZEDDAM).

### **B/ *Coelaenomenodera minuta***

Ce Coléoptère Chrysomelidae est le ravageur le plus important du palmier à huile en Côte d'Ivoire.

A partir d'une maladie naturelle observée chez des larves, deux virus ont été mis en évidence. L'observation en microscopie électronique fait apparaître des particules icosaédriques non enveloppées de 26 et 40 nm de diamètre.

Des tests de pathogénicité en laboratoire sur larves et sur adultes à partir de

suspensions virales purifiées n'ont pas apporté les résultats escomptés. La transmission des virus de *C. minuta* paraît délicate.

Des essais de multiplication des virus ont été réalisés, soit par traitement du substrat alimentaire des adultes, soit par infection *per os* de larves replacées dans des galeries artificielles.

Dans les deux cas, les mortalités observées ne sont pas concluantes.

Nous envisageons maintenant l'établissement d'une lignée cellulaire de *C. minuta* pour tenter en culture de cellules la multiplication des virus.

(Travaux de G. FEDIERE en collaboration avec R. LECOUSTRE, ayant fait l'objet d'une communication à une conférence en Malaisie (FEDIERE *et al.*, 1986b).

### **C. PTEROTEINON LAUFELLA**

Les larves de ce Lépidoptère Hesperidae pullulent fréquemment dans les plantations de palmier à huile. Des mortalités apparues dans les populations nous ont permis d'entreprendre des recherches. (Travaux de R. KOUEVIDJIN, dirigé par G. FEDIERE en collaboration avec R. PHILIPPE, ayant fait l'objet d'un rapport de DEA : KOUEVIDJIN, R., 1986).

## **1. BIOLOGIE ET PATHOLOGIE VIRALE DES HESPERIDAE ET DE PTEROTEINON LAUFELLA EN PARTICULIER**

### **1.1. Systématique**

C'est STEPHENS qui attribua le statut de famille aux Hesperidae en 1829. 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. 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 (Cu<sub>2</sub> à Sc) 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. Dégâts sur Palmacées

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. En Afrique, plusieurs espèces sont citées sur le riz : *Pelopidas mathias* et *Gegenes niso* au Cameroun, *Borbo borbonica* en Tanzanie *Borbo fanta* en Sierra Léone et *Borbo factuclus* en Côte d'Ivoire.

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.

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* .

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 : *Phopalocampa bixae* et *Pytrhochalcia 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 sur les surfaces traitées chimiquement contre *P. laufella* nous montrent l'étendue des dégâts causés par ce ravageur.

Plantation industrielle PALMINDUSTRIE de TAMABO	: 1983	764 ha
Plantation industrielle PALMINDUSTRIE de TIEGBA	: 1982/1983	300/444 ha
Plantation industrielle PALMINDUSTRIE de YOCOBOUE	: 1981	237 ha
Station IRHO de LA ME	: 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 Irodovirus sont très répandues chez les invertébrés. Leur appellation sous le vocable d'irodoviroses 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 paracristallins 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 250.10<sup>6</sup> daltons.

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. 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*.

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

### 1.5.3. Les polyédroses nucléaires

Ces maladies sont dues 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  $95 \text{ à } 120 \cdot 10^6$  daltons.

Les virus de polyédrose ont la propriété d'être intégrés en fin de morphogénèse dans des structures cristallines protéiniques appelées polyèdres, renfermant de nombreuses particules virales. L'espèce-type de ces virus de polyédrose nucléaire est le virus d'*Autographa californica*, Lépidoptère Noctuidae.

Il existe d'autres sous-groupes de Baculoviridae dont le sous-groupe B des virus de granuloze 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 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.

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.

## 2. ETUDE D'UN PETIT VIRUS A ARN CHEZ PTEROTEINON LAUFELLA

### 2.1. 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.

### 2.2. Symptômes et 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 1er et le 3e jour après la contamination, alors que les chenilles s'immobilisent complètement. Au

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 sécrétions buccales et anales de couleur brune s'écoulent, marquant des altérations notables du système digestif. Le corps de la larve devient alors très flasque.

### 2.3. Pathologie expérimentale

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 4].

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.	16 p.c.
3	66 p.c.	21 p.c.
4	82 p.c.	34 p.c.
5	92 p.c.	54 p.c.
6	95 p.c.	64 p.c.
7	95 p.c.	82 p.c.
8	95 p.c.	82 p.c.

Tableau 4. 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.

### 2.4. Recherche de l'agent pathogène

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. 3 et 4].

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 le 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.

## 2.5. Caractérisation du virus

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. La suspension ainsi purifiée est alors contrôlée en microscopie électronique.

Ce virus de *P. lauffella* apparaît sous la forme d'une particule sans enveloppe, de forme icosaédrique et mesurant 409 nm de diamètre. Certaines particules présentent un centre dense.

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. Les rapports  $D_{0_{260}}/D_{0_{280}}$  et  $DD_{260}/D_{0_{240}}$  sont respectivement 1,40 et 1,12.

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. Le génome du virus est donc constitué d'ARN.

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.s et 9 p.c. selon la méthode de WEBER et OSBORN.

Le profil électrophorétique (Fig. 6 et 7) des gels fait apparaître trois protéines (PV<sub>1</sub>, PV<sub>2</sub>, et PV<sub>3</sub>) dont une majeure (PV<sub>2</sub>) de poids moléculaire 53.000 daltons et deux mineures (PV<sub>1</sub> et PV<sub>3</sub>) de poids moléculaires 65.000 et 34.000 daltons respectivement (Tableau 5 et Fig. 8).

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 boeuf	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
$\alpha$ -lactalbumine ,	14.400	-	-	-	-
PV <sub>1</sub>		0,34	0,29	0,23	0,19
PV <sub>2</sub>		0,41	0,35	0,29	0,24
PV <sub>3</sub>		0,51	0,52	0,45	0,38

Tableau 5 . Valeur moyenne des Rf pour chacune des protéines de référence et des trois protéines capsidaires du virus de *P. laufella* aux différentes concentrations du gel en polyacrylamide.

Par la technique de double diffusion en gel d'agarose, nous avons recherché les parentés immunologiques pouvant exister entre les deux virus de *P. laufella* (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* , le Picornavirus de *Latoia viridissima* , le Picornavirus de *Teinorhyncha umbra* , le Picornavirus de *Telegryllus oceanicus* (Crpv) et le virus de *Turnaca rufisquamata* .

Un antisérum de lapin a été préparé par injection d'une suspension contenant les deux virus précités. Ce résultat nous suggère l'absence de communauté antigénique entre les virus de *P. laufella* et les virus déjà connus du laboratoire.

### 3. 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 le différencie 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 (PV<sub>1</sub> et PV<sub>3</sub>) l'exclut provisoirement du groupe des virus de type *bNudaurelia*.

Une caractérisation plus approfondie au niveau génomique, nous permettra alors de la 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 indiquent 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.

#### **D. *TURNACA RUFISQUAMATA***

Ce Lepidoptère Notodontidae, ne pullule qu'épisodiquement sur les plantations de palmiers à huile. Nous avons tout de même mis en évidence un virus à caractère hautement pathogène et les épizooties qu'il s'avère capable de déclencher dans les conditions naturelles nous permettent de fonder de grands espoirs pour son utilisation future. C'est une particule virale libre, icosaédrique et mesurant 30 nm de diamètre. Son génome est à ARN. Ces caractères montrent qu'il s'agit d'un Picornavirus (Travaux de G. FEDIERE, 1985).

#### **E. *LATOIA PALLIDA***

Des pullulations des larves de ce Limacodidae apparaissent périodiquement dans les plantations de cocotier.

Un virus icosaédrique de 30 nm a été mis en évidence mais sa caractérisation n'a pas encore été effectuée car les virions sont systématiquement malangés à des arrangements paracrystallins de particules de 10 nm. Nous n'avons pas encore réussi à obtenir une suspension virale indemne de ces contaminants dont la composition ne révèle pour l'instant que des protéines.

#### **F. CONCLUSIONS**

Pour l'ensemble des virus décrits aux paragraphes B, C, D et E des recherches du même type que celles initiées pour le Picornavirus de *L. viridissima* et le Densovirus de *C. extranea* vont être entreprises.

## **II. CALENDRIER DES OPERATIONS PREVUES POUR 1988 ET PREVISIONS POUR 1989 ET 1990**

### **A. OPERATIONS PREVUES POUR 1988**

- Suivi épidémiologique des populations de ravageurs en plantation.
- Mise au point de nouvelles méthodes de diagnostics sérologiques.
- Traitement en plantation à partir de suspensions virales purifiées.
- Etablissement de nouvelles lignées cellulaires à partir des ravageurs.
- Sensibilité des lignées cellulaires aux différentes souches de virus.
- Poursuite de l'inventaire des souches virales.
- Clonage et caractérisation de ces souches.

### **B. PREVISIONS POUR 1989 ET 1990**

- Etude du spectre d'hôte des souches virales et tests d'inocuité sur vertébrés.
- Mise au point de nouveaux milieux de culture adaptés à la production de virus en gros volume.

## BIBLIOGRAPHIE

- MONSARRAT, P. - 1978 . Contribution à l'étude du virus d'*Oryctes rhinoceros* et de son impact écologique.  
Thèse doctorat Etat, USTL, Montpellier, 209, p.
- FEDIERE, G., DESMIER DE CHENON, R., MARIAN, D. & MONSARRAT, P. - 1981.  
Mise en évidence de maladies à épizootie de type Densonucléose chez deux chenilles de Limacodidae Lépidoptères phyllophages du palmier à huile et du cocotier. Communication au Col. Int. Proct. Cult. Trop. Lyon, France, 8-10 juillet.
- FEDIERE, G. - 1983. Recherches sur des viroses épizootiques de Lépidoptères Limacodidae ravageurs des palmacées.  
Thèse doctorat 3è cycle. USTL, Montpellier, 130 p.
- FEDIERE, G., MONSARRAT, P. & PHILIPPE, R. - 1984. Biological control of a limacodid, oil palm pest in Ivory Coast, by use of small isometric virus. Communication au 1st Symp. Reg. Biol. Contr. Serdang, Malaysia, 3-5 September.
- FEDIERE, G., MONSARRAT, P. & MARIAN, P. - 1986a. Biological controls of *Casphalia extranea* (Lepidoptera Limacodidae) defoliator of oil palm and coconut in Ivory Coast by a new Densovirus.  
In : "Extended abstracts of the 2nd International Conference on plant protection in the tropics", Genting Highlands, Malaisie, 17-20 mars, pp. 287-288.
- FEDIERE, G., MONSARRAT, P. & LECOUSTRE, R. - 1986b. Identification of new viruses of *Coelaenomenodera minuta* (Coleoptera Chrysomelidae) most important issued defoliator of oil palm in Ivory Coast.  
In : "Extended abstracts of the 2nd International Conference on plant protection in the tropics", Genting Highlands, Malaisie, 17-20 mars, pp. 378.
- KOUEVIDJIN, R.K. - 1986. Recherches sur une virose de *Pteroteinon laufella* , Lépidoptère Hesperidae, défoliateur du palmier à huile en Côte d'Ivoire.  
Mémoire de DEA, Faculté des Sciences et Techniques d'Abidjan, 57 p.
- FEDIERE, G. - 1985. Contribution à l'étude de la pathogénie de trois virus libres de Lépidoptères Limacodidae sur *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) et mise en évidence de nouveaux virus entomopathogènes. Rapport de mission ORSTOM, 14 p.
- MARIAN, D., DESMIER DE CHENON, R., JULIA, J.F., 1981. Les ravageurs du palmier à huile et du cocotier en Afrique Occidentale. Oléagineux 36, 4, 192-193.

PHILIPPE, R., 1986. Essais de lutte biologique contre les chenilles défoliatrices du palmier à huile et du cocotier. Rapport IRHO, 46p.

DESMIER DE CHENON, R., 1984. Field guide for coconut and plantation sanitary protection. Rapport IRHO, 270p.

LE PESME, P., 1947. Les insectes du palmier. Le chevalier ed. Paris, 903p.

MARTIGNONI, M.E., IWAI, P.J., 1986. A catalog of viral diseases of insects. 4e ed. gen. Tech. Rep. P.N.R.S. Portland, 50p.

**MEMOIRE DE DEPENSES POUR L'ANNEE 1985 (déjà versé)**

	F.CFA
- Travaux d'ultracentrifugation	200.000
- Travaux de spectrophotométrie	200.000
- Travaux de microscopie électronique	300.000
- Personnels temporaire, indemnités de tournées et carburant	1.050.000
- Matériel et produits	1.750.000
- Frais généraux (10% fonctionnement)	350.000
<b>TOTAL</b>	<b>3.850.000</b>

**MEMOIRE DE DEPENES POUR L'ANNEE 1986 (Déjà versé)**

	F.CFA
- Travaux d'ultracentrifugation	250.000
- Travaux de spectrophotométrie	250.000
- Travaux d'électrophorèse	250.000
- Indemnités de tournées et carburant	260.000
- Matériel et produits	1.040.000
<b>TOTAL</b>	<b>2.050.000</b>

## PREVISION DE DEPENSES POUR L'ANNEE 1987

	F.CFA
- Travaux d'ultracentrifugation	250.000
- Travaux de spectrophotométrie	250.000
- Travaux d'électrophorèse	250.000
- Travaux de microscopie électronique	250.000
- Indemnités de tournées et carburant	260.000
- Matériel et produits	540.000
<b>TOTAL</b>	<b>1.800.000</b>

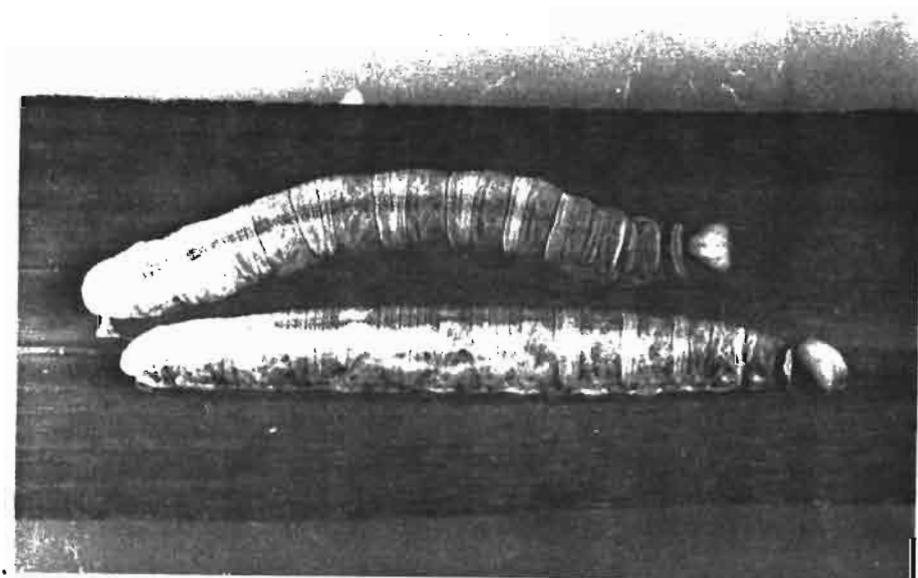
## PREVISIONS DE DEPENSES POUR L'ANNEE 1988

	F.CFA
- Travaux d'ultracentrifugation, de spectrophotométrie et d'électrophorèse	1.000.000
- Travaux en culture de cellules d'insectes	1.000.000
- Travaux de sérologie par la technique ELISA	1.000.000
- Travaux de microscopie électronique	500.000
- Indemnités de tournées et carburant	750.000
- Matériel et produits	750.000
- Frais généraux (10% fonctionnement)	500.000
<b>TOTAL</b>	<b>5.500.000</b>

## PLANCHE I

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

Fig. 2 : Papillon adulte.



1



2

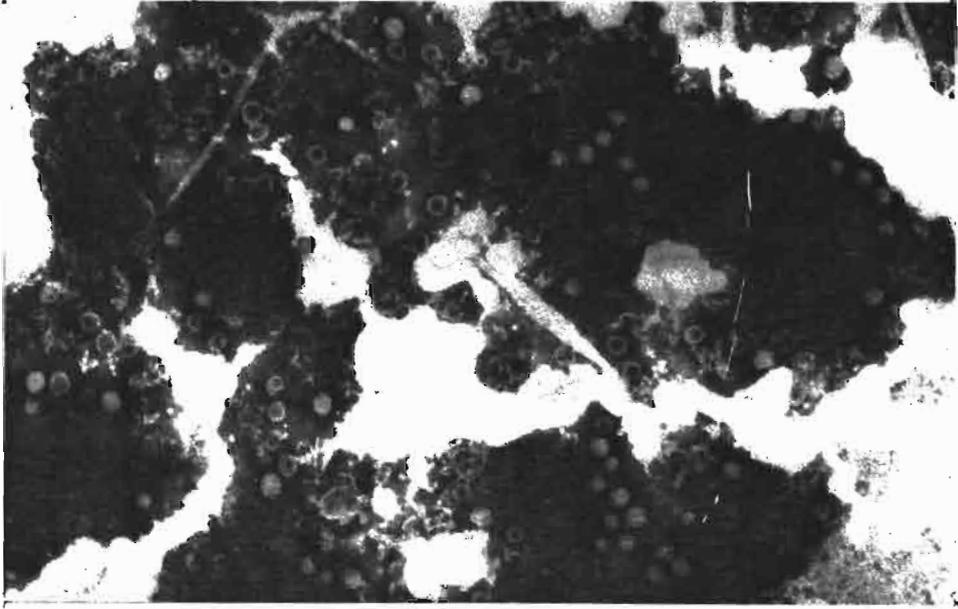
## PLANCHE II

Observation x 90.000 en microscopie électronique

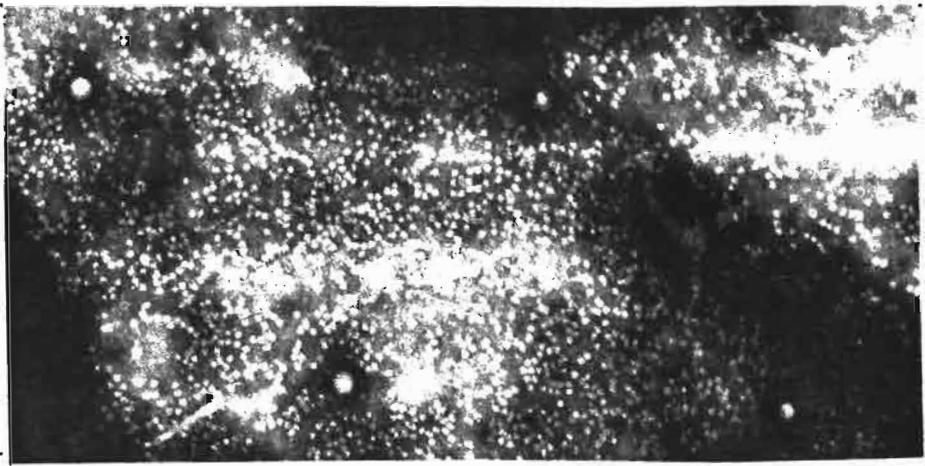
Fig. 3 : Suspension contenant simultanément les virus de 40 et 30 nm de diamètre.

Fig. 4 : Suspension contenant simultanément le virus de 40 nm et des petites particules de 8 nm de diamètre.

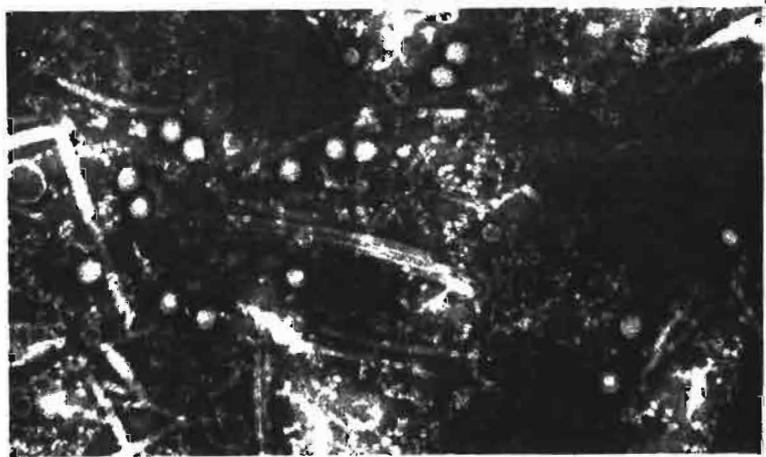
Fig. 5 : Suspension contenant le virus de 40 nm de diamètre où certaines particules présentent un centre dense.



3



4



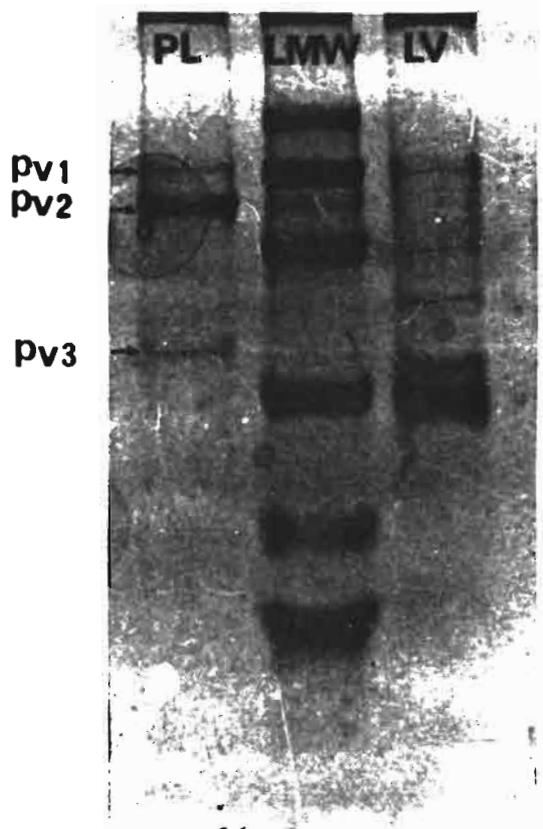
5

### PLANCHE III

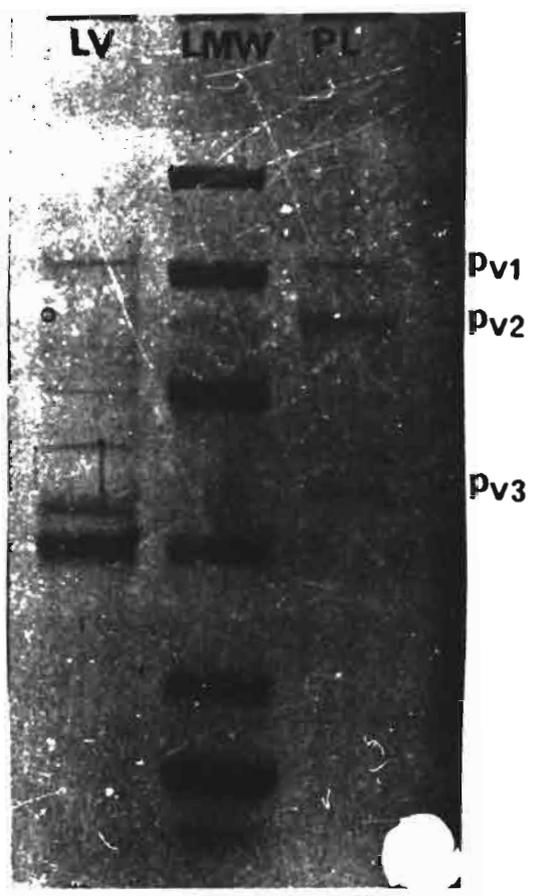
Electrophorégramme de protéines structurales (PV1, PV2 et PV3) du virus de *P. laufella* (PL), des protéines de référence (LMW) et des protéines structurales du Picornavirus de *Latoia viridissima* (LV).

Fig. 6 : Gel de polyacrylamide à 9 p.c.

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



6



7

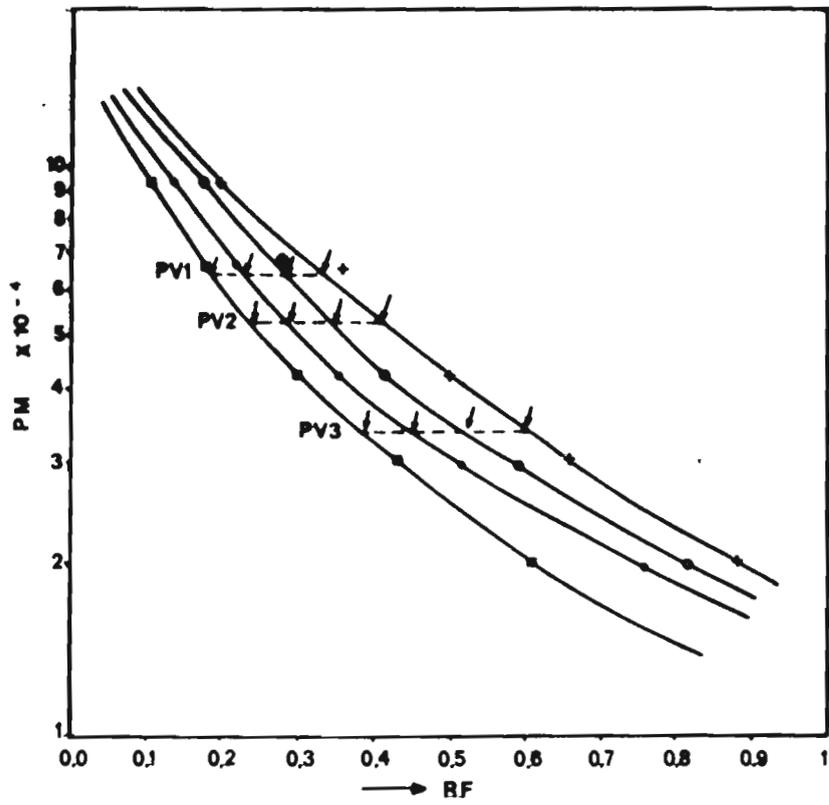
## PLANCHE IV

Fig. 8 : Détermination des poids moléculaires des protéines virales de *P. lauffella* par électrophorèse en gel de polyacrylamide de différentes concentrations.

+ 6 p.c. . 7 p.c. . 8 p.c. 9 p.c.

### Protéines de référence

1 $\alpha$ 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 $\beta$	P.M. : 94.000



## PLANCHE V

Fig. 9 : 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*

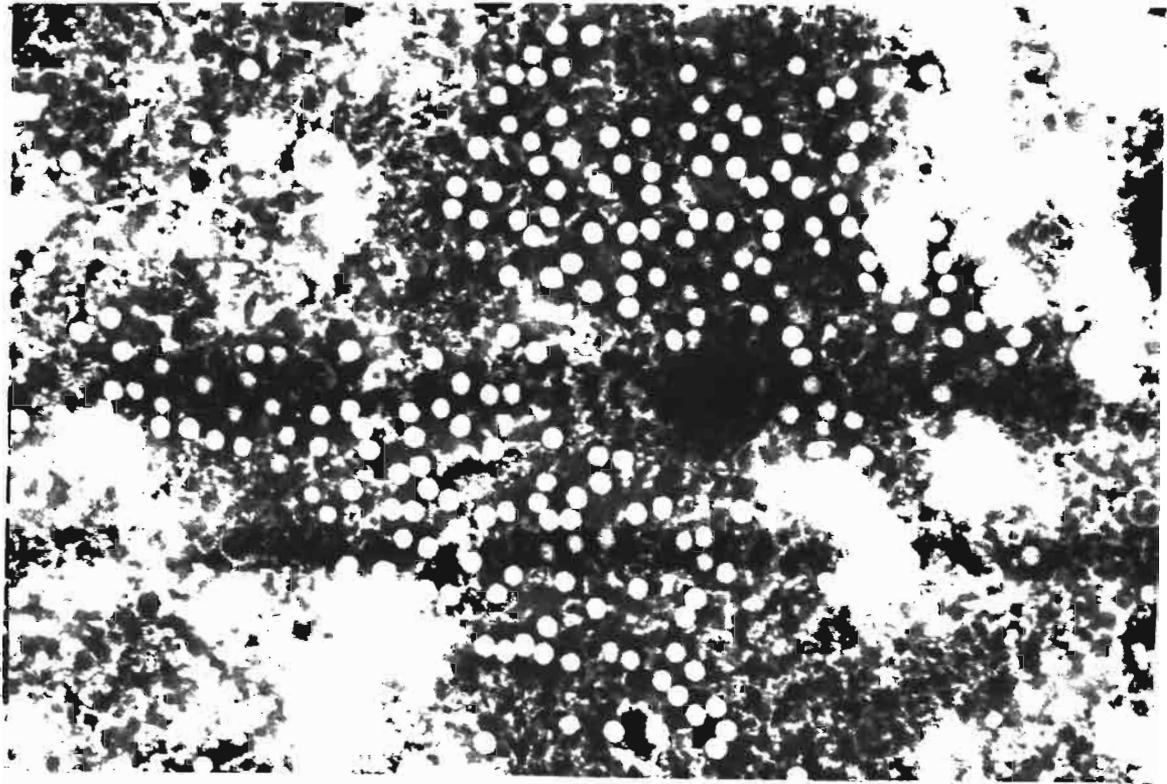
CE : Densovirus de *Casphalia extranea*

TO : Picornavirus de *Teleogryllus oceanicus* (Crpv)

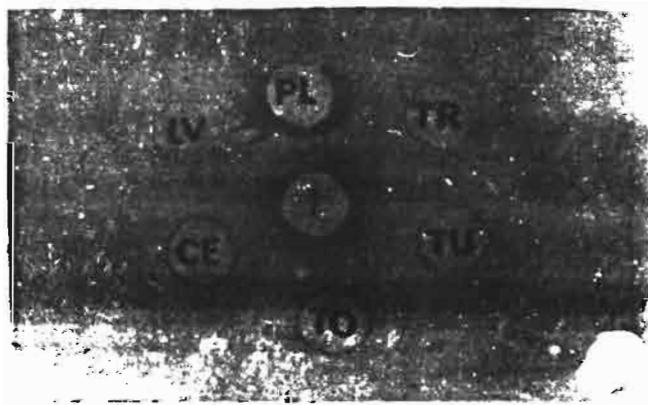
| : Antisérum de lapin antiviral de *P. laufella*

: Arc de précipitation

Fig. 10 : Suspension purifiée du virus de *Turnaca rufisquamata* après contraste négatif à l'acide phosphotungstique.  
x 90.000



10



9