

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DE MONTPELLIER (MONTPELLIER II)
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT
Spécialité : SCIENCES BIOLOGIQUES
(Mention : BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE, PARASITOLOGIE)

ETUDE D'UN RIBOVIRUS PATHOGENE DU
LEPIDOPTERE *LATOIA VIRIDISSIMA* (HOLLAND 1893),
RAVAGEUR DE PALMACEES EN COTE D'IVOIRE.
CARACTERISATION DU VIRUS, DIAGNOSTIC
SEROLOGIQUE ET CLONAGE MOLECULAIRE

par

Jean-Louis ZEDDAM

Soutenu le 10 Mai 1989 devant le Jury composé de :

MM.	L. EUZET	Président
	G. DEVAUCHELLE	
	P. MONSARRAT	
	D. MARIAU	
	M. BERGOIN	

- 5 JUIN 1992



Station de Recherches de Pathologie Comparée - C.N.R.S. - I.N.R.A. - E.P.H.E. - Saint Christol-les-Alès
et
Centre O.R.S.T.O.M. d'Adiopodoumé, Abidjan, Côte d'Ivoire.
Station I.R.H.O. - CIRAD de La Mé, Bingerville, Côte d'Ivoire.

Atelier Duplication

076 KAVPLA 08 ZED

non numérisé
hz 63592
FA JLEX Bdy
F 34.393

Avant d'entreprendre la présentation de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury qui, à des titres variés, ont permis sa réalisation.

Le **Professeur EUZET** a accepté de retenir ma candidature : à la formation doctorale qu'il dirige puis m'a intégré au sein de son équipe. C'est donc dans son laboratoire que j'ai pu prendre, pour la première fois, contact avec la recherche. Je garde de cet homme non seulement le bénéfice des valeurs scientifiques issues de nombreuses discussions, mais aussi le souvenir de bonté et de générosité dont il m'a entouré durant, et après, mon séjour à Montpellier. C'est un grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à remercier ici le **Docteur G. DEVAUCHELLE**, Directeur de la Station de Recherches de Pathologie comparée de SAINT-CHRISTOL-LES-ALES. Il a permis que dans ma formation de virologue s'intègre la maîtrise des méthodes de la biologie moléculaire. C'est un grand honneur de le compter parmi les rapporteurs de ce travail.

Le **Docteur P. MONSARRAT**, Directeur de Recherche à l'ORSTOM, a été l'un des initiateurs de ce programme "pluri-organismes". Sans lui, les difficultés mais aussi les joies et les richesses du travail de terrain me seraient restées inconnues. Depuis de très nombreuses années, son intérêt pour les virus et la lutte biologique à l'aide de ces agents ne se dément pas. Il le prouve cette fois encore en acceptant d'être rapporteur de cette thèse.

Le **Docteur D. MARIAN**, Directeur de laboratoire à l'IRHO-CIRAD a souvent eu l'occasion de me faire bénéficier de sa grande expérience du terrain. Par son esprit pratique, il a aussi guidé ma réflexion sur l'intérêt agronomique des virus utilisés comme agents de lutte biologique. Je lui suis très reconnaissant de faire aujourd'hui partie de ce jury.

Le **professeur M. BERGOIN** m'a accepté dans le laboratoire de Virologie dont il est responsable. A son contact, j'ai beaucoup appris et ce, dans des domaines variés. Ayant toujours écouté avec attention ses conseils, j'ai également souvent pu mettre à profit la grande liberté qu'il a bien voulu m'accorder sur le plan scientifique. Sa présence à ce jury rappelle tout l'intérêt qu'il porte depuis déjà bien longtemps au groupe des ribovirus dont plusieurs des membres les plus connus furent découverts à la Station de Pathologie Comparée.

Enfin, même s'il ne peut aujourd'hui faire partie de ce jury, je désire exprimer toute ma reconnaissance au **Professeur C. VAGO**, membre de l'Institut, pour avoir mis à la disposition de ce programme ORSTOM-IRHO-INRA les équipements et les compétences des laboratoires de la Station de Pathologie comparée et pour sa très grande sollicitude à mon égard.

AVANT - PROPOS

J'éprouve un grand plaisir à témoigner aujourd'hui de l'aide, qu'un certain nombre de personnes ont apporté à la réalisation d'un travail dans lequel j'ai moi-même engagé beaucoup de temps, d'énergie et d'efforts.

Beaucoup d'amis et de collègues, grâce à leurs multiples services et conseils, m'ont permis de mener à bien cette étude. Leur nombre m'empêche de les nommer tous ici, mais ils savent bien que la reconnaissance que je leur porte sait s'exprimer ailleurs que sur le papier.

*Qu'il me soit d'abord permis de remercier tous les membres du personnel de la Station INRA-CNRS de SAINT-CHRISTOL-LES-ALES qui, à un moment ou à un autre, m'ont apporté leur aide efficace ou leurs conseils avisés. Je tiens cependant à accorder une mention toute spéciale à **Jean Claude VEYRUNES** dont l'humeur constante, la justesse du jugement et la compétence scientifique furent abondamment sollicitées. Aussi discret qu'efficace, toujours disponible, peu de ceux ayant travaillé à SAINT-CHRISTOL peuvent l'oublier sans commettre une grave ingratitude.*

*Quoiqu'arrivée à SAINT-CHRISTOL depuis peu, **Martine CERUTTI** a vite révélé des qualités identiques et a su rapidement donner une impulsion vivifiante à la station en y développant la biologie moléculaire. Son dynamisme, son courage et sa gentillesse doivent constituer pour chacun une référence. Pour tous ses précieux conseils, merci.*

*A **Andrée** et **Georges KUHL**, **Jean LUCIANI** et **Jean Pierre BOSSY**, je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance pour leur assistance technique toujours empreinte de bonne humeur.*

*Ma gratitude va également à **Claude ROURE** pour sa compétence et son aide au cours de mes recherches bibliographiques.*

*Que **Laurent GAUTHIER** sache combien j'ai apprécié sa précieuse collaboration au cours de son trop bref passage parmi nous.*

*Les échanges scientifiques constants et fructueux avec mes compagnons de paillasse des services de Virologie (**Professeur BERGOIN**), de Génétique des Virus (**Docteur CROIZIER**) et de Virologie Moléculaire (**Docteur CERUTTI**) m'ont permis maintes fois de leur témoigner ma sympathie et mon estime.*

Qu'ils me pardonnent donc de ne pas y revenir plus longuement ici. Il en est de même pour tous les membres du laboratoire de Microbiologie de l'U.S.T.L. dont beaucoup m'ont aidé ou encouragé au cours de cette thèse.

Au **Docteur Michèle BOULOY** de l'Institut Pasteur, je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son service, au sein du laboratoire de Virologie moléculaire dirigé par le **Professeur Marc GIRARD**. Sans son concours actif, la partie biologie moléculaire de ce travail n'aurait pu être pleinement réalisée. Qu'elle me pardonne si la qualité et la richesse de la formation qui m'a été dispensée au cours de mes stages m'ont conduit à les prolonger au-delà des dates initialement convenues. A travers elle, c'est tous ses collègues et collaborateurs que je tiens à remercier pour avoir su donner à mes séjours parmi eux, un cadre si chaleureux et amical.

Le travail de terrain impose des contraintes particulières, surtout lorsque d'importants efforts doivent être réalisés dans des conditions difficiles pour récolter du matériel et en assurer le traitement. Je tiens donc à remercier les personnels ivoirien, burkinabé et français de l'IRHO et de l'ORSTOM qui ont activement pris part aux études menées en Côte-d'Ivoire.

Parmi eux, il me faut citer **Messieurs de BERCHOUX** (IRHO La Mé), **DE TAFIN** (P.J. ELOKA) et **KOUAME** (Port-Boué) qui m'ont permis de travailler sans contrainte sur les plantations qu'ils dirigent tout en mettant à ma disposition le personnel et le matériel nécessaire.

Monsieur René PHILIPPE, responsable de la protection des cultures à la Station principale de La Mé a contribué efficacement au bon déroulement des suivis épidémiologiques réalisés tout au long de mon séjour. Il m'a fait bénéficier de sa très grande expérience et nos nombreuses discussions ont été l'occasion d'un enrichissement mutuel. J'espère que l'intérêt soutenu que nous portons l'un et l'autre à la lutte microbiologique nous permettra de travailler à nouveau ensemble.

Durant une année, j'ai connu avec les membres du laboratoire d'Entomovirologie de l'ORSTOM d'Adiopodoumé, l'intérêt et les difficultés du travail outre-mer. Je tiens à dire ma reconnaissance à **Gilles FEDIERE**, responsable de ce laboratoire, pour le souci constant qu'il a eu de m'assurer le séjour le plus agréable possible. Que **Xavier LERY**, chercheur de l'équipe (ainsi que sa femme **Marie-Jeanne**) sachent combien, malgré la distance, l'amitié que je leur porte reste

vivante. Que **Dominique DAUTHUILLE** n'ignore pas que j'ai beaucoup apprécié son enthousiasme et son opiniâtreté dans le travail.

DOUBA, KOUAME, BERTIN, KUADIO ... merci de m'avoir fait découvrir votre goût de l'accueil chaleureux et de la joie de vivre.

Je ne peux citer tous ceux qui au cours de ce séjour sont intervenus en de multiples occasions pour réduire quelque peu les obstacles scientifiques ou administratifs rencontrés.

Ensemble, ils m'ont beaucoup transmis de leur précieuse expérience du milieu et des hommes et m'ont donné le goût du travail de terrain.

Jean Claude THOUVENEL, responsable du laboratoire de Phytovirologie, a toujours su me conseiller avec justesse, simplicité et bonhomie. En particulier, sa grande maîtrise de l'ELISA m'a souvent dépanné. Ma gratitude va tout naturellement au reste de son équipe et surtout à **Denis FARGETTE** et **Claude FAUQUET** pour nos discussions amicales, toujours instructives.

Enfin, il m'est impossible de "quitter" la Côte-d'Ivoire sans évoquer mon immense gratitude envers **Henri FERRER** et **Nicole de NADAI** pour leur générosité et leur dévouement de tous les instants.

A tous mes amis qui ont aidé, par leur soutien affectif continu, à ce que cette thèse aboutisse j'espère pouvoir rendre un jour une partie de leur temps, de leur énergie ... et de leur patience perdus à cause de moi. Merci donc à **Patrick** et **Ghislaine**, **Claude** et **Edith**, **Elisabeth**, **Stéphane**, **Philippe**, **Jean-Michel**, **Patrick** et **Evelyne**.

Une pensée affectueuse pour mes parents.

ABREVIATIONS

ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADN _C	:	ADN complémentaire
ARN	:	acide ribonucléique
Br Et	:	bromure d'éthidium
D.E.A.E. cellulose	:	diéthylaminoéthyl cellulose
dNTP	:	désoxyribo nucléotide triphosphate
D.O.	:	densité optique
D.T.T.	:	dithiothréitol
E.D.T.A.	:	acide éthylènediamine tétracétique
Ig G	:	immunoglobulines de classe G
M	:	molaire
mM	:	millimolaire
P.E.G.	:	polyéthylène glycol
Pipes	:	acide 1,4 - piperazine diéthanesulfonique
rNTP	:	ribonucléotide triphosphate
S.D.S.	:	dodécyl sulfate de sodium
Tris	:	tris (hydroxyméthyl) aminométhane

TAMPONS

- P.B.S. : NaCl 140 mM, Na₂ HPO₄ 4,3 mM, KH₂ PO₄ 1,4 mM
- P.B.S.T. : P.B.S. contenant 0,5 % de Tween 20
- P.B.S.T. - P.V.P. : P.B.S.T. contenant 2 % de polyvinylpyrrolidone 40
- P.B.S.T. - P.V.P. - OV : P.B.S.T. - P.V.P. contenant 0,2 % d'ovalbumine
- S.S.P.E. : NaCl 180 mM, phosphate de sodium 10 mM pH 7,7,
E.D.T.A. 1 mM
- S.T.E.T. : Saccharose 250 mM, Triton X-100 5 %, EDTA 20 mM, tris
50 mM pH 8, lysozyme 1 mg/ml
- T.E. : Tris 10 mM, EDTA 1 mM
- T.E.N. : NaCl 100 mM tris 10 mM, EDTA 1 mM
- T.S.D. : Diéthanolamine 9,7 % dans H₂O

S O M M A I R E

REMERCIEMENTS

ABREVIATIONS - TAMPONS

INTRODUCTION

<u>CHAPITRE I</u>	:	<u>LES PETITS VIRUS A ARN D'INSECTES</u>	4
I	-	<u>NODAVIRIDAE</u>	4
II	-	<u>VIRUS DE TYPE NUDAURELIA B</u>	5
III	-	<u>PICORNAVIRIDAE</u>	6
1	-	Généralités	6
2	-	Caractéristiques physico-chimiques	6
		a) - Les protéines de structure	
		b) - Le génome	
3	-	Stratégie de réplication du génomeviral	7
		a) - Protéines de structure	
		b) - Autres protéines	
4	-	Morphogenèse	9
5	-	Pathogénicité des Picornaviridae d'insectes; spectre d'hôtes	11
6	-	Petits virus à ARN chez les végétaux	11
IV	-	<u>KELP FLY VIRUS</u>	12
V	-	<u>AUTRES PETITS VIRUS A ARN INFECTANT LES INSECTES</u>	13
VI	-	<u>PATHOGENIE PROVOQUEE CHEZ LES INSECTES PAR LES PETITS RIBOVIRUS</u>	13

<u>CHAPITRE II</u>	: <u>MATERIELS ET METHODES</u>	14
I	- <u>MATERIEL BIOLOGIQUE</u>	14
1	- <i>Latoia viridissima</i>	14
2	- Souches bactériennes	14
3	- Plasmides	14
	a) - pBR 322	
	b) - pUC 19	
	c) - pGem 2	
II	- <u>TECHNIQUES ET METHODES</u>	17
A	- <u>TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES D'ETUDE DU VIRUS</u>	17
1	- Purification des virions	17
	a) - Par gradients successifs	
	b) - Par le polyéthylène-glycol	
2	- Microscopie électronique	19
3	- Electrophorèse de protéines en conditions dénaturantes (Laemmli 1970)	19
4	- Isolement des acides nucléiques viraux	19
5	- Analyse quantitative de l'ARN	20
6	- Fractionnement des ARN par chromatographie sur colonne d'oligo(dT)- cellulose	20
7	- Electrophorèse sur gel d'agarose en présence d'hydroxyméthyl-mercure	20

B	- <u>TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES D'ETUDES DU VIRUS</u>	21
1	- Immuno-diffusion en gel d'agarose	21
2	- Test immuno-enzymatique pour la détection des anticorps (E.L.I.S.A.)	21
	a) - Purification des γ -globulines	
	b) - Couplage anticorps-phosphate alcaline	
	c) - Test ELISA	
C	- <u>TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE</u>	23
1	- Digestion par les endonucléases de restriction	23
2	- Analyse électrophorétique des ADN	23
3	- Déphosphorylation	23
4	- Ligation	24
5	- Préparation de bactéries compétentes et transformation	24
	a) - Obtention de bactéries compétentes	
	b) - Transformation	
6	- Extraction de plasmides	25
	a) - Minipréparation	
	b) - Maxipréparation	
7	- Transcription inverse de l'ARN viral	25
	a) - Synthèse du premier brin	
	b) - Synthèse du second brin	
	c) - Purification par chromatographie de l'ADN _c synthétisé	
	d) - Adjonction de queues homopolymériques aux inserts ("tailing")	
	e) - Hybridation insert-plasmide	
8	- Clonage des hétéroduplex	27

9	-	Sonde oligothymidylique (oligo (dT))	28
	a)	- Préparation de la sonde (marquage à la T_4 polynucléotide kinase)	
	b)	- Purification de la sonde	
	c)	- Analyse des clones bactériens à l'aide de la sonde marquée	
10	-	Ribosondes	28
	a)	- Synthèse de la ribosonde	
	b)	- Hybridation avec la ribosonde	
11	-	Sondes ADN biotinylées	29
	a)	- Marquage de l'ADN par déplacement de césure ("nick-translation")	
	b)	- Révélation des ADN hybridés	
12	-	Fixation d'ARN sur membrane	30
	a)	- Dépôts directs	
	b)	- Transfert par capillarité	

II -	<u>PRODUCTION DE SONDAS POUR L'ETUDE DU VIRUS DE</u> <u>L. VIRIDISSIMA</u>	81
A -	<u>CONSTRUCTION DU PLASMIDE pGEM Lv</u>	82
B -	<u>UTILISATION DU PLASMIDE pGEM Lv COMME SONDE ADN</u> <u>BICATENAIRE</u>	82
1 -	Recherche d'homologies de séquence LvV- CrPV	82
2 -	Application au diagnostic viral	84
C -	<u>UTILISATION DU PLASMIDE pGEM Lv POUR LA PRODUCTION</u> <u>DE RIBOSONDES</u>	84
1 -	Recherche du brin génomique	84
2 -	Application au diagnostic viral	85
D -	<u>DISCUSSION</u>	85
1 -	Ribosondes	85
2 -	Sondes ADN bicaténaires	86
3 -	Conclusion	89
	 <u>CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	 89
I -	<u>CONCLUSIONS</u>	89
II -	<u>PERSPECTIVES</u>	90
	 <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	 92

<u>CHAPITRE III</u>	: <u>PROPRIETES DES VIRIONS ET DE SES CONSTITUANTS</u>	31
I	- <u>ASPECTS BIOLOGIQUES DE L'INFECTION VIRALE PAR LvV</u>	31
A	- <u>SYMPTOMES ASSOCIES A LA VIROSE</u>	31
B	- <u>MORTALITE PROVOQUEE PAR LA VIROSE</u>	31
C	- <u>ESSAIS DE MULTIPLICATION DU VIRUS SUR D'AUTRES HOTES ET EN CULTURES CELLULAIRES</u>	33
1	- Essais de multiplication du virus sur insectes	33
2	- Essais de multiplication du virus en cultures cellulaires	33
D	- <u>DISCUSSION</u>	34
II	- <u>CARACTERISATION DU VIRUS</u>	34
A	- <u>PURIFICATION DU VIRUS</u>	34
B	- <u>TAILLE DES PARTICULES VIRALES</u>	38
C	- <u>DENSITE DU VIRUS</u>	38
D	- <u>COMPOSITION POLYPEPTIDIQUE</u>	38
E	- <u>ETUDE SEROLOGIQUE DU VIRUS LvV</u>	40
F	- <u>CARACTERISATION DE L'ACIDE NUCLEIQUE VIRAL</u>	40
1	- Nature et taille du génome	40
a)	- Analyse électrophorétique de l'ARN	
b)	- Etalement d'ARN viral	
2	- Recherche d'une séquence polyadénylée au sein des molécules d'ARN viral	41

III	-	<u>DISCUSSION</u>	41
A	-	<u>PROPRIETES DU VIRION</u>	41
1	-	Taille et densité	41
2	-	Composition polypeptidique	42
B	-	<u>PROPRIETES DE L'ARN VIRAL</u>	43
1	-	Taille du génome viral	43
2	-	Séquence polyadénylée de l'ARN viral	44
C	-	<u>PROPRIETES SEROLOGIQUES DU VIRUS LvV</u>	45
D	-	<u>CONCLUSION</u>	45

<u>CHAPITRE IV : MISE AU POINT D'UN DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE</u>		
<u>PAR TEST ELISA ET APPLICATION A UNE ETUDE</u>		
<u>EPIDEMIOLOGIQUE</u>		46
I -	<u>LE TEST ELISA DANS LE DIAGNOSTIC DES VIROSES D'INSECTES</u>	46
II -	<u>CHOIX DE LA METHODE</u>	46
III -	<u>MISE AU POINT DU TEST ELISA POUR LE DIAGNOSTIC DES</u>	
	<u>INFECTIONS A LvV</u>	48
1 -	Objectifs de cette étude	48
2 -	Préparation et titrage des anticorps et conjugués	48
3 -	Etalonnage du test avec du virus purifié	49
4 -	Etalonnage du test en présence de tissus de <i>L. viridissima</i>	49
	a) - Broyat larvaire à 100 mg/ml	
	b) - Broyat larvaire à 10 mg/ml	
	c) - Broyat larvaire à 1 mg/ml	
	d) - Broyat larvaire à 0,1 mg/ml	
5 -	Application du test à des chenilles naturellement infectées	52
6 -	Effet de l'épuisement des anticorps et des conjugués sur la sensibilité du test	52
IV -	<u>ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA VIROSE CHEZ L. VIRIDISSIMA</u>	54
1 -	Intérêt de l'étude épidémiologique	54
2 -	Modalités de cette étude	54
3 -	Résultats du suivi épidémiologique des populations de <i>L. viridissima</i>	56
	a) - Cas de la parcelle F. 52	
	b) - Cas de la parcelle H. 41	
V -	<u>DISCUSSION</u>	60
A -	<u>SENSIBILITE DU TEST ELISA</u>	60
B -	<u>EPIDEMIOLOGIE</u>	60
C -	<u>CONCLUSION</u>	63

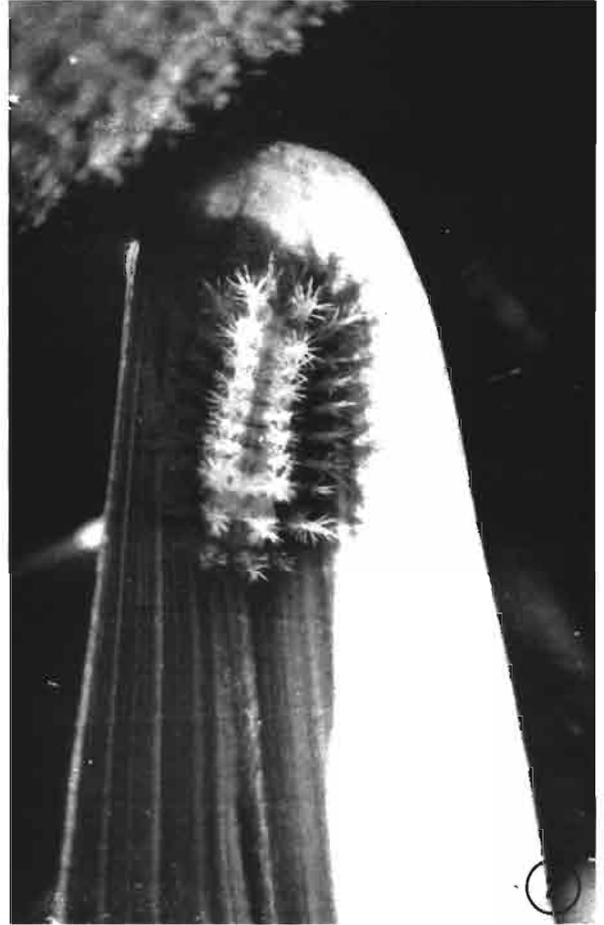
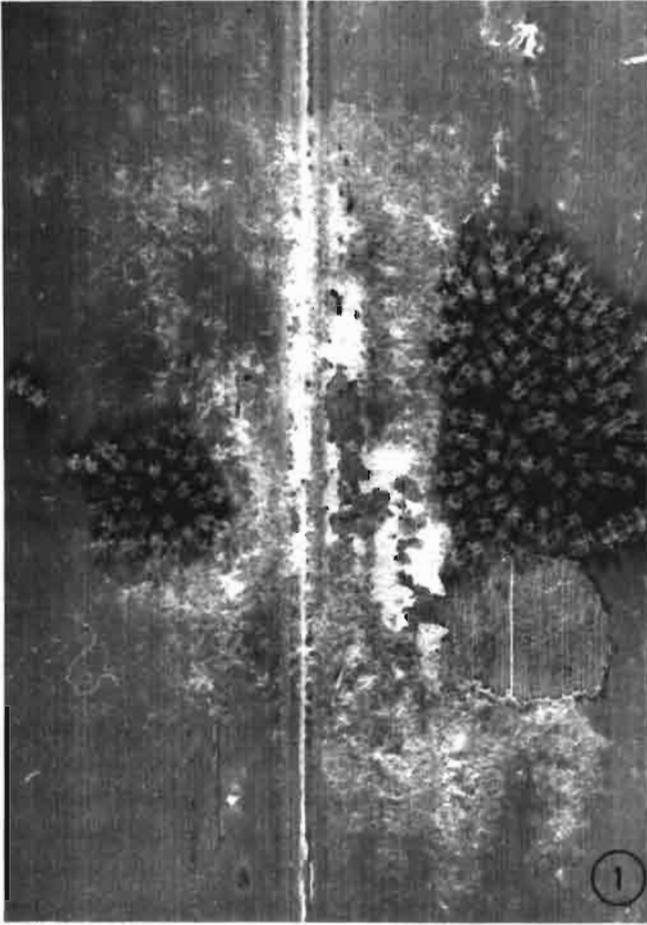
<u>CHAPITRE V</u>	: <u>CLONAGE MOLECULAIRE DE L'ARN VIRAL ET</u>	
	<u>CONSTRUCTION DE SONDES NUCLEIQUES</u>	64
I	- <u>CLONAGE MOLECULAIRE DU GENOME DE LvV</u>	64
	A - <u>STRATEGIE DU CLONAGE</u>	64
	1 - Transcription inverse de l'ARN viral	64
	2 - Clonage des fragments d'ADNc dans pBR 322	68
	B - <u>ANALYSE DES PLASMIDES RECOMBINANTS</u>	68
	C - <u>VERIFICATION DE LA NATURE VIRALE DE L'INSERT</u> <u>CONTENU DANS pLV 16.31</u>	70
	D - <u>CARTOGRAPHIE DE pLV 16.31 ET DES 15 INSERTS DE GRANDE</u> <u>TAILLE</u>	71
	E - <u>SOUS-CLONAGE DE L'INSERT CONTENU DANS pLV 16.31</u>	74
	F - <u>RECHERCHE D'UNE SEQUENCE POLYADENYLEE DANS LES</u> <u>PLASMIDES RECOMBINANTS</u>	76
	G - <u>DISCUSSION</u>	77
	1 - Taille des ADNc clonés	77
	2 - Séquences transcrites de l'ARN viral	78
	3 - Remarques sur le clonage de l'extrémité 3' de l'ARN viral	79
	4 - Cas du clonage des hétéroduplex	79
	5 - Origine des difficultés de clonage des ARN viraux	80
	6 - Conclusion	81

INTRODUCTION

Les écosystèmes naturels constituent des milieux le plus souvent très complexes dans lesquels interviennent un grand nombre de régulations. Aussi, des déséquilibres brusques et importants sont-ils exceptionnels. Par contre, dans les écosystèmes artificiels créés par l'homme, en particulier les agro-écosystèmes, certaines composantes du milieu favorisent les pullulations de populations animales ou végétales responsables d'importantes pertes économiques. Ainsi, dans les plantations de type industriel, la présence d'une nourriture surabondante et de bonne qualité permet le développement considérable des déprédateurs, surtout lorsque les prédateurs naturels de ces espèces ne peuvent s'établir dans le milieu.

Les plantations industrielles de Palmacées réparties dans les zones intertropicales du globe en sont un bon exemple. Elles sont, en effet, régulièrement attaquées par des pullulations d'insectes défoliateurs au premier rang desquels se situent certains Coléoptères et des Lépidoptères de la famille des Limacodidae.

Les moyens de lutte contre ces ravageurs font, le plus souvent, appel à des insecticides chimiques qui bien que généralement efficaces ont un coût élevé et ne sont pas exempts de graves inconvénients; les plus connus étant leur toxicité pour l'environnement et l'apparition de phénomènes de résistance chez les populations-cibles. Aussi, une voie de recherche plus biologique, consistant à tirer parti de l'existence de microorganismes, principalement champignons, bactéries et virus, régulant naturellement les populations animales ou végétales connaît-elle, depuis quelques années, un essor important. Des résultats encourageants de régulation des larves de Limacodidae par épandages de suspensions à base de virus isolés lors d'épizooties naturelles ont été enregistrés dans les palmeraies de Colombie (GENTY et MARIAU, 1975), d'Indonésie (GINTING et DESMIER DE CHENON 1987; LONGWORTH, 1978) et de Côte-d'Ivoire (PHILIPPE résultats non publiés). Les chenilles du Limacodidae *Latoia viridissima* (cf. figures n°1 et n°2) provoquent d'importants dégâts dans les plantations de Côte-d'Ivoire (cf. figures n°3 et n°4). Lors des pullulations, on peut trouver des densités moyennes supérieures à plusieurs centaines de chenilles par palme, ce qui rend nécessaire le recours à des traitements coûteux.



La survenue d'épizooties périodiques dans les populations de ce ravageur a conduit à s'intéresser à l'agent causal de la maladie et à identifier un petit virus à ARN. Une étude approfondie portant sur ce modèle se décide entre l'Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (IRHO-CIRAD), l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) et la Station de Recherches de Pathologie Comparée (INRA-CNRS) associée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc (MONTPELLIER II).

Les résultats de cette étude sont consignés dans ce mémoire. Nous nous sommes, en premier lieu, attachés à caractériser précisément le virus afin d'en connaître les propriétés essentielles. Nous avons alors mis au point et utilisé un test diagnostique permettant d'apprécier l'impact du pathogène sur les populations du ravageur dans les plantations de Palmacées. Enfin, en préalable à l'utilisation possible de ce virus dans le cadre d'une lutte biologique, nous avons construit, grâce aux techniques de la biologie moléculaire, les outils indispensables à sa détection précoce et à l'étude fine de son génome.

CHAPITRE I : LES PETITS VIRUS A ARN D'INSECTES

Il existe sans doute un grand nombre d'espèces d'insectes infectées par de petits virus à ARN (ribovirus), mais la détection de ces virus n'étant pas aisée relativement peu de maladies leur ont été attribuées (MOORE, 1985).

Depuis quelques années, cependant, les infections virales des invertébrés font l'objet d'un surcroît d'attention, en particulier dans la perspective d'une utilisation en lutte biologique (LONGWORTH, 1978). Ainsi, entre 1973 et 1976, trente nouveaux petits virus à ARN ont été trouvés chez divers insectes (LONGWORTH et SCOTTI, 1976).

Les petits ribovirus d'insectes appartiennent, pour l'essentiel, à trois grands groupes: les Nodaviridae, les virus de type Nudaurelia β et les Picornaviridae. A la différence des deux premiers groupes comprenant essentiellement des virus entomopathogènes, les picornavirus se retrouvent à la fois chez les insectes et les vertébrés.

I- NODAVIRIDAE:

Le premier membre de cette famille, le virus Nodamura, fut isolé au Japon en 1967 (SCHERER et HURLBUT, 1967; SCHERER et coll., 1968) chez le moustique *Culex tritaeniorhynchus*. Mais ce n'est qu'en 1973 qu'une étude plus précise révèle qu'il s'agit en fait d'un virus d'un type nouveau (NEWMAN et BROWN, 1973).

En effet, la capsid de ce virus, de 29 nm de diamètre et de symétrie cubique, est constituée d'une seule protéine de 40 kd et renferme deux ARN monocaténaux polyadénylés. L'ARN 1 code pour une polymérase (GUARINO et coll., 1981) et l'ARN 2 pour un précurseur capsidaire (FRIESEN et RUECKERT, 1981). La densité de la particule en chlorure de césium (CsCl) est de 1,34.

Le virus Nodamura paralyse les abeilles puis provoque leur mort en quelques heures après inoculation. Chez *Galleria mellonella*, la mortalité n'intervient qu'une ou deux semaines plus tard (BAILEY et SCOTT, 1979). Chez les moustiques, le mode d'infection joue un rôle capital: la voie de contamination

naturelle (*per os*) conduit à une multiplication non létale tandis qu'une infection expérimentale transcuticulaire induit la mortalité en six à dix jours (TESH, 1980).

Le virus Arkansas de l'abeille, qui appartient au même groupe, provoque une réduction de la durée de vie des individus sans autre pathogénicité détectable (BAILEY et WOOLS, 1974).

Pour l'instant la famille ne contient qu'un petit nombre de représentants découverts dans des ordres d'insectes très divers: Orthoptères, Diptères, Lépidoptères (LONGWORTH, 1978).

L'une des caractéristiques de ces virus réside dans leur capacité à se développer chez certains vertébrés après que ceux-ci aient été piqués par des moustiques infectés.

II- VIRUS DE TYPE NUDAURELIA β :

Ce sont des virus isolés de larves de Lépidoptères Limacodidae et Saturnidae d'Afrique, d'Asie et d'Australie. Plusieurs virus de ce type ont été isolés à partir d'espèces qui provoquent des dégâts sur palmier à huile et cocotier (GREENWOOD et MOORE, 1982); c'est par exemple le cas pour *Setothosea asigna* et *Darna trima* (REINGANUM, 1968).

D'un diamètre de 35 nm environ, le virion montre une densité proche de 1,30 en CsCl (TRIPCONEY, 1970). La capsidie comprend 240 copies d'une protéine de 60 kd (FINCH et coll., 1974; STRUTHERS et HENRY 1974). Elle contient une molécule d'ARN simple brin représentant 12 % du poids total de la particule (STRUTHERS, 1973). L'ARN, non polyadénylé, a une taille d'environ 6 kb (TRIPCONEY, 1970).

Des traitements faisant intervenir ces virus ont été réalisés avec succès dans la lutte contre *Darna trima* (LONGWORTH, 1978) et *Setothosea asigna* (DESMIER DE CHENON, communication personnelle).

Les virus de type Nudaurelia β s'observent fréquemment en association avec d'autres types de particules virales de petites tailles mais mal caractérisées; aussi, les mortalités observées chez les hôtes doivent être attribuées à l'ensemble des pathogènes présents.

III- PICORNAVIRIDAE:

1- Généralités:

Picornavirus est l'acronyme de Poliovirus, Insensible à l'éther, Coxsackievirus, Orphan virus, Rhinovirus, Ribo Nucléique Acide qui rappelle certaines propriétés du groupe et en cite quelques membres parmi les plus anciennement connus.

Actuellement, seuls trois virus d'insectes (les mieux étudiés) sont considérés comme faisant partie de cette famille: le virus de la paralysie du grillon (CrPV), le virus C de la drosophile (DCV) et le virus du lépidoptère Lasiocampidae *Gonometa podocarp*. De nombreux autres virus sont des candidats potentiels à un rattachement à ce groupe, mais pour beaucoup les connaissances restent encore trop fragmentaires.

L'essentiel des données sur cette famille provient d'études menées sur des virus infectant des vertébrés: entérovirus (poliovirus en particulier), rhinovirus, échovirus... Nous en rappellerons les traits caractéristiques.

2- Caractéristiques physico-chimiques:

a)- Les protéines de structure:

Le virion, d'environ 30 nm de diamètre, présente une densité de 1,34 en CsCl et sa constante de sédimentation est d'environ 160 S (RUECKERT, 1987).

La capside, non enveloppée, est constituée de l'assemblage de chacune des quatre protéines structurales appelées 1A, 1B, 1C et 1D. Le poids moléculaire de 1B, 1C et 1D est d'environ 30 kd et celui d'1A proche de 7 kd (RUECKERT, 1987).

La composition polypeptidique de DCV semble très similaire à celle des Entérovirus de vertébrés (JOUSSET et coll., 1977). Chez CrPV, trois des quatre polypeptides attendus ont été rapidement trouvés (PLUS et coll., 1977) et le dernier plus tardivement. LONGWORTH (1978) note que les résultats hétérogènes concernant la composition polypeptidique des autres virus d'insectes pouvant entrer dans la famille des Picornaviridae s'expliquent mal lorsqu'on les rapporte aux nombreuses similitudes existant par ailleurs.

Comme signalé chez certains Entérovirus (COOPER, 1978), des phénomènes de dégradation lors des étapes de purification pourraient aussi intervenir entraînant la perte d'une petite protéine analogue à 1A. En effet, chez CrPV, le peptide de 8 kd, du fait de sa grande labilité, n'a été découvert que tardivement et en partant de virus fraîchement produit sur culture cellulaire. Parallèlement, la présence d'une bande mineure de 38 kd pouvant correspondre à 1AB (précurseur

de 1A et 1B) laisse présager, pour ces entomovirus, l'existence d'une morphogenèse analogue à celle des Picornavirus de vertébrés (SCOTTI et coll., 1981).

D'une façon générale, chez ces virus d'insectes, une bonne résolution des polypeptides reste difficile à obtenir en gel de polyacrylamide (PLUS et coll., 1978).

b)- Le génome:

Les ARN picornaviraux, simple brin, de polarité positive, ont un poids moléculaire d'environ 3×10^6 daltons.

La molécule d'acide ribonucléique, polyadénylée à son extrémité 3' (YOGO et WIMMER 1972), est liée de façon covalente à un peptide à son extrémité 5' (LEE et coll., 1977; NOMOTO et coll., 1977; WIMMER, 1982). Cette petite protéine, appelée VPg, couplée à l'ARN par une liaison O^4 -(5'-uridylyl)-tyrosine (LEE et coll., 1977; NOMOTO et coll., 1977; ROTHBERG et coll., 1978), se retrouve aussi chez CrPV et DCV (KING et MOORE, 1988). Pour CrPV existe aussi une séquence polyA terminale (EATON et STEACIE, 1980).

Chez les membres du groupe des picornavirus d'invertébrés, la teneur en G+C reste inférieure à 40 % ce qui représente une différence essentielle par rapport aux Picornaviridae de vertébrés. C'est une caractéristique unique non retrouvée chez d'autres virus d'invertébrés à l'exception du Kelp Fly Virus.

L'ARN picornaviral, de type messager (ARNm) n'est pas "cappé" à la différence des ARNm mammaliens. Il possède deux zones non codantes, l'une en 5', l'autre en 3'. Sa structure d'ARNm autorise sa traduction directe par les ribosomes *in vivo* (KOCH, 1973) ou en système acellulaire *in vitro* (SHIH et coll., 1978).

3- Stratégie de répllication du génome viral (cf. figure n°5):

Une unique polyprotéine est synthétisée par la traduction de la partie codante de l'ARN viral qui ne possède qu'un seul cadre de lecture ouvert. De cette polyprotéine, appelée NCPV 00, dérivent, par une série de clivages endopeptidiques en cascade, toutes les protéines virales (JACOBSON et BALTIMORE, 1968; PALLANSCH et coll., 1984).

La disposition des gènes viraux s'organise de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' en trois régions principales dénommées P1, P2 et P3.

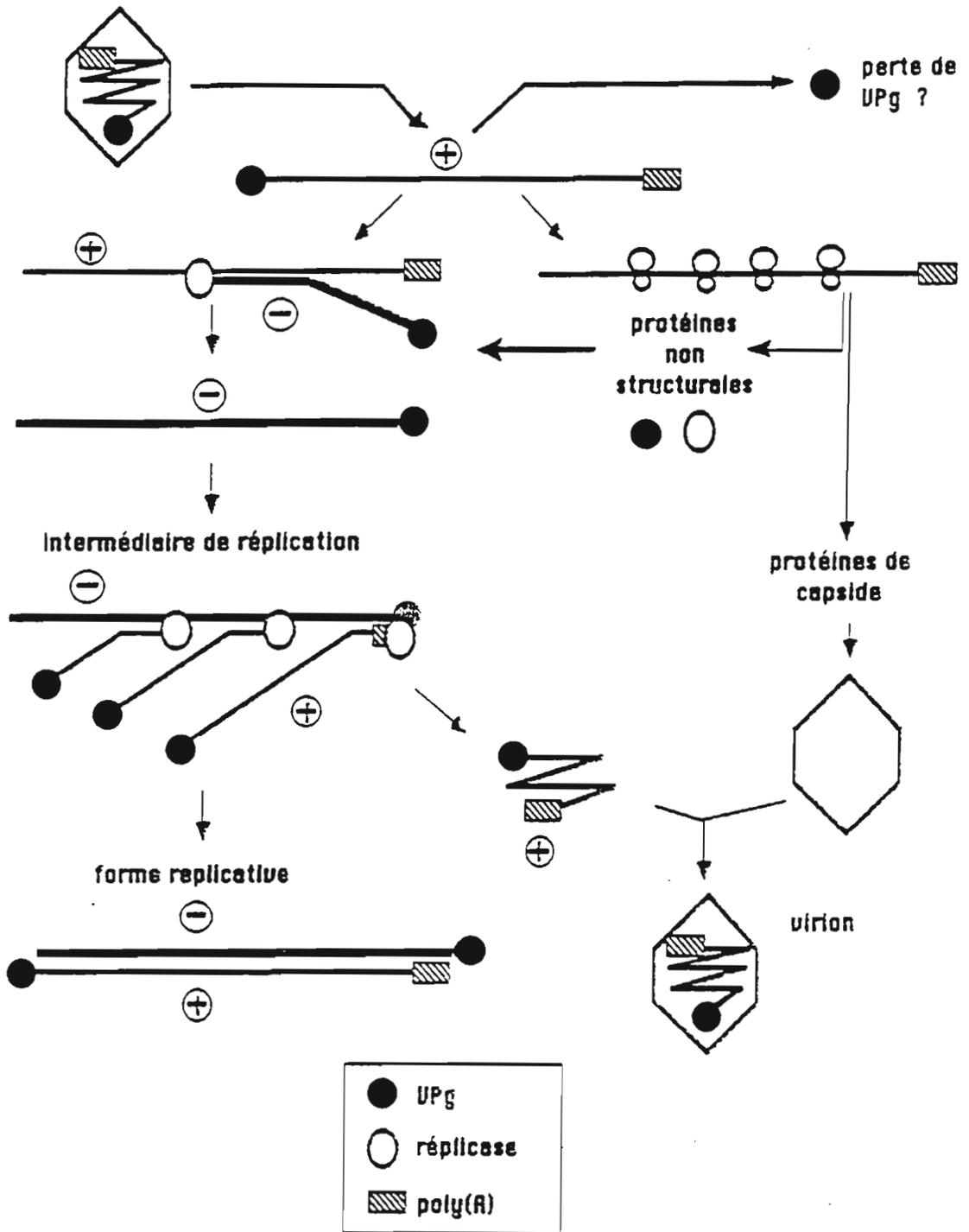


Figure 7: Schéma général de la réplication d'un ARN picornaviral

(d'après RUECKERT, 1985)

Chez CrPV et DCV, la production des différentes protéines de structure et de fonction résulte d'une synthèse suivant des modalités analogues à celles des Picornaviridae de vertébrés (REAVY et MOORE, 1982).

a)- Protéines de structure:

La région P1 code pour les quatre protéines capsidaires 1A, 1B, 1C et 1D qui portent les déterminants antigéniques du virus (exceptée 1B totalement interne (BENEKI et coll., 1977)). C'est la région présentant le plus de variations au sein d'une population virale (EMINI et coll., 1985).

b)- Autres protéines:

P2 code pour des protéines de rôle inconnu et pour une protéase impliquée dans les clivages de NCPV 00 entre les résidus tyrosines et glycines (TOYODA et coll., 1986).

P3 contient l'information génétique pour VPg, pour la protéase majeure des picornavirus (3C) et pour la seule réplicase (ARN-polymérase-ARN-dépendante: 3D).

En séquençant, l'extrémité 3' terminale du génome de CrPV, KING et coll. (1987) ont montré que, chez ce virus, il existait aussi une polymérase présentant de fortes homologues avec celle trouvée chez les picornavirus de vertébrés.

4- Morphogenèse (cf. figures n°6 et n°7):

Les polypeptides 1AB, 1C et 1B issus du clivage de P1 restent associés sous forme d'un protomère. Les protomères s'assemblent en pentamères puis 12 de ces derniers forment une procapside. L'adjonction d'une molécule d'ARN donne un provirion qui, après clivage de 1AB en 1A et 1B, est à l'origine du virion mature (PUTNAK et PHILIPP, 1981). C'est un ARN anti-messager résultant de la transcription du génome picornaviral qui sert de matrice lors de la synthèse de molécules d'ARN de polarité positive qui seront soit encapsidées soit traduites en protéines virales (RUECKERT, 1987).

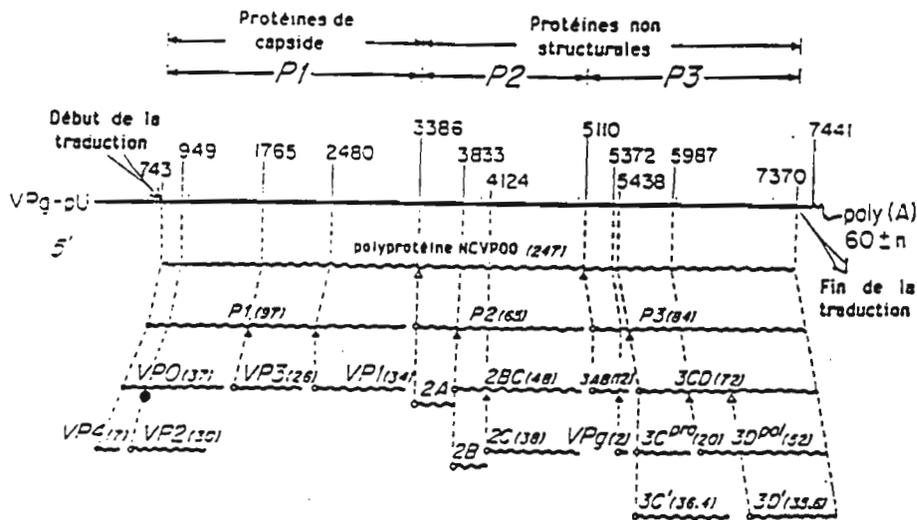


Figure 5: Organisation du génome d'un Picornaviridae (cas du poliovirus)

(d'après RUECKERT, 1985)

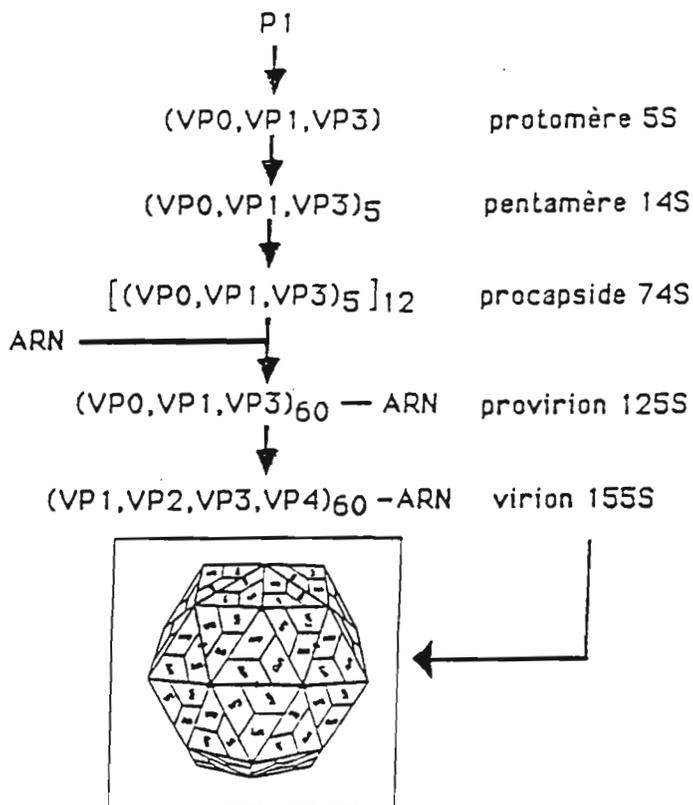


Figure 6: Schéma classique de la morphogénèse des Picornaviridae

(d'après RUECKERT, 1985)

5- Pathogénicité des Picornaviridae d'insectes: spectre d'hôtes:

DCV et CrPV représentent des virus très ubiquistes ayant une large dispersion géographique (MOORE, 1985).

Drosophila melanogaster meurt en trois jours après inoculation avec du DCV (JOUSSET et coll., 1972). Cependant, les différents sérotypes de ce virus, isolés aussi bien à partir d'insectes prélevés dans la nature que dans des élevages de laboratoire ou en cultures cellulaires (MOORE et coll., 1982), montrent des pathogénicités différentes. Ainsi, SCOTTI et coll. (1981) ont rapporté des infections chroniques de nombreuses lignées cellulaires par le DCV.

CrPV est capable de se répliquer dans 35 espèces d'insectes appartenant à 5 ordres différents (SCOTTI et coll., 1981). Après injection, CrPV tue le grillon *Teleogryllus commodus* en 3 jours mais, dans les populations naturelles de cet insecte, le virus est constamment présent à un très faible niveau sans que l'on détecte de symptômes morbides (REINGANUM et coll., 1970).

CrPV (ou des virus indistinguables sérologiquement) existe en Australie (REINGANUM et SCOTTI, 1976), en Malaisie, aux Canaries, aux Antilles (PLUS et coll., 1975), en Afrique du Nord, aux Etats-Unis...

A l'opposé, à l'intérieur du groupe, tous les CrPV ne présentent pas le même sérotype. S'agit-il donc d'un seul virus? Lorsqu'un virus réagit avec un anti-sérum contre CrPV (ou DCV), on le classe comme étant CrPV (ou DCV), ces deux virus présentant d'ailleurs des communautés antigéniques, alors qu'il pourrait s'agir d'antigènes communs à un groupe.

Plusieurs modes de contamination existent probablement pour CrPV et DCV. La possibilité d'infection par les aliments ainsi que par la présence d'individus contaminés dans une population a pu être démontrée (JOUSSET et PLUS, 1975). A la différence d'autres petits virus à ARN (virus A et P de la drosophile...), la transmission transovarienne n'existe pas, mais la femelle peut transmettre l'infection à la suite d'une contamination du chorion de l'oeuf

Le virus de *G. podocarpi*, utilisé en champ contre son hôte naturel, un lépidoptère défoliateur du pin, a montré sa réelle efficacité dans le contrôle du ravageur (HARRAP et coll., 1966).

6- Petits virus à ARN chez les végétaux:

On a répertorié chez les végétaux un très grand nombre de ribovirus ayant des tailles inférieures ou égales à 40 nm. Des virus appartenant à divers groupes présentent la capacité de se développer à la fois chez un arthropode (le vecteur) et chez un végétal.

En outre, d'importantes homologies au niveau des séquences nucléotidiques ou dans les stratégies de réplication apportent la preuve d'une proche parenté entre certains virus infectant pour les uns le règne animal et, pour les autres le règne végétal (DOMIER et coll., 1987).

Ainsi, certains virus de plantes présentent toutes les caractéristiques de Picornaviridae. Aussi, la tendance actuelle consiste à regrouper au sein d'une même super-famille, les Picornaviridae-associés, tous les virus ayant ce type d'organisation quels que soient leurs hôtes (GOLDBACH et WELLINCK, 1988).

IV- KELP FLY VIRUS:

Isolé chez une mouche du varech australienne (SCOTTI et coll., 1976), ce virus de 29 nm de diamètre possède une densité de 1,425 en CsCl. Des sous-unités de la capsidie de quelques nanomètres de long font protubérance à la surface de la particule suivant une symétrie d'ordre 5. Deux protéines majeures de 73 kd et 29,4 kd et un ARN de $3,5 \times 10^6$ d le distinguent nettement des groupes précédents.

V- AUTRES PETITS VIRUS A ARN INFECTANT LES INSECTES:

LONGWORTH (1978) réunit dans quatre groupes ne s'intégrant pas encore dans une classification systématique, différents virus ayant un certain nombre de caractéristiques communes.

1- Les virus A et P de la drosophile (PLUS et coll., 1976), le virus de la paralysie lente de l'abeille et celui de l'abeille du Kashmir (BAILEY et coll., 1976).

Quelques relations au niveau sérologique, la présence de trois (ou plus) protéines capsidaires, une densité proche de 1,36 en CsCl ainsi qu'un coefficient de sédimentation de 170 S- 180 S constituent leurs principaux points communs.

2- Les petits virus inférieurs à 20 nm tels le virus associé au virus de la paralysie chronique de l'abeille (BAILEY, 1976), le "crystalline array virus" de la sauterelle (JUTILA et coll., 1970) et un virus observé chez *Antheraea eucalypti* (BELLET et coll., 1973).

3- Des virus ovoïdes comme celui de la paralysie chronique de l'abeille (BAILEY et coll., 1963) et le virus RS de la drosophile (PLUS et coll., 1975).

4- Des virus n'entrant dans aucune des catégories précitées.

VI- PATHOGENIE PROVOQUEE CHEZ LES INSECTES PAR LES PETITS RIBOVIRUS:

La découverte de la majorité des petits virus à ARN d'insectes s'est faite sans qu'une action importante au niveau des populations-hôtes se soit manifestée (LONGWORTH, 1978).

Par exemple, pour le Kelp Fly Virus, des virus de la drosophile, d'autres infectant l'abeille... l'existence d'un virus inapparent chez des hôtes "sains" s'est révélée après inoculation à d'autres espèces d'insectes chez lesquelles une réplication virale importante a pu permettre la mise en évidence et la production du virus.

LONGWORTH (1978) note que les quelques cas où de petits virus à ARN se manifestent de façon significative correspondent à des lieux confinés où l'on observe des densités très importantes de la population-hôte (par exemple des plantations végétales mono-spécifiques ou des élevages expérimentaux).

MOORE (1985) rappelle que si la pathogénie provoquée par la plupart de ces petits ribovirus reste mal connue c'est que:

- ils sont de petite taille et donc pas toujours faciles à mettre en évidence.
- ils se développent dans des élevages de laboratoire où les conditions paraissent éloignées de celles du milieu naturel.
- les infections se font fréquemment par injection, ce qui ne constitue pas une voie de contamination naturelle.

Cependant, LONGWORTH (1978) relève un certain nombre de points communs. D'abord, tous ces virus se développent dans le cytoplasme des cellules. L'intestin représente, en général, le premier organe-cible (mais, quelquefois, cela peut-être le système nerveux). L'atteinte du tube digestif se traduit par des régurgitations et des pertes anales importantes jouant un rôle dans la dispersion virale au sein de l'écosystème.

Le virus Nodamura représente le seul exemple d'un petit virus à ARN d'invertébré possédant la capacité de se multiplier chez les vertébrés. Pour les autres, aucun effet notable n'est rapporté chez les vertébrés suite aux injections massives et répétées de souris, lapins, cobayes et autres mammifères aux vues de production des sérums.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I- MATERIEL BIOLOGIQUE:

1- Latoia viridissima:

Pour la biologie et l'écologie du Lépidoptère Limacodidae *Latoia viridissima* (HOLLAND, 1893), nous renvoyons aux descriptions données par **FEDIERE et coll. (1981)** et **MARIAU et coll. (1981)**. De 3 à 4 cm d'envergure, l'imago a une teinte vert pomme. La durée du développement s'étage entre 104 et 129 jours, la durée de l'ensemble des stades larvaires variant de 67 à 87 jours (cf. figures n°1 et n°2).

2- Bactéries:

Deux souches dérivées d'*Escherichia coli* K 12 sont utilisées pour l'amplification des plasmides: la souche 1106 (r_{k-}, m_{k-}) et la souche C₆₀₀ (rec⁺).

Les bactéries se cultivent sur milieu Luria-Bertani (L.B) liquide ou solide (1,5 % d'agar) supplémenté ou non en ampicilline (100 mg/l) ou en tétracycline (10 mg/l). Les cultures bactériennes se font à 37° C à l'étuve (boîte de Pétri) ou en bain-marie agité (milieu liquide). Les souches sont conservées dans 40 % de glycérol à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance.

3- Plasmides:

a)- pBR 322 (**BOLIVAR et coll., 1977**; cf. figure n°8):

Ce plasmide de 4363 paires de bases (pb) porte deux gènes de résistance aux antibiotiques: le gène codant pour la β -lactamase (résistance à l'ampicilline) et celui codant pour la résistance à la tétracycline.

La présence de plusieurs sites de restriction uniques à l'intérieur de ces deux gènes permet l'insertion de fragments d'ADN et la sélection sur milieu supplémenté en l'un des deux antibiotiques des colonies de bactéries transformées.

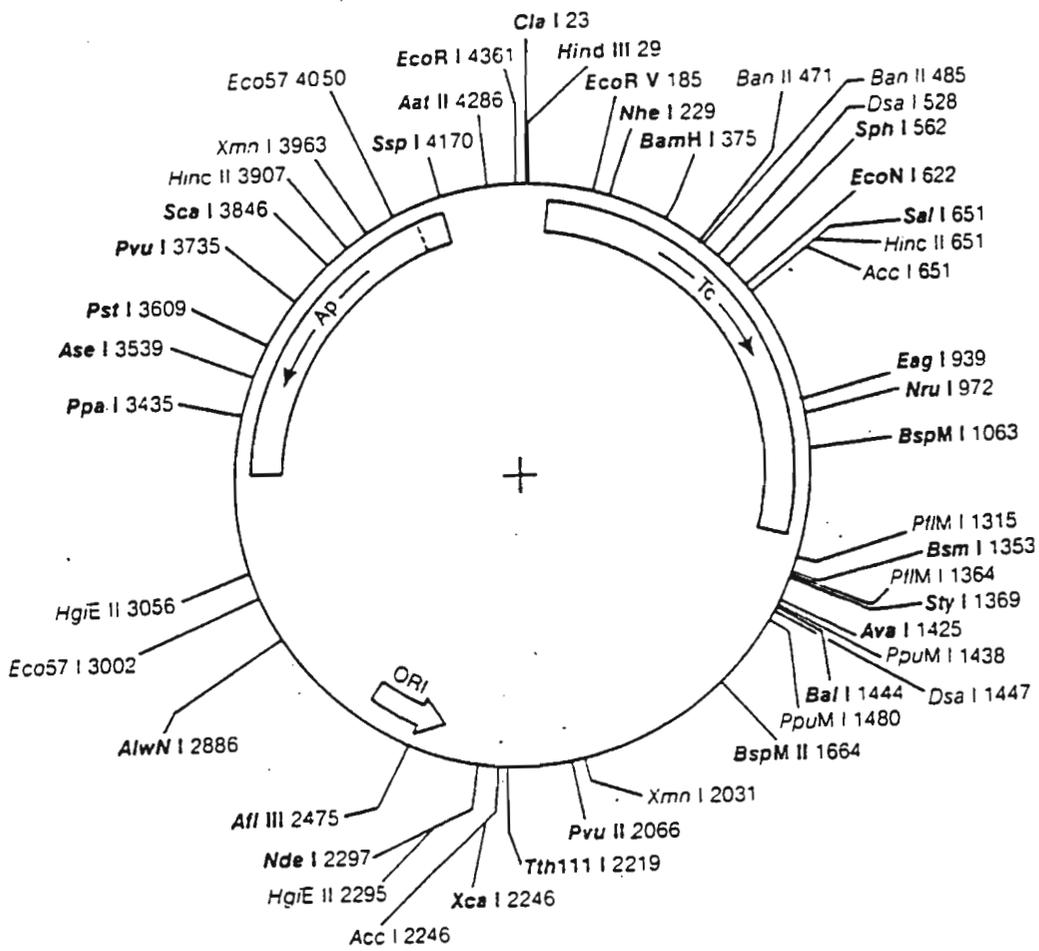


Figure 8: Carte physique du plasmide pBR 322
(d'après Bolivar et coll., 1977)

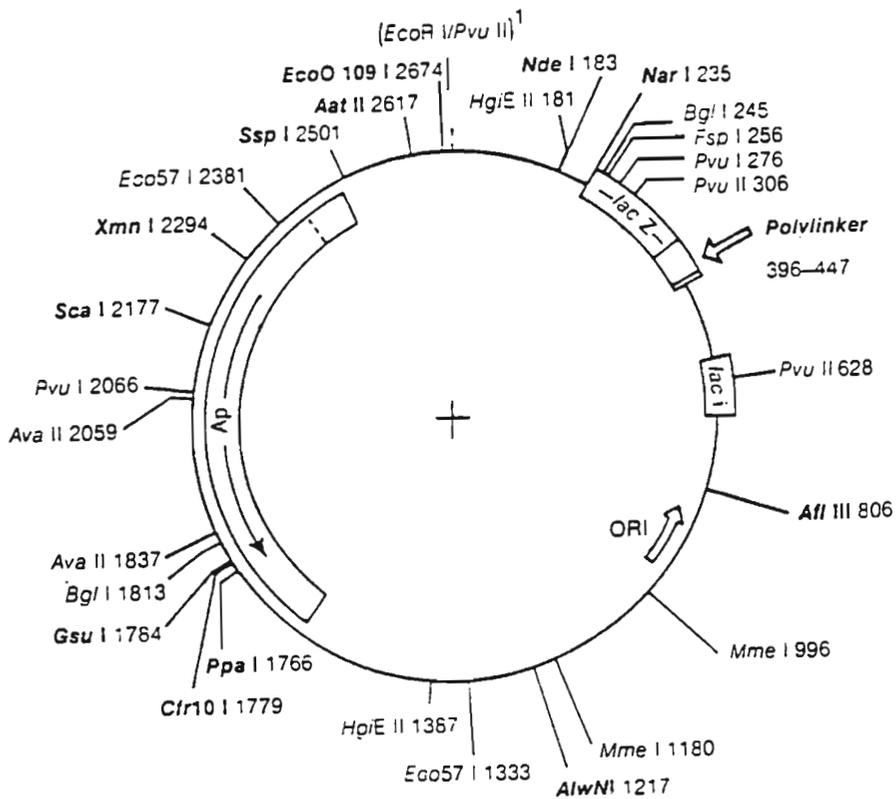


Figure 9: Carte physique du plasmide pUC 19
(d'après Vieira et Messing, 1982)

b)- pUC 19 (VIEIRA et MESSING, 1982; cf. figure n°9):

Dérivé de pBR 322, ce plasmide de 2686 pb porte le gène de résistance à l'ampicilline du précédent ainsi qu'une courte séquence (54 pb) de clonage multiple, ou "polylinker", caractérisée par une succession de 13 sites de restriction uniques permettant l'insertion de fragments d'ADN.

c)- Gémini 2: pGem 2 (YANISH-PERRON et coll., 1985; cf. figure n°10):

Ce vecteur possède une séquence de clonage multiple localisée entre les promoteurs des ARN-polymérases SP6 et T7. Cette construction permet de synthétiser un ARN complémentaire de l'un ou l'autre brin de l'ADN cloné suivant le promoteur choisi (cf. figure n°11).

II- TECHNIQUES ET METHODES:

A- TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES D'ETUDE DU VIRUS:

1- Purification des virions:

a)- Par gradients successifs:

Le broyage des chenilles s'effectue en tampon T.E.N pH 7,4, au froid et en présence de 10 % de sérum de veau foetal servant d'inhibiteur de protéases. Après une clarification à 5000 g pendant 10 minutes, on dépose le surnageant sur un gradient préformé de saccharose (15 % à 45 %) que l'on centrifuge 3 heures à 75000 g et 4° C.

Les fractions absorbant à 260 nm sont prélevées automatiquement à l'aide d'un fractionneur de gradient couplé à un spectrophotomètre et à un collecteur de fractions. Ces fractions, diluées volume à volume par du T.E.N puis déposées au sommet d'un gradient préformé de CsCl (15 % à 45 %), sont centrifugées à l'équilibre pendant 12 heures à 150000 g.

Le gradient est analysé comme précédemment. La fraction contenant les virions est dialysée contre du T.E.N puis centrifugée 2 heures à 150000 g. Le culot obtenu est remis en suspension dans du T.E.N et la pureté de la suspension virale et sa concentration sont contrôlées au spectrophotomètre ainsi qu'au microscope électronique.

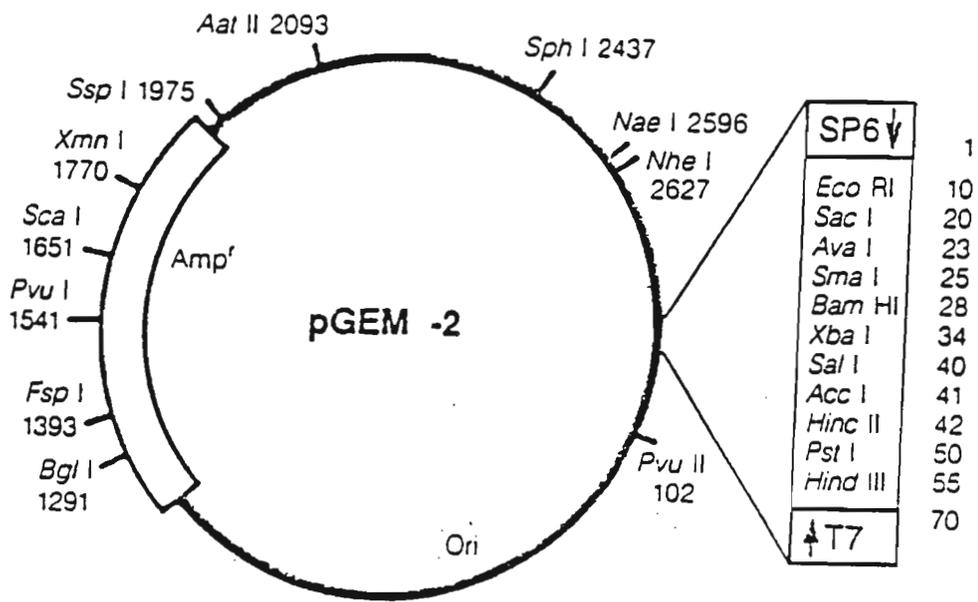


Figure 10: Carte physique du plasmide Gémini 2 (pGEM 2)

(d'après Yanish-Perron et coll., 1985)

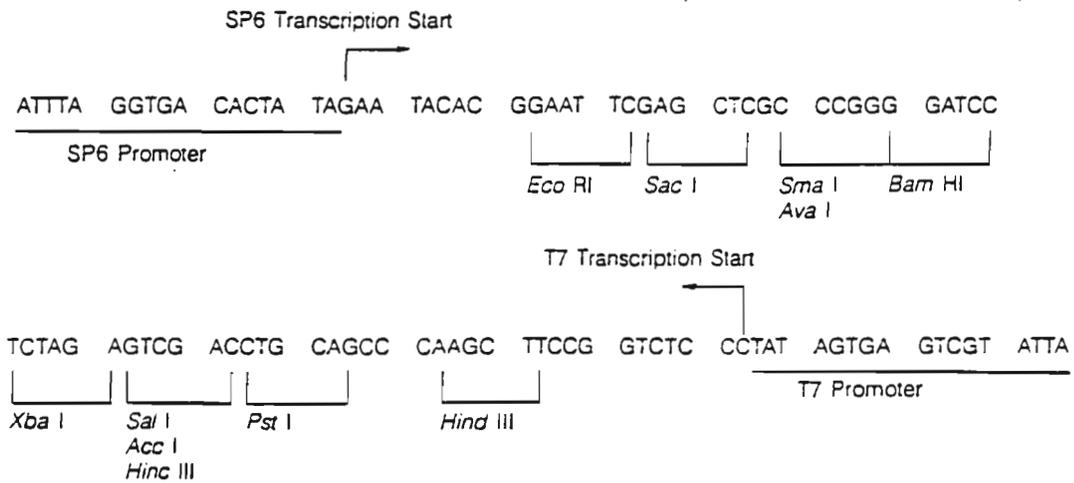


Figure 11: Séquence de la zone de clonage multiple du plasmide pGEM 2

(d'après Yanish-Perron et coll., 1985)

b)- Par le polyéthylène-glycol (CLARK, 1970):

Un broyat de chenilles clarifié par une centrifugation à 5000 g pendant 30 minutes est ajusté à une concentration finale de 7 % en P.E.G 6000 et 0,2 M en NaCl.

Après une nuit de précipitation à 4° C, le virus est sédimenté (1 heure à 10000 g) puis repris dans du tampon T.E.N et enfin déposé sur gradient de saccharose 15 % à 45 % (V/V). Après 3 heures de centrifugation à 140000 g, le virus est récupéré comme précédemment. Si nécessaire, la purification est parachevée par une centrifugation à l'équilibre en CsCl.

2- Observation des virions en microscopie électronique:

Les suspensions virales déposées sur grille porte-objet sont contrastés à l'acide phosphotungstique à 1 % pH 7,0 et examinées au microscope électronique à transmission sous une tension de 75 kV (BRENNER et HORNE, 1959).

3- Electrophorèses de protéines en conditions dénaturantes (LAEMMLI, 1970):

Le virus est dissocié par chauffage à 100° C pendant 3 minutes dans un mélange Tris 0,625 M pH 6,8, SDS 2 %, glycérol 15 %, béta-mercaptoéthanol 5 %, bleu de Coomassie 0,04 %. Les échantillons sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 5 % (gel de tassement) surmontant le gel de migration à 17,5 %. La migration à 140 volts, pendant 12 heures, se réalise en tampon Tris (0,025 M)- glycine (0,1 M) de pH 8,3 après une prémigration d'une heure à 80 volts.

Après migration, les gels sont fixés et colorés dans un mélange méthanol 40 %, acide acétique 10 %, bleu de Coomassie 0,1 % dans de l'eau. La même solution sans bleu de Coomassie permet d'éliminer du gel l'excès de colorant. L'estimation des poids moléculaires des protéines se fait par comparaison au comportement électrophorétique de protéines de poids moléculaires connus utilisées comme marqueurs.

4- Isolement des acides nucléiques viraux:

On ajoute au virus purifié en suspension dans l'eau, un égal volume de phénol saturé avec du T.E pH 7,5. On agite durant quelques minutes. Les phases aqueuse et organique sont ensuite séparées par 10 minutes de centrifugation à 2000 g.

Une seconde extraction de la phase aqueuse est réalisée suivant le même protocole. Les phases phénoliques, regroupées, doivent ensuite être lavées avec un

dernier volume de T.E pH 9 afin que les ARN polyadénylés puissent, à ce pH basique, se décrocher de l'interphase.

Un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 V/1 V) est ajouté à la phase aqueuse afin d'éliminer le phénol. La phase organique, séparée par centrifugation, est éliminée. L'ARN contenu dans la phase aqueuse est précipité par addition de 0,1 volume de chlorure de lithium (LiCl) 4 M et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Le précipité est rincé à l'éthanol à 70 % puis séché sous vide.

5- Analyse quantitative de l'ARN:

Elle est faite par la méthode colorimétrique de MEJBAUM (1939). L'intensité de la coloration obtenue après action du réactif à l'orcinol sur l'échantillon est comparée à celle d'une gamme-étalon obtenue dans les mêmes conditions avec des solutions d'ARN de concentrations connues.

6- Fractionnement des ARN par chromatographie sur colonne de cellulose-oligo(dT):

La technique, adaptée de celle d'AVIV et LEDER (1972), fait intervenir l'hybridation entre les résidus d'acide oligothymidylique couplés à la cellulose (cellulose-oligo(dT)) et de possibles régions polyadénylées de l'ARN testé.

On verse, dans une pipette Pasteur stérile et siliconée, 0,5 ml de cellulose oligo(dT) que l'on équilibre avec du tampon d'accrochage (Tris 10 mM pH 7,4, LiCl 500 mM, SDS 0,1 %, EDTA 1mM). L'ARN, marqué radioactivement à son extrémité 3', en solution dans ce même tampon, est déposé sur la colonne.

On lave la colonne avec quelques millilitres de tampon d'accrochage ce qui élimine les ARN polyA⁻ (c'est-à-dire ne contenant pas de séquence polyadénylée). Puis, on réalise le décrochage des ARN polyA⁺ par addition de 2 ml de tampon d'élution (Tris 10 mM pH 7,4, SDS 0,05 %, EDTA 1 mM).

La radioactivité des différentes fractions se mesure au compteur à scintillation liquide.

7- Electrophorèses en gel d'agarose en présence d'hydroxyméthylmercure :

Les gels d'agarose à 0,8 % sont préparés avec le tampon suivant: acide borique 50 mM, borate de sodium 50 mM et sulfate de sodium 10 mM à pH 8,2 (BAILEY et DAVIDSON, 1976).

Immédiatement avant de couler le gel, l'hydroxyméthylmercure (OH Me Hg) est ajouté à la concentration finale de 5 mM. De même, avant le dépôt, les échantillons sont aussi amenés à cette molarité en OH Me Hg.

L'électrophorèse se fait sous une tension de 1,5 V/cm pendant 15 heures avec recirculation du tampon de migration.

L'OH Me Hg, très toxique, est neutralisé en traitant le gel à l'acétate d'ammonium 0,5 M pendant 90 minutes. Puis, le gel est coloré au bromure d'éthidium (50 µg / ml) et observé en lumière ultraviolette à 254 nm (U.V).

B- TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES D'ETUDE DU VIRUS:

1- Immunodiffusion en gel d'agarose:

La technique de double diffusion en plaque (OUCHTERLONY, 1948) repose sur la capacité de diffusion des antigènes et des anticorps à travers un gel d'agarose

Des lames de verre de microscope optique sont recouvertes d'agarose à 1 % dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,4. Des puits creusés à l'emporte-pièce dans l'agarose suivant une répartition hexagonale centrée reçoivent les sérums et antigènes à comparer suivant différentes dispositions.

Après une nuit d'incubation à 37° C, le gel est rincé plusieurs fois avec de l'eau physiologique puis coloré au bleu de Coomassie. On réalise ensuite plusieurs bains d'eau distillée pour éliminer le colorant du gel et permettre la visualisation des arcs de précipitation antigènes-anticorps.

2- Test immuno-enzymatique pour la détection des antigènes (ELISA):

a)- Purification des gamma-globulines:

Des immuns-sérums anti-virus de *Latoia viridissima* sont obtenus par injection d'une suspension virale purifiée à des lapins suivant le protocole donné par FEDIERE (1983).

1 millilitre d'immun-sérum de titre 1/500 ème en immunodiffusion est dilué au dixième et précipité en présence de sulfate d'ammonium à demi-saturation. Après une heure à température ambiante, on centrifuge la solution 15 minutes à 6 000 g. Le précipité, repris dans 2 ml de tampon P.B.S dilué de moitié, est dialysé 3 fois contre 500 ml du même tampon.

On passe ensuite le dialysat sur une colonne de D.E.A.E.-cellulose couplée à un spectrophotomètre. Le premier pic d'élution absorbant à 280 nm contient les globulines. On ne conserve que les fractions de ce pic dont le rapport d'absorption $E_{278} \text{ nm} / E_{250} \text{ nm}$ se situe entre 2,5 et 2,7.

On dilue la solution pour obtenir une absorbance de 1,4 unité de D.O à 280 nm, correspondant à environ 1 mg de protéines par millilitre.

b)- Couplage anticorps-phosphatase alcaline:

5 mg d'enzyme (phosphatase alcaline) précipités au sulfate d'ammonium sont directement repris dans 2 ml de la solution de gamma-globulines purifiées précédemment. Après trois dialyses contre du P.B.S, on ajoute du glutaraldéhyde à la concentration finale de 0,06 %. Après 4 heures sous agitation à température ambiante, on dialyse à nouveau le mélange contre du P.B.S pour éliminer l'agent couplant. Stocké à 4° C en présence d'azoture de sodium (NaN_3) à 0,1 %, le conjugué se conserve plusieurs mois.

c)- Test ELISA:

La technique retenue suit le protocole donné par CLARK et ADAMS (1977). On dépose dans chaque puits 200 microlitres (μl) de gamma-globulines purifiées, diluées dans du tampon de couverture P.B.S.T pH 9,6. Après 1 heure d'absorption à 4° C, on dépose 200 μl de l'échantillon à tester. broyé en tampon antigène P.B.S.T-P.V.P, l'incubation se faisant à 4° C durant la nuit. Ensuite, on dépose 200 μl de conjugué dilué dans le tampon P.B.S.T-P.V.P-O.V. Après un contact de 12 heures à 4° C, on ajoute 200 μl de paranitrophényl-phosphate (P.N.P) fraîchement préparé dans du tampon T.S.D à la concentration de 0,6 % (P/V).

Après une heure de réaction, l'intensité de la coloration développée est déterminée par la lecture des densités optiques de chaque puits au spectrophotomètre à 405 nm.

Entre chacun des dépôts successifs, la plaque subit trois rinçages au tampon P.B.S.T afin d'éliminer tous les produits non fixés. Chaque rinçage se fait pendant trois minutes sur table à agitation.

C- TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE:

1- Digestions par les endonucléases de restriction:

Les digestions par les endonucléases de restriction se réalisent dans un volume de 20 μ l en incubant 1 à 3 unités d'enzyme par microgramme d'ADN pendant 1 à 12 heures à 37° C dans le tampon spécifique préconisé par le fournisseur.

Une incubation à 65° C pendant 10 minutes suivie d'un refroidissement rapide à 0° C permet d'inactiver l'enzyme et d'éviter le réappariement des extrémités cohésives.

Dans le cas de digestions multiples par des enzymes nécessitant le même milieu réactionnel, on réalise une digestion simultanée. Dans le cas contraire, la première enzyme utilisée est celle agissant dans le milieu de plus basse force ionique; la seconde enzyme est ajoutée après ajustement de la salinité.

2- Analyse électrophorétique des ADN:

L'analyse des plasmides natifs et de leurs produits de digestion se fait par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % dans un tampon Tris-acide phosphorique 80 mM pH 8,0, EDTA 8mM qui sert également de tampon d'électrophorèse. Les échantillons sont chargés sur le gel après addition d'une solution de bleu de bromophénol (0,5 %) et glycérol (50 %) destinée à favoriser le dépôt de ces échantillons au fond des puits et à suivre visuellement leur migration.

L'électrophorèse se déroule sous une tension de 7 V/cm. Après migration, le gel, coloré à l'aide d'une solution de bromure d'éthidium à 0,5 μ g/ml, s'observe en lumière ultraviolette.

3- Déphosphorylation des ADN:

Afin d'éviter une recircularisation du plasmide receveur sur lui-même lors de la ligation, il est nécessaire de le déphosphyler.

L'ADN repris dans du tampon de déphosphorylation (Tris 50 mM pH 9,0, ZnCl₂ 1 mM et spermidine 10 mM) est mis à incuber 30 minutes à 37° C en présence de 2 unités de phosphatase alcaline d'intestin de veau (C.I.P). Après 30 minutes, on rajoute 2 unités de C.I.P supplémentaires et on prolonge l'incubation d'autant. Dans le cas où l'ADN présente des extrémités 5' rentrantes ou à bords francs, la seconde incubation se réalise à 56° C. L'enzyme est inactivée en

amenant le milieu à une concentration de 10 mM en EDTA et 0,1 M en NaCl et en déprotéinisant l'ADN au phénol.

4- Ligation des ADN:

La ligase du bactériophage T4 catalyse la ligation de deux molécules d'ADN par des ponts phosphodiesters.

La ligation d'un insert et d'un plasmide déphosphorylé se réalise avec des rapports quantitatifs insert/plasmide de 5 dans un milieu contenant 66 mM de Tris pH 7,6, 5 mM de $MgCl_2$, 5 mM de D.T.T et 10 mM d'adénosine triphosphate (ATP) en présence de 0,5 unité d'ADN-ligase T4 par microgramme de vecteur. L'incubation se poursuit une nuit à température ambiante.

5- Préparation de bactéries compétentes et transformation:

a) Obtention de bactéries compétentes:

1 ml d'une pré-culture bactérienne de 12 heures est ajoutée à 100 ml de milieu L.B liquide que l'on incube à 37° C sous agitation. Lorsque cette culture se trouve en phase exponentielle de croissance ($D.O_{600\text{ nm}} = 0,2$ pour les souches C₆₀₀ et 1106), les bactéries sont centrifugées 10 minutes à 6 000 g et le culot est resuspendu dans 50 ml d'une solution Tris 10 mM pH 8,0, $CaCl_2$ 50 mM.

Après une demi-heure d'incubation sur glace, les bactéries sont sédimentées comme précédemment, le culot repris dans 2 ml du même tampon et la suspension conservée à 4° C avant utilisation.

b)- Transformation:

Environ 100 ng de plasmide sont mis à incuber pendant 5 minutes à 37° C en présence de 200 μ l de bactéries compétentes. Le choc thermique ainsi créé favorise la pénétration des plasmides à travers la paroi des bactéries dont les propriétés ont été modifiées par le traitement au $CaCl_2$. Ensuite, 200 μ l de milieu L.B liquide sont ajoutés et l'incubation se poursuit 30 minutes à 37° C. Enfin, les bactéries sont étalées sur milieu L.B gélosé complémenté avec un antibiotique. Les colonies apparaissent après 12 heures à 37° C.

6- Extraction de plasmides:

Deux protocoles différents sont mis en application selon que l'on traite de petites ou d'importantes quantités de bactéries et que l'on désire obtenir un ADN plus ou moins purifié.

a)- Mini-préparations:

L'extraction d'ADN plasmidique est, dans ce cas, réalisé par lyse alcaline (BIRNBOIM et DOLY 1979).

Trois solutions de base sont utilisées:

B.D.1 : glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8,0, lysozyme 2 mg/ml

B.D.2 : NaOH 0,1 N, SDS 1 %

B.D.3 : KCH₃ COO 3M, pH 4,8

Brièvement, on sédimente les bactéries par une centrifugation de 5 minutes à 5000 g puis on reprend le culot par 100 μ l de B.D.1 et on laisse 10 minutes à température ambiante. On ajoute 200 μ l de B.D.2 et l'on incube 5 minutes sur glace fondante. La dernière étape consiste en l'adjonction de 100 μ l de B.D.3 froid et de 500 μ l d'un mélange phénol/chloroforme (V/V). Après une centrifugation à 1600 g durant 10 minutes, on recueille la phase aqueuse qui est précipitée à l'éthanol. Le culot est repris dans 100 μ l de tampon T.E 0,1 X contenant 100 μ g de RNase A par millilitre.

b)- Maxi-préparations:

Pour obtenir de grandes quantités de plasmides très purifiés, utilisables par exemple pour le séquençage, on purifie les ADN par la technique décrite ci-après ("boiling method"; MANIATIS et coll., 1982):

Les bactéries contenues dans 200 ml de milieu L.B sont sédimentées puis reprises dans 30 ml de tampon STET. Après une incubation de 15 minutes, le lysat bactérien est porté à ébullition pendant 45 secondes puis brusquement refroidi sur la glace. Une centrifugation d'une heure à 16000 g permet l'élimination des ADN chromosomiques. Le surnageant, précipité et repris dans 2 ml de Tris 100 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, KCl 125 mM, est incubé 3 heures en présence de 100 μ l de protéinase K (1 mg/ml) et 250 μ l de sarkosyl à 10 %.. Les ADN plasmidiques sont alors soumis à une centrifugation à l'équilibre (250000 g

pendant 12 heures) en gradient de CsCl de densité moyenne 1,55 en présence de 500 μ g de BrEt par millilitre. Les bandes d'ADN, prélevées à l'aide d'une seringue sont débarrassées du BrEt par plusieurs extractions au butanol saturé en tampon T.E.N. Une dialyse de plusieurs heures contre du tampon T.E permet d'éliminer le CsCl. Enfin, les plasmides sont précipités à l'éthanol et repris dans de l'eau distillée stérile. La quantité d'ADN présente dans ces solutions se détermine d'après la mesure de la densité optique à 260 nm au spectrophotomètre.

7- Transcription inverse:

a) Synthèse du premier brin:

L'ARN viral (5 μ g), préalablement hybridé au niveau de sa séquence polyadénylée avec un excès (2 μ g) d'acide oligothymidylique (oligo(dT)) 15-mère, est transcrit en ADN par une ADN-nucléotidyltransférase-ARN-dépendante, l'AMV-RT (transcriptase inverse extraite du rétrovirus responsable de la myéloblastose aviaire).

La réaction se fait à 42° C durant une heure dans un milieu contenant 50 mM de Tris (pH 8,3 à 42° C), 10 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 12 mM de D.T.T, 1 mM de chacun des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dXTP), 40 unités d'un inhibiteur de ribonucléases (extrait du placenta humain) et 25 unités de transcriptase inverse. Le marquage radioactif est obtenu par adjonction supplémentaire de 30 Ci d' α -³²P-dCTP (110 TBq/mmmole).

b)- Synthèse du second brin:

On ajoute au milieu précédent, à volume égal, un mélange comprenant 200 μ l de chacun des quatre dXTP dans 50 mM de Tris pH 7,5, 160 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂ et 20 mM de (NH₄)₂ SO₄, 20 unités d'ADN-polymérase I d'*Escherichia coli* ainsi qu'une unité de ribonucléase H (RNase H) d'*E. coli*. Une première incubation de 60 minutes à 15° C est suivie d'une seconde de même durée à 22° C après laquelle intervient une extraction phénolique. Puis la totalité de l'échantillon subit une précipitation éthanolique.

c)- Purification par chromatographie de l'ADNc synthétisé:

Le précipité résultant de la transcription inverse est repris dans 200 μ l de tampon T.E.N (Tris 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 100 mM) puis déposé au sommet d'une colonne de Séphadex G.75 de 10 cm de hauteur équilibrée avec le même tampon. On recueille des fractions de 300 μ l dont on mesure la radioactivité par effet Cerenkov à l'aide d'un compteur à scintillation. Les premières fractions éluées montrant une radioactivité relativement importante correspondent aux

produits de transcription les plus longs. Un deuxième pic, plus important encore, contenant l'isotope radioactif regroupe les transcrits de très petites tailles et les nucléotides libres. Après regroupement, les fractions ayant incorporé de la radioactivité sont phénolées puis précipitées à l'alcool éthylique.

d)- Adjonction de queues homopolymériques aux acides nucléiques ("tailing"):

L'ADNc bicaténaire synthétisé puis purifié au cours des étapes précédentes est repris dans un faible volume d'eau stérile à laquelle on ajoute une égale quantité d'un tampon renfermant 200 mM de cacodylate de sodium pH 7,0, 4 mM de $MnCl_2$, 200 μM de D.T.T et 30 μM de dCTP. 1 unité de terminal-désoxynucléotidyl-transférase (TdT) catalyse la réaction d'incorporation des nucléotides à l'extrémité 3' des brins d'ADN. Après 1 heure à 30° C, on ajuste le milieu pour obtenir une concentration de 2 % en SDS et 20 mM en EDTA, puis on agite vigoureusement sur la glace jusqu'à l'obtention d'un précipité blanc éliminé par centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes (à 4° C). Le surnageant prélevé est précipité à l'éthanol.

e)- Hybridation insert-plasmide:

100 ng de plasmide pBR 322 ouvert au site unique *Pst* I et portant des queues homopolymériques complémentaires à celles des inserts (résidus guanidines) sont hybridés avec 25 ng d'ADNc en présence de 20 mM Tris pH 7,5, 0,3 M NaCl et 1 mM EDTA. Le mélange réactionnel est porté 10 minutes à 65° C puis 1 heure à 55° C et enfin 1 heure à 50° C. On le laisse revenir progressivement à la température ambiante puis on le précipite. Repris dans de l'eau distillée stérile, les plasmides ainsi obtenus servent à transformer la souche 1106 d'*E. coli*.

8- Clonage des hétéroduplex:

Une modification de la technique classique consiste à cloner directement l'hybride ADN-ARN dans le vecteur.

Cette molécule hybride, d'abord traitée 15 minutes à 37° C avec la RNase T2 en milieu 0,3 M NaCl, reçoit le greffage de queues homopolymériques comme précédemment décrit. Les autres étapes du clonage ne diffèrent pas de celles suivies ci-dessus.

9- Sonde oligothymidylique (oligo(dT)):

a) Préparation de la sonde (marquage à la polynucléotide-kinase T4):

50 ng (10 picomoles) d'oligo(dT) 15-mère déphosphorylés sont incubés 30 minutes à 37° C dans un milieu renfermant 50 mM de Tris pH 7,6, 10 mM de MgCl₂, 5 mM de D T T, 0,1 mM de spermidine, 0,1 mM d'EDTA, 50 picomoles d' α -³²P-ATP (150 Ci) et 10 unités de polynucléotide-kinase T4 (MANIATIS et coll., 1982). Le mélange est extrait au phénol puis au chloroforme et précipité à l'éthanol.

b)- Purification de la sonde:

Le culot renfermant l'ADN marqué repris dans du T.E est passé sur un gel de polyacrylamide à 20 % en tampon Tris- acide borique (90 mM), EDTA (2mM). Après une migration de 10 heures sous 60 volts, le gel est autoradiographié. La zone correspondant à l'oligonucléotide marqué est découpée au scalpel, mise dans un boudin de dialyse stérile puis électroéluee 2 heures sous une tension de 20 volts. Le courant est inversé 5 minutes puis on prélève le tampon. La manipulation est répétée. La sonde est nettoyée au phénol, précipitée, reprise dans du T.E et la radioactivité déterminée.

c)- Analyse des clones bactériens à l'aide de la sonde oligo(dT) marquée:

Le transfert sur filtre des clones bactériens à analyser ainsi que l'hybridation avec la sonde oligo(dT) sont réalisés suivant le protocole de GRUNSTEIN et HOGNESS (1975) à une température de 25° C.

10- Ribosondes:

a) Préparation de la ribosonde:

1 g de plasmide pGem 2 renfermant une séquence d'ADNc viral linéarisé au niveau d'un de ses sites uniques est utilisé comme matrice pour la production de ribosondes, soit par la polymérase SP6 soit par la polymérase T7.

Pour ces deux enzymes, le milieu réactionnel contient: Tris 40 mM pH 7,9, MgCl₂ 6 mM, D.T.T. 10 mM, spermidine 2 mM, chacun des trois ribonucléotides triphosphates froids 0,5 mM (rATP,rGTP, rUTP), 100 μ Ci d' ³²P rCTP (800 Ci/mmmole), 20 unités d'inhibiteur de ribonucléases et 1 unité de polymérase. Après une incubation d'une heure à 37° C, le mélange est porté 10 minutes à 65° C; une unité de désoxyribonucléase exempte de ribonucléase est ajoutée et

laissée agir 20 minutes à 37° C. Pour arrêter l'action de cette enzyme, on ajuste le milieu réactionnel à une concentration de 0,04 M en EDTA, puis on l'inactive définitivement à 65° C pendant 10 min. Après précipitation, la sonde est reprise dans de l'eau traitée au diéthyl-pyrocarbonate (D.E.P.C) puis purifiée par chromatographie sur colonne. Sa radioactivité spécifique est ensuite déterminée au compteur à scintillation liquide.

b)- Hybridation:

Le filtre subit d'abord une préhybridation d'une heure à 42° C dans une solution de SSPE 5X contenant 50 % de formamide, 0,5 % de SDS, 0,1 % de ficoll, 0,1 % de PVP, 0,1 de sérumalbumine bovine et 20 µg/ml d'ADN hétérologue; cet ADN, extrait du sperme de hareng, a été préalablement traité trois minutes aux ultrasons (60 W) et dénaturé 5 minutes à 100° C avant d'être rapidement déposé sur de la glace.

L'hybridation se déroule dans le même tampon en présence de la sonde (0,5 x 10⁶ cpm/ml de tampon) pendant 16 heures à 42° C.

11- Sondes ADN biotinylées:

a)- Marquage de l'ADN par déplacement de césure ("nick-translation"):

1 µg d'ADN est incubé pendant deux heures à 15° C en présence de 22 M de chacun des quatre dNTP dont l'un est marqué à la biotine. Le marquage interne de la molécule est réalisé avec, respectivement, 5 unités d'ADN-polymérase I et 1 pg d'ADNase I par microgramme d'ADN (RIGBY et coll., 1977). La réaction est arrêtée par 2,5 µl d'EDTA 0,1 M.

b)- Révélation:

Le filtre est préhybridé, hybridé et rincé comme précédemment (cf. paragraphe 10b). Puis il est laissé une heure à 65° C dans un tampon Tris 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM contenant 3 % de sérumalbumine bovine. Le filtre est ensuite incubé dix minutes à température ambiante dans un tampon Tris 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM et MgCl₂ 50 mM (solution A) avec 1 µg/ml de conjugué streptavidine-phosphatase alcaline.

Après rinçage, le filtre est incubé à l'obscurité dans la solution A en présence de nitrobleu de tétrazolium (N.B.T) et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (B.C.I.P) aux concentrations respectives de 330 µg/ml et 165 µg/ml. Lorsque l'intensité de coloration est jugée convenable, on arrête la réaction avec un tampon Tris 20 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM.

12- Fixation d'ARN sur membrane:

Pour les expériences d'hybridation, nous avons principalement utilisé des membranes de nylon plus solides que celles en nitrocellulose et donc aisément manipulables.

a)-Dépôts directs:

Les ARN sont préalablement incubés 15 minutes à 65° C en tampon SSPE 5X en présence de 10 % de formaldéhyde. Après dépôt de l'acide nucléique, le filtre séché est placé 5 minutes sous les U.V. pour assurer la fixation covalente des molécules d'ARN.

Pour l'analyse rapide des échantillons biologiques, une technique d'écrasement direct ("squash-blot") a également été utilisée (CZOSNEK et NAVOT, 1988). Les chenilles à tester sont directement écrasées, à l'aide d'une tige de verre, sur une membrane de nylon préalablement saturée avec du SDS et de la protéinase K.

Après fixation aux U.V., la membrane est incubée 5 minutes à température ambiante dans la soude 0,5 M puis neutralisée et rincée avec du tampon d'hybridation.

b)- Transfert par capillarité:

Le transfert d'ARN à partir du gel d'électrophorèse (réalisée en conditions dénaturantes), s'effectue par flux transversal suivant le protocole donné par THOMAS (1980).

CHAPITRE III : PROPRIETES DU VIRION ET DE SES CONSTITUANTS

I- ASPECTS BIOLOGIQUES DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE *LATOIA VIRIDISSIMA*:

A- SYMPTOMES ASSOCIES A LA VIROSE:

Les infections expérimentales réalisées en cages, recoupées avec des observations de terrain, permettent de décrire les différentes étapes de la virose chez *Latoia viridissima*.

Les symptômes associés à la maladie consistent, dans un premier temps, en une réduction puis un arrêt de la prise de nourriture. Parallèlement, le comportement des larves change, leur déplacement devenant erratique. Lorsqu'il y a atteinte des jeunes stades (avant la quatrième mue larvaire), les chenilles, habituellement grégaires et regroupées en colonies, quittent leurs congénères et se dispersent rapidement (ce qui favorise, certainement, la dissémination du virus).

Au fur et à mesure du développement de la maladie, on assiste à un brunissement progressif des différentes parties de l'insecte atteint, accompagné d'une diminution de la vitesse des mouvements. A un stade un peu plus avancé, les individus commencent à devenir flasques en même temps qu'ils se mettent à perdre, de façon continue ou presque, des quantités importantes d'un liquide noirâtre d'origine intestinale. La mort survient rapidement accompagnée d'un noircissement des tissus en partie liquéfiés.

B- MORTALITE PROVOQUEE PAR LA VIROSE:

Des chenilles du dernier stade larvaire, maintenues en cages par groupes d'une centaine, sont infectées expérimentalement en badigeonnant leur nourriture à l'aide d'une suspension virale. La mortalité contrôlée chaque jour est rapportée sur les figures n°12a et n°12b. Cette mortalité apparaît très rapide puisqu'au deuxième jour après l'infection il reste moins de la moitié des individus. Après six jours, trente chenilles sont entrées en nymphose et toutes les autres, soit 554, sont mortes.

Nombre de chenilles mortes

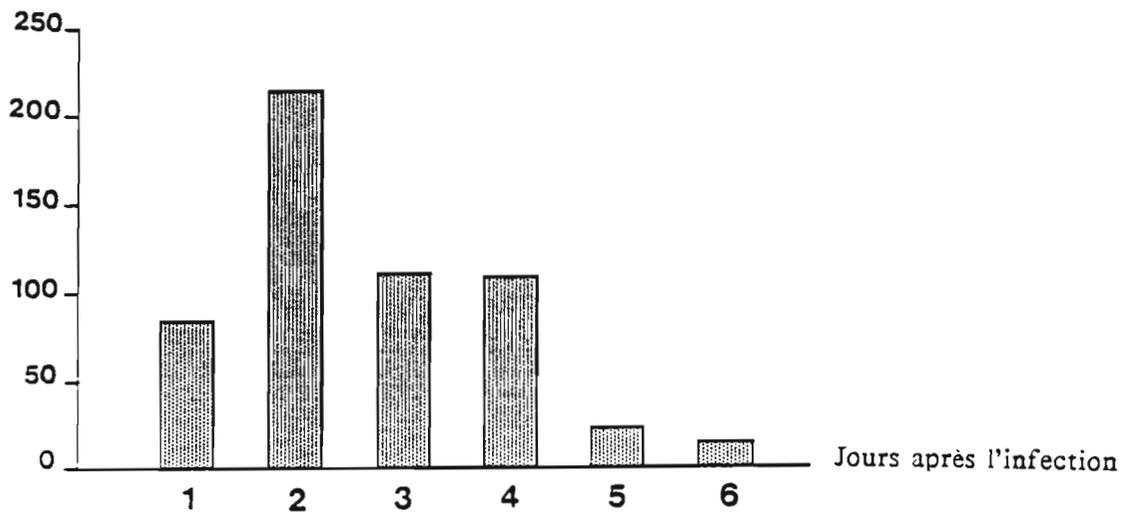


Figure n°12a: nombre de chenilles mortes de *L. viridissima* lors des infections expérimentales.

Mortalité cumulée (en %)

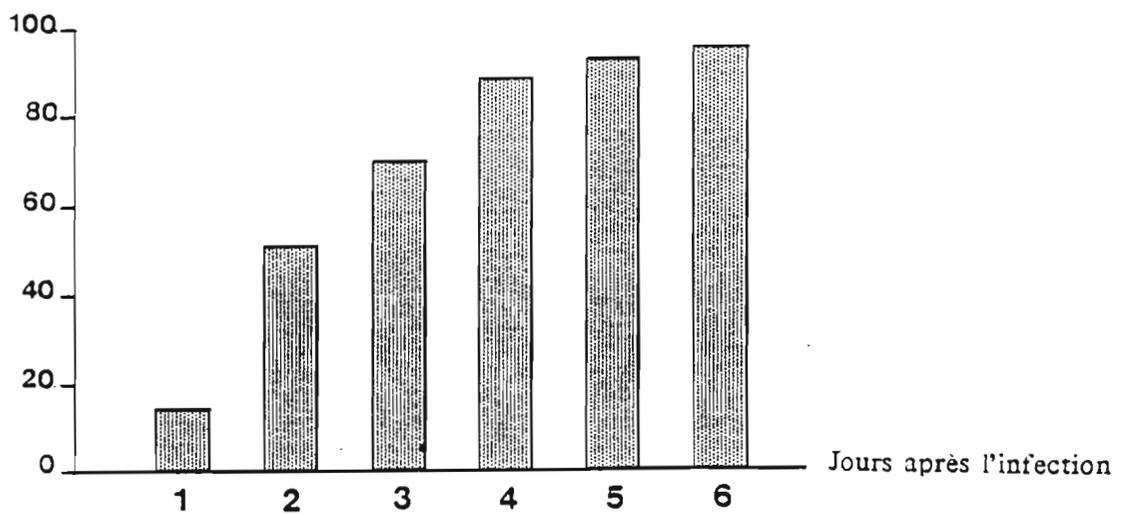


Figure n°12b: mortalité cumulée des chenilles de *L. viridissima* lors de ces mêmes infections (en %).

C- ESSAIS DE MULTIPLICATION DU VIRUS SUR D'AUTRES HOTES ET EN CULTURES CELLULAIRES:

L'impossibilité d'élever l'hôte d'origine en métropole nous a conduit à tenter de multiplier le virus sur des hôtes de remplacement ou en cultures cellulaires afin de s'assurer d'une source d'approvisionnement permanente. D'autre part, même en Côte-d'Ivoire, l'état sanitaire des populations naturelles de *Latoia viridissima* rend pour l'instant impossible toute étude rigoureuse des interactions entre le virus et son hôte naturel. Il paraît donc essentiel de disposer également d'hôtes de substitution afin de préciser certains aspects biologiques de l'infection par le virus de *Latoia viridissima*, virus que nous avons dénommé LvV.

1- Essais de multiplication du virus LvV sur insectes:

Des suspensions virales dont la pureté et la concentration ont été contrôlées sont injectées par la méthode de L'HERITIER (1957) à des lots de 40 individus des quatre espèces d'insectes suivantes: *Spodoptera littoralis* (Noctuidae), *Galleria mellonella* (Pyralidae), *Sesamia calamistis* (Noctuidae) et *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae).

Ces espèces ont été choisies en raison du grand nombre de virus différents qu'elles sont capables de multiplier dans les élevages en laboratoire. De plus, chez chacune a déjà été isolé au moins un petit virus à ARN.

Malgré cinq passages successifs, aucune multiplication de LvV n'a été observée chez ces hôtes.

2- Essais de multiplication du virus LvV en cultures cellulaires:

Plusieurs essais de multiplication du virus sur des lignées de *Lymantria dispar* (Lymantriidae) et de *Galleria melonella* ont échoué.

Par contre, l'infection d'une lignée cellulaire de *Mamestra brassicae* (Noctuidae) se traduit par un arrêt de la multiplication cellulaire. Des phénomènes de fusion entre cellules s'observent et une coloration à l'acridine orange met en évidence l'existence d'importantes synthèses d'ARN au niveau cytoplasmique. Cependant, ces phénomènes, qui ne se produisent pas chez des témoins non infectés, ne semblent pas s'accompagner d'une production virale. L'apparition de telles modifications cellulaires en l'absence de cycle viral complet a déjà été observée chez d'autres virus (QUIOT, communication personnelle).

D- DISCUSSION:

Au niveau des populations naturelles du ravageur, il convient de rappeler la mortalité considérable provoquée par cet agent pathogène qui, bien souvent, permet d'éviter un traitement chimique (MARIAU et coll. 1981). Si diverses études menées conjointement par l'IRHO et l'ORSTOM ont maintenant bien établi l'efficacité de la maladie, ses modalités de déclenchement restent obscures.

La présence endémique du virus dans les populations naturelles (cf. Chapitre V) est selon toute vraisemblance responsable des fortes mortalités observées précocément dans les essais d'infections expérimentales. En effet, les 50 % de mortalité observés en deux jours chez des larves du dernier stade ne peuvent être attribués à la seule infection expérimentale de larves saines mais résultent plus vraisemblablement de la généralisation d'une infection préexistante.

L'impossibilité d'amplifier le virus sur un hôte de laboratoire ou en cultures cellulaires a eu pour conséquence de limiter les quantités de matériel disponible à ce qui provenait de Côte-d'Ivoire. En raison du niveau relativement faible de ces stocks et de la fragilité du virus, la poursuite du travail s'en est trouvée compliquée et certaines études, nécessitant la présence d'un hôte, n'ont pu être réalisées.

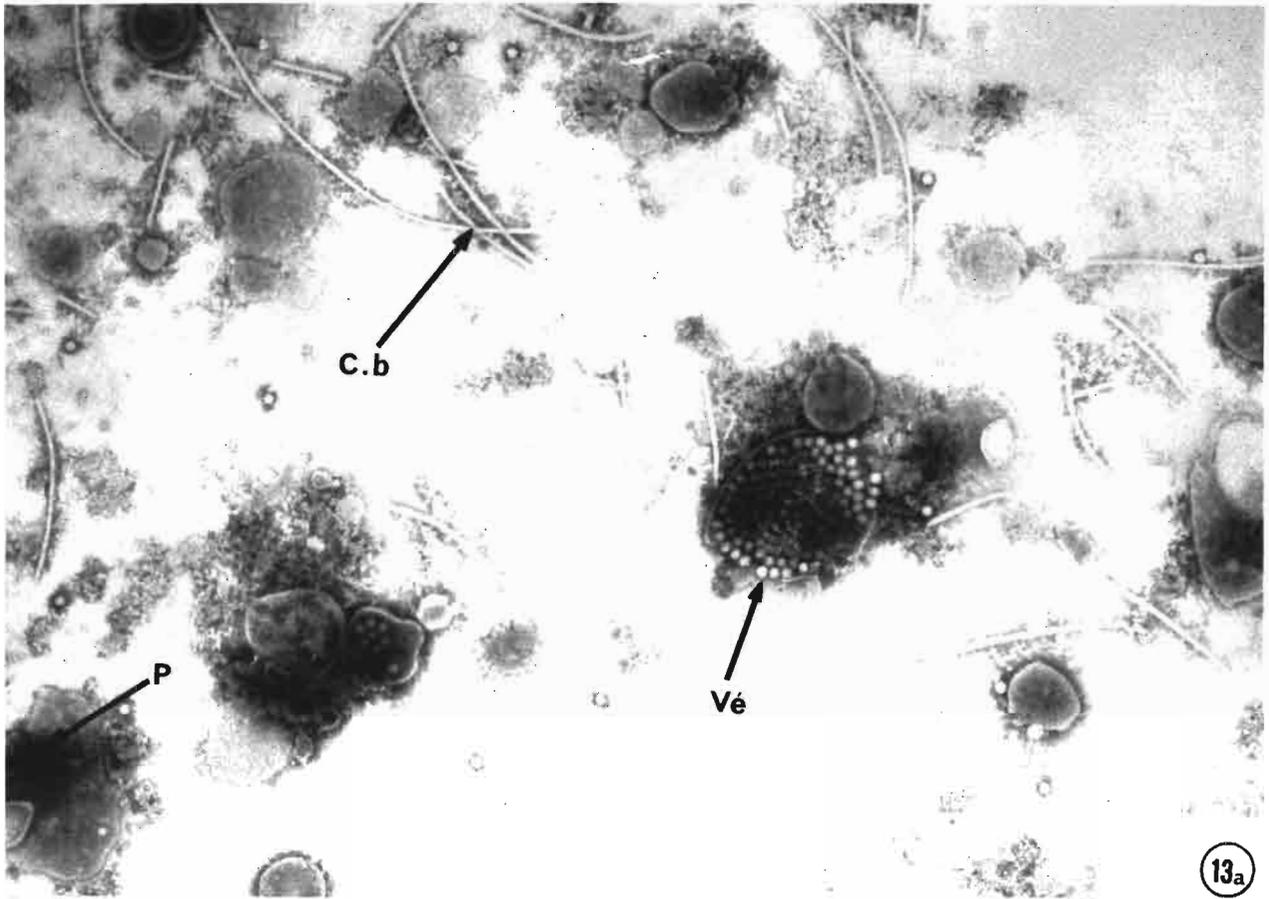
II- CARACTERISATION DU VIRUS:

A- PURIFICATION DU VIRUS:

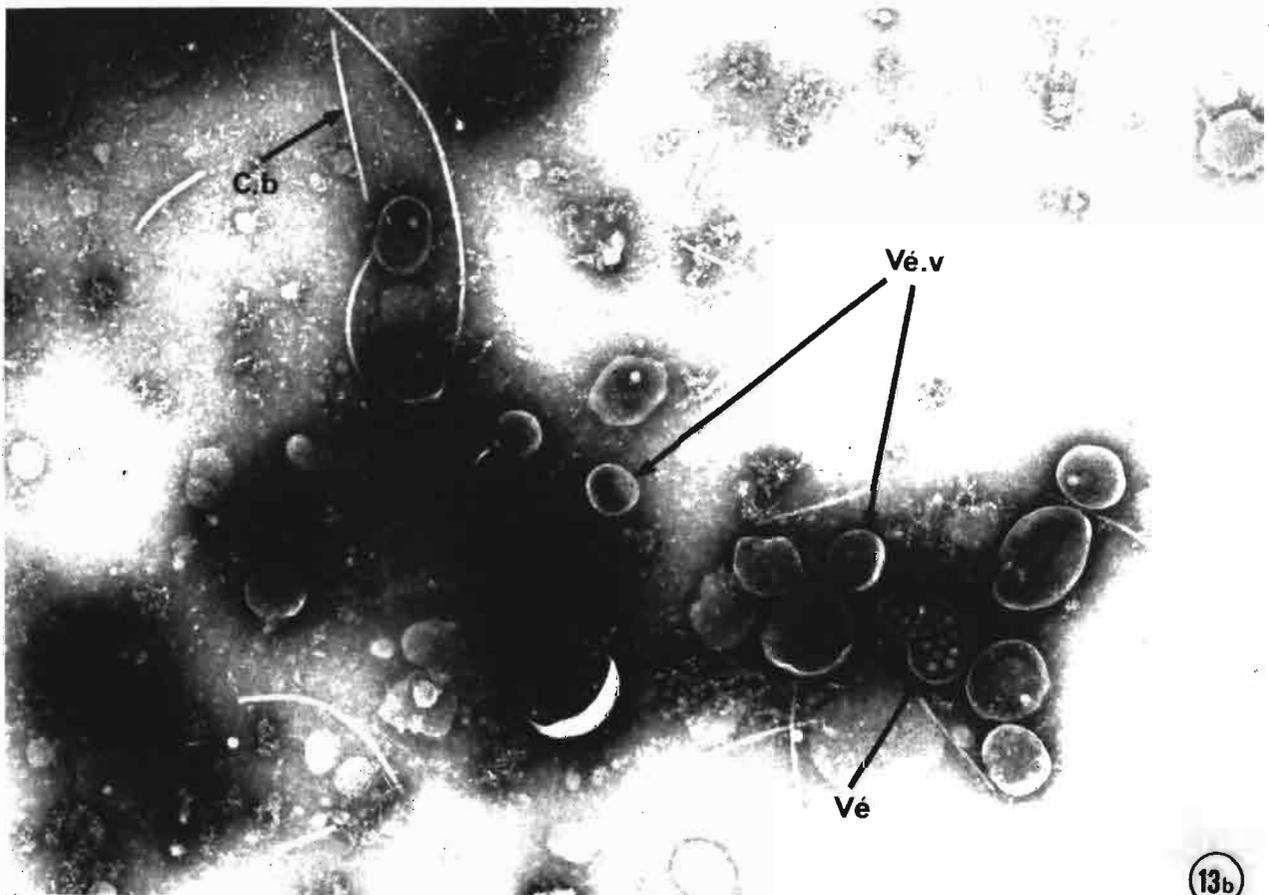
Des chenilles de *Latoia viridissima* virosées sont traitées suivant le protocole décrit dans "Matériels et Méthodes". Lors de l'ultime étape de purification du virus par centrifugation à l'équilibre en gradient de chlorure de césium, les particules virales se retrouvent sous forme d'une fine bande horizontale dans le tiers inférieur des gradients.

Les observations en microscopie électronique du matériel contenu dans cette bande permettent de contrôler la qualité de la suspension virale. Des différences sensibles apparaissent entre les préparations de chenilles récoltées sur le terrain et celles provenant d'infections expérimentales réalisées en cages.

Les chenilles virosées récoltées en plantation sont, le plus fréquemment, envahies par des bactéries. Lors de la purification, les cils bactériens piègent une quantité appréciable de virus (cf. figures n°13a et n°13b) que l'on ne peut séparer du contaminant ni par gradient à l'équilibre ni par centrifugation de zone. Une contamination tout aussi difficile à éliminer est celle représentée par plusieurs types de bactériophages associés aux bactéries présentes. Etant donnée la grande



13a



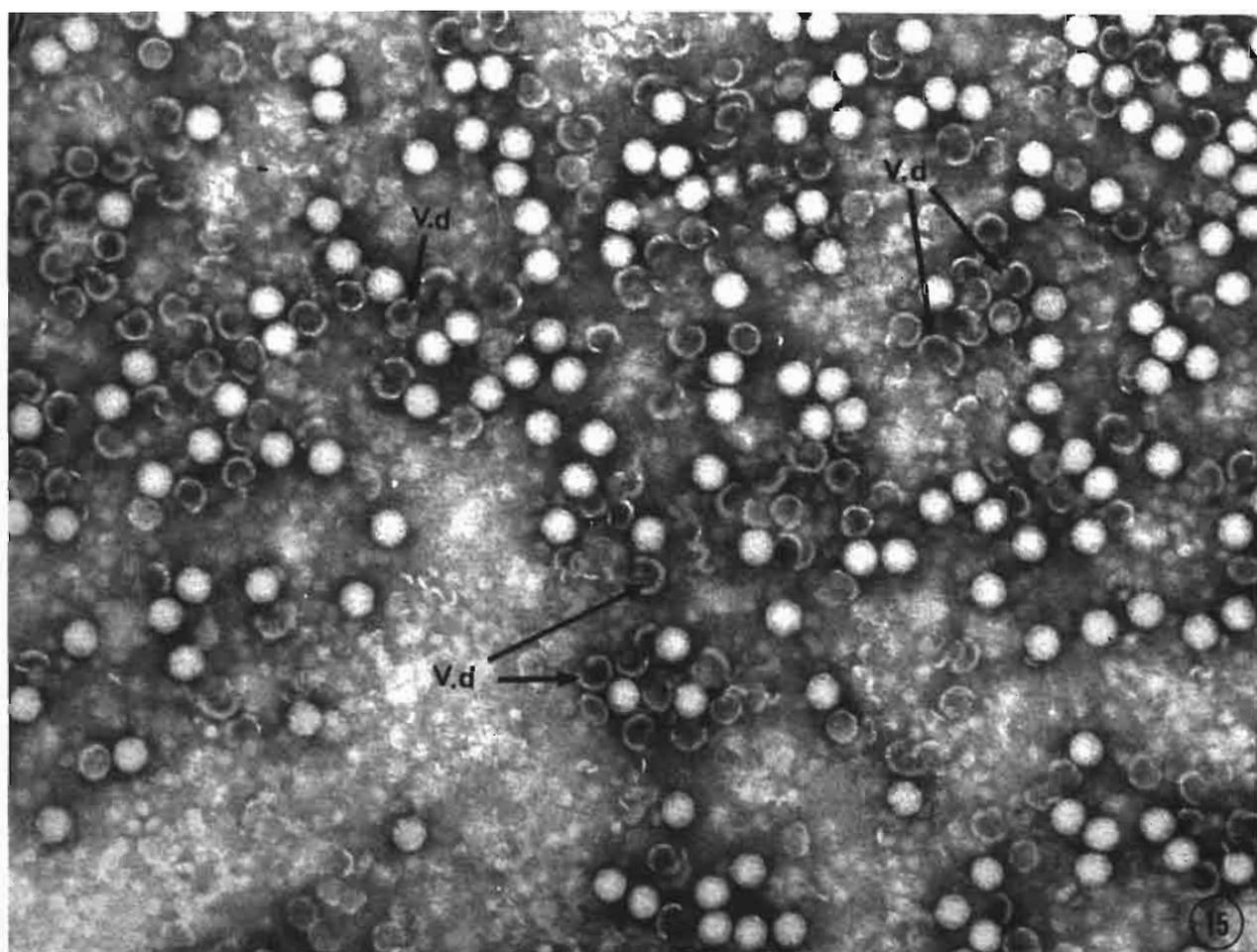
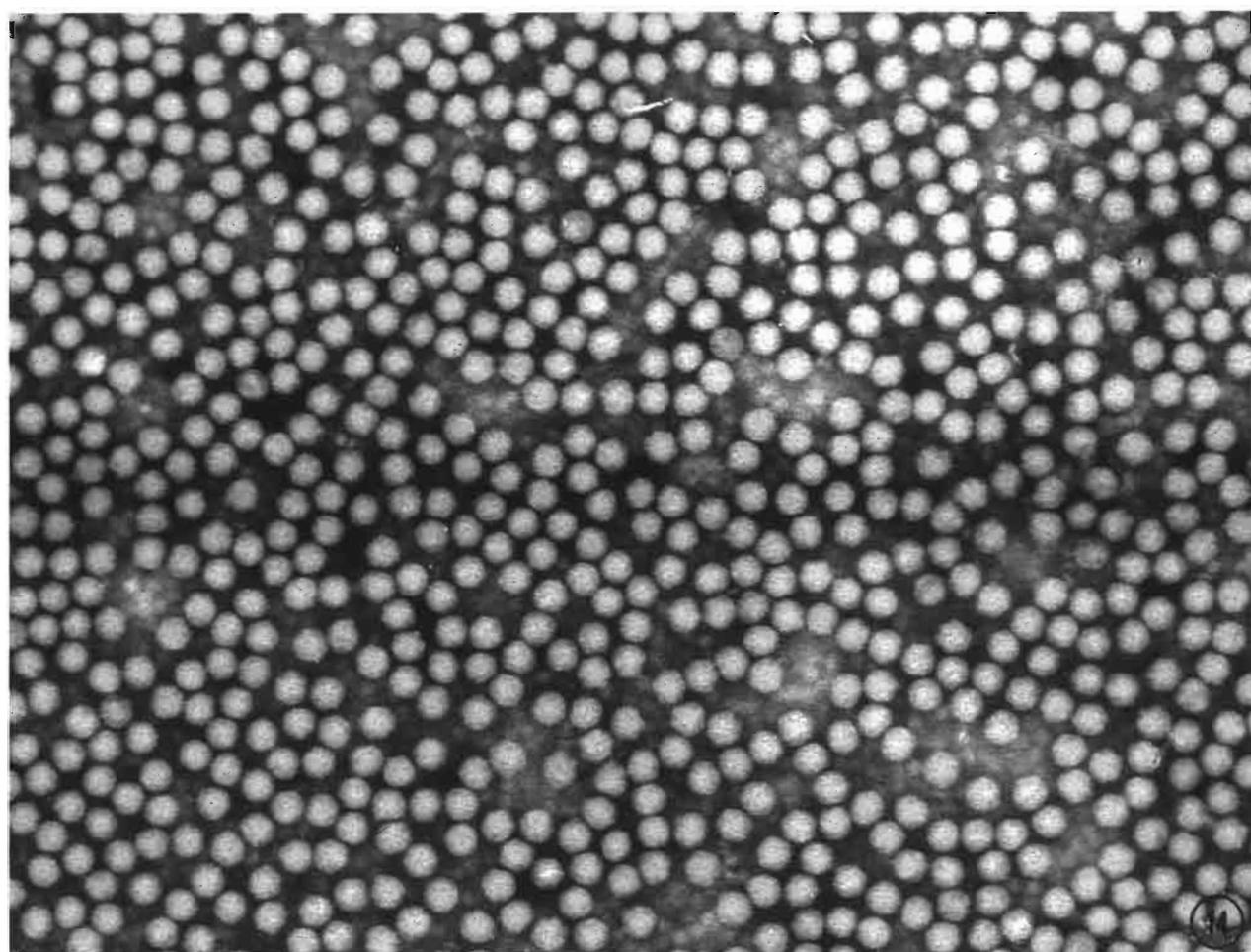
13b

fragilité du virus et sa faible quantité disponible, il n'a pas été possible d'obtenir un plus haut degré de pureté à partir de ces larves. Ce matériel viral a principalement servi aux infections expérimentales.

La purification de virus à partir de larves infectées expérimentalement au Laboratoire d'Entomovirologie d'Adiopodoumé et ramassées très peu de temps après leur mort, conduit à des préparations dont le degré de pureté du virus est bien supérieur (cf. figure n°14). Ces suspensions ont permis de déterminer certaines caractéristiques physico-chimiques du virus et c'est aussi à partir de ce type de préparations, qu'après extraction phénolique de l'ARN, nous avons réalisé la transcription inverse.

Quel que soit le matériel de départ, la purification s'est heurtée à de grandes difficultés du fait de la fragilité importante des particules virales. En effet, celles-ci se sont avérées résister très mal à la congélation-décongélation ce qui a conduit à des pertes importantes en matériel biologique. Pourtant, pour la plupart des virus, le mode préférentiel de conservation et de transport fait intervenir la congélation qui prévient les multiplications bactériennes et assure l'intégrité vis-à-vis de certaines molécules présentes chez l'hôte (protéases...). Dans le cas du virus étudié, un cycle de congélation-décongélation réduit considérablement la quantité de matériel récupérable et il n'y a pratiquement plus de particules virales intactes après deux cycles (cf. figure n°15). De plus, les virions paraissent en meilleur état lorsque l'extraction à partir des tissus de l'hôte est réalisée au froid et en présence d'inhibiteurs de protéases (enzymes qui sont abondantes dans le tube digestif de certains insectes). Enfin, on a constaté que les changements de pression osmotique (à la sortie des gradients par exemple) et les centrifugations avec sédimentation sont responsables de la dégradation d'une fraction non négligeable du matériel. Ce sont pourtant des étapes classiquement rencontrées lors de la purification de petits virus.

Lorsque la purification du virus est réalisée à l'aide de polyéthylène-glycol (cf. "Matériels et Méthodes") à partir de chenilles n'ayant jamais subi de congélation, la majorité des virions se retrouvent à l'intérieur de vésicules (cf. figure n°13). Beaucoup de vésicules se sont vidées de leur contenu en cours de manipulation (cf. figure n°13) mais celles qui sont intactes renferment parfois plusieurs dizaines de virions. Leur taille, difficile à déterminer car elles ne forment pas de structures régulières, varie entre 100 nm et 1 μ m, parfois plus; cependant, les plus grosses étant probablement les plus fragiles, elles éclatent peut-être rapidement après (ou avant) le broyage des chenilles et ne s'observent donc que rarement pleines. Le nombre considérable de vésicules visibles en microscopie électronique dans les conditions favorables témoigne de la quantité importante de virus produite au cours de l'infection. La présence du virus de *Latoia viridissima* à l'intérieur de vésicules correspond à l'une des phases ultimes de la morphogénèse des particules; pour l'instant, nous ne possédons pas de données sur les phases plus précoces. Cependant, il faut rappeler que chez des petits ribovirus à multiplication cytoplasmique appartenant à divers groupes, les virions



apparaissent, eux aussi, confinés dans des vésicules lors des derniers stades de la morphogénèse (BIENZ et coll., 1980. HESS et coll., 1978. CHAO et coll., 1985).

B- TAILLE DES PARTICULES VIRALES:

La taille du virus a été déterminée après mesure sur photographie prise au microscope électronique de suspensions virales concentrées contrastées à l'acide phosphotungstique par comparaison à la maille d'un réseau cristallin de catalase de 8,75 nm mesuré au même grandissement.

La précision des mesures a été affinée en prenant en compte une dizaine de particules en contact les unes avec les autres sur une même ligne droite et en divisant la longueur de l'ensemble par le nombre de particules.

La moyenne de plusieurs mesures donne un diamètre de $29,8 \pm 1,4$ nm pour le virus de *Latoia viridissima*.

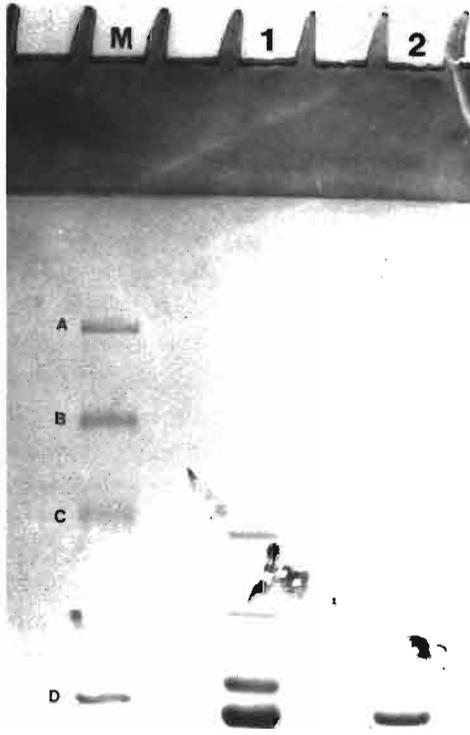
C- DENSITE DU VIRUS:

La densité du ribovirus de *Latoia viridissima* a été déterminée après centrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité préformé de chlorure de césium (15 % à 45 % poids/poids).

L'indice de réfraction des fractions contenant le virus a été mesuré à 25° C au réfractomètre d'Abbe. Trois expériences différentes ont donné les valeurs suivantes: $n_1 = 1,3668$, $n_2 = 1,366$, $n_3 = 1,3668$, ce qui, par comparaison aux tables de correspondances, permet d'attribuer au virus la densité de 1,345. Ce résultat précise quelque peu celui de FEDIERE (1983) rapportant une valeur de 1,34. En parallèle, un échantillon de CrPV servait de témoin. Pour ce dernier, la densité déduite de nos mesures (1,34) est en accord avec les données de la littérature (LONGWORTH, 1978).

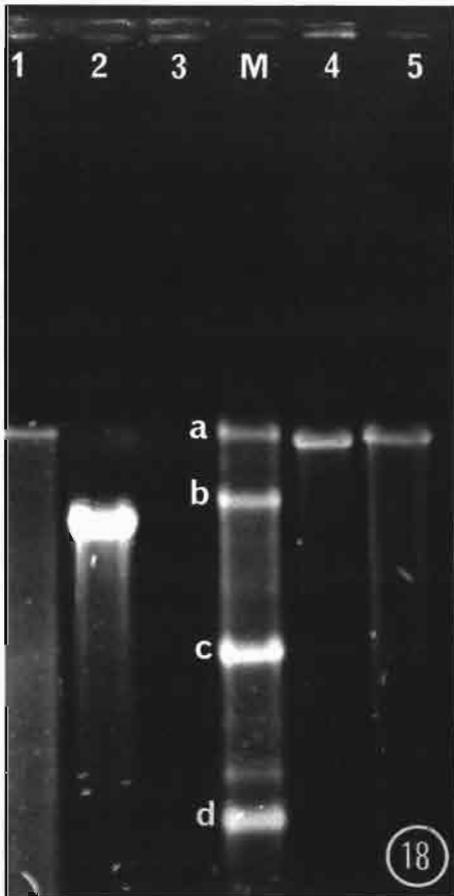
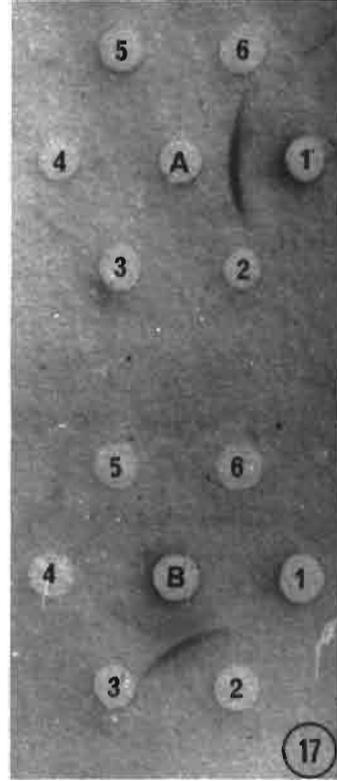
D- COMPOSITION POLYPEPTIDIQUE:

Les électrophorèses ont été réalisées en conditions dénaturantes suivant le protocole défini par LAEMMLI (1972). Les gels d'électrophorèse en polyacrylamide révèlent la présence de deux protéines majeures, la plus abondante ayant un poids moléculaire d'environ 29 kd et l'autre d'environ 31 kd (cf figure n°16). Avec des charges importantes en matériel, deux bandes mineures

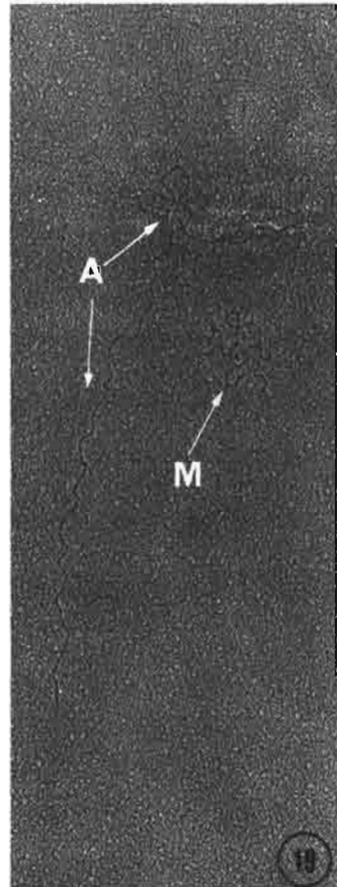


E

16



18



apparaissent, respectivement de 49 et 41 kd (cf. figure n°16, piste 3).

E- ETUDE SEROLOGIQUE DU VIRUS LvV:

On a recherché par la technique d'immuno-diffusion en gel d'agarose s'il existait des parentés antigéniques entre le virus de *Latoia viridissima* et d'autres virus d'insectes appartenant aux Picornaviridae, c'est-à-dire CrPV et DCV (cf. figure n°17). Le sérum anti-LvV ne croise ni avec CrPV ni avec DCV. De la même façon, des anticorps dirigés contre CrPV ne réagissent pas avec les virions provenant de *Latoia viridissima*. Il n'existe pas non plus de réaction croisée entre LvV et deux autres virus, de type picornavirus, isolés très récemment de *Galleria mellonella* et dénommés pour l'instant PgLmV et PgScV (VEYRUNES, communication personnelle; ZEDDAM, résultats non publiés).

F- CARACTERISATION DU GENOME VIRAL:

1- Nature et taille du génome:

Les réactions à l'orcinol et à la diphenylamine ont indiqué chez le virus de *Latoia viridissima* la présence d'ARN et l'absence d'ADN.

a)- Analyse électrophorétique de l'ARN:

La taille de l'ARN viral a été déterminée par électrophorèse en conditions dénaturantes en présence de 5 mM d'hydroxyméthylmercure (cf. figure n°18).

Les profils électrophorétiques montrent la présence d'une seule bande (cf figure n°18, piste 4). Une incubation en présence des nucléases A et T1, qui hydrolysent les régions monocaténares, fait disparaître la bande précédemment observée (cf. figure n° 18, piste 3).

Une échelle de poids moléculaire d'ARN fiable (cf. figure n°18, piste M) permet d'estimer à 9,3 kb la taille du génome viral isolé de *Latoia viridissima*. L'ARN de DCV (cf. figure n° 18, piste 1) et l'ARN de CrPV (même figure, piste 5) montrent des tailles proches de celle de l'ARN de LvV. L'ARN polioviral de la souche Sabin (7,3 kb;cf. figure n° 18, piste 2) sert de contrôle et met en évidence la différence de poids moléculaire avec les deux génomes entomoviraux.

b)- Etalement d'ARN viral:

L'observation en microscopie électronique de l'ARN extrait du virus de *Latoia viridissima* confirme les résultats obtenus par la technique précédente. La taille de la majorité des molécules semble homogène. Un témoin interne, l'ADN de la forme répliquative du phage ØX 174 (ADN circulaire de 5386 paires de bases), permet par comparaison des longueurs des molécules, d'attribuer à l'ARN viral une taille de 9,5 kb (cf. figure n°19).

2- Recherche d'une séquence polyadénylée au sein des molécules d'ARN viral:

Chez plusieurs virus à ARN, la présence d'une séquence polyadénylée située à l'extrémité 3' du génome viral permet d'employer un acide oligothymidylique comme amorce dans la réaction de transcription inverse. Dans la perspective d'obtenir un ADNc du génome du virus LvV, nous avons donc recherché s'il existait une telle séquence polyadénylée dans ce génome en réalisant un fractionnement sur colonne de cellulose-oligo(dT).

En raison des faibles quantités de matériel disponibles, il a fallu recourir à un marquage radioactif des molécules d'ARN viral pour les localiser au sein des différentes fractions d'élution. Nous avons marqué de manière uniforme les molécules en 3', l'extrémité 5' pouvant être bloquée par un petit peptide comme c'est le cas chez nombre de petits ribovirus, en particulier les Picornaviridae.

Après passage sur colonne de cellulose-oligo(dT), la radioactivité retenue correspond à environ 65 % de la radioactivité déposée sur colonne. Ce résultat apporte l'évidence qu'au moins la majorité, sinon la totalité, des ARN de LvV portent une séquence polyadénylée. Les 35 % de molécules marquées non retenues correspondent probablement à des molécules dégradées ayant perdu leur extrémité 3'. La transcription inverse de l'ARN viral de LvV peut donc se réaliser en utilisant comme amorce un acide oligothymidylique de synthèse.

III- DISCUSSION:

A- PROPRIETES DU VIRION:

1- Taille et densité:

Les valeurs obtenues pour la densité du virus de *Latoia viridissima* sont sensiblement identiques à celles rapportées pour le CrPV et le DCV

(LONGWORTH, 1978; PLUS et coll., 1978).

1,34 représente aussi la densité des Picornaviridae appartenant aux genres Entérovirus et Cardiovirus; les membres des autres genres faisant partie de cette famille étant plus denses (entre 1,39 et 1,42).

Parallèlement, la taille des particules virales de LvV, environ 30 nm de diamètre, correspond aussi à celle trouvée pour les Picornaviridae de vertébrés et d'insectes (MOORE, 1985).

2- Composition polypeptidique:

Dans son étude, FEDIERE (1983) signalait la présence de cinq polypeptides différents auxquels il attribuait les poids moléculaires suivants: 51 kd, 44 kd et 39 kd pour les moins abondants et 31 kd et 30 kd pour les deux principaux.

Nous n'avons pas retrouvé, lors de nos électrophorèses, la bande correspondant à 44 kd, et les deux autres bandes mineures n'apparaissent qu'avec des charges en matériel très importantes.

Si les deux polypeptides proches de 30 kd représentent sans aucun doute des constituants structuraux, il n'est pas, pour l'instant, possible de déterminer le rôle des autres protéines.

Deux principales conclusions peuvent être tirées des électrophorégrammes; d'abord, les proportions entre les différentes protéines ne sont pas équimolaires ce qui différencie LvV des Picornaviridae de vertébrés et d'invertébrés (RUECKERT, 1985); ensuite, le nombre de ces protéines et le poids moléculaire de certaines d'entre elles sont plus élevés que ce que l'on observe chez les Picornaviridae.

Cependant, une analyse électrophorétique des protéines de petits ribovirus d'insectes est parfois difficile; Ainsi, chez CrPV et chez DCV, trois composants polypeptidiques apparaissent lorsque l'électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide à 12 % alors que seulement deux composants se révèlent lorsque le gel n'est que de 7,5 % (PLUS et coll., 1978). D'autres auteurs (SCOTTI et coll., 1981) rapportent, chez ces deux virus, la présence des quatre polypeptides classiquement répertoriés chez les Picornaviridae ainsi que la présence d'une cinquième bande, mineure, correspondant à 1 AB non clivée.

Les petites différences relevées par rapport aux données de FEDIERE (1983) pour les poids moléculaires proviennent probablement du fait que les techniques employées sont légèrement différentes. L'absence d'une des protéines peu abondantes peut résulter de la dégradation des particules du fait de leur fragilité. Cependant, il reste à déterminer la validité de cette composition polypeptidique

dans le sens où cinq protéines ayant ces tailles ne sont habituellement pas répertoriées chez les petits virus à ARN d'invertébrés. La possibilité d'une contamination par des composants extra-viraux ou la présence de précurseurs non clivés, comme on l'observe parfois chez les Picornaviridae (RUECKERT 1985), ne peut être exclue.

B- PROPRIETES DE L'ARN VIRAL:

1- Taille du génome viral:

Les valeurs de 9,3 kb environ, trouvées pour la taille des génomes de CrPV, DCV et LvV, sont sensiblement supérieures à celles observées chez les picornavirus de vertébrés (environ 20 % par rapport aux Entérovirus).

En 1983, FEDIERE avait attribué, suite à des électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence d'urée, une valeur de $2,9 \times 10^6$ d soit 8,8 kb pour l'ARN de LvV. Les molécules lui ayant à l'époque servi de marqueurs étaient, outre les ARN ribosomiaux 28 S et 18 S, l'ARN de CrPV et celui de DCV. Pour le cas étudié, les ARN ribosomiaux ne représentent pas des marqueurs adéquats parce que leur taille est trop éloignée de celle du génome viral analysé. Par ailleurs, les longueurs des génomes de CrPV et DCV servant également de références ne constituent pas des marqueurs sûrs puisque les estimations sur leur poids moléculaire varient, suivant les auteurs, entre 2,6 et 3 millions de daltons (SCOTTI et coll., 1981). L'incertitude tient essentiellement à ce que les déterminations ont souvent été réalisées en étudiant les vitesses de sédimentation très dépendantes des structures secondaires des molécules analysées. En 1981, SCOTTI et coll. rappellent l'incertitude qui existe encore sur la taille de l'ARN de CrPV pourtant connu depuis de nombreuses années. Ainsi, en 1977, JOUSSET et coll. publient, pour cet ARN, un poids de 3 millions de daltons (environ 9,1 kb) que certains estiment trop haut parce que bien supérieur à ce qui existe chez les Entérovirus de vertébrés. En 1980, EATON et STEACIE, après analyse électrophorétique de l'ARN annoncent une valeur de 8,5 kb. De son côté, REINGANUM (données non publiées), en appliquant l'équation de SVEDBERG et PEDERSON à la constante de sédimentation de l'ARN viral, lui attribue un poids moléculaire d'environ 7,8 kb. Finalement, SCOTTI et coll. (1981) concluent en la nécessité de réaliser des électrophorèses précises en conditions dénaturantes. Il ne semble pas qu'un tel travail ait été publié depuis. Aussi il est intéressant de souligner que nous avons trouvé pour l'ARN de CrPV une taille proche de 9,5 kb dans des conditions totalement dénaturantes et par comparaison à des ARN marqueurs dont les poids moléculaires sont connus avec précision.

Depuis quelques années, suite, peut-être, au meilleur contrôle des facteurs intervenant dans les électrophorèses, il y a un accroissement des tailles génomiques rapportées pour les virus pouvant éventuellement se rattacher aux

Picornaviridae d'insectes. Ainsi, pour prendre deux exemples récents et bien étudiés, le virus de la mouche du fruit du Queensland atteint 9,5 kb (BASHIRUDDIN et coll., 1988) et celui de la punaise *Triatoma infestans* presque 10 kb (MUSCIO et coll., 1988).

En conclusion, quelle que soit la finesse de ces déterminations, il faut admettre la différence très nette avec ce qui s'observe chez les Picornaviridae de vertébrés. Tant nos résultats que les données de la littérature, indiquent que la majorité de ces ribovirus approchent ou dépassent 9,5 kb.

Dans le cas de LvV, il est possible que la taille importante du génome par rapport aux Picornaviridae de vertébrés soit principalement liée à la présence de protéines de hauts poids moléculaires. En effet, si l'on reprend les données de FEDIERE (1983), l'analyse électrophorétique de LvV montre la présence de cinq polypeptides représentant, au total, presque 200 kd. Sur l'ARN cela correspond à une mobilisation d'environ 5 000 nucléotides nettement supérieure au 2 500 nucléotides codant, chez les Entérovirus, pour les protéines de structure (WIMMER et coll., 1987). Si l'on admet que peu de variations de taille interviennent au niveau des protéines non structurales, cette seule donnée pourrait expliquer la différence de taille observée entre le génome du poliovirus par exemple et celui de LvV.

En considérant que le diamètre du virion est de 29,8 nm, sa densité de 1,345, et la taille de son génome de 9,3 kb, le calcul donne, pour la teneur en ARN de la particule, une valeur très voisine de celle de 30 % rapportée pour les virus CrPV et DCV (MOORE, 1985; JOUSSET et coll., 1977).

2- Séquence polyadénylée de l'ARN viral:

Pour plusieurs virus d'insectes proches des Picornaviridae, la présence d'une séquence polyadénylée (polyA) est maintenant connue. En particulier, EATON et STEACIE (1980) ont démontré chez le CrPV l'existence d'un polyA de 20 à 70 nucléotides de long. Il a été établi que, chez les Picornaviridae, le polyA situé à l'extrémité 3' terminale du génome est codée génétiquement (SPECTOR et BALTIMORE, 1975). Par contre, chez les Nodaviridae et les virus de type Nudaurelia β , il n'y a pas de polyA (MOORE et coll., 1985).

Le fractionnement de l'ARN de LvV sur colonne de cellulose-oligo(dT) a prouvé qu'il comporte une séquence polyadénylée. Bien que non localisée, il existe cependant de fortes probabilités pour qu'à l'instar de ce que l'on observe chez les ARN viraux possédant cette séquence, le polyA se trouve à l'extrémité 3' du génome ce qui lui conférerait alors l'apparence structurale d'un ARN messager d'eucaryote.

C- PROPRIETES SEROLOGIQUES:

Bien que fragmentaires, les résultats des comparaisons sérologiques amènent à conclure que LvV est sérologiquement distinct de CrPV et DCV.

Un certain nombre de petits virus récemment décrits et supposés appartenir au groupe des Picornaviridae d'insectes ne présentent pas, eux non plus, de communautés antigéniques avec CrPV et DCV (BASHIRUDDIN et coll., 1988). *A contrario*, bien que CrPV et DCV, considérés tous les deux comme membres des Picornaviridae, soient sérologiquement apparentés, ils ne présentent aucune homologie de séquence détectable (KING et coll., 1984) alors que nous avons mis en évidence de telles homologies entre les génomes de LvV et CrPV (cf. Chapitre V).

Ces résultats illustrent sans doute la très grande facilité d'adaptation de ces petits ribovirus (GOLDBACH et WELLINCK, 1988). C'est pourquoi seule une étude sérologique poussée devrait permettre de conclure à la présence ou à l'absence d'antigène(s) commun(s) à ce groupe.

D- CONCLUSION:

L'ensemble des données que nous possédons actuellement sur les propriétés biophysiques du virus LvV et de ses constituants ne nous permet pas de conclure de manière définitive à l'appartenance de ce virus au groupe des Picornaviridae d'insectes. Toutefois, certaines propriétés de son génome telles sa taille, la présence d'une séquence polyadénylée et, comme on le verra plus loin, certaines homologies de séquences avec le génome de CrPV sont en faveur d'une telle conclusion.

CHAPITRE IV: MISE AU POINT D'UN DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE PAR TEST ELISA ET APPLICATION A UNE ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE.

I- LE TEST ELISA DANS LE DIAGNOSTIC DES VIROSES D'INSECTES:

La technique immunoenzymatique pour la détection des antigènes ou ELISA est décrite pour la première fois en 1971 (ENGVALL et PEARLMAN, 1971; VAN WEEMEN et SCHUURS, 1971). D'abord appliquée dans le domaine médical puis vétérinaire, cette technique s'est progressivement répandue pour le diagnostic des maladies virales de plantes remplaçant la plupart des techniques sérologiques précédentes (ZREIN, 1986).

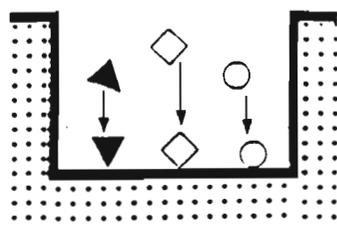
Dans le cadre de la lutte à base de baculovirus, il est rapidement apparu la nécessité d'un suivi épidémiologique des populations d'insectes traitées par des virus à l'aide d'une technique rapide, fiable et peu coûteuse pouvant s'appliquer simultanément à un grand nombre d'échantillons. Aussi, depuis les premiers travaux, (VOLLER et coll., 1976), l'application de l'ELISA au diagnostic des infections à baculovirus s'est considérablement généralisée comme en témoigne l'abondance des publications traitant de ce sujet (DAUTHUILLE, 1986).

Cependant, peu de travaux d'épidémiologie faisant intervenir cette technique se rapportent à d'autres groupes d'entomovirus, en particulier aux petits virus à ARN (MOORE et TINSLEY, 1982). Pour les Picornaviridae, les travaux les plus approfondis concernent le CrPV en Australie (REINGANUM et coll., 1981) et un virus d'aphide trouvé en Afrique du Sud (WILLIAMSON et coll., 1989). Dans le cas des virus de type Nudaurelia β , l'ELISA a été utilisée dans certaines études pour le diagnostic d'infections expérimentales sub-léthales (VAIL et coll., 1984).

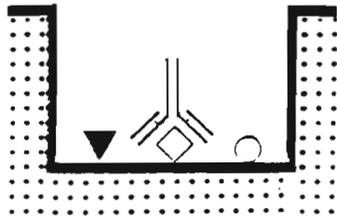
II- CHOIX DE LA METHODE:

Un test ELISA peut se dérouler suivant l'une des trois principales méthodes présentées ci-contre (cf.figure n°20)

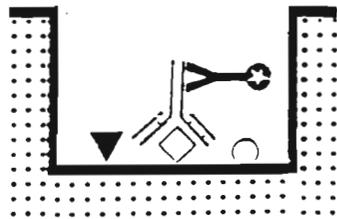
CROOK et PAYNE (1980) ont comparé les avantages respectifs de chacune pour la détection de baculovirus chez des larves de lépidoptères. A de fortes concentrations en matériel-hôte, la méthode en "sandwich" reste la seule capable



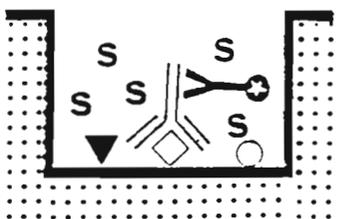
1



2

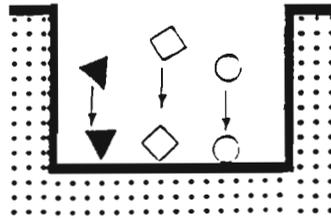


3

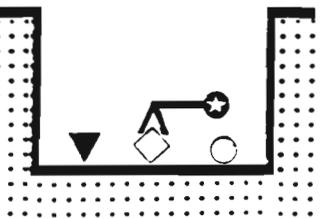


4

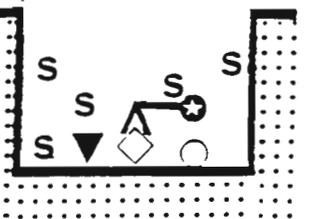
Méthode indirecte



1

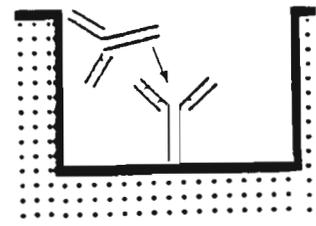


2

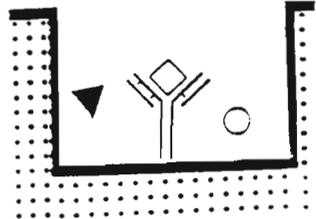


3

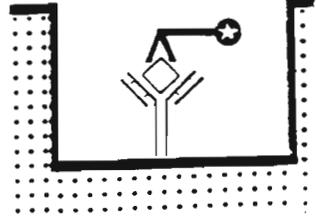
Méthode directe



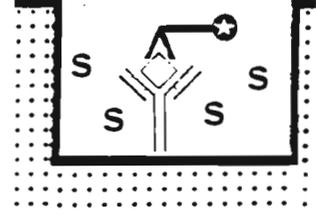
1



2



3



4

Méthode en sandwich

- , ▼ : Antigènes divers.
- ◇ : Antigène recherché (virus).
- Y : Anticorps anti-virus.
- Y* : Conjugué anti-anticorps.
- Y* : Conjugué anti-virus.
- S : Substrat de l'enzyme.

Figure n°20: Différentes modalités du test ELISA.

de détecter l'antigène viral. Elle permet de détecter la présence d'une seule larve malade au sein d'un lot renfermant une centaine d'individus sains (CROOK et PAYNE, 1980).

C'est donc cette méthode en "sandwich" que nous avons choisie pour l'étude épidémiologique concernant le virus de *L. viridissima*.

III- MISE AU POINT DU TEST ELISA POUR LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A LvV:

1- Problématique:

Notre problématique étant d'essayer d'étudier l'infection virale dans les populations d'insectes, il convient de rechercher le meilleur protocole possible pour la détection du virus dans des broyats de chenilles. Une série d'étalonnages s'avère nécessaire afin d'établir la sensibilité du test en fonction des produits préparés (anticorps, conjugué...) et des types d'échantillons analysés. Nous avons donc successivement établi la limite minimale de détection du test lorsque le virus est déposé seul dans les puits et lorsqu'il se trouve en association avec des tissus de l'hôte. Dans ce dernier cas, il paraît souhaitable d'envisager différentes combinaisons entre teneurs en virus et teneurs en tissus larvaires afin de déterminer les dilutions les plus favorables à la mise en évidence des antigènes viraux.

2- Préparation et titrage des anticorps et conjugués:

Les anticorps et conjugués ont été préparés suivant le protocole décrit au chapitre "Matériels et Méthodes" à partir d'immuns-sérums de lapins produits en Côte-d'Ivoire. Différents lots de sérums ont été analysés afin de rechercher leur titre homologue (c'est-à-dire la dilution maximale permettant encore de détecter le virus par immuno-diffusion en gel d'agarose) et leur titre hétérologue (dilution minimale à partir de laquelle, par cette même technique, il n'y a plus d'arc de précipitation avec les protéines de l'hôte).

Après quelques essais préliminaires portant sur différents lots, nous avons retenu pour cette étude un stock de gamma-globulines de concentration 0,77 mg/ml déterminée par dosage spectrophotométrique (en considérant que les gamma-globulines ont un coefficient d'extinction spécifique de 1,4 unité de D.O par millilitre à 280 nm).

Le conjugué a été préparé à partir de ces mêmes globulines. Une série de tests a permis de préciser les conditions optimales d'utilisation de ces produits. Les meilleurs résultats s'obtiennent après dilution au 1/500 ème de la solution-mère de γ -globulines, ce qui correspond à environ 1,5 μ g de protéine/ml,

concentration qui se rapproche des valeurs considérées comme les plus favorables (CLARK et ADAMS, 1977). De façon analogue, la dilution la meilleure pour le conjugué est 1/1000 ème.

3- Etalonnage du test avec du virus purifié:

Les antigènes viraux sont préparés sous forme de suspensions virales purifiées (cf. "Matériels et Méthodes"). Une unité de densité optique à 260 nm (1 U D.O.₂₆₀) correspond approximativement, pour un picornavirus d'invertébré, à 120 µg de virus (VEYRUNES, communication personnelle).

En considérant une teneur de 30 % en acide nucléique, la quantité de protéines présente dans une suspension contenant 1 U. D.O.₂₆₀/ml s'élève à 84 µg/ml.

En travaillant avec les mêmes dilutions que précédemment, nous avons comparé la qualité des préparations d'IgG issues de trois sérums différents: Ac1, Ac2 et Ac3. Leur capacité à détecter diverses quantités d'antigènes peut se déduire de la figure n°21. Les différentes préparations d'immunoglobulines paraissent très homogènes, donnant des réponses sensiblement identiques pour de mêmes conditions.

On considère comme positive une valeur égale ou supérieure à deux fois le bruit de fond représenté ici par la ligne continue horizontale correspondant à des contrôles en l'absence d'antigènes. D'après ce critère, le seuil minimal de détection du virus se situe aux alentours de 10^{-6} unités D.O.₂₆₀/ml soit 0,12 ng/ml. Pour des concentrations de virus supérieures à 0,12 µg/ml, il apparaît des phénomènes de saturation se traduisant par la dégradation rapide et totale du substrat.

En conclusion, les trois lots d'anticorps réagissent positivement à la présence de l'antigène viral et le seuil de détection atteint 0,12 ng de virus par millilitre; il paraît maintenant possible d'étudier de manière plus approfondie les possibilités de détection du virus en présence des tissus de l'hôte.

4- Etalonnage du test en présence de tissus de *L. viridissima*:

Une série d'expériences a été menée afin de déterminer les limites de notre test ELISA appliqué à l'analyse des chenilles récoltées en plantation. Pour cela, on ajoute des quantités connues de virus à un broyat de chenilles représentant une certaine teneur en tissus de *Latoia viridissima*.

Les chenilles saines et virosées proviennent de récoltes dans la plantation d'Eloka en mars 1987. Après broyage et clarification, une série de dilutions successives dans du tampon antigène (P.B.S.T-P.V.P), permet de disposer des

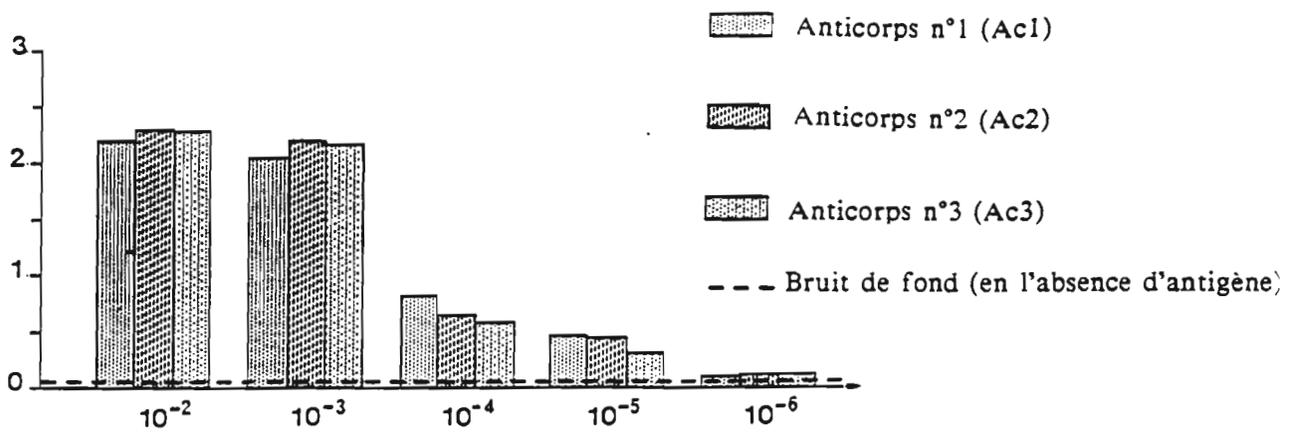


Figure n°21

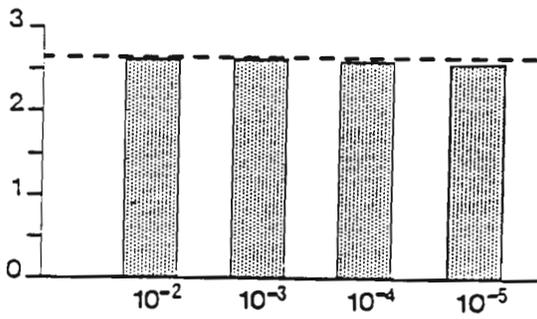


Figure n°22

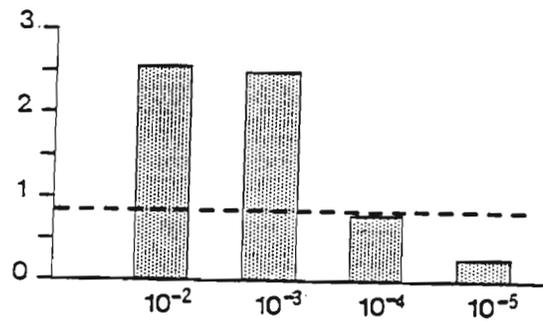


Figure n°23

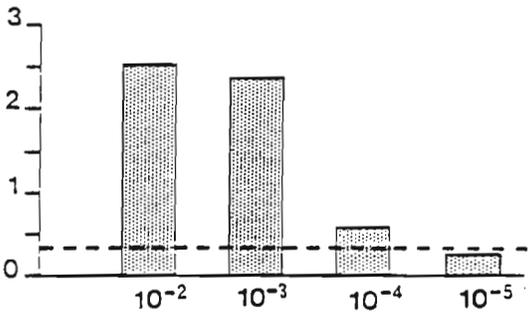


Figure n°24

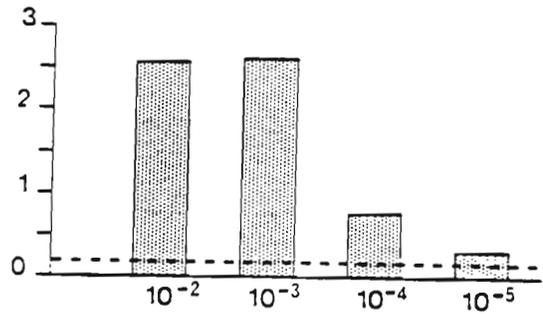


Figure n°25

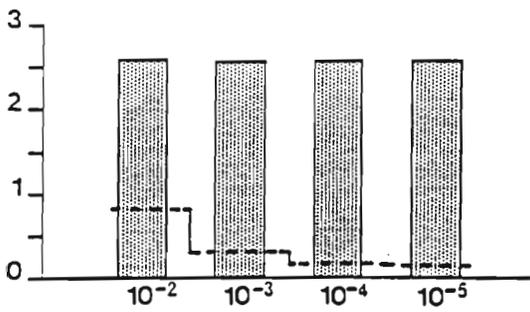


Figure n°26a

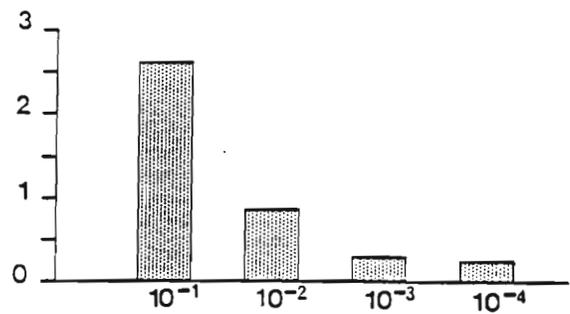


Figure n°26b

concentrations désirées en tissus larvaires.

Les échantillons, renfermant soit le virus de *Latoia viridissima* seul soit ce même virus ajouté à des quantités connues de broyat de chenilles saines, subissent aussi des dilutions dans le tampon antigène afin d'obtenir les différentes solutions qui seront testées. Parallèlement, des témoins, constitués de broyats de larves saines à diverses concentrations, servent à estimer la part du signal due aux tissus de l'hôte (cf. figure n° 26b).

a)-broyat larvaire à 100 mg/ml:

A de telles concentrations en tissus de l'hôte, il paraît impossible de détecter la présence du virus quelle que soit sa concentration, le bruit de fond masquant tout autre signal (cf. figure n°22).

Dans ces conditions, l'intensité de coloration obtenue (supérieure à 2,5 unités D.O₂₆₀) correspond à une dégradation maximale du substrat due principalement aux réactions anticorps anti-*Latoia viridissima*-antigènes de chenilles. Aussi, l'apport supplémentaire d'un autre antigène, le virus, sur lequel viennent se fixer des molécules supplémentaires de conjugué, n'entraîne-t-il pas d'augmentation de la densité optique, l'enzyme (couplée aux IgG) étant déjà en excès dans le milieu par rapport au substrat disponible.

b)- Broyat larvaire à 10 mg/ml:

Le bruit de fond dû à l'hôte reste très élevé dans ces conditions (cf figure n°23); mais les densités optiques étant inférieures à l'unité, on dispose d'une certaine marge pouvant être mise à profit pour détecter le virus. En effet, ce dernier provoque un accroissement considérable de la réaction colorée pour des concentrations de 120 ng/ml (10^{-3} unité D.O₂₆₀).

Les résultats obtenus après addition de virus aux concentrations de 12 et 1,2 ng/ml montrent que le seuil minimal de détection est compris entre ces deux valeurs.

c)- Broyat larvaire à 1 mg/ml:

En présence de 1 mg de chenille par millilitre, le seuil de sensibilité se situe en dessous de 120 ng de virus par millilitre, ce qui améliore le résultat obtenu précédemment (cf. figure n°24).

d)- Broyat larvaire à 0,1 mg/ml:

L'analyse de la figure n°25 montre qu'en présence de 0,1 mg de chenille par millilitre, moins de 1,2 ng de virus par millilitre peut être détecté. Dans ces conditions, le bruit de fond dû aux tissus de *L. viridissima* devient pratiquement négligeable.

5- Application du test à des chenilles naturellement infectées:

Réalisée avec des insectes morts de virose, une expérience analogue à celle décrite ci-dessus met également en évidence l'existence d'un phénomène d'épuisement du substrat pour des teneurs supérieures à 10 mg de tissu/ml. Lorsque l'on atteint ou dépasse 100 mg de chenille par millilitre, il est donc impossible, là aussi, de distinguer entre animaux sains et virosés parce que le bruit de fond est trop élevé.

Par contre, à partir d'une teneur de 10 mg de chenilles par millilitre, et jusqu'à une dilution de 100000 au moins, il devient possible de détecter la présence de virus dans les larves mortes de *Latoia viridissima* (cf.figure n°26a).

6- Effet de l'épuisement des anticorps et des conjugués sur la sensibilité du test:

Les expériences ci-dessus ont démontré que la détection du virus varie suivant que l'on teste des suspensions virales purifiées ou bien des échantillons contenant des concentrations très importantes en protéines de *Latoia viridissima*. Ce phénomène est dû à la présence de protéines de l'hôte dans les suspensions virales ayant servi à immuniser les lapins, ce qui a conduit à l'obtention de sérums dirigés contre les virions mais, aussi, contre les chenilles.

Afin d'éliminer des milieux de réaction du test ELISA les anticorps (couplés ou non à l'enzyme) dirigés contre les protéines de l'hôte, on les épuise contre un broyat brut de *Latoia viridissima* à 100 mg/ml.

La figure n°27 montre que ce traitement réduit sensiblement le bruit de fond, même lorsque le conjugué n'est pas épuisé. Ainsi, le signal dû à des concentrations de 1,2 ng de virus par millilitre apparaît bien supérieur au bruit de fond provoqué par 100 mg de chenilles par millilitre. Cela représente un très important gain de sensibilité par rapport à un test réalisé directement avec les réactifs non épuisés. L'épuisement concomittant du conjugué concourt à l'amélioration des résultats.

Cependant, on remarque, pour de faibles teneurs en virus (12 ng/ml) que le signal paraît plus important lorsque les tissus de l'hôte sont également présents

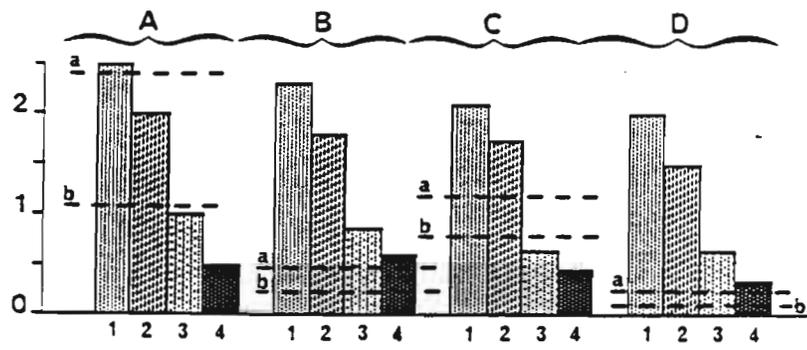


Figure n°27

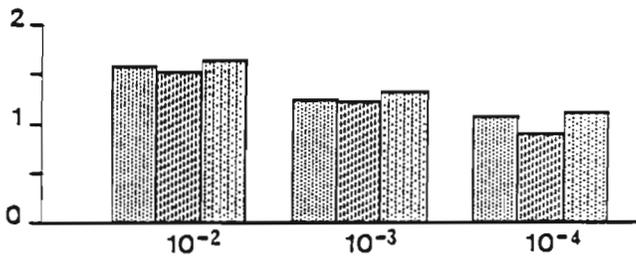


Figure n°28

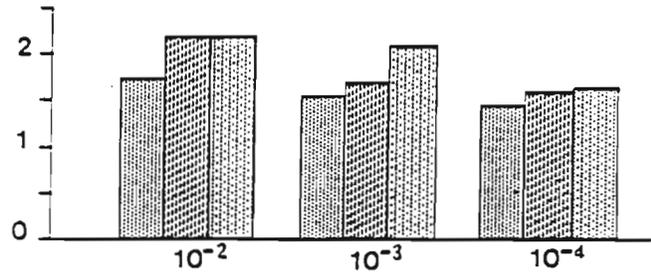


Figure n°29

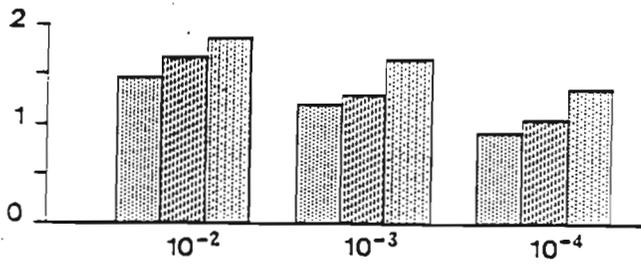


Figure n°30

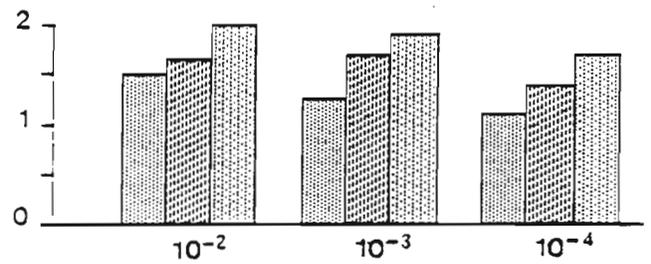


Figure n°31

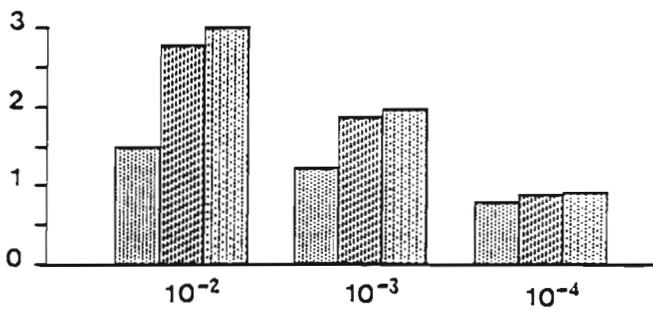


Figure n°32

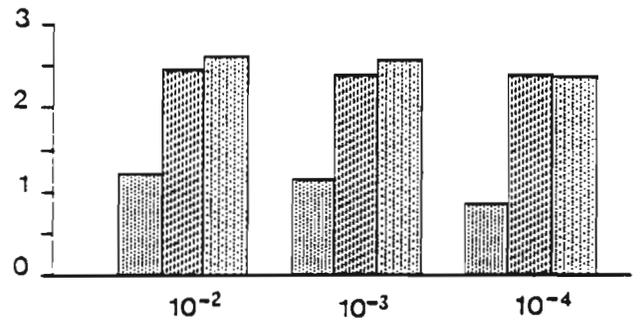


Figure n°33

dans le milieu à de fortes concentrations (100 mg de chenilles/ml et plus; résultats non présentés). Cela provient certainement d'un épuisement incomplet des réactifs et donc il semble nécessaire de réaliser cet épuisement contre des broyats larvaires plus concentrés. Les figures n° 28 à 33 montrent les résultats d'une telle expérience où il apparaît que 500 mg de chenilles par millilitre constitue la concentration testée la plus adéquate pour l'épuisement tant du conjugué que des anticorps primaires, le bruit de fond étant réduit à un niveau tout à fait tolérable.

Les figures n° 34 à 38 illustrent les seuils de détection du test ELISA en présence et en l'absence de tissus de *Latoia viridissima*.

Lorsque l'on dose le virus pur, des concentrations proches de 0,12 ng de virus par millilitre sont détectables (cf. figure n°34). Pour des teneurs élevées en larves (100 mg/ml et 10 mg/ml), la quantité d'antigènes détectable ne descend pas en dessous de valeurs proches de 12 ng/ml (cf. figures n°36 et n°37). Par contre, pour 1 mg et 0,1 mg de tissus larvaires par millilitre, il devient possible d'atteindre une sensibilité de 1,2 ng/ml (cf. figures n°38 et n°39).

La figure n°35 présente le signal obtenu, avec les mêmes réactifs, pour différentes concentrations en tissus sains de *Latoia viridissima*.

IV- ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA VIROSE CHEZ *L. VIRIDISSIMA*:

A- INTERET DE L'ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE:

La mortalité observable en plantation et attribuée au virus LvV après analyse des échantillons par test ELISA et par observation en microscopie électronique, correspond au stade ultime de la maladie chez les chenilles de *Latoia viridissima*. Des insectes se trouvant à des stades plus précoces de la virose ou infectés à un niveau non léthal restent indétectables par l'observation directe. Aussi, afin de mieux connaître la répartition de la maladie au sein des populations naturelles du ravageur, nous avons entrepris de rechercher, à l'aide du test ELISA précédemment mis au point, la présence du virus à l'intérieur des lots de chenilles échantillonnées. Une telle étude nous a permis aussi de suivre l'évolution de la maladie au cours du temps. Enfin, cela a constitué un contrôle en grandeur réelle de la possibilité d'utiliser le test ELISA mis au point sur LvV comme support d'études épidémiologiques de terrain.

B- MODALITES DE CETTE ETUDE:

Plusieurs parcelles de palmiers à huile localisées sur la station IRHO de La Mé (Côte-d'Ivoire) ont fait l'objet d'un suivi épidémiologique concernant l'incidence de la maladie virale chez le ravageur *Latoia viridissima*. Nous présenterons ici les résultats obtenus sur deux de ces parcelles, F.52 et H.41, étudiées de septembre à

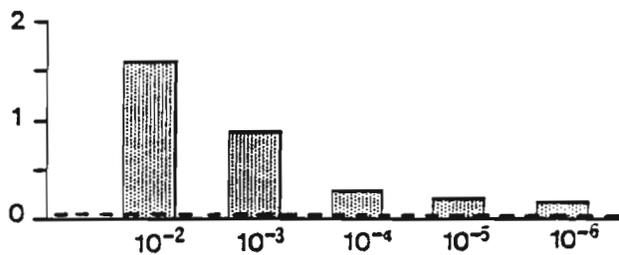


Figure n°34

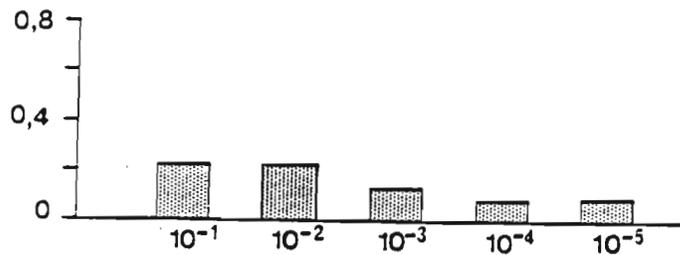


Figure n°35

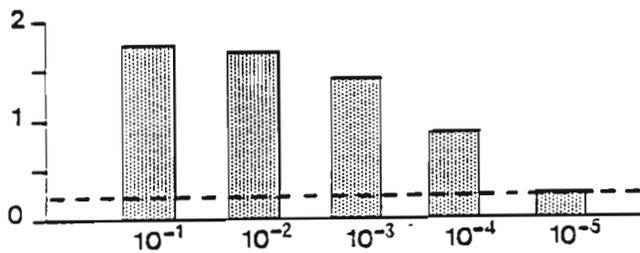


Figure n°36

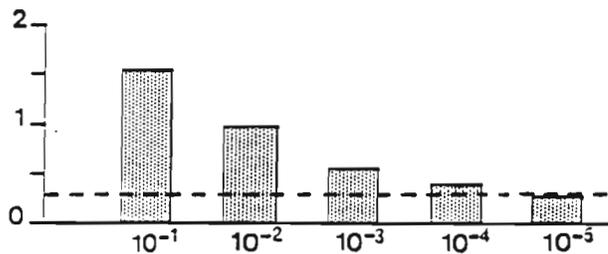


Figure n°37

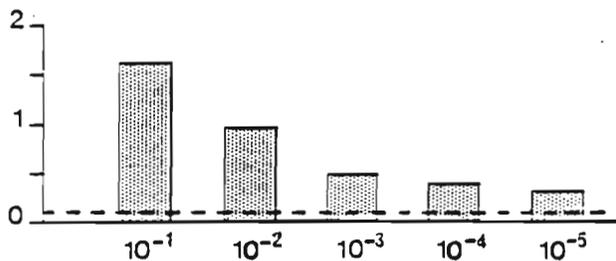


Figure n°38

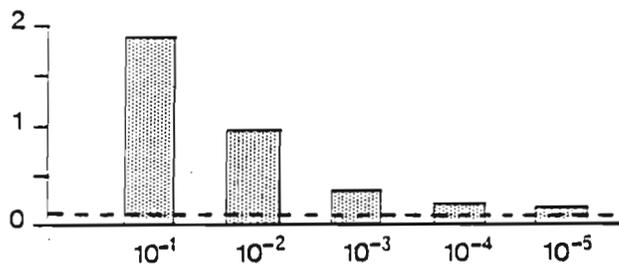


Figure n°39

En ordonnées: Figures n°21 à 39: unités de densité optique à 405 nm.

En abscisses: Figures n°21 à 26a, 28 à 34 et 36 à 39: teneurs en virus LvV en unités de densité optique à 260 nm.

Figures n°26b et 35: Concentration des broyats larvaires de *L. viridissima* en grammes par millilitre.

décembre 1986.

C- RESULTATS DU SUIVI EPIDEMIOLOGIQUE DES POPULATIONS DE *LATOIA VIRIDISSIMA*:

Comme précisé sur les figures correspondantes, les résultats présentés ci-dessous se rapportent à deux catégories d'échantillons. En effet, lorsque les chenilles commencent à perdre leur instinct grégaire, après les trois premiers stades larvaires, elles sont analysées individuellement par la technique ELISA. A des stades plus précoces, la petite taille des chenilles et le fait qu'elles se retrouvent groupées de façon compacte nous a conduit à étudier la colonie de manière globale.

1- Cas de la parcelle F.52:

Les bordures ouest et nord (lignes 1 à 12) de F.52 ont été traitées le 22 septembre 1986 à l'aide d'un canon pulvérisateur tracté dispersant l'équivalent de 56 g de chenilles mortes de virose par hectare.

Le tableau A présente les pourcentages d'infection par LvV des lots de *Latoia viridissima* échantillonnés chaque semaine soit dans la zone traitée à l'aide de la suspension virale (Z.T.), soit dans la zone non traitée (Z.N.T.). En parallèle est présenté le nombre moyen de chenilles vivantes par palme (cf. figure n°40). La collecte des chenilles s'est faite sur huit palmes de chacun des six arbres retenus chaque semaine pour être prélevés. Au total, ce sont plusieurs centaines de chenilles, soit isolées soit en colonies, qui ont été analysées au cours de cette étude.

Au premier jour de l'étude, le 19 septembre 1986, on trouve à peu près 40 chenilles par palme qui correspondent à des individus très jeunes encore groupés en colonies (cf. figure n°40). L'analyse ultérieure des larves prélevées à cette période a montré que plus de la moitié des colonies testées par ELISA se révélaient positives (cf. tableau A) alors qu'encore aucun symptôme pathologique ne se manifestait. C'est sur une partie de ces colonies que, le 22 septembre 1986, le traitement à base de virus est appliqué. Mais au cours des semaines suivantes, l'incidence de la maladie reste identique entre la zone traitée et celle non traitée. Les toutes premières chenilles mortes sont signalées le 7 octobre 1986 alors que la présence de la virose chez un fort pourcentage d'individus est détectée depuis presque trois semaines. A partir de cette date (première semaine d'octobre), la maladie provoque une chute constante du nombre de larves présentes dans la parcelle.

Nombre de chenilles

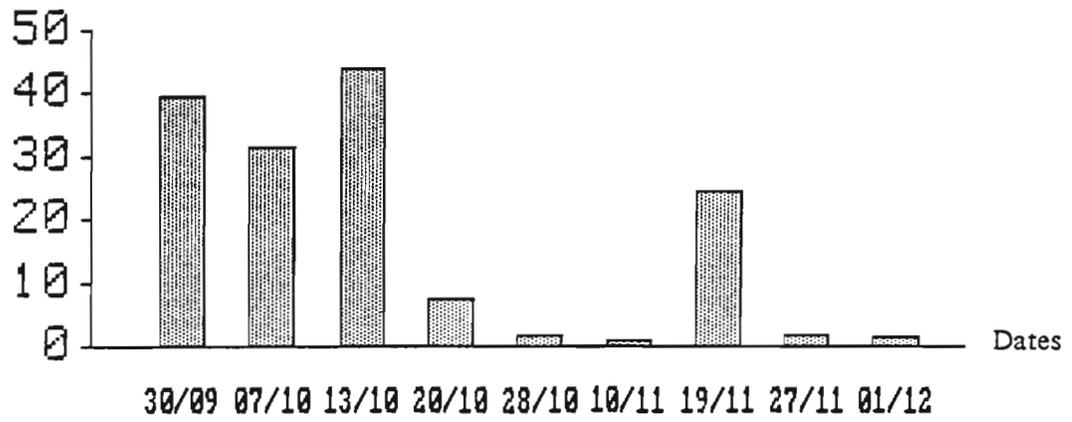


Figure n°40: nombre moyen de chenilles vivantes par palme sur la parcelle F.52

Nombre de chenilles

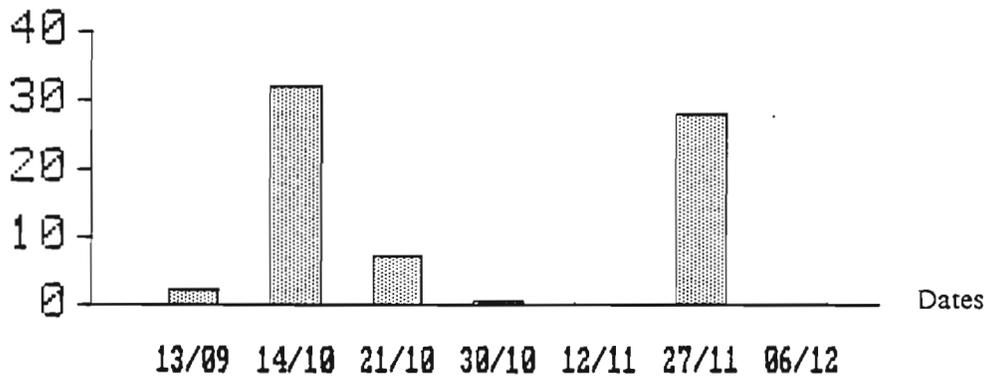


Figure n°41: nombre moyen de chenilles vivantes par palme sur la parcelle H.41.

(données fournies par R. Philippe)

TABLEAU A: Données relatives à la parcelle F. 52

Dates	* B	* M	C	D	E	F	G	H	C	D	E	F	G	H
22/09		2	36	6	34	27	56	0	0		1	1	50	
30/09	39,50		0	0		11	6	65	0	0		0	0	
07/10	31,30													
13/10	43,90	2,5	102	51	67	0	0		103	51	67	0	0	
20/10	7,40	84	5	23	18	0	0		26	37	41	0	0	
28/10	1,90	97	3	0	100	0	0		0	0		0	0	
10/11	0,80											11	2	85
19/11	24,60		0	0		5	3		0	0		0	0	
27/11	1,80	44	14	0	100	12	1	63	3	0	100	0	0	
02/12	1,40		0	0		0	0	92	0	0				

┌────────── Z.T. ─────────┐ ┌────────── Z.N.T. ─────────┐

TABLEAU B: Données relatives à la parcelle H 41

Dates	* A	* B	Dates	C	D	E	F	G	H
13/09	1,30	2,40	19/09	0	0		3	15	17
14/10	0,50	1,90	09/10	76	73	51	13	7	65
21/10	0,10	7,30	23/10	70	95	42	4	4	50
30/10	1,10	0,50	06/11	0	0	0	1	1	50
12/11	5,30	0,10	20/11	33	50	40	15	25	38
27/11	0,30	27,90	04/12	0	0		2	2	50
06/12	0	0							

*: données fournies par R. Philippe

Au 28 octobre 1986, la mortalité a atteint presque 100 %; le petit nombre de chenilles encore vivantes sont porteuses du virus (cf. tableau B). Elles finissent par mourir assez rapidement ou par se nymphoser.

Exceptionnellement, en cette fin d'année 1986, la biologie de *Latoia viridissima* est apparue un peu particulière puisque la ponte s'est étalée sur presque deux mois (ponte régulière depuis fin septembre jusqu'à mi-novembre). Aussi, après l'élimination de la première population, apparaît une nouvelle génération vers le début novembre; on atteint alors rapidement l'indice de 25 chenilles/palme (27 novembre 1986; cf figure n°40)

A la fin novembre, les quelques grosses chenilles de la génération précédente encore présentes sont infectées par LvV à 100 %.. Les colonies correspondant à la nouvelle génération sont, à la fois, moins nombreuses qu'en septembre et porteuses du virus à un très fort taux, bien supérieur à celui rencontré chez les colonies de la première génération (cf. Tableau A). La mortalité augmente rapidement; par exemple, en 8 jours (du 19 novembre au 27 novembre 1986), l'indice de chenilles par palme passe de 24,6 à 1,8 (cf. figure n°40).

Toutes les chenilles récoltées mortes durant ce suivi des populations de *Latoia viridissima* se sont révélées très fortement positives par test ELISA.

2- Cas de la parcelle H.41:

Par rapport à F.52, l'échantillonnage sur cette parcelle a été réalisé moins fréquemment (toutes les deux semaines) mais sur un nombre d'arbres et de palmes supérieur (27 arbres et 4 palmes par arbre). Aucun traitement n'a été appliqué durant l'étude, ce qui a permis de suivre l'évolution naturelle de la maladie.

Comme sur F.52, l'éclosion des oeufs commence au début du mois de septembre (2,4 chenilles/palme le 13 septembre 1986) et se poursuit en octobre (31,9 chenilles/palme le 14 octobre 1986) (cf. figure n°41).

Au départ, peu de colonies sont porteuses du virus (un peu plus de 15 % le 19 septembre 1986), mais trois semaines plus tard, le 9 octobre 1986, la majorité des colonies et des chenilles isolées sont atteintes (cf. tableau B). La mortalité intervient ensuite rapidement faisant revenir la densité à 7,3 chenilles/palme le 21 octobre 1986. Une semaine plus tard il ne reste pratiquement plus rien de la population initiale de *L. viridissima* (cf. figure n°41).

Mais, dans la dernière quinzaine de novembre, l'éclosion d'une seconde population d'oeufs fait très rapidement remonter le nombre de chenilles présentes (27,9 individus/palme le 27 novembre 1986) dont le niveau d'infection est compris entre 25 % et 50 % (cf. tableau B), c'est-à-dire sensiblement moins que

ce que l'on observe dans F.52 pour la même période. Cependant, en moins de 10 jours, du 27 novembre au 6 décembre 1986, la quasi-totalité de la population de *Latoia viridissima* disparaît du fait de la virose.

V- DISCUSSION:

A- SENSIBILITE DU TEST:

L'application du test ELISA à la détection des petits ribovirus d'insectes est encore peu développée et donc peu de données se rapportent à la sensibilité de cette technique dans la mise en évidence de ce type de virus.

Par contre, de très nombreux résultats sont publiés concernant d'autres virus entomopathogènes et, principalement, les baculovirus. Ainsi CROOK et PAYNE (1980) ont étudié en détail les différents facteurs intervenant dans la sensibilité du test ELISA appliqué à la recherche de virus de polyèdroses nucléaires. Pour la technique "en sandwich", ils rapportent comme seuil minimal de détection une concentration de 10 ng de virus purifié par millilitre. Dans le cas où ce virus est traité de façon à dissoudre les corps d'inclusion, la sensibilité se trouve multipliée par un facteur 10 et atteint donc 1 ng de virus par millilitre. En présence de 500 mg de broyat de chenilles par millilitre, il reste possible de détecter jusqu'à 4 ng de virus traité par millilitre.

Pour les agents des polyèdroses cytoplasmiques, la sensibilité du test ELISA réalisé en "sandwich" atteint 10 ng d'antigène par millilitre en présence des tissus de l'insecte-hôte (PAYMENT et coll., 1982).

Pour ce qui concerne les virus icosaédriques, les travaux menés chez les plantes font, le plus souvent, état de seuils minimaux de détection compris entre 10 et 100 ng d'antigène par millilitre de tissu végétal et parfois moins (VOLLER et coll., 1976).

Avec un seuil de détection approchant 0,12 ng de virus purifié par millilitre et 12 ng de virus par millilitre dans les broyats larvaires peu dilués, le test ELISA mis au point pour LvV représente donc un excellent outil, bien adapté à une investigation de type épidémiologique.

B- EPIDEMIOLOGIE:

La comparaison des densités de population et des taux de mortalité dans les deux zones, l'une traitée, l'autre non, de la parcelle F 52, révèle une évolution de la virose à peu près identique dans les deux cas, qu'il s'agisse de la première ou

de la seconde pullulation de *Latoia viridissima*. A la différence d'autres essais menés précédemment (FEDIERE, communication personnelle. PHILIPPE, résultats non publiés), le traitement réalisé cette fois-ci apparaît inutile puisque les parcelles témoins montrent que la maladie allait se déclencher naturellement. Cela explique que la mortalité par virose apparaît, pour l'essentiel, semblable dans l'un et l'autre lot.

Préparée à partir de chenilles virosées, la suspension destinée au traitement a connu un stockage prolongé au congélateur. L'absence de moyens de contrôle tels que la microscopie électronique ou le test ELISA (qui n'était pas encore disponible à l'époque) a rendu impossible d'apprécier qualitativement et quantitativement l'état de la suspension virale avant sa dispersion en plantation. Toutefois, la fragilité du virus mise en évidence depuis, laisse penser que le fait qu'il n'y ait pas eu accélération du déclenchement de la maladie (par rapport au témoin) tient sans doute à la faible quantité de particules virales biologiquement actives apportées dans le milieu par le traitement.

Par contre, on note une efficacité foudroyante du virus naturellement présent sur les parcelles vers la mi-novembre. La mortalité très rapide qui apparaît à cette période, aussi bien dans F 52 que dans H 41, tient à ce que le virus ayant été amplifié à la fin de la génération précédente se trouve dans le milieu à une concentration élevée, encore en bon état biologique et dispersé de façon favorable pour assurer une contamination rapide des chenilles. C'est pourquoi, à cette nouvelle génération, ce sont des larves jeunes qui meurent alors qu'à la première pullulation il s'agissait plutôt des derniers stades. Ces observations prouvent qu'après la première manifestation de la maladie, aucun traitement supplémentaire n'est nécessaire puisque la quantité d'inoculum viral présent dans le milieu assure le déclenchement rapide d'une épizootie parmi les jeunes larves de la nouvelle génération. Ces données illustrent l'efficacité des phénomènes de dissémination du virus et de contamination des larves de *Latoia viridissima*.

Une donnée intéressante qui ressort de notre étude est que lors des deux pullulations, on a toujours observé le virus à un niveau facilement détectable dans une fraction importante de la population du ravageur comme s'il s'agissait d'une infection enzootique.

Pour la première pullulation de *Latoia viridissima*, cette proportion de chenilles contaminées croît au cours du temps et, parallèlement, les teneurs des individus en virus augmentent. Cependant, la mortalité n'apparaît pas systématiquement chez les chenilles au fur et à mesure qu'elles sont atteintes par la virose; en fait, il semble que la mortalité intervienne globalement dans la population de chenilles à un moment donné, indépendamment de la date de contamination respective des individus.

Par contre, si, sur les palmes, il se trouve assez de virus (comme cela a été le cas lors de la seconde pullulation de *Latoia viridissima*) pour une contamination

massive et rapide des hôtes, la virose se manifeste très rapidement sous forme de phénomène épizootique et non plus comme une "maladie chronique", la mortalité intervenant aussi dès les premiers stades larvaires.

En se fondant sur ces données, on peut émettre l'hypothèse qu'il existe un certain nombre d'individus atteints dès les premiers stades larvaires. Ces chenilles contaminent progressivement leurs congénères au sein des colonies mais à des doses ne provoquant pas immédiatement la mort des chenilles néo-contaminées (doses non léthales). Si, comme cela arrive parfois, une génération supplémentaire de *Latoia viridissima* suit rapidement la première pullulation (avant que les pluies provoquent un lessivage du virus présent sur les feuilles par exemple), elle émerge dans un milieu contenant des doses infectantes léthales (cas de la deuxième génération dans notre étude). Dans ce cas, la mortalité atteint les tout premiers stades larvaires et peu d'individus échappent à la maladie; les populations du ravageur seront donc très réduites au cycle suivant.

En conclusion, il vaut mieux traiter les chenilles de *Latoia viridissima* précocément parce qu'ainsi l'amplification du virus dans le milieu permet d'obtenir la mortalité avant qu'une partie de la population se soit nymphosée ce qui constituerait un risque majeur de pullulation au cycle suivant. De plus, comme à des stades jeunes les chenilles sont moins dispersées, elles vont se contaminer plus rapidement au sein des colonies, et enfin, elles sont plus facilement atteintes par les traitements que les chenilles plus âgées (qui se localisent, souvent, à la base des folioles).

On peut émettre l'hypothèse qu'à partir de quelques individus atteints dès les premiers stades larvaires, la maladie se propage progressivement au sein des colonies mais à des doses non léthales. Cette contamination serait due au rejet du virus dans le milieu extérieur. Cette hypothèse est étayée par l'analyse détaillée des résultats qui montrent qu'aux premiers stades larvaires la maladie ne semble pas uniformément répartie. En effet, pour toutes les colonies analysées, un fractionnement a été réalisé en groupes de 5 à 10 chenilles, suivant leur taille. Lorsqu'on s'adresse aux tout premiers stades larvaires de la première pullulation, le virus n'est détecté, en général, que dans un seul de ces groupes traduisant, vraisemblablement l'existence d'une seule chenille bien infectée dans la colonie. Mais, à des stades un peu plus avancés du développement de *Latoia viridissima*, plusieurs groupes se révèlent infectés. Il paraît donc probable que la contamination des individus précédemment sains s'effectue rapidement, à cause de la très grande promiscuité, à partir de quelques chenilles virosées initialement présentes.

C- CONCLUSION:

Au cours de notre travail, nous avons pu mettre au point un test ELISA adapté à la détection du virus LvV dans les échantillons biologiques. Nous avons montré que ce test était utilisable pour des expérimentations au laboratoire, mais aussi pour une étude épidémiologique réalisée sur des individus provenant du milieu naturel.

Nous avons ainsi suivi l'incidence de la maladie dans les populations naturelles de *Latoia viridissima* durant presque trois mois au cours de deux pullulations successives.

La succession rapide de ces pullulations du ravageur à la fin 1986 a permis de comparer l'évolution de la maladie selon que la population de *Latoia viridissima* émergeait sur une parcelle faiblement infectée ou, au contraire, dans un milieu très enrichi en virus.

Les résultats obtenus au cours de l'enquête épidémiologique réalisée en Côte-d'Ivoire sont d'autant plus intéressants qu'il ne semble pas qu'un petit ribovirus d'insecte ait déjà fait l'objet d'une étude analogue.

Dans le cas de la virose de *Latoia viridissima*, l'utilisation du test donne de bien meilleures indications sur la présence et la "dynamique" du virus que la simple étude de la mortalité; d'abord parce que, dans ce dernier cas, il existe un problème d'échantillonnage dû à la chute des chenilles mortes ou gravement virosées. Ensuite, le test ELISA donne des indications plus précoces que l'observation de la mortalité. Enfin, il peut être utilisé de façon semi-quantitative afin de comparer les différents niveaux d'infection des chenilles en fonction du temps.

Sur le plan pratique, le mode de conservation des échantillons (plusieurs mois au congélateur avant leur traitement), autorise des collectes de matériel biologique importantes en période de pullulation et, ensuite, des analyses par test ELISA étalées dans le temps. Ce type d'étude doit permettre de mieux cerner les modalités de déclenchement et d'évolution de la maladie.

D'un point de vue plus appliqué, il est envisageable de déterminer, pour un stade de développement donné de *L. viridissima*, un niveau d'incidence de la maladie au-dessus duquel l'épizootie va se déclencher rapidement, ce qui permet d'éviter des traitements insecticides.

Il est actuellement impossible de savoir si, avec ce type de virus, le niveau d'infection des jeunes colonies est toujours aussi élevé, c'est-à-dire si le maintien de ces virus dans l'écosystème passe nécessairement par leur présence constante chez les hôtes qu'ils infectent, et non pas seulement par leur présence dans le

milieu.

Comme les autres, les observations de REINGANUM et coll. (1981) corroboreraient plutôt la première hypothèse puisque, parmi 229 lots de grillons provenant de différents sites géographiques en Australie, ils retrouvent le virus CrPV chez 42,9 % de ces lots alors qu'aucun effet pathogène n'est décelable. Mais, à d'autres périodes, chez le même hôte, apparaît une très forte mortalité provoquée par ce virus.

Dans le cas de *Latoia viridissima*, l'infection pratiquement systématique, mais sans symptômes décelables, de jeunes larves au sein des colonies pourrait expliquer les mortalités rapides qui interviennent dès que l'on tente des élevages expérimentaux de ce Limacodidae. Dans ces conditions artificielles, les chenilles perturbées s'opposent mal au développement d'un virus LvV présent dès l'origine.

Pour les chenilles les premières atteintes, la voie d'infection reste à déterminer; il peut y avoir soit une transmission verticale du virus (par exemple à la suite d'une contamination du chorion de certains oeufs lors de la ponte), soit une infection d'un premier individu lors de son alimentation. Quoi qu'il en soit, la jeune larve porteuse amplifie le virus et le transmet à ses voisines.

La transmission transtadiale du virus existe au moins à certaines étapes du développement de *Latoia viridissima*. En effet, lors de nos expérimentations au laboratoire ainsi qu'à la suite de prélèvements réalisés en plantation, nous avons mis en évidence que les chenilles virosées pouvaient se nymphoser alors que le test ELISA leur attribuait une forte teneur en virus. Une mortalité intervient à ce stade nymphal mais quelques imagos émergent de leur cocon et sont porteurs du virus. Il n'a pas été possible de déterminer si ces adultes pouvaient transmettre l'agent pathogène à leur descendance.

Pour l'instant, chez les Picornaviridae d'invertébrés, toutes les études ont conclu à l'absence de transmission transovarienne, mais il peut y avoir contamination des oeufs lors de la ponte des adultes (REINGANUM et coll., 1970; JOUSSET et PLUS, 1975). Cependant, pour d'autres petits ribovirus tels les virus A, P et iota de la drosophile, la transmission transovarienne a été démontrée (JOUSSET et PLUS, 1975).

CHAPITRE V : CLONAGE MOLECULAIRE DE L'ARN VIRAL ET CONSTRUCTION DE SONDES NUCLEIQUES.

I- CLONAGE MOLECULAIRE DU GENOME DE LvV:

La mise au point de sondes nucléiques s'effectue à partir de séquences virales clonées dans des plasmides sous forme d'ADN complémentaire (ADNc). Ce clonage permet aussi, lorsque l'approvisionnement en virus est difficile, de faire produire par des bactéries ces séquences virales intégrées dans les plasmides. Comme l'ARN est une molécule très difficile à travailler, le passage sous forme d'ADNc constitue souvent une étape obligatoire préalable à son étude. Ces multiples raisons nous ont donc conduit à tenter le clonage moléculaire du virus LvV.

A- STRATEGIE DE CLONAGE:

La figure n°42 schématise les diverses opérations que nous avons réalisées pour cloner les séquences virales dans les plasmides bactériens. Parmi les différentes étapes aboutissant à l'obtention d'un ADN complémentaire double brin intégré dans un plasmide, seule la première était partiellement contrôlable. Ensuite, la manipulation s'est poursuivie jusqu'à son terme et seule l'analyse des colonies bactériennes tétracycline-résistantes a pu indiquer le degré de réussite de l'expérience (taille des inserts plasmidiques, parties transcrites de l'ARN viral d'origine...). Deux types de dénaturation de l'ARN (soit chimique soit thermique) et deux types de clonage des inserts (soit sous forme hétéroduplex soit sous forme d'ADN double brin) étaient envisageables. Nous avons réalisé les quatre types de combinaisons possibles.

1- Transcription inverse de l'ARN viral:

Les figures n°43a et n°43b montrent les profils obtenus après chromatographie sur colonne des produits de la transcription inverse réalisée en présence d' α -³²P-dCTP. Nous avons pu séparer les nucléotides libres et les produits de synthèse de très petite taille (pics B1 et B2) des chaînes néosynthétisées de tailles intéressantes (pics A1 et A2).

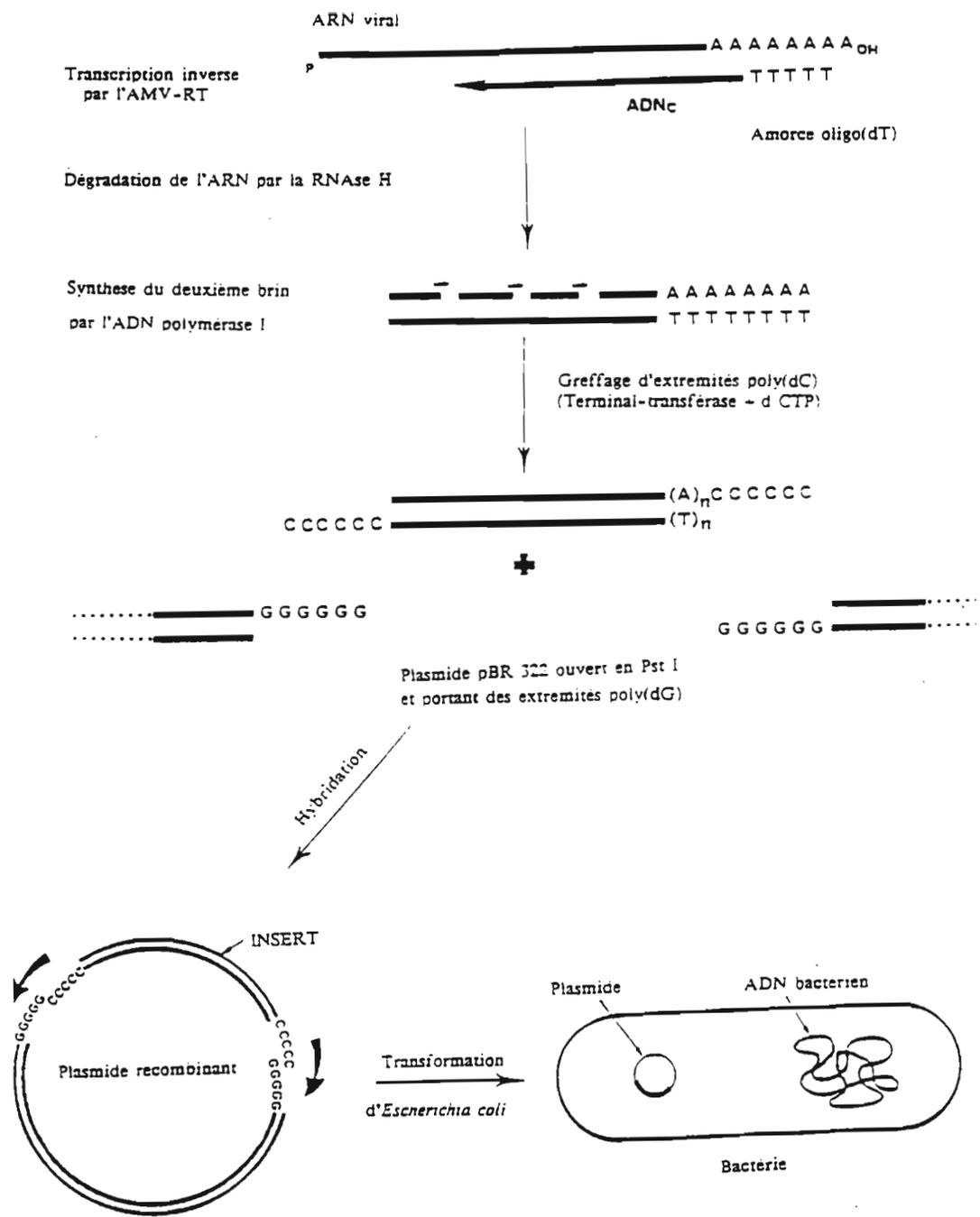


Figure 42, Schéma d'obtention d'ADN_c à partir d'ARN viral et stratégie de clonage

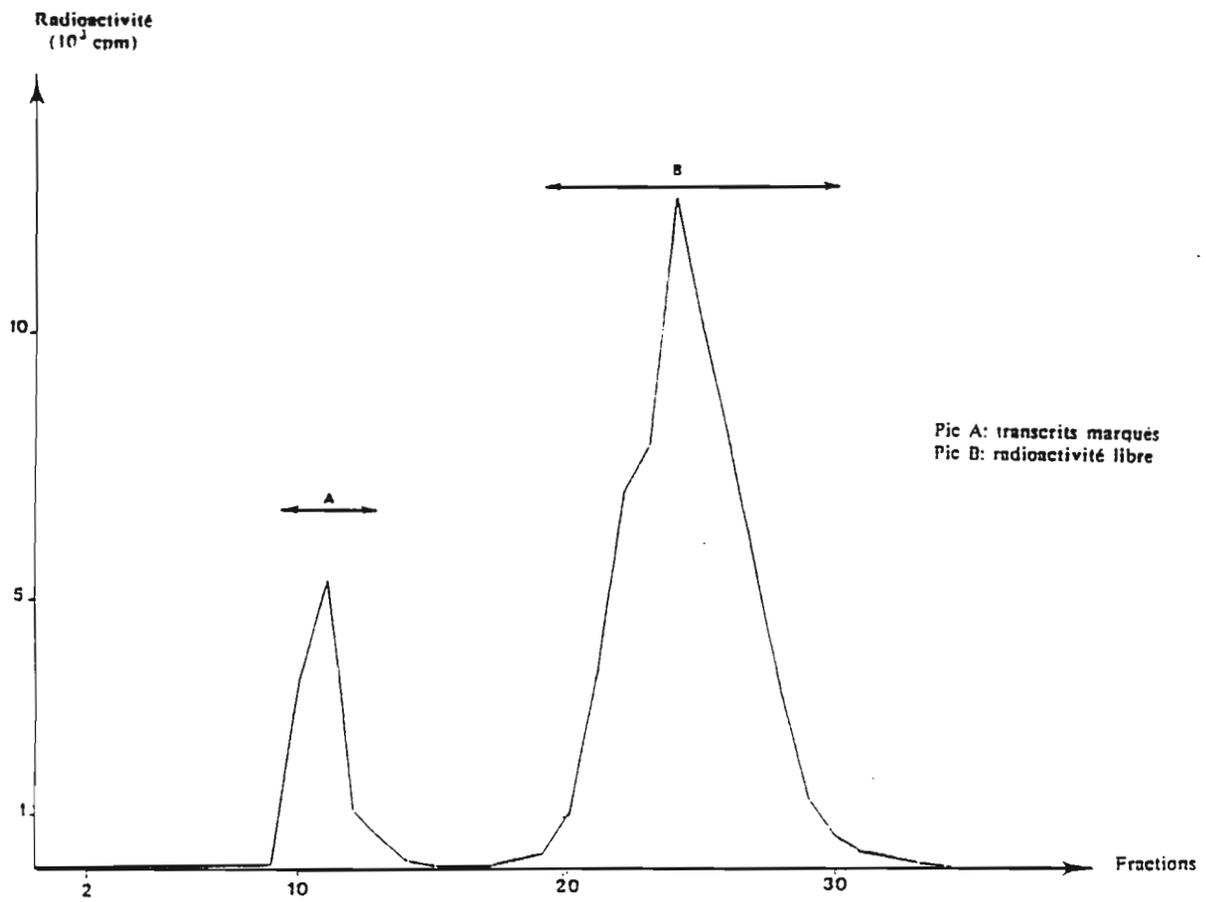


Figure n°43a: Profil d'élution des produits de la transcription inverse chromatographiés sur gel de Sephadex G.75 (cas de l'ADN bicaténaire).

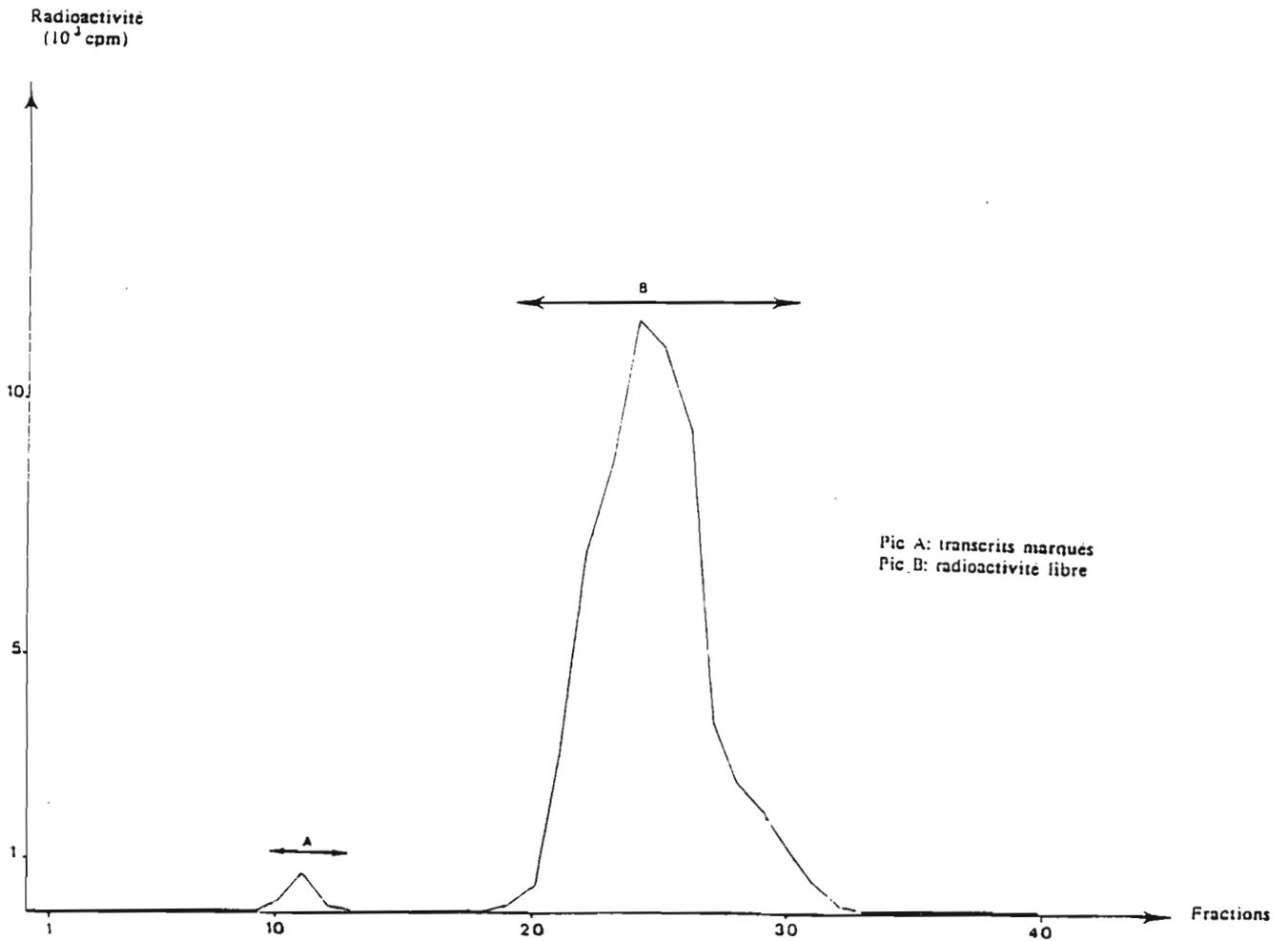


Figure n°43b: Profil d'élution des produits de la transcription inverse chromatographiés sur gel de Sephadex G.75 (cas de l'hétéroduplex).

Une légère modification est intervenue selon que l'on a cloné l'hétéroduplex ou l'ADN sous forme bicaténaire. Dans le premier cas, nous avons réalisé la chromatographie immédiatement après la réaction de transcription inverse (cf. figure n°43a). Dans l'autre cas, il y a auparavant eu incubation en présence d'ADN-polymérase I et de RNase H selon les modalités spécifiées dans "Matériels et Méthodes" (cf. figure n°43b).

2- Clonage des fragments d'ADNc dans pBR 322:

Deux possibilités s'offrent pour le clonage proprement dit: soit un fractionnement des ADNc sur gradient de saccharose afin de ne retenir que ceux ayant une taille intéressante, soit le clonage de la totalité des produits de transcription obtenus.

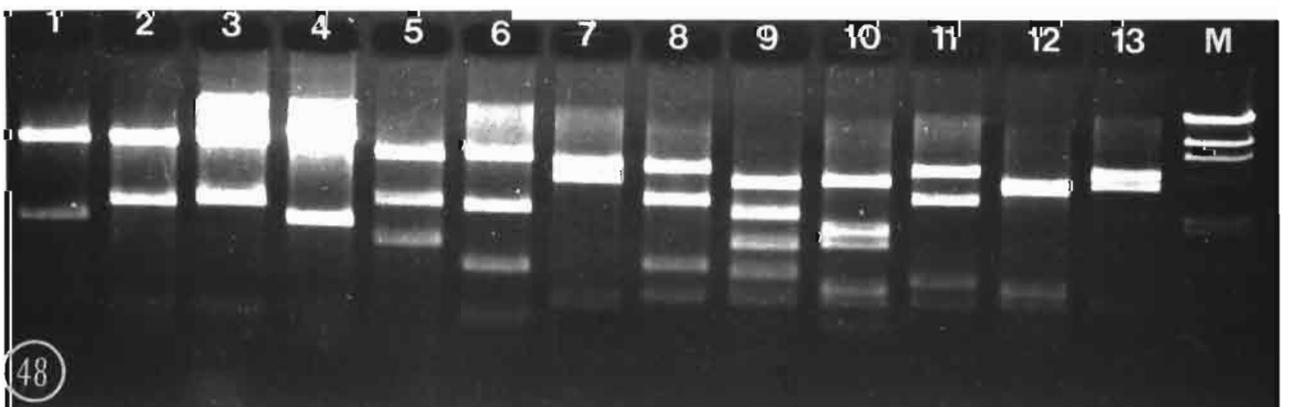
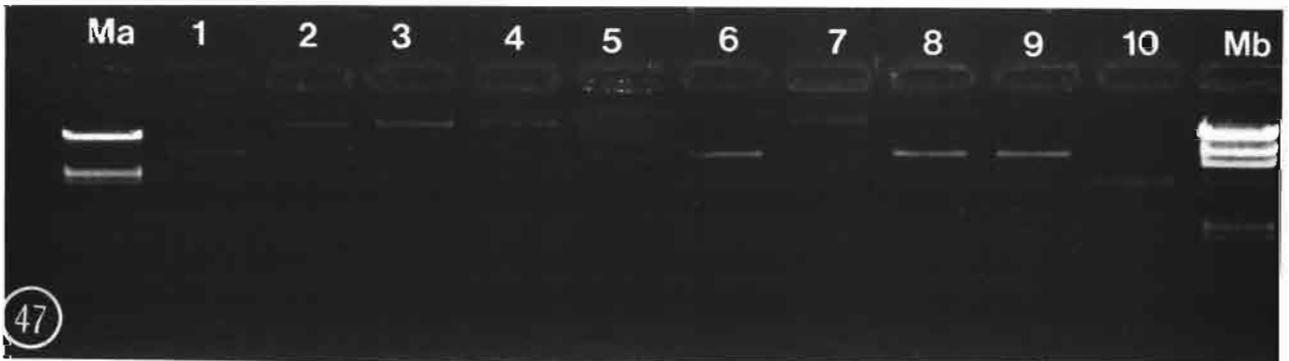
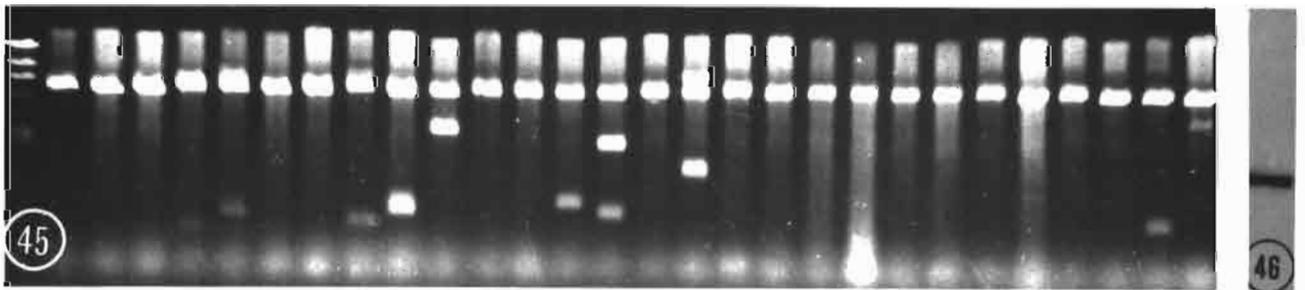
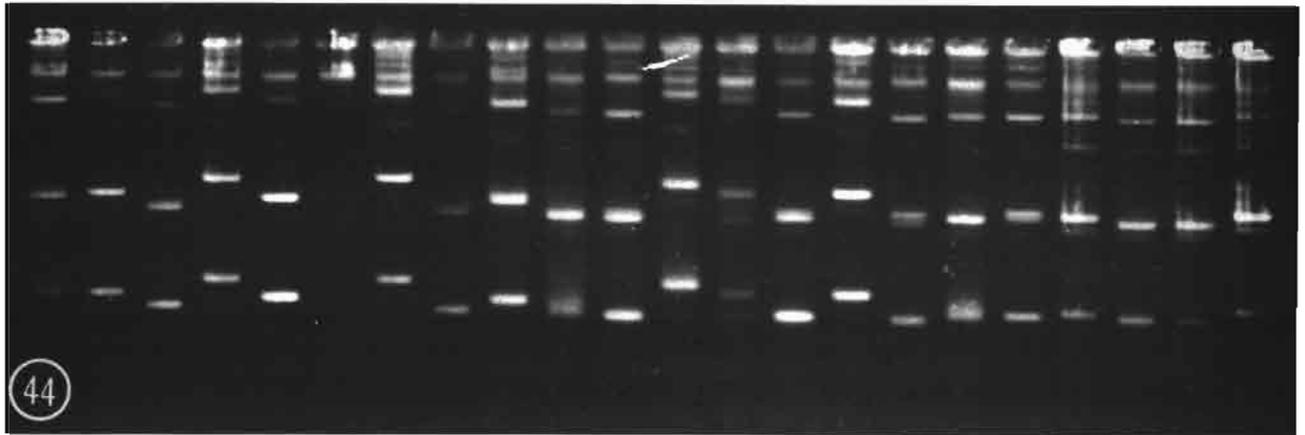
En raison des pertes intervenant lors du fractionnement sur gradient et de la faible quantité de matériel disponible à l'origine, nous avons préféré cloner l'ensemble des ADNc sans distinction de taille. Les fragments d'ADN à insérer, dotés de séquences poly(dC), sont hybridés avec des plasmides pBR 322 ouverts au site *Pst* I et portant des séquences complémentaires poly(dG). Après cette hybridation, les plasmides recombinants servent à transformer des bactéries compétentes.

B- Analyse des plasmides recombinants:

Après transformation de bactéries compétentes à l'aide des quatre mélanges d'hybridation (cf. "Matériels et Méthodes"), un total de 826 colonies résistantes à la tétracycline ont été obtenues. Sur ce nombre, 113 colonies, soit 13,6 %, se développent sur un milieu supplémenté en ampicilline, indiquant l'absence d'insert au niveau du site de clonage, ont été éliminées.

Les plasmides de chacune des 713 colonies sélectionnées ont été extraits par minipréparations et analysés en gel d'agarose à l'état natif pour comparer leur taille à celle du plasmide pBR 322 ou après digestion par *Pst* I pour connaître précisément la taille de l'insert.

Les figures n°44 et n°45 illustrent l'analyse des plasmides sous forme native et après ouverture au niveau du site de clonage. Les tailles des inserts des quatre types de préparations d'ADNc se trouvent présentées dans le tableau ci-dessous:



RENDEMENTS COMPARES DES DIFFERENTES TRANSCRIPTIONS
INVERSES

Préparation	Nombre de colonies	Nombre d'inserts	Nombre d'inserts
A	412	40 (10 %)	8 (8 %)
B	15	1 (6,5 %)	1 (6 %)
C	20	0 (0 %)	0 (0 %)
D	266	43 (16 %)	31 (11 %)

- A : ARN dénaturé par la chaleur, clonage d'ADNc double brin.
- B : ARN dénaturé par le OH Me Hg, clonage de l'hétéroduplex.
- C : ARN dénaturé par la chaleur, clonage de l'hétéroduplex.
- D : ARN dénaturé par le OH Me Hg, clonage de l'ADNc double brin.

Il n'est pas possible de comparer ici l'efficacité de chacune des méthodes d'obtention d'ADNc en termes quantitatifs. En effet, des quantités différentes d'ARN ont été utilisées selon les types de clonage; les expériences A et D, moins aléatoires et donnant classiquement plus de colonies ont été volontairement privilégiées. Par contre, sous l'aspect qualitatif, il apparaît évident que la dénaturation par le méthylmercure apporte de bien meilleurs résultats qu'une dénaturation thermique.

Cette efficacité supérieure résulte peut-être de l'existence de structures secondaires assez stables au sein de la molécule d'ARN viral. En effet, un traitement au Me OH Hg semble plus drastique que la chaleur pour l'élimination de ces structures (KACIAN et MYERS, 1976). L'absence d'inserts dans la préparation C pourrait s'expliquer par une dénaturation thermique insuffisante entraînant le décrochage précoce de l'AMV-RT au niveau des structures secondaires.

Sur les quarante plasmides recombinants renfermant des inserts supérieurs à 1,5 kpb, 16 ayant les tailles les plus élevées ont été analysés en détail afin d'établir leur carte physique de restriction.

Le plus gros plasmide, pLV 16.31, renferme un insert de 4,5 kpb correspondant à environ la moitié du génome viral. Une vérification de la nature virale de cet insert a été réalisée avant d'en pousser l'étude plus avant. Ensuite, sa cartographie physique a été établie. Puis cette carte a servi de base pour l'analyse des 15 autres plasmides retenus.

C- VERIFICATION DE LA NATURE VIRALE DE L'INSERT CONTENU DANS pLV 16.31:

Afin de s'assurer que la séquence de l'insert contenu dans pLV 16.31 était bien de l'ADNc viral, une sonde a été préparée par "nick-translation" à partir de ce plasmide et hybridée à de l'ARN viral fixé sur membrane.

Après électrophorèse, de l'ARN génomique de LvV est transféré sur membrane par capillarité; l'hybridation, positive à 65° C avec la sonde marquée, montre la complémentarité de séquence entre les deux types d'acides nucléiques (cf. figure n°46). Une sonde pBR 322 marquée de façon identique n'ayant, par ailleurs, donnée aucun signal d'hybridation avec le génome de LvV, on peut affirmer que l'insert contenu dans pLV 16.31 est bien de l'ADNc viral.

D- CARTOGRAPHIE DE pLV 16.31 ET DES QUINZE INSERTS DE GRANDE TAILLE:

La carte physique du plasmide pLV 16.31 a été établie pour les enzymes *Cla* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Bgl* II, *Sal* I, *Eco* RV, *Hind* III, *Eco* RI, *Bcl* I, *Xba* I, *Bam* HI, *Sma* I et *Kpn* I. Le choix de ces endonucléases de restriction a été dicté par le fait qu'elles ne coupent pas dans la séquence de pBR 322 (*Xba* I, *Bgl* II, *Bcl* I, *Sma* I, *Kpn* I) ou qu'elles génèrent une seule coupure dans ce plasmide (*Cla* I, *Eco* RV, *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Pst* I, *Sal* I, *Pvu* II). Ainsi, les profils électrophorétiques obtenus après digestion enzymatique de pLV 16.31 sont-ils plus aisés à interpréter.

Sur les cinq enzymes n'ayant pas de site dans pBR 322, trois (*Bcl* I, *Sma* I et *Kpn* I) ne linéarisent pas pLV 16.31, ce qui permet de déduire que ces sites n'existent pas non plus dans l'insert. Par contre, une coupure par *Xba* I ou *Bgl* II linéarise le plasmide indiquant la présence d'un site *Xba* I et d'un site *Bgl* II à l'intérieur de la séquence virale (cf. figure n°47).

L'hydrolyse de pLV 16.31 par *Eco* RV et *Cla* I générant deux fragments, il existe donc au sein de l'insert un site pour chacune de ces endonucléases.

Enfin, la digestion par *Pst* I ou *Eco* RI donne naissance à trois fragments, ce qui signifie qu'il y a trois sites dans pLV 16.31 pour chacune de ces enzymes. Comme la stratégie de clonage conduit à obtenir un site *Pst* I à chacune des extrémités de l'insert, il existe aussi un site *Pst* I dans la séquence clonée. De même le site *Eco* RI étant unique dans pBR 322, le résultat obtenu montre que l'ADNc renferme deux sites de reconnaissance pour cette enzyme.

Les tailles des différents fragments de restriction du plasmide pLV 16.31 générés par les endonucléases ayant au moins un site dans l'insert se trouvent présentées dans le tableau ci-dessous:

<u>Enzymes</u>	<u>Fragments obtenus (en kpb)</u>		
	A	B	C
Bgl II	8,8		
Xba I	8,8		
Eco RV	6,2	2,6	
Cla I	4,8	4,0	
Eco RI	6,0	2,3	0,5
Pst I	4,3	3,9	0,6

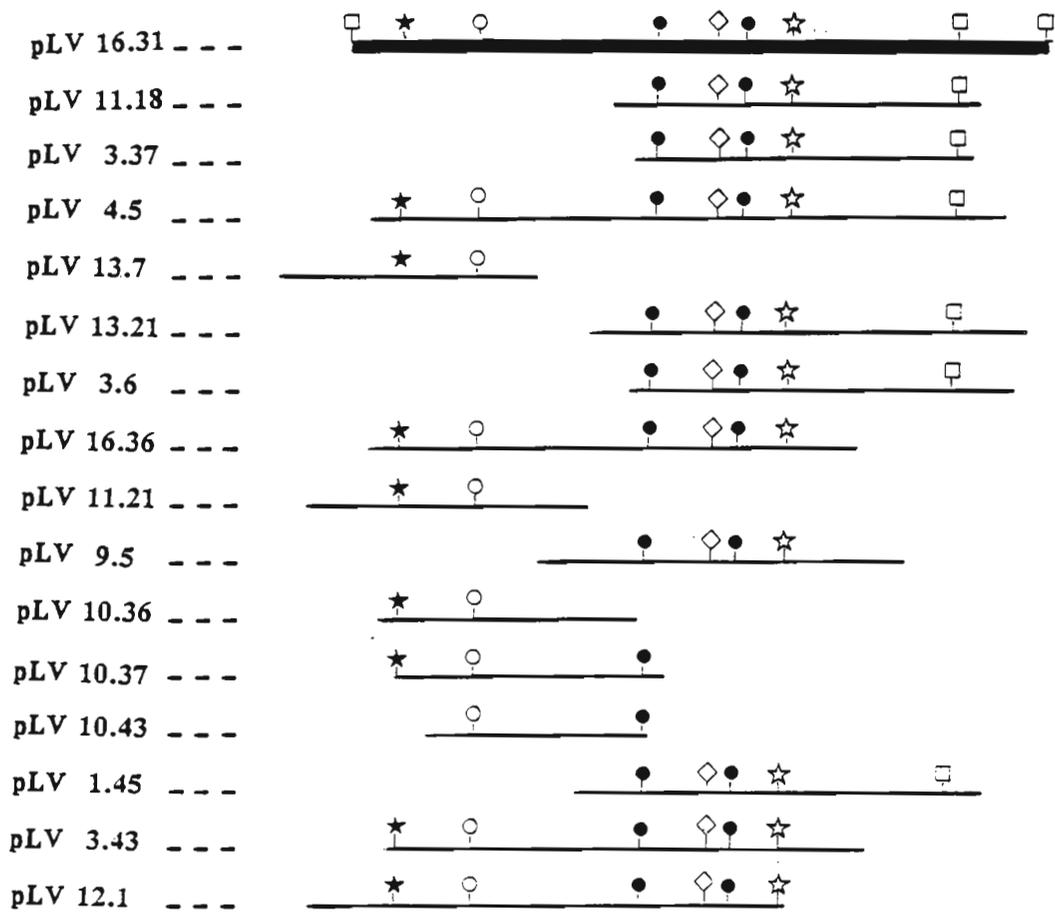
Par des séries de doubles digestions (cf. figure n°48), il a été possible de positionner les fragments de restriction les uns par rapport aux autres. Nous avons pu ainsi obtenir la carte physique du plasmide pLV 16.31. Par exemple, une double digestion *Pst* I-*Xba* I génère quatre fragments: pBR 322 linéarisé (4,36 kpb), un fragment de 0,6 kpb correspondant à *Pst* I-B et deux fragments de 3,0 et 0,9 kpb résultant de la coupure du fragment *Pst* I-A par *Xba* I à 0,9 kpb de l'une de ses extrémités (cf. figure n°48).

A l'aide d'autres doubles digestions, le site *Xba* I a pu être localisé sans ambiguïté ainsi que les six autres sites enzymatiques trouvés dans la séquence d'origine virale de pLV 16.31.

La cartographie physique des quinze autres plasmides sélectionnés a été menée par la recherche, dans un premier temps, des sites *Eco* RV et *Cla* I au sein de cette séquence d'origine virale. Ces deux enzymes ont été retenues parce qu'elles coupent à l'une ou l'autre des extrémités de l'insert de pLV 16.31. Les quinze inserts analysés possèdent soit l'un ou l'autre site soit les deux. Des coupures faisant intervenir l'une des quatre autres enzymes coupant dans l'ADNc viral (*Xba* I, *Eco* RI, *Bgl* II et *Pst* I) indiquent, avec une très forte probabilité, si ces inserts correspondent à des séquences contenues dans pLV 16.31.

En effet, le génome viral à cloner correspond à moins de 10 kb. Or, pour une si petite taille, il serait exceptionnel que deux inserts plasmidiques ne soient pas au moins partiellement colinéaires lorsqu'une coupure par les mêmes enzymes de restriction génère un (ou des) fragment(s) de taille(s) identique(s) chez l'un et l'autre insert.

Les résultats de cette étude, consignés dans la figure n°49, indiquent que les quinze inserts sont, pour l'essentiel, compris dans la séquence de pLV 16.31. Seuls quatre clones, pLV 13.7, pLV 16.36, pLV 11.21, pLV 12.1, présentent du côté du site *Cla* I une extension inférieure à quelques centaines de nucléotides par rapport



Sites de restriction:

- ☆: Bgl II
- : Pst I
- : Eco RI
- : Xba I
- ◇: Eco RV
- ★: Cla I

Enzymes ne coupant pas dans
les séquences d'origine virale:

- Bam* HI
- Bcl* I
- Hind* III
- Kpn* I
- Pvu* II
- Sal* I
- Sma* I

1 kpb

Figure n°49: Carte physique de restriction des seize inserts de haut poids moléculaire

à l'insert de pLV 16.31.

E- SOUS-CLONAGE DE L'INSERT CONTENU DANS pLV 16.31:

Nous avons réalisé le sous-clonage de l'insert de 4,5 kpb de pLV 16.31 afin de disposer de plasmides portant des séquences plus courtes pouvant servir à produire des sondes nucléiques correspondant à différentes régions du génome viral. L'obtention de ces plasmides s'avère également nécessaire pour le séquençage de LvV.

Dans cette optique, différents fragments générés par une série de digestions enzymatiques de l'insert d'origine virale contenu dans pLV 16.31 ont été clonés dans la séquence "polylinker" du plasmide pUC 19. Ce vecteur a été en effet choisi parce qu'il contient une zone de clonage multiple permettant d'insérer des fragments d'ADN générés par de multiples enzymes.

Ce sous-clonage permet également d'éliminer les queues homopolymériques qui rendent impossible le séquençage direct dans pLV 16.31.

La digestion de pLV 16.31 par *Pst* I a coupé l'insert en deux fragments qui ont pu être intégrés séparément au site *Pst* I de pUC 19 déphosphorylé. Le plasmide contenant le fragment *Pst* I-B appelé pLV 16.31.2 (cf. figure n°50) possède une taille adéquate pour le séquençage (0,6 kpb). Plusieurs plasmides contenant le fragment *Pst* I-A appelé pLV 16.31.1 ont pu être obtenus (cf. figure n° 50). Une double digestion *Cla* I-*Sal* I (cf. figure n°51) a précisé leur orientation. Chez tous le site *Cla* I se situe du côté du site *Sal* I de pUC 19. L'impossibilité d'obtenir l'orientation inverse provient sans doute de phénomènes d'interactions stériques entre les molécules d'ADN.

A partir du plasmide pLV 16.31.1, qui contient le fragment *Pst* I-A, différents inserts ont été sous-clonés dans le vecteur pUC 19:

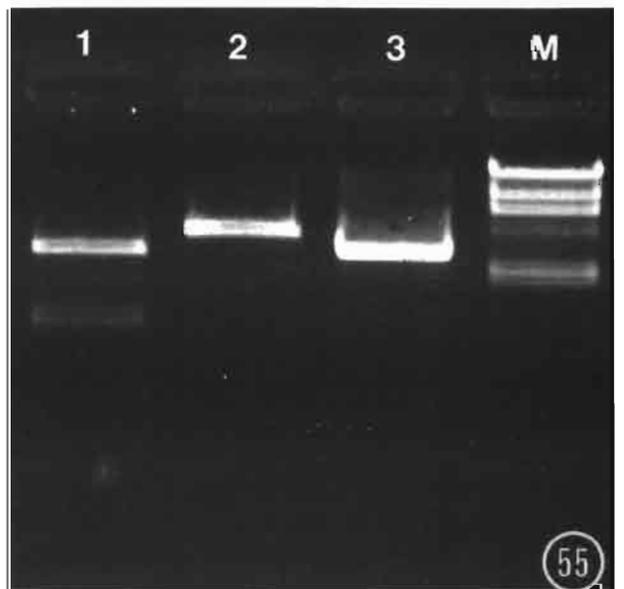
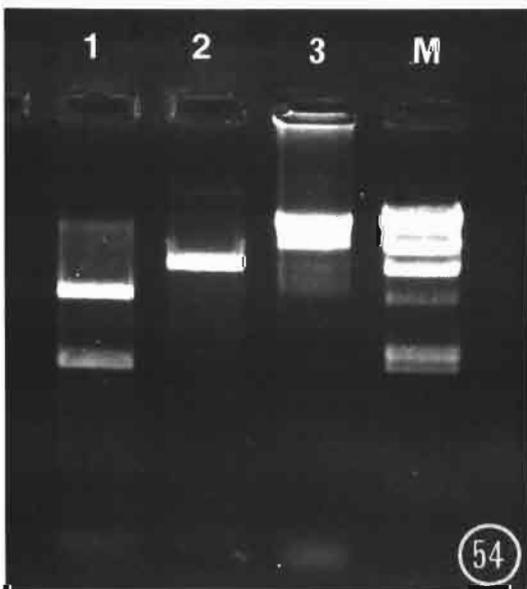
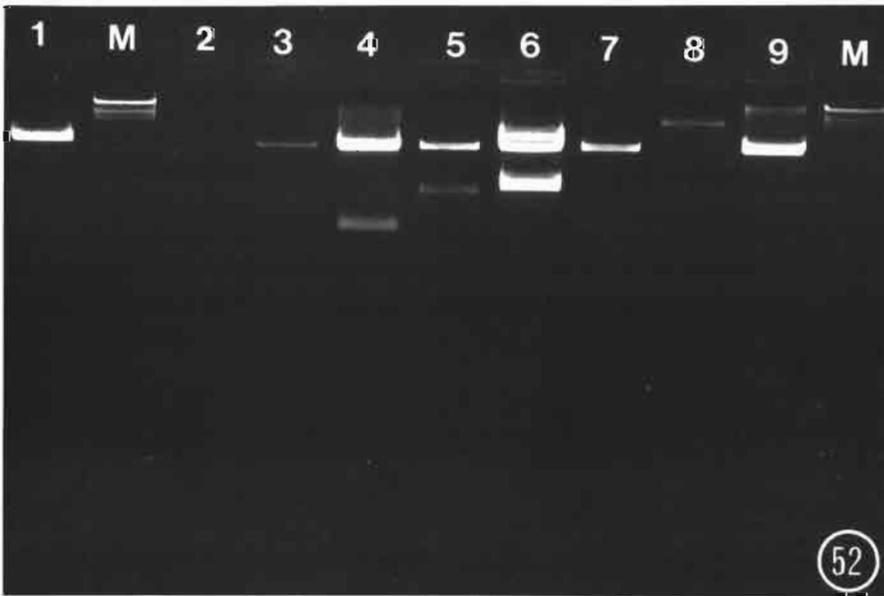
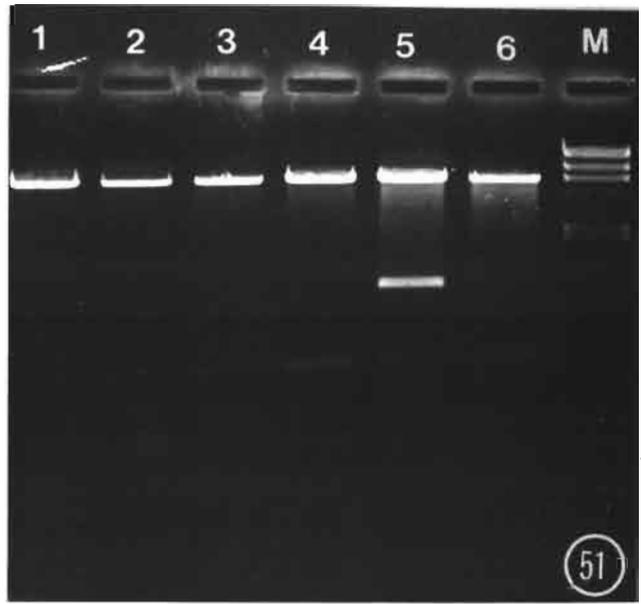
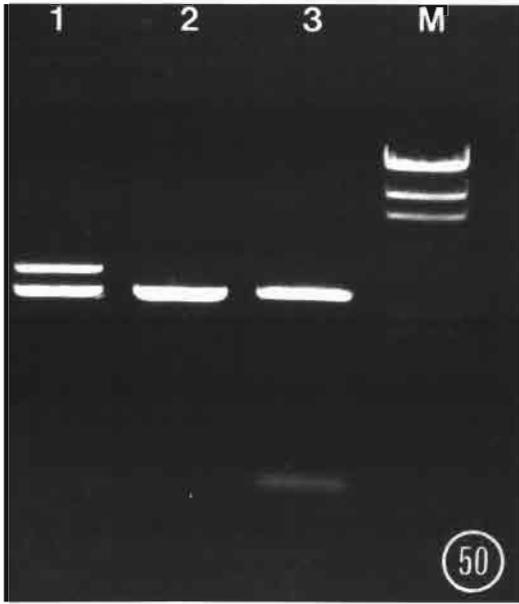
-le fragment *Eco* RI-*Eco* RI au site correspondant du vecteur.

-le fragment *Bgl* II-*Pst* I en l'insérant dans le vecteur ouvert par *Pst* I et *Bam* HI, les extrémités *Bam* HI et *Bgl* II étant compatibles.

-le fragment *Xba* I-*Eco* RI en l'insérant dans le vecteur digéré par ces mêmes enzymes.

-le fragment *Eco* RV-*Bgl* II dans le vecteur digéré par *Sma* I et *Bam* HI.

-enfin, le fragment *Cla* I-*Xba* I en l'insérant dans le vecteur digéré par *Xba* I et *Acc* I, *Acc* I et *Cla* I étant compatibles.



La figure n°52 présente les tailles des inserts contenus dans les différents sous-clones de pLV 16.31.

Du fait de la disparition de certains sites enzymatiques lors du sous-clonage, la libération de ces inserts ne se réalise pas nécessairement à l'aide des enzymes utilisées au cours du clonage.

F- RECHERCHE D'UNE SEQUENCE POLYADENYLEE DANS LES PLASMIDES RECOMBINANTS:

Puisque la transcription inverse a été amorcée avec un oligo(dT), il est logique de rechercher des séquences oligo(dA) dans les plasmides recombinants. La présence d'une telle séquence permettra d'orienter l'insert viral par rapport à l'extrémité 3' du génome et, par comparaison des cartes de restriction, d'orienter les différents inserts les uns par rapport aux autres. Nous avons donc recherché de tels plasmides polyA⁺ par hybridation sur filtre avec une sonde oligo(dT) 15-mère phosphorylée à l'extrémité 5' avec de l' α -³²P (activité: $3,4 \times 10^6$ cpm). La préparation de cette sonde suit le protocole donné au chapitre "Matériels et Méthodes".

Tous les clones testés renferment un insert de taille au moins égale à 500 nucléotides, libérable par digestion avec l'enzyme *Pst* I. Ils résultent d'une sélection des 100 plus gros plasmides faite parmi les 713 colonies analysées lors de la recherche d'inserts de grande dimension.

Sur 100 colonies testées, 12 se sont révélées fortement positives après autoradiographie. D'autres colonies montraient un signal plus faible indiquant la présence d'un polyA écourté n'autorisant pas de liaison avec beaucoup de molécules de sonde par molécule d'ADNc ou bien l'existence de liaisons au niveau de courtes séquences de polyadénylation intragénomiques.

Après une minipréparation suivie d'une digestion par l'enzyme *Pst* I, deux clones ont été retenus. Il s'agit de pLPA 7 qui, outre pBR 322 linéarisé, montre deux bandes, l'une proche de 2 kpb et l'autre de 0,6 kpb (cf. figure n°53); pLPA 8 possède, lui, un insert d'environ 1 kpb (cf. figure n°54). Les inserts contenus dans pLPA 7 et pLPA 8 présentent une taille peu importante; de ce fait, aucun site commun autre que *Pst* I n'a pu être trouvé entre ces deux plasmides et pLV 16.31.

Aucun des douze plasmides renfermant une séquence polyadénylée ne correspond à l'un des seize plus gros plasmides précédemment analysés

(paragraphe E).

Lors de l'analyse systématique des clones provenant de la transcription inverse, l'abondance relative des plasmides de petite taille dont l'insert possédait un site *Pst* I d'origine virale pouvait laisser supposer que ce site se trouvait proche de l'extrémité 3' terminale du génome de LvV. En effet, cela signifie que la partie de la séquence virale comportant le site *Pst* I a déjà été transcrite même lorsqu'interviennent des arrêts précoces de l'AMV-RT, c'est-à-dire lorsque l'enzyme se décroche à proximité de l'extrémité 3'. pLV 16.31 qui possède le site *Pst* I n'a pourtant pas hybridé avec la sonde indiquant soit qu'il n'englobait pas la séquence de polyadénylation soit que cette dernière n'était pas assez longue pour induire un fort signal d'hybridation. Cependant, la faible différence de taille des fragments engendrés par *Pst* I chez les plasmides polyA⁺ et chez pLV 16.31 laisse supposer que ce dernier plasmide contient une séquence toute proche de l'extrémité 3' terminale.

G- DISCUSSION:

1- Taille des ADN clonés:

Après la transcription inverse de l'ARN de LvV, la majorité des plasmides obtenus ne comportent des inserts que de quelques centaines de nucléotides. Cela rejoint ce que l'on observe le plus fréquemment dans ce type d'expérience, les petits produits étant les plus abondants. Ils résultent de la transcription de molécules fragmentées, ou bien souvent d'un décrochage de l'enzyme en cours de synthèse. Ainsi, RUSSO et coll. (1988), partant de 10 µg d'ARN de CyRSV ("Cymbidium ringspot virus"), dont la taille atteint 4,7 kb, obtiennent 38 recombinants dont les inserts s'échelonnent entre quelques centaines de paires de bases et 3,8 kpb.

Au sein d'une même famille de virus, et malgré les homologies de séquences souvent importantes, les ARN génomiques sont parfois transcrits avec des efficacités très différentes. Par exemple, lors du clonage du picornavirus responsable de l'hépatite virale A chez l'homme, (HAV. 7,5 kb), LINEMEYER et coll.(1985) obtiennent des tailles comprises entre 0,5 et 2,5 kb lors du clonage du premier brin alors que dans les mêmes conditions on peut obtenir des inserts de 4 kpb lorsque l'on part de l'ARN du poliovirus (VAN DER WERF, 1984). Précédemment, en suivant un protocole légèrement différent, VON DER HELM et coll. (1981) ne rapportaient la synthèse que de fragments proches de 1kpb pour HAV. La dénaturation soit thermique soit chimique de l'ARN ne change pas significativement la longueur des transcrits obtenus pour ce virus (LINEMEYER et coll., 1985). La raison pour laquelle des produits plus longs ne sont pas observés reste inconnue. Dans le cas de LvV si aucun insert ne représente la totalité du génome, les tailles obtenues se situent dans un créneau très favorable par rapport aux résultats classiquement rapportés. La moitié du génome est d'ores

et déjà clonée.

2- Séquences transcrites de l'ARN viral:

Un fait important qu'il faut signaler est, qu'à la différence de ce qui arrive fréquemment, il n'y a pas, semble-t-il une couverture de la totalité du génome de LvV pour l'ensemble des inserts, tout au moins pour ceux ayant une taille supérieure à 1 kpb. L'AMV-RT semble n'avoir pas transcrit les régions du génome situées au-delà des quatre ou cinq mille premiers nucléotides. L'analyse des plasmides recombinants n'ayant révélé aucun insert de taille intéressante correspondant à une zone située au-delà de cette région, on peut donc supposer que la transcription a pris fin, au mieux, à ce niveau du génome. On pourrait penser que la réaction a été arrêtée trop tôt mais les temps d'incubation paraissent suffisamment longs si l'on s'en réfère aux données de la littérature ou à l'activité polymérisique de l'AMV-RT. En effet, après une heure, l'essentiel des molécules d'ADNc correspondant à la totalité de l'ARN a été synthétisée et il n'y a ensuite production que de petits inserts (KACIAN et MYERS, 1976).

Pour expliquer que seule une même région du génome ait été transcrite par l'AMV-RT, plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

+D'abord un décrochage de la transcriptase inverse en une zone préférentielle située à environ 5 kb à partir de l'extrémité 3' et due à l'existence d'une séquence nucléotidique particulière ou à la conformation de l'ARN dans cette zone. HILLEBRANDT et coll. (1985) ont cependant démontré que lors de la synthèse de l'ADNc par l'AMV-RT, les arrêts au cours de la réaction de polymérisation sont plutôt dûs à la séquence nucléotidique de la matrice qu'aux effets de certaines structures secondaires comme les épingles à cheveux. En effet, ces dernières ne seraient responsables que de moins de la moitié des fins d'élongation.

+Une autre hypothèse rendant compte de l'arrêt de la transcription serait que, malgré les précautions prises, des contaminations aient pu intervenir. Ainsi, dans les différents tampons ou dans la transcriptase inverse (dont on sait qu'elle possède une activité ribonucléasique H endogène), des nucléases sont parfois présentes. Lors d'une incubation pendant une durée importante à une température à laquelle les réactions chimiques d'hydrolyse se déroulent très rapidement, quelques traces de ribonucléases suffisent à rendre impossible l'obtention de transcrits totaux. Au cours du temps, le nombre de coupures au sein des chaînes d'ARN ne fait que s'amplifier. Les zones déjà transcrites, donc bicaténaires, étant protégées la probabilité que se produise une coupure dans une zone donnée est d'autant plus importante que cette zone est située vers l'extrémité 5'.

3- Remarques sur le clonage de l'extrémité 3' de l'ARN viral:

Une autre observation fréquemment faite est que les inserts récupérés ne contiennent que rarement l'amorce à partir de laquelle ils ont été transcrits. Au cours de notre travail, nous avons constaté que moins de 20 % des inserts égaux ou supérieurs à 1 kpb hybrident avec l'oligo(dT).

Parallèlement, mais de façon indépendante, **RACANIELLO et BALTIMORE (1981)** et **VAN DER WERF et coll. (1981)** réalisent le premier clonage moléculaire de l'ARN du poliovirus type 1. Ces derniers auteurs obtiennent 800 colonies contenant des inserts dont seuls 10 % hybrident avec une sonde spécifique de l'extrémité 3'. Ils peuvent obtenir la carte de restriction de 99 % du génome en choisissant 4 des clones obtenus. L'analyse de l'ensemble des clones montrent qu'ils recouvrent la totalité du génome viral bien qu'ils aient tous été amorcés avec de l'oligo(dT). Signalons, en outre, que la taille du plus gros insert est 3,2 kpb.

CANN et coll. (1985) notent aussi la sous-représentation des clones portant des séquences de l'extrémité 3' lors du clonage du poliovirus type 3. Ce phénomène se retrouve également lorsque l'amorce est complémentaire d'une séquence interne de l'ARN viral et non plus d'un polyA terminal. Ainsi, **LINEMEYER et coll. (1985)** finissent par obtenir 97 % du génome en réalisant une extension par amorce. Mais, là encore, sur 37 clones sélectionnés (entre 0,3 et 4,2 kpb), seuls 4 hybrident avec l'amorce.

4- Cas du clonage des hétéroduplex:

Lors de notre étude, le clonage des hétéroduplex s'est traduit par l'obtention d'un nombre moins élevé de recombinants que le clonage des ADN bicaténaires. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par d'autres auteurs (**VAN DER WERF, 1981**).

L'avantage de cette technique résulte dans le fait qu'elle augmente considérablement la probabilité de cloner les extrémités 5' de longs ARN et que les transcrits obtenus possèdent, en général, des tailles plus importantes. Par exemple, **CANN et coll. (1983)** notent lors du clonage du poliovirus de type 3, que beaucoup de clones ne comportent que des inserts inférieurs à 1 kpb et cela quelque soit la technique employée, c'est-à-dire l'insertion dans le vecteur d'un double brin d'ADN ou d'un hétéroduplex. Cependant, par cette dernière méthode, les plus gros inserts ont une taille de 3,8 et 3,7 kpb tandis que dans l'autre cas, ils ne mesurent que 2 et 1,7 kpb.

L'existence possible d'un petit peptide lié à l'extrémité 5' du génome viral n'a pas nécessité de traitement préalable à la protéinase K lors des expériences

conduisant à l'insertion d'hétéroduplex dans les plasmides. En effet, la littérature rapporte que le VPg des différentes souches de poliovirus (KITAMURA et coll., 1981; VAN DER WERF et coll., 1981), de rhinovirus (VAN DER WERF et coll., 1981), etc... n'interfère pas avec l'emploi de cette stratégie de clonage. Nous avons, en effet, obtenu des inserts en clonant directement des hétéroduplex non traités à la protéinase K.

Le traitement des hybrides ARN-ADN est préférentiellement réalisé à l'aide de la RNase T2 plutôt qu'avec l'action conjointe des RNases A et T1. En effet, en utilisant cette seconde modalité, VAN DER WERF (1981) n'obtient pas de plasmides comportant l'extrémité 3' virale. Les RNases A et T1 n'hydrolysent pas les parties excédentaires du polyA, c'est-à-dire non hybridées avec l'oligo(dT); les plasmides ayant intégré une telle structure semblent ne pas pouvoir être réparés par les bactéries. Par contre, la RNase T2 qui rogne le polyA jusqu'à un niveau où il est hybridé avec l'amorce permet d'obtenir un hétéroduplex dont l'extrémité polyadénylée est une extrémité à bouts francs. C'est donc cette dernière méthode qui a été retenue pour le clonage des hétéroduplex du virus de *Latoia viridissima*.

En conclusion, dans le cas du clonage moléculaire de LvV, les tailles moyennes des inserts ayant pour origine un hétéroduplex paraissent effectivement supérieures à celles provenant d'ADN intégré sous forme bicaténaire. Par contre, l'absence de transcrits importants localisés dans la partie de l'ARN viral localisée en 5' n'a pas permis de bénéficier du second avantage de la technique c'est-à-dire le clonage de l'extrémité 5' terminale du génome.

5- Origine des difficultés de clonage des ARN viraux:

KACIAN et MYERS (1976) évoquent plusieurs raisons pour expliquer que l'AMV-RT ne synthétise pas d'ADNc totaux à partir de grands ARN messagers.

D'abord, il peut exister des sites de liaison internes pour l'amorce ce qui ne permettra pas la transcription de toute la région située en 3' de cette amorce. Des fins de synthèse interviennent lorsque la polymérase rencontre certaines séquences ou certaines structures secondaires. Dans la stratégie que nous avons utilisée, la synthèse du deuxième brin se fait en rajoutant directement l'ADN-polymérase I au mélange réactionnel sans qu'il y ait préalablement extraction phénolique comme certains auteurs le préconisent. Cela permet d'avoir présent dans le milieu deux types de polymérases. Or, les travaux d'HILLEBRANDT et coll. (1985) ont mis en évidence que les séquences nucléotidiques induisant des décrochages de l'ADN-polymérase I de la matrice étaient différentes de celles produisant le même effet chez l'AMV-RT. Ainsi, la présence concomitante des deux enzymes est-elle un facteur favorisant l'obtention de plus grands transcrits, l'activité de synthèse de l'une pouvant se trouver palliée par celle de l'autre.

KACIAN et MYERS (1976) rappellent aussi que des activités nucléasiques peuvent ne pas se révéler dans les gels de contrôle mais agir dans les conditions particulières de la transcription inverse. De plus, certaines nucléases peuvent être

spécifiques de structures particulières qui se forment exclusivement lors de la réaction de polymérisation. Enfin, il existe toujours des ARN plus ou moins dégradés au sein de la population à transcrire et ces ARN entrent en compétition avec les molécules intactes.

D'autres explications sont parfois avancées comme la présence de molécules d'AMV-RT plus ou moins altérées qui ne peuvent assurer la production de grands fragments d'ADNc

KACIAN et MYERS (1976) montrent que lors de la synthèse d'ADNc à partir d'ARN polioviral, les transcrits de petite taille s'obtiennent tardivement dans la réaction, lorsque la synthèse des plus grands produits a cessé. De plus, ils observent qu'au fur et à mesure de la synthèse, l'ARN se dégrade, ce qui pourrait expliquer la présence de ces nombreux petits inserts de fin de réaction.

6- Conclusion:

D'après les tailles des inserts obtenus au cours de notre travail, il semble que l'AMV-RT puisse transcrire la partie 3' présumée du génome de LvV sur des portions assez importantes, comme c'est le cas, par exemple, pour l'ARN polioviral, sans décrochage prématuré. Par contre, l'absence de fragments d'ADNc dépassant 1 kpb correspondant aux régions situées vers l'extrémité 5' traduit des difficultés particulières de transcription comme il en existe pour HAV. Mais, dans le cas de l'ARN de LvV, comme dans celui d'HAV, les causes de ce phénomène demeurent inexplicables. Cependant, cet état de fait explique pourquoi le clonage de l'hétéroduplex n'a pas apporté de résultats qualitativement supérieurs à ceux donnés par l'intégration d'ADN bicaténaire dans les plasmides.

II- PRODUCTION DE SONDAS POUR L'ETUDE DU VIRUS DE *LATOA VIRIDISSIMA*:

Différentes parties de l'insert viral contenu dans pLV 16.31 ont été sous-clonées dans les plasmides pUC 19 et pGem 2. A partir des vecteurs contenant ces séquences d'origine virale, il est possible de produire des sondes à ADN bicaténaires marquées soit radioactivement soit à l'aide de nucléotides biotinylés. A partir des séquences clonées dans pGem 2 on peut aussi synthétiser des sondes à ARN monocaténaires radiomarquées (ribosondes).

L'utilisation de ces diverses sondes peut-être variée; nous les avons employées pour rechercher des homologies de séquences existant entre virus supposés apparentés, pour trouver le brin génomique de l'ADNc de LvV ainsi que pour détecter de faibles quantités de virus.

A- CONSTRUCTION DU PLASMIDE pGem Lv:

Afin de pouvoir produire des sondes d'ARN simple brin, nous avons utilisé le plasmide pGem 2 qui porte en orientation inverse, deux promoteurs spécifiques d'ARN-polymérase-ADN-dépendantes séparés par une séquence de clonage multiple (cf. figures n°10 et n°11).

La construction du plasmide pGem Lv a été réalisée par l'insertion du fragment Bgl II-Pst I de pLV 16.31 dans le plasmide pGem 2 ouvert aux sites *Bam* HI et *Pst* I. La taille de ce fragment de 1,2 kpb représente un bon compromis entre l'intérêt d'incorporer beaucoup de radioactivité afin d'augmenter l'intensité du signal d'hybridation et la nécessité de ne pas travailler avec des sondes trop longues qui, plus fragiles, deviennent difficiles à produire et à manipuler.

Dans notre construction, le site *Pst* I est conservé et le site *Bam* HI, dont les extrémités sont cohésives avec *Bgl* II, se transforme en site *Xho* III. La présence de l'insert dans les colonies transformées est contrôlée par une double digestion *Eco* RI-*Pst* I des plasmides (cf. figure n° 55). Le plasmide recombinant ainsi obtenu, dénommé pGem Lv, a servi à la production de sondes ADN bicaténaires et de ribosondes.

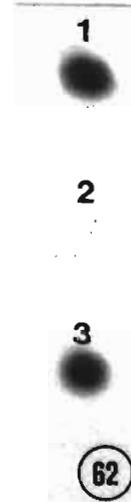
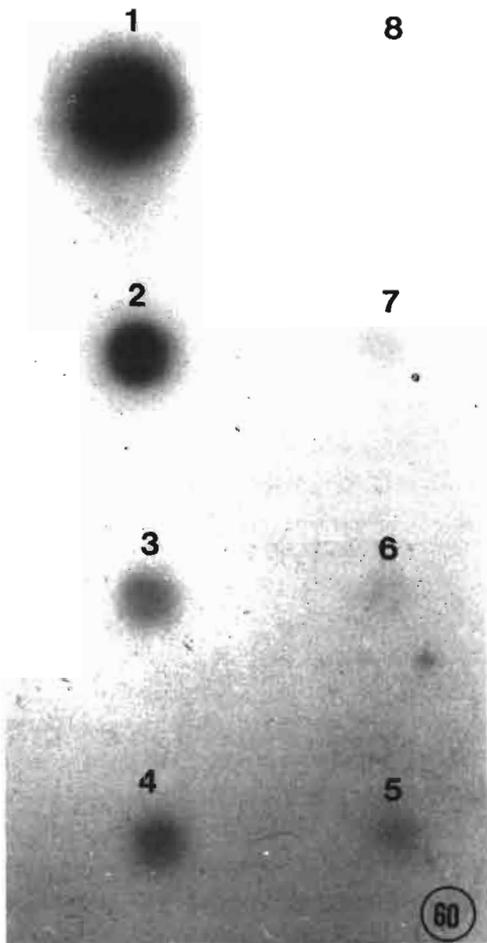
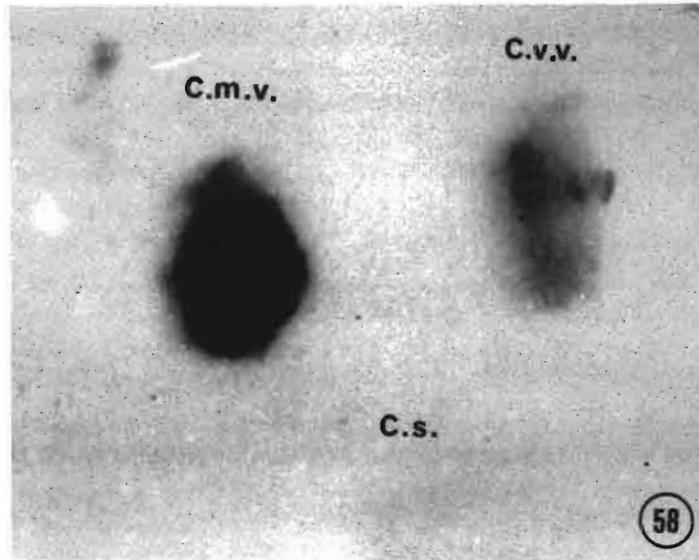
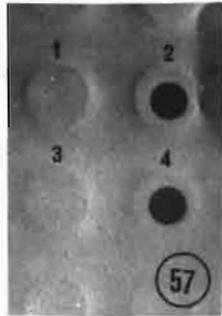
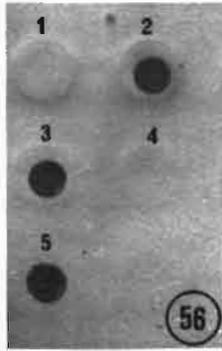
B- UTILISATION DU PLASMIDE pGem Lv COMME SONDE ADN BICATENAIRE:

1- Recherche d'homologies de séquence entre LvV et CrPV:

Afin de positionner le virus étudié par rapport aux Picornaviridae d'insectes, nous avons recherché s'il existait des homologies de séquences entre les génomes viraux de LvV et de CrPV.

La sonde utilisée est le plasmide pGem Lv renfermant l'insert Bgl II-Pst I de pLV 16.31 marqué à la biotine par déplacement de césure. La température de 42° C à laquelle a été réalisée l'hybridation correspond à des conditions d'hybridation faiblement restrictives, compte tenu de la salinité choisie (0,9 M); cela permet l'hybridation entre séquences nucléotidiques ne présentant qu'une complémentarité partielle.

Dans ces conditions expérimentales, une analogie apparaît entre les génomes viraux de CrPV et de LvV (cf. figures n°56 et n°57). La sonde utilisée représente probablement la région 3' de ces génomes. Cette zone correspond, pour les



Picornaviridae, à la partie la plus conservée du point de vue évolutif entre les différents membres de cette famille (REANNEY, 1982).

2- Application au diagnostic viral:

Le plasmide pGem Lv a été marqué par déplacement de césure, soit avec un nucléotide biotinylé soit avec un nucléotide radioactif.

L'utilisation de la sonde radiomarquée se traduit, après autoradiographie, par l'apparition d'un fort signal d'hybridation chez les chenilles virosées de *Latoia viridissima* directement écrasées sur les filtres d'hybridation (technique de "squash-blot") (cf. figure n°58)

Avec un marquage non radioactif, les tests de sensibilité ont indiqué que le seuil de détection se situait entre 10^{-6} et 10^{-7} D.O. de virus, ce qui correspond, respectivement à 480 et 48 pg d'ARN viral (cf. figure n°59).

C- UTILISATION DU PLASMIDE pGem Lv POUR LA PRODUCTION DE RIBOSONDES:

1- Recherche du brin génomique:

Pour déterminer lequel des deux brins d'ADNc correspond au génome viral, il est nécessaire de produire à partir du plasmide pGem Lv, les deux types de ribosondes possibles et d'hybrider chacune avec l'ARN viral. Seule la ribosonde de séquence complémentaire à l'ARN viral (ARNc) doit donner un signal positif.

Etant donnée la position de l'insert à l'intérieur de la zone de clonage multiple, la synthèse de la sonde assurée par le promoteur de la polymérase SP6 se fait après ouverture du plasmide en *Pst* I. Celle sous le contrôle du promoteur de la polymérase T7 nécessite une digestion préalable par l'enzyme *Eco* RI (cf. figure n°60).

Dans les deux cas, la séquence non virale des transcrits reste inférieure à vingt nucléotides ce qui, en regard de la taille de la sonde n'interfère pas sur la stabilité des duplex d'acide nucléique lors de l'hybridation.

La figure n°61 présente l'électrophorèse du mélange réactionnel résultant de la transcription suivie d'un traitement à l'ADNase. En éliminant la matrice ADN on augmente la sensibilité de la détection parce qu'il n'y a plus d'hybridation possible entre cet ADN et l'acide nucléique-cible.

En marquant les ribosondes à l'aide d' α - ^{32}P -rCTP et en partant de 200 ng de plasmide pGem Lv, la radioactivité spécifique obtenue atteint environ 10^9 cpm/ μg de plasmide.

Nous avons vu que l'insert viral contenu dans pGem Lv se trouve sous forme bicaténaire entre les promoteurs T7 et SP6 et donc que deux types de sondes peuvent être synthétisées selon que l'on utilise l'un ou l'autre de ces promoteurs. Le brin d'ADN homologue de l'ARN viral donnera une ribosonde (de type ARN négatif ou "anti-messenger") s'hybridant avec cet ARN viral. L'autre brin est à l'origine d'une ribosonde de même polarité que le génome de LvV et, donc, il n'y aura pas d'hybridation avec ce dernier.

Deux filtres ayant reçu les mêmes dépôts d'ARN viral et d'ARN hétérologue ont été hybridés, parallèlement, avec chacune des sondes produites.

Les résultats obtenus montrent que c'est la portion d'ADN sous le contrôle du promoteur T7 qui correspond au brin "messenger" de l'ADNc (cf. figure n°62) puisque seule cette ribosonde T7 a hybridé avec l'ARN viral déposé sur le filtre.

2- Application au diagnostic viral:

Des suspensions du virus de *Latoia viridissima* déposées sur filtre sont hybridées avec une sonde ARN simple brin marquée au phosphore 32. Cette ribosonde est transcrite par la polymérase T7 à partir du plasmide pGem Lv ouvert au site *Eco* RI.

Lors de nos expériences, la sensibilité de la technique atteignait environ 50 pg mais le fait de déposer la totalité du virus sur le filtre, et non pas uniquement l'acide nucléique, modifie sans doute le seuil de détection. En effet, il a été démontré que la présence de protéines sur le filtre réduit l'intensité du signal d'hybridation (MEINKOTH et WOHL, 1984).

D- DISCUSSION:

1- Sondes ADN bicaténaires:

Les systèmes de détection faisant appel à des sondes marquées par "nick-translation" sont fondés sur un marquage soit radioactif soit "froid". Les résultats que nous avons obtenus dans ce dernier cas correspondent à une sensibilité comparable à celle classiquement rapportée pour les sondes biotinylées qui peuvent détecter jusqu'à 100 pg d'acide nucléique et même moins. L'intérêt de ce type de sondes, outre leur facilité de préparation, réside principalement dans leur stabilité (plusieurs mois).

La technique de "squash-blot", outre sa simplicité, présente l'avantage d'être rapide puisque CZOSNEK et NAVOT (1988) réduisent les temps de préhyridation et d'hybridation à, respectivement, 1 h et 5 h sans perdre de sensibilité. Il suffit donc de moins de 24 h pour disposer d'un résultat sur les échantillons testés. Sur les grosses chenilles de *Latoia viridissima*, la détermination par cette méthode de la quantité de virus présente paraît assez aléatoire parce que seule une fraction des tissus larvaires imbibe le filtre lors de l'écrasement. Ensuite, la répartition des virions chez un hôte est souvent hétérogène, avec des localisations préférentielles à tel ou tel tissu. L'information à retirer est donc, principalement, d'ordre qualitatif. Pour des larves de très petite taille, encore dans les premiers stades larvaires, cette méthode peut apporter un bon complément à l'ELISA, car on peut traiter sur un même filtre toute une colonie individu par individu, pour rechercher la présence de l'infection virale à des stades où une grande partie du génome viral n'est pas encore encapsidée.

2- Ribosondes:

Depuis ces dernières années, on note un intérêt accru pour l'utilisation des ribosondes en vue de la détection des virus à ARN et, principalement des Picornaviridae (COVA et coll., 1988. COX et coll., 1984). Ce type de sondes permet de mettre en évidence les génomes viraux tant *in situ* (MITCHELL et coll., 1987. COX et coll., 1984) qu'après dépôts ou transferts sur membrane (COVA et coll., 1988).

Nous avons choisi d'insérer dans le plasmide pGem 2, un fragment d'ADNc de LvV dont la localisation au niveau du génome viral est telle que la spécificité de la ribosonde produite sera la plus large possible.

En effet, plusieurs études (KOPECKA et coll., 1987. COVA et coll., 1988) ont maintenant bien établi qu'en choisissant telle ou telle zone de l'ADNc viral servant à produire la ribosonde, il devenait possible d'en faire varier la spécificité. On peut ainsi construire des sondes uniquement dirigées contre une souche précise d'un virus ou, au contraire, disposer de ribosondes hybridant avec tous les membres d'un même groupe de virus. Les sondes ADN marquées par la technique de "nick-translation" ne permettent pas d'obtenir de telles spécificités (ROTBART, 1988).

Le choix de la séquence d'ADN qui a servi de sonde a été guidé par ce que l'on sait de l'organisation génomique des petits ribovirus proches de LvV, en particulier les Picornaviridae. Chez ce type de virus, les travaux de la dernière décennie ont montré que les régions codant pour la polymérase, situées en 3', sont les mieux conservées entre les différents membres du groupe (PALMENBERG, 1987). Cela s'explique par les contraintes de sélection importantes s'exerçant au niveau des protéines de fonction pour lesquelles un faible changement de séquence peut induire des changements conformationnels responsables de la perte

d'activité enzymatique. Dans le même ordre d'idée, c'est la protéase qui arrive en seconde position comme la protéine la mieux conservée.

Par contre, les protéines de structure présentent de multiples variations au sein même d'une "espèce" virale (HOLLAND et coll., 1982; STEINHAUER et HOLLAND, 1987).

Chez le poliovirus de la souche Sabin, cette protéase est codée par les nucléotides 5987 à 7669, soit environ 1,5 kpb (PALMENBERG, 1987). Chez le coxsackievirus B4, il y a 1387 nucléotides entre le codon d'origine (5906) et celui de fin (7293). Pour CrPV, KING et coll. (1987) montrent, par analogie de séquence avec les picornavirus de vertébrés, qu'il existe 242 nucléotides non codants en 3' avant d'arriver à la zone codant pour la polymérase. Cette région 3' non codante de CrPV possède une taille bien supérieure à celle des picornavirus de vertébrés (PALMENBERG, 1987).

En choisissant le fragment Bgl II-Pst I pour constituer la sonde, on évite certainement l'extrémité 3' non codante du virus de *Latoia viridissima* et on se trouve, avec une forte probabilité, pour la plus grande partie dans le gène de la polymérase avec, sans doute, un chevauchement sur celui de la protéase. On dispose ainsi d'une sonde dirigée contre les parties les plus stables du génome viral.

Sous nos conditions expérimentales, le seuil de détection avec la ribosonde Bgl II-Pst I atteint 50 pg et même moins. Il faut souligner qu'en partant de virions au lieu d'acide nucléique purifié, la sensibilité est réduite puisque les protéines (qui représentent 70 % de la masse des particules), interfèrent en se fixant elles aussi sur le filtre de manière covalente (MEINKOTH et WOHL, 1984). D'autre part, il semble peu probable que des pertes ne soient pas intervenues au cours du processus de "lyse-fixation" (tous les virions n'ont sans doute pas libéré leur acide nucléique et toutes les molécules d'ARN n'ont peut-être pas été fixées à la membrane). Malgré ces facteurs défavorables, la sensibilité, préservée pour l'essentiel, montre tout l'intérêt de ce type de sondes.

Dans des conditions plus favorables, c'est-à-dire en l'absence de protéines, il devient possible de détecter 10 pg d'ARN par échantillon (JOHNSON et MAC CRAE, 1988). Cela constitue l'un des principaux intérêts des ribosondes qui apparaissent ainsi 10 fois plus sensibles que des sondes analogues préparées par "nick-translation" (MELTON et coll., 1984; MITCHELL et coll., 1987).

Les principaux facteurs responsables de ce gain de sensibilité sont, d'une part, les hautes activités spécifiques que l'on peut obtenir pour ces ribosondes et, d'autre part, la stabilité supérieure des duplex ARN-ARN comparés aux hétéroduplex ADN-ARN (MEINKOTH et WOHL, 1984), ce qui permet de travailler en conditions plus restrictives et donc de réduire les interactions non spécifiques. De plus, il n'y a pas de possibilité de réhybridation de la sonde sur

elle-même, phénomène qui réduit la sensibilité des sondes bicaténaires. En utilisant une ribonucléase, on élimine l'excès de sonde accrochée au filtre mais non hybridée, ce qui réduit le bruit de fond et donc accroît la sensibilité (MEINKOTH et WOHL, 1984).

Ainsi, d'après l'organisation génomique supposée du virus LvV fondée sur ce que l'on connaît des virus les plus proches, la sonde construite porte sur la région la mieux conservée de l'ARN viral. Cela facilitera la recherche d'autres souches de ce virus parmi les différents insectes (ravageurs ou non) présents dans le même biotope que *Latoia viridissima*, ce qui apportera des renseignements importants sur la circulation du virus dans l'écosystème.

3- Conclusion:

En conclusion, le clonage moléculaire de l'ARN de LvV a permis la construction, à partir de zones choisies de l'ADNc, de différents types de sondes, chacune adaptée à des problématiques spécifiques.

Les unes, particulièrement sensibles (ribosondes) apporteront de précieux renseignements lors d'études plus approfondies du virus au laboratoire, notamment celles portant sur les aspects moléculaires de la maladie.

Les autres, (sondes biotinylées préparées par "nick-translation"), plus stables et plus facilement manipulables, représentent un outil d'investigation précieux pour rechercher la présence d'acide nucléique d'origine virale dans les échantillons ou pour tester les parentés géniques existant entre LvV et d'autres virus.

A la différence de la technique ELISA, fondée sur la détection des composants protéiques externes du virus, les sondes nucléiques reconnaissent des séquences virales de l'acide nucléique et peuvent donc être utilisées à certains stades précoces du cycle infectieux pendant lesquels la capsidie n'est pas encore présente.

CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I- CONCLUSIONS:

Au cours de notre étude du virus de *Latoia viridissima*, nous avons établi certaines données physico-chimiques de base sur ce virus permettant son identification et montrant son originalité. Toutefois, sa position taxinomique demeure incertaine. Si l'on considère le génome, les résultats acquis (taille et nature de l'acide nucléique, présence d'une séquence polyadénylée,...) le rapprochent plutôt des Piconaviridae d'insectes. Par contre, certains aspects de son organisation capsidaire (nombre de protéines, proportions respectives de ces protéines,...) ne se retrouvent pas chez les membres de cette famille. Cette difficulté à classer ce virus rejoint celles rencontrées pour un certain nombre de virus à ARN isolés chez les insectes (LONGWORTH, 1978). Moins de deux cents petits ribovirus sont actuellement rapportés, ce qui, vues les capacités évolutives de ces pathogènes (REANNEY, 1982), montre bien le peu de recherches engagées dans ce domaine, si l'on considère que les insectes représentent un nombre d'hôtes considérable et, par ailleurs, très diversifiés. Aussi l'on comprend bien que tel ou tel nouveau virus puisse ne pas s'intégrer au sein des trois ou quatre familles pour lesquelles quelques membres sont déjà répertoriés.

La mise au point d'un test de diagnostic sérologique permet d'appréhender au sein des populations naturelles de *Latoia viridissima* l'évolution de la virose au cours du temps. Ainsi, les enquêtes de terrain ont démontré que la mortalité observée chez l'hôte a bien pour origine l'agent viral. Utilisée sur le plan épidémiologique, la technique ELISA a donné de précieuses indications sur l'état sanitaire des populations du ravageur. En fonction de ces indications on peut donc décider du recours ou non à des traitements pesticides. *A fortiori*, ce test constitue également un bon moyen pour suivre l'impact de traitements à base de suspensions virales.

L'obtention de sondes nucléiques complète et amplifie les moyens de diagnostic disponibles pour mettre en évidence le virus. La sensibilité de ce type de sondes, particulièrement celles à ARN monocaténaire, permet la détection de très faibles quantités de virions. Un peu moins sensibles, les sondes biotinylées permettent de s'affranchir des problèmes de stabilité et des difficultés de manipulation des sondes radioactives.

Une meilleure connaissance du virus de *Latoia viridissima* et de ses modalités d'action passe par le choix judicieux de l'outil diagnostique le mieux adapté à la problématique abordée parmi les différents outils désormais disponibles.

II- PERSPECTIVES:

La poursuite de l'étude du virus de *Latoia viridissima* devrait s'orienter suivant deux axes complémentaires:

En premier lieu, il paraît nécessaire de réaliser une investigation fine, à l'aide des outils de la biologie moléculaire, de l'organisation génomique du virus.

C'est pourquoi il est du plus haut intérêt de poursuivre le clonage de LvV afin de disposer de la totalité du génome viral sous forme d'ADNc; cet objectif peut se réaliser en effectuant une extension par amorce ("primer-extension") à partir de l'ADNc déjà disponible, l'amorce correspondant à un oligonucléotide localisé dans la partie 5' de cet ADNc. Cela permettra d'étendre au génome tout entier le séquençage déjà engagé sur les sous-clones de pLV 16.31. Mais, surtout, un tel plasmide permettra d'aborder de manière plus aisée l'étude de l'organisation de l'ARN viral, tout particulièrement s'il se révèle infectieux.

En effet, des plasmides renfermant l'intégralité de la séquence nucléotidique de divers ribovirus de vertébrés ou de végétaux ont pu être construits au cours de ces dernières années. La plupart de ces plasmides se montrent infectieux et redonnent, après transfection de leur hôte, un virus en tout point semblable à la souche d'origine clonée. Ces constructions représentent de très puissants outils pour l'étude des aspects moléculaires de la multiplication virale. Sur un plan plus appliqué, on envisage déjà que ces constructions puissent, à terme, s'intégrer dans des traitements visant à réguler des populations naturelles d'animaux ou de végétaux.

Parallèlement, les sondes ADN et ARN disponibles permettent dès maintenant d'évaluer le degré d'homologie existant entre LvV et différents virus que l'on soupçonne assez proches. En particulier, l'utilisation des ribosondes dans l'étude des parentés entre les génomes viraux apporte généralement des données essentielles dans le domaine de la taxinomie (BODKIN et KNUDSON, 1985; PEDLEY et coll., 1985; BROWN et coll., 1988; DANGLEY et coll., 1988; GONZALEZ et KNUDSON, 1988). Les sondes nucléiques, surtout les sondes biotinylées préparées par "nick-translation" qui sont plus stables et plus facilement manipulables, constituent un outil d'investigation précieux pour rechercher la présence d'acide nucléique d'origine virale dans les échantillons biologiques. A la différence de la technique ELISA fondée sur la détection des composants

protéiques externes du virus, les sondes nucléiques reconnaissent des séquences génomiques virales et peuvent donc être utilisées à certains stades précoces du cycle infectieux au cours desquels la capsidie n'est pas encore présente.

Enfin, le surcroît de connaissances que l'on possède sur DCV et CrPV par rapport à d'autres virus analogues provient, pour une bonne part, de la capacité que l'on a eu de les produire aisément chez un large spectre d'hôtes et de lignées cellulaires. A l'instar de beaucoup de Limacodidae, aucun élevage sain de *Latoia viridissima* ne semble disponible à courte échéance. Aussi, la recherche d'un hôte de substitution ou de lignées cellulaires permissives constitue-t-elle un objectif prioritaire. Une excellente opportunité s'offre d'ailleurs avec la mise au point récente d'une première lignée cellulaire de *Latoia viridissima* à l'Institut International de Recherche Scientifique pour le Développement à Adiopodoumé (LERY, communication personnelle).

Outre l'intérêt fondamental évident, un développement des connaissances disponibles sur LvV représente un préalable à toute utilisation rationnelle et sûre de ce virus dans le cadre d'une lutte biologique.

En second lieu, il convient de privilégier les études de terrain et tout particulièrement l'épidémiologie. Les recherches bibliographiques mettent bien en évidence une carence manifeste dans ce domaine chez les petits ribovirus.

En effet, les interactions entre les dynamiques des populations de l'hôte et la présence de l'agent pathogène restent totalement négligées. Pourtant, ce thème de recherche dans lequel nous nous sommes engagés au cours de notre travail, constitue un préalable incontournable à tout développement de méthodes de contrôle des ravageurs faisant intervenir des virus. A la suite de cette étude les outils techniques indispensables (sondes nucléiques, test ELISA) sont désormais disponibles pour poursuivre l'étude de la virose de *Latoia viridissima*.

Il s'avère donc nécessaire de contrôler l'état sanitaire des populations du ravageur, d'abord en étudiant l'impact du virus dans les conditions naturelles en fonction des différents facteurs du milieu, ensuite en analysant les effets de traitements à base de virus appliqués sous différentes conditions et à diverses périodes aux chenilles de *Latoia viridissima*.

L'approche de terrain réalisée au cours de notre travail nous a convaincu que les efforts engagés dans cette voie ne doivent pas s'interrompre. Au contraire, une action soutenue et programmée s'avère indispensable à l'obtention de données qualitativement et quantitativement exploitables. Cette démarche appliquée au modèle *Latoia viridissima*-LvV, doit être transposée aux virus présents chez d'autres ravageurs à chaque fois que l'on vise à utiliser ces pathogènes dans le

cadre d'une lutte biologique.

Le développement des recherches suivant les deux axes évoqués plus haut permettront d'effacer progressivement les contradictions existant :

- sur le plan fondamental, entre le peu de connaissances actuellement disponibles sur ces petits virus à ARN d'insectes et leur abondance numérique,
- sur un plan plus appliqué, entre les lacunes que l'on a sur leur écologie et leur possible utilisation en lutte biologique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AVIV H., LEDER P. 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 1408-1412.

BAILEY J.M., DAVIDSON N. 1976. Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 70, 75-85.

BAILEY L. 1976. Viruses attacking the honey bee. *Adv. Virus Res.*, 20, 271-304.

BAILEY L., SCOTT H.A. 1973. The pathogenicity of Nodamura virus for insects. *Nature (London)*, 241, 545.

BAILEY L., WOOLS R.D. 1974. Three previously undescribed viruses from the honey bee. *J. Gen. Virol.*, 25, 175-186.

BAILEY L., GIBBS A.J., WOODS R.D. 1963. Two viruses from adult honey bees *Apis mellifera* (Linnaeus). *Virology*, 21, 390-395.

BASHIRUDDIN J.B., MARTIN J.L., REINGANUM C. 1988. Queensland fruit fly virus, a probable member of the Picornaviridae. *Arch. Virol.*, 100 (1-2), 61-74.

BELLET A.J.D., FENNER F., GIBBS A.J. 1973. The viruses *In Viruses and Invertebrates* (A. J. Gibbs Ed.), p. 41-88. North Holland Publ., Amsterdam.

BERNSTEIN H.D., SARNOW P., BALTIMORE D. 1986. Genetic complementation among poliovirus mutants derived from an infectious cDNA clone. *J. Virol.*, 60, 1040-1049.

BIENZ K., EGGER D., RASSER D., BOSSART W. 1983. Intracellular distribution of poliovirus proteins and the induction of virus-specific cytoplasmic structures. *Virology*, 131, 39-48.

BIRNBOIM H.C., DOLY J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7 (6), 1513-1523.

BODKIN D.K., KNUDSON D.L. 1985. Sequence relatedness of Palyam virus genes to cognates of Palyam serogroup viruses by RNA/RNA blot hybridization. *Virology*, 143, 55-62.

BOLIVAR F., RODRIGUEZ R.L., GREENE P.J., BETLACH M.C., HEYNECKER H. L., BOYER H.W., CRUSH J.H., FALKOW S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multiple cloning system. *Gene*, 2, 95-113.

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

- BROWN F., HULL R.** 1973. Comparative virology of the small RNA viruses. *J. Gen. Virol.*, 20, 43-60.
- BROWN S.E., GONZALEZ H.A., BODKIN D.K., TESH R.B., KNUDSON D.L.** 1988. Intra-serogroup and inter-serogroup genetic relatedness of orbiviruses. 2. Blot hybridization and reassortment in vitro of epizootic haemorrhagic disease serogroup bluetongue type 10 and Pata viruses. *J. Gen. Virol.*, 69, 135-148.
- CHAO Y.-C., YOUNG S.Y., KIM K.S.** 1985. Cytopathology of the soybean looper, *Pseudoplusia includens*, infected with the *Pseudoplusia includens* icosahedral virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 45, 16-23.
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N.** 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroforme extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- CLARK M.F.** 1970. Polyethylene-glycol solubility gradients, a new and rapid technique for investigations of plant viruses. *Virology*, 42, 246-247.
- CLARK M.F., ADAMS A.N.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.*, 34, 475-483.
- COOPER P.D.** 1978. Picornaviridae. *Intervirology*, 10, 165-180.
- COVA L., KOPECKA H., AYMARD M., GIRARD M.** 1988. Use of cRNA probes for the detection of enteroviruses by molecular hybridization. *J. Med. Virol.*, 24 (1), 11-18.
- COX K.H., DE LEON D.V., ANGERER L.H., ANGERER R.C.** 1984. Detection of mRNAs in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev. Biol.*, 101, 485-502.
- CROOK N.E., PAYNE C.C.** 1980. Comparison of three methods of ELISA for baculoviruses. *J. gen. Virol.*, 46, 29-37.
- CZOSNEK H., NAVOT N.** 1988. Virus detection in squash-blots of plants and insects : applications in diagnostics, epidemiology and breeding. *In* Biotechnology in Agriculture (Advances in Biotechnological Processes, A. Mizrahi Ed.), vol. 9, p. 83-96. Alan R. Liss, New York.
- DANGLER C.A., DUNN S.J., SQUIRE K.R.E., STOTT J.L., OSBURN B.I.** 1988. Rapid identification of bluetongue virus by nucleic acid hybridization in solution. *J. Virol. Methods*, 22 (4), 353-335.
- DAUTHUILLE D.** 1986. Etude écopathologique de deux Baculovirus pathogènes de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (Lépidoptère: Noctuidae) en prairie guyanaise à *Digitaria swazilandensis* STENT. Th. Doct. Univ., Univ. Paris 6, Novembre 1986, 197 p.
- DESMIER DE CHENON R., MARIAU D., MONSARRAT P., FEDIERE G., SIPAYUNG A.** 1988. Recherches sur les agents entomopathogènes d'origine virale chez les lépidoptères défoliateurs du palmier à huile et du cocotier. *Oléagineux*, 43, 107-117.

- DOMIER L.L., SHAW J.G., RHOADS R.E. 1987. Potyviral proteins share amino-acid sequence homology with picorna, como, and caulimoviral proteins. *Virology*, 158, 20-27.
- EATON B.T., STEACIE A.D. 1980. Cricket paralysis virus RNA has a 3' terminal poly(A). *J. Gen. Virol.*, 50, 167-171.
- EMINI E.A., SCHLEIF W.A., COLONNO R.J., WIMMER E. 1985. Antigenic conservation and divergence between the viral specific proteins of poliovirus type 1 and various picornaviruses. *Virology*, 140, 13-20.
- ENGLAND T.E., UHLENBECK O.C. 1978. 3' terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase. *Nature (London)*, 275, 560-561.
- ENGVALL E., PEARLMANN P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, 109, 129-135.
- FEDIERE G. 1983. Recherches sur des viroses épizootiques de lépidoptères Limacodidae ravageurs de palmacées. Thèse Doct. 3ème cycle, Univ. Sci. Techn. Languedoc, Montpellier, Juin 1983, 103 p.
- FEDIERE G., DESMIER DE CHENON R., MARIAU D., MONSARRAT P. 1981. Mise en évidence de maladies à épizootie de type denonucléose chez deux chenilles de lépidoptères Limacodidae phyllophages du palmier à huile et du cocotier en Côte-d'Ivoire. *Abstr. Colloq. int. Protect. Cult. trop.*, Lyon (France), p. 62.
- FINCH J.T., CROWTHER R.A., HENDRY D.A., STRUTHERS J.K. 1974. The structure of Nudaurelia capensis β virus : the first example of a capsid with icosahedral surface symmetry T=4. *J. Gen. Virol.*, 24, 191-200.
- FRIESEN P.D., RUECKERT R.R. 1981. Synthesis of black beetle virus proteins in cultured *Drosophila* cells : differential expression of RNAs 1 and 2. *J. Virol.*, 37, 876-886.
- FRANKEL G., FRIEDMANN A. 1987. Synthesis of long viral complementary DNA from 7,5 kb poly A⁺ RNA templates. *J. Virol. Methods*, 18, 1-12.
- GENTY P., MARIAU D. 1975. Utilisation d'un germe entomopathogène dans la lutte contre *Sibine fusca* (Limacodidae). *Oléagineux*, 30, 349-354.
- GINTING C.U., DESMIER DE CHENON R. 1987. Nouvelles perspectives biologiques pour le contrôle d'un ravageur très important du cocotier en Indonésie: *Parasa lepida* Cramer, Limacodidae par l'utilisation de virus. *Oléagineux*, 42, 107-115.
- GIRARD M., BALTIMORE D., DARNELL J.E. 1967. The poliovirus replication complex : site for synthesis of poliovirus RNA. *J. Mol. Biol.*, 24, 59-74.
- GOLDBACH R., WELLINK J. 1988. Evolution of plus-strand RNA viruses. *Intervirology*, 29 (5), 260-267.
- GONZALEZ H.A., KNUDSON D.L. 1988. Intra-serogroup and inter-serogroup genetic relatedness of orbiviruses : I. Blot hybridization of viruses of Australian serogroups. *J. Gen. Virol.*, 69, 125-134.

- GREENWOOD L.K., MOORE N.D. 1982. The Nudaurelia β group of small RNA-containing viruses of insects : serological identification of several new isolates. *J. Invertebr. Pathol.*, 39, 407-409.
- GRUBMAN M.J., BAXT B., BACHRACH H.L. 1979. Foot-and-mouth disease virion RNA : studies on the relation between the length of its 3'-Poly(A) segment and infectivity. *Virology*, 97, 22-31.
- GRUNSTEIN M., HOGNESS D. 1975. Colony hybridization : a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3961-3965.
- GUARINO L.A., KAESBERG P. 1981. Isolation and characterization of an RNA-dependant RNA polymerase from black beetle virus-infected *Drosophila melanogaster* cells. *J. Virol.*, 40, 379-386.
- HAMLIN P.H., BROWNLEE G.G., CHENG C.C., GAIT M.J., MILSTEIN C. 1978. Complete sequence of constant and 3' non coding regions of an immunoglobulin mRNA using the dideoxynucleotide method of RNA sequencing. *Cell*, 15, 1067-1075.
- HARRAP K.A., LONGWORTH J.F., TINSLEY T.W., BROWN K.W. 1966. A non-inclusion virus of *Gonometa podocarpi* (Lepidoptera : Lasiocampidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 41, 68-76.
- HESS R.T., SUMMERS M.D., FALCON L.A. 1978. A mixed virus infection in midgut cells of *Autographa californica* and *Trichoplusia ni* larvae. *J. Ultrastruct. Res.*, 65, 253-265.
- HILLEBRAND G.G., BEATTIE K.L. 1985. Influence of template primary and secondary structure on the rate and fidelity of DNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 260, 3116-3125.
- HOLLAND J., SPINDLER K., HORODYSKI F., GRABAU E., NICHOL S., VANDEPOL S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, 215, 1577-1585.
- HRUBY D.E., ROBERTS W.K. 1976. Encephalomyocarditis virus RNA : variations in polyadenylic acid content and biological activity. *J. Virol.*, 19, 325-330.
- GRANADOS R.R., NGUYEN T., CATO B. 1978. An insect cell line persistently infected with a baculovirus-like particle. *Intervirology*, 10, 309-317.
- JENKINS O., BOOTH J.D., MINOR P.D., ALMOND J.W. 1987. The complete nucleotide sequence of coxsackievirus B4 and its comparison to other members of the Picornaviridae. *J. gen. Virol.*, 68 (7), 1835-1848.
- JOHNSON M.A., Mac CRAE M.A. 1988. A rapid and sensitive solution hybridization assay for the quantitative determination of specific viral RNA sequences. *J. Virol. Methods*, 22 (2-3), 247-254.
- JOUSSET F.X., PLUS N. 1975. Etude de la transmission horizontale et de la transmission verticale des picornavirus de *Drosophila melanogaster* et de *Drosophila immigrans*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 126B, 231-249.
- 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. III*, 275, 3042-3046.

- JOUSSET F.X., BERGOIN M., REVET B.** 1977. Characterization of the Drosophila C virus. *J. gen. Virol.*, 34, 269-285.
- JUTILA J.W., HENRY J.E., ANACKER R.L., BROWN W.R.** 1970. Some properties of a crystalline-array virus (CAV) isolated from the grasshopper *Melanoplus bivattatus* (SAY) (Orthoptera: Acridiidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 15, 225-231.
- KACIAN D.L., MYERS J.C.** 1976. Synthesis of extensive, possibly complete, DNA copies of poliovirus RNA in high yields and at high specific activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2191-2195.
- KING L.A., MOORE N.F.** 1988. Evidence for the presence of a genome-linked protein in two insect picornaviruses, cricket paralysis and Drosophila C viruses. *F.E.B.S. Microbiol. Lett.*, 50, 41-44.
- KING L.A., MASSALSKI P.R., COOPER J.J., MOORE N.F.** 1984. Comparison of the genome RNA sequence homology between cricket paralysis virus and Drosophila C virus by complementary DNA hybridization analysis. *J. gen. Virol.*, 65, 1193-1196.
- KING L.A., PULLIN J.S.K., STANWAY G., ALMOND J.W., MOORE N.F.** 1987. Cloning of the genome of cricket paralysis virus : sequence of the 3' end. *Virus Res.*, 6, 331-344.
- KOCH F., KOCH G.** 1973. The molecular biology of poliovirus. Springer-Verlag, Wien.
- KOPECKA H., PREVOT J., GIRARD M., FUCHS F., AYMARD M.** 1988. Intérêt des sondes ARNc (ribosondes) synthétisées *in vitro* dans la détection des entérovirus par hybridation moléculaire. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, 139, 217-225.
- LAEMMLI U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
- LEE F.Y., NOMOTO A., DEJEN B.M., WIMMER E.** 1977. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 59-63.
- L'HERITIER P.** 1952. A convenient device for injecting large number of flies. *Drosophila Inf. Serv.*, 26, 131.
- LINEMEYER D.L., MENKE J.G., MARTIN-GALLARDO A., HUGHES J.V., YOUNG A., MITRA S.W.** 1985. Molecular cloning and partial sequencing of hepatitis A viral cDNA. *J. Virol.*, 54, 247-255.
- LONGWORTH J.F.** 1978. Small isometric viruses of invertebrates. *Adv. Virus Res.*, 23, 103-157.
- LONGWORTH J.F., ROBERTSON J.S., TINSLEY T.W., ROWLANDS D.J., BROWN F.** 1973. Reactions between an insect picornavirus and naturally occurring IgM antibodies in several mammalian species. *Nature (London)*, 242, 314-316.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J.** 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 545 p.

- MARIAU D., DESMIER DE CHENON R., JULIA C., PHILIPPE R. 1981. Limacodidae. *Oléagineux*, 36, 189.
- MATTERN C.F.T., DANIEL W.A. 1965. Replication of poliovirus in HeLa cells : electron microscopic observations. *Virology*, 26, 646-663.
- MATTHEWS R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 17, 1-199.
- MEINKOTH J., WAHL G. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, 138, 267-284.
- MEJBAUM W.Z. 1959. Ueber die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in derivaten der Adenylsäure. *Z. Physiol. Chem.*, 258, 117-120.
- MELTON D.A., KRIEG P.A., REBAGLIATI M.R., MANIATIS T., ZINN K., GREEN M.R. 1984. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.*, 12, 7035-7056.
- MEYNADIER G., AMARGIER A., GENTY P. 1977. Une virose de type denonucléose chez le lépidoptère *Sibine fusca* Stoll. *Oléagineux*, 32, 357-361.
- MITCHELL W.J., RUSSEL S.E.H., CLARK D.K., RIMA B.K., HAPPEL M.J. 1987. Identification of negative strand and positive strand RNA of canine distemper virus in animal tissues using single stranded RNA probes. *J. Virol. Methods*, 18, 121-132.
- MONSARRAT P. 1978. Contribution à l'étude du virus d'*Oryctes rhinoceros* L. et de son impact écologique. Thèse Doct. Sci. nat., Univ. Sci. Techn. Languedoc, Montpellier, Mars 1978, 209 p.
- MOORE N.F. 1985. Pathology associated with small RNA viruses of insects. In *Viral insecticides for biological control* (K. Maramorosch, K.E. Sherman Eds.), p. 233-245. Academic Press, Orlando.
- MOORE N.F., TINSLEY T.W. 1982. The small RNA-viruses of insects. *Arch. Virol.*, 72, 229-245.
- MUSCIO O.A., LA TORRE J.L., SCODELLER E.A. 1988. Characterization of *Triatoma* virus, a picorna-like virus isolated from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *J. Gen. Virol.*, 69 (11), 2929-2934.
- NEWMANN J.F.E., BROWN F. 1973. Evidence for a divided genome in Nodamura virus, an arthropod-born picornavirus. *J. Gen. Virol.*, 21, 371-384.
- NOMOTO A., KITAMURA N., GOLINI F., WIMMER E. 1977. The 5'-terminal structures of poliovirions RNA and poliovirus mRNA differs only in the genome-linked protein VPg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5345-5349.
- OUCHTERLONY O. 1948. Antigen antibody reaction in gels. *Ark. Keni. Miner., Geol. B*, 26, 16.
- PALLANSCH M.A., KEW O.M., SEMLER B.L., OMILIANOWSKI D.R., ANDERSON C.W., WIMMER E., RUECKERT R.R. 1984. Protein processing map of poliovirus. *J. Virol.*, 49, 873-880.

- PALMENBERG A.C. 1987. Comparative organization and genome structure in Picornaviruses. *In* Positive strand RNA viruses (Brinton M. A., Rueckert R. R. Eds.), p. 25-34. UCLA Symp. mol. cell. Biol., N. Ser., 54. Liss, New York.
- PAYMENT P., ARORA D.J.S., BELLONCIK S. 1982. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 40, 55-60.
- PEDLEY S., MOHAMED M.E.H., MERTENS P.P.C. 1988. Analysis of genome segments from six different isolates of bluetongue virus coding RNA-RNA hybridization : a generalised coding assignment for bluetongue viruses. *Virus Res.*, 10, 381-390.
- PLUS N., CROIZIER G., DUTHOIT J.L., DAVID J., ANXOLABEHERE D. 1975. Découverte, chez la drosophile, de virus appartenant à trois nouveaux groupes. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, 280, 1501-1504.
- PLUS N., CROIZIER G., REINGANUM C., SCOTTI P.D. 1978. Cricket paralysis virus and Drosophila C virus : serological analysis and comparison of capsid polypeptides and host range. *J. Invertebr. Pathol.*, 31, 296-302.
- PLUS N., CROIZIER G., VEYRUNES J.C., DAVID J. 1976. A comparison of buoyant density and polypeptides of Drosophila P, C, and A viruses. *Intervirology*, 7, 346-350.
- PUTNAK J.R., PHILIPS B.A. 1981. Picornaviral structure and assembly. *Microbiol. Rev.*, 45, 287-315.
- REANNEY D.C. 1982. The evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*, 36, 47-73.
- REAVY B., MOORE N.F. 1982. The replication of small RNA-containing viruses of insects. *Microbiologica*, 5, 63-84.
- REINGANUM C., SCOTTI P. 1976. Serological relations between twelve small RNA viruses of insects. *J. Gen. Virol.*, 31, 131-134.
- REINGANUM C., GAGEN S., SEXTON S.B., VELLACOTT H.P. 1981. A survey for pathogens of black field cricket *Teleogryllus commodus* in the western district of Victoria, Australia. *J. Invertebr. Pathol.*, 38, 153-160.
- REINGANUM C., O'LOUGHLIN G.T., HOGAN T.W. 1970. A non-occluded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera : Gryllidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 16, 214-220.
- REINGANUM C., ROBERTSON J.S., TINSLEY T.W. 1978. A new group of RNA viruses from insects. *J. Gen. Virol.*, 40, 195-202.
- RICE C.M., LEVIS R., STRAUSS J.H., HUANG H.V. 1987. Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones : mapping of lethal mutations, rescue of a temperature sensitive marker, and *in vitro* mutagenesis to generate defined mutants. *J. Virol.*, 61, 3809-3819.
- RIGBY P.W.J., DIECKMANN H., RHODES C., BERG P. 1977. Labelling deoxyribonucleic acid to high activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, 113, 237-251.

ROTBART H.A. 1988. Human enterovirus infections. Molecular approaches to diagnosis and pathogenesis. *In* Molecular aspects of picornavirus infection and detection (B. Semler Ed.). A.S.M. Publ.

ROTBART H.A., ABZUG M.J., MURRAY R.S., MURPHY N.L., LEVIN M.J. 1988. Intracellular detection of sense and antisense enteroviral RNA by *in situ* hybridization. *J. Virol. Methods*, 22 (2-3), 295-302.

ROTHBERG P.G., HARRIS T.J.R., NOMOTO A., WIMMER E. 1978. The genome-linked protein of picornaviruses. O⁴-(5'-uridylyl) tyrosine is the bond between the genome-linked protein and the RNA of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4868-4872.

RUECKERT R. R. 1985. Picornaviruses and their replication. *In* Fundamental Virology. B. N. Fields Ed., Raven Press, New York. 768 p.

RUSSO M., BURGYAN J., CARRINGTON J.C., HILLMAN B.I., MORRIS T.J. 1988. Complementary DNA cloning and characterization of cymbidium ringspot virus RNA. *J. Gen. Virol.*, 69, 401-406.

SCHERER W.F., HURLBUT H.S. 1977. Nodamura virus from Japan: a new and unusual arbovirus resistant to diethylether and chloroform. *Am. J. Epidemiol.*, 86, 271-285.

SCHERER W.F., VERNA J.E., RICHTER G.W. 1968. Nodamura virus, an ether and chloroform-resistant arbovirus from Japan. Physical and biological properties with ecologic observations. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 17, 120-128.

SCOTTI P.D., GIBBS A.J., WRIGLEY N.G. 1976. Kelp fly virus. *J. Gen. Virol.*, 30, 1-9.

SCOTTI P.D., LONGWORTH J.F., PLUS N., CROIZIER G., REINGANUM C. 1981. The biology and ecology of strains of an insect small RNA virus complex. *Adv. Virus Res.*, 26, 117-143.

SHIH D.S., SHIH C.T., KEW O., PALLANSCH M., RUECKERT R., KAESBERG P. 1978. Cell-free synthesis and processing of the proteins of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5807-5811.

SPECTOR D.H., BALTIMORE D. 1974. Requirement of 3'-terminal polyadenylic acid for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 2983-2987.

SPECTOR D.H., BALTIMORE D. 1975. Polyadenylic acid on poliovirus RNA. IV. Poly(U) in replicative intermediate and double stranded RNA. *Virology*, 67, 498-505.

STEINHAUER D.A., HOLLAND J.J. 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41, 409-433.

STRUTHERS J.K. 1973. Physico-chemical and substructural studies on Nudaurelia capensis beta virus. M. Sci. Thesis, Rhodes Univ.

TESH R.B. 1980. Infectivity and pathogenicity of Nodamura virus for mosquitoes. *J. Gen. Virol.*, 48, 177-182.

THOMAS P.S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 5201-5205.

- TINSLEY T.W., MacCALLUM F.O., ROBERTSON J.S., BROWN F. 1984. Relationship of encephalomyocarditis virus to cricket paralysis virus of insects. *Intervirology*, 21, 181-186.
- TOYODA H., NICKLIN M.J.H., MURRAY M.G., ANDERSON C.W., DUNN J.J., STUDIER F.W., WIMMER E. 1986. A second virus encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*, 45, 761-770.
- TRIPCONEY D. 1970. Studies on a non-occluded virus of the pine tree emperor moth. *J. Invertebr. Pathol.*, 15, 268-275.
- VAIL P.V., MORRIS T.J., COLLIER S.S. 1983. An RNA virus in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus preparations : gross pathology and infectivity. *J. Invertebr. Pathol.*, 41, 179-183.
- VAN DER WERF S. 1984. Clonage moléculaire du poliovirus type I et expression de ses protéines de capsid chez *Escherichia coli*: identification d'un épitope de neutralisation. Thèse Doct. Sci. nat., Univ. Paris 7.
- VAN DER WERF S., BREGERE F., KOPECKA H., KITAMURA N., ROTHBERG P.G., KOURILSKY P., WIMMER E., GIRARD M. 1981. Molecular cloning of the genome of poliovirus I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5983-5987.
- VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H. 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *F.E.B.S. Lett.*, 15, 232.
- VIEIRA J., MESSING J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion, mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19, 259-268.
- VOLLER A., BARTLETT A., BIDWELL D.E., CLARK M.F., ADAMS A.N. 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.*, 33, 165-167.
- VON DER HELM K., WINNACKER E.L., DEINHARDT F., FROSNER G., GAUSS-MULLER V., BAYERL B., SCHEID R., SIEGL G. 1981. Cloning of hepatitis A virus genome. *J. Virol. Methods*, 3, 37-43.
- WILLIAMSON C., RYBICKI E.P., KASDORF G.G.F., VON WECHMAR M.B. 1988. Characterization of a new picorna-like virus isolated from aphids. *J. gen. Virol.*, 69 (4), 787-795.
- WIMMER E. 1982. Genome-linked proteins of viruses. *Cell*, 28, 199-201.
- WIMMER E., KUHN R.J., PINCLUS S., YANG C.F., TOYODA H., NICKLIN M.J.H., KAKEDA N. 1987. Molecular events leading to picornavirus genome replication. *J. Cell Sci., Suppl.* 7, 1-26, 251-276.
- YOGO Y., WIMMER E. 1972. Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 1877-1882.
- ZREIN M., BURCKARD J., VAN REGENMORTEL M.H.V. 1986. Use of the biotin avidin system for detecting a broad range of serologically related plant viruses by ELISA. *J. Virol. Methods*, 13, 121-128

ETUDE D'UN RIBOVIRUS PATHOGENE DU LÉPIDOPTERE
LATOIA VIRIDISSIMA (HOLLAND, 1893) RAVAGEUR DE
PALMACEES EN COTE D'IVOIRE. CARACTERISATION DU
VIRUS, DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE ET CLONAGE MOLECULAIRE

Date de Soutenance : 10 Mai 1989
Auteur : Jean Louis ZEDDAM
Laboratoire : Laboratoire de Virologie - Station de recherches de
pathologie comparée (INRA-CNRS).
Université : Université des Sciences et Techniques du Languedoc
(Montpellier II).

RESUME :

Les populations naturelles du Lépidoptère *Latoia viridissima* dont la chenille défoliatrice ravage les plantations de Palmacées en Côte-d'Ivoire sont périodiquement décimées par une virose. Une caractérisation physico-chimique du virus responsable des épizooties en a précisé plusieurs propriétés essentielles dont certaines le rapprochent des Picornaviridae.

Un test immunoenzymatique (technique ELISA) a été mis au point afin de détecter ce ribovirus, appelé LvV, dans des échantillons biologiques. A l'aide de cet outil de diagnostic sérologique, l'aspect épidémiologique de la maladie se développant en plantation a été abordé. Parallèlement, le clonage moléculaire du génome viral a été entrepris donnant les premières indications sur l'organisation de LvV. A partir de l'ADNc ainsi obtenu, différents types de sondes nucléiques ont été construites faisant intervenir des marquages radioactifs ou par nucléotides biotinylés. La capacité de ces diverses sondes, à ADN bicaténaire ou à ARN monocaténaire, à détecter le virus a été testée.

MOTS CLES : Ribovirus, Picornaviridae-associé, Entomopathogène, Lépidoptère Limacodidae *Latoia viridissima*, Technique ELISA, Epidémiologie, Clonage moléculaire, Sondes nucléiques.

THE STUDY OF A PATHOGENIC RIBOVIRUS OF THE
LEPIDOPTERAN *LATOIA VIRIDISSIMA* (HOLLAND 1893), A
PALMACEA PEST IN IVORY COAST. VIRUS CHARACTERIZATION,
SEROLOGICAL DIAGNOSIS AND MOLECULAR CLONING

SUMMARY :

The natural populations of the Lepidopteran *Latoia viridissima* of which the palm pest caterpillar ravages the plantations of Palmaceae in Ivory Coast, are periodically decimated by a virose. A physico-chemical characterization of the virus responsible for epizooties has made clear several of its essential properties, some of which bring it nearer to the Picornaviridae.

An immuno-enzymatic test (ELISA technique) has been developed to detect this ribovirus, named LvV, in biological samples. Thanks to this test used in the serological diagnosis, the epidemiological side of the disease which develops in plantations has been approached. At the same time, molecular cloning of the viral genome has been started, giving the first indications on the organization of LvV. From the cDNA here obtained, different kinds of nucleic probes have been built, involving radioactive marking or biotinylated nucleotides. The ability of these various probes, double-stranded DNA or single-stranded RNA, to detect the virus has been tried out.

KEY WORDS : Ribovirus, Picorna-like virus, Entomopathogen, *Latoia viridissima* (Lepidoptera : Limacodidae), ELISA, Epidemiology, Molecular cloning, Nucleic probes.