

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

présentée à l'université de Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le DIPLOME DE DOCTORAT

SPECIALITE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Formation Doctorale : Parasitologie

ETUDE DU GENOME DES DENSOVIRUS DE LEPIDOPTERES  
RAVAGEURS DE CULTURES : *CASPHALIA EXTRANEA* EN  
COTE D'IVOIRE ET *DIATRAEA SACCHARALIS* AU BRESIL,  
APPLICATION AU DIAGNOSTIC PAR SONDE NUCLEIQUE.

par

KOUASSI Koffi II Nazaire

Soutenue le 27 Avril 1993, devant le jury composé de :

M. Constantin VAGO, Membre de l'Institut.

M. Guy RIBA, Directeur de Recherche INRA, La Minière.

M. Max BERGOIN, Professeur, Université Montpellier II.

M. Gérard DEVAUCHELLE, Professeur, Université Montpellier II.

M. Dominique MARIAU, Directeur de Recherche CIRAD-CP.

M. Gilles FEDIERE, Chargé de Recherche ORSTOM.

Président  
Rapporteur

Rapporteur

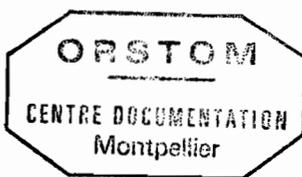
Directeur de Thèse

Examineur

Examineur

Examineur

25 NOV. 1993



Ø76  
RAVPLA Ø8  
KOU

pas  
Aomé n se  
hz 70823  
FA J 2 & Boly  
F 38330

A mes parents,  
à Berthe et Olivier,  
à tous mes amis,

à tous ceux qui ont su m'aider et me soutenir pendant ces longues années d'études

## AVANT PROPOS

Le présent travail se situe dans le cadre du projet de prospection et d'étude d'agents pathogènes, initié conjointement par l'ex Institut de Recherche pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) en Côte d'Ivoire, aujourd'hui Département des plantes Oléagineuses de l'Institut des Forêts (IDEFOR/DPO) et l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en coopération (ORSTOM), ceci en collaboration très étroite avec la Station de Recherches INRA-CNRS de Pathologie Comparée de St. Christol-lès-Alès. C'est donc la mobilisation conjointe de ces différents Instituts de Recherches qui m'ont apporté une contribution aussi bien financière que logistique, ce qui m'a permis de mener à bien ce travail.

Mes travaux ont été réalisés dans le Laboratoire de Virologie Moléculaire du professeur Max BERGOIN. Ce laboratoire fait partie de la Station de Recherches de Pathologie Comparée INRA-UA CNRS 1184 de Saint Christol-lès-Alès (France) dirigée par le professeur Gérard DEVAUCHELLE.

J'ai bénéficié pour cette étude d'une allocation de Recherche ORSTOM qui m'a permis de travailler dans de bonnes conditions. Mes travaux de terrain ont bénéficié d'une aide très appréciable du service phytosanitaire de Palmindustrie-Eloka et de l'IDEFOR/DPO - La Mé.

Qu'il me soit permis d'abord et avant tout de signifier toute ma déférence et ma gratitude à Monsieur le Professeur **A. S. N'DIAYE**, Ministre de la Recherche Scientifique et de l'Education Nationale de Côte d'Ivoire, pour ses encouragements et pour toutes les suites favorables qu'il a bien voulu donner à mes sollicitations. Pour le secours financier qu'il n'a pas hésité à m'accorder pour terminer cette thèse, je lui témoigne toute ma reconnaissance.

C'est à juste titre que je témoigne toute ma reconnaissance et ma gratitude aux responsables de l'ORSTOM : son Président Monsieur **M. LEVALLOIS**, son Directeur Général Monsieur **G. WINTER**, pour l'allocation de Recherche qu'ils m'ont accordée. Il m'est agréable de remercier Monsieur **A. CORNET**, Directeur délégué Responsable du Département Milieu et Activité Agricole (MAA) de l'ORSTOM et son adjointe technique Madame **L. SUAVIN** pour leur compréhension et leur soutien très appréciable.

Ma reconnaissance va également au personnel de l'IDEFOR/DPO, à son Directeur, Monsieur **B. KOUAME**, à Monsieur **R. PHILIPPE**, ex Responsable du Laboratoire d'Entomologie. J'exprime aussi ma gratitude à Monsieur **N. N'GORAN** chef du service de défense des cultures à Palmindustrie Côte d'Ivoire, et à Monsieur **BEUGRE** responsable de l'unité agro-industrielle palmier (Palmindustrie) d'Eloka et ses collaborateurs, pour leur aide appréciable. Je n'oublierai pas cependant Monsieur **J. DAUZAT** Chercheur au laboratoire de biomodélisation du CIRAD pour l'aide appréciable qu'il m'a apportée dans le traitement statistique de mes résultats.

## REMERCIEMENTS

Avant d'exposer mes travaux qu'il me soit permis de remercier tous ceux qui m'ont encouragé et qui ont bien voulu participer à mon jury de thèse.

Monsieur le Professeur **C. VAGO**, Membre de l'Institut, dont je suis très fier d'avoir fait la connaissance, m'a toujours reçu avec une attention bienveillante et prodigué des conseils précieux et des encouragements. Il m'a fait des remarques judicieuses et constructives tout au long de mon séjour. Aussi je suis très heureux de lui témoigner l'expression de toute ma déférence de l'insigne honneur qu'il me fait d'accepter de juger ce travail.

Monsieur le Professeur **M. BERGOIN**, responsable de l'unité de virologie moléculaire de la Station de Recherches INRA-CNRS de Pathologie comparée de St-Christol-lès-Alès et professeur de microbiologie à l'Université de Montpellier II m'a accepté dans son laboratoire et m'a initié à la biologie moléculaire. Il n'a ménagé aucun effort pour me guider et m'aider à réaliser ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur **G. RIBA**, Directeur du département de Zoologie de l'INRA, a accepté malgré ses nombreuses occupations de juger ce travail, et aussi de se déplacer de Paris pour participer à mon jury de thèse. C'est pourquoi je le prie d'accepter tous mes remerciements et lui témoigne l'expression de mes sentiments respectueux.

Je sais gré à Monsieur le professeur **G. DEVAUCHELLE**, Directeur de la Station de Recherches de Pathologie Comparée de Saint Christol, de la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant et en m'offrant un cadre de Recherche propice. Il a accepté de faire partie de ce jury, qu'il sache combien de fois j'ai apprécié sa sollicitude et trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur **D. MARIAU**, Directeur de Recherche au CIRAD-CP de Montpellier, pour l'intérêt qu'il porte à ce travail et pour l'aide appréciable qu'il m'a fournie dans l'approvisionnement en matériel biologique. Je lui suis également reconnaissant de la disponibilité dont il a toujours su faire preuve à mon égard et d'avoir accepté de siéger au jury de cette thèse.

Monsieur **G. FEDIERE**, chargé de Recherche à l'ORSTOM, responsable de ce stage, m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire de l'ex ORSTOM Adiopodoumé où j'ai commencé ces travaux. C'est à son instigation que je me suis tourné vers l'Entomovirologie dont il m'a montré tout l'intérêt. D'autrepart il a su présenter partout où il se devait, l'importance de ce travail. Qu'il veuille bien croire à ma très respectueuse gratitude.

C'est aussi avec un vif plaisir que je remercie Monsieur le professeur **L. EUZET** et le professeur **A. RAIBAUT**, pour la confiance qu'ils m'ont faite en acceptant ma candidature au sein de leur formation Doctorale de Parasitologie.

Que le professeur **A. AOUTI**, responsable du laboratoire de Zoologie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Nationale de Côte d'Ivoire (FAST - UNCI) parrain de cette thèse, trouve ici l'expression de ma très profonde gratitude.

Monsieur **J.M. QUIOT**, Directeur de Recherche CNRS et Responsable du laboratoire de culture cellulaire de la Station de Recherche de Pathologie Comparée a été toujours disposé à m'aider aussi bien sur le plan professionnel, que moral et civil. Qu'il veuille trouver ici, ainsi que **F.X. JOUSSET**, Chargé de Recherche CNRS pour son aide appréciable au cours de ces travaux, l'expression de toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier Monsieur **BETBEDER** et Monsieur **BORDAT** tous deux Chercheurs au CIRAD-CA pour le matériel biologique qu'ils ont bien voulu me fournir et aussi pour leurs encouragements.

Je tiens à remercier vivement tout le personnel de la Station de Recherches de Saint Christol, tous les stagiaires avec qui le contact a été très précieux et tous ceux qui m'ont apporté leur aide et leurs critiques aussi bien dans l'interprétation des résultats que dans la rédaction de ce mémoire. Les mots me manquent pour exprimer à Monsieur **J.C. VEYRUNES** ingénieur à l'INRA, ma gratitude pour sa disponibilité légendaire à mon égard et pour m'avoir fait bénéficier de son savoir. Je n'oublierai pas mon ami **Y. LI**, thésard dans le même laboratoire, et le remercie de m'avoir fait bénéficier de son expérience dans la transfection des cultures cellulaires d'insectes.

J'ai une particulière reconnaissance envers Monsieur et Madame **Georges et Andrée KUHL** respectivement Assistant Ingénieur INRA et Adjointe Technique CNRS, pour leur aide morale, matérielle et technique dont j'ai bénéficiée tout au long de ce séjour loin des miens. Qu'ils soient assurés de ma sincère gratitude pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus. Je n'oublierai pas Mademoiselle **C. ROURE** responsable de la bibliothèque, Monsieur **J. P. BOSSY** du service de microscopie électronique et **J. SAN ISIDORO** pour leur contribution à ce travail et les remercie très sincèrement.

Mes pensées sont tournées vers mes parents et mes amis qui de près ou de loin m'ont toujours témoigné leur affection.

Enfin je dédie particulièrement cette thèse à Berthe, mon épouse qui n'a pas hésité à risquer son emploi pour me rejoindre en France rendant plus agréable cette aventure.

## SOMMAIRE

<b>LISTE DES FIGURES</b>	11
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	12
<b>ABREVIATIONS</b>	13
<b>INTRODUCTION</b>	14
<b>CHAPITRE I : BIOLOGIE ET PATHOLOGIE VIRALE DES RAVAGEURS ETUDIES</b>	
<b>I. Biologie, dégâts et aires de répartition</b>	19
A. Biologie	19
1°) <i>Casphalia extranea</i>	19
2°) <i>Diatraea saccharalis</i>	21
B. Dégâts et aires de répartition	22
1°) <i>C. extranea</i>	22
2°) <i>D. saccharalis</i>	24
<b>II. Pathologie virale et lutte biologique</b>	26
A. Pathologie virale	26
1°) Les baculoviroses	27
2°) Les iridoviroses	28
3°) Les denonucléoses	28
4°) Les réoviroses	28
5°) Les tétraviroses (virus du groupe <i>β nudaurelia</i> )	29
6°) Les picornaviroses	29
7°) Les entomopoxviroses	29
B. Lutte biologique	30
1°) Introduction d'entomophages prédateurs et parasites	30
2°) Utilisation de germes entomopathogènes	31
3°) Utilisation des virus d'insectes	32
a) Facteurs indispensables	32
b) Application de virus	32

## CHAPITRE II : LES DENSOVIRUS : EVOLUTION DES RECHERCHES

<b>I. Introduction</b>	35
<b>II. Variété et distribution</b>	35
<b>III. Histopathologie : symptômes et spécificité tissulaire</b>	37
<b>IV. Cytopathologie</b>	38
<b>V. Spectre d'hôtes</b>	39
<b>VI. Parentés antigéniques et hémagglutination</b>	39
<b>VII. Diagnostic de la virose</b>	40
<b>VIII. Le virion : morphologie et propriétés physico-chimiques</b>	41
<b>IX. Infection, transfection et production de virions</b>	43
<b>X. Le génome</b>	44
A. Propriétés physico-chimiques	44
B. Cartographie, clonage et séquençage du génome viral	46
C. Organisation du génome viral et transcription	46
D. Structure et fonctions des extrémités	49
E. Réplication	51

## CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

<b>I. Matériel</b>	53
A. Les larves de lépidoptères	53
B. Les souches virales	53
C. Les lignées cellulaires	53
D. Les souches bactériennes	54
E. Les milieux d'élevage et de culture	54
F. Les plasmides	54
G. Les enzymes	54
<b>II. Techniques et méthodes</b>	55
A. Méthodes de récolte et d'échantillonnage des larves	55
B. Méthode d'élevage des larves	55
C. Techniques de pathologie expérimentale	55
1°) Infection et transfection des larves	55
2°) Infection et transfection des cultures cellulaires	56
a) Repiquage et entretien des cultures cellulaires	56
b) Infection et transfection	56

D. Purification des virions et dosage	57
1°) Purification des virions.	57
2°) Dosage et contrôle du virus	57
E. Extraction et analyse de l'ADN	58
1°) Extraction de l'ADN viral	58
2°) Maxipréparations des plasmides par lyse alcaline	58
3°) Minipréparations des plasmides	59
4°) Digestion de l'ADN et analyse par électrophorèse	59
F. Clonage moléculaire	60
1°) Remplissage des extrémités ("filling")	60
2°) Déphosphorylation du plasmide et ligation	60
3°) Préparation des bactéries compétentes et transformation	60
G. Transfert et hybridation	61
1°) Transfert des fragments de restriction sur membrane de nylon	61
2°) Dépôt d'ADN viral sur membrane de nylon par "dot blots"	61
3°) Préparation de sonde marquée à la digoxigénine d-UTP	61
4°) Hybridation et révélation	62
H. Techniques sérologiques	64
1°) Préparation des antisérums	64
2°) Détection d'antigènes par immunodiffusion en gel d'agarose	64
3°) Détection d'antigènes par la technique ELISA	64
4°) Détection <i>in situ</i> d'antigènes par la technique d'immunofluorescence	65
I. Traitement informatique des données	65

## RESULTATS

### CHAPITRE IV : ETUDE DES GENOMES DES DENSOVIRUS DE *C. EXTRANEA* (*CeDnV*) ET DE *D. SACCHARALIS* (*DsDnV*)

I. Carte de restriction et clonage du génome du <i>CeDnV</i>	68
A. Cartographie physique de restriction du génome du <i>CeDnV</i>	68
B. Clonage des fragments de restriction de l'ADN du <i>CeDnV</i>	76
1°) Choix du plasmide vecteur	76
2°) Clonage des fragments de restriction	77

<b>II. Etude du génome du <i>Ds</i>DNV</b>	<b>80</b>
A. Pathologie expérimentale et purification du <i>Ds</i> DNV	80
B. Caractérisation de l'ADN viral	82
1°) Purification de l'ADN	82
2°) Estimation de la taille de l'ADN viral	82
a) En microscopie électronique	82
b) En gel d'agarose	83
3°) Cartographie physique de restriction du génome du <i>Ds</i> DNV	86
a) Détermination du nombre et de la taille des fragments de restriction	86
b) Carte physique de restriction du génome	86
4°) Etude d'homologie de séquence entre les génomes du <i>Ds</i> DNV et du <i>Ce</i> DNV	91
C. Clonage du génome du <i>Ds</i> DNV	91
1°) Clonage du fragment interne <i>Bam</i> HI.	91
2°) Clonage du génome entier	94
<b>III. Recherche de systèmes permissifs</b>	<b>101</b>
A. Introduction	101
B. Lignée cellulaire permissive	101
C. Optimisation du taux de transfection	101
D. Comparaison du pouvoir transfectant des différents plasmides recombinants	102
E. Essais de transfection de larves de différents lépidoptères	104
<b>IV. Construction des génomes chimères <i>Ds</i>DNV-<i>Jc</i>DNV</b>	<b>105</b>
A. Problématique	105
B. Obtention de plasmides chimères	105
1°) Construction des plasmides chimères pDsBamAJH et pJcBamADH	105
2°) Transfection des lignées cellulaires	109
3°) Transfection des larves	109
a) obtention de virions	109
b) Analyse des génomes viraux	109
<b>V. Discussion</b>	<b>112</b>

**CHAPITRE V : MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DIAGNOSTIC  
DU DENSOVIRUS DE *C. EXTRANEA* PAR SONDE NUCLEIQUE ET  
APPLICATION A L'ETUDE DE LA VIROSE EN MILIEU NATUREL**

<b>I. Préparation de la sonde</b>	118
A. Choix de l'utilisation d'une sonde nucléique dans le diagnostic.	118
B. Obtention de la sonde spécifique et contrôle de sa sensibilité	118
C. Adaptation de la méthode de "dot blot" au diagnostic de l'infection virale	119
<b>II. Diagnostic et épizootiologie de la virose chez <i>C. extranea</i></b>	124
A. Intérêt de l'étude épizootiologique	124
B. Choix de la parcelle et de la méthode d'échantillonnage	124
1°) Présentation de la plantation et de la parcelle	124
2°) Choix de la méthode d'échantillonnage	125
3°) Prélèvement des larves	125
C. Traitement des données	128
1°) Tableau des valeurs	128
2°) Etude de la répartition des larves de <i>C. extranea</i>	128
a) Prélèvement I (stade IV)	128
b) Prélèvement II (stade VI)	133
3°) Analyse spatiale de la virose chez les larves de <i>C. extranea</i>	135
a) prélèvement I (stade IV)	135
b) Prélèvement II (stade VI)	135
4°) Facteurs possibles de décroissance de la population	137
<b>V. Discussion</b>	141
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	144
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	146
<b>ANNEXE</b>	159

## LISTE DES FIGURES

Fig. 1 : Morphologie de <i>C. extranea</i> et de <i>D. saccharalis</i>	20
Fig. 2 : Localisation de l'espèce <i>Casphalia extranea</i> en Côte d'Ivoire	23
Fig. 3 : Carte de répartition géographique de <i>D. saccharalis</i>	25
Fig. 4 : Organisation du génome des <i>Parvoviridae</i>	48
Fig. 5 : Structure des extrémités (ITRs) des génomes des <i>Parvoviridae</i>	50
Fig. 6 : Principe de marquage non radioactif et de détection	63
Fig. 7 : Carte physique de restriction du génome du <i>CeDNV</i>	75
Fig. 8 : Schéma du plasmide pEMBL 19+	76
Fig. 9 : Clonage des fragments <i>Hind</i> III A et D dans le plasmide pEMBL 19+	78
Fig. 10 : Profils électrophorétiques des fragments de restriction des plasmides recombinants pCeHindIII A+D, pCeHindIII A, pCeHindIII D et pCeHindIII E générés par l'enzyme <i>Hind</i> III	79
Fig. 11 : Courbes de mortalité cumulée des larves infectées et des larves saines témoins	81
Fig. 12 : Suspension purifiée du densovirus de <i>D. saccharalis</i> examinée au microscope électronique après contraste négatif au phosphotungstate de sodium	84
Fig. 13 : Etalement des molécules d'ADN du <i>DsDNV</i> et du phage $\Phi$ x 174	85
Fig. 14 : Electrophorégramme en gel d'agarose à 1,2 % des fragments de restriction de l'ADN du <i>DsDNV</i>	87
Fig. 15 : Cartographie Physique de restriction du <i>DsDNV</i>	89
Fig. 16 : Carte physique de restriction du génome du <i>DsDNV</i>	90
Fig. 17 : Schéma du plasmide recombinant pDsBamA	93
Fig. 18 : Profils électrophorétiques en gel d'agarose à 1,2% des fragments de restriction des plasmides recombinants pDsBamA et pDsBamA' après digestion avec les enzymes <i>Bam</i> HI et <i>Pst</i> I.	93
Fig. 19 : Schéma de la stratégie de clonage du génome viral complet du <i>DsDNV</i>	96
Fig. 20 : Profils électrophorétiques des plasmides recombinants de type A contenant un insert viral de la taille du génome entier du <i>Ds</i> DNV	99
Fig. 21 : Comparaison des profils électrophorétiques des plasmides recombinants pDst50 (type A) et pDst9 (type A')	99
Fig. 22 : Schéma de comparaison des plasmides pDst50 et pDst9	100

Fig. 23 : Détection d'antigènes viraux dans les cellules BCIRL-Px2-HNU3 transfectées par le plasmide recombinant pDst50	103
Fig. 24 : Protocole d'obtention des plasmides chimères	106
Fig. 25 : Schéma des plasmides recombinants chimères dont les inserts viraux sont constitués du fragment DsBamA ou JcBamA flanqué de l'une ou des deux extrémités de l'ADN du <i>DsDNV</i> ou du <i>JcDNV</i>	107
Fig. 26 : Comparaison des profils de restriction de l'insert viral des plasmides chimères et des génomes des virions chimères, digérés par les enzymes <i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI et la paire d'enzymes <i>Hind</i> III / <i>Asp</i> 718	111
Fig. 27 : Comparaison des cartes de restriction des génomes du <i>BmDNV</i> et du <i>CeDNV</i>	112
Fig. 28 : Comparaison des cartes de restriction des génomes du <i>DsDNV</i> et du <i>JcDNV</i>	114
Fig. 29 : Analyse de la sensibilité de la sonde	121
Fig. 30 : Détection par sonde nucléique du <i>CeDNV</i> dans les larves de <i>C. extranea</i> (prélèvement I) par hybridation ADN - ADN	122
Fig. 31 : Détection par sonde nucléique du <i>CeDNV</i> dans les larves de <i>C. extranea</i> (prélèvement II) par hybridation ADN - ADN	123
Fig. 32 : Répartition spatiale des larves de <i>C. extranea</i>	127
Fig. 33 : Demi-variogrammes de la répartition des larves <i>C. extranea</i> (larves de stade IV)	132
Fig. 34 : Demi-variogrammes de la répartition des larves <i>C. extranea</i> (larves de stade VI)	134
Fig. 35 : Schéma de la dissémination de la virose en plantation	137
Fig. 36 : Demi-variogrammes de la virose des larves en plantation (larves de stade IV)	138
Fig. 37 : Demi-variogrammes de la virose des larves en plantation (larves de stade VI)	139
Fig. 38 : Courbes de décroissance de la population en fonction du taux de larves virosées et de la densité.	140

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Etapes du cycle de développement de <i>C. extranea</i>	21
Tableau 2 : Virose de <i>Limacodidae</i> et <i>Pyralidae</i>	26
Tableau 3 : Densovirus : hôtes et origine	36
Tableau 4 : Poids moléculaire des protéines de capsid de différents densovirus	43
Tableau 5 : Poids moléculaire du génome de différents densovirus	46

Tableau 6 : Pourcentage cumulé de mortalité chez les larves infectées <i>per os</i> et les larves saines	80
Tableau 7 : Taille et nombre des fragments de l'ADN du <i>DsDNV</i> générés par différentes enzymes de restriction	88
Tableau 8 : Caractéristiques des plasmides recombinants de type A et de type A'	97
Tableau 9 : Cultures cellulaire transfectées par les différents ADN (détection par immunofluorescence utilisant des immunosérums spécifiques)	104
Tableau 10 : Caractéristiques des plasmides receveurs et des chimères obtenus	108
Tableau 11 : Nombre de larves récoltées par palme	129
Tableau 12 : Pourcentage des larves virosées récoltées par palme	130
Tableau 13 : Paramètres statistiques de densité de la population et de taux d'infection	131

## ABREVIATIONS

**AAV** : Adeno-associated virus

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**CeDNV** : Virus de la denonucléose de *Casphalia extranea*

**DNV** : Virus de la denonucléose

**DOTAP** : N-(1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl)-N,N,N-triméthylammonium méthylsulfate

**DOTMA** : N-(1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl)-N,N,N-triméthylammonium chloride

**DsDNV** : Virus de la denonucléose de *Diatraea saccharalis*

**EDTA** : Ethylène-Diamine-Tétra-acétate

**ICTV** : International Committee on Taxonomy of Viruses

**IF** : Immunofluorescence

**IPTG** : Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranoside.

**ITR** : Inverted Terminal Repeat (répétition terminale inversée)

**JcDNV** : Virus de la denonucléose de *Junonia cænia*

**kb** : Kilobase

**kDa** : Kilodaltons

**NBT** : Nitrobleu tétrazolium

**ORF** : Open reading frame (cadre de lecture ouvert)

**pb** : Paires de bases

**SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate

**UV** : Ultraviolets

**XPhosphate** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

**XGal** : 5-Bromo-4 Chloro-3 Indolyl-β-D Galactopyranoside

## **INTRODUCTION**

Les cultures industrielles de Palmacées d'une part, en particulier du cocotier (*Cocos nucifera*) et du palmier à huile (*Elaeis guineensis*) et celles de graminées d'autre part, avec le riz, le sorgho, le maïs et la canne à sucre, revêtent une grande importance dans l'économie et l'alimentation des populations de la zone intertropicale du globe. Le grand développement de ces plantations industrielles a offert de nouvelles niches écologiques aux populations d'insectes ravageurs, chaque espèce étant inféodée à un ou plusieurs organes de la plante hôte. C'est ainsi que parmi les lépidoptères *Limacodidae* les dégâts causés par *Casphalia extranea* espèce inféodée à la Côte d'Ivoire, premier pays africain producteur d'huile de palme, se limitent aux feuilles du palmier à huile, alors que chez les *pyralidae* l'espèce *Diatraea saccharalis* attaque à la fois les tiges et les bourgeons de la canne à sucre.

Parmi les insectes nuisibles aux palmacées, à part les lépidoptères qui sont les plus fréquemment observés avec la famille des *Limacodidae*, nous pouvons citer les coléoptères, bien représentés par les *Dynastidae*, en particulier les genres *Oryctes* et *Augosoma* qui forent le cœur des palmiers, et les *Chrysomelidae* avec le genre *Coelaenomenodera* qui mine les folioles. Quant aux graminées, en particulier la canne à sucre, les foreurs répertoriés sont en général des lépidoptères *Pyralidae* et *Noctuidae* qui sont observés également sur les cultures vivrières telles que le riz, le sorgho et le maïs en Afrique.

Pour lutter contre ces insectes ravageurs, la lutte chimique classique utilisant des insecticides organiques de synthèse : le DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane), HCH, Parathion etc.. a connu un immense succès. Mais l'utilisation abusive de ces insecticides a entraîné de nombreux inconvénients notamment l'apparition de résistances nécessitant l'utilisation de doses de plus en plus élevées d'insecticides. Pour tenter de contourner ces problèmes, des solutions de remplacement ou de complémentarité relevant des principes de la lutte biologique ou intégrée bénéficient depuis quelques années d'un essor considérable. Des recherches ont été conduites, ayant pour but de rétablir l'équilibre entre les insectes nuisibles et leurs prédateurs par l'introduction d'un certain nombre d'antagonistes que sont les insectes prédateurs et les parasitoïdes, comme certains hyménoptères et diptères, pouvant intervenir à divers niveaux du cycle biologique de l'insecte cible.

D'autres voies plus récentes et plus prometteuses de lutte contre les insectes ravageurs se sont ouvertes avec la lutte microbiologique utilisant les bactéries, les virus, les champignons et les protozoaires. Cette prospection d'agents pathogènes a conduit à reconnaître plus récemment les virus entomopathogènes, comme un des facteurs naturels les plus efficaces, intervenant dans la régulation des populations à forte densité, en raison des épizooties qu'ils déclenchent.

Alors que pendant longtemps seuls les baculovirus ont été pris en considération dans la lutte entomovirologique, des travaux récents ont mis en lumière le rôle efficace des petits virus icosaoédriques, à ARN ou à ADN, dans le déclenchement naturel ou provoqué d'épizooties. La première motivation des recherches qui leur sont consacrées est liée à leur fort pouvoir pathogène pour plusieurs espèces d'insectes de grand intérêt agronomique ou médical. Nous mentionnerons tout particulièrement les densovirus originellement découvert à la Station de Recherches de Pathologie Comparée de St. Christol (Meynadier *et al.*, 1964) qui exercent un fort pouvoir régulateur sur les populations naturelles de leurs hôtes parmi lesquels on trouve de nombreux lépidoptères et orthoptères ravageurs de cultures et des diptères vecteurs de maladies humaines. La seconde motivation, plus fondamentale, est fondée sur le fait que plusieurs virus d'insectes représentent des modèles tout à fait originaux sur le plan de la virologie comparée. Leur spécificité stricte, leur innocuité pour l'homme et les vertébrés, leur fort pouvoir pathogène et leur faculté de multiplication massive aussi bien en culture cellulaire que sur les insectes sont autant de propriétés qui expliquent l'intérêt qui leur est porté. Ainsi, les recherches en biologie moléculaire des baculovirus ont conduit à leur utilisation comme vecteurs d'expression par insertion d'un gène étranger dans leur génome. A l'heure actuelle, plusieurs dizaines de protéines d'intérêt médical ou vétérinaire, tels les interférons humains, les hormones peptidiques ou des antigènes viraux ont été obtenus (Devauchelle, 1988).

Les densovirus représentent un autre modèle alliant plusieurs des préoccupations développées ci-dessus. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, leur fort pouvoir pathogène pour plusieurs espèces d'invertébrés nuisibles les font pressentir pour la lutte microbiologique. De plus la petite taille de leur génome fait de ces virus un modèle de choix pour l'étude de l'organisation et de l'expression des gènes dans les systèmes cellulaires eucaryotes. Enfin, le puissant outil que constituent les techniques de génie génétique doit permettre de modifier leurs propriétés dans un sens encore plus favorable à leur utilisation par l'homme.

C'est de l'ensemble de ces considérations qu'est né le projet de prospection et d'étude de densovirus initié conjointement par l'Institut de Recherche pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) devenu CIRAD-CP et l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) en collaboration très étroite avec la Station de Recherche INRA-CNRS de Pathologie Comparée de St. Christol lèz-Alès. Nos travaux ont porté sur l'étude de deux densovirus, le densovirus isolé de *Casphalia extranea* (CeDNV)(Fédière, 1983) espèce pullulant annuellement dans les plantations de palmiers à huile de Palmindustrie d'Eloka (Côte d'Ivoire) et le densovirus de *Diatraea saccharalis* (DsDNV), originellement découvert par Meynadier *et al.*, (1977b) qui est le principal foreur de la canne à sucre au Brésil et en Guadeloupe.

Un premier volet de notre étude que l'on peut qualifier de biologie moléculaire, concerne l'analyse et le clonage du génome de ces deux virus. L'obtention de plasmides contenant la séquence complète du génome de *DsDNV* et la construction de virus chimères nous a de plus permis d'aborder l'aspect des relations virus - cellules par la transfection de lignées cellulaires et d'insectes sensibles. Le deuxième volet de notre recherche a consisté à l'initiation d'une étude épizootiologique sur le terrain de la densonucléose de *C. extranea* en utilisant les outils performants de diagnostic que sont les sondes nucléiques.

Avant de présenter les résultats de nos travaux au chapitre IV et V, nous rappellerons les grands traits de la biologie et de la pathologie virale des ravageurs hôtes (chapitre I), les propriétés essentielles des densovirus (chapitre II), et décrirons le matériel et les méthodes que nous avons utilisés (chapitre III).

**CHAPITRE I**

**BIOLOGIE ET PATHOLOGIE VIRALE  
DES RAVAGEURS ETUDIES**

## I. Biologie, dégâts et aires de répartition

### A. Biologie

#### 1) *Casphalia extranea* Walker, 1869.

Cette espèce appartient à la famille des *Limacodidae* créée par Walker en 1855. Cette famille de macrolépidoptères changea ensuite souvent de nom : *Euclideanidae* - Dyar, 1894, *Heterogeneidae* - Meyrick, 1895, puis *Cochlididae* - Dyar, 1902, avant de reprendre son appellation d'origine désormais seule reconnue. Les membres de la famille des *Limacodidae* sont avec les *Zygaenidae* regroupés dans la super famille des *Zygaenoidea* - Gravenhorst, 1843.

La biologie de *C. extranea* a été étudiée par Fédière (1983). L'adulte (Fig. 1) est un papillon au corps robuste, de taille moyenne (20 et 50 mm d'envergure). L'imago possède un corps jaune ocre, le dessus du thorax est gris brun et la tête noirâtre. Les ailes antérieures sont gris brun, avec une nervure blanche vers la base dans la partie antérieure. Les ailes postérieures sont jaune d'ocre, avec une bande marginale brun foncé et une tache noirâtre médiane. Les individus des deux sexes sont de coloration identique mais se différencient par une envergure plus grande chez la femelle (43 - 45 mm) par rapport au mâle (32 - 34 mm). L'imago possède une durée de vie d'environ 15 jours et une activité essentiellement nocturne avec une alimentation très réduite en rapport avec ses pièces buccales atrophiées. La femelle pond ses oeufs groupés en ooplaque sur la face inférieure d'une feuille. Chaque ponte est constituée d'une centaine d'oeufs dont la période d'incubation est de 6 à 7 jours. A l'éclosion les larves néonates mesurent en moyenne 1,5 mm de long et sont de couleur entièrement jaune paille. La chenille (Fig. 1) est limaciforme rampant sur sa face ventrale aplatie pourvue de ventouses grâce auxquelles elle reste fixée aux feuilles. Elle possède 4 rangées longitudinales de tubercules coniques ornés de soies jaunes urticantes et des tubercules plus gros hérissés de soies noires. Les toxines responsables de cette urticaire ont été caractérisées chez l'espèce voisine *Latoia vivida* (Fourie et Hull, 1980). Les tubercules sont au nombre de 10 dans la partie antérieure et de 4 dans la partie postérieure. En fin de développement la cuticule prend un aspect gras, la larve change de teinte et devient jaunâtre. Le cycle de développement larvaire dure en moyenne 3 mois et est composé de 8 stades distincts essentiellement par la taille. La larve du dernier stade mesure environ 28 mm de long, elle se laisse tomber au sol depuis les feuilles et s'enfonce à faible profondeur pour se confectionner un cocon. La prénymphe et la nymphe sont enfermées dans ce cocon brun très épais, de forme ovoïde, présentant un dimorphisme sexuel. Les cocons des femelles mesurent de 16 à 18 mm de long et pèsent de 0,9 à 1,2 g; ceux des mâles mesurent 12 à 14 mm et ne pèsent que 0,3 à 0,6 g. Un arrêt de développement (diapause) d'une durée de 7 mois intervient au stade prénympheal. La chronologie du cycle de développement est résumée dans le tableau 1

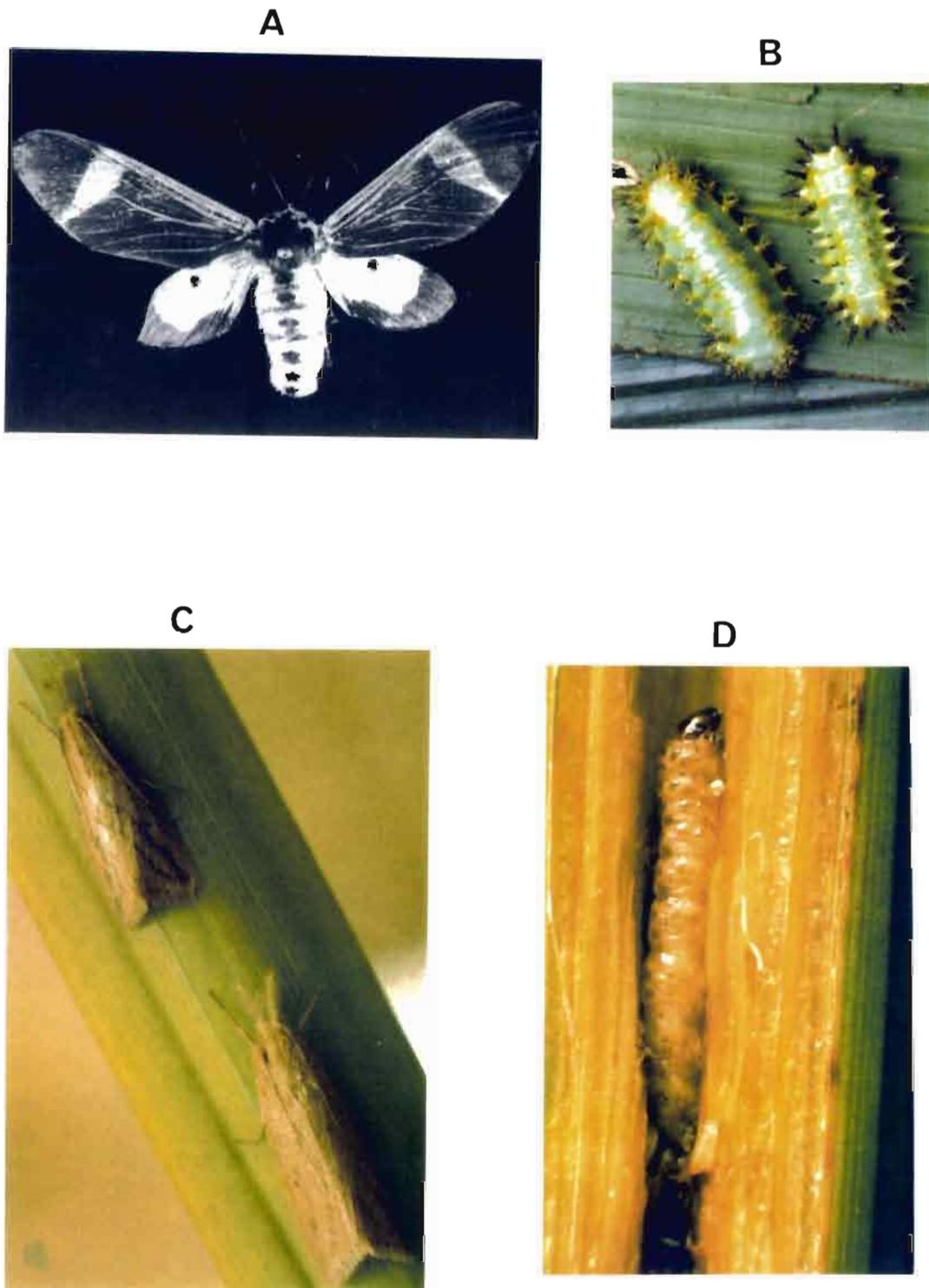


Fig. 1 : Morphologie de *C. extranea* et de *D. saccharalis*

A : Adulte de *C. extranea* x 2,5

B : Larves de *C. extranea* (stade V et VII x 1)

C : Adulte de *D. saccharalis* x 2,5

D : Larves de stade VII de *D. saccharalis* x 2,5

C et D ; cliché CIRAD-CA

**Tableau 1 : Etapes du cycle de développement de *C. extranea*  
(Fédière, 1983)**

SAISONS	MOIS	STADES DE DEVELOPPEMENT
Petite saison des pluies	Octobre	Prénympe  en  diapause
	Novembre	
Grande saison sèche	Décembre	
	Janvier	
	Février	
	Mars	
Grande saison des pluies	Avril	Nymphe Adulte Oeuf Stades larvaires
	Mai	
	Juin	
	Juillet	
Petite saison sèche	Août	
	Septembre	

2) *D. saccharalis* Frabricius, 1794,

Cette espèce appartient à la famille des *Pyralidae* et à la sous famille des *Crambinae*. Décrite d'abord en 1794 par Fabricius sous le nom de *Phalaena saccharalis*, elle possède plusieurs synonymes (Williams *et al.*, 1969) : *Crambus sacchari* - Fabricius 1794; *D. sacchari* - Guilding, 1928; *Crambus lineosellus* - Walker 1863; *Chilo oblitterallus* - Zeller, 1863; *D. saccharalis* var. *grenadensis* - Dyar, 1911; *D. Pedidocla* - Dyar, 1911; *D. continens* - Dyar-1911; *D. saccharali* f. *brasilensis* - Van Gorkum et De Waal, 1913; *D. incomparella* - Dyar et Heinrich, 1927, *D. saccharalis* - Dyar et Heinrich, 1927.

L'adulte (Fig. 1) mesure 12 à 14 mm pour une envergure de 20 à 40 mm; les ailes antérieures sont bistre clair avec deux lignes brunes, plus ou moins continues, formant un V. Il est de couleur crème avec des séries dorsales et latérales de taches verruqueuses brun foncé (Appert et Deuse, 1982) et une durée de vie d'environ 3 jours. L'accouplement est nocturne et la femelle fécondée pond des oeufs dès le lendemain. Les pontes sont disposées en amas plaqués contre la face inférieure de la feuille. Les amas comptent en moyenne 25 oeufs disposés en 3 ou

4 rangées et imbriqués en écailles de poisson (Stehle, 1956; Astabie, 1986). A la fin de la période d'incubation qui dure en moyenne 8 jours, les embryons deviennent visibles sous forme d'un petit point noir (capsule céphalique).

A l'éclosion les larves néonates sont très mobiles et commencent à manger à la surface du limbe foliaire. Ces larves, de couleur crème-beige, mesurent environ 1 mm à l'éclosion et peuvent atteindre 25 à 35 mm au dernier stade (Fig.1). Elles peuvent se faire transporter par le vent au bout d'un fil de soie. La chenille descend ensuite le long de la feuille et reste à la base de la gaine foliaire durant 5 à 7 jours. Après la mue elle pénètre dans les tissus ligneux de la canne où elle fore une galerie circulaire pouvant passer d'un entre-noeud dans le suivant. A la fin d'un cycle de développement de 6 à 8 stades, d'une durée moyenne de 5 à 7 semaines, la chenille creuse un trou de sortie plus gros près duquel elle se chrysalide. L'adulte sort au bout d'une semaine environ et vit 2 à 3 jours (D'Aguilar et Bonfils, 1962). On peut dénombrer 7 générations annuelles. Toutefois cette pyrale peut présenter une diapause larvaire et on trouve alors des chenilles hivernantes dans les chaumes et les tiges demeurés sur le champ ou dans les herbes (Appert et Deuse, 1982)

#### B. Dégâts et aires de répartition

##### 1°) *C. extranea*

Les larves néonates de *C. extranea* restent grégaires jusqu'au 4<sup>ème</sup> stade larvaire. Durant cette période elles ne consomment que les cellules de l'épiderme inférieur de la foliole; le reste de l'épiderme foliaire se dessèche très rapidement et prend une teinte grisâtre qui permet la localisation rapide des jeunes colonies (Fédière, 1983). A partir du 4<sup>ème</sup> stade l'instinct grégaire disparaît et la larve consomme la foliole sur toute son épaisseur ne laissant que la nervure principale. C'est durant le dernier stade que la larve consomme la plus grande quantité du tissu foliaire. Sur la plantation d'Eloka, durant les mois d'Août et Septembre 1980, la pullulation de *C. extranea* occasionna de sévères défoliations sur plus d'une centaine d'hectares.

Les *Limacodidae*, sont inféodés presque exclusivement aux zones intertropicales humides du globe. Ainsi ils sont particulièrement abondants en espèces et en nombre d'individus dans les régions équatoriales d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie du sud Est. Cette famille possède plusieurs espèces phyllophages de plantes cultivées. Mais c'est surtout en tant que défoliateurs des palmacées en plantations industrielles, que les larves de ces lépidoptères sont essentiellement connues.

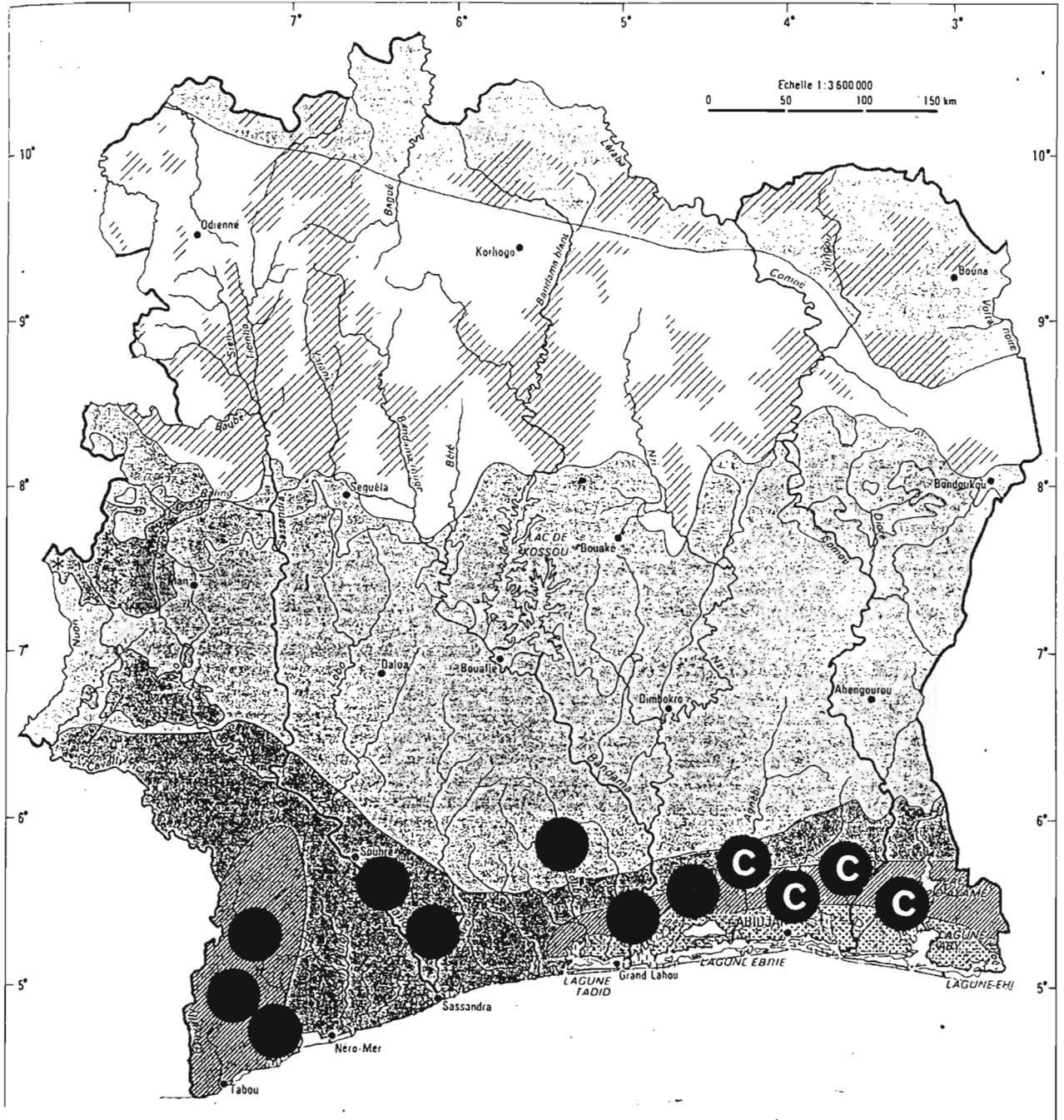


Fig. 2 : Localisation de l'espèce *Casphalia extranea* en Côte d'Ivoire



Unités Agroindustrielle palmiers en Côte d'Ivoire



Localisation de l'espèce *C. extranea*

En Afrique de l'Ouest, c'est Lepesme (1947) qui le premier a cité trois espèces causant des dégâts au palmier à huile. En Côte d'Ivoire, lieu de nos investigations, les premières pullulations de *Limacodidae* sur les palmacées sont signalées par Houiller (1961) qui étudie l'espèce *Latoia pallida*. Cet auteur rend compte de plusieurs foyers d'attaque affectant des dizaines d'hectares de palmiers à huile sur les plantations de Mopoyem en 1957 puis de Cosrou et Yocoboué en 1959. Depuis cette date les entomologistes de l'Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) signalent régulièrement les dégâts causés par deux espèces : *Latoia viridissima* et *C. extranea*. Deux importantes épizooties ont été étudiées au cours des pullulations de ces deux espèces par Fédière (1983). L'une de *L. viridissima* sur la plantation de cocotiers de l'IRHO Port-Bouët, l'autre de *C. extranea*, non signalée jusqu'en 1980, sur la plantation de palmiers à huile de Palmindustrie - Eloka. Depuis cette date, des générations plus ou moins importantes de ces deux dernières espèces se succèdent dans les plantations de palmiers à huile et de cocotiers de la basse Côte d'Ivoire qui constitue notre zone d'étude (Fig. 2) Récemment l'espèce *C. extranea* a été également signalée dans les plantations villageoises d'Assinie et en fin d'année 1991 sur les cocotiers de la Station Marc Delorme de Port bouët (Philippe, communication personnelle)

## 2°) *D. saccharalis*

*D. saccharalis*, appelé communément "sugar cane borer" par les anglophones est un ravageur de toutes les graminées cultivées : riz, maïs, canne à sucre, sorgho (Roe *et al.*, 1981). Au Brésil, il est le plus important ravageur de canne à sucre, surtout dans la région de Sao paulo qui avec une superficie de 1,87 M ha, et une production estimée pour l'année 1985 à 122 M de tonnes de canne, représente la plus importante région de culture de canne à sucre au monde (Macedo et Botelho, 1988). Les dégâts causés par cette espèce occasionnent une perte estimée à plus de 100 M \$ US chaque année (Macedo et Botelho, 1986; Margarido et Castilho, 1988 ). Une attaque précoce de la plante, pendant les 2 premiers mois de sa croissance, provoque un "coeur mort" avec arrêt de la végétation. Une atteinte plus tardive entraîne un retard dans le développement ou le bris de la tige. Les entre-noeuds sont perforés et sur le riz, la moelle de la tige est détruite (Appert et Deuse, 1982)

Sa répartition est tropicale et subtropicale (Fig. 3). Il provoque de graves préjudices en Floride (Gifford et Man, 1966), en Louisiane, au Texas et dans toute l'Amérique centrale. Il est également présent dans toutes les îles antillaises, notamment en Guadeloupe où il est un des plus grands ravageurs de canne à sucre (Galichet, 1972; Delattre, 1978). Il sévit également en Argentine, en Bolivie, au Brésil, en Colombie, en Equateur, en Guyanne française, au Pérou, au Paraguay, en Uruguay ainsi qu'au Vénézuéla ( CAB IIE, 1989).



© C.A.B. International, 1989

Fig. 3 : Carte de répartition géographique de *D. saccharalis*

## II. Pathologie virale et lutte biologique

### A. Pathologie virale

Des représentants de sept familles de virus ont été identifiés comme agents pathogènes des *Limacodidae* et des *Pyrallidae* (tableau 2). Il s'agit de baculovirus de polyédroses nucléaires et de granuloses, d'iridovirus, de densovirus, de réovirus de polyédroses cytoplasmiques (Cypovirus), de virus du groupe  $\beta$  nudaurelia (*Tetraviridae*), de picornavirus et enfin d'entomopoxvirus. Nous présenterons brièvement les principales caractéristiques de ces virus.

**Tableau 2 : Viroses de quelques *Limacodidae* et *Pyrallidae***

TYPE DE VIROSE	ESPECE HÔTE ET PLANTES RAVAGEES	ORIGINE	REFERENCES
<b>BACULOVIROSES</b>			
a) Granuloses	(1) <i>Darna nararia</i> (C) (1) <i>D. trima</i> (P, C) (1) <i>Parasa lepida</i> (C)  (2) <i>Diatraea saccharalis</i> (CS) (2) <i>Chilo suppressalis</i> (R, M) (2) <i>C. sacchariphagus indicus</i> (2) <i>Cadra cautella</i>	Sri Lanka Malaisie Indonésie  USA USA	Smith & Xeros, 1954 Thomas & Poinar, 1973 Ginting & Desmier de Chenon, 1987 . Steinhaus & Marsh, 1962 Steinhaus & Marsh, 1962 Akbaraly-Vally, 1985 Hunter & Hoffmann, 1970
b) Polyédroses nucléaires	(1) <i>Natada pucara</i> (P) (1) <i>Setora tagalog</i> (P) (1) <i>Thosea boreocaeerulea</i> (C) (1) <i>Parasa consocia</i> (1) <i>Setora stimulea</i>  (1) <i>Latoia viridissima</i> (P, C) (2) <i>Galleria mellonella</i> (2) <i>Cadra cautella</i> (2) <i>Maliarpha separatella</i>	Colombie Philippines Philippines Chine Amérique Lat  Côte d'Ivoire Côte d'Ivoire	Genty <i>et al.</i> , 1978 Cock et Godfray, 1985 Cock et Godfray, 1985 Ting-Wei <i>et al.</i> , 1980 Van Der Geest & Van Der Laan, 1972 Kouassi & <i>al.</i> , 1991 Bergold, 1947 Thomson & Redinger, 1968 Pollet , 1981
<b>IRIDOVIROSES</b>			
	(1) <i>Apoda dentatus</i> (1) <i>Microleon longipalpis</i> (2) <i>C. suppressalis</i> (2) <i>Ephestia cautella</i>	Etats-Unis  Etats-Unis	Martignoni & Iwai , 1981 Martignoni & Iwai, 1986 Fukaya & Nasu, 1966 Martignoni et Iwai, 1986
<b>DENSONUCLEOSES</b>			
	(1) <i>Sibine fusca</i> (P) (1) <i>Casphalia extranea</i> (P, C) (2) <i>Diatraea saccharalis</i> (CS) (2) <i>Galleria mellonella</i>	Colombie Côte d'Ivoire Guadeloupe France	Meynadier & <i>al.</i> , 1977a Fédière, & <i>al.</i> , 1981 Meynadier <i>et al.</i> , 1977b Meynadier <i>et al.</i> , 1964

CYPOVIROSES	(1) <i>Setothosea asigna</i> (P, C) (1) <i>Sibine apicalis</i> (2) <i>C. sacchariphagus</i> (2) <i>Ephestia cautella</i>	Indonésie Amérique Lat Réunion	Monsarrat (non publ.) Martignoni & Iwai , 1981 Morel & al., 1981 Martignoni & Iwai , 1981
TETRAVIROSES	(1) <i>Darna trima</i> (P, C) (1) <i>Parasa lepida</i> (C)  (1) <i>Setora nitens</i> (P, C) (1) <i>Setothosea asigna</i> (P, C) (1) <i>L. vivida</i> (café, cacao)	Malaisie Indonésie  Pakistan Malaisie Côte d'Ivoire	Reinganum <i>et al.</i> , 1978 Ginting & Desmier de Chenon, 1987. Grenwood & Moore, 1982 Reinganum <i>et al.</i> , 1978 Fédière, 1985
PICORNAVIROSES	(1) <i>L. pallida</i> (C) (1) <i>L. viridissima</i> (P, C) (1) <i>Sibine fusca</i> (P) (1) <i>Ploneta diducta</i> (P)	Côte d'Ivoire Côte d'Ivoire Colombie Indonesie	Fédière, 1985 Fédière, 1983 Fédière, 1983 Mariau <i>et al.</i> 1991
ENTOMOPOX- VIROSES	(2) <i>Acrobasis zelleri</i>	Tchécoslov.	Weiser et Vago, 1966

(1) = famille des *Limacodidae* ; (2) = famille des *Pyalidae*

(P = palmier à huile; C = cocotier; CS = canne à sucre; R = riz; M = maïs)

NB. D'autres virus isolés chez plusieurs autres espèces de *Limacodidae* sont mentionnés dans : La lutte intégrée en palmeraie : Bilan (Mariau, 1993) et dans *Virus Diseases of Limacodidae* (Entwistle, 1987).

### 1°) Les baculoviroses

Certaines maladies dues aux baculovirus sont connues depuis très longtemps chez les insectes sous le terme de polyédroses nucléaires. Cette appellation reflète la propriété de ces agents d'induire, dans les noyaux où ils se multiplient, la formation d'inclusions polyédriques de grande taille facilement reconnaissables au microscope photonique. Les baculovirus (du latin baculum = petit bâton) sont des virus en forme de bâtonnet mesurant en moyenne 250 à 300 nm de long sur 30 à 60 nm de diamètre. Les virions sont constitués d'un corps central formant une nucléocapside entourée d'une enveloppe trilamellaire. Le génome est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire circulaire superhélicoïdale d'un poids moléculaire de 90 à 230 kb. La nucléocapside est constituée d'au moins 12 à 30 polypeptides structuraux. Les baculovirus sont divisés en deux sous-familles selon qu'ils produisent ou non des corps d'inclusion. Ils sont regroupés dans la famille des *Baculoviridae* (Francki *et al.*, 1991).

Les *Eubaculovirinae* regroupent les baculovirus de la polyédrose nucléaire (NPV) et de la granulose (GV) qui constituent les deux genres. Les NPV ont la propriété de s'inclure en fin de morphogénèse dans des structures cristallines (corps d'inclusion) de nature protéinique appelées polyèdres et renfermant de nombreuses particules virales.

Les corps d'inclusion d'environ 0,5 à 3 microns de diamètre sont constitués d'un polypeptide unique, de poids moléculaire compris entre 25.000 et 33.000 daltons : la polyédrine (Croizier et Croizier, 1977; Francki *et al.*, 1991). Les NPV sont divisés en deux sous-genres : Les MNPV (plusieurs nucléocapsides par enveloppe) dont l'espèce type est le baculovirus d'*Autographa californica* lépidoptère *Noctuidae* (Vail *et al.*, 1973) et le SNPV (une seule nucléocapside par enveloppe) avec pour espèce type le baculovirus de *Bombyx mori*. Les GV (baculovirus de granulose) se caractérisent par des corps d'inclusion plus petits, ovoïdes, appelés granules, ne contenant généralement qu'une seule particule virale. L'espèce type est le baculovirus de *Plodia interpunctella* (PIGV) (Francki *et al.*, 1991).

**Les *Nudibaculovirinae*** : Cette deuxième sous famille des *Baculoviridae*, qui regroupe les baculovirus libres (non-occluded baculovirus) possèdent les mêmes caractéristiques que la première, mais en diffèrent du fait qu'ils ne sont pas inclus dans un corps protéique. L'espèce type en est le baculovirus d'*Heliothis zea* (*HZNOB*) (Francki *et al.*, 1991).

#### 2°) Les iridoviroses

Ces viroses doivent leur nom à l'iridescence bleutée ou verdâtre caractéristique des insectes infectés. La particule virale est non enveloppée, icosaédrique, mesurant entre 125 et 300 nm de diamètre et à site de multiplication cytoplasmique. Le génome est composé d'ADN bicaténaire linéaire d'un poids moléculaire de 100 à 250 x 10<sup>6</sup> daltons (Kelly et Robertson, 1973). Les iridovirus isolés chez les insectes sont scindés en deux genres au sein de la famille des *Iridoviridae* (Francki *et al.*, 1991) : le genre *Iridovirus* dont l'espèce type est "l'iridescent virus" de *Chilo suppressalis* et le genre *Chloriridovirus* avec pour espèce type le virus irisant type 3 des moustiques du genre *Aedes* (Bellet, 1968).

#### 3°) Les densonucléoses

Ce sont des viroses caractérisées essentiellement par l'hypertrophie des noyaux des cellules infectées, correspondant à l'accumulation de particules virales dans le nucléoplasme (Meynadier *et al.*, 1964). Les agents responsables de ces maladies sont des petits virus à ADN (Vago *et al.*, 1964) dont les caractéristiques seront exposées dans le chapitre suivant.

#### 4°) Les réoviroses

Les réoviroses sont essentiellement représentées chez les insectes par le genre *Cypovirus* responsable des maladies connues sous le nom de polyédroses cytoplasmiques, caractérisées par la présence de polyèdres dans le cytoplasme des cellules de l'intestin moyen.

Les agents de ces maladies, inclus dans les polyèdres sont constitués d'une double capsidie icosaédrique de 60 à 80 nm de diamètre, sans enveloppe, La capsidie interne portant douze spicules disposées aux sommets de l'icosaèdre. Le génome viral se compose d'ARN bicaténaire linéaire segmenté en 10 ou 12 fragments dont les poids moléculaires se répartissent entre 0,2 et 3,0 x 10<sup>6</sup> daltons (Payne et Rivers, 1976). L'espèce type est le cypovirus du lépidoptère *Bombycidae*, *Bombyx mori* (Ishimori, 1934).

#### 5°) Les tétraviroses (virus du groupe *β nudaurelia*)

L'agent pathogène est un petit virus icosaédrique à ARN monocaténaire. Une quinzaine de virus présentant la propriété de ne posséder qu'une seule protéine de capsidie (PM : 60-70 x 10<sup>3</sup> daltons) ont été regroupés pour former une famille ayant reçu le nom de *β nudaurelia* (Matthews, 1982). Cette famille a reçu récemment le nom de *Tetraviridae* (Brown, 1989). L'espèce type est le virus *β* du lépidoptère *Saturnidae*, *Nudaurelia cytherea capensis* isolé en Afrique du sud (Juckes, 1970).

#### 6°) Les picornaviroses

La famille des *Picornaviridae* regroupe essentiellement des virus de vertébrés comme le genre *Enterovirus* dont fait partie le virus humain de la poliomyélite. Ces picornavirus se présentent comme des particules icosaédriques de 30 nm de diamètre dont le génome est formé d'une chaîne linéaire monocaténaire d'ARN d'une taille de 2,4 à 2,7 x 10<sup>6</sup> daltons et représentant 30 % de la masse totale du virion. La composition polypeptidique de la capsidie consiste en 4 protéines dont 3 majeures (VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub>) de 24 à 41 x 10<sup>3</sup> daltons et d'une protéine mineure, VP<sub>4</sub> de 5,5 à 13,5 x 10<sup>3</sup> daltons (Francki *et al.*, 1991). Deux virus d'insectes représentent les espèces types chez les invertébrés : le virus de la paralysie du grillon (CrPV) (Reinganum *et al.*, 1970) et le virus C de la drosophile (DCV) (Jousset *et al.*, 1972). Les picornavirus des insectes font partie de la famille des *Picornaviridae*, mais n'ont pas encore été regroupés au sein d'un genre (Francki *et al.*, 1991).

#### 7°) Les entomopoxviroses

Les genres *Entomopoxvirus* composent la sous-famille des *Entomopoxvirinae* que sont les Poxvirus inféodés aux insectes. Les virus de ce groupe, inclus en grand nombre dans des corps d'inclusion parasphériques (ou ovoïde) de 170-250 à 300-400 nm, se multiplient dans le cytoplasme des cellules infectées. Leur génome, à ADN bicaténaire linéaire possède un poids moléculaire de l'ordre de 225 à 380 kb. Les genres qui représentent cette sous-famille sont : les *Entomopoxvirus A* dont l'espèce type est le poxvirus du coléoptère *Melolontha melolontha*, les *Entomopoxvirus B* représenté par le Poxvirus du lépidoptère *Amsacta moorei*, et les *Entomopoxvirus C* avec pour espèce type, le poxvirus du diptère *Chironomus luridus* (Francki *et al.*, 1991).

## B. Lutte biologique

La lutte strictement chimique contre les insectes ravageurs des cultures connaît ses limites avec le développement de formes de résistance, la pollution de l'environnement par les produits toxiques à grande rémanence et leur stockage dans les organismes vivants, la destruction non sélective de l'entomofaune utile, et enfin l'élévation au rang de ravageurs importants de certaines espèces auparavant minoritaires, par suite d'une perturbation des niches écologiques ou de la destruction des ennemis naturels de ces espèces. Des solutions de remplacement ou de complémentation relevant des principes de la lutte biologique qui consiste à utiliser contre une population donnée ses antagonistes ou ennemis, ont connu depuis quelques années un essor considérable. Parmi les ennemis d'insectes ravageurs de cultures, on distingue : les insectes prédateurs, les insectes parasitoïdes, les nématodes, les protozoaires et les germes entomopathogènes que sont les virus, les bactéries et les champignons.

### 1°) Introduction d'entomophages prédateurs et parasites

Elle a pour but de rétablir l'équilibre entre les insectes nuisibles et leurs prédateurs ou leurs parasites par l'introduction d'un certain nombre de ces antagonistes que sont les insectes prédateurs et les parasites pouvant intervenir à divers niveaux du cycle biologique de l'insecte cible. On distingue chez les entomophages deux groupes zoologiques : Les entomophages prédateurs qui chassent leurs proies et les entomophages parasites.

Les entomophages prédateurs sont essentiellement des coléoptères, des névroptères, des hémiptères, des diptères et hyménoptères, des arachnides et certains poissons, amphibiens et nombre d'oiseaux (Riba et Silvy, 1989). Ils ont été les premiers utilisés en lutte biologique par Riley en 1873. L'acarien *Tyroglyphus phylloxerae* a été utilisé contre *Phylloxera vitifoliae*; *Coccinella undecimpunctata* a été utilisé en Nouvelle Zélande contre les pucerons (Simonds *et al.*, 1976). Même si parmi les nombreuses tentatives d'introduction de prédateurs il ya eu très peu de réussite, il faut cependant reconnaître le grand rôle de ces derniers dans l'équilibre naturel de leurs proies.

Les entomophages parasites d'insectes se répartissent en deux classes zoologiques que sont les insectes et les nématodes (Riba et Silvy, 1989). Les insectes parasites sont en fait des entomophages parasitoïdes dans la mesure où ils finissent par tuer l'individu qu'ils colonisent. Chez ces espèces, seul le stade larvaire se déroule au dépens de l'hôte qui est soit unique ou à spectre très limité. Ils se rencontrent essentiellement chez les diptères et hyménoptères. Parmi les hyménoptères, plusieurs espèces du genre *Apanteles* (*Braconidae*) tels *A. chilonius* et *A. flavipes*, parasitent les lépidoptères *Noctuidae* et surtout les *Pyrilidae*. Ces dernières ont été utilisées dans la lutte contre des lépidoptères du genre *Chilo* et *Diatraea*. Ils ont fait l'objet de plusieurs lâchers depuis de nombreuses années dans diverses régions du globe notamment à

Madagascar (Brenière, 1965), en Guadeloupe (Bordat, 1983) et au Brésil (Macedo et Botelho, 1988) pour lutter contre *D. saccharalis*. En 1981 *A. flavipes* et *A. chilonius* ont été introduits en Côte d'Ivoire pour lutter contre le foreur du riz *Chilo zacconius* (Bordat, 1983).

Chez les nématodes parasites d'insectes, on retiendra les Merminthides qui pénètrent dans l'hôte au deuxième stade larvaire et colonisent l'hémocœle en modifiant considérablement les fonctions de leurs victimes. C'est le cas de *Steinernema carpocapsae* qui élabore une substance non seulement toxique pour les insectes mais également inhibitrice de la défense immunitaire de l'hôte. Les espèces du genre *Steinernema* et *Heterorhabditis* associées à des bactéries très pathogènes des insectes présentent beaucoup d'espoirs pour la lutte biologique (Georgis, 1992). De plus la perspective d'utilisation de *Xenorhabdus spp.* bénéficie d'une attention particulière, suite aux travaux actuels qui ont montré leur rôle dans la lutte contre les ravageurs (Akhurst et Boemare, 1990).

## 2°) Utilisation des germes entomopathogènes

Les microorganismes utilisés en lutte biologique sont les champignons, les bactéries, les virus et les protozoaires. Les **champignons** les plus utilisés sont des hyphomycètes et des zygomycètes entomophages en particulier des genres *Beauveria*, *Metarhizium*, *Hirsutella*, *Entomophaga*, *Erynia*, *Neozygites* et *Verticillium* dont certaines espèces sont soit produites en grande quantité et utilisées au champ, soit considérées comme des biopesticides potentiels (Wraight et Roberts, 1987). Les biopesticides fongiques permettent la répression des stades inactifs (l'oeuf ou la nymphe) de l'hôte.

Les **bactéries** entomopathogènes appartiennent au genre *Serratia* et surtout au genre *Bacillus* avec les 4 espèces bien connues, *Bacillus moritai*, *B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* (BT) qui est industriellement produite et utilisée actuellement à grande échelle, agit par l'intermédiaire de deux toxines principales que sont l'endotoxine et l'exotoxine thermostable. Des essais positifs utilisant cette bactérie ont été faits sur le *Limacodidae*, *Latoia pallida* Möschl (Mariau, 1982) et plus récemment sur les larves de *C. extranea* pullulant sur les cocotiers de la Station de Recherches Marc Delorme de Port bouët en Côte d'Ivoire. Aux Philippines cette bactérie a été utilisée contre les *Limacodidae* du cocotier (Pacumbaba, 1988).

Les **protozoaires** les mieux connus dans le contexte de la lutte biologique sont les microsporidies du genre *Nosema* avec l'espèce *Nosema locustæ* qui a été utilisée avec succès contre les invasions de criquets dans l'ouest des Etats-Unis et du Canada, ainsi qu'en Inde. Un biopesticide à base de *N. locustæ* est fabriqué industriellement aux Etats-Unis et offert sur le marché (Cloutier C. et Cloutier C., 1992). En général l'action de ces microsporidies n'est pas assez rapide pour que celles-ci puissent être utilisées à des fins curatives. Quant à la lutte microbiologique utilisant les virus, elle fera l'objet du paragraphe suivant.

### 3°) Utilisation des virus d'insectes

#### a) Facteurs indispensables

La réussite de l'utilisation des germes entomopathogènes et en particulier des virus doit tenir compte de plusieurs facteurs entre autres la spécificité d'hôte et son innocuité vis-à-vis des vertébrés et surtout pour l'homme, sa capacité à déclencher une épizootie dans un délai bref (la virulence) ou son maintien au sein de l'hôte. La connaissance des périodes d'épizootie, des stades de sensibilité des larves et du mode de dissémination des germes sont autant de facteurs indispensables en lutte biologique. Plusieurs virus sont transmis de génération en génération par une contamination externe du chorion des oeufs déposés sur des substrats contaminés, ou par voie orale par la consommation d'aliments souillés par les générations précédentes. On parlera alors de transmission horizontales. D'autres le sont par voie transovarienne, il s'agit d'une transmission verticale. Parmi les facteurs responsables de la dissémination des virus on peut citer la pluie et le ruissellement, le vent, les prédateurs et les parasitoïdes. En ce qui concerne le facteur de spécificité et d'innocuité, des travaux ont montré une grande spécificité et une innocuité à l'égard de l'homme et des vertébrés (Burgess, 1980) chez les baculovirus. On peut mentionner d'autres exemples comme les tétravirus, les densovirus qui sont utilisés depuis quelques années en plantation sans dommage sur la faune non cible ni sur l'homme.

#### b) Application de virus

Pendant longtemps, seuls les baculovirus ont été pris en considération dans la lutte microbiologique du fait qu'ils constituent une famille spécifique aux invertébrés. A l'heure actuelle, des travaux ont mis en lumière le rôle tout aussi efficace des petits virus icosahédriques à ADN ou à ARN dans le déclenchement des épizooties. Les virus les plus rencontrés chez les insectes se répartissent en six principales familles (cf. tableau 2)

Des recherches sur les virus entomopathogènes de lépidoptères *Limacodidae* défoliateurs du palmier à huile et du cocotier et les premiers essais en plantation contre ces ravageurs ont été faits à l'instigation de l'IRHO dès 1975 (Desmier de Chenon *et al.*, 1988). La plupart du temps, ces viroses furent décelées lors d'épizooties apparaissant durant les pullulations (Genty et Mariau, 1975; Tiong et Munroe, 1976). Les représentants de sept familles de virus mentionnés plus haut (cf. tableau 2) sont des agents potentiels de lutte microbiologique contre les ravageurs *Limacodidae* (Payne, 1982; Entwistle 1983). C'est sur *Sibine fusca* Stoll qu' a été pour la première fois mise en évidence une virose de type denonucléose sur un insecte phyllophage de palmiers (Meynadier *et al.*, 1977a). En Colombie, dans les conditions naturelles, il a été possible de déclencher la maladie avec de très faibles quantités de matériel infectieux et cela sur des surfaces importantes (Genty et Mariau, 1975).

D'autres utilisations en plantation ont été faites avec le virus  $\beta$  nudaurelia de *Parasa lepida* Cramer (Ginting et Desmier de Chenon, 1987). *Setora nitens* et *Setothosea asigna* en Indonésie ont été l'objet de plusieurs traitements par applications virales (Sipayung *et al.*, 1989; Sinuraya et Desmier de Chenon, 1988). En Côte d'Ivoire, des essais de lutte biologique utilisant le picornavirus de *Latoia viridissima* et le densovirus de *C. extranea* ont donné des résultats satisfaisants. En effet après deux semaines de traitement on a enregistré 92% de mortalité chez les larves des parcelles traitées et une diminution très significative de la densité de la génération suivante (Fédière *et al.*, 1986).

Quant aux *Pyralidae*, bien que depuis plusieurs années un certain nombre de maladies virales aient été décrites chez cette famille, peu d'études détaillées de caractérisation et d'utilisation en lutte biologique ont été entreprises. Ces virus isolés chez les pyrales se répartissent dans cinq principales familles (voir tableau 2). La granulose de *D. saccharalis* a été l'objet de plusieurs essais de traitement avec succès contre ce ravageur à Sao Paulo au Brésil (Macedo *et al.*, 1989; Pavan *et al.*, 1983).

D'autres méthodes de lutte biologique existent, parmi elles on peut retenir : la **lutte mécanique** qui peut se faire par la capture et la destruction d'adultes, des nymphes, des œufs, et des nids. La **méthode physique** qui exploite divers facteurs physiques tels que la température, le courant électrique, l'eau, la dessiccation, les radiations gamma. La **méthode physiologique** utilise les variétés résistantes aux insectes. La **méthode écologique** consiste en l'introduction des plantes pièges qui attirent les insectes ravageurs ou autres animaux dans le but de protéger d'autres plantes données. La **méthode culturale** elle, prend en compte la rotation des cultures, l'assolement, les espacements entre les plantes, les périodes de semilles, et la sélection génétique des variétés de plantes résistant aux insectes nuisibles. Enfin la **lutte intégrée** est un assemblage judicieux de toutes les possibilités existantes de lutte contre les ravageurs. Elle dérive du fait que aucune de ces méthodes n'est parfaite et satisfaisante isolément. Elle a pour but non pas de détruire radicalement une population donnée de ravageur mais de la ramener et la maintenir au-dessous du seuil de tolérance économique.

## **CHAPITRE II**

### **LES DENSOVIRUS : EVOLUTION DES RECHERCHES**

## I. Introduction

Les densovirus pathogènes des invertébrés, font partie de la famille des *Parvoviridae* à laquelle appartiennent deux autres groupes : les parvovirus autonomes et les virus adéno-associés (dépendovirus) inféodés aux vertébrés. Ce sont des petits virus icosaédriques non enveloppés, mesurant de 22 à 25 nm, dont le site de multiplication est nucléaire. Le génome viral est constitué par un ADN monocaténaire linéaire de 4,5 à 6 kb, chaque virion encapsidant un brin soit de polarité positive (brin +) soit de polarité complémentaire négative (brin -). Dans la population virale, les virions contenant un brin + ou un brin - sont en proportions égales chez la plupart des densovirus. Au contraire des dépendovirus qui requièrent pour se multiplier, la présence de virus "helper", tels que les adénovirus ou les herpesvirus (Rose, 1974; Buller *et al.*, 1981), les densovirus et les parvovirus autonomes se multiplient de façon autonome chez leur hôtes. Nous présentons dans ce chapitre les propriétés essentielles des densovirus.

## II. Variété et distribution

C'est à la station de Recherche de Pathologie Comparée de Saint Christol-lès-Alès qu'a été mis en évidence le premier densovirus (Meynadier *et al.*, 1964) chez la larve du lépidoptère *Pyralidae Galleria mellonella* L. au cours d'une épizootie foudroyante survenue dans un élevage massif de cet insecte pratiqué en Haute Savoie. L'origine virale de cette épizootie a été reconnue et à partir de ce matériel un nouveau type de virus, celui des densovirus (DNV), a été ainsi découvert (Vago *et al.*, 1964). Depuis cette date une vingtaine de virus semblables ont été isolés chez plusieurs espèces d'invertébrés provenant de diverses régions du globe et appartenant à divers ordres d'insectes : diptères, dictyoptères, lépidoptères, odonates et orthoptères. Des virus de type densovirus ont été récemment décrits chez les crustacés (cf. tableau 3).

Les densovirus sont généralement très pathogènes pour leurs hôtes et sont dans le milieu naturel responsables de fortes épizooties participant ainsi pour une grande part à la régulation de populations de ravageurs de cultures industrielles ou de vecteurs de maladies. De plus leur spécificité, leur innocuité vis-à-vis de l'homme et des vertébrés (Giran, 1966) ont fait pressentir ces virus comme un matériel de choix pour la lutte biologique (Lavie *et al.*, 1965). Des essais préliminaires d'application contre les moustiques (Buchatsky *et al.*, 1987) et certains défoliateurs de palmacées (Genty et Mariau, 1975; Fédière *et al.* 1986) ont fourni des résultats encourageants.

Tableau 3 : Densovirus : hôtes et origine

Ordres	Espèces	Pays d'origine	Références
Dictyoptères	<i>Periplaneta fuliginosa</i>	Japon	Suto <i>et al.</i> , 1979
Diptères	<i>Aedes aegypti</i> (Aedes DNV)	URSS	Lebedeva <i>et al.</i> , 1973
	<i>Simulium vitalium</i>	Etats-Unis	Federici, 1976
	<i>Aedes pseudoscutellaris</i> (lignée cellulaire)	Vénézuela	Gorziglia <i>et al.</i> , 1980
Lépidoptères	<i>Agraulis vanillae</i>	Grande Bretagne	Kelly <i>et al.</i> , 1980a
	<i>Bombyx mori</i> (BmDNV1)	Japon	Shimizu, 1975
	<i>Bombyx mori</i> (BmDNV2)	Japon	Maeda <i>et al.</i> , 1982
	<i>Bombyx mori</i> (BmDNV3)	Chine	Li - Ren <i>et al.</i> , 1982
	<i>Diatraea saccharalis</i> (DsDNV)	Guadeloupe	Meynadier <i>et al.</i> , 1977b
	<i>Euxoa auxiliaris</i>	Etats-Unis	Sutter, 1973
	<i>Galleria mellonella</i> (GmDNV)	France	Meynadier <i>et al.</i> , 1964
	<i>Junonia coenia</i> (JcDNV)	Etats-Unis	Rivers&Longworth, 1972
	<i>Lymantria dispar</i> (lignée cellulaire)	France	Grignon, 1982
	<i>Pieris rapae</i>	Chine	Sun <i>et al.</i> , 1981
	<i>Sibine fusca</i>	Colombie	Meynadier <i>et al.</i> , 1977a
	<i>Casphalia extranea</i> (CeDNV)	Côte d'Ivoire	Fédière <i>et al.</i> , 1981
<i>Pseudoplusia includens</i>	Etats-unis	Chao <i>et al.</i> , 1985	
Odonates	<i>Leucorrhinia dubia</i>	Suède	Charpentier, 1979
Orthoptères	<i>Acheta domestica</i> (AdDNV)	France	Meynadier <i>et al.</i> , 1977c
Crustacées	<i>Penaeus merguensis</i>	Singapour	Ligtner et Redman, 1985
Décapodes	<i>Penaeus semisulcatus</i>	Koweït	"
	<i>Penaeus orientalis</i>	Chine	"
	<i>Penaeus monodon</i>	Philippines	"
	<i>Carcinus mediterraneus</i>	France	Mari et Bonami, 1988
	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Malaisie	Anderson <i>et al.</i> , 1990
	<i>Penaeus sp</i> (IHHNV)	Hawaï	Bonami <i>et al.</i> , 1990

### III. Histopathologie : symptômes et spécificité tissulaire

Les maladies à densovirus sont appelées denonucléoses en raison de l'hypertrophie caractéristique des noyaux des cellules infectées, qui s'imprègnent fortement de colorants nucléaires tel que le réactif de Feulgen (Meynadier *et al.*, 1964). Elles se caractérisent chez les larves d'insectes infectées, notamment chez *Galleria mellonella*, par une paralysie progressive s'accompagnant d'une décoloration du tégument. Dans le noyau des cellules adipeuses apparaissent de larges plages denses correspondant à l'accumulation de particules virales (Vago *et al.*, 1966a ; Amargier *et al.*, 1965 ). Le densovirus de *D. saccharalis* (*DsDNV*) se multiplie dans le noyau sans entraîner la formation de masse centrale de virus rassemblés mais plutôt des amas chromatiniens fragmentés avec apparition de masse cristalline (Meynadier *et al.*, 1977b). Chez le lépidoptère *C. extranea*, les larves du 4<sup>e</sup> stade sont plus sensibles à l'infection virale. Elles meurent 2 à 3 jours après la contamination, tandis que les larves plus âgées survivent jusqu'à 6 à 8 jours. Au cours de l'évolution de la maladie les larves initialement vert pâle deviennent jaunes puis marron. Avant la mort, des sécrétions anales et buccales de couleur brune s'écoulent, marquant des altérations notables du système digestif. La larve devient alors très flasque. Les jeunes larves meurent collées aux feuilles alors que les plus âgées tombent sur le sol. Des phénomènes de prolifération cellulaire à caractère tumorigène ont été signalés soit dans l'intestin moyen de *C. extranea* et *Sibine fusca* (Fédière, 1983; Meynadier *et al.*, 1977a ; ) soit dans l'intestin postérieur de *Periplaneta fuliginosa* (Suto *et al.*, 1979).

Beaucoup de densovirus sont connus pour leur polytropisme tissulaire très large. Tel est le cas des densovirus de *G. mellonella* (*GmDNV*), *D. saccharalis* (*DsDNV*) *Acheta domestica* (*AdDNV*) (Meynadier *et al.*, 1964; 1977b; 1977c), *Junonia coenia* (*JcDNV*) (Diallo, 1978), *Aedes aegypti* (*Aedes DNV*) (Lebedeva *et al.*, 1973), *Pseudoplusia includens* (Chao *et al.*, 1985). Chez ces espèces les altérations nucléaires particulièrement nettes dans les cellules adipeuses sont également présentes dans presque tous les autres tissus (Vago *et al.*, 1966a) dont l'hypoderme, les hémocytes, le tissu péritrachéal, la paroi des glandes séricigènes, l'épithélium de l'intestin antérieur et postérieur, les muscles, les tubes de Malpighi, les gonades et les glandes de mue. Par opposition, les densovirus de *Bombyx mori*, de *S. fusca* et de *P. fuliginosa* présentent une spécificité tissulaire stricte et infectent presque exclusivement les cellules de l'intestin moyen (Watanabe *et al.*, 1976; Maeda et Watanabe, 1978). Chez *C. extranea* (*CeDNV*) même si les lésions sont décelables dans beaucoup de tissus, l'infection est essentiellement localisée dans l'intestin moyen (Fédière, 1983).

L'étude du développement du virus au cours de la métamorphose de son hôte a révélé que les larves infectées au dernier stade larvaire sont, selon la dose de virus, soit bloquées à l'état de prénymphe, soit atteintes seulement après la mue nymphale (Boemare et Bres, 1969; Boemare, 1973). La gamétogenèse se déroule dans sa quasi-totalité chez les chrysalides porteuses du

densovirus mais le développement des gonades ne se poursuit qu'un certain temps chez les prénymphe bloquées. Quel que soit le sexe, les gamètes ne sont pas lésés. C'est à un stade plus avancé de la maladie que les gaines conjonctives de gonades sont atteintes (Bergoin et Bres, 1968). Dans les autres organes, les lésions apparaissent d'abord au sein des tissus larvaires qui persistent chez la nymphe, ensuite dans les tissus en voie de développement tels que les ébauches imaginaires thoraciques. Dans les tissus des adultes issus de larves infectées, une oligoinfection a été également mise en évidence dans les noyaux des cellules adipeuses, des glandes séricigènes encore présentes, dans les cellules pérित्रachéales et de l'hypoderme (Boemare, 1969).

#### IV. Cytopathologie

De nombreux travaux de cytologie et d'ultrastructure conduits à l'aide de techniques de microscopie électronique, d'autoradiographie, d'immunofluorescence, et d'immunopéroxydase ont permis de préciser les différentes étapes de la pathogénèse virale chez les densovirus (Vago *et al.*, 1966a; Coté, 1969; Garzon et Kurstak, 1976). L'incorporation de thymidine tritiée est détectée dans le noyau par autoradiographie dès la deuxième heure après l'infection chez le densovirus de *G. mellonella*. De plus, les premiers marquages par immunofluorescence et immunopéroxydase apparaissent dans le cytoplasme 4 à 6 heures après l'infection et correspondent à l'apparition d'antigènes viraux précoces. Plus tard le marquage est intranucléaire et résulte de la synthèse d'antigènes structuraux (Kurstak, 1972). Les premières modifications ultrastructurales sont observées 6 à 12 heures après l'infection, dans le noyau. Le nucléole subit une rapide hypertrophie accompagnée d'une ségrégation de ses composants fibrillaires et granulaires, suivie d'une apparition de stroma virogène au centre du noyau qui repousse vers la périphérie le nucléole et la chromatine. Après 24 à 48 heures d'infection, des corpuscules intranucléaires apparaissent au centre du stroma virogène et des particules virales commencent à s'individualiser. Par la suite, le stroma virogène envahit la totalité du noyau causant son hypertrophie, le nucléole ayant complètement disparu. A l'intérieur du stroma virogène des virions s'individualisent et se regroupent en îlots. Graduellement, ces inclusions virales se rejoignent et remplacent le stroma virogène. Au dernier stade de l'infection, l'hypertrophie du noyau est telle, que le cytoplasme est considérablement réduit.

La production des virions par cellule est très importante. A ce stade de la maladie, des particules virales sont observées à l'intérieur de vésicules, dans le cytoplasme. De telles accumulations cytoplasmiques ont été observées lors de plusieurs infections à densovirus : chez *Spodoptera littoralis* infecté par le JcDNV (Diallo, 1978), chez *A. aegypti* (Buchatsky et Raikova, 1979), chez *L. dubia* (Charpentier, 1979) et dans les infections spontanées de deux lignées cellulaires : *A. pseudoscutellaris* (Gorziglia, 1980) et *L. dispar* (Grignon, 1982)

## V. Spectre d'hôtes

Le spectre d'hôtes de divers densovirus est variable. Malgré de nombreux essais *GmDNV* semble être limité à son hôte (Giran, 1966) et à une espèce très voisine, *Aphonia sociella* (Diallo, 1978) *GmDNV* peut être transmis d'une larve infectée à d'autres larves saines de l'hôte, par le parasite ovipositeur *Nemeritis canescens* (Kurstak, 1967). *CeDNV* et *AdDNV* semblent être spécifiques à leur hôte (Fédière *et al.*, 1990; Jousset *et al.*, 1986). En revanche le *JcDNV*, possède un spectre d'hôte étendu à plusieurs espèces de lépidoptères : *Aglais urticae* L. (*Nymphalidae*), *Lymantria dispar* L. (*Lymantriidae*), *Bombyx mori* L. (*Bombycidae*), *Mamestra oleracea*, *M. brassicae* L. (*Noctuidae*), *Spodoptera exuga*, *S. littoralis* (*Noctuidae*) (Rivers et Longworth, 1972; Longworth, 1978; Diallo, 1978). L'*Aedes DNV* est signalé comme pathogène pour 8 espèces de moustiques. *A. vexans*, *A. geniculatus*, *A. caspius dorsalis*, *A. cantans*, *A. albopictus*, *Culex pipiens pipiens*, *C. pipiens molestus*, *Culiseta annulata* (Lebedeva *et al.*, 1973; Lebedinets *et al.*, 1978).

Le densovirus de *Periplaneta fuliginosa* possède un spectre d'hôte étendu à trois autres espèces de blattes *P. australasiae*, *P. brunnea* et *P. japonica* (Suto *et al.*, 1979) et celui d'*Euxoa auxiliaris* semble pathogène pour deux autres noctuelles : *Pseudaletia unipuncta* et *Heliothis zea* (Sutter, 1973). Les densovirus de *B. mori* (*BmDNV1* et *BmDNV2*) semblent être spécifiques à chaque souche hôte. Même si des travaux d'infections croisées n'ont pas encore été réalisés, il convient de noter que plusieurs souches de *B. mori* ne sont pas sensibles au *BmDNV1* alors qu'elles sont au contraire sensibles au *BmDNV2* (Watanabe et Maeda, 1978; Seki, 1984).

Par ailleurs, il est important de mentionner qu'en dépit d'une forte virulence pour les invertébrés, les densovirus ne semblent pas pathogènes pour les vertébrés supérieurs et pour l'homme. L'inoculation du *GmDNV* à des mammifères tels que la souris et le lapin n'a entraîné aucun effet pathogène (Giran, 1966). Il en est de même pour le *JcDNV* et *Aedes DNV* inoculés à ces animaux en vue de la production d'immunsérums. En ce qui concerne la pathogénicité vis à vis de l'homme, bien qu'aucune preuve directe d'innocuité ne puisse être établie, il convient de noter que les essais de multiplication du *JcDNV* en culture cellulaire humaine Hela ont été négatifs (Jousset, communication personnelle). Par contre *GmDNV* semble se multiplier sur les cellules L de souris (Kurstak *et al.*, 1969)

## VI. Parentés antigéniques et hémagglutination

La structure antigénique des densovirus est encore mal connue. Cependant des parentés sérologiques ont été recherchées parmi les densovirus eux mêmes ou bien avec les parvovirus de vertébrés. Ainsi il a été montré que le *JcDNV* et le *GmDNV* ont des parentés sérologiques très étroites bien qu'ils présentent un spectre d'hôtes différent (Rivers et Longworth, 1972). Longworth (1978) et Kelly *et al.*, (1980b) ont montré par immunodiffusion double que cette

parenté antigénique n'était que partielle, le *JcDENV* possédant des déterminants antigéniques supplémentaires différents de ceux du *GmDENV*. Le densovirus du lépidoptère *A. vanillae* est apparenté au *GmDENV* et au *JcDENV* (Kelly *et al.*, 1980a). Il en est de même pour le densovirus de *P. includens* qui possède une parenté sérologique partielle avec celui de *G. mellonella* sans affecter pour autant les larves de cet insecte (Chao *et al.*, 1985). Au contraire, ceux de *C. extranea* et *A. domestica* n'ont aucune parenté antigénique ni avec le *GmDENV* ni avec le *JcDENV* (Fédière *et al.*, 1983; Jousset *et al.*, 1986). La souche Ina du densovirus de *B. mori* (*BmDENV1*) ne possède aucune parenté antigénique avec le *GmDENV* mais elle est étroitement reliée aux *BmDENV* (isolats de type 1) de Furuta et de Matsui (Kawase, 1985).

Aucune parenté sérologique entre le *GmDENV* et les parvovirus de vertébrés AAV1, H1, MVM et RV n'a pu être mise en évidence par Hoggan (1971) en utilisant les techniques de fixation du complément et d'immunofluorescence. Contrairement à la plupart des parvovirus de vertébrés, les densovirus ne semblent posséder aucune propriété hémagglutinante. Ainsi, *GmDENV* n'agglutine aucune des hématies humaines, de canard, de rat, de cobaye, de singe, de cheval, de vache, de chèvre, de mouton, de hamster, de souris et de babouin (Hoggan, 1971; Boemare *et al.*, 1970; Kurstak, 1972). Il est de même pour le *BmDENV1* qui n'agglutine pas les hématies de cobaye, de mouton, et le densovirus de *P. fuliginosa* pour lequel aucun pouvoir agglutinant vis à vis d'hématies humaines, de singe, de rat, de cobaye, de souris et de grenouille n'a pu être détecté (Kawase, 1985).

## VII. Diagnostic de la virose

Plusieurs méthodes permettent le diagnostic des densoviroses, soit de façon directe par observation des symptômes de la maladie, soit indirectement par la recherche des antigènes viraux. L'étude histopathologique en microscopie optique réalisée sur coupes de tissus permet d'observer une forte hypertrophie des noyaux infectés qui se colorent intensément avec le réactif de Feulgen. En microscopie électronique, les noyaux hypertrophiés présentent des masses granuleuses denses aux électrons constituées d'amas de particules virales. D'autres méthodes plus rapides à mettre en oeuvre, font appel à la détection de virus dans les broyats de larves examinés en microscopie électronique ou d'antigènes viraux au moyen d'anticorps spécifiques, préparés sur souris ou sur lapin. L'immunoprécipitation en gel d'agarose permet de détecter la présence de virions dans une goutte d'hémolymphe de larve infectée.

Le test ELISA pratiqué sur les larves de *G. mellonella* (Tijssen, 1985) est d'une grande sensibilité; il peut révéler la présence d'antigènes viraux de l'ordre du picogramme. L'agglutination à des billes de latex couplées à un anticorps spécifique a été utilisée pour la détection des *BmDENVs* (Shimizu, 1991). Les protéines virales à la concentration de 0,5 µg/ml peuvent ainsi être détectées. Cette méthode, très rapide, est 5 fois plus sensible que l'immunodiffusion. Par contre elle est 5 à 20 fois moins sensible que le test ELISA.

L'immunofluorescence est réalisée à partir de frottis de tissus d'insectes sur lames histologiques, fixés à l'acétone, puis couplés à un anticorps marqué à la fluorescéine (Maeda et Watanabe, 1978). Cette méthode a une sensibilité comparable au test d'agglutination sur les billes de latex.

La technique très sensible et très spécifique de diagnostic faisant appel à l'hybridation ADN-ADN à l'aide d'une sonde nucléaire, radioactive ou froide sera détaillée dans le chapitre suivant.

Toutes ces techniques sont des outils particulièrement bien adaptés à l'étude de l'épidémiologie des densovirus. Elles permettent notamment la surveillance de l'état sanitaire des populations, facteur important dans le choix de la méthode de lutte contre les insectes nuisibles. Après traitement, elles permettent également d'établir l'impact de l'insecticide viral sur les populations de ces ravageurs.

### VIII. Le virion : morphologie et propriétés physico-chimiques

Les agents des denonucléoses se présentent sous forme de particules icosaédriques non enveloppées de 20 à 25 nm de diamètre ayant un poids moléculaire d'environ  $6 \times 10^6$  daltons. L'estimation de la taille des densovirus présente des variations vraisemblablement liées au choix de la technique utilisée (coupes ultrafines ou colorations négatives : Vago *et al.*, 1964; 1966a). Les tailles suivantes sont rapportées dans la littérature : *Aedes* DNV, 20 nm (Butchasky *et al.*, 1979); DNV de *P. fuliginosa*, 20-21 nm (Suto *et al.*, 1979); *Jc*DNV, 20-22 nm (Rivers et Longworth, 1972); *Ad*DNV et *Ds*DNV, 22 nm (Meynadier *et al.*, 1977b; 1977c); *Ce*DNV, 22 nm (Fédière, 1983); et le DNV de *P. rapae*, 25 nm (Sun *et al.*, 1981); *Gm*DNV, 21-23 nm (Meynadier *et al.*, 1964); *Agraulis* DNV, 20 nm (Kelly *et al.*, 1980a).

La détermination de la structure fine des densovirus présente des difficultés liées à leur petite taille. Leur capsid possède une symétrie icosaédrique (Kurstak et Coté, 1969). La plus petite protéine (VP4) dont l'assemblage de 60 molécules constituerait les 12 capsomères de l'icosaèdre (Kurstak *et al.*, 1977; Tijssen et Kurstak, 1979; Nakagaki et Kawase, 1982) est de loin le principal constituant des virions. La localisation des polypeptides VP1, VP2 et VP3 dans la capsid n'est pas connue. L'examen au microscope électronique de suspensions virales purifiées a révélé la présence d'un mélange de particules pleines ayant un coefficient de sédimentation de 117 à 119 S et des particules creuses dépourvues d'acide nucléique de 59 à 60 S (Longworth *et al.*, 1968; Meynadier *et al.*, 1977b, 1977c; Kelly *et al.*, 1977; Gorziglia *et al.*, 1980). En outre, des petits éléments de 7 à 9 nm de diamètre désignés sous le nom de particules associées ont été observés chez le *Gm*DNV, le *Jc*DNV, et le *Pf*DNV (Kurstak et Coté, 1968b; Suto *et al.*, 1979). Selon ces auteurs, ces particules associées seraient des sous-unités virales ayant une antigénicité commune avec les virions.

Tout comme pour la taille, une hétérogénéité au niveau de la densité en gradient de chlorure de césium a été observée; celle-ci varie de 1,39 à 1,45 (Truffaut *et al.*, 1967). Le virion est constitué essentiellement de protéine et d'ADN dans les proportions 2/3 et 1/3 de sa masse totale (Longworth *et al.*, 1968; Meynadier, 1977b). Selon Kelly et Elliot, (1977); Bando *et al.*, (1983), de petites quantités de polyamines seraient associées à l'ADN viral chez certains densovirus. Bien que la fonction de ces polyamines ne soit pas élucidée, il est possible qu'elles interviennent dans l'encapsidation du génome en neutralisant certaines charges négatives (Bachrach *et al.*, 1974). En outre, aucune présence de lipide essentiel ni de fraction glucidique n'a été signalée. De plus les virions sont stables à pH 3 et résistent à de nombreux solvants organiques comme l'éther et le chloroforme, et à la chaleur (65°C) (Boemare *et al.*, 1970; Suto *et al.*, 1979).

La capside des virions est constituée de 4 polypeptides structuraux désignés dans l'ordre des tailles décroissantes, par VP1, VP2, VP3, VP4 dont les poids moléculaires varient de 42 à 110 kDa (Kurstak *et al.*, 1977). Dans la plupart des cas la protéine de plus faible poids moléculaire est majoritaire. Pour le *GmDNV* les poids moléculaires et les proportions des polypeptides structuraux VP1,VP2,VP3,VP4, sont respectivement de 98 (1%); 69 (15%); 58 (15%); 49 (69%) (Tijssen *et al.*, 1976); ceux de *CeDNV* sont de 82(8%); 74(27%); 54(6%); 49(59%) (Fédière, 1983). Tijssen *et al.*, (1982) ont montré que les proportions relatives des polypeptides surtout au niveau de VP4 pouvaient varier du simple au double selon les stades larvaires, suggérant ainsi l'hypothèse d'une cinétique de synthèse et de maturation des protéines au cours du développement larvaire. Des études de parenté sérologique, de cartographie de peptides par protéolyse ménagée et de composition en acides aminés ont montré que les 4 polypeptides possèdent des séquences communes et donc qu'ils dérivent au moins partiellement d'une même séquence d'ADN (Tijssen et Kurstak, 1981; Moore et Kelly, 1980; Bando *et al.*, 1984).

**Tableau 4 : Poids moléculaire des protéines de capsid  
de différents densovirus**

Insectes hôtes	Protéines de capsid(kDa)				Références
	VP1	VP2	VP3	VP4	
<i>J. coenia</i>	107	71	61	<u>43</u>	Kelly <i>et al.</i> , (1980b)
<i>J. coenia</i>	101	68	58	<u>49</u>	Fédière, (1983)
<i>G. mellonella</i>	98	69	58	<u>49</u>	Tijssen <i>et al.</i> , (1976)
<i>G. mellonella</i>	92	67	58,5	<u>49</u>	Tijssen <i>et al.</i> , (1982)
<i>G. mellonella</i>	110	71	59	<u>42</u>	Kelly <i>et al.</i> , (1980b)
<i>A. vanillae</i>	110	72	62	<u>43</u>	Kelly <i>et al.</i> , (1980a)
<i>B. mori</i> 1 (Ina)	77	70	57	<u>50</u>	Nakagaki et Kawase (1980b)
<i>C. extranea</i>	82	74	54	<u>49</u>	Fédière, (1983)
<i>L. dispar</i>	74	70	57	50	Grignon, (1982)
<i>A. aegypti</i> *	40	38			Afanasiev <i>et al.</i> , (1991)
<i>A. pseudoscutellaris</i>	100	75	70	<u>52</u>	Gorziglia <i>et al.</i> , (1980)
<i>P. includens</i>	87	64	54	46,5	Chao, (1985)
<i>P. fuliginosa</i>	76	61	<u>52</u>	48	Suto <i>et al.</i> , (1979)

- \* Ne possède que deux protéines de capsid.

\_ Les nombres soulignés représentent les protéines majoritaires.

### IX. Infection , transfection et production de virions

Les infections sont réalisées soit sur larves vivantes soit en cultures de cellules (primocultures et lignées cellulaires). Deux méthodes sont utilisées pour l'infection des larves : l'infection *per os* par contamination des aliments et l'infection par injection de suspensions virales purifiées ou non. La cinétique de multiplication a été étudiée chez le *BmDNV* en utilisant la méthode d'immunodiffusion simple. Les auteurs ont montré que le titre du virus croit rapidement 24 heures post inoculation et atteint son maximum après 96 heures. A un stade avancé de l'infection, une diminution du titre du virus a été notée, et attribuée à l'excrétion abondante de virions dans la lumière intestinale de l'intestin moyen. En effet, dans les derniers stades de l'infection les virions sont recueillis dans les fèces (Kawase *et al.*, 1983).

Les premières tentatives de multiplication de densovirus en cultures cellulaires d'insectes ont été faites par Vago *et al.*, (1966b) qui ont réalisé l'infection des primocultures de gaines ovariennes de *B. mori* par le *GmDNV*. Parallèlement, la réplication du *GmDNV* a été obtenue en culture primaire de cellules ovariennes de *G. mellonella*. Le développement de la virose a été

obtenu dans les ovarioles de la nymphe, les glandes séricigènes et le tissu adipeux de larves de *G. mellonella* maintenus en culture organotypique en milieu gélosé (Quiot *et al.*, 1970). C'est à partir de primocultures de *B. mori* que le premier titrage d'un densovirus a été mis au point par Quiot *et al.*, (1973) en utilisant le *JcDNV*. L'infection de lignées cellulaires s'est heurtée à de grandes difficultés liées sans doute à l'étroite dépendance des densovirus vis-à-vis des certaines fonctions et l'état physiologique des cellules. Récemment, Li *et al.*, (1990) ont mis au point les conditions d'infection et de la lignée SPC-PL 65 de *Spodoptera littura* par le *JcDNV* permettant le titrage par la méthode de la dose infectante 50 (TCID<sub>50</sub>). La réplication du *CeDNV* a été obtenue par infection de la lignée cellulaire SPC-Bm40 de *B. mori* (Fédière *et al.*, 1990).

La transfection des larves sensibles est réalisée par inoculation d'un complexe ADN viral - DEAE dextrane. Cette méthode a permis l'infection de larves de *G. mellonella* et *S. littoralis* à partir des ADN bicaténaires du *GmDNV* et du *JcDNV* respectivement. Par contre, elle a été sans effet sur les larves d'*A. domestica* transfectées par l'ADN bicaténaire de l'*AdDNV* (Jousset *et al.*, 1986). La technique de transfection est également efficace dans l'infection de cultures cellulaires. Fédière (1983) a montré que les lignées cellulaires de *L. dispar* (SCLd 135) et celle de *B. mori* (SPC-Bm 40) étaient sensibles à la transfection par l'ADN viral du *CeDNV*.

Plus récemment, le pouvoir transfectant de l'ADN du *JcDNV* cloné dans pBR322 (Plasmide pBRJ) pour les larves de *S. littoralis* a été démontré (Jourdan *et al.*, 1990). Li *et al.*, (1990) ont mis au point une méthode de transfection de la lignée cellulaire SPC-SL 52 de *S. littoralis* par l'ADN du *JcDNV* ou de pBRJ.

## X. Le génome

### A. Propriétés physico-chimiques

Dans un premier temps il a été établi que le génome du *GmDNV*, extrait en milieu tamponné de force ionique élevée, présente les caractéristiques typiques d'un ADN bicaténaire possédant une masse de  $3,9 \times 10^6$  Daltons (Truffaut *et al.*, 1967). Par la suite la coloration à l'acridine orange sur coupes histologiques de tissus infectés (Barwise et Walker, 1970) ainsi que les modifications du spectre d'absorption en lumière ultra-violette de suspensions de virus purifié traitées au formaldéhyde, ont démontré la nature monocaténaire de l'ADN viral à l'intérieur du virion. D'autre part, il a été mis en évidence que les suspensions de virus sont constituées de deux populations de particules, présentes en proportions stoechiométriques contenant chacune une molécule d'ADN simple brin linéaire de P.M. de  $1,6 \cdot 10^6$  Daltons et de polarité soit négative soit positive (Kurstak *et al.*, 1971). L'extraction de l'ADN d'une suspension de virions en milieu de force ionique élevée met en présence les deux types de molécules monocaténaires et complémentaires qui s'associent pour donner des molécules bicaténaires. Cependant l'extraction du génome en milieu de faible force ionique laisse apparaître

un ADN monocaténaire (Kelly *et al.*, 1977; Barwise et Walker, 1970). Ces résultats obtenus à partir de l'ADN du *GmDNV* ont été depuis lors confirmés par d'autres travaux portant sur l'ADN du *JcDNV*, du *PfDNV* et du *BmDNV* (Kelly *et al.*, 1977; Suto *et al.*, 1979; Nakagaki et Kawase, 1980a).

Par contre, le densovirus d'*A. aegypti*, récemment étudié semble encapsider les brins négatifs et positifs dans les proportions respectives de 85% et 15% (Afanasiev *et al.*, 1991). Le virus d'AaPv récemment découvert au laboratoire partage cette propriété (Jousset *et al.*, 1993). L'analyse de la structure fine du génome en microscopie électronique et en gel d'agarose a montré que dans certaines conditions expérimentales l'ADN du *GmDNV* et du *JcDNV* pouvait exister aussi bien sous forme de monomères linéaires prédominants, que sous forme de monomères circulaires et de concatémères (Kelly et Bud, 1978). Ces auteurs ont conclu que la présence de séquences inversées répétées dont la taille était estimée de 60 à 320 paires de bases était à l'origine de cette circularisation. Plus récemment l'observation au microscope électronique, de l'ADN du *BmDNV2* a révélé la présence de deux groupes d'ADN double brins de tailles différentes, 1,7 et 2,1  $\mu\text{m}$  (Hu *et al.*, 1986).

Le poids moléculaire du génome de différents densovirus a été estimé par différentes méthodes incluant la mesure directe au microscope électronique, le calcul à partir de la constante de sédimentation en ultracentrifugation analytique, l'électrophorèse en gel d'agarose et plus récemment de manière plus précise le séquençage de la molécule d'ADN. Le tableau 5 indique quelques unes de ces tailles.

La température de fusion de l'ADN viral dans sa configuration bicaténaire est de 82,1°C pour le *GmDNV*, 82,9°C pour le *JcDNV* et de 84,5°C pour le *CeDNV*, correspondant respectivement à une teneur en G+C de 35%, 37% et 36% (Kelly *et al.*, 1977; Fédière, 1983)

Kelly *et al.*, 1977 ont montré par cinétique de réassociation que les ADN du *JcDNV* et du *GmDNV* présentent 87% d'homologie indiquant une parenté génétique étroite entre ces deux virus. Les travaux plus récents de Jousset *et al.*, (1990) ont confirmé par transfert de Southern, la forte homologie entre ces deux génomes.

**Tableau 5 : Poids moléculaire du génome de différents densovirus**

Densovirus	P. M du génome monocaténaire (kb)	Références
<i>Gm</i> DNV	6	Barwise et Walker, 1970
<i>Jc</i> DNV	6	Jourdan, 1990; Dumas <i>et al.</i> , 1992
<i>Ad</i> DNV	5,2	Jousset <i>et al.</i> , 1986
<i>Ce</i> DNV	4,9	Fédière <i>et al.</i> , 1991
<i>Pi</i> DNV	6,0	Chao <i>et al.</i> , 1985
<i>Bm</i> DNV1	5,0	Bando <i>et al.</i> , 1987a,
<i>Agraulis</i> DNV	5,5	Kelly <i>et al.</i> , 1980a
<i>Aedes</i> DNV	4,8	Afanasiev <i>et al.</i> , 1991

### B. Cartographie, clonage et séquençage du génome viral

Les cartes de restriction précises du génome du *Bm*DNV1 (Ina) et des génomes du *Gm*DNV et du *Jc*DNV ont été établies (Bando *et al.*, 1987a; Jousset *et al.*, 1990). La mise en évidence de sites symétriques aux deux extrémités du génome suggère la présence de séquences inversées répétées. Cette structure est reconnue comme nous le verrons plus tard, indispensable pour le processus de réplication des virions.

Plusieurs génomes de densovirus ont été clonés et séquencés : celui du *Bm*DNV (Bando *et al.*, 1990), du *Gm*DNV (Tijssen *et al.*, 1990), *Aedes* DNV (Afanasiev *et al.*, 1991) et du *Jc*DNV (Dumas *et al.*, 1987 ; Dumas *et al.*, 1992). Parallèlement, la séquence de génomes de divers parvovirus de vertébrés a été déterminée (Rhode, In Tijssen, 1990)

### C. Organisation du génome viral et transcription

Le séquençage des génomes de ces virus a permis de dégager deux grands types d'organisation génomique chez les densovirus et de les comparer à leurs homologues pathogènes de vertébrés. Le premier est représenté par le groupe du *Bm*DNV1 et d'*Aedes* DNV qui possèdent deux cadres de lecture majeurs non chevauchants portés par le même brin, comme chez les parvovirus de vertébrés, du côté 5', l'ORF de gauche coderait pour les protéines non structurales, tandis que du côté 3', l'ORF de droite coderait pour les protéines structurales (Fig. 4). Chez le densovirus d'*Aedes*, un troisième ORF inclus dans l'ORF de gauche mais dans un cadre de lecture différent coderait également pour des protéines non structurales (Afanasiev *et al.*, 1991).

Il existe de plus chez ces virus un cadre de lecture mineur situé sur le brin complémentaire. Le deuxième type comprend le groupe du *JcDENV* et du *GmDENV* qui possèdent une organisation strictement identique et unique chez les *Parvoviridae*. Un cadre de lecture majeur (ORF1) et trois autres de plus petite taille ORF2, ORF3, ORF4, sont portés par la moitié 5' de chacun des deux brins. L'ORF1 est supposé coder pour les protéines structurales, les 3 autres ORF sont supposés coder pour les protéines non structurales. Le schéma (Fig. 4) montre une organisation comparée du génome des *Parvoviridae* et laisse apparaître une région homologue (PGY) entre la protéine structurale VP1 du *JcDENV* et celle du parvovirus B19 de vertébré.

L'étude "in vivo" du mécanisme de transcription chez le *GmDENV* a montré la présence de 5 transcrits, tous polyadénylés de 1,8; 2,4; 3,5; 4 et 5 kb dont la traduction "in vitro" génère 5 polypeptides de tailles respectives 30, 49, 55, 65 et 94 kDa (Gross *et al.*, 1990a). Le polypeptide de 30 kDa généré vraisemblablement par le transcrit de 1,8 kb (50% de l'ARN messager total du virion) est la protéine la plus abondante et semble faire fonction de protéine non structurale; les 4 autres correspondant aux polypeptides de structure avec une prédominance du polypeptide de 49 kDa. Ces auteurs, dans une étude "in vitro" montrent que 2 transcrits majeurs génèrent les polypeptides structuraux (transcrit de 2,4 kb) et les polypeptides non structuraux (transcrit de 1,8 kb) (Gross *et al.*, 1990b). Ce second résultat se rapproche beaucoup plus des travaux récents de transcription aussi bien "in vivo" que "in vitro", portant sur le *JcDENV* (Li et Bergoin, 1991; 1992). En effet, ces auteurs ont démontré que seuls deux transcrits de 2,6 et 2,2 kb étaient synthétisés aussi bien "in vitro" que "in vivo" et ont aussi montré que le messenger de 2,6 kb génère les 4 polypeptides structuraux tandis que celui de 2,2 kb génère 3 polypeptides non structuraux de 20, 30 et 68 kDa. Ce résultat est en accord avec ceux de Giraud *et al.*, (1992) qui a obtenu l'expression sous forme de protéines chimères, VP2- $\beta$ gal, VP3- $\beta$ gal et VP4- $\beta$ gal, du gène lac Z inséré en fusion dans l'ORF1. De plus, cet auteur a montré que ces polypeptides structuraux possèdent une extrémité C-terminale commune.

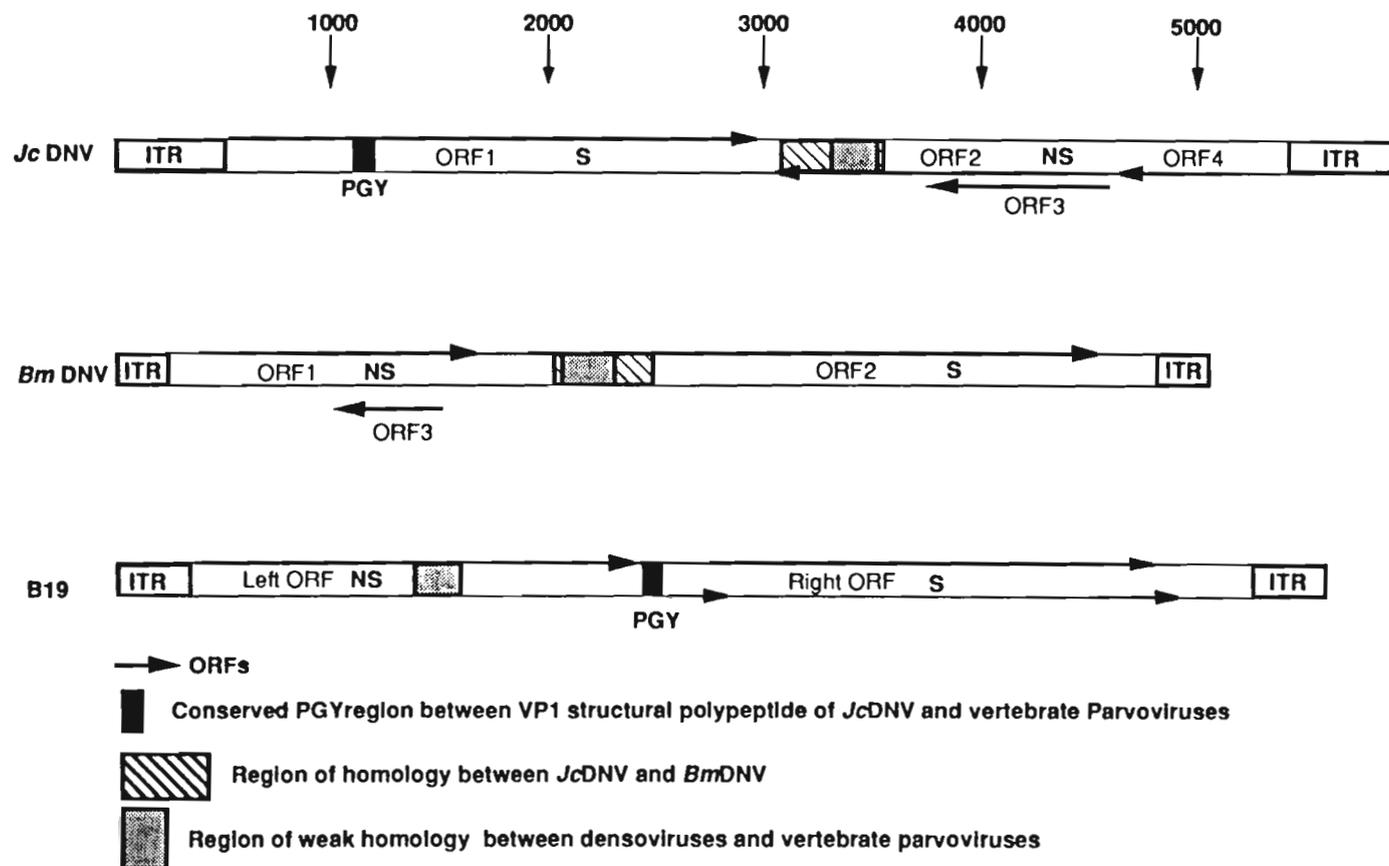


Fig. 4 : Organisation comparée du génome des parvovirus de vertébrés et d'invertébrés (Fig., Dumas *et al.*, 1992)

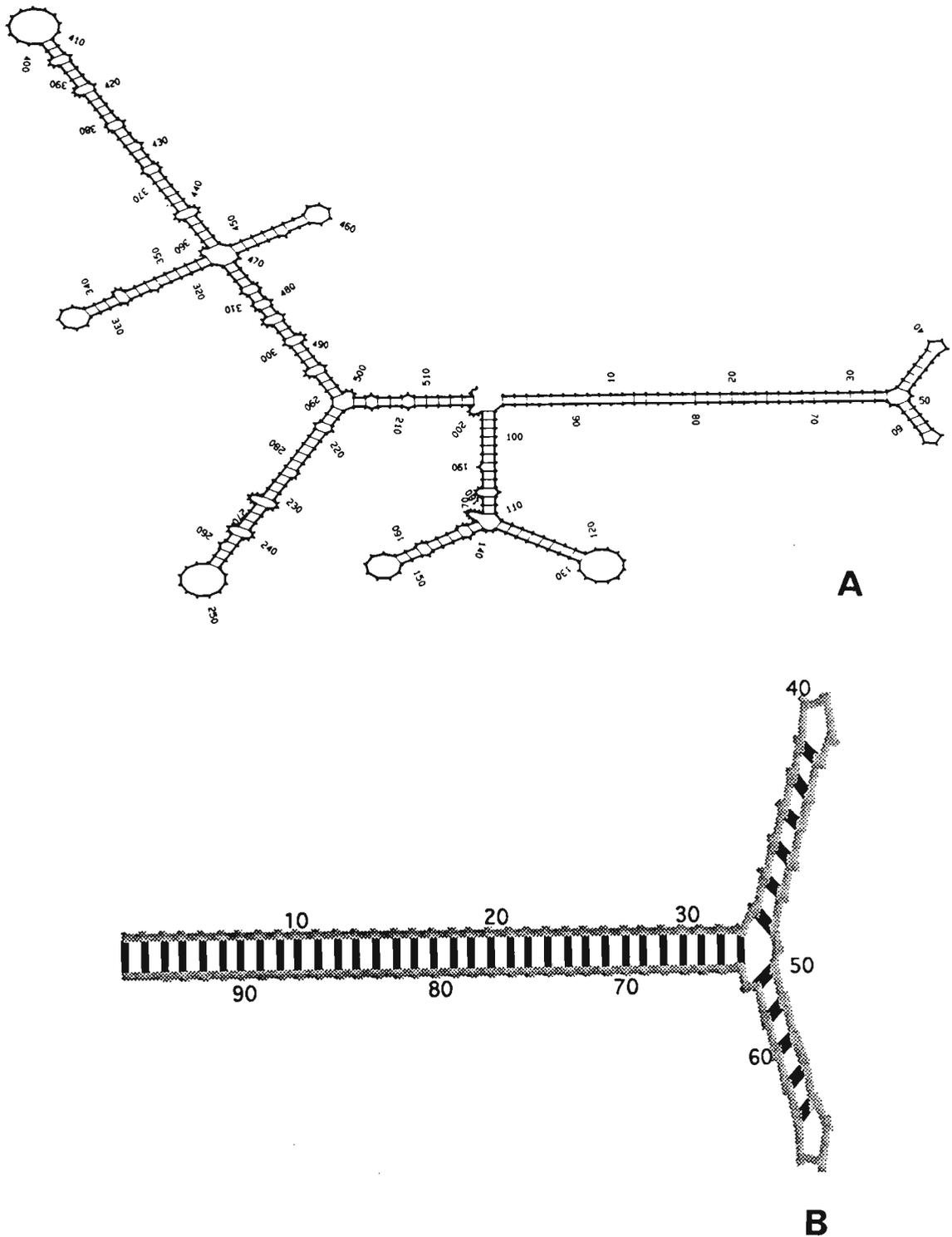
#### D. Structure et fonctions des extrémités

Par convention (Armentrout *et al.*, 1978), le brin viral (encapsidé) est de polarité négative (brin non codant), tandis que le brin complémentaire est de polarité positive (brin codant). Toutefois cette convention ne s'applique pas à l'ADN du *JcDENV* ni à celui du *GmDENV* puisque les deux brins sont codants

La présence de répétitions terminales inversées (ITRs) (Fig.4 et 5) a été postulée par plusieurs auteurs en conclusion : des observations en microscopie électronique, de la digestion des formes circulaires monocaténares à la nucléase S1 et des examens des formes concatémères bicaténares, résistant à cette digestion. C'est ainsi que Kelly et Bud, (1978) et Chao *et al.*, (1985) ont observé la présence de structures en forme de "poêle à frire" résultant de l'appariement des deux extrémités et ont estimé la taille de ces répétitions terminales de 60 à 380 pb chez le *GmDENV* et le *JcDENV*. De même, la présence à chaque extrémité du génome de sites de restriction symétriques a été observée par d'autres auteurs suggérant l'existence de répétitions terminales comme il avait été déjà décrit chez les AAVs. Ainsi Bando et Kawase, (1987a), ont montré chez *BmDENV*, la présence de sites de restriction symétriques par digestion avec l'endonucléase *Bgl*II. De même, Jousset *et al.*, (1990) ont signalé la présence d'ITRs d'au moins 420 et 440 pb dans les génomes du *GmDENV* et du *JcDENV*. Ces génomes possèdent à leurs extrémités des sites de restriction symétriques communs, générés par les endonucléases *Bam*HI et *Hha*I.

Le séquençage de ces ADN a permis de préciser la taille et la conformation de ces ITRs : En effet Tijssen *et al.*, (1990) déterminent une valeur de 440 pb pour les ITRs du génome du *GmDENV*, Bando *et al.*, (1990) une valeur de 225 pb pour celles du génome du *BmDENV*1. Cette valeur qui est la plus faible chez les densovirus se rapproche de celle qui est annoncée chez les AAVs, elle même inférieure à celle de la taille des ITRs de B19, qui est de 383 pb (Deiss *et al.*, 1990). Dumas *et al.*, (1992) obtiennent une valeur de 517 pb pour les ITRs du génome du *JcDENV*. Cette valeur, avec celle observée chez le *GmDENV* est supérieure à celles généralement trouvées chez les AAVs ou le parvovirus B19.

Ces structures peuvent adopter plusieurs conformations secondaires complexes. Dans la plupart des cas, la présence de séquences palindromiques à l'intérieur de ces ITRs génère une structure en "T" ou en "Y" appelée "Hairpin" (structure d'épingle à cheveux) (Fig 5) bien caractérisée chez les AAVs et les parvovirus autonomes. Chez le *BmDENV* il n'existe pas de structure en T mais les extrémités du génome peuvent présenter deux orientations "flip" et "flop".



**Fig. 5 : Structure secondaire des extrémités (ITR) du génomes du *JcDNV* établie à l'aide du programme Fold (Fig., Dumas *et al.*, 1992).**

A : 517 premières bases; B : 96 premières bases qui constituent l'hairpin terminal.

Par contre le séquençage récent du génome de *Aedes* DNV a révélé la présence d'une structure en "T" même si dans ce cas il n'existe pas de séquences inversées répétées (Afanasiev *et al.*, 1991). Chez le génome du *Jc*DNV il existe une structure en "Y" comme chez les AAVs et les parvovirus autonomes, avec possibilité d'orientation "flip" et "flop" (Jourdan, 1990; Dumas *et al.*, 1992).

#### E. Réplication

Les modalités de réplication du génome des densovirus ne sont encore pas connues, mais tout laisse à penser que celle-ci se déroule selon un schéma semblable à celui décrit chez les parvovirus de vertébrés. Les ITRs ont un rôle essentiel dans ce processus, comme l'ont montré Jourdan *et al.*, (1990) sur le modèle du *Jc*DNV. Une délétion bilatérale de 100 à 250 pb dans les ITRs de ce virus conduit à une perte d'infectiosité du génome cloné. Par contre, si la délétion est unilatérale, et n'affecte qu'un morceau de la séquence de l'ITR, un mécanisme de réparation permet la réplication du génome et la reconstitution de l'extrémité manquante. La structure en épingle à cheveux que prend l'extrémité 3' par appariement des bases, joue le rôle d'amorce dans la synthèse du brin complémentaire. Comme chez les parvovirus autonomes, c'est vraisemblablement la DNA polymérase cellulaire qui fonctionne comme une réplicase virale mais la réplication nécessite également l'expression des protéines non structurales transcrites en fonction précoce par l'ARN polymérase II cellulaire.

**CHAPITRE III**

**MATERIEL ET METHODES**

## I. Matériel

### A. Les larves de lépidoptères

**C. *extranea*** : les larves sont récoltées dans la plantation de palmier à huile d'Eloka de Palminindustrie située au sud de la Côte d'Ivoire, dans la sous préfecture de Bingerville à environ 35 Km d'Abidjan. Pour le diagnostic de la virose, les larves ont été prélevées dans la parcelle B3/3 (Bloc B3, parcelle 3) de la plantation.

**D. *saccharalis*** : les larves de *D. saccharalis* proviennent du Laboratoire de Virologie des insectes de l'Institut de Biologie de l'UNICAMP (Université de Campinas), Sao Paulo - Brésil. Deux échantillons de ce matériel biologique dont un lot de larves mortes virosées et un lot de pontes ont été reçus. A partir des oeufs, nous avons effectué un élevage de l'insecte sur milieu artificiel de POITOUT (Poitout et Bues, 1970) pendant 3 générations. Nous avons reçu aussi des larves originaires de Guadeloupe maintenues en élevage au laboratoire du CIRAD-CA de Montpellier.

***Spodoptera littoralis* Boisduval (Noctuidae)** : cette espèce est maintenue en élevage sur place. Les larves sont élevées comme celles de *D. saccharalis* sur du milieu POITOUT légèrement modifié.

### B. Les souches virales

La souche du densovirus de *C. extranea* provient de la collection de virus de l'ex laboratoire d'Entomovirologie de l'institut Français de Recherche Scientifique pour le développement en Coopération (ORSTOM) d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire). Ce virus a été isolé au cours d'une épizootie foudroyante intervenue dans les populations de larves de *C. extranea* défoliateurs du palmier à huile dans la plantation d'Eloka (Fédière 1981).

Le densovirus de *D. saccharalis* provient du même laboratoire que les larves hôtes (voir ci dessus). Ce densovirus isolé en 1977 des larves provenant de Guadeloupe (Meynadier, 1977b) à été récemment la cause d'une mortalité dans les élevages de larves de *D. saccharalis* servant à produire un baculovirus de granulose utilisé en lutte biologique contre ce ravageur au Brésil.

### C. Les lignées cellulaires

Nous avons utilisé les lignées cellulaires de lépidoptères suivantes :

- la lignée cellulaire BCIRL-Px2-HNU3 de *Plutella xylostella* (Chen *et al.*, 1983)
- La ligné de SPC-SL 52 de *Spodoptera littoralis* (Mialhe *et al.*, 1984)
- la lignée SPC-PL 65 d'hémocytes de *S. litura* (Quiot, non publié)
- la lignée IPLB-Sf 9 de tissu ovarien de *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977)
- la lignée SPC-Bm 36 d'ovaires de nymphes de *Bombyx mori* (Quiot, 1982)
- la lignée SPC-Gm 17 de *Galleria mellonella* (Quiot, non publié)

#### D. Les souches bactériennes

Les différents plasmides utilisés dans notre étude ont été amplifiés sur les souches de bactéries d'*E. coli* : la souche JM 83 (Yanich-Peron *et al.*, 1985) et la souche DH5 $\alpha$  (Gibco).

#### E. Les milieux d'élevage et de culture

- Milieu de POITOUT (Poitout et Bues, 1970) légèrement modifié : 1700 ml d'eau désionisée 50 g d'agar, 3 g d'acide benzoïque, 4 g de nipagine, 280 g de semoule de maïs, 75 g de levure de bière, 70 g de germe de blé, 10 g d'acide ascorbique et 2,8 ml de formol.

- Cultures de bactéries : les milieux utilisés pour la culture de bactéries JM 83 et DH5 $\alpha$  sont le milieu LB liquide et le milieu solide (LB + agar) (annexe). Pour la culture des bactéries transformées, ces deux milieux sont additionnés de 50 mg/l d'ampicilline.

- Cultures cellulaires : les milieux de culture cellulaire sont : Le milieu **BM 25 SS** (Quiot, non publié); le milieu de **Grace** (Grace, 1962); le milieu **TG3** (milieu TC-100 de Gibco modifié). La composition de ces milieux est donnée en annexe. Le milieu **TG1** est une variante du milieu TG3 dont il diffère par l'absence d'hydrolysate de lactalbumine et de sérum. Ce milieu a été utilisé pour les transfections.

#### F. Les plasmides

- Le plasmide **pEMBL 19+** dérivé du pUC 19, est un vecteur de clonage qui possède le gène de résistance à l'ampicilline ( $\beta$  lactamase) et un lieu multisite (succession de sites de restriction uniques) situé dans la portion du gène lacZ d'*E. coli*, gène codant pour la  $\beta$  galactosidase. Sa taille est de 3960 pb (Viera et Messing, 1982; Dente *et al.*, 1983)

- Le plasmide **pBRJH** (Rolling, 1992), d'une taille de 8811 pb, dérive du plasmide pBRJ (Jourdan *et al.*, 1990). Ce plasmide contient la séquence complète du génome du densovirus de *J. coenia* avec les deux hairpins intacts.

#### G. Les enzymes

Les enzymes de restriction que nous avons utilisées provenaient des fournisseurs (Boehringer ou Biolabs). Les réactions enzymatiques avec les endonucléases de restriction, le fragment de Klenow (fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli*), la phosphatase alcaline de veau, la T4 DNA ligase sont réalisées selon les protocoles préconisés par les fournisseurs Boehringer et Biolabs ou par les protocoles décrits dans ("Current Protocols in Molecular Biology", 1987 ; Maniatis, 1989).

## II. Techniques et méthodes

### A. Méthodes de récolte et d'échantillonnage des larves

La méthode d'échantillonnage choisie en accord avec des spécialistes du Laboratoire de Biomodélisation du CIRAD-GERDAT est un dispositif en étoile qui sera présenté au chapitre V. Les larves sont récoltées après élagage d'une palme de rang  $17 \pm 1$  à la faucille, les chenilles d'une même palme étant regroupées dans le même tube de récolte et conservées au congélateur pour éviter une détérioration du virus. Deux prélèvements espacés de 14 jours ont été faits sur les mêmes palmiers suivant le même plan de récolte et en tenant compte des larves issues de la même éclosion au cours de ces deux échantillonnages.

### B. Méthode d'élevage des larves

Les chenilles de *C. extranea* sont maintenues groupées par lots de 50 sur des folioles leur servant de nourriture, dans des cages (50 x 30 x 30 cm) placées en lumière naturelle à température ambiante (25 à 28°C). Ces cages dont les faces sont faites de mousseline à mailles très fines possèdent une armature en bois.

La technique d'élevage des larves de *D. saccharalis*, dérive directement de celle mise au point par Bordat (1983). Les ooplaques découpées dans le papier cannelé servant de substrat de ponte sont désinfectées par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 5% suivi de 2 rinçages dans de l'eau désionisée, puis séchage entre du papier filtre avant d'être mises en incubation dans une boîte ronde appropriée. Cette boîte est munie d'un morceau de papier filtre imbibé d'eau pour maintenir l'atmosphère saturée en humidité. Deux jours après l'éclosion les larves sont transférées à l'aide d'un pinceau sur des morceaux de milieu nutritif dans des boîtes en plastique ou bocaux en verre. Cet élevage est réalisé à 24 - 26 °C et 75% d'humidité relative et dans des conditions proches de l'aseptie. Une variante a consisté à placer les oeufs au stade point noir (proche de l'éclosion) directement sur le milieu nutritif en les piquant verticalement dans le milieu. les nymphes sont retirées du lot des larves et placées dans des récipients bien aérés contenant du coton imbibé d'eau et du papier cannelé. les adultes qui émergent sont récupérés tous les jours. Plusieurs couples (10 à 20) ayant émergé le même jour sont placés dans des pondeurs qui sont des boîtes cylindriques tapissées de papier filtre, contenant un papier cannelé, et munies d'un abreuvoir constitué de coton imbibé d'eau sucrée.

### C. Techniques de pathologie expérimentale

#### 1°) Infection et transfection des larves

On a pratiqué deux types d'infection : d'une part, l'infection *per os* d'autre part l'infection ou la transfection par inoculation. Dans le premier cas, les chenilles de *C. extranea* sont déposées sur des folioles préalablement badigeonnées avec un broyat clarifié de larves infectées.

La tête de l'animal peut être trempée dans cette suspension. Pour *D. saccharalis*, le milieu nutritif est contaminé par des gouttes du broyat de larves virosées. L'injection se fait en piqûre sous-cutanée dans les fausses pattes pour éviter de léser le tube digestif. Une seringue à tuberculine, munie d'une aiguille fine, montée sur un microinoculateur à vis micrométrique permet de délivrer avec précision des petits volumes de 10 à 13  $\mu$ l. Les infections sont réalisées avec une suspension virale. Pour les transfections, l'inoculum est constitué par une solution d'ADN viral ou plasmidique précipité au DEAE-dextrane (2 mg/ml final en tampon TE) (voir annexe). Cette méthode a été utilisée pour la transfection des larves de *D. saccharalis* et *S. littoralis*.

## 2°) Infection et transfection des cultures cellulaires

### a) Repiquage et entretien des cultures cellulaires

La culture cellulaire est entretenue par des repiquages hebdomadaires en boîtes de 25 cm<sup>2</sup> contenant 5 ml de milieu de culture. Avant le repiquage, les cultures sont homogénéisées en aspirant et rejetant vivement plusieurs fois le milieu de culture sur le tapis cellulaire, pour qu'un nombre suffisant de cellules se décolle du support. Une fraction du mélange soit 0,5 ml ou 1 ml est alors introduite dans une nouvelle boîte, avec un complément de milieu frais (5 ml de volume final). Les cellules sont conservées à l'étuve à 28°C. Pour évaluer le nombre de cellules par boîte les cellules sont détachées à la pipette et comptées à l'aide d'un hématimètre de THOMA. Pour les transfections ou les infections, les cellules sont aliquotées à raison de 10<sup>6</sup> cellules environ par cupule de boîte Falcon à 6 cupules ou 2.10<sup>6</sup> cellules par boîte de 25 cm<sup>2</sup> et utilisées 24 à 36 heures plus tard.

### b) Infection et transfection

Pour les infections, en boîte de 25 cm<sup>2</sup>, 1 ml de l'inoculum (suspension virale) est additionné et les cultures sont mises à incuber à l'étuve à 28°C pendant 5 à 7 jours. Les cellules sont récupérées et le virus est soit purifié soit dosé directement par différentes techniques d'immunologie.

Nous avons utilisé deux méthodes de transfection : la transfection selon Summers et Smith (1987) (Méthode II). L'ADN est précipité par 25  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> à 2,5 M dans 475  $\mu$ l d'une solution d'HEBS (annexe) pendant 30 min. Le milieu de culture est remplacé par 2,5 ml de milieu de Grace ou TG1 frais. Le précipité d'ADN-phosphate de calcium est ajouté au milieu et les cellules maintenues à 28°C. Après 4 heures d'incubation le précipité est éliminé et remplacé par 3 ml de milieu de culture Grace ou TG3. La deuxième méthode utilisée est la transfection par lipofection selon Li *et al.*, (1990). Elle dérive de la méthode de Felgner *et al.*, (1987). L'inoculum est préparé pour les deux types de boîtes (plaque 6 cupules et boîte de 25 cm<sup>2</sup>) de la façon suivante : 10  $\mu$ g (40  $\mu$ g) d'ADN et 25  $\mu$ l (40  $\mu$ l) de liposomes (DOTMA ou DOTAP

(Boehringer) à la concentration de 1 mg/ml, ) sont séparément dilués dans 1 ml (1,5 ml) de milieu de Grace sans sérum ou TG1 puis mélangés. Les 2 ml (3 ml) du complexe ADN-liposome sont ensuite déposés sur les cellules préalablement rincées par du milieu de Grace sans sérum ou TG1 et laissés en contact avec les cellules pendant 6 à 10 heures à 28°C. Les liposomes et le milieu de transfection sont éliminés et remplacés par du milieu de culture contenant du sérum de veau foetal. Pour améliorer les conditions de transfection, on peut faire varier la concentration de liposomes et de l'ADN, le temps de contact entre le complexe liposomes-ADN et les cellules.

#### D. Purification des virions et dosage

##### 1°) Purification des virions.

Les larves virosées sont broyées au broyeur de Potter dans du tampon PBS ou tampon Tris-SDS (voir annexe). Après 10 mn de clarification à 10.000 g, les virions sont soit mis au culot par une centrifugation à 200.000 g à 8°C ou bien le broyat clarifié est directement déposé sur un gradient de densité de Rénografine (20% - 76%) et centrifugé à 100.000 g à 8°C pendant 12 à 15 heures. La bande de particules virales, visible sous la forme d'une bande bleue et localisée dans le tiers inférieur du gradient est récupérée puis dialysée contre du tampon TE, pendant 48 heures avec changements réguliers (toutes les 12 heures) du tampon de dialyse. La pureté de la suspension virale est contrôlée en microscopie électronique et en spectrophotométrie d'absorption en UV.

Les larves prélevées en plantation et destinées à un diagnostic de la virose dans les conditions naturelles (plantation), sont broyées individuellement dans des microtubes avec 250 µl de tampon PBS. Après clarification, une goutte de 2 µl de chaque broyat est déposée sur une membrane de nylon.

L'extraction des virions à partir de cultures cellulaires se fait 5 à 7 jours après transfection. Pour cela, les cellules sont décollées et centrifugées à 200 g pendant 5 min. Le culot de cellules est récupéré dans 0,5 ml de PBS / boîte de culture. Après plusieurs congélations et décongélations, la suspension de cellules est soumise aux ultrasons pendant quelques secondes puis clarifiée à 10.000 g pendant 10 min. Les virions contenus dans le surnageant sont mis au culot à 200.000 g pendant 1 h . Le culot est récupéré dans du tampon TE. L'extraction de l'ADN peut être poursuivie à partir de ce culot comme nous le verrons plus loin.

##### 2°) Dosage et contrôle du virus

Les virions sont dosés par spectrophotométrie. Le spectre d'absorption dans le proche ultra-violet (220-340 nm) d'une suspension de virus purifiés est analysé à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau. On utilise des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

Ce spectre, présente un maximum d'absorption à 260 nm et un minimum à 240 nm caractéristiques des nucléoprotéines. Le rapport DO 260/DO 280 (maximums d'absorption respectifs des acides nucléiques et des protéines) est calculé. La concentration en virus est estimée par la mesure de la densité optique à 260 nm. Pour les densovirus, une unité de DO à 260 nm correspond à une concentration de 100 µg/ml de virions. La pureté et la concentration de la suspension virale peuvent être aussi contrôlées au microscope électronique. Des grilles recouvertes d'un film de collodion carboné sont déposées sur des gouttes de suspension virale. Après adsorption des particules virales sur le film, les grilles sont contrastées négativement à l'acide phosphotungstique à 1% pH 7,4 selon Brenner et Horne (1959) ou à l'acétate d'uranyle à 2%. Les préparations sont observées au microscope électronique à transmission.

## E. Extraction et analyse de l'ADN

### 1°) Extraction de l'ADN viral

La suspension de virus purifiée est ajustée à 40 mM EDTA, 200 mM KCl, puis traitée par le lauryl sarcosinate de sodium à 2%, et la protéinase K à 200 µg/ml final, pendant 2 à 3 heures à 50°C. La déprotéinisation de la solution d'ADN est parachevée par 2 extractions par un volume de phénol saturé de tampon TE, puis de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 : 24 : 1) et enfin de chloroforme-alcool isoamylique (24 : 1). La phase aqueuse est récupérée puis dialysée contre du tampon TE. L'ADN est ensuite précipité par addition de 2 volumes d'éthanol 100% en présence de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pendant 12 à 16 heures à -20°C ou 15 minutes à -70°C. Après une centrifugation de 15 mn à 24 000 g à 4°C, le culot d'ADN est rincé à l'éthanol 70%, séché, puis repris dans le tampon TE. La pureté de la suspension d'ADN viral est contrôlée et sa concentration déterminée par spectrophotométrie UV. La quantité d'ADN est déterminée en fonction de la densité optique de la solution à 260 nm (une unité de DO à 260 nm correspond à 50 µg / ml d'ADN bicaténaire). Ces molécules d'ADN peuvent être observées après étalement suivant la technique de Davis *et al.*, (1971). Cette technique utilise une hypophase contenant 17 % de formamide. Après coloration à l'acétate d'uranyle alcoolique, les grilles sont ombrées par évaporation sous vide d'or - palladium. Les tailles des molécules d'ADN du *DsDNV* et de celles de l'ADN du bactériophage  $\phi$  x 174 utilisé comme marqueur interne sont mesurées sur photographies à l'aide d'un intégrateur de courbes couplé à un calculateur.

### 2°) Maxipréparations des plasmides par lyse alcaline

Un inoculum de bactéries (ou une colonie bactérienne) est mis en préculture ("Starter") agitée à 37°C pendant quelques heures dans 2 ml de milieu LB contenant 50 µg d'ampicilline. 200 ml de LB contenant le même antibiotique sontensemencés par ces 2 ml de préculture puis incubés pendant 12 à 15 heures dans les mêmes conditions que précédemment.

Les plasmides sont extraits de la suspension bactérienne par la méthode de Birnboim et Doly (1979), puis purifiés par centrifugation en gradient de densité de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium, selon le protocole décrit par Maniatis *et al.*, (1989)

### 3°) Minipréparations des plasmides

Les colonies bactériennes issues de la transformation et vérifiant les critères de sélection sont mises en culture agitée à 37°C dans 2 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline. L'ADN plasmidique est extrait selon la méthode de Maniatis *et al.*, (1989)

### 4°) Digestion de l'ADN et analyse par électrophorèse

La digestion de l'ADN par les enzymes de restriction se fait dans les conditions décrites par le fournisseur. Généralement, la digestion d'environ 1 à 2 µg d'ADN se fait dans un volume final de 20 µl contenant de l'ADN, 2 µl de tampon de digestion 10 x, un volume adéquat de la solution d'enzyme correspondant à environ 5 U /µg d'ADN et complété par l'eau distillée. La digestion de l'ADN est réalisée dans un microtube stérile par incubation au bain marie à 37°C pendant 1 heure. Une digestion multiple peut être menée simultanément avec deux ou plusieurs enzymes si celles-ci sont actives dans le même tampon. Dans le cas contraire, l'enzyme qui nécessite le tampon de force ionique la plus faible doit être utilisée en premier lieu. La force ionique du milieu réactionnel est ensuite ajustée, la seconde enzyme ajoutée et l'incubation poursuivie.

L'analyse de l'ADN viral et de plasmides natifs ou leurs produits de digestion se fait par séparation électrophorétique en gel d'agarose horizontal ou en minigel d'acrylamide vertical pour la séparation des fragments de petites tailles. Les gels d'agarose de 0,8 à 2% sont préparés et soumis à l'électrophorèse dans le tampon TEP (voir annexe). Les gels sont ensuite colorés dans une solution de BET (0,5 µg/ml). Les profils de restriction sont visualisés en lumière ultraviolette à 312 nm. La taille des fragments générés est estimée grâce à la comigration dans le gel de marqueurs de poids moléculaires connus permettant d'établir une courbe étalon reliant le logarithme du poids moléculaire des fragments à leur mobilité relative (Rf).

Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont fournis par Boehringer : **Marqueur III** (ADN du phage λ digéré par *Hind* III + *Eco* RI, 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 pb); **Marqueur VI** (ADN du plasmide pBR328 digéré par *Bgl* I + *Hinf* I, 154, 220, 234, 298, 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766, 2176 pb), **Marqueur VII** (ADN du bactériophage SSP1 digéré par *Eco* RI, 370, 490, 680, 1000, 1150, 1400, 1500, 1850, 1900, 2700, 3500, 4800, 6000, 7100 pb).

Les bandes d'ADN correspondant aux fragments de restriction destinés à un usage ultérieur sont découpées dans le gel d'agarose exposé à la lumière ultraviolette. L'ADN est ensuite purifié par la méthode de "Gene clean" (Vogelstein et Gillespie, 1979).

## F. Clonage moléculaire

### 1°) Remplissage des extrémités ("filling")

Le remplissage des extrémités 3' incomplètes et la coupure des extrémités 5' sortantes ont été réalisés par l'enzyme de Klenow (grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli*) qui possède simultanément une activité 5' - 3' polymérase et 3' - 5' exonucléase. Cette réaction s'effectue pendant 15 à 30 mn à 22 °C dans un volume total de 50 µl contenant 2 - 5 µg de l'ADN, 5 µl de tampon de réaction de Klenow (voir annexe), 2 µl du mélange des désoxynucléotides triphosphate à 2 mM chacun et 1 à 1,5 unité d'enzyme par µg d'ADN. Après incubation, l'ADN polymérase est inactivée par chauffage à 65°C puis extraction au phénol-chloroforme.

### 2°) Déphosphorylation du plasmide et ligation

La déphosphorylation empêche la recircularisation du plasmide linéarisé lors de la ligation. Elle est réalisée en présence de phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP). La ligation est faite avec l'ADN ligase T4, en utilisant un rapport insert / vecteur variant de 2 à 10, à température de 16°C pendant 15 heures. Des ligations témoins pratiquées à l'aide d'ADN linéarisé déphosphorylé et d'ADN linéarisé non déphosphorylé sont effectuées en même temps et permettent de tester l'efficacité de la déphosphorylation. Les protocoles de déphosphorylation et de ligation sont décrits par Maniatis *et al.*, (1989).

### 3°) Préparation des bactéries compétentes et transformation

La méthode de préparation et de transformation des bactéries compétentes est la même que celle proposée par (Current Protocols in Molecular Biology" 1987; Maniatis, 1989). Selon cette méthode, 200 ml de milieu LB sontensemencés avec 2 ml d'une préculture en phase stationnaire, puis agités à 37°C. La suspension bactérienne est centrifugée à 4000 g pendant 5 mn et le culot repris dans 5 ml d'une solution de Pipes froide (annexe) et après 30 mn d'incubation dans la glace, recentrifugé comme précédemment. Le dernier culot est repris dans 1 ml de la solution de Pipes froide, incubé à 4°C pendant quelques heures avant d'être conservé sous forme d'aliqotes de 200 µl à -70°C pendant plusieurs mois.

Pour transformer les bactéries, on ajoute à 100 µl de bactéries compétentes, 10 à 100 ng d'ADN. Après 15 mn d'incubation dans la glace, et un choc thermique de 5 mn à 37°C, le volume de la préparation est ajusté à 0,5 ml et mis à incuber pendant 1 heure à 37°C.

Les bactéries sont ensuite étalées sur des boîtes de milieu gélosé LB contenant l'antibiotique approprié et un indicateur du gène de sélection lac Z porté par le plasmide pEMBL19+. Cet indicateur est composé 40 mg/ml XGal et 1 mM IPTG. Les clones de bactéries transformées et sélectionnées apparaissent sur les boîtes après une nuit d'incubation à 37°C. Les bactéries transformées par les plasmides recombinants forment des colonies blanches à l'inverse de celles qui contiennent des plasmides non recombinants qui sont bleues.

## G. Transfert et hybridation

### 1°) Transfert des fragments de restriction sur membrane de nylon

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Le gel après plusieurs traitements préconisés par le fournisseur (Boehringer) est ensuite transféré par capillarité sur une membrane de Nylon chargé positivement selon la méthode de Southern (1975). Après transfert la membrane est séchée à l'air, et l'ADN est fixé de façon covalente à la membrane par exposition de celle-ci à la lumière ultra-violette (312 nm) pendant 5 mn. La membrane ainsi prête à l'emploi peut être conservée à 4°C ou être directement hybridée avec une sonde.

### 2°) Dépôt d'ADN viral sur membrane de nylon par "dot blots"

Les suspensions virales sont directement déposées sur la membrane de nylon sous forme de taches et séchées à température ambiante. Selon un protocole identique à celui utilisé dans la méthode de Southern, la membrane subit une dénaturation qui détruit la capsid virale et libère l'ADN, celui-ci est fixé à la membrane de façon covalente par une exposition aux UV.

### 3°) Préparation de la sonde marquée à la digoxigénine d-UTP

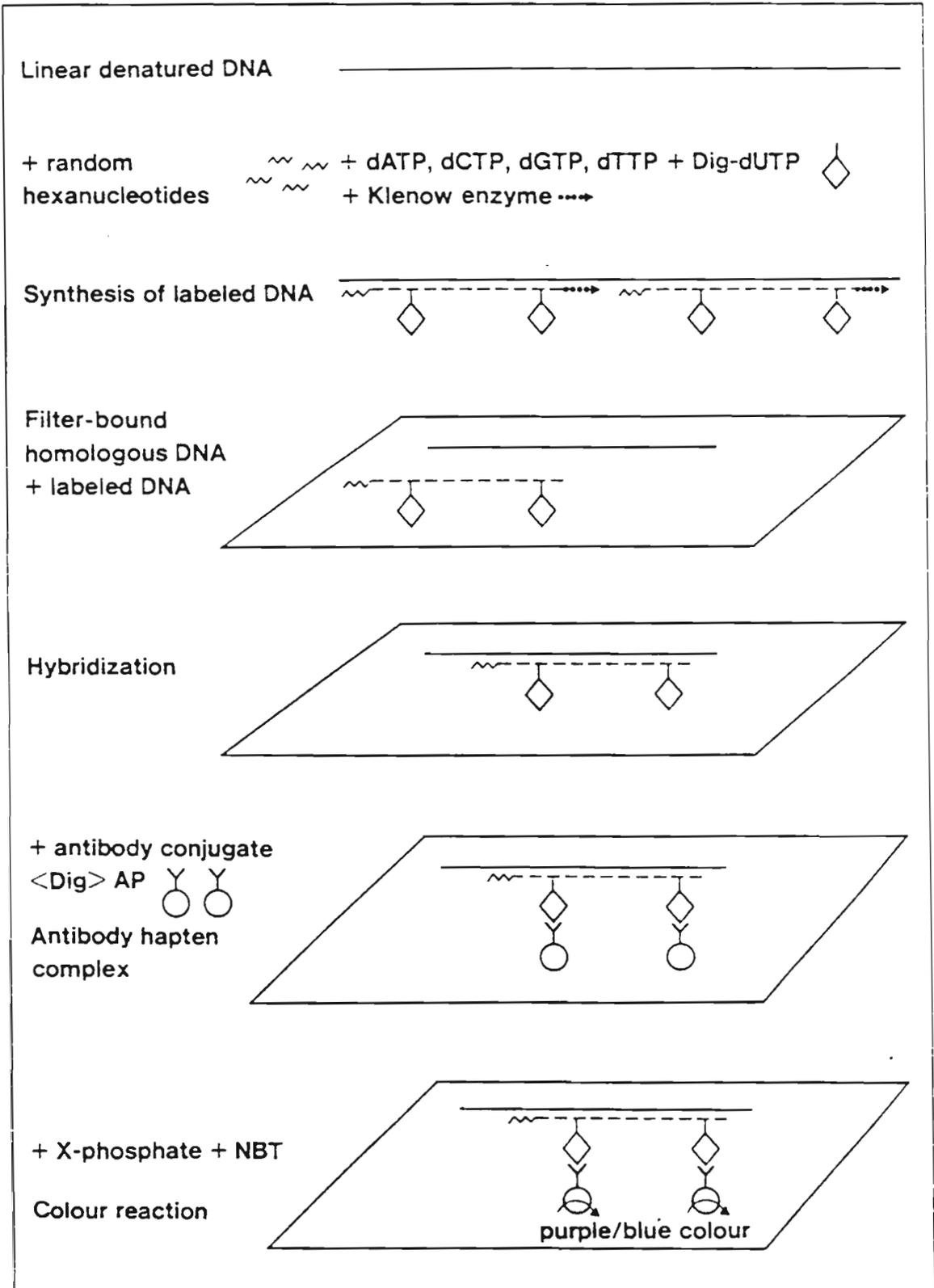
Le principe de l'élaboration de la sonde et de l'hybridation (Fig. 6) est le suivant : l'ADN utilisé comme sonde est marqué par incorporation de déoxyuridine triphosphate couplée à la digoxigénine selon la technique de "random priming" (Feinberg et Vogelstein, 1983).

Pour la préparation de la sonde, 1 µg d'ADN est dénaturé par chauffage à 95° C pendant 10 mn puis refroidi dans la glace. Ensuite sont ajoutés 2 µl (250 ng) d'un mélange d'hexanucléotides servant d'amorce à la synthèse du brin complémentaire, 2 µl d'un mélange de désoxynucléotides triphosphate (dATP 1mM, dCTP 1mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM, digoxigénine 11 dUTP 0,35 mM), 1 µl de fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli* (2u/µl) dans un volume total de 20 µl (eau distillée). Le mélange est incubé à 37° C pendant une heure puis la réaction arrêtée par addition de 2 µl d'EDTA 0,2 M. La sonde ainsi obtenue est dénaturée par chauffage à 65° C pendant 10 mn et conservée à - 20° C.

#### 4°) Hybridation et révélation

Les hybridations ADN-ADN sont réalisées selon le protocole du Kit Boehringer (DNA labeling and détection kit non radioactive) sur les deux types de membranes préalablement décrites (transfert selon Southern et dot blot) et permettent de révéler de très petites quantités de l'ordre de quelques picogrammes d'ADN. Pour cela, les membranes subissent une préhybridation à 68°C pendant une heure dans la solution d'hybridation (voir annexe). Cette dernière est ensuite remplacée par la solution d'hybridation contenant la sonde fraîchement dénaturée. Après 6 heures d'incubation, la membrane est traitée par différentes solutions et tampons, et incubée dans une solution d'anticorps conjugué antidigoxigénine à 150 mU/ml. Elle est ensuite révélée après addition du complexe NBT (0,3 mg/ml) - Xphosphate (0,15 mg/ml). La révélation apparaît sous forme de spots noirs dans les 15 min qui suivent, ou plus tard suivant la quantité de l'ADN à détecter et de l'efficacité de la sonde.

Plusieurs sondes peuvent être utilisées successivement pour la même membrane. Celle-ci doit être déshybridée avant l'incubation avec la deuxième sonde. La méthode consiste d'abord à décolorer la membrane dans plusieurs bains de DMF (Diméthylformamide) chauffé à 50-60°C puis la sonde est éliminée par incubation de la membrane pendant 30 mn à 37°C dans NaOH 0,2 M contenant 0,1% de SDS.



**Fig-6** : Principe de marquage à la digoxigénine et de détection (Boehringer Mannheim)

## H. Techniques sérologiques

### 1°) Préparation des antisérums

Des antisérums spécifiques sont préparés à partir de lapins ou de souris ascitiques. Dans ce dernier cas la souris reçoit lors de l'immunisation initiale par injection intrapéritonéale 600  $\mu$ l d'un mélange volume à volume d'une suspension virale contenant 150  $\mu$ g de virus par ml et d'adjuvant complet de Freund, puis 12 jours après, le même mélange virus / adjuvant incomplet de Freund. Une troisième inoculation est faite 12 jours plus tard avec 600  $\mu$ l d'un mélange virus - liquide ascitique 10 : 1. Une variante consiste à injecter le liquide ascitique après la troisième injection virale. Après 12 jours, et chaque trois jours suivants la souris subit une ponction intrapéritonéale. Le sérum recueilli est centrifugé à 5000 g pendant 15 mn. Le caillot est éliminé après plusieurs congélations et décongélations et le sérum conservé à -20°C.

### 2°) Détection d'antigènes par Immunodiffusion en gel d'agarose

La méthode de double-diffusion (Ouchterlony, 1948) se prête à l'étude de systèmes antigéniques complexes (parentés immunologiques existant entre antigènes et anticorps de diverses origines). Une solution d'agarose à 1% contenant NaCl : 0,9 % et NaN<sub>3</sub> 0,01 % est coulée à 50°C sur des lames histologiques de 76 mm x 26 mm, à raison de 3 ml par lame. Après solidification du gel, des puits de 3 mm de diamètres sont pratiqués à l'emporte pièce dans le gel aux sommets et au centre d'un hexagone. Chaque puits périphérique reçoit 25  $\mu$ l de solution d'un antigène et le puits central 25  $\mu$ l d'un anticorps. La lame est incubée à température ambiante pendant 24 heures ou plus. Les antigènes et anticorps diffusent dans le gel. Aux point de rencontre de l'anticorps et de l'antigène sérologiquement apparenté se produit la précipitation du complexe antigène - anticorps sous forme d'un arc opalescent.

### 3°) Détection d'antigènes par la technique ELISA

Le test " Enzyme linked Immuno Sorbent Assay" est effectué en microplaques de titrage spécialement conditionnées selon le protocole suivant : les puits sont sensibilisés avec 90  $\mu$ l de broyat de larves. Après une nuit d'incubation au froid, les puits sont lavés trois fois avec 200  $\mu$ l de tampon PBS-Tween 20 (0,1% Tween). L'antisérum préparé sur souris ou lapin titré et dilué dans du tampon PBS-Tween contenant 0,5 % de sérum albumine de bœuf (BSA) est déposé à raison de 90  $\mu$ l par puits. Après 2 h d'incubation à température ambiante, 3 lavages de 3 mn sont effectués avec du tampon PBS-Tween et les puits remplis avec 90  $\mu$ l d'anticorps conjugué anti IgG de souris ou lapin marqué à la peroxydase et dilué en fonction du titre (de 100 à 1000 fois) dans du tampon PBS-Tween contenant 5% de BSA. Après 2 h d'incubation à la température ambiante les puits sont lavés comme précédemment. La révélation de l'activité peroxydasique se fait par addition de 200  $\mu$ l de substrat constitué de 1,1 mg/ml d'ABTS (2,2'-Azino-D-3-éthylbenzothiazoline) solubilisé dans du tampon citrate 0,1 M pH 4,7 auquel est

ajouté extemporanément de l'eau oxygénée à une concentration finale de 0,03 %. Une coloration verte spécifique de la présence de peroxydase apparaît dans les 15 mn qui suivent et l'absorbance est lue à 405 nm dans un lecteur de plaques ELISA

#### 4°) Détection *in situ* d'antigènes par la technique d'immunofluorescence

La technique d'immunofluorescence utilisée dérive de la méthode de Stitz *et al.*, (1988). Cinq à sept jours après infection ou transfection, les cellules sont fixées par une solution de formaldéhyde à 3% pendant 30 mn puis perméabilisées par du Triton 3% en tampon phosphate (IF - Pasteur) pendant 30 mn à la température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées avec du tampon PBS, puis mises en contact pendant 1 heure avec un anticorps anti-virions préparé sur souris ou lapin, dilué dans le tampon IF. Les cellules sont à nouveau rincées puis incubées pendant 1 heure dans du tampon IF contenant l'anticorps conjugué anti IgG de souris ou de lapin marqué à la fluorescéine et du bleu d'Evans au 1/10.000. Après ce délai les cellules sont rincées et observées en microscopie optique.

#### I. Traitement informatique des données

La méthode que nous avons choisie pour le traitement des données de l'échantillonnage est une méthode fondée sur la théorie des variables régionalisées (Matheron, 1965; Narboni, 1979), qui tiennent compte à la fois de la localisation, la continuité, et du caractère transitif de ces variables. L'outil d'analyse de ces variables est le demi-variogramme orienté (pour une direction donnée) ou non orienté qui se définit pour toutes les distances  $h$  (distances séparant deux échantillons contigus) comme étant la demi-moyenne des carrés des écarts des valeurs prises par la variable en tout point distant de  $h$  l'un de l'autre :  $G(h) = (1/2Nh) \sum F(x_i + h) - F(x_i)^2$ ;  $Nh$  étant le nombre de couple  $(x_i, x_i + h)$ ;  $x_i$  est la position d'un échantillon,  $x_i + h$  sera la position du second échantillon situé à distance  $h$  du premier et  $F(x_i)$  la mesure de la valeur à la position  $x_i$ . Cette méthode récente est largement utilisée par les pédologues, les forestiers, les virologues, les entomologistes et phytopathologistes. Elle conduit à une meilleure description de l'analyse structurale d'une variable spatiale que par les seules moyennes et variances et permet le calcul des corrélations locales et différées sur plusieurs variables (Lecoustre et Reffye, 1986).

## **RESULTATS**

## CHAPITRE IV

**ETUDE DES GENOMES DU DENSOVIRUS DE  
*C. EXTRANEA* (*Ce*DNV) ET DE *D. SACCHARALIS* (*Ds*DNV)**

## I. Carte de restriction et clonage du génome du *CeDNV*

### A. Cartographie du génome du densovirus de *C. extranea*

Nous avons établi la carte physique de restriction du génome du densovirus de *C. extranea* par digestion avec plusieurs endonucléases de restriction. Ce travail ayant fait l'objet d'une publication ci-après reproduite, nous n'en donnerons que les résultats essentiels. La taille de la forme bicaténaire de l'ADN viral a été estimée à 4900 +/-100 pb soit  $3,2 \times 10^6$  Daltons, valeur qui a été confirmée par le calcul de la somme des tailles des différents fragments de restriction générés par les enzymes utilisées pour l'établissement de la carte physique. L'ADN viral monocaténaire, forme sous laquelle cette molécule est encapsidée dans les virions, a donc un poids moléculaire de 1,6 MDa.

A partir de 7 enzymes de restriction, 20 sites ont été cartographiés (Fig.2 de la publication). Aucun site de restriction n'a été reconnu par les endonucléases suivantes : *Bam* HI, *Bgl* II, *Bst* EII, *Cla* I, *Hae* II, *Hha* I (*Cfo* I), *Hpa* I, *Kpn* I, *Nhe* I, *Not* I, *Pst* I, *Pvu* I, *Pvu* II, *Sal* I, *Sma* I, *Stu* I. Par contre les endonucléases *Eco* RV, *Xba* I et *Xho* I reconnaissent un site unique de restriction sur le génome du *CeDNV*, les autres enzymes reconnaissent plus d'un site de restriction générant ainsi plus de deux fragments. C'est le cas des enzymes *Eco* RI et *Hinc* II (4 fragments), *Dra* I et *Hind* III (5 fragments), *Hae* III et *Taq* I (7 fragments) (cf. Tableau 1 de la publication ). Pour l'établissement de la carte de restriction, le site unique *Eco* RV nous a servi à orienter la molécule d'ADN : Le plus petit fragment (B) étant considéré de manière arbitraire comme situé du côté gauche et le plus grand fragment (A) situé du coté droit (Fig. 2 de la publication et Fig. 7). Il ne nous a pas été possible de positionner les sites *Dra*I et *Taq*I. L'enzyme *Hae* III possède deux sites de restriction symétriques aux extrémités du génome, ce qui peut suggérer comme chez les autres densovirus cartographiés à ce jour, la présence d'une répétition terminale inversée. Celle-ci serait de type *BmDNV*, c'est à dire de petite taille.

Nous n'avons décelé aucune homologie entre l'ADN génomique du *CeDNV* et celui du *JcDNV* en utilisant la technique de Southern (cf. Fig 3 de la publication). L'ensemble des données de la cartographie et la liste des enzymes sans site de restriction nous ont été très précieux pour le clonage du génome du *CeDNV*

## Restriction map of the *Casphalia extranea* densovirus genome

G. Fédière<sup>(1)</sup>, S. Herder<sup>(1)</sup>, K.N. Kouassi<sup>(1)</sup>, X. Léry<sup>(1)</sup>,  
D. Dauthuille<sup>(1)</sup> and M. Bergoin<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> *Laboratoire d'Entomovirologie ORSTOM, BPV 51 Abidjan (Côte-d'Ivoire), and*

<sup>(2)</sup> *Station de Recherches de Pathologie comparée INRA-CNRS, 30380 St. Christol-lez-Alès (France)*

### SUMMARY

A physical map of the *Casphalia extranea* densovirus genome (CeDNV) was constructed. The size of the intact viral genome was estimated to be 4.9 kilobases or 1.6 MDa (single strand). The double-stranded CeDNV genomic DNA was cleaved with 26 restriction endonucleases and 20 restriction sites were mapped on the genome. The CeDNV DNA restriction map was compared to those of other densoviruses. Southern blotting hybridization experiments failed to reveal any homology between the genomes of CeDNV and *Junonia coenia* densovirus (JcDNV).

*Key-words:* DNA, Densovirus, *Parvoviridae*, Restriction map; *Casphalia extranea*.

### INTRODUCTION

Densoviruses (DNV) originally discovered in heavily infected larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Meynadier *et al.*, 1964) have been since isolated from several species of insects, mainly Lepidoptera (see review by Kawase, 1985). The virions of DNV are small icosahedral non-enveloped particles, 20 to 23 nm in diameter and their capsid contains 4 polypeptides (Tijssen *et al.*, 1976; Kelly *et al.*, 1980; Bando *et al.*, 1985). Their genome is a single-stranded (ss) linear DNA molecule 5-6 kb in length (Barwise and Walker, 1970; Kelly and Bud, 1978; Nakagaki and Kawase, 1980; Jousset *et al.*, 1986; Bando *et al.*, 1987).

Owing to their properties, DNV have been classified within the family *Parvoviridae* as the genus *Densovirus*, along with the two genera *Parvovirus* and *Dependovirus* of vertebrate parvoviruses (Matthews, 1982; Siegl *et al.*, 1985). They are characterized by their autonomous replication (unlike the dependoviruses) and by the separate encapsidation in equimolar ratios of strands of each polarity (Barwise and Walker, 1970; Kurstak *et al.*, 1971; Kelly *et al.*, 1977). As a consequence of this property, DNA extraction from DNV virions in high salt buffer resulted in the formation of double-stranded (ds) DNA molecules (Truffaut *et al.*, 1967; Barwise and Walker, 1970; Kelly *et al.*, 1977).

Submitted December 15, 1990, accepted November 12, 1991.

Corresponding author: Prof. Max Bergoin, Station de Recherches de Pathologie comparée, INRA-CNRS, 30380 St. Christol-lez-Alès (France).

A small DNA virus has been recently isolated from *Casphalia extranea* (Lepidoptera, *Limacodidae*), one of the major oil palm pests in West Africa (Fédière, 1983). Laboratory and field tests with this virus have shown its high pathogenicity and ability to control natural populations of its host (Fédière *et al.*, 1986). Preliminary results indicated that this virus shared most of the properties of densovirus, including a capsid built up of 4 polypeptides and a DNA of about 5.7 kb (Fédière, 1983). Recently, we succeeded in multiplying the virus in an established cell line (Fédière *et al.*, 1990). In order to further investigate the basic properties of the *C. extranea* densovirus (*CeDNV*) genome, we have established the restriction map of its dsDNA form.

## MATERIALS AND METHODS

### Virus purification

Virus was purified from infected larvae collected in the fields (Fédière, 1983). Larvae were first homogenized in Tris (0.05 M)-SDS (0.06 %) buffer pH 7.8. After filtration through cheese cloth and clarification (9,000 g, 5 min), the virus was concentrated by high speed centrifugation (Ti-55 Beckman rotor, 40,000 rpm, 2 h). The viral pellets, resuspended in Tris (0.05 M pH 7.8) buffer were dispersed by ultrasonication and then clarified (9,000 g, 5 min). The resulting supernatant, containing virus particles, was layered onto a 15-45 % (w/w) saccharose gradient prepared in Tris buffer and centrifuged (SW 28, Beckman rotor, 27,000 rpm, 2 h). The virus band was removed with a peristaltic pump connected to an UV spectrophotometer (Beckman UV-5230). Generally, 2 or 3 gradients were necessary to obtain a satisfactory purification of the virus.

### DNA extraction

The virus suspension in TE buffer (0.01 M Tris, 0.01 M EDTA, pH 8.0) was treated with SDS (5 mg/ml final concentration) and incubated at 60°C for 15 min. The DNA solution was deproteinized by mixing with an equal volume of a phenol/chloroform solution and gentle shaking at room temperature. The mixture was centrifuged for 5 min at 5,000 g and the same extraction procedure was applied to the upper aqueous phase using phenol only, then chloroform only, and finally, ether.

The deproteinized DNA solution was then dialysed against TEN buffer (0.01 M Tris pH 8.0; 0.001 M EDTA; 0.1 M NaCl) for 72 h, with a change of buffer every 12 h and finally ethanol precipitated overnight at -20°C.

The DNA precipitate was resuspended in TE buffer and the purity and concentration of the solution checked by UV spectrophotometry.

### Digestion

The DNA was digested with the following endonucleases: *Bam*HI, *Bgl*II, *Bst*EII, *Cl*aI, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*II, *Hae*III, *Cfo*I, *Hinc*II, *Hind*III, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Nhe*I, *Not*I, *Pst*I, *Pvu*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sma*I, *Stu*I, *Taq*I, *Xba*I, *Xho*I, under conditions specified by the supplier.

The digestion volume was approximately 50 µl and 1 to 2 µl of enzyme were added in order to have at least one unit per µg of DNA. The digested fragments were analysed by electrophoresis on horizontal agarose mini-gels (Helling *et al.*, 1974) of appropriate concentrations (1.2 to 2 %) in TAE buffer (40 mM Tris pH 8.0; 40 mM sodium acetate; 1 mM EDTA). To separate restriction fragments too small to be detected by agarose gel electrophoresis, polyacrylamide slab gels (7.8 and 9 %) were also used. After migration, gels were stained with ethidium bromide (1 mg/ml) and photographed under UV light. The size of restriction fragments was determined by linear regression according to the method of Southern (1979) using double *Eco*RI-*Hind*III

*Ad*DNV = *Acheta domestica* DNV.  
*Bm*DNV = *Bombyx mori* DNV.  
*Ce*DNV = *Casphalia extranea* DNV.  
 ds = double-stranded.  
 EDTA = ethylene diamine tetraacetate.  
*Gm*DNV = *Galleria mellonella* DNV.  
 ITR = inverted terminal repeat.

*Jc*DNV = *Junonia coenia* DNV.  
 SDS = sodium dodecyl sulphate.  
 ss = single-stranded.  
 TAE buffer = Tris-acetate-EDTA buffer.  
 TE buffer = Tris-EDTA buffer.  
 TEN buffer = Tris-EDTA-NaCl buffer.

digestion fragments of bacteriophage lambda DNA as standards. This method permits the calculation of a correction coefficient (L) to avoid error in measurement due to the inflexion in the upper part of the calibration curve.

#### Southern blot hybridization

DNA restriction fragments were transferred onto nylon membranes (Boehringer Mannheim) and then hybridized with a total genomic probe of either CeDNV or JcDNV DNA, both labelled with digoxigenin-11-dUTP according to the supplier's protocol (Boehringer Mannheim).

In order to reuse a membrane for a second hybridization, it was first decolorized and treated following the recommendations of the supplier.

### RESULTS

The DNA of CeDNV was submitted to a range of restriction enzymes. The following endonucleases: *Bam*HI, *Bgl*II, *Bst*EII, *Cl*I, *Hae*II, *Hha*I, *Cfo*I, *Hpa*I, *Kpn*I, *Nhe*I, *Not*I, *Pst*I, *Pvu*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sma*I and *Stu*I were found to have no cleavage site in the viral DNA.

The enzymes *Eco*RV, *Xba*I and *Xho*I cleaved the CeDNV DNA once. The other enzymes tested had more than one restriction site: *Eco*RI and *Hinc*II (3 sites), *Dra*I and *Hind*III (4 sites), *Hae*III and *Taq*I (6 sites). Digestion with *Hpa*II appeared to be poorly reproducible by generating an inconstant number of fragments. The sizes of the restriction fragments of the CeDNV ge-

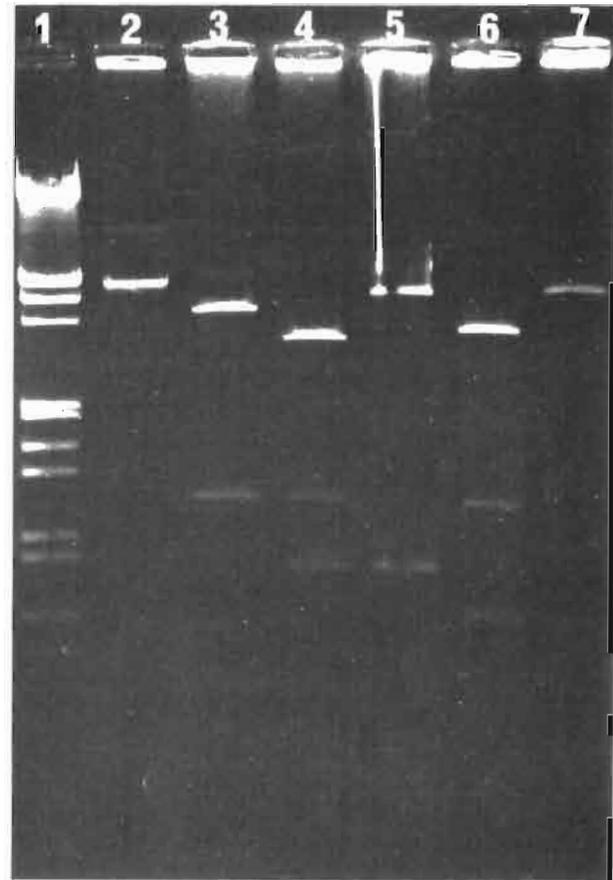


Fig. 1. Electrophoretic profile of restricted genomic DNA from CeDNV.

Lane 1: *Eco*RI-*Hind*III lambda DNA digest; lane 2: undigested DNA; lane 3: *Eco*RV digest; lane 4: *Eco*RV+*Xba*I digest; lane 5: *Xba*I digest; lane 6: *Eco*RV+*Xho*I digest; lane 7: *Xho*I digest.

Table 1. Number and size (in kb) of the restriction fragments from the genomic DNA of CeDNV.

Enzymes	Fragments						
	A	B	C	D	E	F	G
<i>Dra</i> I	2.72	1.18	0.75	0.14	0.11	—	—
<i>Hinc</i> II	1.68	1.43	1.13	0.66	—	—	—
<i>Eco</i> RI	3.49	0.58	0.51	0.32	—	—	—
<i>Eco</i> RV	3.83	1.07	—	—	—	—	—
<i>Hae</i> III	1.87	1.09	0.65	0.56	0.20	0.25	0.22
<i>Hind</i> III	2.39	0.89	0.82	0.42	0.38	—	—
<i>Taq</i> I	1.25	1.08	0.86	0.73	0.64	0.22	0.12
<i>Xba</i> I	4.22	0.68	—	—	—	—	—
<i>Xho</i> I	4.40	0.50	—	—	—	—	—

The sizes of the individual fragments generated by each enzyme were adjusted according to the value of 4.9 kb estimated for the undigested genomic DNA.

nome are shown in table I. Due to the limitations of the method used, it was not possible to detect DNA fragments with a size smaller than 80 bp. The molecular weight of undigested dsDNA estimated by electrophoresis on agarose gel was 3.2 MDa (4.9 kbp) or 1.6 MDa for the ss molecule.

Complete mapping of the restriction sites on the genome was achieved by using classical techniques of total or partial digestion with each of the different enzymes or simultaneous digestion with pairs of restriction enzymes (see fig. 1). The restriction map of the *Ce*DNV genome was obtained by ordering the 29 restriction fragments and positioning the 20 restriction sites (see fig. 2). The unique *EcoRV* restriction site served for ordering the fragments on the genome. It was arbitrarily decided that the large fragment (A) represented the right hand side of the molecule. The recognition sites of the other enzymes were positioned relative to this.

The restriction sites for enzymes *HpaII*, *DraI* and *HincII* were not mapped on the genome, and

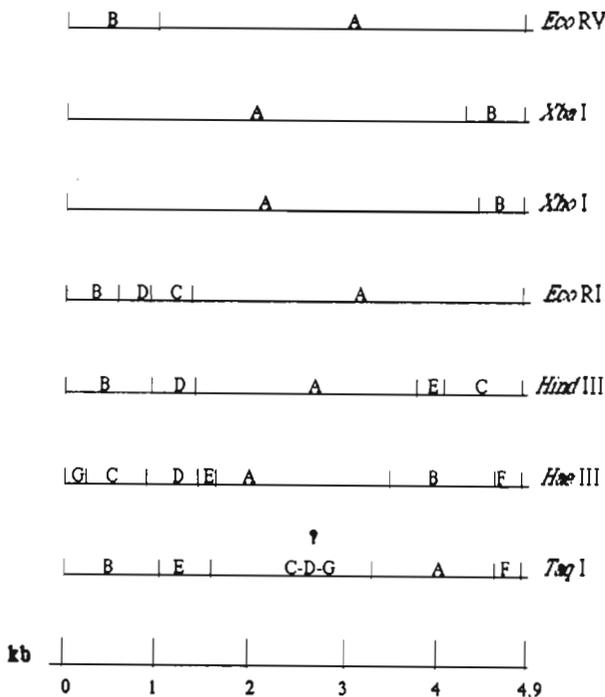


Fig. 2. Restriction map of the *Ce*DNV genomic DNA as determined by the following endonucleases: *EcoRV*, *XbaI*, *XhoI*, *EcoRI*, *HindIII*, *HaeIII* and *TaqI*.

the restriction fragments C, D and G of *TaqI* enzyme (see fig. 2), in the central part of the molecule, could not be ordered accurately because none of the enzymes used cleaved the DNA molecule in this region.

We looked for homologies between *Ce*DNV DNA and *Jc*DNV DNA. For this purpose, restriction fragments of both genomes, were electrophoresed in 1 % agarose gel, transferred onto a nylon membrane and hybridized first with a total genomic *Ce*DNV probe, then rehybridized with a total genomic *Jc*DNV probe (see "Materials and Methods"). As shown in figure 3, both *Ce*DNV and *Jc*DNV DNA probes hybridized only with the restriction fragments of their homologous DNA. We concluded from these results that the two genomes have no significant sequence homology.

#### DISCUSSION

A restriction map of the *Ce*DNV DNA was derived from 7 restriction enzymes and 20 sites have been positioned on the genome. In order to know if the proposed map orientation conforms to the convention adopted for other parvoviruses (Armentrout *et al.*, 1978), *i.e.* the 3'-OH terminus of the "minus" (viral) strand as the left end of the molecule; the 3' and 5' extremities have yet to be defined. Cleavage of the *Ce*DNV genome by *HaeIII* generated 2 small fragments of similar size which mapped at both ends of the genome (see fig. 2). Symmetrical cleavages were also found in other densovirus genomes (Bando *et al.*, 1987; Jousset *et al.*, 1990), which very likely indicates the presence of inverted repeats at both ends of the genome.

With a size of 4.9 kb, the *Ce*DNV genome is closer to the 5.0-kb DNA of *Bombyx mori* DNV (*Bm*DNV; Bando *et al.*, 1990) or to the 5.2-kb genome of *Acheta domestica* DNV (*Ad*DNV, Jousset *et al.*, 1986) than to the 5.9-kb DNA of *Jc*DNV and *Gm*DNV (Jousset *et al.*, 1990). However, the restriction map of the *Ce*DNV genome shows little similarity with that of *Bm*DNV (Bando *et al.*, 1987), *Ad*DNV (Jousset, personal communication), *Jc*DNV or

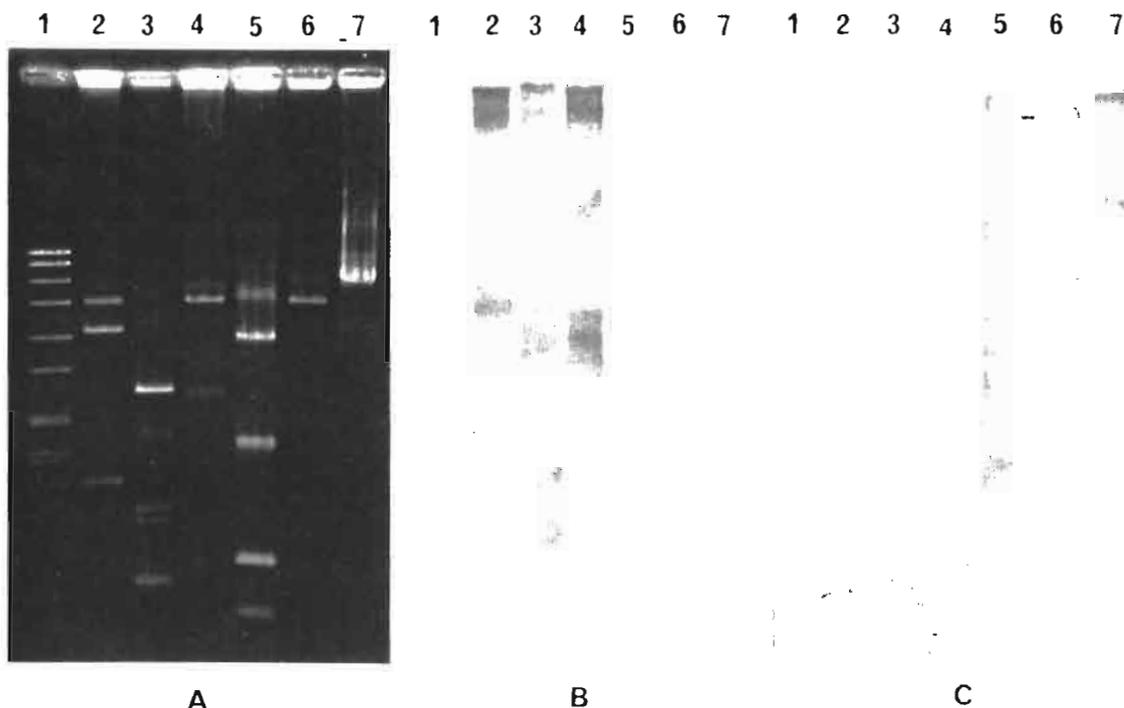


Fig. 3. Southern blotting hybridization between *CeDNV* and *JcDNV* genomes.

A) Electrophoretic profiles of restricted and uncleaved *CeDNV* and *JcDNV* genomic DNA. Lane 1: *EcoRI* fragments of phage SPPI DNA used as molecular weight marker (Boehringer Mannheim); lane 2: *EcoRV* digest of *CeDNV* DNA; lane 3: *HindIII* digest of *CeDNV* DNA; lane 4: undigested *CeDNV* DNA; lane 5: *EcoRI* digest of *JcDNV* DNA; lane 6: *HindIII* digest of *JcDNV* DNA; lane 7: undigested *JcDNV* DNA.

B) Southern blot of DNA fragment profiles shown in A revealed by a digoxigenin-labelled *CeDNV* DNA probe.

C) The nylon membrane shown in B was dehybridized and rehybridized using a digoxigenin-labelled *JcDNV* DNA probe.

*GmDNV* (Jousset *et al.*, 1990). Furthermore, Southern hybridization failed to reveal any homology between *CeDNV* and *JcDNV* DNA. This lack of homology may reflect the lack of serological relationship observed between *CeDNV*, *JcDNV* and *GmDNV* (Fédière, 1983).

On the basis of the length of their inverted terminal repeats (ITR), we recently proposed to separate the densoviruses into 2 categories: those with a genomic size averaging 6 kb possessing long ITR and those with a smaller size (about 5 kb) with shorter ITR (Jourdan *et al.*, 1990). Additional experiments will be necessary to further define these differences and their significance and to precisely define the relationship of *CeDNV* to other densoviruses.

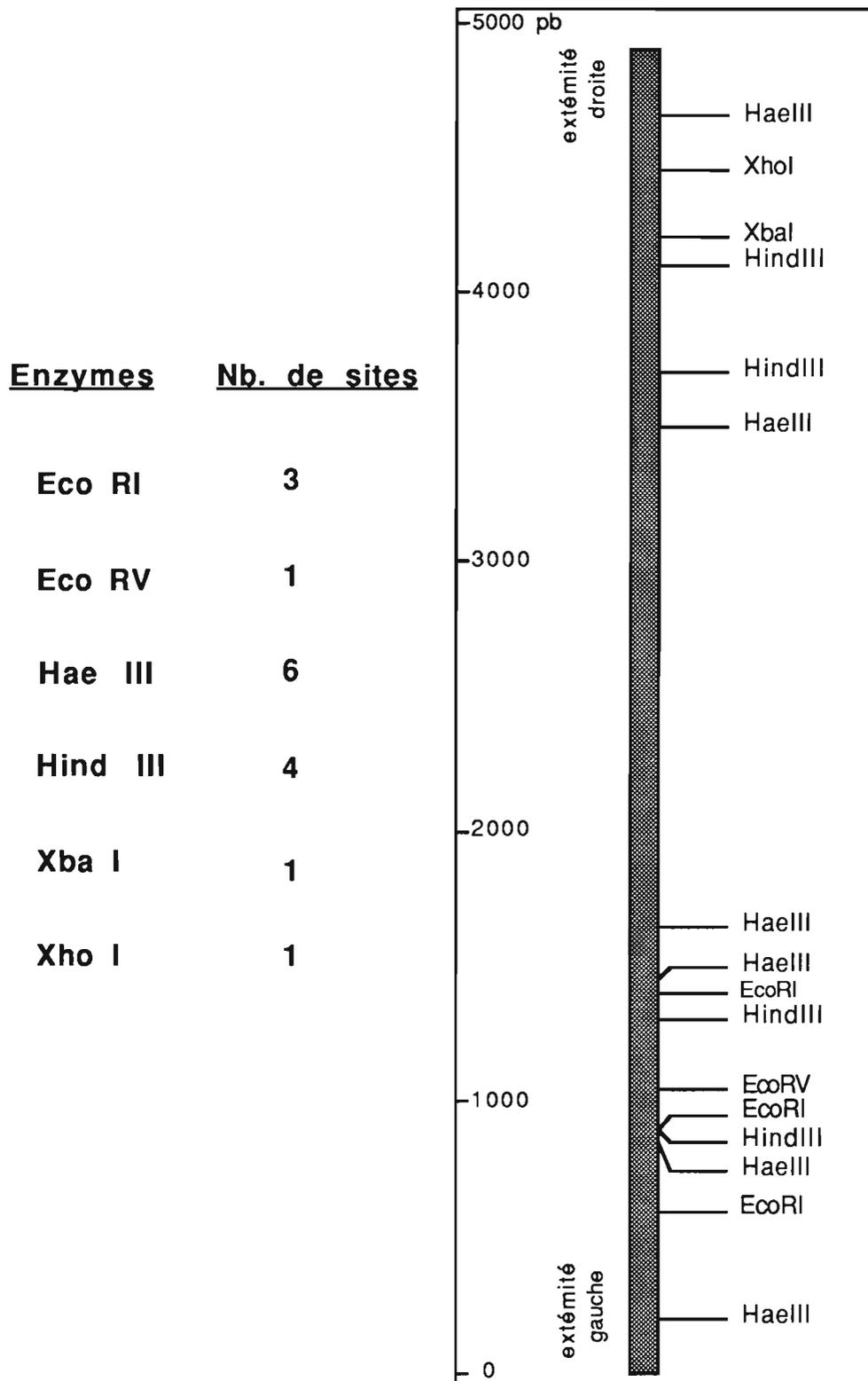
#### Carte physique de restriction du génome du densovirus de *Casphalia extranea*

Nous avons dressé la carte physique de restriction de la forme bicaténaire de l'ADN du densovirus de *Casphalia extranea* Walker (*CeDNV*; Lepidoptère, *Limacodidae*). La taille du génome a été estimée à 4,9 kilobases, soit 1,6 MDa (forme monocaténaire). L'ADN génomique a été digéré par 26 endonucléases, et 20 sites de restriction ont été cartographiés par 7 enzymes. Cette carte a été comparée à celles d'autres densovirus. Aucune homologie de séquence n'a été détectée entre l'ADN génomique du *CeDNV* et celui du densovirus de *Junonia coenia*.

*Mots-clés*: ADN, Densovirus, *Parvoviridae*, Carte de restriction; *Casphalia extranea*.

## References

- Armentrout, R., Bates, R., Berns, K., Carter, B., Chow, M., Dressler, K., Fife, W., Hauswirth, W., Hayward, G., Lavelle, G., Rhode, S., Strauss, S., Tattersall, P. & Ward, D. (1978), A standardized nomenclature for restriction endonuclease fragments, in "Replication of parvoviruses" (D. Ward & P. Tattersall) (pp. 523-526). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Bando, H., Kusuda, J. & Kawase, S. (1987), Molecular cloning and characterization of *Bombyx* densovirus genomic DNA. *Arch. Virol.*, 93, 139-146.
- Bando, H., Kusuda, J., Gojobori, T. & Kawase, S. (1985), (Genome structure and origin of *Bombyx* densovirus DNA). *Jap. J. Genetics*, 60, 584.
- Bando, H., Choi, H., Ito, Y. & Kawase, S. (1990), Terminal structure of a densovirus implies a hairpin transfer replication which is similar to the model for AAV. *Virology*, 179, 57-63.
- Barwise, A.H. & Walker, I.O. (1970), Studies of the DNA of a virus from *Galleria mellonell* L. *FEBS Letters*, 6, 13-16.
- Fédière, G. (1983), Recherches sur des viroses épizootiques de lépidoptères *Limacodidae* ravageurs de palmacées. Thèse, Univ., Montpellier II, 103 pp.
- Fédière, G., Monsarrat, P., Mariau, D. & Bergoin, M., A Densovirus of *Casphalia extranea* (Lepidoptera, *Limacodidae*): characterization and use for biological control, in "Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology" (R.A. Samson, J.M. Vlak & D. Peters) p. 705. Proc 4th int. Colloq. Invertebr. Pathol., Veldhoven (The Netherlands), August 1986.
- Fédière, G., Léry, X., Quiot, J.M. & Monsarrat, P. (1990), Replication of the Densovirus of *Casphalia extranea* (Lepidoptera, *Limacodidae*) on an established cell line. *J. Invertebr. Path.*, 56, 132-134.
- Helling, R.B., Goodman, H.M. & Boyer, H.W. (1974), Analysis of R.EcoRI fragments of DNA from lambda-doid bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis. *J. Virol.*, 14, 1235-1244.
- Jourdan, M. (1990), Clonage et séquençage du génome infectieux d'un parvovirus d'insecte, le densovirus du lépidoptère *Junonia coenia*. Th. Doct., Univ. Montpellier 2, Décembre 1990, 172 p.
- Jousset, F.X., Compagnon, B. & Bergoin, M. (1986), Comparison of the restriction map and infectivity of the genome of three Densoviruses, in "Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology" (R.A. Samson, J.M. Vlak & D. Peters) p. 121. Proc. 4th int. Colloq. Invertebr. Pathol., Veldhoven (The Netherlands), August 1986.
- Jousset, F.X., Jourdan, M., Compagnon, B., Mialhe, E., Veyrunes, J.-C. & Bergoin, M. (1990), Restriction maps and sequence homologies of two densovirus genomes. *J. gen. Virol.*, 71, 2463-2466.
- Kawase, S. (1985), Pathology associated with densoviruses, in "Viral insecticides for biological control" (K. Maramorosch, K.E. Sherman) (pp. 197-231). Academic Press, New York, London.
- Kelly, D.C., Moore, N.F., Spilling, C.R., Barwise, A.H. & Walker, O. (1980), Densovirus structural proteins. *J. gen. Virol.*, 36, 224-235.
- Kelly, D.C. & Bud, H.M. (1978), Densovirus DNA: analysis of fine structure by electron microscopy and agarose gel electrophoresis. *J. gen. Virol.*, 40, 33-43.
- Kelly, D.C., Barwise, A.H. & Walker, I.O. (1977), DNA contained by two densovirus viruses. *J. Virol.*, 21, 396-407.
- Kurstak, E., Vernoux, J.P., Niveleau, A. & Onji, P.A. (1971), Visualisation du DNA du virus de la densovirus (VDN) à chaînes monocaténaire complémentaires de polarités inverses, plus et moins. *C.R. Acad. Sci. (Paris) (Sér. D)*, 272, 762-765.
- Matthews, R.E.F. (1982), Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 17, 1-199.
- Meynadier, G., Vago, C., Plantevin, G. & Atger, P. (1964), Virose d'un type inhabituel chez le Lépidoptère *Galleria mellonella* L. *Rev. Zool. agric. appl.*, 63, 207-208.
- Nakagaki, M. & Kawase, S. (1980), DNA of a new parvovirus isolated from the silkworm *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Path.*, 35, 124-133.
- Siegl, G., Bates, R.C., Berns, K.I., Carter, B.J., Kelly, D.C., Kurstak, E. & Tattersall, P. (1985), Characteristics and taxonomy of *Parvoviridae*. *Intervirology*, 23, 61-73.
- Southern, E.M. (1979), Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 100, 319-323.
- Tijssen, P., Van der Hurk, J. & Kurstak, E. (1976), Biochemical, biophysical, and biological properties of densovirus. — I. Structural proteins. *J. Virol.*, 17, 686-691.
- Truffaut, N., Berger, G., Niveleau, A., May, P., Bergoin, M. & Vago, C. (1967), Recherches sur l'acide nucléique du virus de la densovirus du lépidoptère *Galleria mellonella* L. *Arch. ges. Virusforsch.*, 21, 469-474.



**Fig. 7 : Carte physique de restriction du génome du *CeDNV***

La bande verticale représente l'ADN du *CeDNV* sous la forme bicaténaire obtenue par appariement lors de l'extraction des brins complémentaires.  
Les traits horizontaux représentent les sites de coupure des endonucléases

## B. Clonage des fragments de restriction de l'ADN du CeDNV

### 1°) Choix du plasmide vecteur

Le clonage a été réalisé dans le plasmide pEMBL 19+ dont les caractéristiques présentées au chapitre III sont schématisées (Fig. 8). Ce plasmide de 3960 pb dérivé de pBR322 possède d'une part le gène de résistance à l'ampicilline et d'autre part le gène lac Z d'*E. coli* dans la séquence duquel a été inséré, sans rompre le cadre de lecture, un multisite constitué par une succession de sites de restriction uniques. Cette disposition permet la sélection des clones recombinants après insertion d'un fragment d'ADN viral dans l'un de ces sites. En effet, cette opération détruisant le cadre de lecture du gène lac Z, il n'y a plus synthèse de  $\beta$  galactosidase. En conséquence, les bactéries possédant un plasmide recombinant, se multipliant sur du milieu nutritif gélosé contenant le complexe Xgal - IPTG ne peuvent synthétiser de la  $\beta$  galactosidase et sont donc incapables de cliver l'Xgal pour générer un chromogène. Les colonies de ces bactéries restent blanches, alors que celles qui contiennent le plasmide pEMBL19+ natif sont bleues. De plus, le pEMBL 19+ permet l'amplification de l'ADN recombinant, d'une part sous forme bicaténaire dans les bactéries transformées par ce plasmide, et d'autre part sous forme monocaténaire après infection de la souche bactérienne avec le phage F1. Ces deux éventualités pourront être utilisées par la suite dans le séquençage du génome viral.

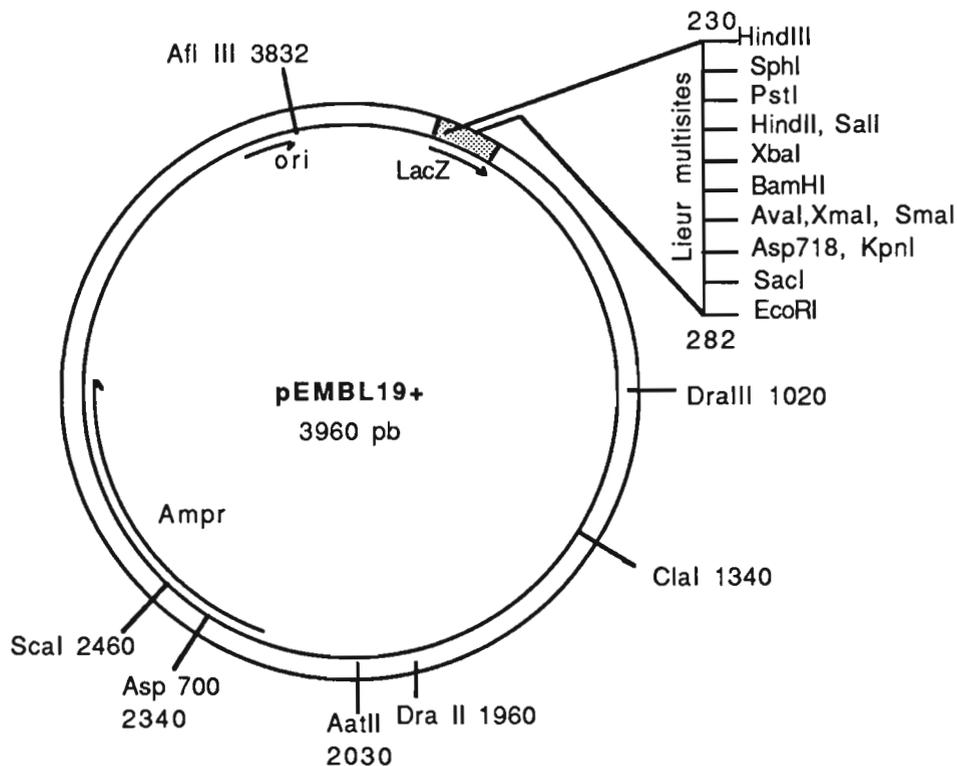


Fig. 8 : Schéma du plasmide pEMBL 19+

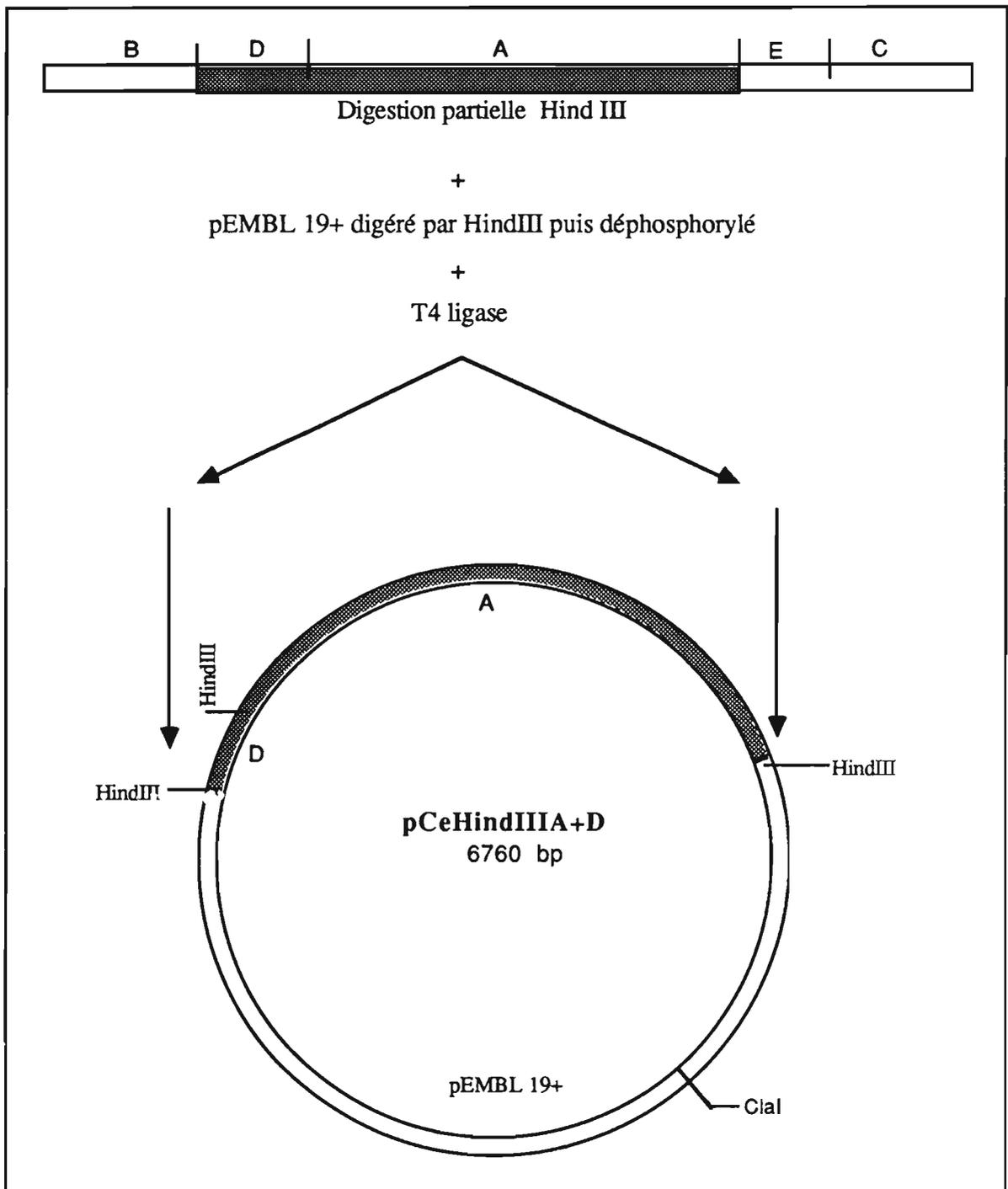
## 2°) Clonage des fragments de restriction

Dans le but de préparer une sonde nucléique spécifique destinée à la mise au point d'une méthode de diagnostic (cf. chapitre V), nous nous sommes intéressés au clonage des fragments de restriction générés par l'enzyme *Hind*III. Le processus de clonage que nous avons suivi est schématisé sur la Fig. 9. L'ADN viral et le plasmide sont digérés séparément par l'endonucléase *Hind*III. Le plasmide ainsi linéarisé est déphosphorylé dans les conditions décrites au chapitre III. Tous les fragments de restriction de l'ADN et le plasmide ont été soumis à la ligation. Après transformation des bactéries compétentes de la souche JM 83 d'*E. coli*, les colonies blanches ont été analysées.

Sur 6 colonies contenant des plasmides recombinants une seule renfermait un plasmide possédant un insert de 2,8 kb (Fig. 10). Cette taille représente la somme des fragments de restriction A et D générés par l'endonucléase *Hind*III (cf. Tableau 1 publication et Fig. 9) nous avons appelé ce plasmide pCe*Hind*III A+D. Deux autres renfermaient un plasmide recombinant dont l'insert viral de 2,39 kb correspond à la taille du fragment A et nous les avons nommés pCe*Hind*III A (Fig. 10).

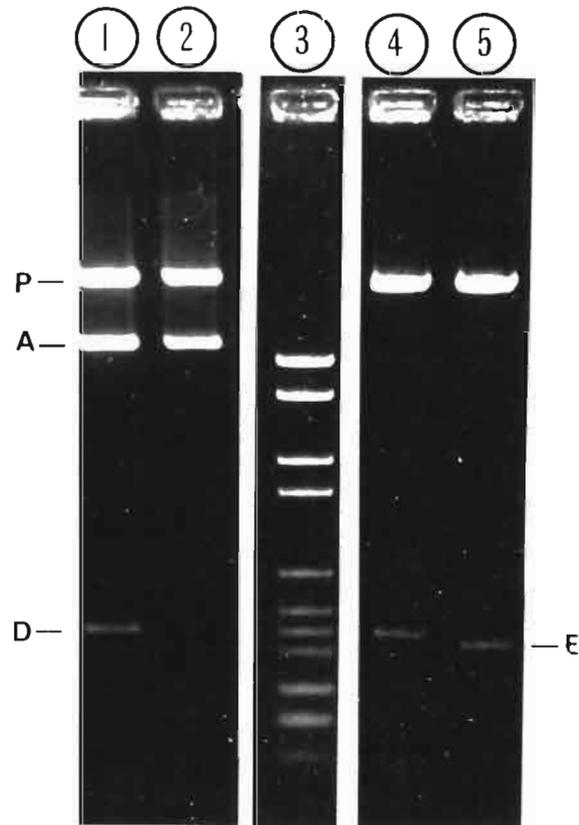
De la même manière, nous avons isolé deux recombinants pCe*Hind*III D (la taille de l'insert viral est de 0,42 kb) et un recombinant pCe*Hind*III E (la taille de l'insert viral est de 0,38 kb) (Fig. 10). La présence de ces inserts viraux a été confirmée par hybridation avec une sonde ADN génomique total du *Ce*DNV après électrophorèse en gel d'agarose des inserts viraux, puis transfert par la technique de Southern sur une membrane de nylon.

Des tentatives de clonage du génome entier ont été réalisées mais n'ont pas abouti au résultat escompté. Nous avons pour cela rendu les extrémités franches par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* et avons tenté l'insertion de ce génome dans le site unique *Hind* II (*Hinc*II) du plasmide pEMBL 19+. Le criblage des colonies recombinantes nous a permis d'isoler différents plasmides dont les inserts viraux étaient hétérogènes en taille, le plus grand fragment inséré étant de 2 kb environ. Nous attribuons ces échecs répétés à la mauvaise qualité des préparations d'ADN ayant servi au clonage.



**Fig. 9 : Clonage des fragments *Hind* III A et D dans pEMBL 19+**

Le plasmide pEMBL 19+ et l'ADN du CeDNV sont digérés séparément par l'enzyme *Hind*III, le plasmide est déphosphorylé pour éviter sa recircularisation. La digestion partielle de l'ADN viral a généré un grand fragment A+D qui est inséré dans le site *Hind*III de pEMBL19+ en présence de la ligase T4.



**Fig. 10 : Profils électrophorétiques des fragments de restriction des plasmides recombinants pCeHindIII A+D, pCeHindIII A, pCeHindIII D et pCeHindIII E générés par l'enzyme *HindIII*.**

Piste 1 : Plasmide pCeHindIII A+D

Piste 2 : Plasmide pCeHindIII A

Piste 3 : Marqueur de poids moléculaire (marqueur VI)\*

Piste 4 : Plasmide pCeHindIII D

Piste 5 : Plasmide pCeHindIII E

A (fragment A = 2390 pb), D (fragment D = 420 pb), E (fragment E = 380 pb), P (pEMBL19+ linéarisé = 3960 pb)

\* Marqueur VI (cf. Chapitre III, Matériel et méthodes)

Pour la préparation de sondes, nous ne nous sommes intéressés qu'aux recombinants ayant inséré les fragments de restriction de l'endonucléase *Hind*III et plus particulièrement au plasmide pCeHindIII A+D comportant l'insert de la plus grande taille. En effet l'insert viral de ce plasmide représente plus de 50 % de la séquence interne du génome, séquence dans laquelle plusieurs autres sites sont cartographiés.

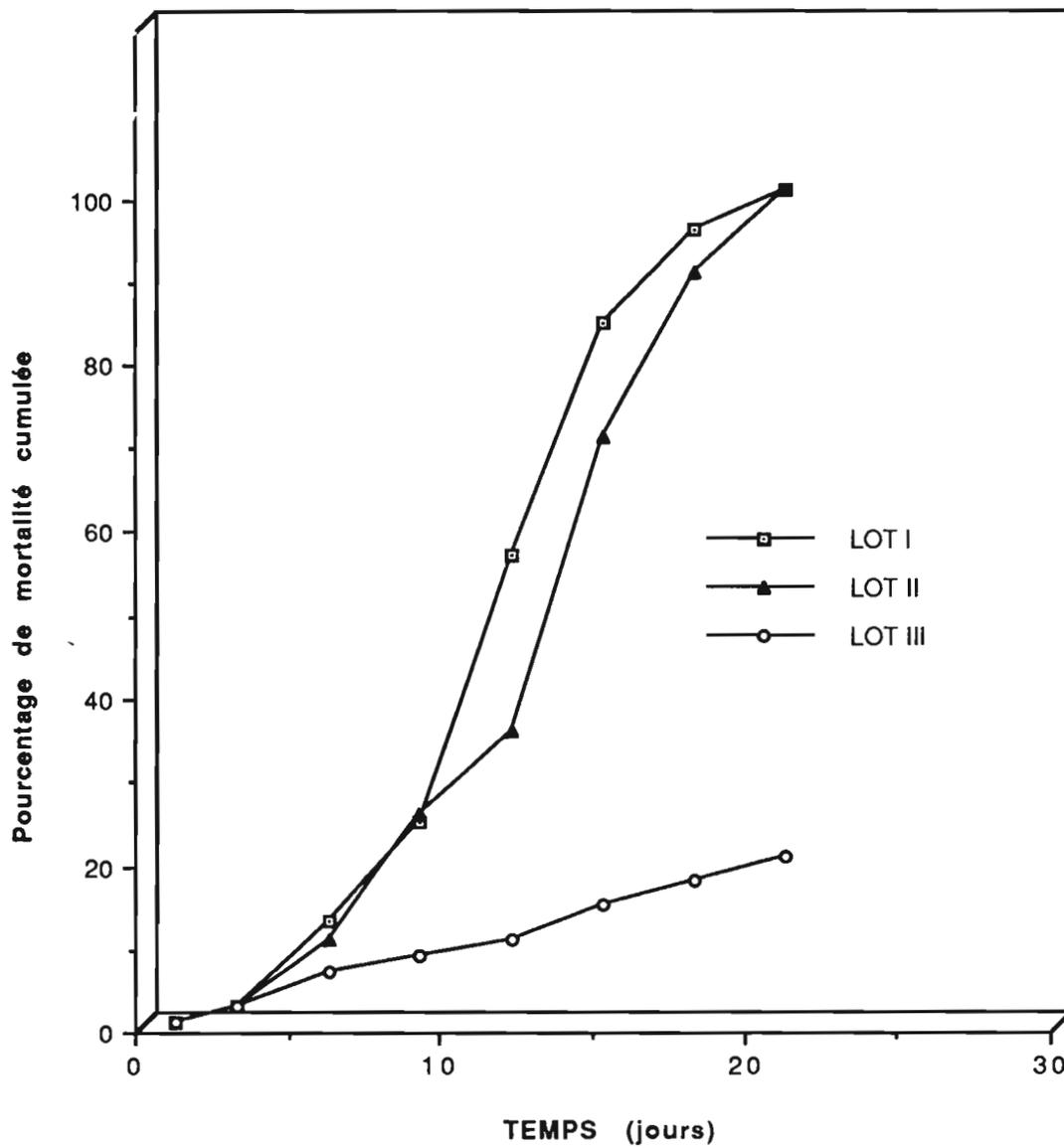
## II. Etude du génome du *Ds*DNV

### A. Pathologie expérimentale et purification du *Ds*DNV

Les virions du densovirus de *D. saccharalis* ont été produits à partir de la souche virale et des larves hôtes originaires du Brésil (UNICAMP). Un élevage de ce lépidoptère a été effectué sur le milieu nutritif artificiel mis au point par POITOUT (cf. chapitre III). Les larves du stade III ont été infectées par différentes voies, soit *per os* en souillant le milieu nutritif avec une suspension virale soit par injection de cette suspension à l'aide d'un microinoculateur (cf. chapitre III). Les infections expérimentales ont donné les résultats suivants (Tableau 6)

**Tableau 6 : Pourcentage cumulé de mortalité chez les larves infectées *per os* et chez les larves saines**

Temps en jours	larves infectées		Larves saines lot III (100 larves)
	lot I (380 larves)	lot II (600 larves)	
1	0	0	0
3	2%	2%	2%
6	12%	10%	6%
9	24%	25%	8%
12	56%	35%	10%
15	84%	70%	14%
18	95%	90%	17%
21	100%	100%	20%



**Fig. 11 : Courbes de mortalité cumulée des larves infectées et des larves saines témoins**

Lot I et lot II : Larves infectées  
lot III : larves témoins (voir Tableau 6)

On remarque que pendant les quatre premiers jours de l'infection, les courbes de mortalité cumulée des larves infectées et des larves saines se superposent. Au delà de cette période d'incubation, la mortalité dans les lots de larves infectées augmente régulièrement et après 21 jours, atteint 100 % dans les lots infectés I et II, alors qu'elle est de 20 % seulement chez les larves témoins. Pendant cette période donc, 80% seulement de la mortalité est réellement imputable au virus dans les lots de larves infectées. Les larves de *D. saccharalis* infectées sont broyées dans le tampon PBS comme exposé au chapitre III.

Le broyat clarifié est ensuite directement déposé sur un gradient de densité de rénografine 20 % - 76 %. Après centrifugation à l'équilibre à 120.000 g pendant 14 heures, le virus concentré en une bande visible à l'œil nu dans le tiers inférieur du tube est prélevé et dialysé contre du tampon TE.

Le spectre d'absorption dans le proche ultra-violet de la suspension de virus purifiés est caractéristique de nucléoprotéines présentant un maximum d'absorption à 260 nm et un minimum à 240 nm. Le rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm (maximum d'absorption respectif des acides nucléiques et des protéines) est de 1,5. Cette valeur relativement élevée est caractéristique des densovirus dont la teneur en ADN est de 35 % (cf. chapitre III) quant au rapport  $DO_{260} / DO_{240}$  (max/min), il est de 1,3. L'examen au microscope électronique après contraste négatif à l'acide phosphotungstique (APT) à 1 % (Fig. 12) montre que la plupart des suspensions sont de pureté satisfaisante.

Les virions ne sont pas pénétrés par l'APT et présentent les caractéristiques décrites par Meynadier *et al.*, (1977b). C'est à partir de suspensions virales ainsi purifiées que nous avons préparé les anticorps anti-virions de *D. saccharalis* et extrait l'ADN génomique pour sa caractérisation et son clonage. La caractérisation des protéines de la capsidie et des travaux de comparaison du densovirus de *D. saccharalis* avec d'autres densovirus déjà étudiés font l'objet de la thèse de Doctorat de Cristina Cavallaró, dans la même unité.

## B. Caractérisation de l'ADN viral

### 1°) Purification de l'ADN

L'extraction de l'ADN est faite dans un tampon de force ionique élevée à partir de la suspension virale obtenue plus haut, selon la méthode décrite au chapitre III. Plusieurs extractions au phénol - chloroforme sont nécessaires pour parachever la déprotéinisation. La pureté de l'ADN ainsi obtenu est contrôlée par son spectre d'absorption en UV qui présente un maximum d'absorption à 260 nm et un minimum à 240 nm. Le rapport  $DO_{260} / DO_{280}$ , de l'ordre de 1,85 est synonyme de la pureté des préparations d'ADN.

## 2°) Estimation de la taille de l'ADN viral

### a) En microscopie électronique

Nous avons observé des étalements de cet ADN en microscopie électronique selon la technique de Davis *et al.*, (1971). L'examen de ces préparations révèle des molécules linéaires (Fig. 13) dont la taille varie de 1,97 à 2,08  $\mu\text{m}$  avec une moyenne (valeur sur 18 molécules) de  $2,03 \pm 0,03 \mu\text{m}$ . Afin de déterminer le poids moléculaire du génome du *DsDNV*, nous avons incorporé à notre échantillon des molécules d'ADN circulaire bicaténaire (forme répliquative du bactériophage  $\phi$  x 174 servant de référence de taille. Sur la base de 2,95 kb (ou  $1,92 \times 10^6$  Daltons) par  $\mu\text{m}$  d'ADN bicaténaire, et après correction de la valeur mesurée de l'ADN du  $\phi$  x 174 (1,80  $\mu\text{m}$ ) par rapport à la valeur connue (1,77  $\mu\text{m}$ ), nous avons estimé la taille du génome bicaténaire du *DsDNV* à  $5900 \pm 100$  pb.

### b) En gel d'agarose

La taille de l'ADN génomique natif a été estimée après migration en gel d'agarose, par comparaison avec d'une part des marqueurs de poids moléculaire, et d'autre part les génomes de densovirus de *J. coenia* et de *G. mellonella* dont les tailles sont connues de façon précise. La taille de la forme bicaténaire (ds) du *DsDNV* est estimée à  $5950 \pm 50$  pb soit  $3,9 \times 10^6$  Daltons. Le poids moléculaire de la forme monocaténaire (ss), forme sous laquelle cette molécule est encapsidée est donc de  $1,95 \times 10^6$  Daltons. C'est à cette valeur de 5950 pb qu'a été ajustée la somme des tailles des fragments de restriction (voir section suivante)

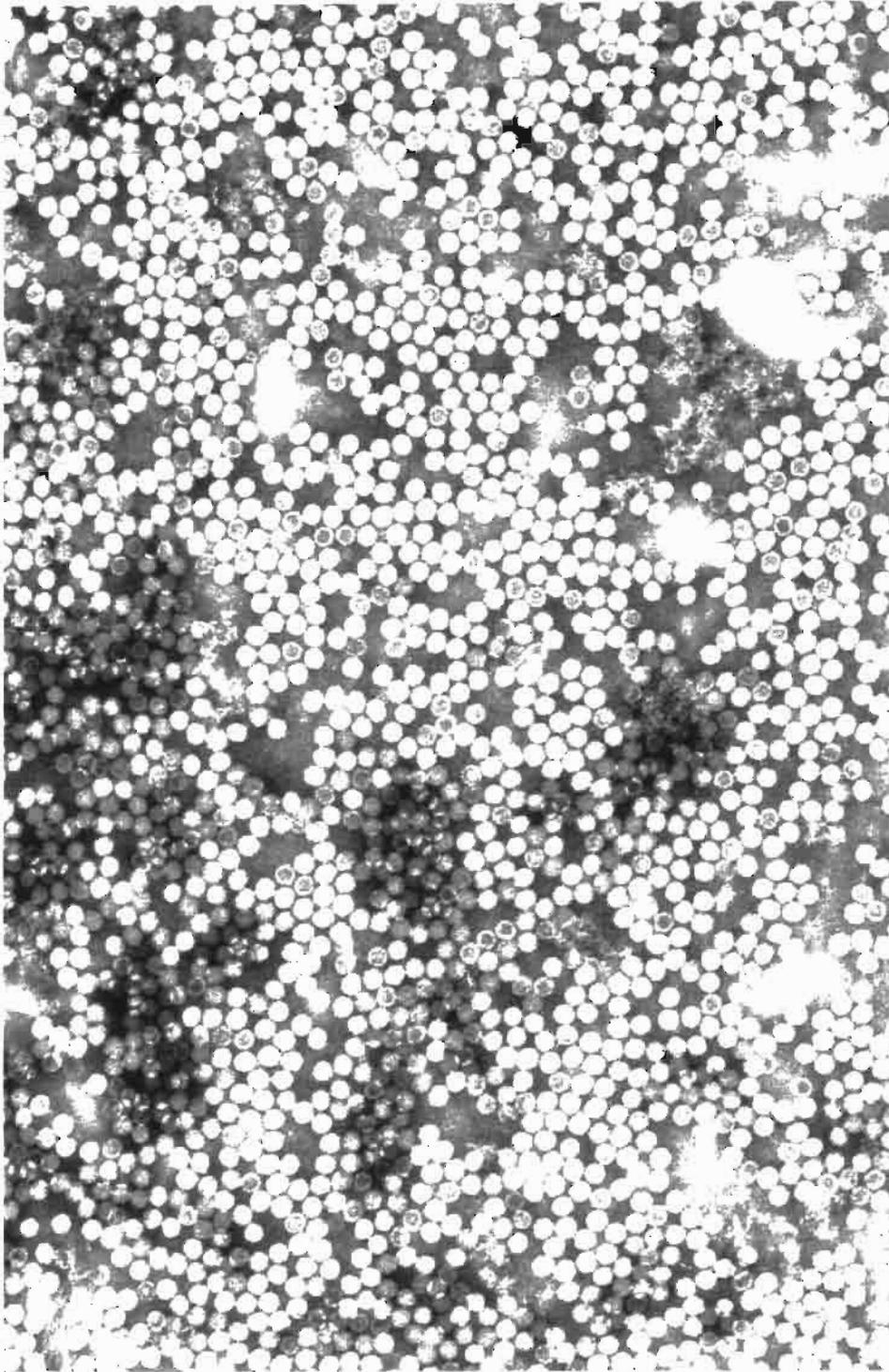
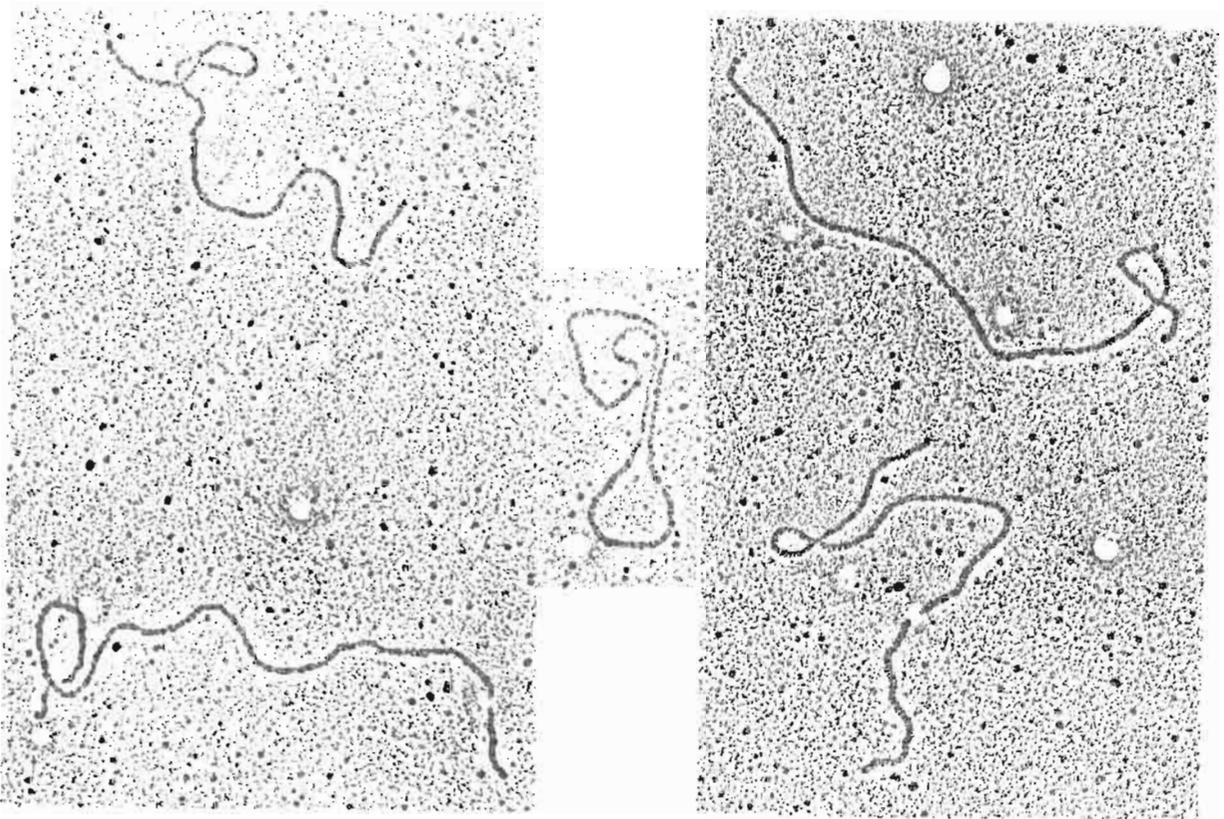


Fig. 12 : Suspension purifiée du densovirus de *D. saccharalis* examinée au microscope électronique après contraste négatif au phosphotungstate de sodium (Grossissement x 140.000)



**Fig. 13 : Etalement des molécules d'ADN du *Ds*DNV et du bactériophage  $\Phi$  x 174 (Méthode de Davis *et al.*, 1971)**

\* La molécule circulaire : molécule du  $\Phi$  x 174

Grossissement x 60.000

### 3°) Cartographie physique de restriction du génome du *DsDNV*

#### a) Détermination du nombre et de la taille des fragments de restriction

Nous avons digéré la forme bicaténaire de L'ADN du *DsDNV* par plusieurs endonucléases de restriction. En général des aliquotes contenant de 1 à 2 µg d'ADN ont été digérés par 37 endonucléases, dans les conditions préconisées par les fournisseurs. Les fragments de restriction générés par chaque enzyme sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose ou d'acrylamide. Un exemple de ces analyses est présenté (Fig. 14). La taille de ces fragments est estimée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire (marqueur III, marqueur VI et marqueur VII décrits au chapitre III). De même la méthode de détermination de la taille des différents fragments de l'ADN du *DsDNV* obtenus après digestion par les enzymes est expliquée au chapitre III.

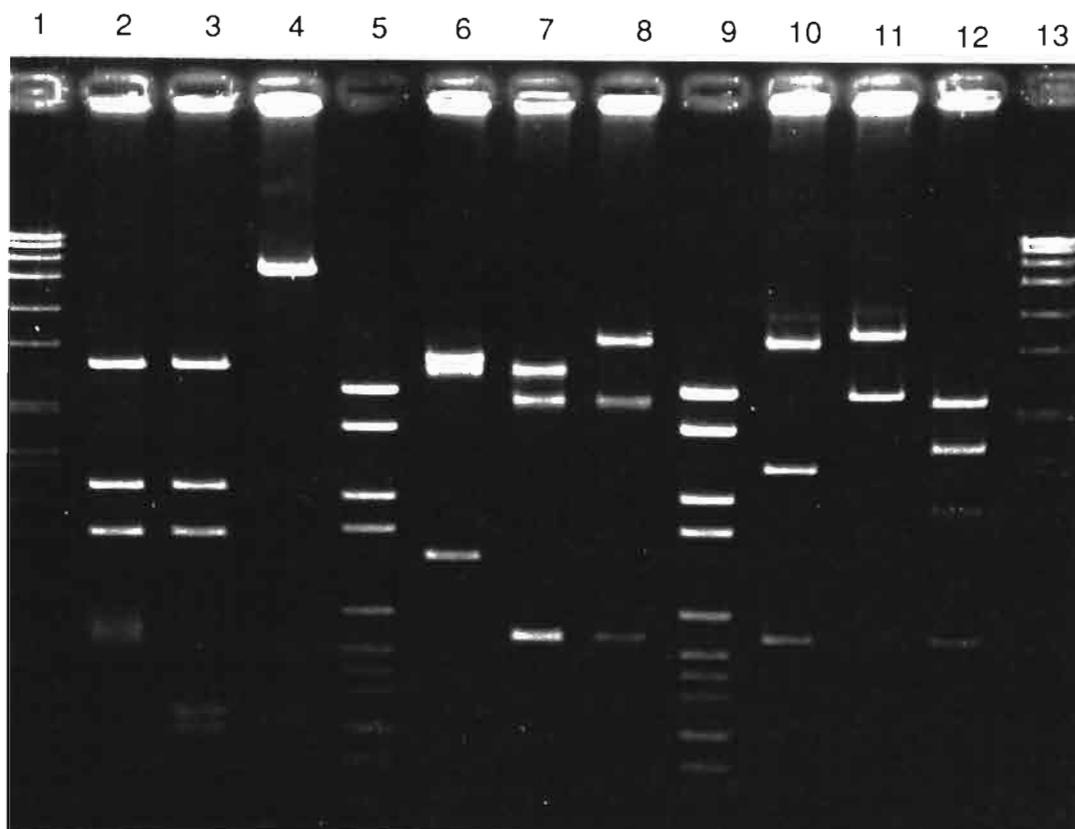
Sur les 37 enzymes utilisées, 21 seulement reconnaissent au moins un site de restriction sur le génome du *DsDNV*. Le nombre de fragments générés par ces enzymes varie de 2 à plus de 9 selon les enzymes utilisées. Les endonucléases *Cla* I et *Pst* I génèrent deux fragments; trois sont générés par *Asp* 700, *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* II, *Hpa* I, *Nco* I et *Nsi* I ; quatre par *Bcl* I, *Bgl* II, *Xba* I et *Spe* I ; cinq par *Hae* III et *Hha* I ; et six par *Sca* I. Les enzymes *Alu* I, *Hinf* I, *Dra* I, *Taq* I et *Sau* 3A génèrent chacune plus de 9 fragments de restriction dont certains de tailles inférieures à 100 pb.

Les 16 enzymes suivantes ne reconnaissent aucun site de restriction sur le génome : il s'agit d' *Ava* I, *Asp* 718, *Avi* II, *Bgl* I, *Bst* E II, *Dpn* I, *Eco* RV, *Hind* III, *Kpn* I, *Ksp* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Sal* I, *Sma* I, *Sph* I et *Xho* I.

Les tailles des différents fragments ajustées par rapport à celle de 5,95 kb estimée pour l'ADN natif sont mentionnées dans le Tableau 7. Les lettres A, B, C, D, E, F sont attribuées aux différents fragments dans l'ordre décroissant de leurs poids moléculaires, ainsi le fragment de 4300 pb et celui de 1650 pb générés par la digestion *Pst* I, seront appelés respectivement A et B.

#### b) Carte physique de restriction du génome

La carte physique du génome du *DsDNV* (Fig. 15) a été réalisée après digestions simples, doubles et partielles avec différentes enzymes de restriction. Nous avons ainsi positionné 41 sites de restriction générés par 16 enzymes le long du génome entier (Fig. 16). La molécule d'ADN du *DsDNV* a été orientée arbitrairement en positionnant le petit fragment de 1650 pb (fragment B), généré par la digestion du génome par *Pst* I, du côté gauche de la molécule et le grand fragment A de 4300 pb, du côté droit. Les autres sites de digestion ont été positionnés par rapport à cette orientation.



**Fig. 14 : Electrophorégramme en gel d'agarose 1,2 % des fragments de restriction de l'ADN du *DsDNV*.**

Pistes 1 et 13: marqueur VII \*

Piste 2 : digestion par *HhaI*

Piste 3 : double digestion par *HhaI-BamHI*

Piste 4 : digestion par *BamHI*

Pistes 5 et 9 : marqueur VI \*

Piste 6 : digestion par *EcoRI*

Piste 7 : double digestion par *EcoRI-SpeI*

Piste 8 : digestion par *SpeI*

Piste 10 : double digestion par *SpeI-HincII*

Piste 11 : digestion par *HincII*

Piste 12 : double digestion par *NsiI-ClaI*

\* Marqueur VI et marqueur VII (voir chap.III, Matériel et méthodes)

**Tableau 7 : Taille et nombre de fragments de l'ADN du *DsDNV* générés par différentes enzymes de restriction**

Taille des fragments (pb)							
Enzymes ↓	A	B	C	D	E	F	Total
<b>Cla I</b>	<b>3 800</b>	<b>2 150</b>					<b>5 950</b>
<b>Pst I</b>	<b>4 300</b>	<b>1 650</b>					
<b>Asp 700</b>	<b>2 450</b>	<b>2 000</b>	<b>1 500</b>				
<b>Bam HI</b>	<b>5 330</b>	<b>3 20</b>	<b>300</b>				
<b>Eco RI</b>	<b>2 600</b>	<b>2 450</b>	<b>900</b>				
<b>Hind II</b>	<b>3 150</b>	<b>2 200</b>	<b>600</b>				
<b>Hpa I</b>	<b>3 150</b>	<b>2 200</b>	<b>600</b>				
<b>Nco I</b>	<b>3 200</b>	<b>1 950</b>	<b>800</b>				
<b>Nsi I</b>	<b>2 600</b>	<b>2 200</b>	<b>1 150</b>				
<b>Bcl I</b>	<b>4 300</b>	<b>1 150</b>	<b>280</b>	<b>220</b>			
<b>Bgl II</b>	<b>2 150</b>	<b>2 000</b>	<b>1 350</b>	<b>450</b>			
<b>Xba I</b>	<b>2 450</b>	<b>2 000</b>	<b>850</b>	<b>650</b>			
<b>Spe I</b>	<b>3 050</b>	<b>2 080</b>	<b>540</b>	<b>280</b>			
<b>Hae III</b>	<b>1 600</b>	<b>1 450</b>	<b>1 250</b>	<b>1 170</b>	<b>480</b>		
<b>Hha I</b>	<b>2 500</b>	<b>1 300</b>	<b>1 000</b>	<b>600</b>	<b>550</b>		
<b>Sca I</b>	<b>3 750</b>	<b>1 100</b>	<b>680</b>	<b>170</b>	<b>130</b>	<b>120</b>	

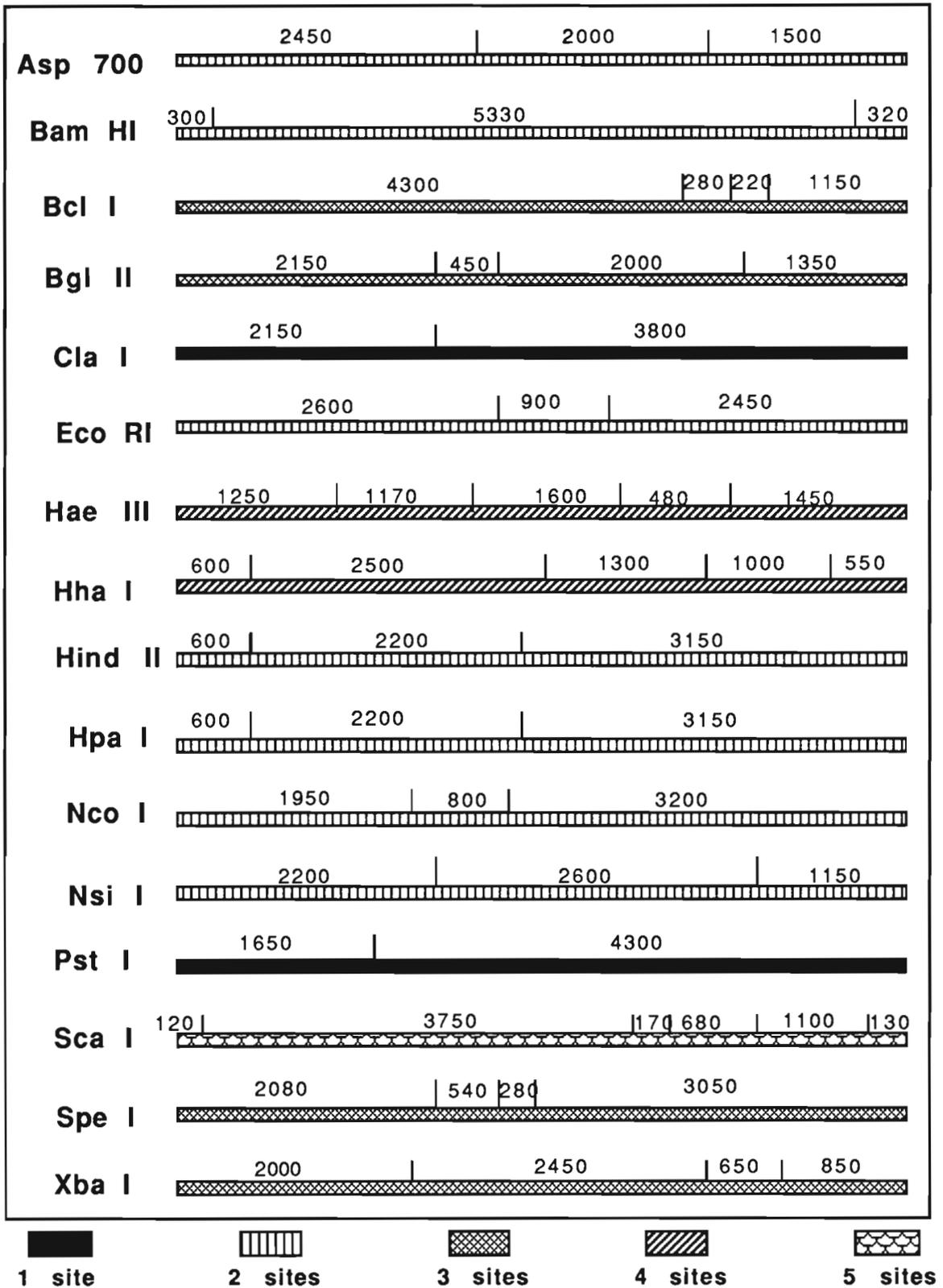


Fig. 15 : Cartographie Physique de restriction du *DsDNV*

Les bandes horizontales représentent la forme bicaténaire de l'ADN et les traits verticaux, les sites de restriction des enzymes. Les tailles qui sont affectées aux différents fragments sont exprimées en pb.

**Enzymes**      **Nb de sites**

<b>Asp 700</b>	<b>2</b>
<b>Bam HI</b>	<b>2</b>
<b>Bcl I</b>	<b>3</b>
<b>Bgl II</b>	<b>3</b>
<b>Cla I</b>	<b>1</b>
<b>Eco RI</b>	<b>2</b>
<b>Hae III</b>	<b>4</b>
<b>Hha I</b>	<b>4</b>
<b>Hind II</b>	<b>2</b>
<b>Hpa I</b>	<b>2</b>
<b>Nco I</b>	<b>2</b>
<b>Nsi I</b>	<b>2</b>
<b>Pst I</b>	<b>1</b>
<b>Sca I</b>	<b>5</b>
<b>Spe I</b>	<b>3</b>
<b>Xba I</b>	<b>3</b>

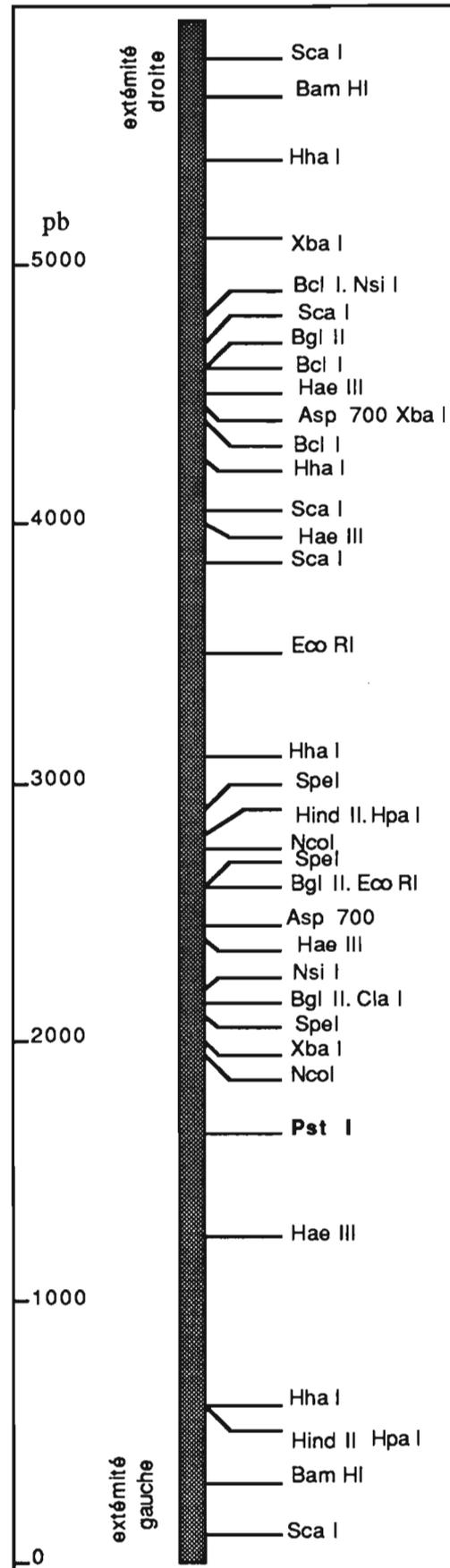


Figure 16 : Carte physique de restriction du génome de *DsDNV*

#### 4°) Etude d'homologie de séquence entre les génomes du *DsDNV* et du *CeDNV*

Les fragments de restriction *Hind* II, *Sca* I et *Bam* HI du génome du *DsDNV* ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose puis transférés par la technique de Southern sur une membrane de nylon chargée positivement. L'hybridation avec une sonde préparée à partir d'ADN total du densovirus de *C. extranea*, n'a révélé aucune homologie entre ces deux génomes.

#### C. Clonage du génome du *DsDNV*

Comme le montre nettement la carte physique de restriction du génome du *DsDNV* (Fig. 15 et 16), la présence de plusieurs sites *Sca*I, *Bam*HI, *Hha*I disposés de façon symétrique aux extrémités du génome suggère fortement l'existence de répétitions terminales inversées (ITR) comparables à celles connues chez les virus adénoassociés, le virus B19 (Samulsky *et al.*, 1983; Deiss *et al.*, 1990) et surtout chez le *JcDNV* (Jourdan *et al.*, 1990). Or ces ITRs sont susceptibles de former des structures en "épingle à cheveux" (voir chapitre II) rendant difficile le clonage du génome complet. Notre soucis au cours du clonage de ce génome a été de conserver intactes ces ITRs qui sont essentielles à l'infectiosité de la séquence virale clonée (Jourdan *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1983). Afin de concilier ces deux exigences contradictoires, nous avons cloné d'abord le grand fragment interne généré par la digestion du génome viral par l'enzyme *Bam*HI, puis dans un second temps, la totalité du génome.

##### 1°) Clonage du fragment interne *Bam*HI.

Nous avons inséré dans le plasmide pEMBL 19+ ouvert au site *Bam*HI du multisite, le fragment interne A du génome du *DsDNV* généré par la même enzyme (Fig. 15). Ce fragment possède une taille de 5330 pb, ce qui correspond à 90 % du génome entier. Le clonage, dont les différentes étapes sont décrites au chapitre III, est réalisé par la ligation de ces deux ADN dont les extrémités sont cohésives, puis transformation des bactéries compétentes de la souche JM 83 d'*E.coli*, et criblage des colonies bactériennes sur le milieu sélectif contenant de l'ampicilline et un mélange Xgal + IPTG.

Nous avons isolé 17 colonies recombinantes renfermant toutes des plasmides possédant une taille d'environ 9300 pb. Cette taille correspond à un plasmide pEMBL 19+ qui a inséré le fragment attendu. L'analyse plus détaillée de ces recombinants nous a permis de distinguer une insertion de ce fragment dans les deux sens. Les recombinants dont le petit fragment (B) généré par *Pst* I se trouve du côté de l'origine de répllication du plasmide seront nommés pDsBamA (Fig. 17) et ceux dont l'insert est dans le sens contraire, c'est à dire avec le fragment A de *Pst* I du coté de l'origine de répllication, seront appelés pDsBamA'. La digestion de ces deux types de plasmides par *Pst*I, doit générer normalement d'une part, les fragments de 1350 pb et 7950 pb pour le type A et d'autre part, les fragments de 4000 pb et 5300 pb pour le type A'.

**Fig. 17 : Schéma du plasmide recombinant pDsBamA**

P1 : fraction 1 du multisite, *HindIII-SphI-PstI-HindII-SalI-XbaI-BamHI*

P2 : Fraction 2 du multisite, *BamHI-AvaI-XmaI-SmaI-Asp718-KpnI-SacI-EcoRI*

L'ADN du *DsDNV* est délété par l'enzyme *BamHI* des fragments B et C situés aux extrémités et le fragment A est ensuite inséré au site homologue de pEMBL 19+.

Nous avons obtenu deux types de plasmides : pDsBamA et pDsBamA' possédant respectivement une insertion du fragment A (DsBamA) dans chaque sens (en prenant pour repère le site unique *PstI*). Le plasmide recombinant représenté sur cette figure 17, possède le site unique *PstI* de l'ADN du *DsDNV* du côté de l'origine de réplication de pEMBL19+. La digestion de ces deux types de plasmides par *Pst I* génère d'une part, les fragments de 1350 pb et 7950 pb pour pDsBamA et d'autre part, les fragments de 4000 pb et 5300 pb pour pDsBamA'. On remarque la conservation des sites *BamHI* à chaque extrémité de l'insert permettant de restituer le grand fragment interne A de *BamHI* après digestion avec cette enzyme.

**Fig. 18 : Profils électrophorétiques en gel d'agarose à 1,2% des fragments de restriction des plasmides recombinants pDsBamA et pDsBamA' après digestion avec les enzymes *BamHI* et *PstI*.**

Pistes 1 et 2 : Plasmides pDsBamA et pDsBamA' digérés par l'enzyme *BamHI*

Piste 3 : Plasmide pEMBL19+ linéarisé (3960 pb)

Piste 4 : Marqueur III \*

Piste 5 : Plasmide pDsBamA digéré par l'enzyme *Pst I*.

Piste 6 : Plasmide pDsBamA' digéré par l'enzyme *Pst I*.

A (DsBamA = 5330 pb), p (pEMBL 19+ linéarisé = 3960 pb)

\* Marqueur III (voir chap. III, Matériel et méthodes)

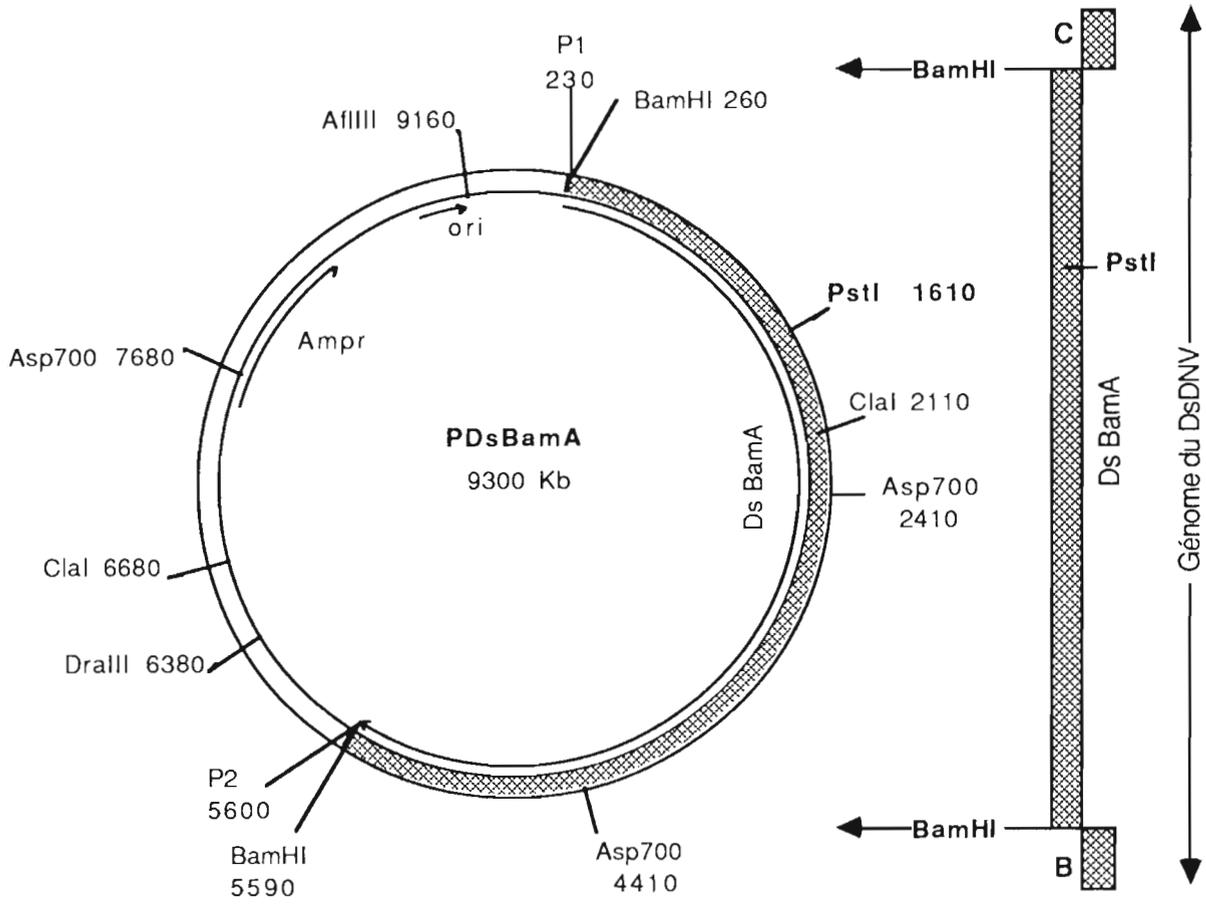


Fig. 17

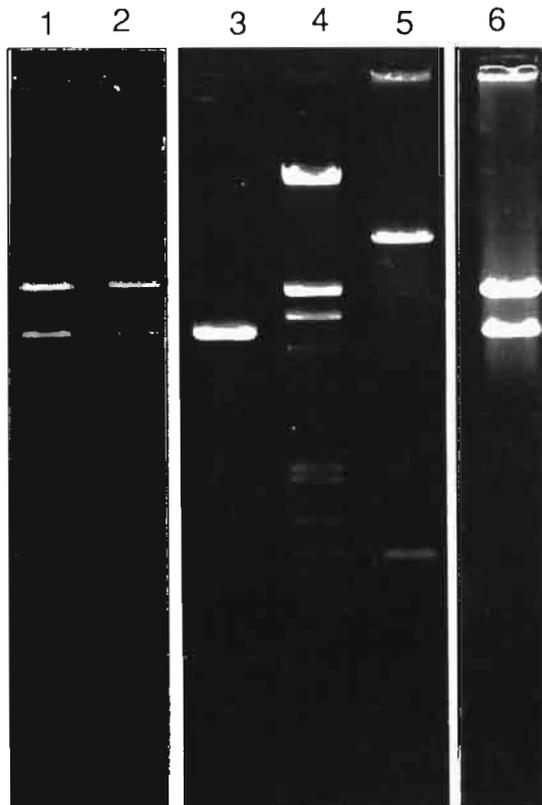


Fig. 18

Sur les 17 recombinants de taille attendue, nous en avons dénombré 15 de type A et 2 de type A'. La Fig. 17 montre les profils de restriction de deux plasmides recombinants de chaque type, digérés par *Bam*HI et *Pst* I. La digestion du recombinant de type A par *Pst* I (Fig. 18, piste 5), génère comme prévu deux fragments dont celui de 1350 pb correspond au petit fragment de *Pst* I, délété à son extrémité du fragment C (300 pb) de *Bam*HI, et l'autre de 7950 pb qui est composé du grand fragment de *Pst* I délété du fragment B (320 pb) de *Bam*HI et du pEMBL19+. La digestion par *Pst* I du type A' génère comme prévu et selon un schéma comparable au précédent, deux fragments de 4000 et 5300 pb. (Fig. 18, piste 6). La digestion par *Bam*HI (Fig. 18 pistes 1 et 2) quant à elle, permet d'exiser le fragment inséré. L'analyse par transfert selon Southern des fragments de restriction à l'aide d'une sonde préparée à partir du génome entier du *Ds*DNV a confirmé l'origine virale du fragment inséré.

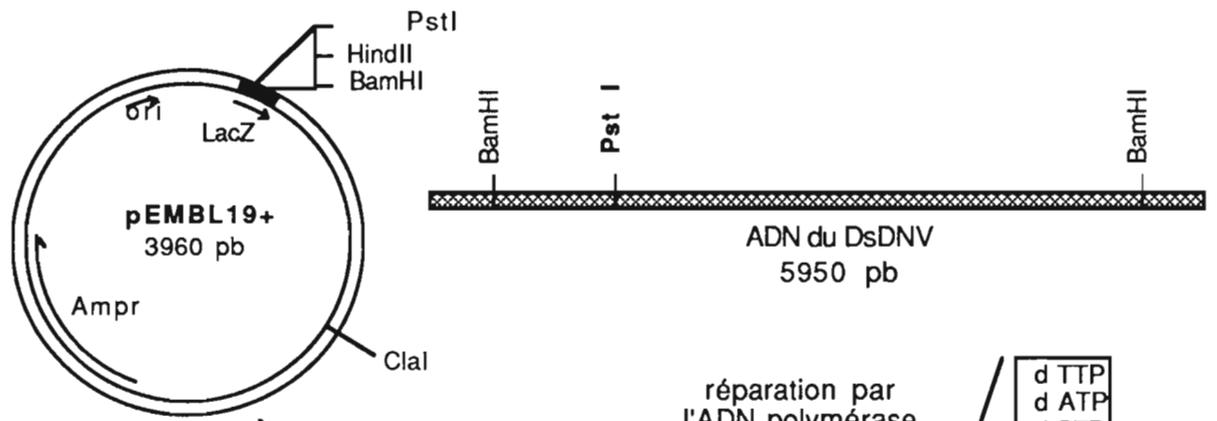
## 2°) Clonage du génome entier

Contrairement aux extrémités cohésives générées par la digestion de l'ADN viral par *Bam*HI, les extrémités de la forme bicaténaire du génome complet du *Ds*DNV sont incertaines. Pour favoriser l'insertion d'une séquence génomique complète, Nous avons d'abord procédé à une opération de réparation par remplissage des extrémités en utilisant le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Fig. 19). Cette opération a pour but d'obtenir un génome à extrémités franches que nous avons ensuite tenté d'insérer au site *Hind* II du multisite du pEMBL 19+ par ligation en présence de l'ADN ligase du bactériophage T4. La transformation des bactéries et la sélection des clones recombinants sont réalisées comme précédemment.

Sur les 120 colonies que nous avons sélectionnées et analysées, seules 4 possédaient des plasmides recombinants dont la taille de l'insert viral, comprise entre 5800 pb et 5900 pb représente respectivement 97 % et 99 % du génome total. Le reste des recombinants comportait des fragments de très petites tailles qui n'ont pas été pris en compte. Comme pour le clonage du fragment interne *Bam*HI, les digestions par *Pst*I nous ont servi non seulement à déterminer les deux orientations possibles d'insertion du génome viral dans le plasmide, mais aussi à déterminer et à comparer les tailles de ces fragments. Les tailles attendues des fragments *Pst*I des plasmides recombinants contenant le génome complet du *Ds*DNV inséré dans le sens A sont de 1650 pb et 8260 pb et dans le sens contraire, de 4300 pb et 5610 pb. La digestion par *Pst*I nous a permis d'isoler 3 plasmides recombinants de type A, nommés pDst4, pDst27, pDst50 et un seul de type A' nommé pDst9.

**Fig. 19 : Schéma de la stratégie de clonage du génome viral complet du *DsDNV***

Le plasmide est linéarisé par digestion avec l'enzyme de restriction *HincII*, puis déphosphorylé pour éviter la récircularisation de la molécule. Les extrémités de la molécule d'ADN viral sont réparées par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I afin d'avoir des extrémités franches. A une quantité de 100 ng de plasmide on additionne selon trois rapport différents (1 : 1, 1 : 2 ou 1 : 5 ) respectivement 100 ng; 200 ng et 500 ng d'ADN viral réparé, puis le mélange est incubé en présence de 1 U/ $\mu$ g de l'ADN ligase.T4. Après transformation, les bactéries compétentes de la souche JM 83 d'*E coli* sont ensemencées sur boîte de pétri contenant de l'ampicilline et le mélange Xgal + IPTG. Les clones recombinants sont sélectionnés par la résistance à l'ampicilline et la perte de l'activité  $\beta$  galactosidasique (colonies blanches). L'insertion de l'ADN dans les deux sens génère des recombinants de type A et A' (voir texte).



Digestion par l'enzyme HindII et déphosphorylation

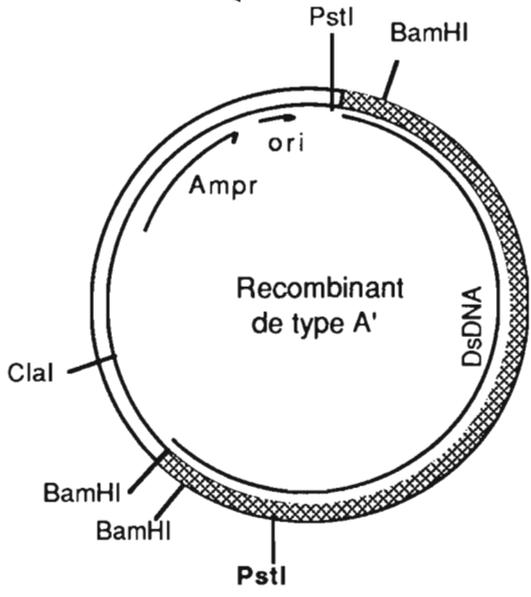
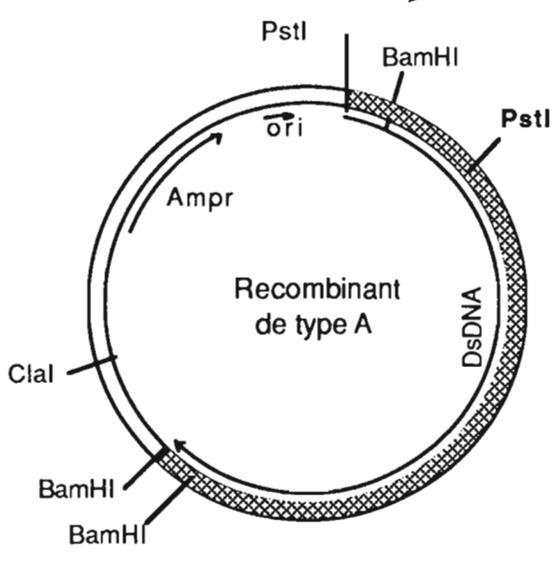
réparation par l'ADN polymérase (Enzyme de Klenow) +

d TTP
d ATP
d GTP
d CTP

Ligation puis transformation de bactéries JM83 compétentes, culture sur milieu agar contenant de l'ampicilline et Xgal + IPTG .

↓ ↓

Sélection des clones blancs.



Nous avons dans un premier temps comparé entre eux les recombinants de type A en analysant leurs profils de restriction après digestion par les enzymes *Pst*I, et la double digestion *Hind*III-*Sma*I qui permet de sortir l'insert viral du plasmide recombinant (Fig. 20). Aucune différence de taille ne peut être perçue entre les 3 inserts excisés par double digestion *Hind*III-*Sma*I et le génome natif (Fig. 20 pistes 2, 3, 4 et 5).

La digestion par *Pst* I nous a permis de comparer les tailles du petit fragment chez chacun d'eux. Ce fragment qui correspond en fait au fragment B de la digestion du génome du *Ds*DNV par *Pst* I (Tabl. 7; Fig. 15), présente chez ces trois recombinants des tailles différentes toutes plus petites que la taille attendue (Fig. 20 piste 9). La délétion de l'extrémité gauche est d'environ 150 pb pour l'insert du plasmide pDst4, d'environ 100 pb pour celui du pDst27 et d'environ 60 pb pour celui du pDst50 (Fig. 20 pistes 6, 7, 8).

L'insert viral du plasmide pDst9, le seul de type A' que nous avons obtenu, a été comparé à celui du plasmide pDst50 de type A. Les profils de digestion par l'enzyme *Sca*I (Fig. 21 pistes 1 et 2) sont très proches pour ces deux recombinants. Par contre, les profils de digestion par *Xba* I (Fig. 21, pistes 3 et 4 ; *Pst*I (Fig. 21 pistes 6 et 7) et *Cla*I (Fig. 21 pistes 8 et 9) sont très différents. L'analyse de ces profils notamment l'estimation de la taille des fragments de restriction correspondant aux extrémités, permet de conclure que des délétions sont intervenues aux deux extrémités de l'insert génomique chez le plasmide pDst9. D'autres digestions ont permis d'estimer la taille approximative de ces délétions entre 60 et 150 pb selon le plasmide (cf. Tableau 8). Les plasmides recombinants pDst50 et pDst9 sont schématisés (Fig. 22). Le plasmide dont la taille de l'insert viral se rapproche le plus possible de celle du génome viral complet est le pDst50. Un intérêt particulier a été porté à ce plasmide dans les travaux présentés ci - dessous.

**Tableau 8 : Caractéristiques des plasmides recombinants de type A et A'**

Plasmide	Taille de l'insert viral (1)	Délétion extrémité gauche (1)	Délétion extrémité droite (1)	Type de plasmide
pDst50	5890	60	non détectable	A
pDst27	5850	100	non détectable	A
pDst4	5800	150	non détectable	A
pDst9	5830	60	60	A'

(1) Les tailles sont exprimées en paires de bases.

**Fig. 20 : Profils électrophorétiques des fragments de restriction des plasmides recombinants de type A contenant un insert viral de la taille du génome entier du *DsDNV*.**

Piste 1 : Marqueur VII \*

Pistes 2, 3, 4 : Plasmides pDst4, pDst27, pDst50 après double digestion par les enzymes *Hind*III et *Sma* I.

Piste 5 : génome natif du *DsDNV* (5950 pb)

Pistes 6, 7, 8, 9 : Plasmides pDst4, pDst27, pDst50 et génome du *DsDNV* digérés par l'enzyme *Pst* I.

**Fig. 21 : Comparaison des profils électrophorétiques des fragments de restriction des recombinants pDst50 (type A) et pDst9 (type A').**

Pistes 1 et 2 : pDst50 et pDst9 après digestions par l'enzyme *Sca* I.

Pistes 3 et 4 : " " digérés par l'enzyme *Xba* I

Pistes 6 et 7 : " " digérés par l'enzyme *Pst* I

Pistes 8 et 9 : " " digérés par l'enzyme *Cla* I

Piste 5 : Marqueur VII\*

\* Marqueur VII (cf. chap.III, Matériel et méthodes)

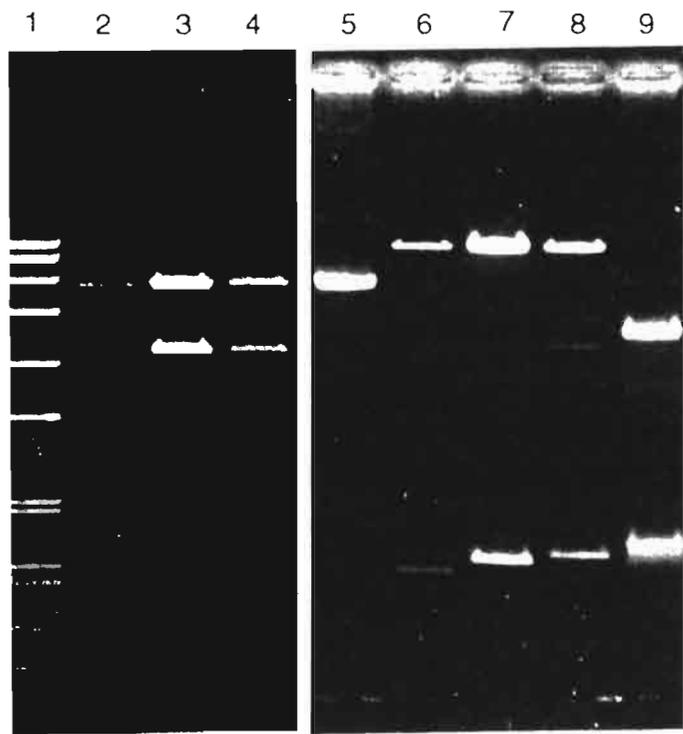


Fig. 20

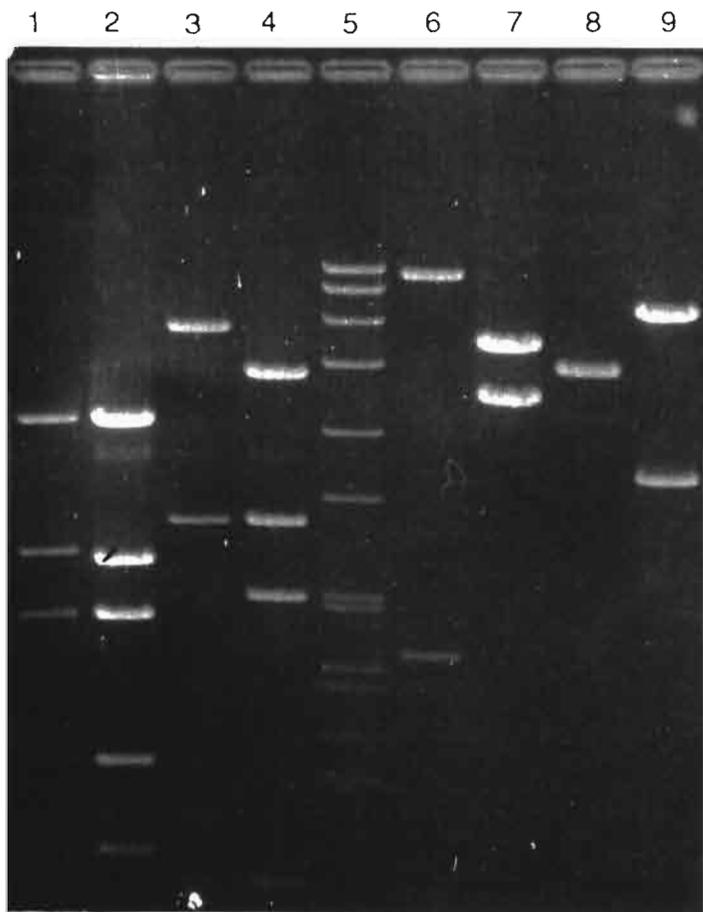
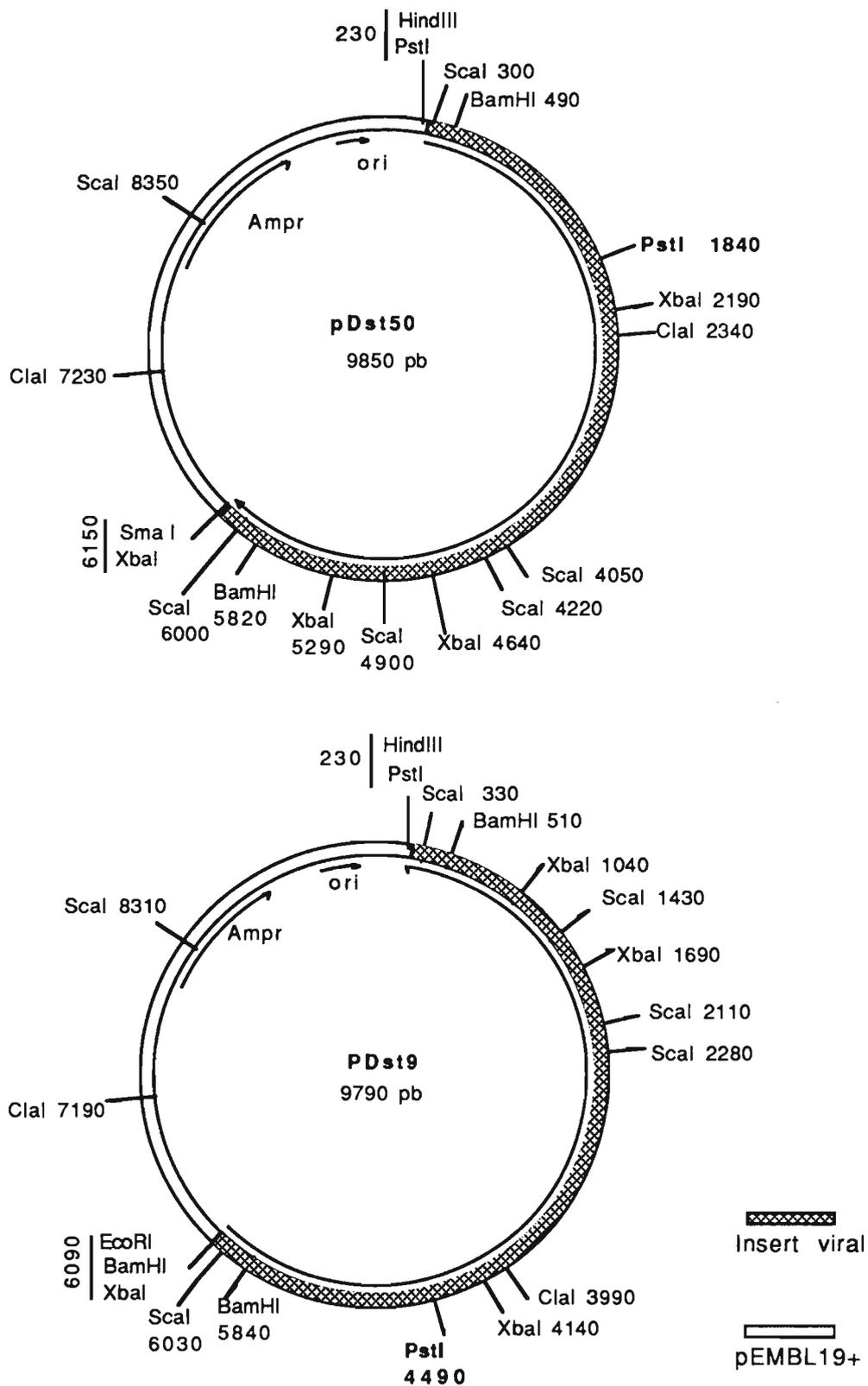


Fig. 21



**Fig. 22 : Schéma des plasmides pDst50 et pDst9 .**

Dans le plasmide pDst50, le génome du DsDNV est inséré avec son site unique *Pst*I du côté de l'origine de réplcation du pEMBL 19+ (recombinant de type A). L'insert viral du plasmide pDst9 est en orientation inverse (recombinant de type A'). La différence de taille entre les 2 plasmides résulte d'une délétion de 60 pb de la séquence de l'extrémité droite de l'insert viral dans le plasmide pDst9.

### III. Recherche de systèmes permissifs à la transfection

#### A. Introduction

Comme il a été rappelé au chapitre II, des travaux récents ont révélé la possibilité de transfection de lignées cellulaires établies par l'ADN isolé de densovirus ou par des plasmides recombinants contenant le génome viral. Ne disposant pas de lignée cellulaire de *D. saccharalis*, et notre élevage de cet insecte ayant été anéanti par le *DsDNV*, il était nécessaire, pour tester le pouvoir transfectant des plasmides recombinants obtenus, de rechercher des lignées cellulaires et des hôtes de substitution, sensibles au *DsDNV*. Différentes techniques de transfection ont été utilisées dans cette recherche, en particulier la technique de lipofection (DOTAP ou DOTMA) selon Li *et al.*, (1990) pour les systèmes cellulaires et la précipitation au DEAE dextrane pour la transfection des larves (voir chapitre III).

#### B. Lignée cellulaire permissive

Le plasmide recombinant pDst50 qui contient la presque totalité du génome du *DsDNV* a été utilisé pour les essais de transfection de six lignées cellulaires de lépidoptères :

- la lignée cellulaire BCIRL-Px2-HNU3 de *Plutella xylostella* (Chen *et al.*, 1983) désignée Px
- La ligné de SPC-SL 52 de *Spodoptera littoralis* (Mialhe *et al.*, 1984), désignée SL 52
- la lignée SPC-PL 65 d'hémocytes de *S. litura* (Quiot, non publié), désignée PL 65
- la lignée IPLB-Sf 9 de tissu ovarien de *S. frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977), désignée Sf9
- la lignée SPC-Bm 36 d'ovaires de nymphes de *Bombyx mori* (Quiot, 1982), désignée Bm 36
- la lignée SPC-Gm 17 de *Galleria mellonella* (Quiot, non publié), désignée Gm 17

Parmi ces 6 lignées, seule la lignée BCIRL-Px2-HNU3 de *P. Xylostella* (Px) s'est avérée sensible à la transfection par l'ADN viral du *DsDNV*. Lorsque les cellules ont atteint un degré de confluence de 60 à 80 %, la transfection est réalisée avec un volume de 2 ml de milieu sans sérum contenant 10 µg d'ADN et 25 µg de DOTMA (ou de DOTAP) par cupule, dans des boîtes de culture à 6 cupules. La détection des antigènes viraux (Fig. 23) est faite après 5 jours de transfection par la technique d'immunofluorescence utilisant un immunsérum anti-virions du *DsDNV*. Cette technique permet de visualiser les noyaux denses des cellules infectées.

#### C. Optimisation du taux de transfection

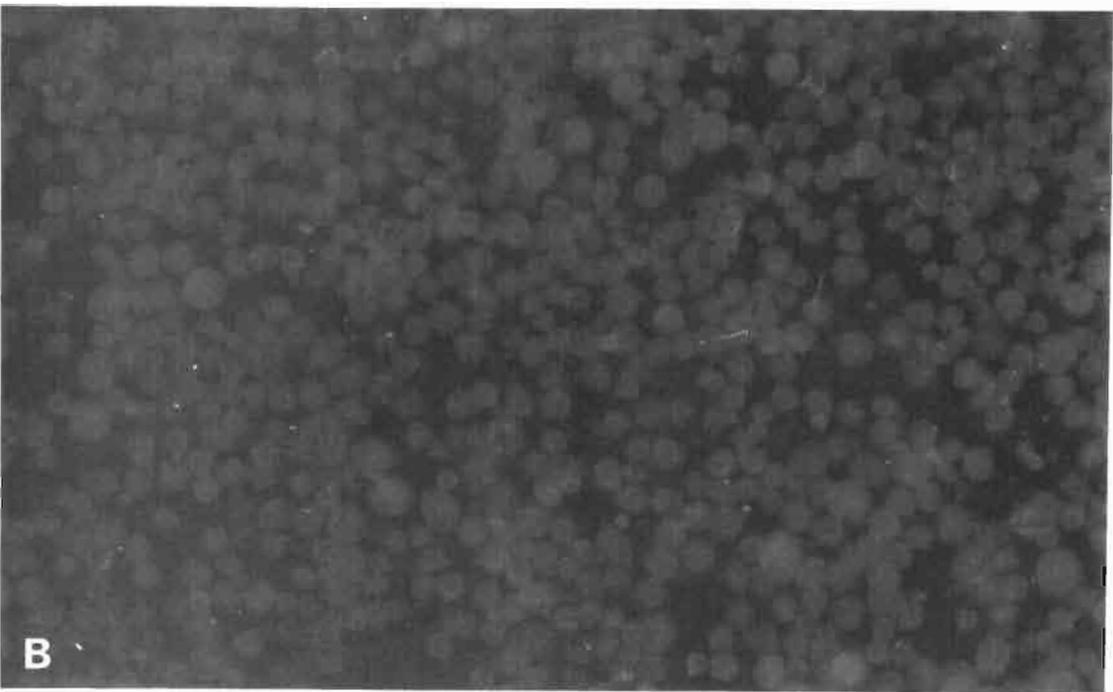
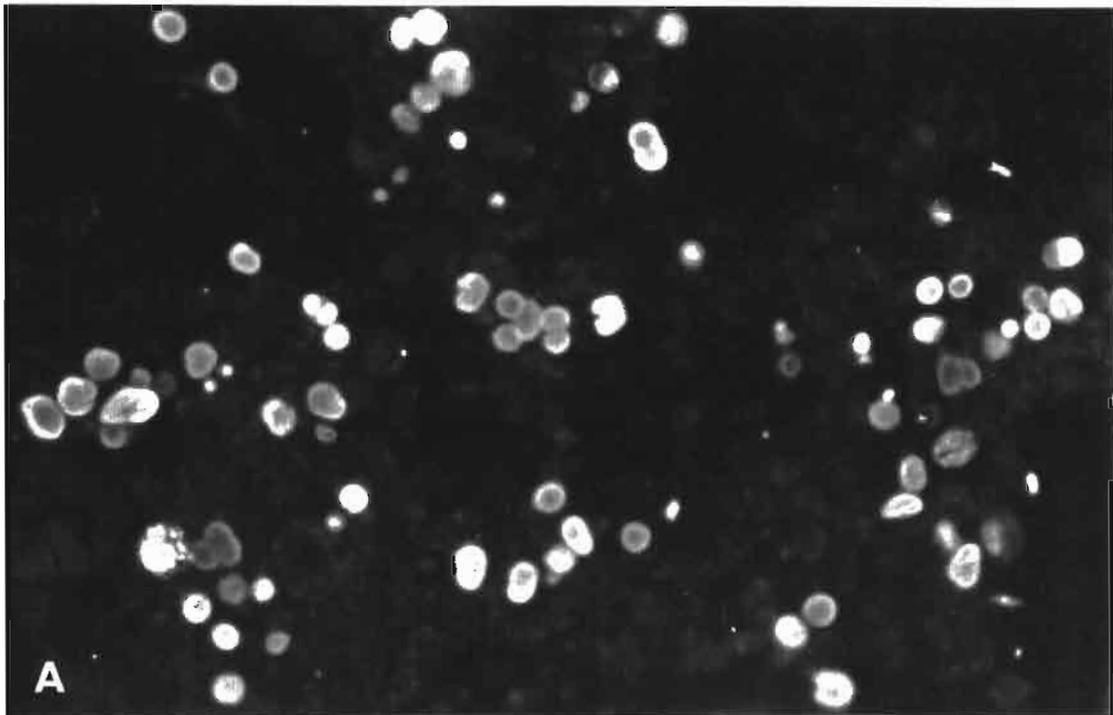
Compte tenu du taux relativement faible de cellules transfectées (cellules exprimant les antigènes viraux) par le plasmide pDst50 (moins de 15%) dans les premiers essais, nous avons tenté d'améliorer le système en faisant varier successivement quelques paramètres importants. Ainsi nous avons fait varier le temps de contact du complexe ADN - liposomes avec la culture cellulaire, de 6 à 24 heures et nous avons utilisé des quantités suivantes d'ADN : 5 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg et 30 µg ) par puits de boîtes de culture à 6 cupules (volume de l'inoculum = 2 ml)

Nous avons également fait varier le rapport des quantités d'ADN et de liposomes (DOTMA ou DOTAP) de 0,5 à 3. De plus, différents milieux sans sérum ont été testés pour la préparation de l'inoculum de transfection. Il ressort de tous ces essais, que les conditions optimales pour la transfection de la lignée Px par l'ADN du plasmide recombinant pDst50, sont les suivantes :

- le milieu de transfection est soit le milieu TG1 soit le milieu de culture BM25 sans sérum, utilisé pour la multiplication de la lignée cellulaire (Quiot, communication personnelle)
- la quantité d'ADN est de 20 µg / cupule (boîte à 6 cupules)
- le rapport ADN / liposome est de 1,5
- le temps de contact inoculum - cellules est de 8 heures. Une augmentation significative du taux de cellules exprimant les antigènes viraux est obtenue dans ces conditions, toutefois celui-ci ne dépasse pas 20% des cellules.

#### D. Comparaison du pouvoir transfectant des différents plasmides recombinants

Nous avons comparé l'aptitude des différents plasmides recombinants obtenus, à transférer la lignée cellulaire Px. En utilisant les conditions optimales de transfection indiquées plus haut, nous avons réalisé des transfections à l'aide de plasmides pDst27, pDst4, pDst9 et pDsBamA, le plasmide pDst50 servant de référence. Les taux de transfection des cellules ont été comparés dans chaque cas à ceux obtenus par transfection de la lignée cellulaire SL 52 de *S. littoralis* avec l'ADN viral du JcDNV et le plasmide recombinant pBRJH contenant la séquence complète du génome de ce virus (Rolling, 1992). En effet lors des différent test, la lignée Px s'est révélée également sensible à la transfection par le pBRJH. La révélation des cellules transfectées est faite comme précédemment par immunofluorescence en utilisant un immunosérum anti-virions spécifique. Les plasmides recombinants contenant la quasi-totalité du génome du DsDNV ainsi que l'ADN viral, génèrent un taux d'infection dans la lignée Px d'environ 20%, correspondant à moins de la moitié de celui provoqué par pBRJH dans les deux lignées cellulaires (50% environ). Même s'il n'existe aucune différence significative du taux de transfection entre les 5 plasmides, les réponses aux transfection du plasmide pDsBamA est généralement plus faible, les cellules ne présentant qu'une fluorescence discrète (cf. Tableau 9).



**Fig. 23 : Détection des antigènes viraux dans les cellules BCIRL-Px2-HNU3 transfectées par le plasmide pDst50 .**

La détection des antigènes viraux est faite 5 jours post-transfection par la technique d'immunofluorescence en utilisant des anticorps anti-virions du *DsDNV*. Cette technique permet de visualiser les noyaux denses des cellules infectées qui fluorescent.

A : Cellules transfectées

B : Cellules saines

**Tableau 9 : Cultures cellulaires transfectées par les différents ADN (détection par immunofluorescence utilisant des immunosérums spécifiques)**

Plasmides lignées cel.	pDst50	pDst27	pDst4	pDst9	pDsBamA	ADN Ds DNV	pBRJH
SPC-SI 52	-	-	-	-	-	-	++++
BCIRL- Px-HNU3	++	++	++	++	+	++	++++

Le pourcentage des cellules fluorescentes a été estimé par rapport à celui de 50% obtenu avec la transfection de la lignée cellulaire SPC-SL 52 par pBRJ (Li *et al.*, 1991).

Après transfection, les cellules ont été broyées et toutes les suspensions ont été observées en microscopie électronique. Les cellules Px et SL 52 transfectées par pBRJH contiennent des virions. Il est de même pour la lignée Px transfectée par l'ADN viral du DsDNV et par les plasmides recombinants pDst50, pDst27, pDst4 et pDst9. Par contre, nous n'avons pas observé de virion dans les broyats de cellules transfectées par le plasmide pDsBamA. D'après nos estimations, l'insert viral de ce plasmide délété aux deux extrémités de plus de 300 pb (cf. Tableau 8) ne peut pas se répliquer mais exprime cependant des protéines de capsides révélées par les anticorps anti-virions du DsDNV. Des travaux antérieurs sur l'ADN du JcDNV cloné ont montré qu'une délétion de cet ordre aux extrémités de la séquence virale, abolissait sa capacité de se répliquer et de générer une infection (Jourdan *et al.*, 1990).

#### E. Essais de transfection de différentes larves de lépidoptères.

La transfection des différentes larves de lépidoptères a été réalisée avec le plasmide pDst50, dont on savait qu'il pouvait générer une infection en système cellulaire. Des larves de *D. saccharalis*, *C. sacchariphagus*, *S. littoralis* et *G. mellonella* ont reçu par injection, une dose correspondant à 1,5 µg d'ADN plasmidique. Dans chaque cas un témoin de transfection a été réalisé dans les mêmes conditions avec de l'ADN viral. Seules les larves de *D. saccharalis*, l'insecte hôte du DsDNV, se sont révélées sensibles à la transfection par le plasmide et l'ADN viral. Dans tous les autres cas l'essai a été négatif.

## IV. Construction de génomes chimères *DsDNV* - *JcDNV*

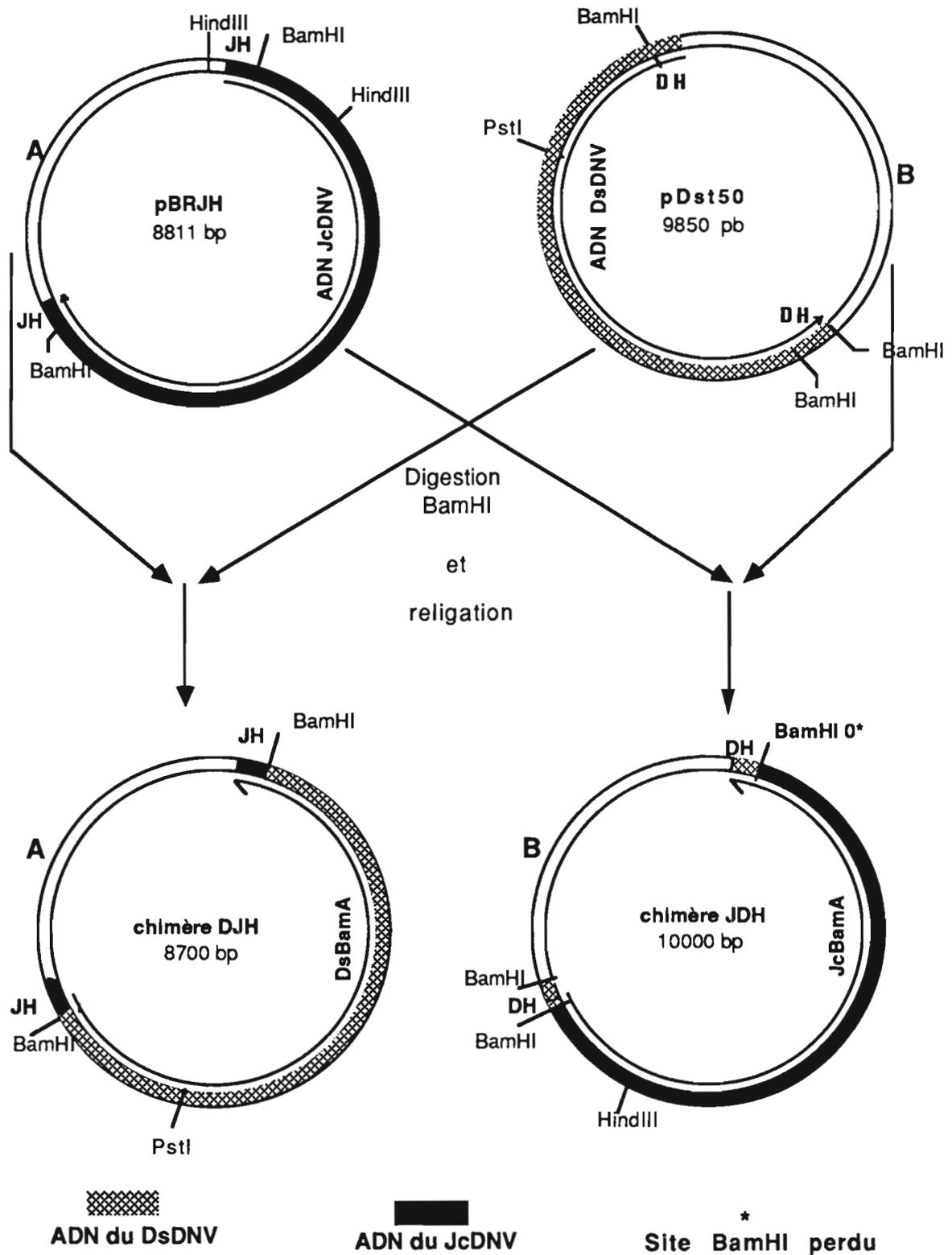
### A. Problématique

Nous disposons de deux génomes de densovirus clonés, celui du *JcDNV* (plasmide pBRJH) et celui du *DsDNV* (Plasmide pDst50), tous deux capables de transfecter les cellules de la lignée Px et de générer une infection typique. Il nous a donc paru intéressant de construire des génomes chimères par échange de segments homologues. En effet, la carte de restriction du génome du *DsDNV*, indique l'existence de deux sites *Bam*HI en position symétrique aux deux extrémités de la molécule (cf. Fig. 15). Or, ces mêmes sites existent à des positions semblables sur le génome du *JcDNV* (Fig. 24). Chez ce dernier, on sait que ces sites sont localisés dans la longue répétition terminale inversée (ITR), en amont des séquences codantes. Sans connaître la séquence du *DsDNV*, mais sachant que son génome présente de fortes homologues avec celui du *JcDNV* (travail de thèse de C. Cavalarro) nous avons pensé qu'il était possible d'échanger son grand fragment interne *Bam*HI par celui du *JcDNV* et inversement, d'insérer ce dernier entre les ITRs du *DsDNV*. Etant donné le rôle essentiel d'origine de la réplication attribué aux ITR des AAV et également à celles du *JcDNV* (voir chap. II), la construction de ces génomes chimères nous permettra de démontrer, en cas de succès, la capacité de l'origine de réplication de l'un des deux virus d'être fonctionnelle pour l'autre. Ces génomes chimères devraient permettre également de déterminer si les ITRs sont impliqués dans la spécificité d'hôte.

### B. Obtention de plasmides chimères

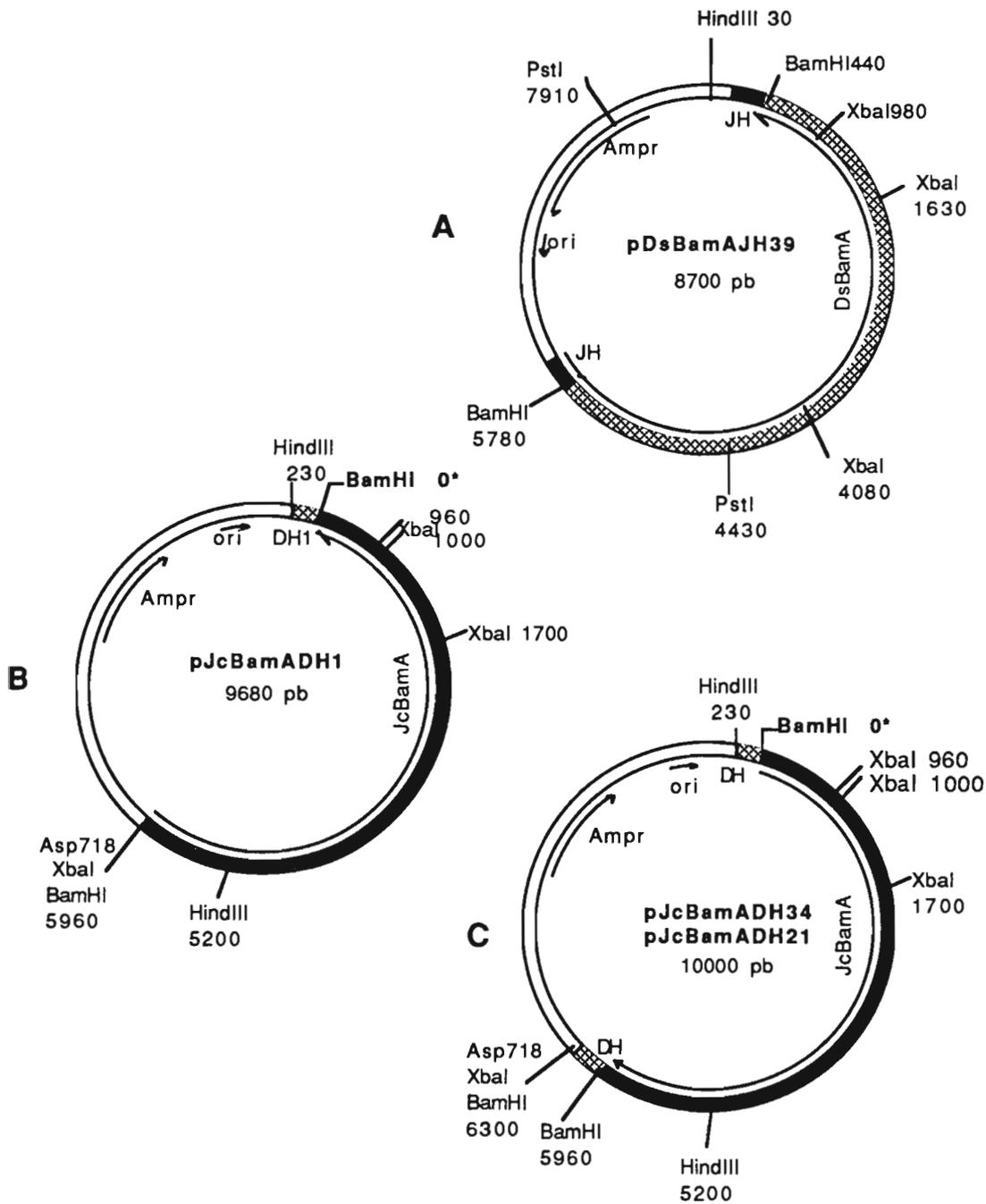
#### 1°) Construction des plasmides chimères pDsBamAJH et pJcBamADH

La digestion des plasmides pBRJH et pDst50 par l'endonucléase *Bam*HI génère dans chaque cas comme exposé plus haut, un grand fragment interne, appelé respectivement JcBamA et DsBamA de même taille. La construction de plasmides chimères a été réalisée par substitution du fragments A de l'un des plasmides par le fragment homologue de l'autre plasmide et réciproquement (Fig. 24). Le protocole que nous avons suivi est le suivant : digestion par *Bam*HI des deux plasmides, insertion des fragments A homologues, ligation et transformation des bactéries JM83. Le criblage des recombinants nous a permis d'obtenir dans un premier temps deux types de plasmides chimères dont le premier est composé d'un recombinant possédant un insert viral comportant le fragment DsBamA dans le sens A flanqué des deux extrémités du génome du *JcDNV* que nous avons nommé pDsBamAJH39 (Fig. 25). Le deuxième type comprend un plasmide recombinant dont l'insert viral est composé de fragment JcBamA dans le sens inverse de sa position dans pBRJH, flanqué d'une seule extrémité du génome du *DsDNV* (DH). En effet la présence dans le plasmide pDst50 d'un site *Bam*HI dans la séquence plasmidique a conduit à la délétion d'une extrémité du génome.



**Fig. 24 : Protocole d'obtention des plasmides chimères**

On obtient des chimères viraux ayant le fragment interne BamA de l'un des génomes, flanqué des extrémités de l'autre. (\* BamHI 0 : site BamHI perdu)



**Fig. 25 : Schéma des plasmides recombinants chimères dont les inserts viraux sont constitués du fragment DsBamA ou du JcBamA flanqué de l'une ou des deux extrémités de l'ADN du DsDNV ou du JcDNV.**

A : pDsBamAJH39 , possède un insert viral composé du fragment DsBamA flanqué des ITRs (JH) de l'ADN du JcDNV

B : pJcBamADH1 possède un insert viral composé du fragment JcBamA flanqué d'une seule extrémité (DH1) de l'ADN du DsDNV.

C : pJcBamADH34 et pJcBamADH21, possèdent un insert viral composé du fragment JcBamA flanqué des deux extrémités (DH) de l'ADN du DsDNV. Ces deux plasmides diffèrent par le sens d'insertion de l'extrémité de droite.

(BamHI 0 représente le site BamHI perdu au cours de la ligation)

Nous avons obtenu des recombinants dont l'insert viral est composé du fragment JcBamA flanqué des deux extrémités terminales du génome du *DsDNV*. Sur les 53 plasmides chimères possédant les deux extrémités, 42 ont inséré une seule copie de l'extrémité que nous avons restaurée, 9 ont insérés 2 copies et enfin 2 auraient inséré 3 copies. Parmi les plasmides ne possédant qu'une copie de l'extrémité droite, les pourcentages d'insertion dans chacune des deux orientations sont les mêmes. Nous avons retenu parmi tous ces plasmides chimères obtenus, cinq chimères qui diffèrent les uns des autres soit par le sens d'insertion soit par le nombre de copies de l'extrémité de droite insérées. Ainsi, le pDsBamAJH39 (Fig. 25 A) possède le fragment interne de l'ADN du *DsDNV* et les deux extrémités de l'ADN du *JcDNV*. Le pJcBamADH1 (Fig. 25 B) possède le fragment interne de l'ADN du *JcDNV* et une seule extrémité du génome de *DsDNV*. pJcBamADH21 et pJcBamADH34 (Fig. 25 C) diffèrent du précédent par la présence de la deuxième extrémité. Cette extrémité chez ces deux plasmides étant dans le sens contraire. Enfin le pJcBamADH11 possède une copie de l'extrémité gauche et posséderait trois copies de l'extrémité droite restaurée. Nous avons comparé les profils de restriction de tous les plasmides chimères obtenus à ceux des plasmides receveurs et nous avons résumé leurs caractéristiques dans le Tableau 10.

**Tableau 10 : Caractéristiques des plasmides receveurs et des chimères obtenus**

Plasmides recombinants	Insert viral (pb)	Fragment BamA	Extrémité gauche	Extrémité droite
pDst50 **	5890	DsBamA	DH(+)	DH(+)
pBRJH **	5908	JcBamA	JH(+)	JH(+)
pDsBamAJH39 **	5850	DsBamA	JH(+)	JH(+)
pJcBamADH1**	5720	JcBamA	DH(+)	Non
pJcBamADH34 **	6050	JcBamA	DH(+)	DH(+)
pJcBamADH21 *	6050	JcBamA	DH(+)	DH(-)
pJcBamADH11 *	6675	JcBamA	DH(+)	3 DH (?)

(+) et (-) sont les différents sens d'insertion des extrémités, \* Plasmides testés par transfection de cultures cellulaires; \*\* Plasmides testés par transfection de cultures cellulaires et de larves

## 2°) Transfection des lignées cellulaires

Nous avons transfecté les deux lignées cellulaires, SL 52 de *S. littoralis* sensible au *JcDNV* et la lignée Px sensible au *JcDNV* et au *DsDNV* par les plasmides chimères. Nous avons obtenu les résultats suivants : les génomes des plasmides pDsBamAJH39 et pDst50 s'expriment dans la lignée Px, les plasmides pJcBamADH1, pJcBamADH34, pJcBamADH21, pJcBamADH11 qui possèdent tous le fragment JcBamA flanqué par une ou les deux extrémités de l'ADN du *DsDNV* s'expriment dans les deux lignées transfectées comme le plasmide pBRJH. L'expression virale a été détectée par la technique d'immunofluorescence en utilisant les anticorps anti-virions du *DsDNV* et du *JcDNV*. Des résultats identiques ont été obtenus par transfection de ces mêmes lignées cellulaires par les génomes viraux du *DsDNV* et du *JcDNV* ou par les plasmides recombinants possédant ces génomes. Nous n'avons pas observé de différence significative dans les taux de transfection selon les plasmides utilisés.

## 3°) Transfection des larves

### a) Obtention des virions

Compte tenu des taux de transfection relativement faibles dans les cultures cellulaires, nous avons envisagé la production de virions chimères à partir des larves hôtes. Comme nous ne disposons pas de larves de *D. saccharalis*, nous avons transfecté les larves de *S. littoralis* à l'aide des mêmes plasmides chimères et des deux plasmides ayant servi à leur construction. Comme pour les transfections des cellules SL 52 (voir Tableau 9), nous n'avons aucune expression des chimères possédant le fragment interne DsBamA, quelle que soit l'origine des extrémités. Par contre, nous avons obtenu des virions en transfectant les larves de *S. littoralis* par les plasmides pBRJH, pJcBamADH1 et pJcBamADH34 (voir caractéristiques des plasmides, Tableau 10). L'observation de ces virions au microscope électronique ne montre aucune différence entre les virions chimères et les virions sauvages du *JcDNV*. Les génomes viraux de ces recombinants ont été extraits, comparés entre eux en gel d'agarose, puis aux génomes sauvages du *DsDNV* et du *JcDNV* (Fig. 26)

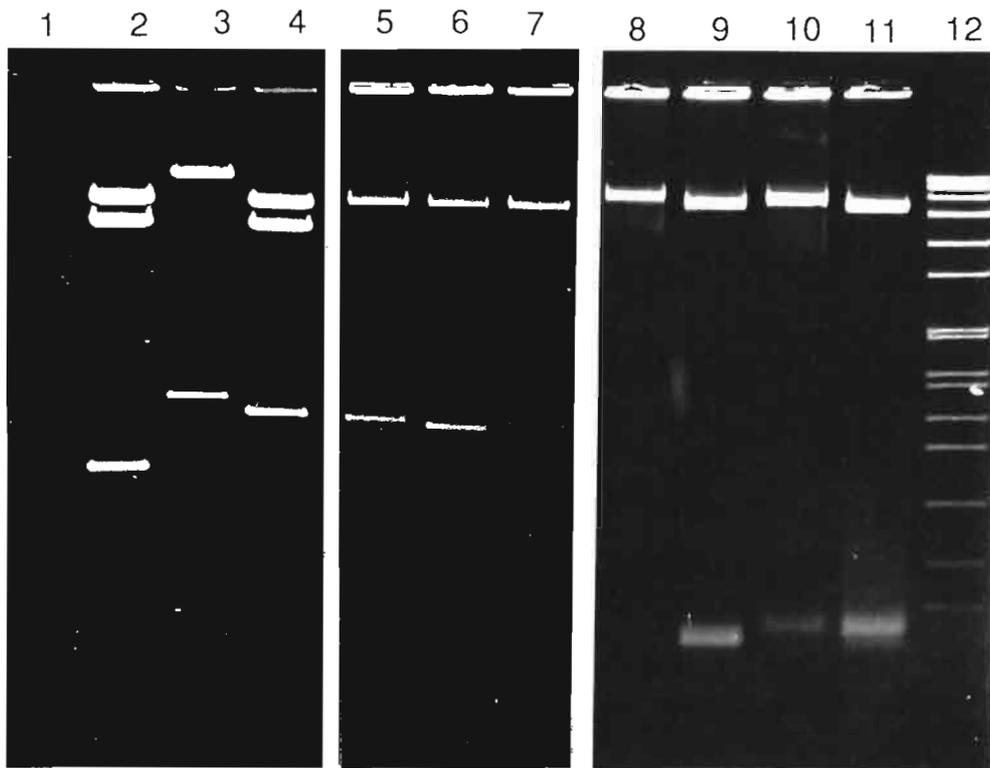
### b) Analyse des génomes viraux

Les profils de digestion des ADN extraits des virions par les enzymes *HindIII* et *BamHI* (Fig. 26 pistes 5, 6, 7 et 8, 9, 10, 11) permettent de comparer la taille des extrémités des génomes. En parallèle les digestions par la paire d'enzymes *HindIII* / *Asp718* des plasmides transfectants (Fig. 26 pistes 2, 3, 4) qui libèrent les inserts viraux et les fragments *HindIII* de l'ADN du *JcDNV* ont été faites. La taille du petit fragment *HindIII* chez pJcBamADH1 diffère de celle des autres plasmides par une délétion de 320 pb dans l'ITR.

Au contraire, les tailles des fragments *HindIII* chez l'ADN des virions chimères sont identiques (Fig. 26 pistes 5 et 7) alors qu'elles diffèrent de 320 pb dans les plasmides chimères transfectants (Fig. 26 pistes 2 et 4). Cette étude montre que le génome des virions issus de la transfection par le plasmide chimère pJcBamADH34 est formé par un grand fragment interne de type *JcDNV* et des deux extrémités de type *DsDNV* (Fig. 26 pistes 9, 10 et 11).

La digestion *HindIII* (Fig. 26 pistes 2, 3, 4 puis 5, 6 et 7) indique par ailleurs que le génome des virus provenant de la transfection par le plasmide chimère pJcBamADH1 a récupéré l'extrémité de droite par un processus de réparation utilisant comme matrice, l'extrémité unique de gauche du plasmide transfectant.

Ces résultats montrent que les ITRs du génome du *DsDNV* ont servi à la réplication du génome du *JcDNV*. De plus, la présence d'une seule extrémité suffit à la réplication du génome et à la formation de virions avec intervention du phénomène de réparation des "Hairpins".



**Fig. 26 : Comparaison des profils de restriction de l'insert viral des plasmides chimères et des génomes des virions chimères, digérés par les enzymes *Hind* III, *Bam*HI, et la paire d'enzymes *Hind*III / *Asp*718**

Pistes 1 et 12 : Marqueur VII \*

Pistes 2, 3 et 4 : Double digestion par *Asp*718 et *Hind*III des plasmides pDsBamADH1 (2), pBRJH (2) et pJcBamADH34 (4).

Pistes 5, 6 et 7 : Digestion par *Hind*III de l'ADN des virions chimères issus de la transfection des larves par les plasmides pDsBamADH1 (5), pBRJH (6) et pJcBamADH34 (7).

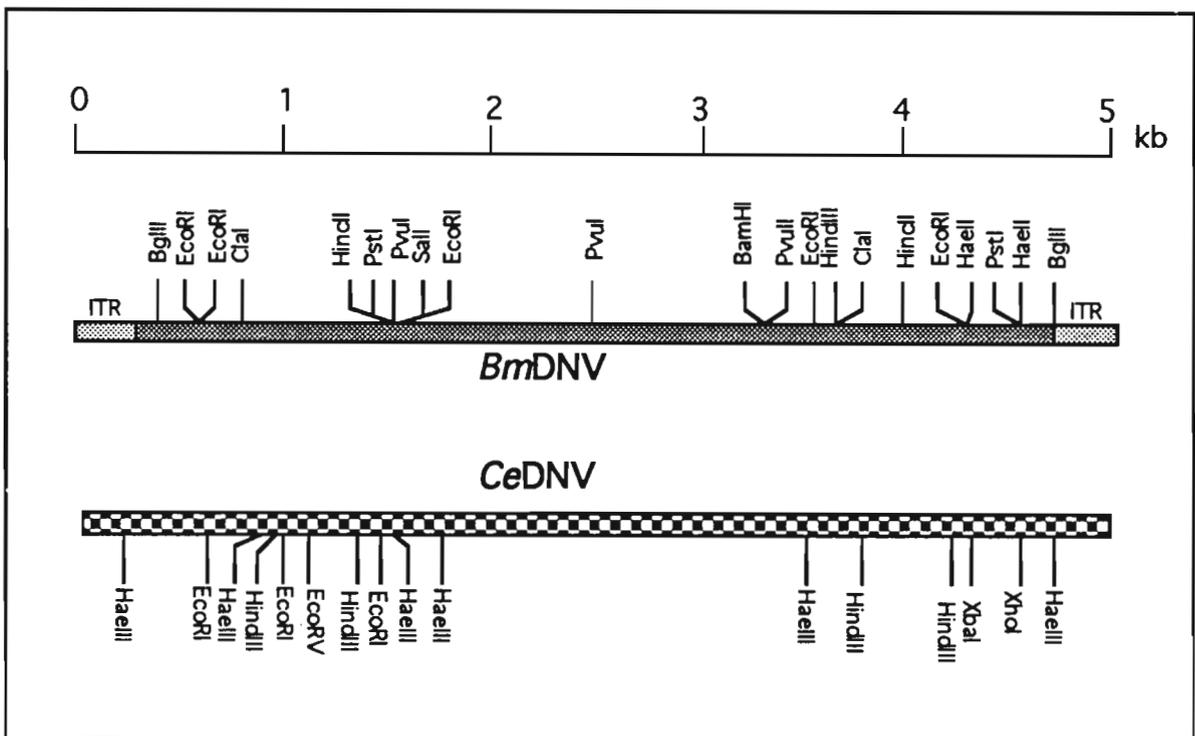
Pistes 8, 9 et 10 : Digestion par *Bam*HI de l'ADN des virions chimères issus de la transfection des larves par les plasmides pDsBamADH1 (8), pBRJH (9) et pJcBamADH34 (10).

Piste 11 : Digestion par *Bam*HI de L'ADN du *Ds*DNV

\* Marqueur VII (cf. chap. III, Matériel et méthodes)

## VII. Discussion

L'établissement des cartes physiques de restriction des deux génomes de densovirus, celui de *C. extranea* et *D. saccharalis* montre qu'il s'agit selon toute vraisemblance de deux virus nettement différents l'un de l'autre. D'une part on a affaire à deux génomes de tailles significativement différentes, celui du *Ce*DNV ne dépassant pas 5 kb alors que celui du *Ds*DNV est d'environ 6 kb. D'autre part, la comparaison de leurs cartes (cf. Fig. 7 et 16) ne fait apparaître aucune communauté de sites de restriction. Enfin, de nombreux sites présents dans le génome du *Ds*DNV, tels les sites *Bam*HI, *Hha*I, *Hpa*I, *Bg*III, *Cla*I et *Pst*I sont absents de la séquence du génome de *Ce*DNV. A l'inverse, ce dernier possède un ou plusieurs sites pour les enzymes *Eco*RV, *Hind*III et *Xho*I absents de la séquence du *Ds*DNV. L'absence de détection d'homologie entre les deux génomes par la technique du Southern, confirme que les deux virus diffèrent nettement l'un de l'autre.



**Fig. 27 :** Comparaison des cartes de restriction des génomes du *Bm*DNV et du *Ce*DNV.

ITR : Répétitions terminales inversées

Les comparaisons concernent uniquement les sites cartographiés ou absents dans le génome du *Ce*DNV. La carte de restriction du génome du *Bm*DNV a été établie à partir des données de Bando *et al.*, (1990).

Par sa taille et le nombre restreint de sites des restriction en position symétrique aux extrémités, le génome du *CeDnV* rappelle celui du *BmDnV* (Bando *et al.*, 1990) et on peut anticiper, qu'il possède, comme ce dernier, une répétition terminale inversée de taille inférieure à celle du *JcDnV*. Par contre, la comparaison entre les cartes de restriction de ces deux génomes, ne fait pas apparaître de ressemblances évidentes (Fig. 27).

Ainsi, les enzymes *EcoRV*, *XbaI* et *XhoI* possèdent des sites de restriction dans la séquence du génome du *CeDnV* mais ne reconnaissent aucun site dans la séquence du génome du *BmDnV*. A l'inverse, *BamHI*, *BglII*, *ClaI*, *HaeII*, *HhaI*, *PstI*, *PvuI*, *PvuII* et *SalI* coupent le génome du *BmDnV* et pas dans celui du *CeDnV*. En l'absence de données sur les homologies de séquence, la comparaison entre les génomes des ces 2 virus ne peut être que spéculative.

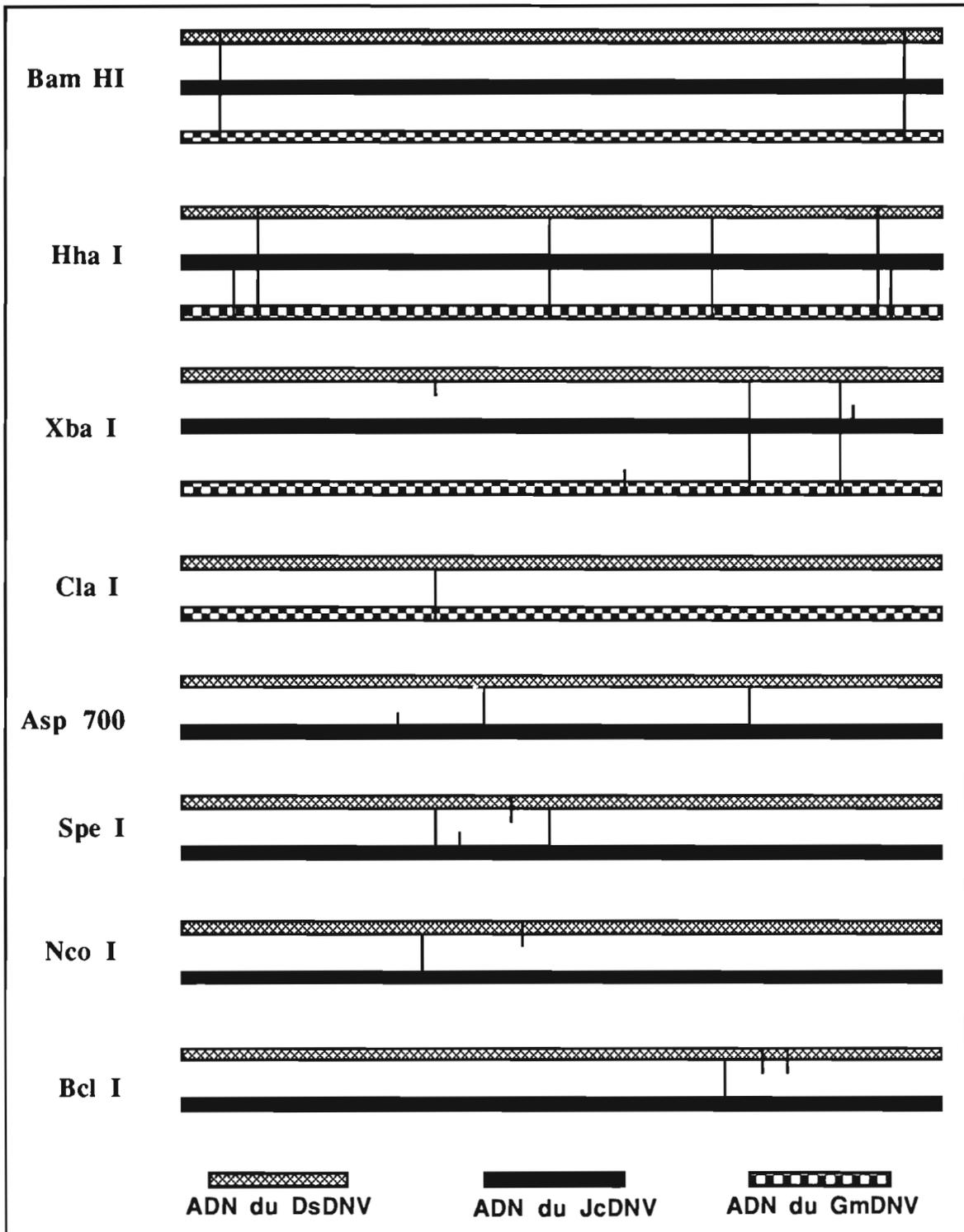
La taille de 5950 pb  $\pm$  50 pb de la forme bicaténaire de l'ADN du densovirus de *D. saccharalis* est comparable à celle du génome du *JcDnV* et du *GmDnV* qui avoisine 6000 pb (Jousset *et al.*, 1990; Dumas *et al.*, 1992). La comparaison des cartes de restriction des trois densovirus révèle de fortes ressemblances dans la position des sites d'une même enzyme le long des molécules d'ADN (Fig. 28).

Ainsi, la position des deux sites *BamHI* sur le génome de ces trois densovirus est identique. Il en est de même des enzymes *HhaI* et *XbaI* qui coupent les trois génomes respectivement en 4 et 2 sites identiques bien qu'ayant sur certains d'entre eux des sites supplémentaires. D'autres enzymes, telles *ClaI*, *Asp700*, *SpeI*, *NcoI* et *BclII* ont des sites de coupure identiques dans le génome du *DsDnV* et l'un des deux autres.

Les nombreux fragments générés par la digestion du génome du *DsDnV* par les enzymes *AluI*, *DraI*, *HinfI*, *Sau3A* et *TaqI*, dont certaines ont des tailles inférieures à la limite de détection en gel d'agarose ou d'acrylamide, se retrouvent également chez le densovirus de *J. coenia* (Dumas *et al.*, 1992).

Enfin, à l'instar du génome du *JcDnV* (Dumas *et al.*, 1992), celui du *DsDnV* possède de nombreux sites de coupure par les enzymes *AluI*, *DraI*, *HinfI*, *Sau3A*, et *TaqI* que nous n'avons pas pu cartographier.

Comme pour les génomes du *JcDnV* et du *GmDnV*, les fragments des extrémités du génome du *DsDnV* forment des bandes diffuses en gel d'agarose. Ces profils seraient dûs à l'inégalité des tailles des séquences terminales du génome par suite de cassures mécaniques plus ou moins importantes (Jousset, communication personnelle).



**Fig. 28 :** Comparaison des cartes de restriction des génomes du *DsDNV*, *JcDNV* et du *GmDNV*.

Les bandes horizontales représentent la forme linéaire bicaténaire de l'ADN de ces trois densovirus et les traits verticaux symbolisent les sites de restriction des différentes enzymes.

Les sites de restriction *Bam* HI, *Hha* I et *Sca* I symétriques aux extrémités du génome du *Ds*DNV suggèrent comme chez les autres densovirus, la présence de répétitions terminales inversées (ITRs) (Jourdan *et al.*, 1990; Dumas *et al.*, 1992; Bando *et al.*, 1990; Bando *et al.*, 1987b). Ces séquences possèderaient une taille d'environ 500 bases.

Par plusieurs de ses propriétés, dont sa taille de 6 kb, la présence vraisemblable d'ITRs de grandes tailles (environ 500 pb) et surtout, sa carte de restriction, le génome du *Ds*DNV présente des ressemblances telles avec les génomes du *Jc*DNV et du *Gm*DNV qu'elles ne peuvent être qualifiées de fortuites. Les travaux en cours au laboratoire sur les propriétés comparées de plusieurs DNVs (Sujet de thèse de Cristina Cavallaro) apportent la preuve de parentés sérologiques et d'homologies de séquence très fortes entre les trois virus.

En ce qui concerne le clonage du *Ds*DNV, nous nous sommes heurtés, comme cela était prévisible, aux difficultés inhérentes à la présence de répétitions terminales inversées capables de se replier pour donner des structures en "épingle à cheveux", et à l'instabilité des palindromes terminaux qu'elles contiennent (Samulski *et al.*, 1982 ; Laughlin *et al.*, 1983; Jourdan *et al.*, 1990). Pour ces raisons, nous avons envisagé dans un premier temps, le clonage de l'ADN en plusieurs parties, en commençant par le grand fragment interne *Bam*HI, qui a donné les plasmides pDsBamA et DsBamA'. L'obtention de quatre plasmides contenant la quasi-totalité du génome du *Ds*DNV, nous a fait abandonner la première stratégie.

L'analyse détaillée de la taille des fragments de restriction générés aux extrémités du génome viral dans les 4 plasmides obtenus, a montré que tous les génomes clonés avaient subi des délétions. Avec une délétion de seulement 60 pb (soit environ 1 % du génome) à une seule extrémité, l'insert viral du plasmide pDst50 est le plus complet que nous ayons obtenu. Deux autres plasmides contiennent une séquence virale délétée de 100 pb (pDst27) et 150 pb (pDst4) à la même extrémité. Quant à l'insert du plasmide pDst9, il est délété de 60 pb à chaque extrémité. Au cours du clonage, le génome du *Jc*DNV a subi une délétion de 89 pb (Jourdan *et al.*, 1990); de la même façon celui de l'*Aedes* DNV a subi une délétion de 31 pb (Afanasiev *et al.*, 1991). Toutes ces constatations attestent une fois de plus, la fragilité des répétitions terminales et la difficulté pour réussir un tel clonage. Cette fragilité des extrémités du génome des densovirus peut expliquer les différences de tailles des fragments situés aux extrémités mentionnées plus haut.

La transfection de la lignée cellulaire Px par les quatre plasmides recombinants contenant des inserts viraux quasi-complets a entraînée l'infection des cellules avec production de virions. Le mécanisme de réparation d'une délétion unilatérale dans la séquence de l'ITR proposé chez les AAV (Samulski *et al.*, 1983; Bohenzky et Berns, 1989) peut expliquer l'obtention, par réparation à partir de l'extrémité intacte de l'insert viral des plasmides pDst50, pDst4 et pDst27, de génomes complets.

Par contre, le pouvoir infectieux de l'insert de pDst9 qui contient une délétion bilatérale est plus difficile à expliquer car il ne peut y avoir de réparation dans ce cas. Il faut admettre pour l'expliquer que les 60 premières bases de l'ITR ne sont pas indispensables et doivent donc précéder l'hairpin terminal. En effet, la transfection de la lignée Px par le plasmide pDsBamA qui contient seulement le grand fragment interne *Bam*HI du génome du *Ds*DNV permet la synthèse de protéines structurales, sans cependant entraîner la réplication et la formation de virions. Cette absence de pouvoir infectieux peut s'expliquer par les délétions symétriques de 300 pb environ aux extrémités du génome de *Ds*DNV chez les recombinants pDsBamA et pDsBamA'. Des travaux dans ce sens ont montré que chez le pBRJ, une délétion symétrique de 100 à 250 pb éliminant l'hairpin terminal, entraîne la perte de son pouvoir infectieux (Jourdan *et al.*, 1990). Cela démontre une fois de plus, comme chez les AAVs, l'importance et le rôle de ces structures non codantes dans le processus de réplication (Salmulski *et al.*, 1987; Jourdan *et al.*, 1990).

Ce même phénomène de réparation serait à l'origine du pouvoir infectieux du plasmide chimère pJcBamADH1 qui conduit, après transfection de la larve de *S. littoralis*, à la production de virions dont le génome possède les deux extrémités du *Ds*DNV identiques, alors que l'insert du plasmide chimère est constitué par le fragment BamA de l'ADN du *Jc*DNV et une seule extrémité du génome du *Ds*DNV.

L'obtention de recombinants comportant des génomes chimères infectieux (plasmides pJcBamADH1 et pJcBamADH34) constitués par le grand fragment interne *Bam*HI, du génome du *Jc*DNV flanqué des extrémités *Bam*HI du génome du *Ds*DNV, démontre de façon formelle la capacité des structures terminales en hairpin du *Ds*DNV de fonctionner comme des origines de réplication pour le *Jc*DNV. L'analyse fine des génomes des virions obtenus par transfection de larves de *S. littoralis* a confirmé qu'ils étaient bien constitués des deux types de séquence. Le faible pouvoir transfectant pour les cellules Px et l'absence de larves de *D. saccharalis* ne nous ont pas permis d'obtenir l'autre type de virions chimères, dont le génome devait être de type grand fragment interne de l'ADN du *Ds*DNV, flanqué des extrémités *Bam*HI de celui du *Jc*DNV. Toutefois, les résultats négatifs de transfection de larves de *S. littoralis* par le plasmide pDsBamAJH39 suggèrent fortement que la spécificité d'hôte du *Jc*DNV comme celle du *Ds*DNV, ne repose pas sur les ITRs. En effet le génome chimère porté par ce plasmide possède les propriétés de celui du *Ds*DNV, à savoir son pouvoir transfectant pour les cellules et son incapacité à se répliquer dans les lignées cellulaires ou des larves de *S. littoralis*.

**CHAPITRE V**

**MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DIAGNOSTIC  
DU DENSOVIRUS DE *C. EXTRANEA* PAR SONDE  
NUCLEIQUE ET APPLICATION A L'ETUDE DE  
LA VIROSE EN MILIEU NATUREL**

## I. Préparation de la sonde

### A. Choix de l'utilisation d'une sonde nucléique dans le diagnostic.

De toutes les techniques de diagnostic sérologique de maladies infectieuses, utilisées en médecine humaine et vétérinaire, en phytopathologie et en lutte biologique, la technique ELISA décrite pour la première fois en 1971 (Van Weemen et Schuurs 1971, Engvall et Pearlman, 1972) reste de loin la plus couramment utilisée actuellement. Une méthode de diagnostic du picornavirus de *Latoia viridissima* par test ELISA a été appliquée à une étude épidémiologique de la virose chez son hôte en Côte d'Ivoire (Zeddou, 1989). Bien que simple de mise en œuvre, et relativement peu coûteuse, cette technique, appliquée au diagnostic d'infections virales d'insectes, nécessite pour être fiable la possession de bon anticorps, c'est à dire non contaminés par des immunoglobulines dirigées contre des protéines cellulaires de l'hôte. Faute de posséder des anticorps monoclonaux, elle implique de disposer d'un stock de sérums conservés dans de bonnes conditions.

Le développement au cours des années 1980 de Kits de diagnostic reposant sur le principe de détection d'un acide nucléique, ADN ou ARN, par hybridation spécifique avec une sonde nucléique froide, constituée d'une chaîne de polarité complémentaire à celle recherchée marquée à la digoxigénine ou à la biotine, a conduit à abandonner dans certains cas les anciennes techniques. Surtout utilisée dans le domaine médical (Anderson *et al.*, 1985; Cunningham *et al.*, 1988; Azzi *et al.*, 1990), cette méthode tend à se généraliser. Très sensible et ne nécessitant aucun appareillage de lecture coûteux, cette méthode est également simple et rapide. Elle s'applique aussi bien sur du matériel purifié que sur des broyats cellulaires ou tissulaires bruts directement déposés sur des membranes de nylon (technique de dot blot). Les sondes, stables à -20 C ne subissent pas de perte d'activité et peuvent être réutilisées plusieurs fois avec des résultats réguliers et reproductibles. De plus, si l'on dispose comme sonde d'une séquence clonée dans un plasmide, ce qui est généralement le cas, sa préparation est très rapide et renouvelable sans problème. Disposant de séquences clonées d'ADN génomique du densovirus de *C. extranea*, il nous a paru évident d'utiliser ces séquences pour préparer une sonde ADN froide, la tester sur une suspension de virus purifié pour mesurer la sensibilité de la détection et nous en servir pour une étude épidémiologique à partir de broyats de larves récoltées dans la nature.

### B. Obtention de la sonde spécifique et contrôle de sa sensibilité

La sonde est élaborée à partir du plasmide recombinant pCeHindIII A+D (Chap.IV, Fig. 9) amplifié dans les bactéries en excisant l'insert viral après digestion *Hind*III et récupération en gel d'agarose des fragments A et D selon la technique du "Gene clean" (cf. chapitre III). La sonde a été préparée en utilisant 1 µg d'ADN viral, par marquage à la digoxigénine avec le kit de

marquage Boehringer, (comme précisé au chapitre Matériel et Méthodes). Pour connaître le seuil de détection de la sonde, nous avons déposé sur une membrane nylon des gouttes (2 µl) de dilution de 2 en 2 de suspensions hautement purifiées de particules virales (Fig. 29, C et D) du *CeDNV* ainsi que des dilutions d'une solution d'ADN du plasmide pCeHindIII A+D (Fig.29, E). Après avoir réalisé les hybridations comme indiqué au chapitre Matériel et méthodes, nous avons révélé les membranes. Les résultats présentés sur la Fig. 29 montrent que la sonde est capable de détecter l'équivalent de 5 pg d'ADN viral. Ces valeurs sont comparables à celles annoncées par le fournisseur.

### C. Adaptation de la méthode de "dot blot" au diagnostic de l'infection virale

Disposant d'une sonde correcte nous l'avons testée sur des broyats de larves dans lesquelles la présence de virions a été préalablement contrôlée par examen au microscope électronique. L'adaptation de la technique à notre matériel a nécessité quelques mises au point. Ainsi, pour éviter ou réduire les bruits de fond nous avons insisté sur les rinçages, sur la quantité de révélateur, le temps de révélation et surtout sur la concentration de l'agent saturant la membrane (blocking reagent). Partant d'un broyat larvaire, clarifié puis concentré, que nous avons repris dans un volume de tampons correspondant à 15 µl / larve, nous avons fait des dépôts (2 µl) de dilution de 2 en 2. Comme le montre la figure 29 A et B, les résultats les plus nets sont apparus pour les dilutions au 1/16<sup>e</sup>-1/32<sup>e</sup>. Le protocole que nous avons choisi a donc consisté à broyer une larve dans 250 µl de tampon. Les concentrations suivantes 0,5 % : W/V de "bloking reagent", 0,2 mg/ml de NBT et 0,1 mg/ml de Xphosphate et un temps de révélation de 2 heures, se sont avérés les plus favorables. Une fois la mise au point faite, nous avons pu facilement trancher entre les échantillons positifs et négatifs comme l'illustrent les résultats présentés sur les Fig. 30 et 31. On peut noter par ailleurs que le traitement du broyat larvaire par le Fréon n'a pas modifié la détection (Fig. 29 A).

**Fig. 29 : Analyse de la sensibilité de la sonde.**

La sonde est préparée à partir de l'insert viral A et D du plasmide pCeHindIII A+D. L'ADN a été marqué à la digoxigénine 11dUTP.

Nous avons effectué des dilutions de 2 en 2 pour les différents échantillons et avons déposé 2  $\mu$ l pour chaque échantillon.

Echantillon A : broyat larvaire traité au Fréon . La dilution 1 correspond à l'équivalent d'une larve dans 15  $\mu$ l.

Echantillon B : broyat larvaire brut à la même concentration que l'échantillon A

Echantillon C : suspension virale du CeDNV (8 ng d'ADN/  $\mu$ l pour la dilution 1) \*

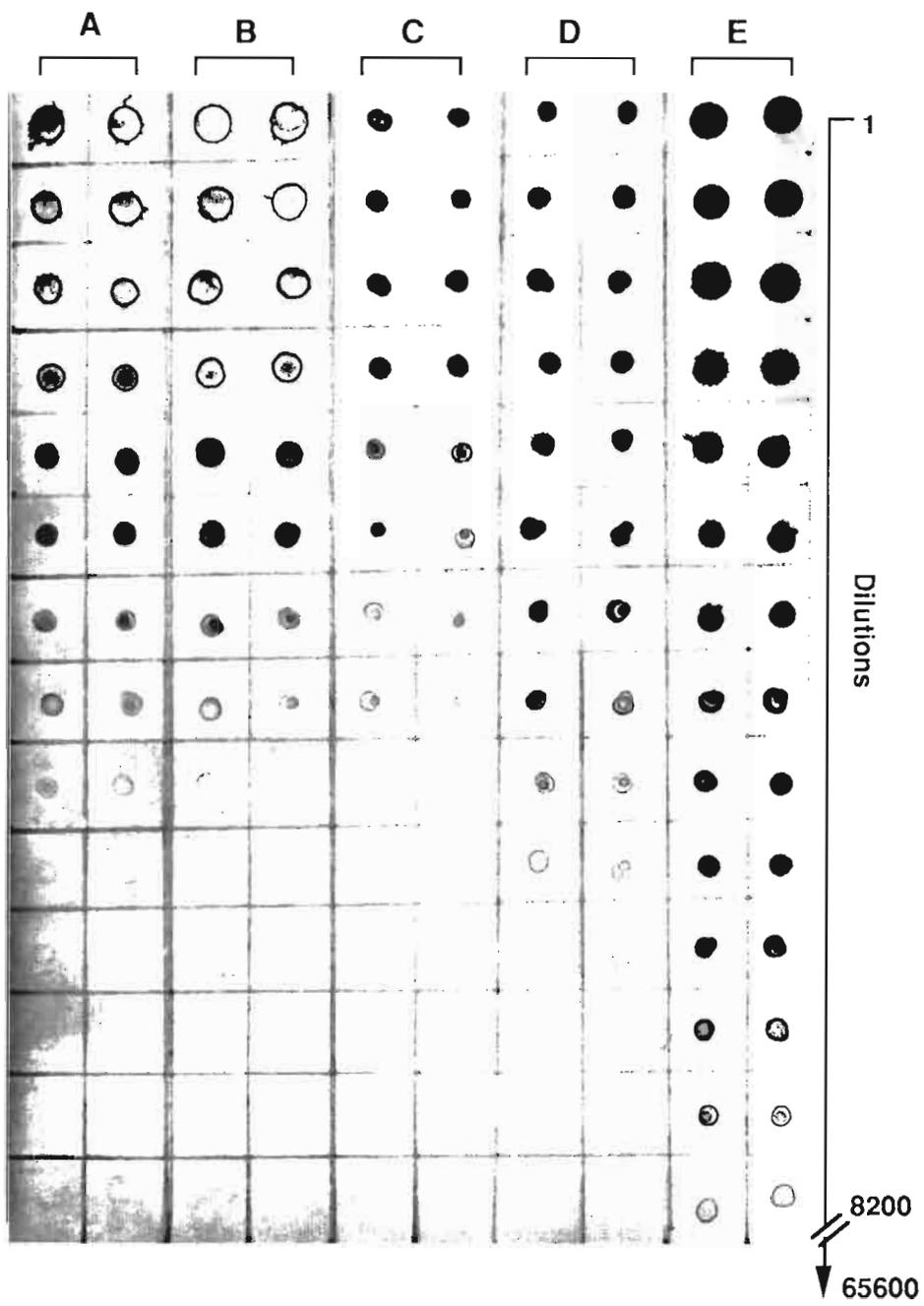
Echantillon D : suspension virale du CeDNV (20 ng d'ADN /  $\mu$ l pour la dilution 1) \*

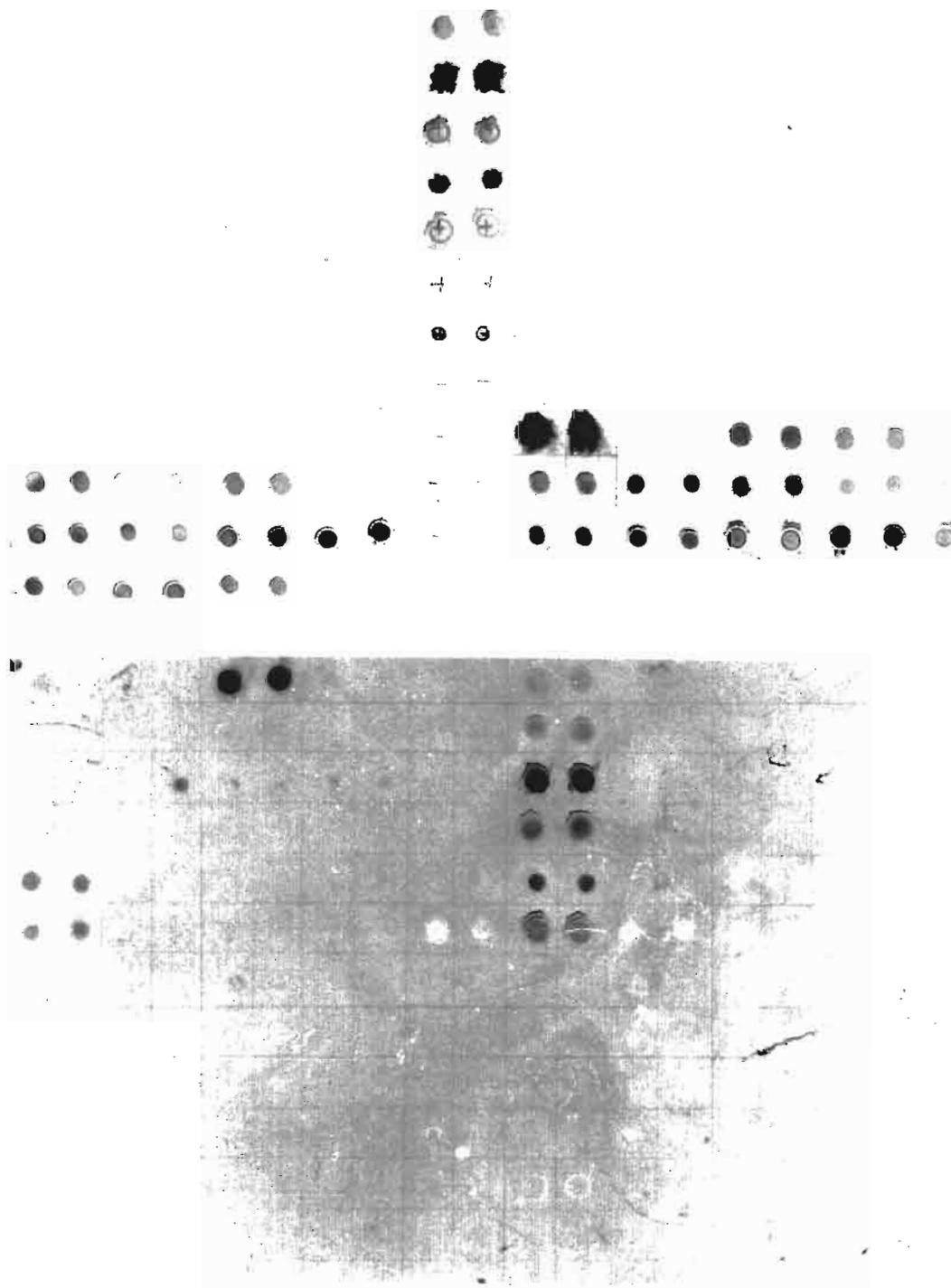
Echantillon E : solution d'ADN plasmidique (pCeHindIII A+D) (180 ng d'ADN /  $\mu$ l pour la dilution 1) correspondant à une concentration d'ADN viral de 75 ng /  $\mu$ l. §

Les limites de détection sont de 15 pg (échantillon C); 10 pg (échantillon D) et 4,6 pg (échantillon E)

\* Concentration estimée sur la base de 35  $\mu$ g d'ADN viral par unité de densité optique à 260 nm.

§ Concentration estimée sur la base 50  $\mu$ g d'ADN par unité de densité optique à 260 nm.





**Figure 30 : Détection par sonde nucléique du *CeDNV* dans les larves de *C. extranea* (prélèvement I), par hybridation ADN - ADN**

Les larves sont broyées dans 250  $\mu$ l de tampon PBS (voir annexe), le broyat est clarifié à 10.000 g pendant 10 mn. Puis 2  $\mu$ l de ce broyat sont directement déposés sur la membrane de nylon chargée positivement. Après dénaturation de la capsid, l'ADN libéré est exposé 3 mn aux UV puis, hybridé par la sonde ADN du *CeDNV* (insert viral du plasmide pCeHindIII A+D). La membrane est ensuite révélée en présence du complexe NBT - Xphosphate pendant environ 2 heures.

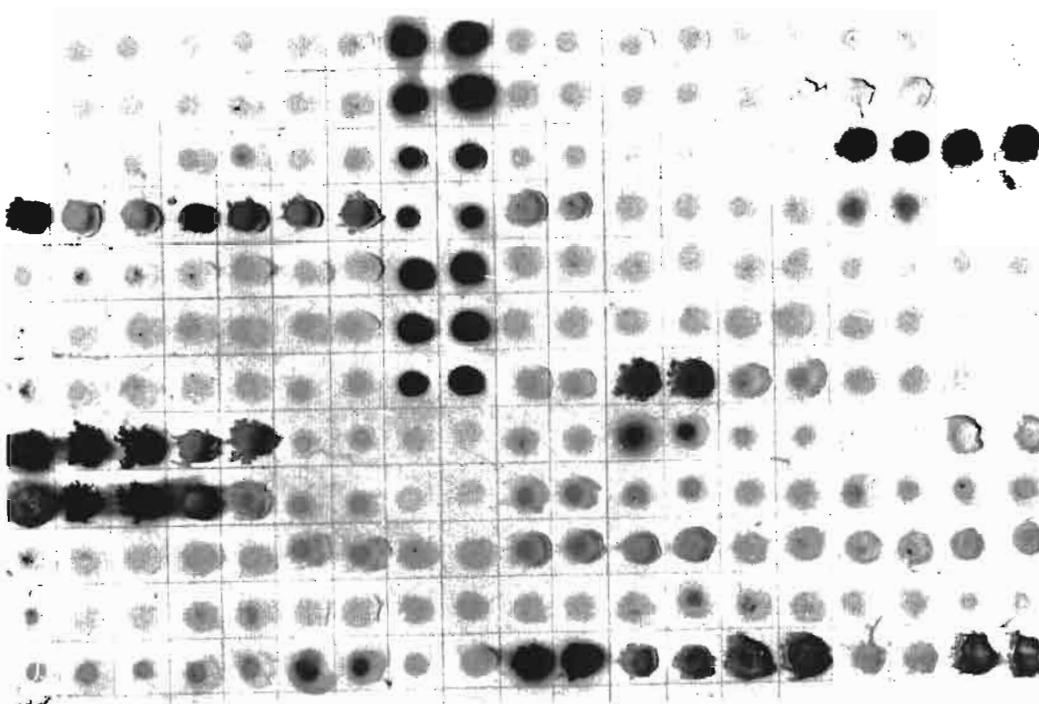
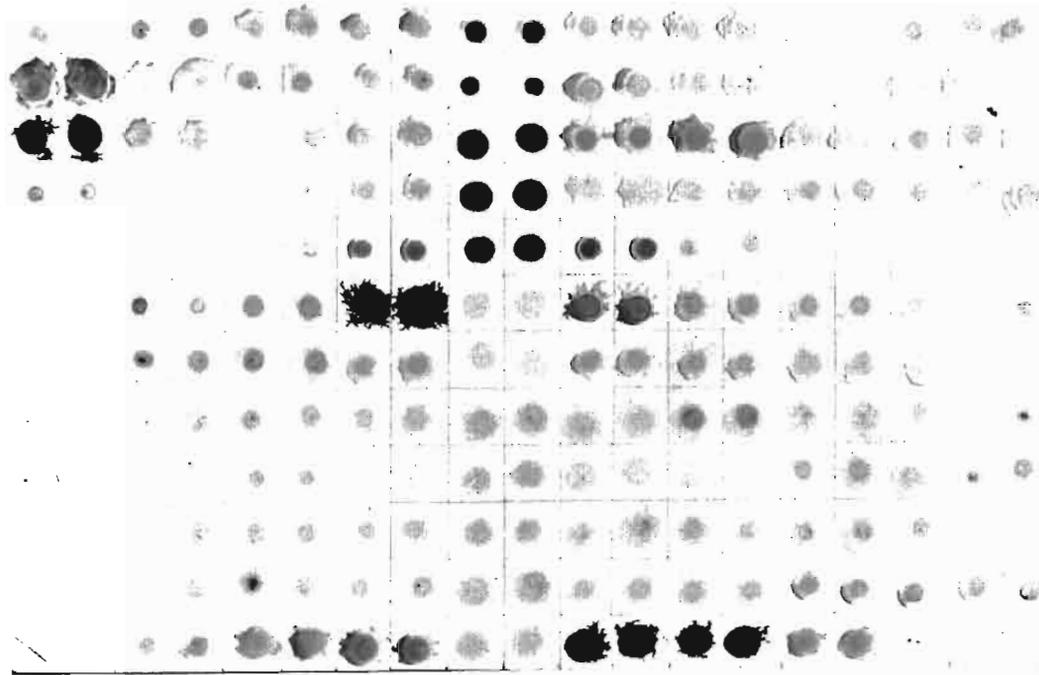


Figure 31 : Détection par sonde nucléique du *CeDNV* dans les larves de *C. extranea* (prélèvement II), par hybridation ADN - ADN

Les larves sont broyées dans 250  $\mu$ l de tampon PBS (voir annexe), le broyat est clarifié à 10.000 g pendant 10 mn. Puis 2  $\mu$ l de ce broyat sont directement déposés sur la membrane de nylon chargée positivement. Après dénaturation de la capsid, l'ADN libéré est exposé 3 mn aux UV puis, hybridé par la sonde ADN du *CeDNV* (insert viral du plasmide pCeHindIII A+D). La membrane est ensuite révélée en présence du complexe NBT - Xphosphate pendant environ 2 heures.

## II. Diagnostic et épizootiologie de la virose chez *C. extranea*

### A. Intérêt de l'étude épizootiologique

Des recherches antérieures ont été menées à partir de 1981 par Gilles Fédière alors chercheur à l'ORSTOM d'Adiopodoumé en collaboration avec Monsieur René Philippe du laboratoire d'entomologie de l'ex IRHO, Station de LA ME. Ils ont montré que le densovirus de *C. extranea* constitue un facteur naturel de contrôle des populations dans lesquelles il se maintient de façon endémique. Il peut être efficacement utilisé en lutte biologique contre cette espèce en période de pullulation (Fédière, 1986). Alors que les signes visibles de la virose ne se manifestent qu'à un stade avancé de l'infection, la détection précoce permet d'adapter une stratégie d'intervention le cas échéant.

Dans la perspective d'étudier la dissémination de la virose dans la plantation de palmiers à huile d'Eloka, au cours de la pullulation de l'année 1991, nous avons effectué à 13 jours d'intervalle des échantillonnages de larves vivantes ou déjà mortes, selon un plan bien défini. Ces prélèvements nous ont permis de suivre l'évolution de la maladie et sa répartition dans l'espace et dans le temps.

### B. Choix de la parcelle et de la méthode d'échantillonnage

#### 1°) Présentation de la plantation et de la parcelle.

Située au sud de la Côte d'Ivoire dans la sous-préfecture de Bingerville et à environ 35 Km d'Abidjan, la plantation de palmier à huile d'Eloka de l'ex SODEPALM aujourd'hui PALMINDUSTRIE couvre une superficie de 2200 ha environ. Elle possède un microclimat composé de deux saisons pluvieuses, dont une grande allant d'Avril à Juillet et l'autre petite allant d'Octobre à Novembre, deux saisons sèches dont une grande de Décembre à Mars et une petite d'Août à Septembre. Le cycle de développement annuel de *C. extranea*, espèce défoliatrice du palmier à huile, est calqué sur les quatre saisons de l'année (cf. tableau 1, Chap. I). La période annuelle de pullulation des larves se situe entre Août et Octobre en petite saison sèche.

Un contrôle préliminaire réalisé par l'équipe phytosanitaire de la plantation d'Eloka puis par nous, lors de notre arrivée en plantation, nous a permis d'isoler les parcelles attaquées par cette espèce. En effet sur une quarantaine de blocs composés chacun de 4 parcelles de 20 ha en moyenne nous avons décelé la pullulation sur 5 blocs (A3, B3, D2, D3, D4). Ces 400 ha étaient intensément infestés par les larves avec un indice d'attaque (moyenne de chenilles / palme) de l'ordre de 34, comme c'était le cas de la parcelle 3 du bloc B3 (B3 / 3) que nous avons choisie pour notre échantillonnage.

## 2°) Choix de la méthode d'échantillonnage

Nous avons, en collaboration avec le laboratoire de Biomodélisation du CIRAD-GERDAT choisi une méthode d'échantillonnage en étoile (Fig. 32). En effet par manque d'information préalable, sur l'ampleur de la répartition des larves, nous avons dû faire des échantillonnages sur des distances assez grandes, des prélèvements sur des arbres voisins enfin avoir des données dans différentes directions, d'où le choix de ce dispositif en étoile qui possède l'avantage de la construction des demi-variogrammes orientés ou non. Ce dispositif comprenait 25 palmiers dans les quatre directions suivantes : Sud - Nord; Ouest - Est; les diagonales Sud Ouest - Nord Est et Sud Est - Nord Ouest suivant lesquelles nous devions prélever les larves. Sur le schéma du dispositif (Fig. 32), le palmier est représenté par une tache dont le diamètre est proportionnel au nombre de larves de *C. extranea* du même stade qui ont été récoltées sur ce palmier. Il est bien entendu que les larves infestant le palmier central ne sont prélevées qu'une seule fois à chaque échantillonnage.

## 3°) Prélèvement des larves

Les larves de *C. extranea* ont été prélevées après abattage de la palme de rang 17 plus ou moins un (17 ou 18) à la faucille. Les chenilles d'une même palme ont été regroupées dans des tubes de récolte appropriés et conservées au congélateur. Deux prélèvements séparés de 2 semaines ont été réalisés dans la même parcelle et sur les mêmes palmiers, l'un dans la période du 12 au 15 Septembre 1991 et l'autre deux semaines après le premier prélèvement c'est-à-dire du 25 au 28 Septembre 1991. Lors du deuxième prélèvement, la palme prélevée est celle de rang immédiatement supérieur à celle du premier prélèvement. Toutes ces larves ont été transportées au laboratoire de virologie en France dans des récipients isothermes pour prévenir les larves et les virions de toute détérioration.

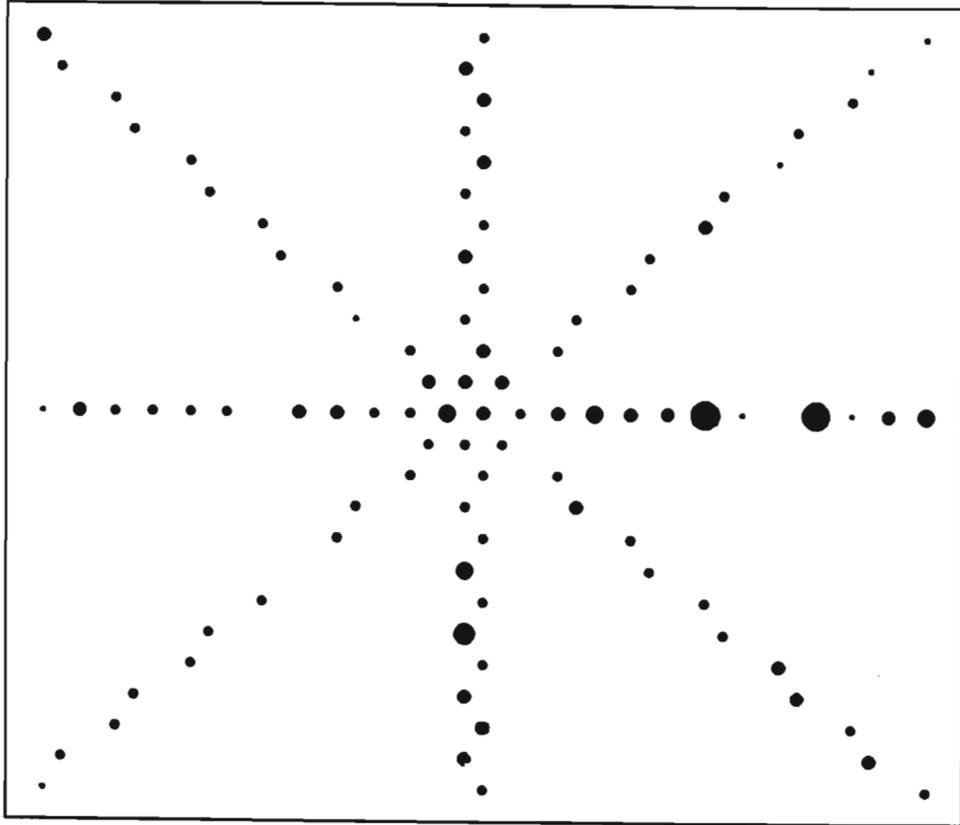
Au cours de la récolte des larves, il était courant d'observer plusieurs stades de développement larvaire et même des œufs en incubation sur la même palme. Cela peut s'expliquer par le fait que l'émergence des imagos de la génération précédente est échelonnée dans le temps et les pontes ne sont pas synchrones. Pour cette raison, nous n'avons récolté que les larves du même stade de développement se trouvant sur la palme choisie. Ainsi au cours du premier prélèvement, nous n'avons récolté que les larves du stade IV, ce stade marque la fin de la phase grégaire et les larves se disséminent sur toute la surface foliaire. Lors du deuxième prélèvement deux semaines plus tard, nous n'avons récolté que des larves du stade VI, car dans ce délai les larves de la même classe d'âge que celles du premier prélèvement atteignaient le stade VI.

**Fig. 32 : Représentation spatiale de la répartition des larves de *C. extranea*.**

Le modèle utilisé est un modèle en étoile qui comporte 25 palmiers dans chacune des quatre directions choisies (Nord - Sud, Ouest - Est, Sud Ouest - Nord Est, Sud Est - Nord Ouest). Les échantillonnages ont été faits sur 94 palmiers, les autres étant inaccessibles à la faucille. Chaque palmier est représenté par une tache dont le diamètre est proportionnel au nombre de larves recueillies sur une palme de rang 17 (ou 18).

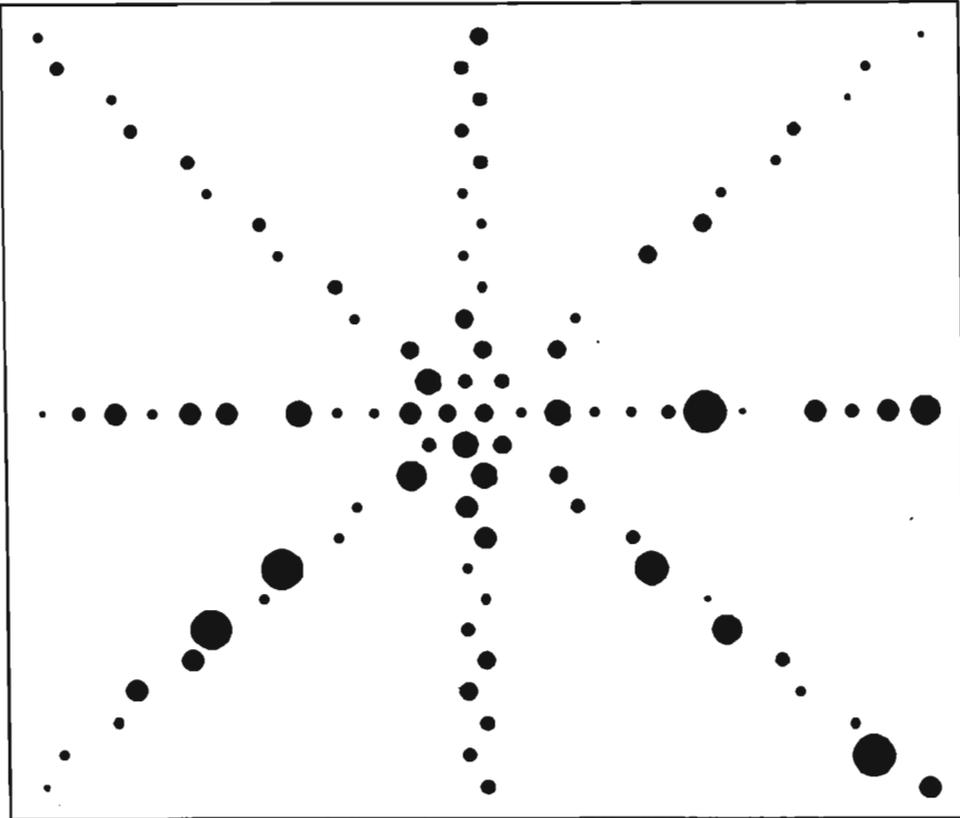
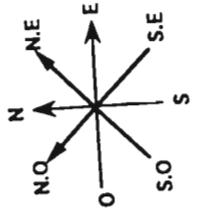
A : prélèvement I (larves de stade IV)

B : prélèvement II (larves de stade VI)



**B**

- > 40
- 36-40
- 31-35
- 26-30
- 21-25
- 16-20
- 11-15
- 6-10
- 1-5
- 0



**A**

Notre souci en agissant ainsi était de suivre l'évolution de la virose au niveau des larves issues de la même période d'éclosion. Nous avons ignoré les palmiers sur lesquels aucun prélèvement de larve n'a pu être effectué à cause de leur trop grande taille et par conséquent inaccessibles à la faucille. Pour cette raison, nos prélèvements ont porté sur 94 palmiers (Fig. 32) alors que le dispositif choisi en prévoyait 97.

### C. Traitement des données

#### 1°) Tableau des valeurs

Le nombre de larves de *C. extranea* du stade IV et VI dans l'espace du site de prélèvement (B3 / 3) de la plantation d'Eloka est mentionné dans le tableau 11. La moyenne des larves récoltées est de 10,74 larves au stade IV (premier prélèvement) avec une valeur maximum de 64 larves alors que cette moyenne n'était que de 5,18 pour le second prélèvement (stade VI) avec un maximum de 28 larves. Au cours de ces deux prélèvements nous avons comptabilisé 13 palmiers n'abritant aucune larve de *C. extranea*. Pour l'analyse de l'infection virale, nous avons choisi d'analyser les pourcentages de larves infectées (tableau 12). De plus avant toute construction de demi-variogrammes (cf. matériel et méthodes), on procède d'abord à une normalisation des données en rapportant les valeurs obtenues pour chaque palme (nombre de larves) à la moyenne générale pour l'ensemble de la parcelle. Cette normalisation présente le double avantage de faire immédiatement ressortir sur les demi-variogrammes, l'ampleur de la variabilité du phénomène étudié et de permettre des comparaisons pour les deux dates de prélèvement malgré les effectifs différents (Lecoustre et Reffye, 1986; Lecoustre *et al.*, 1989). Les demi-variogrammes sont obtenus en traçant les courbes de la variance moyenne entre couples de points représentés d'une part, par le nombre de larves du ravageur infestant deux palmiers voisins et d'autre part par le pourcentage de larves infectées, en fonction de la distance qui sépare les palmiers hôtes.

#### 2°) Etude de la répartition des larves de *C. extranea*

##### a) Prélèvement I (stade IV)

Le demi-variogramme non orienté que nous avons construit (Fig. 33 E) est globalement plat. Cela suppose qu'il n'existe aucune corrélation sensible entre les populations de larves pour des distances de l'ordre de 100 m (soit à l'échelle de la parcelle). Quand on analyse le début du demi-variogramme, pour les trois premiers points, c'est-à-dire sur une distance de 18 mètres, la courbe est décroissante d'où une corrélation négative entre les trois premiers palmiers voisins. Cela laisse supposer que plus un palmier est infesté par des larves, moins ses voisins le sont.

Tableau 11 : Nombre de larves récoltées par palme

Col. / ligne	Stade IV	Stade VI		Col. / ligne	Stade IV	Stade VI
42 / 1	18	2		54 / 1	30	13
43 / 2	51	8		54 / 2	16	9
44 / 3	1	3		54 / 3	6	0
45 / 4	4	6		54 / 4	16	26
46 / 5	7	9		54 / 6	0	0
47 / 6	26	3		54 / 7	41	28
48 / 7	0	1		54 / 8	7	8
49 / 8	32	4		54 / 9	5	10
50 / 9	8	3		54 / 10	1	13
51 / 10	7	7		54 / 11	22	10
52 / 11	11	5		54 / 12	5	4
53 / 12	11	4		54 / 14	14	12
54 / 13	15	8		54 / 15	18	3
55 / 14	21	7		54 / 16	1	3
56 / 15	14	1		54 / 17	3	7
57 / 16	1	0		54 / 18	21	6
58 / 17	7	3		54 / 20	16	5
59 / 18	3	1		54 / 21	1	1
60 / 19	7	4		54 / 22	2	1
61 / 20	35	3		54 / 23	16	1
62 / 21	9	3		54 / 24	6	8
63 / 22	10	5		54 / 25	0	0
64 / 23	2	1		42 / 13	6	4
65 / 24	8	3		43 / 13	8	6
66 / 25	3	7		44 / 13	7	8
42 / 25	0	0		45 / 13	11	6
43 / 24	2	5		46 / 13	12	5
44 / 23	4	4		47 / 13	6	17
45 / 22	16	3		48 / 13	2	4
46 / 21	16	3		49 / 13	4	11
47 / 20	42	1		50 / 13	18	4
48 / 19	5	3		51 / 13	20	4
49 / 18	64	3		52 / 13	22	3
50 / 17	2	5		53 / 13	25	4
51 / 16	3	3		55 / 13	7	6
52 / 15	29	5		56 / 13	14	6
53 / 14	7	4		57 / 13	12	4
55 / 12	7	8		58 / 13	2	2
56 / 11	13	3		59 / 13	1	7
57 / 10	3	1		60 / 13	3	3
59 / 8	3	5		61 / 13	1	2
60 / 7	1	8		62 / 13	10	10
61 / 6	1	2		63 / 13	6	5
62 / 5	8	0		64 / 13	6	6
63 / 4	0	3		65 / 13	8	8
64 / 3	3	4		66 / 13	13	5
65 / 2	0	0				
66 / 1	30	13				

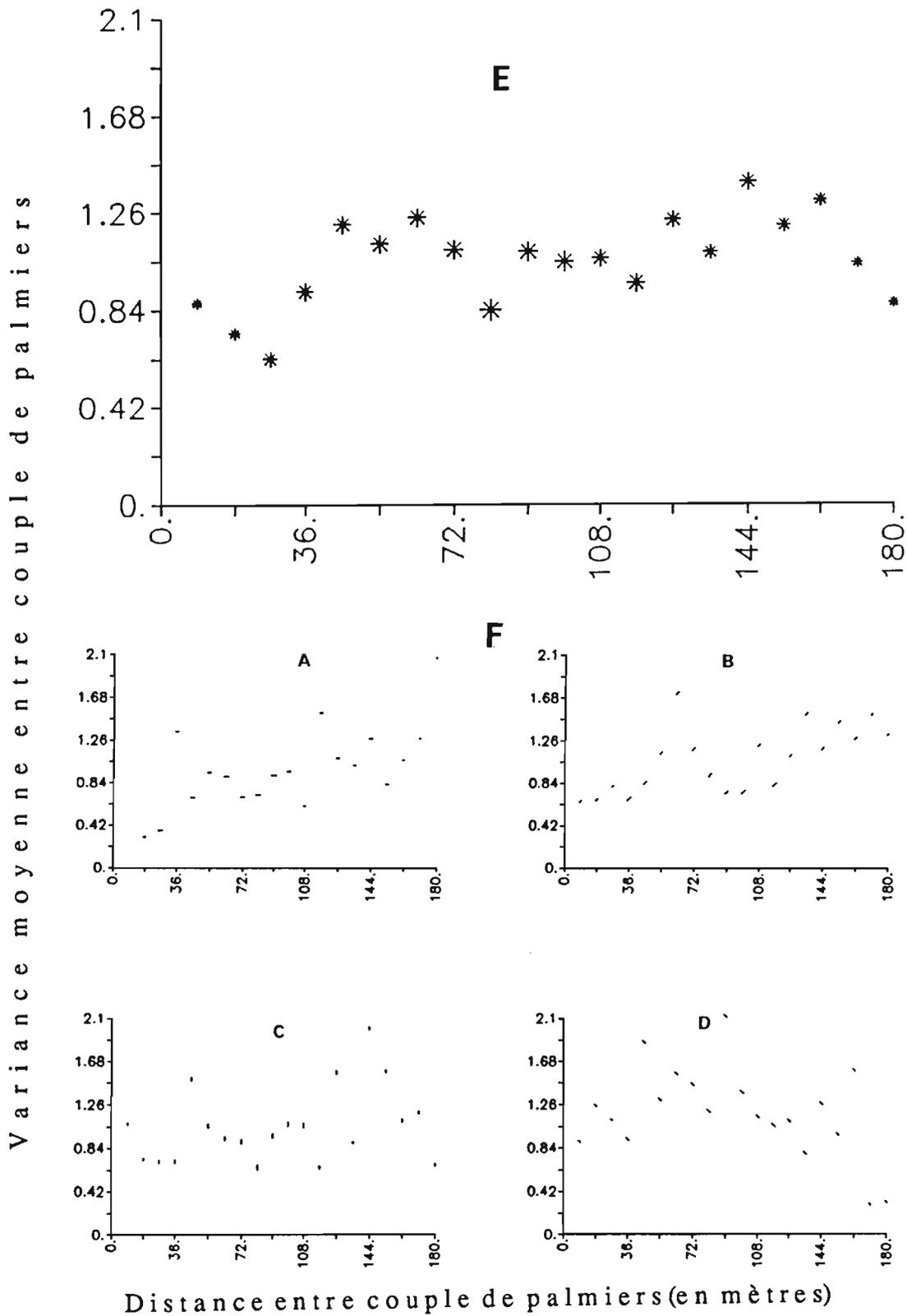
Tableau 12 : Pourcentage de larves virosées récoltées par palme

Col. / Ligne	Stade IV	Stade VI		Col. / Ligne	Stade IV	Stade VI
42 / 1	77%	100%		54 / 1	0%	85%
43 / 2	0%	100%		54 / 2	0%	100%
44 / 3	0%	100%		54 / 3	0%	-
45 / 4	0%	100%		54 / 4	0%	77%
46 / 5	0%	44%		54 / 6	-	-
47 / 6	0%	0%		54 / 7	0%	71%
48 / 7	-	0%		54 / 8	14%	12%
49 / 8	0%	50%		54 / 9	0%	10%
50 / 9	37%	100%		54 / 10	0%	0%
51 / 10	0%	14%		54 / 11	0%	100%
52 / 11	0%	40%		54 / 12	40%	0%
53 / 12	9%	50%		54 / 14	0%	92%
54 / 13	0%	38%		54 / 15	0%	0%
55 / 14	0%	71%		54 / 16	0%	100%
56 / 15	0%	0%		54 / 17	0%	100%
57 / 16	0%	-		54 / 18	33%	0%
58 / 17	0%	67%		54 / 20	100%	40%
59 / 18	0%	100%		54 / 21	20%	0%
60 / 19	0%	100%		54 / 22	100%	0%
61 / 20	0%	33%		54 / 23	0%	0%
62 / 21	78%	100%		54 / 24	0%	87%
63 / 22	0%	100%		54 / 25	-	-
64 / 23	0%	100%		42 / 13	0%	50%
65 / 24	12%	100%		43 / 13	0%	50%
66 / 25	100%	14%		44 / 13	0%	62%
42 / 25	-	-		45 / 13	0%	66%
43 / 24	0%	40%		46 / 13	0%	40%
44 / 23	0%	100%		47 / 13	0%	59%
45 / 22	0%	100%		48 / 13	0%	25%
46 / 21	0%	0%		49 / 13	0%	82%
47 / 20	0%	100%		50 / 13	0%	25%
48 / 19	20%	0%		51 / 13	5%	50%
49 / 18	86%	33%		52 / 13	77%	33%
50 / 17	0%	0%		53 / 13	4%	100%
51 / 16	0%	33%		55 / 13	0%	33%
52 / 15	86%	0%		56 / 13	7%	67%
53 / 14	0%	75%		57 / 13	0%	0%
55 / 12	0%	100%		58 / 13	0%	0%
56 / 11	0%	100%		59 / 13	0%	100%
57 / 10	0%	100%		60 / 13	0%	33%
59 / 8	0%	100%		61 / 13	0%	30%
60 / 7	0%	37%		62 / 13	0%	20%
61 / 6	0%	50%		63 / 13	0%	50%
62 / 5	0%	-		64 / 13	0%	87%
63 / 4	-	0%		65 / 13	0%	100%
64 / 3	0%	0%		66 / 13	0%	100%
65 / 2	-	-				
66 / 1	0%	0%				

**Tableau 13 : Paramètres statistiques de densité de population et de taux d'infection**

Paramètres	Prélèvement I (Stade IV)	prélèvement II (Stade VI)
Nombre total de larves	1010	482
Pourcentage par rapport au nombre total de larves	67 %	32 %
Moyenne de larves/palme (erreur à 5 % de risque)	10,7 (+- 2,30)	5,1 (+- 0,93)
Ecart type (s)	11,3	4,6
Coefficient de variation	105 %	90 %
pourcentage d'infection		
Nombre de larves infectées	156	284
% de larves infectées	15,15 %	59 %
% de palmiers infestées par au moins une larve virosée	21 %	72 %

Les demi-variogrammes orientés (Fig. 33 F) présentent une pente générale très faible à l'échelle de la parcelle, avec des points dispersés. Seuls les demi-variogrammes orientés dans les directions Est - Ouest, et la diagonale Sud Ouest - Nord Est, présentent des pentes positives. Pour des courtes distances, on observe une pente négative synonyme de corrélation négative entre la densité de larves infestant les 4 premiers palmiers (sur une distance de 27 mètres), pour les directions Nord - Sud et la diagonale Nord Ouest - Sud Est. Pour cette même distance au contraire dans les directions Ouest - Est, et la diagonale Sud Ouest - Nord Est, la corrélation est positive.



**Fig. 33 : Demi-variogrammes de la répartition des larves en plantation (prélèvement I, stade IV)**

A : Direction Est-Ouest (A),  
 B : Direction Sud Ouest-Nord Est  
 C : Direction Sud-Nord (C)

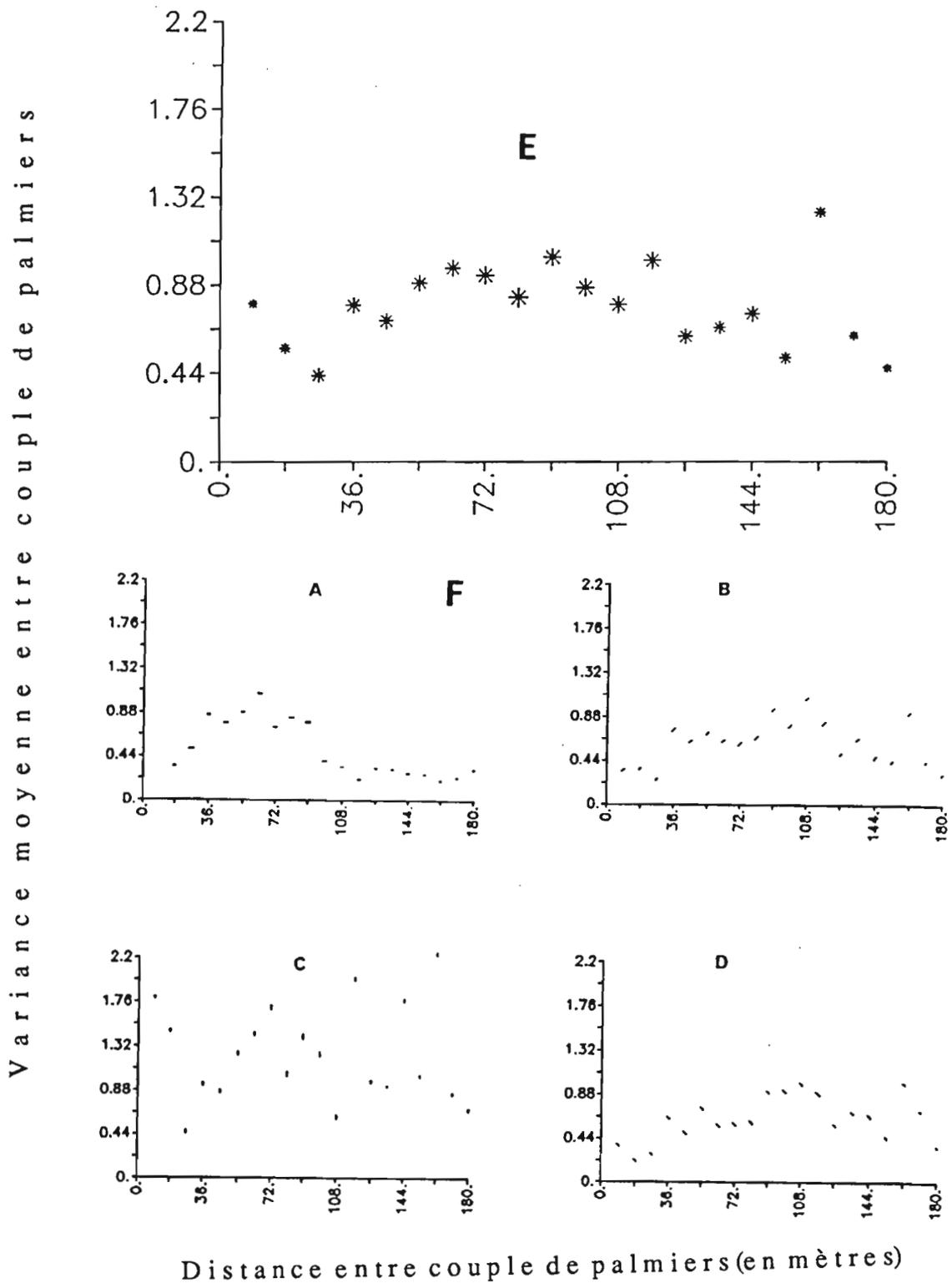
D : Direction Sud Est-Nord Ouest  
 E : Demi-variogramme non orienté  
 F : Demi-variogrammes orientés

On est en présence de résultats contradictoires pour des arbres voisins aussi bien à l'échelle de la parcelle que pour des courtes distances. On ne peut donc pas établir de corrélation entre la densité des larves et la position des palmiers qu'elles infestent. Il n'existe donc pas de foyer d'infestation, de zone d'attaque privilégiée, ni une infestation de proche en proche. Cependant si l'on considère chaque direction, on peut penser qu'à l'échelle de la parcelle, il existerait un gradient de dissémination dans les sens Ouest - Est, et la diagonale Sud Ouest - Nord Est.

#### b) Prélèvement II (stade VI)

Dans ce deuxième échantillonnage, on remarque tout d'abord, une décroissance significative de la densité de larves (issues de la même période d'éclosion) qui passe de 10,74 à 5,18. Le demi-variogramme non orienté (Fig. 34 E) de ce deuxième prélèvement, possède presque la même allure que celui du premier prélèvement, avec des mêmes ordres de grandeur de semi-variance normalisée. Là aussi on retrouve les trois premiers points du demi-variogramme descendant. Les demi-variogrammes orientés (Fig. 34 F) ne présentent pas non plus de tendance nette. Celui qui est orienté dans la direction Est - Ouest présente un début net ascendant suivi d'une décroissance, ce qui n'apparaît pas dans le cas précédent. D'un autre côté, le demi-variogramme est décroissant pour la direction Nord - Sud, ce qui est difficilement explicable. Pour la direction Sud Ouest - Nord Est, on observe une première pente légèrement ascendante sur une centaine de mètres, suivie d'une décroissance.

Une fois de plus, il n'est pas possible d'établir une corrélation très nette, au niveau du nombre de larves infestant un palmier avec les larves parasitant les palmiers voisins. Cependant on remarque, dans l'ensemble, des résultats assez comparables pour les deux prélèvements. Il faut noter aussi qu'il n'y a pas assez de points sur le variogramme, et pour chaque direction il n'y a qu'un seul transect ce qui ne permet pas de donner des conclusions définitives. Mais il semble se dégager, pour l'ensemble des deux prélèvements, une corrélation positive entre les nombres de larves infestant les palmiers sur les transects Est - Ouest et Sud Ouest - Nord Est. Il résulte aussi de cette analyse qu'il n'y a pas de régionalisation marquée.



**Fig. 34 : Demi-variogrammes de la répartition des larves en plantation (prélèvement II, stade VI)**

A : Direction Est-Ouest (A),  
 B : Direction Sud Ouest-Nord Est  
 C : Direction Sud-Nord (C)

D : Direction Sud Est-Nord Ouest  
 E : Demi-variogramme non orienté  
 F : Demi-variogrammes orientés

### 3°) Analyse spatiale de la virose chez les larves de *C. extranea*

#### a) prélèvement I (stade IV)

La Fig. 35 montre la dissémination de la virose dans le site de prélèvement des larves de *C. extranea*. Le demi-variogramme non orienté de ce premier prélèvement (Fig. 36 E) est très plat, il présente d'emblée un effet de pépite assez important de l'ordre de 3,6 (variance moyenne extrapolée pour une distance nulle). Cette courbe présente une légère pente ascendante pour les premiers points, ce qui serait synonyme de corrélation positive entre les pourcentages de larves de *C. extranea* virosées, prélevées sur des palmiers voisins. Cette pente ascendante et cette corrélation semblent subsister sur les demi-variogrammes orientés (Fig. 36 F) des directions considérées à l'exception de la direction Nord - Sud. Dans l'ensemble, les demi-variogrammes orientés donnent des points assez dispersés et un effet de pépite très important.

#### b) Prélèvement II (stade VI)

Le demi-variogramme non orienté (Fig. 37 E) est pratiquement plat comme au premier prélèvement, mais cette fois avec un effet de pépite moindre de seulement 0,6 ce qui montre une tendance à l'homogénéisation de la virose dans la parcelle. Quant aux demi-variogrammes orientés (Fig. 37 F), ils présentent presque les mêmes allures que pour le prélèvement précédent, sans tendance nette. Le taux de virose passe de 15,5 % au premier prélèvement, à 59 % au second et la virose est observée sur 72 % des palmiers, alors qu'elle n'était observée au départ, que sur 21 % des palmiers. On remarque dans l'ensemble donc une augmentation du taux de larves virosées et une tendance à une extension de façon homogène de cette virose dans l'espace.

D'une façon générale l'allure des variogrammes présente des fluctuations assez similaires aussi bien pour les densités de populations que pour les taux de larves virosées, ceci au niveau des deux prélèvements. Pour tenter d'expliquer ce phénomène nous avons construit la courbe du taux de décroissance en fonction du pourcentage d'infection.

### 4°) Facteurs possibles de décroissance de la population

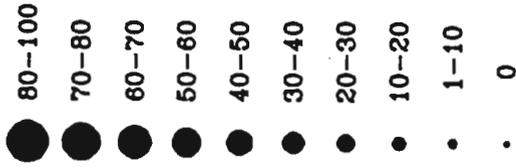
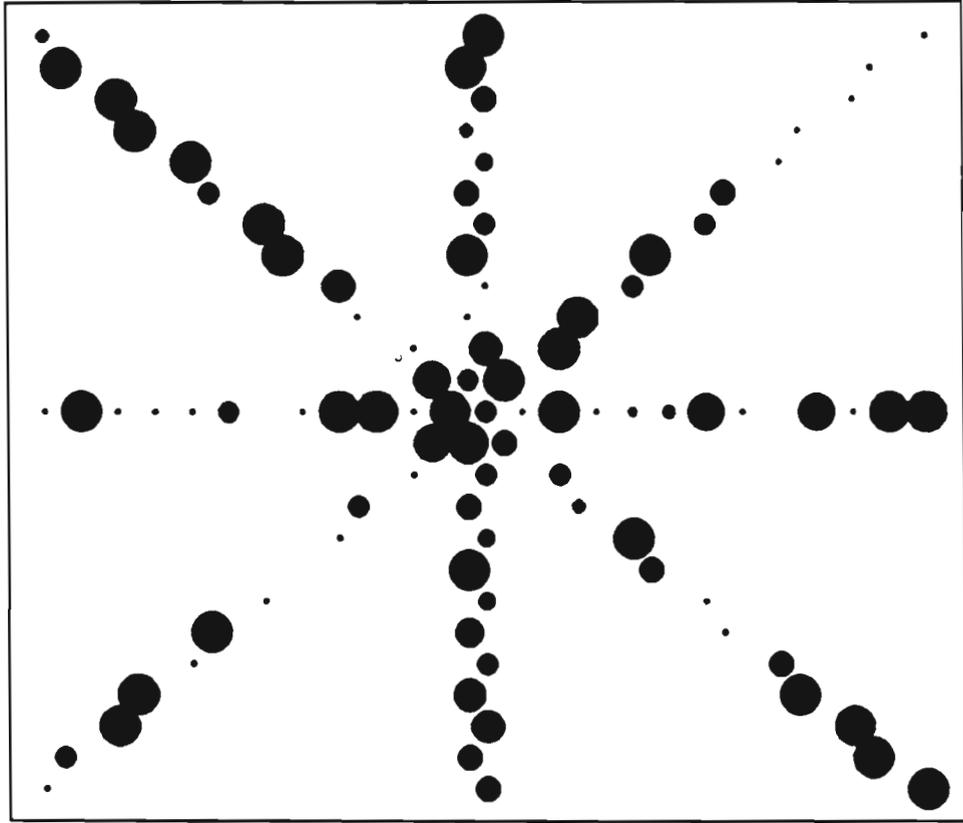
Nous avons analysé la courbe du taux de décroissance de la population en fonction du pourcentage de larves infectées (données portant sur les larves infestant une palme). Avant cette construction nous avons fait le rapport entre le nombre de larves du deuxième prélèvement (stade VI) et le nombre de larves de premier (stade IV). Ce rapport est exprimé en pourcentage et représente le taux de décroissance de la population de larves. Nous avons sélectionné les palmiers sur lesquelles au moins 10 larves ont été dénombrées dans les prélèvements I et II. La courbe obtenue (Fig. 38A) possède une allure décroissante et suggère que, plus la population est virosée au départ plus elle décroît au second prélèvement. Ce qui nous amène à conclure que l'infection de départ est donc source de la mortalité observée.

**Fig. 35 : Représentation spatiale de la dissémination de la virose en plantation**

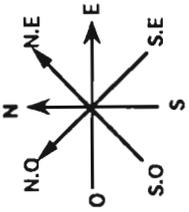
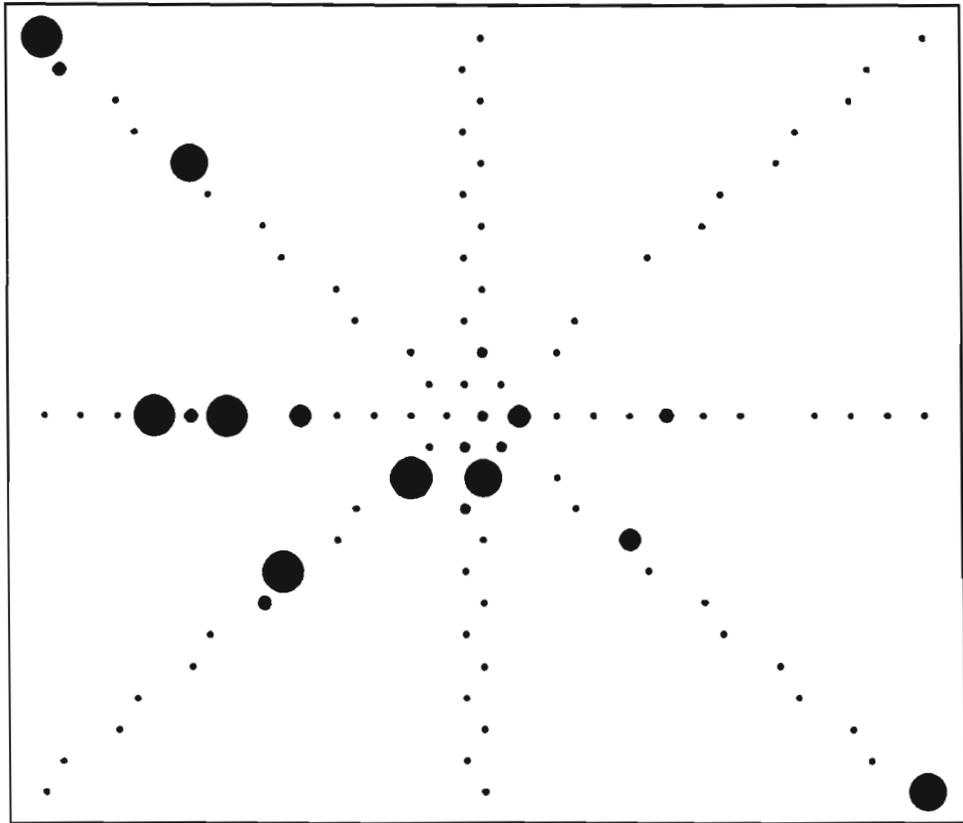
Le modèle utilisé est un modèle en étoile qui comporte 25 palmiers dans chacune des quatre directions choisies (Nord - Sud, Ouest - Est, Sud Ouest - Nord Est, Sud Est - Nord Ouest). Les échantillonnages ont été faits sur 94 palmiers, les autres étant inaccessibles à la faucille. Chaque palmier est représenté par une tache dont le diamètre est proportionnel au pourcentage de larves virosées recueillies sur une palme de rang 17 (ou 18).

A : prélèvement I (larves de stade IV)

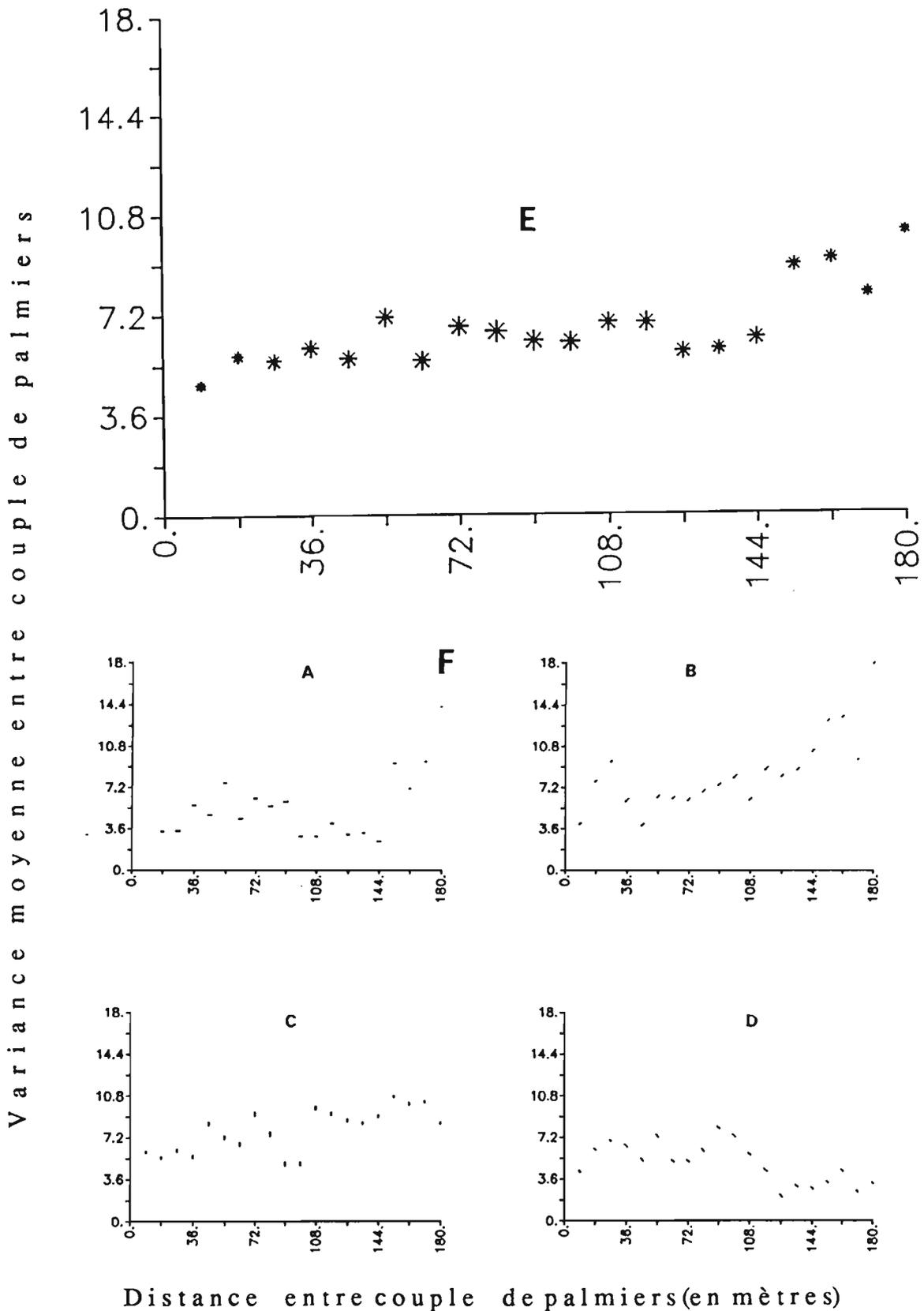
B : prélèvement II (larves de stade VI)



**A**



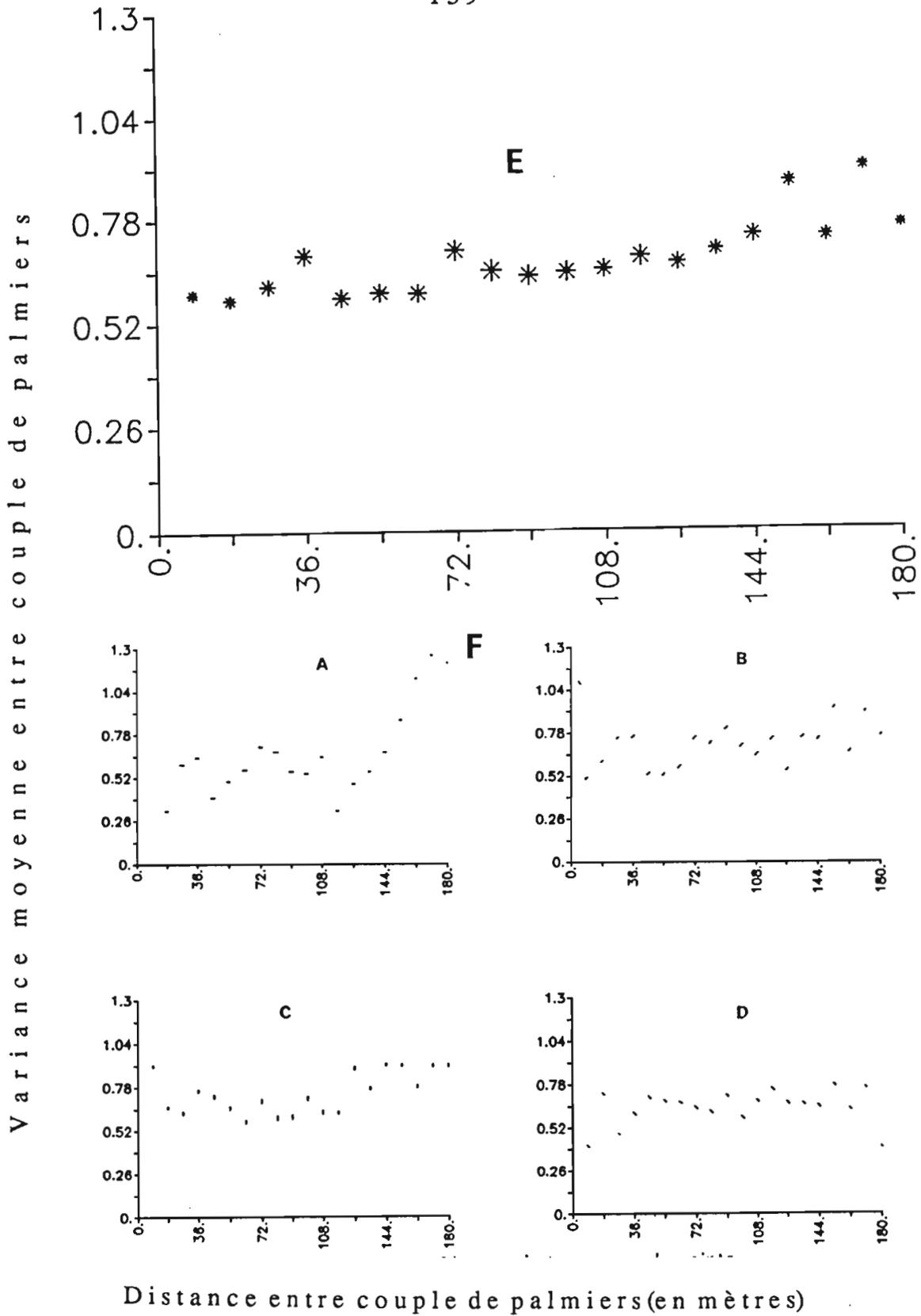
**B**



**Fig. 36 : Demi-variogrammes de la répartition de la virose chez les larves en plantation (prélèvement I, stade IV)**

A : Direction Est-Ouest (A),  
 B : Direction Sud Ouest-Nord Est  
 C : Direction Sud-Nord (C)

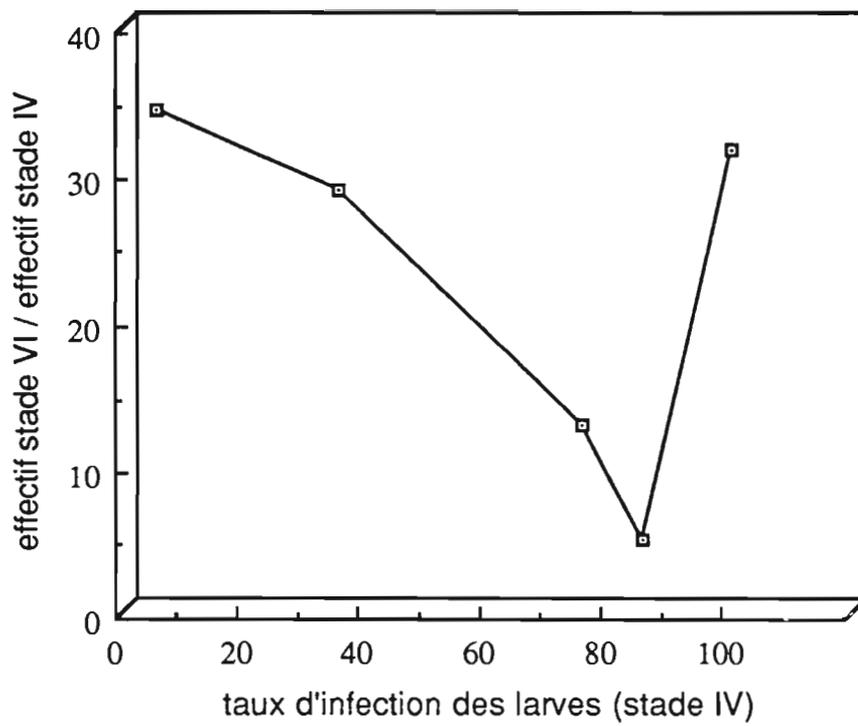
D : Direction Sud Est-Nord Ouest  
 E : Demi-variogramme non orienté  
 F : Demi-variogrammes orientés



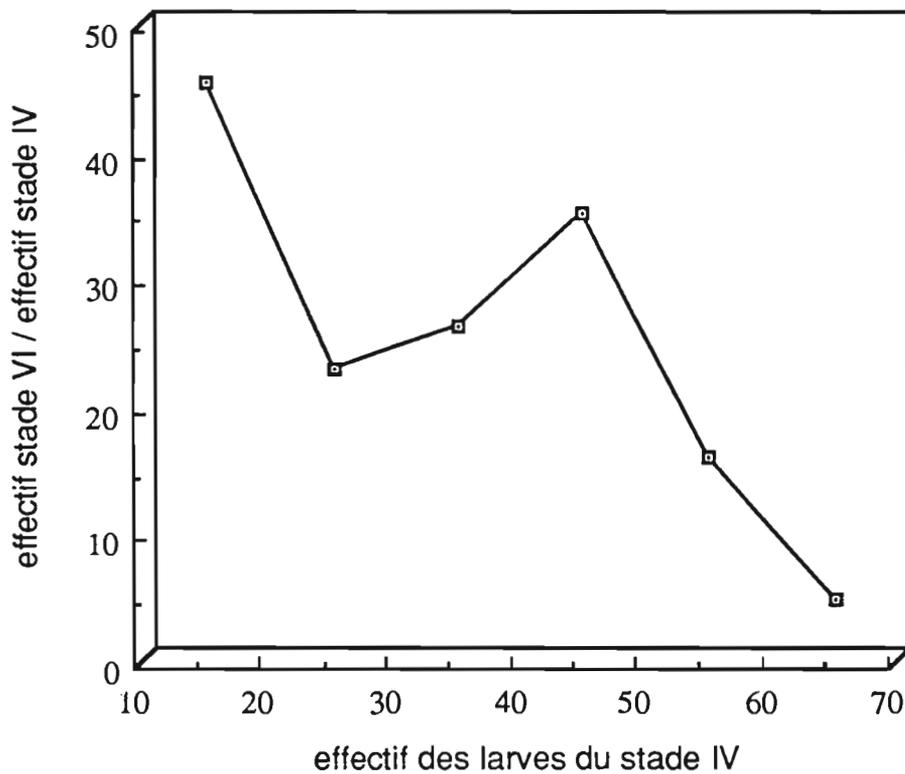
**Fig. 37 : Demi-variogrammes de la répartition de la virose chez les larves en plantation (prélèvement II, stade VI)**

A : Direction Est-Ouest (A),  
 B : Direction Sud Ouest-Nord Est  
 C : Direction Sud-Nord (C)

D : Direction Sud Est-Nord Ouest  
 E : Demi-variogramme non orienté  
 F : Demi-variogrammes orientés



A : décroissance de la population en fonction du pourcentage d'infection



B : décroissance de la population en fonction de la densité des larves du stade IV

**Fig. 38 : Courbes de décroissance de la population en fonction du taux de larves virosées et de la densité.**

La courbe du taux de décroissance de la population calculé comme précédemment, en fonction des effectifs de départ, (Fig. 38B) montre aussi une allure descendante et nous permet de dire que la chute de la population est d'autant plus importante que l'on a une forte concentration des larves au départ. Les courbes du taux d'infection des larves de chaque prélèvement en fonction de leurs effectifs montrent aussi que plus la densité est élevée plus le risque d'infection est élevé.

## V. Discussion

Le développement d'une méthode de diagnostic de la densovirose de *C. extranea* par sonde nucléique marquée froide a nécessité une mise au point précise des conditions d'hybridation et de révélation. La sensibilité de la méthode qui permet de détecter des quantités d'ADN de l'ordre du pg est tout à fait satisfaisante. Un des problèmes soulevé par l'application de la méthode au diagnostic de l'infection sur larves est celui du bruit de fond lié au broyat de tissu déposé sur la membrane. Celui-ci peut être considérablement réduit en diluant suffisamment le broyat, sans que la spécificité de la réaction ne soit mise en cause. Appliquée à un nombre important de larves (plus de 1500 chenilles), cette méthode s'est avérée facile à mettre en oeuvre. Par comparaison avec la technique ELISA, elle a donné des résultats similaires tant sur plan sensibilité que fiabilité. Ainsi, l'utilisation de cette méthode essentiellement dans le domaine médical et vétérinaire, peut être étendue à la lutte biologique pour le contrôle de l'état sanitaire des ravageurs ou de l'effet d'application de biopesticides. Ne nécessitant aucun équipement coûteux particulier, elle peut être mise en place dans des conditions de terrain. L'analyse spatio-temporelle d'une population larvaire naturelle de *C. extranea* et de l'évolution parallèle de la densovirose dans cette population que nous avons faite sur une parcelle de 20 ha dans la plantation de palmiers à huile d'Eloka a fourni plusieurs données intéressantes. Tout d'abord nous avons montré que la virose était toujours présente et qu'elle représentait selon toute vraisemblance, un facteur important de régulation de la population du ravageur. Ainsi, le taux d'infection de 15,5% au premier prélèvement pour une population larvaire de stade IV est passé à 59% au second pour cette même population qui avait atteint le 6<sup>e</sup> stade. Parallèlement, le pourcentage de palmiers sur lesquels nous avons rencontré des larves infectées est passé de 21% au premier prélèvement à 72 % au second prélèvement. Bien que les deux échantillonnages que nous avons faits à 15 jours d'intervalle sur cette parcelle ne reflètent pas nécessairement la situation de toute la population, ils indiquent néanmoins que les populations de *C. extranea* y sont efficacement contrôlées par la virose.

Une autre conclusion que l'on peut tirer de cette analyse est que la répartition du ravageur semble se faire selon un gradient Ouest - Est et la diagonale Sud Ouest - Nord Est, cette direction correspond à celle du vent dominant dans le sud de la Côte d'Ivoire où se situe la plantation d'Eloka. La dissémination de la virose semble se faire dans la même direction (Sud Ouest - Nord Est).

L'analyse de la répartition des larves dans l'espace n'a pas permis d'établir de corrélation entre leur densité et la position des palmiers qu'elles infestent. Les larves semblent se répartir au hasard dans la parcelle étudiée. De plus nous n'avons pas pu isoler des foyers d'infestation. On peut émettre l'hypothèse qu'on est en présence d'une parcelle fortement contaminée probablement depuis assez longtemps. Par contre une très forte corrélation a été mise en évidence entre la concentration des larves et le pourcentage d'infection. Nous avons en effet montré que plus la concentration en larves était importante au départ plus la mortalité (possible par virose) était forte. Cette constatation a été faite également par Tanada, (1961) qui étudiait l'épizootologie de baculovirus chez *Pseudotaletia unipuncta*.

Les facteurs responsables de la propagation de l'infection n'ont pas été étudiés. La contamination du chorion des œufs pondus sur les feuilles souillées, des larves néonates entre elles par suite de leur comportement grégaire, l'influence de facteurs abiotiques tels que l'humidité et l'insolation sont autant de causes possibles pouvant expliquer l'épidémiologie de cette virose.

La méthode de géostatistique que nous avons utilisée pour le traitement de ces données est pratique et compte actuellement beaucoup d'utilisateurs dans plusieurs domaines, que ce soit pour l'étude d'une population de ravageurs ou pour des maladies infectieuses pouvant contrôler ces ravageurs. Nous avons appliqué cette méthode à l'analyse spatio-temporelle de la dissémination de la virose dans la plantation de palmiers à huile d'Eloka. Cette méthode est simple et donne à la fois une représentation spatiale et dans une certaine mesure le mode de distribution d'une infection ou d'une dissémination. Il faut noter cependant que chaque cas d'étude d'un phénomène donné devrait faire appel à la mise en oeuvre de méthodes d'analyses statistiques spécifiques. L'adaptation de méthodes statistiques dont nous disposons s'avère difficile. Celle que nous avons utilisée répond à nos exigences pour l'étude que nous avons menée. Elle nous a permis d'avoir une idée sur le sens de distribution de l'espèce *C. extranea* qui semble être liée à la direction privilégiée du vent. La virose est également très répandue dans la parcelle et sa localisation semble être fonction de la densité de la population larvaire. Il est cependant trop prématuré pour tirer des conclusions définitives d'un tel résultat, c'est pourquoi des travaux dans ce sens seraient souhaitables pour déterminer avec plus de précision le mode de dissémination de la virose.

La détection de virus dans les larves apparemment saines, confirme la présence de virus latent qui rend difficile voire impossible l'élevage sain de ces *Limacodidae* au laboratoire. Cette présence de virus cause la mortalité et la perte précoce de l'élevage des larves récoltées en plantation et confinées dans des cages. Ce phénomène lié à la promiscuité est très souvent observé chez les larves de *Limacodidae*, notamment chez *C. extranea* et *Latoia viridissima* en Côte d'Ivoire (Fédière, 1983; Kouassi, 1988; Zeddani 1989).

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Les densovirus font depuis de nombreuses années l'objet de deux types de recherches parallèles. Les unes, déjà bien avancées, concernent les propriétés fondamentales de ces virus, notamment le clonage et le séquençage de leur génome pour en décrypter les modalités d'expression. Les autres, encore fragmentaires, bien que prometteuses, ont trait à leur utilisation en lutte biologique. Le travail que nous avons présenté dans ce mémoire, tente de faire le lien tout à fait nécessaire entre ces deux types de recherches.

L'étude comparée des génomes du *Ce*DNV et celui du *Ds*DNV a mis en évidence d'importantes différences entre ces deux densovirus. Ils diffèrent non seulement par leur taille : 4,9 kb pour le génome du *Ce*DNV contre 5,95 kb pour celui du *Ds*DNV, mais aussi par l'absence de site commun de restriction et de forte homologie de séquence. Le génome du *Ce*DNV serait plutôt du type de celui du *Bm*DNV alors que celui du *Ds*DNV est très voisin du génome du *Jc*DNV.

Nos tentatives infructueuses du clonage du génome complet du *Ce*DNV ne nous ont pas permis de poursuivre plus en avant son analyse. L'obtention d'un génome cloné nous aurait certainement permis de rechercher un système cellulaire permissif à la transfection, ce qui aurait beaucoup facilité les recherches en biologie moléculaire sur ce virus. Ne disposant pas de quantité suffisante d'ADN viral pour faire de nouvelles tentatives, nous avons dû renoncer à ce but. La séquence virale que nous avons tout de même clonée et qui représente plus de 50% du génome viral, nous a été très utile pour la préparation d'une sonde nucléique spécifique.

Nous avons été plus chanceux avec le génome du *Ds*DNV puisque 4 de nos plasmides renferment des séquences virales capables de générer des infections typiques en culture cellulaire. Toutefois, les cellules Px que nous avons réussi à transférer sont relativement peu sensibles puisque seulement 20% de la population cellulaire transférée est positive en test IF. La recherche d'une lignée cellulaire plus sensible doit donc être poursuivie.

Les fortes ressemblances que nous constatées entre les cartes de restriction des génomes du *Jc*DNV et celui du *Ds*DNV nous ont incité, une fois le génome du *Ds*DNV cloné, à construire des génomes chimères par échange des séquences internes entre les deux virus. Une de ces constructions à partir de laquelle nous avons pu transférer des larves de *S. littoralis* nous a permis de purifier des virions ayant un génome chimère constitué de la région interne codante de l'ADN du *Jc*DNV (fragment *Bam*HI) flanquée des séquences terminales du génome du *Ds*DNV. Ce résultat confirme les propriétés communes aux deux virus en ce qui concerne leurs séquences terminales dont on sait le rôle essentiel qu'elles jouent dans la réplication. Il apporte également la preuve que la spécificité d'hôte ne semble pas résider au niveau des origines de réplication, ce qui est logique. L'obtention de systèmes cellulaires appropriés et surtout des transfections de larves de *D. saccharalis* devraient permettre de démontrer le caractère infectieux du 2<sup>e</sup> type de génome chimère et de confirmer ainsi cette hypothèse.

Ces résultats ont conduit à approfondir l'analyse comparée des génomes des deux virus. Les fortes homologies récemment détectées par transfert de Southern entre le génome du *DsDNV* et celui du *JcDNV* (sujet de thèse de C. Cavalarro) suggèrent que ces deux virus possèdent vraisemblablement une organisation semblable de leur génome. Le séquençage en cours de la région du génome du *DsDNV* correspondant à celui de l'ORF1 du *JcDNV* (protéines structurales) devrait permettre de préciser ces ressemblances. Par mutagénèse dirigée ou échange de certains fragments de restriction, il sera alors possible d'aborder l'étude des bases moléculaires de la spécificité d'hôte de ces deux virus qui réside probablement dans les protéines non structurales.

Le second volet de notre recherche a consisté à mettre au point une méthode de diagnostic de l'infection à densovirus dans la larve de *C. extranea* ravageur important dans les plantations de palmiers à huile en Côte d'Ivoire. Nous avons délibérément choisi pour cette mise au point l'utilisation d'une sonde nucléique froide et une technique simple de dépôt sur membrane de matériel viral ou de broyat larvaire suivi de l'hybridation. Nous disposions en effet de la séquence génomique clonée mentionnée plus haut et les tests réalisés avec des suspensions virales purifiées montraient un seuil de détection de l'ordre du picogramme d'ADN viral. Nous avons ensuite démontré la validité de la méthode en utilisant des broyats larvaires d'abord concentrés puis bruts. Enfin, nous avons appliqué cette technique à l'analyse de l'état sanitaire d'une population larvaire de ravageurs par deux prélèvements faits dans la plantation d'Eloka à deux semaines d'intervalles. Au cours de la pullulation de Septembre à Octobre 1991. Cette étude a montré par l'analyse de près de 1500 larves, la validité de la méthode de diagnostic dont la mise en oeuvre est simple. C'est à notre connaissance le premier exemple d'utilisation de ce type de sonde pour le diagnostic d'infection virale en population d'insectes.

Les résultats que nous avons obtenus de l'étude de la virose dans les conditions naturelles sont trop fragmentaires dans l'espace et dans le temps pour que l'on puisse en déduire des lois générales sur l'impact du virus sur la dynamique des populations du ravageur. Une chose est certaine toutefois, c'est que près de 10 ans après la détection du virus sur la plantation d'Eloka, la virose se maintient à un niveau non négligeable et qu'au moins sur la parcelle étudiée, elle semble être la cause importante de mortalité.

Cette constatation témoigne de l'intérêt que l'on doit porter à ce virus pour la lutte biologique. Comme nous le mentionnons au début, les recherches sur les densovirus sont encore beaucoup trop parcellaires et insuffisantes dans ce domaine. L'obtention d'élevages sains sur milieux artificiel à partir desquels des suspensions virales pourraient être produites et leur pouvoir pathogène testé, reste une priorité. Par le développement d'une méthode de diagnostic de l'infection fiable, sensible et facile à appliquer sur un grand nombre d'échantillons, nous apportons un outil précieux pour les recherches en écopathologie indispensables à toute évaluation sérieuse d'un traitement par biopesticide.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFANASIEV B.N., GAYLOV E.E., BUCHATSKY L.P., KOZLOV Y.V., 1991. Nucleotide sequence and genomic organization of *Aedes densovirus*. *Virology*, **185**, 323-336.
- AGUILAR J D', and BONFILS J., 1962. Entomological problems concerning sugar cane in the French Antilles. *Agron. Trop.*, **17**, 566-575.
- AKBARALY-VALLY, 1985. Etude d'une polyédrose cytoplasmique chez le foreur ponctué de la canne à sucre, *Chilo sacchariphagus* BoJ. à la Réunion. Thèse Doct. 3<sup>e</sup> cycle Univ. Montpellier 2,
- AKHURST R.J., BOEMARE N.E., 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (R. Gauger, H.K. Kaya Eds.) pp. 75-89.
- AMARGIER A., VAGO C., MEYNADIER G., 1965. Etude histopathologique d'un nouveau type de virose mise en évidence chez le lépidoptère *Galleria mellonella*. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **15**, 659-667.
- ANDERSON I.G., LAW A.T., SHARIFF M., NASH G., 1990. A parvo-like virus in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Invertebr. Pathol.*, **55**, 447-449.
- ANDERSON M.J., JONES S.E and MINSON A.C., 1985. Diagnosis of human parvovirus infection by dot blot hybridization using cloned viral DNA. *J. Med. Virol.*, **15** , 163-172
- APPERT J., DEUSE J., 1982. Les ravageurs de cultures vivrières et maraîchères sous les tropiques. *Maisonneuve et Larose; ACCT*, **31**, 420 pp.
- ARMENTROUT R., BATES R., BERNS K.I., CARTER B., CHOW M., DRESSLER D., FIFE W., HAUSWIRTH P., HAYWARD G., LAVELLE G., RHODE S., STRAUS S., TATTERSALL P., WARD D., 1978. A standard nomenclature for restriction endonuclease fragments, In : Replication of Mammalian Parvovirus (D. WARD and P. Tattersall Eds.) pp. 523-526. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.
- ASTABIE J.F., 1986. Observation en Guadeloupe (Basse terre) sur deux foreurs de la canne à sucre : *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) et *Diatraea impersonatella* (Walker, 1863). *Dipl. Agron. Trop.*, *CNEARC* 58 pp.
- AZZI A., ZAKRZEWSKA K., GENTILLOMI G., MUSIANI M. and ZERBINI M., 1990. Detection of B19 Parvovirus infections by dot blot hybridization assay using a digoxigenin - labelled probe. *J. Virol. Methods*, **27**, 125-134.
- BACHRACH U., DON S. and WEINER H., 1974. Occuring polyamines in myxovirus. *J. Gen. Virol.*, **22**, 451-454
- BANDO H., CHOI H., ITO Y., KAWASE S., 1990. Terminal structure of a densovirus implies a hairpin transfer replication which is similar to the model for AAV. *Virology*, **179**, 57-63.
- BANDO H., KONDO N., KAWASE S., 1984. Molecular homology among the structural proteins of densovirus from silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Virol.*, **80**, 209-218.
- BANDO H., KUSUDA J., GOJOBORI T., MARUYAMA T., KAWASE S., 1987b. Organization and nucleotide sequence of a densovirus genome imply a host-dependent evolution of the parvoviruses. *J. Virol.*, **61**, 553-560.
- BANDO H., KUSUDA J., KAWASE S., 1987a. Molecular cloning and characterization of *Bombyx* densovirus genomic DNA. *Arch. Virol.*, **93**, 139-146.

- BARWISE, A. M. and WALKER, I.O., 1970. Studies on the DNA of a virus from *Galleria mellonella*. *FEBS Lett.*, **6**, 13-16.
- BELLET A. J. D., 1968. The iridescent virus group. *Adv. Virus Res.*, **13**, 225-246.
- BELLONCIK S., QUIOT J.M., ARELLA M., LECOMTE J., 1985. Etablissement d'une nouvelle lignée cellulaire (IAFES-1) à partir d'ovarioles d'*Euxoa scandens* (Lépidoptère Noctuidae). *Entomophaga*, **30**, 51-54.
- BERGOIN M., VEYRUNES J.C., VAGO C., 1986. Les parvovirus d'invertébrés : propriétés biologiques et biochimiques des densovirus. *1er Congr. Soc. Fr. Microbiol.*, Toulouse (France), avril 1986, CP 58, p. 43.
- BERGOLD G.H., 1947. Die Isolierung des Polyeder-Virus and die Natur der Polyeder. *Z. Naturforsch.*, **2(b)**, 122-143.
- BIRNBOIM H.C., DOLLY J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1529.
- BOEMARE N., BRES N., 1969. Le développement du virus de la denonucléose au cours de la métamorphose de son hôte, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera). *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **1**, 309-320
- BOEMARE N., 1973. Action du virus de la denonucléose sur la formation des organes génitaux et la gamétogénèse du lépidoptère *Galleria mellonella* L. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **5**, 81-87
- BOEMARE N., CROIZIER G., VEYRUNES J.C., 1970. Contribution à la connaissance des propriétés du virus de la denonucléose. *Entomophaga*, **15**, 327-332.
- BOHENZKY R.A., BERNS K.I., 1989. Interaction between the termini of adeno-associated virus DNA. *J. Mol. Biol.*, **206**, 91-100.
- BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M., LIGHTNER D.V., 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657-2664
- BORDAT D., 1983. Mise au point de l'élevage de masse d'*Apanteles chilonis* (Matsumura, 1912) et d'*Apanteles flavipes* (Cameroun, 1891) (Hyménoptères Braconidae) sur trois lépidoptères Pyralidae foreurs des graminées (*Chilo zacconius* Bleszinsky, 1970; *Chilo partellus* (Swinnhoe, 1884) et *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)) dans un objectif de lutte biologique. *Thèse Doct. Sci.nat., Univ. Montpellier 2*, 184 pp.
- BRENIERE J., 1965. Les trichogrammes parasites de *Proceras saccharariphagus* BöJ., borer de la canne à sucre à Madagascar. *Entomophaga*, **10**, 1-4
- BRENNER S., HORNE R.W., 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 103-110.
- BROWN F., 1989. The Classification and Nomenclature of Viruses : Summary of Results of Meetings of International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canada 1987. *Intervirology*, **30**, 181-186
- BUCHATSKY L.P., BOGDANOVA E.N., KUZNETSOVA M.A., LEBEDINETS N.N., KONONKO A.G., TCHABANENKO A.A., PODRESOVA L.M., 1987. Fields trials of viral preparation Viroden on preimaginal stages of blood-sucking mosquitos. *Med. Parazit Bolezni*, **4**, 69-71.
- BUCHATSKY L.P., RAIKOVA A.P., 1979. Electron microscope study of mosquito denonucleosis virus maturation. *Acta Virol.*, **23**, 170-172.

- BULLER R.M.L., JANIK J.E., SEBRIND E.D., ROSE J.A., 1981. Herpes simplex virus types 1 and 2 help adeno-associated virus replication. *J. Virol.*, **40**, 241-247.
- BURGES H.D., CROIZIER G., HUBER J., 1980. A review of safety test on baculoviruses. *Entomophaga*, **4**, 329-340
- C.A.B International-Commonwealth Institute of Entomology (IIE), 1989. Distribution maps of insects pests, ser A Map N°5 *In* : Distribution Maps of Pests. *Slough (GBR) London*.
- CHAO Y-C., YOUNG III S.Y., KIM K.S., SCOTT H.A., 1985. A newly isolated densovirus from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, **46**, 70-82.
- CHARPENTIER R., 1979. A nonoccluded virus in nymphs of the dragonfly *Leucorrhinia dubia* (Odonata, Anisoptera). *J. Invertebr. Pathol.*, **34**, 95-98.
- CHEN Q., MCINTOSH A. H. and IGNOFFO C.M., 1983. Establishment of a new cell line from the pupae of diamond - back, *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae) *J. Cent. China Teachers Coll.*, **27**, 99
- CLOUTIER C., CLOUTIER C., 1992. Les solutions biologiques de la lutte pour la repression des insectes et acariens ravageurs des cultures. *In* : La lutte biologique. (Vincent C., Coderre D.), pp. 19-88. Tec Doc Lavoisier. Morin, Boucherville (Québec).
- COCK M.J.W., GODFRAY H.C.J., 1985. Report on program for the biological control of selected coconut pest in the Philippines. CIBC, *Imperial College. UK*, 75 pp.
- COTE J.R., 1969. Replication et morphologie du virus de la densovirus. *Thèse Doct., Univ., Fac. Sci., Univ. Montpellier*, 173 pp.
- CROIZIER G., CROIZIER L., 1977. Evaluation du poids moléculaire de la protéine des corps d'inclusion de divers baculovirus d'insectes. *Arch. Virol.*, **55**, 247-250.
- CUNNINGHAM D.A., PATTISTON J.R. and CRAIG R.K., 1988. Detection of parvovirus DNA in human serum using biotinylated RNA hybridization probes. *J. Virol. Methods* , **19**, 279-288
- Current Protocols in Molecular Biology, 1987. (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, Eds.). Wiley, New York.
- DAVIS R.N., SIMON M., DAVIDSON N., 1971. Electron microscopic heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. *Methods Enzymol.*, **21D**, 413-428.
- DEISS V., TRATSCHIN J-D., WEITZ M., SIEGL G., 1990. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology*, **175**, 247-254.
- DELATTRE P., 1978. Conditions d'établissement et de dispersion en Guadeloupe d'*A. flavipes*, parasite des pyrales de la canne à sucre du genre *Diatraea*. *Entomophaga*, **23**, 43-50
- DENTE L., CESARINI G. and CORTESE R., 1983. pEMBL : a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1645-1655
- DESMIER DE CHENON R., MARIAN D., MONSARRAT P., FEDIERE G., SIPAYUNG A., 1988. Recherches sur les agents entomopathogènes d'origine virale. *Oléagineux*, **43**, 107-117.
- DEVAUCHELLE G., 1988. Les baculovirus d'insectes : intérêt et perspectives. *Ann. Soc. Entomol. Fr* , **24**, 403-406

- DIALLO B., 1978. Etude de l'infection à densovirus chez le lépidoptère *Spodoptera littoralis* BOISDUVAL. *Thèse Doct. Spéc., Univ., Montpellier 2*, 141 pp.
- DUMAS B., GERVAIS M., BERGOIN M., JOURDAN M., JOUSSET F.X., 1987. Nouveaux plasmides provoquant des denonucléoses, leur procédé d'obtention et leur application dans la lutte biologique contre les insectes ravageurs. *Brevet n° 87-16764 ROUSSEL-UCLAF/I.N.R.A.*
- DUMAS, B., JOURDAN, M., PASCAUD, A.M. and BERGOIN, M., 1992. Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia coenia* densovirus reveals an organization unique among parvoviruses. *Virology*, **191**, 202-222
- ENGVALL E., PEARLMANN P., 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 3. Quantification of specific antibodies by enzyme-labeled antiimmunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, **109**, 129-135.
- ENTWISTLE P.F., 1983. Viruses for insect pest control. *Span*, **26**, 59-62
- ENTWISTLE P.F., 1987. Virus diseases of Limacodidae. *In* : Slug and Nettle Caterpillars, (M.J.W. Cock *et al* , Eds.), pp. 213-221. *International CAB* .
- FEDERICI B.A., 1976. Pathology and histochemistry of a denonucleosis virus in larvae of a blackfly *Simulium vittatum*. *Proc. Ist. Int. Colloq. Invertebr. Pathol., Kingston Canada*, pp. 341-342.
- FEDIERE G., 1983. Recherches sur des viroses épizootiques de lépidoptères Limacodidae ravageurs de Palmacées. *Thèse Doct. 3ème cycle, Univ. Montpellier 2*. 103 pp.
- FEDIERE G., DESMIER DE CHENON R., MARIAU D., MONTSARRAT P., 1981. Mise en évidence de maladies à épizootie de type denonucléose chez deux chenilles de Limacodidae lépidoptères phyllophages du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire. *Abstr. Colloq. int. Prot. Cult. trop., Lyon (France)*, p. 62.
- FEDIERE G., LERY X., QUIOT J.M., MONSARRAT P., 1990. Replication of the densovirus of *Casphalia extranea* (Lepidoptera Limacodidae) on a established cell line. *J. Invertebr. Pathol.*, **56**, 132-134.
- FEDIERE G., MONSARRAT P., 1985. Mise en évidence d'une virose épizootique chez *Teinorhyncha umbra*, lépidoptère Limacodidae défoliateur du bananier en Côte d'Ivoire. *4th Int. Conf. Impact of Viral Diseases on the Development of Africa, Rabat, (Maroc)*, p. 19.
- FEDIERE G., MONTSARRAT P., MARIAU D., BERGOIN M., 1986. Lutte microbiologique par virus entomopathogènes contre deux lépidoptères Limacodidae ravageur du palmier à huile et du cocotier. *4ème Congr. Protect. Santé hum. Cultures milieu trop. "Nouvelles Stratégies de Protection Intégrée des Cultures et de Lutte contre les vecteurs de Maladie (Régions Tropicales et Subtropicales)"*, Marseille, pp. 363-368.
- FEDIERE, G., HERDER, S., KOUASSI, K.N, LERY, X., DAUTHUILLE, D., BERGOIN, M., 1991. Restriction maps of the *Casphalia extranea* densovirus genome. *Res. Virol.*, **142**, 489-494
- FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B., 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13.
- FELGNER P.L., GADEK T.R., HOLM M., ROMAN R., CHAN H.W., WENZ M., NORTHROP J.P., RINGOLD G.M., DANIELSEN M., 1987. Lipofection : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413-7417.
- FOURIE P.B., HULL P. R., 1980. Urticaria caused by the slug caterpillar *Latoia vivida*, Lepidoptera : Limacodidae. *S. Afr. J. Zool.*, **15**, 56.

- FRANCKI R.I.B., FAUQUET C.M., KNUDSON D.L., BROWN F., 1991. Classification and Nomenclature of Viruses. (Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses). Springer-Verlag, Wien, 450 pp.
- FUKAYA M., NASU S., 1966. A Chilo iridescent virus (CIV) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera : Pyralidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **1**, 69-72
- GALICHET P.F., 1972. Elevage d'*Apanteles flavipes* Cam. (Hym. Braconidae) au laboratoire sur deux espèces du genre *Diatraea* Guil. (Lép. Pyralidae). *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **4**, 255-259
- GARZON S., KURSTAK E., 1976. Ultrastructural studies on the morphogenesis of the densovirus (Parvovirus). *Virology*, **70**, 517-531.
- GENTY P., DESMIER DE CHENON R., MORIN J.P., 1978. Les ravageurs du palmier à huile en Amérique Latine. Lepidoptera : Limacodidae. *Oléagineux*, **33**, 360-382.
- GENTY P., MARIAU D., 1975. Utilisation d'un germe entomopathogène dans la lutte contre *Sibine fusca* (Limacodidae). *Oléagineux*, **30**, 349-354.
- GEORGIS R., 1992. Present and future prospects for entomopathogenic nematode products. *Biocontrol Sci. Technol.*, **2**, 83-89
- GIFFORD J.B., MANN G.A., 1966. Biology rearing and a trial release of *A. flavipes* in Florida to control the sugar cane borer. *J. Econ. Entomol.*, **60**, 44-46
- GINTING U. C., DESMIER de CHENON R., 1987. Nouvelles perspectives biologiques pour le contrôle d'un ravageur très important du cocotier en Indonésie : *Parasa lepida* Cramer, Limacodidae, par l'utilisation de virus. *Oléagineux*, **42** (3), 107-118
- GIRAN F., 1966. Action de la densovirus de lépidoptères sur les mammifères. *Entomophaga*, **11**, 405-407.
- GIRAUD C., DEVAUCHELLE G., BERGOIN M., 1992. The densovirus of *Junonia coenia* (Jc DNV) as an insect cell expression vector. *Virology*, **186**, 207-218.
- GORZIGLIA M., BOTERO L., GIL F., ESPARZA J., 1980. Preliminary characterization of virus-like particles in a mosquito *Aedes pseudoscutellaris* cell line MOS.-61. *Intervirology*, **13**, 232-240.
- GRACE T.D.C., 1962. Establishment of four strains of cells from insect grown *in vitro*. *Nature (London)*, **195**, 788-789.
- GREENWOOD L.K. and MOORE N.F., 1982. The Nudaurelia  $\beta$  group of small RNA containing viruses of insects : serological identification of several new isolate. *J. Invertebr. Pathol.*, **39**, 407-409
- GRIGNON N., 1982. Recherches sur une infection virale chronique dans une lignée cellulaire de lépidoptère. *Thèse Doct. 3<sup>ème</sup> cycle, Univ. Montpellier 2*, 109 pp.
- GROSS O., MEZAMER-TOV I., TAL J., 1990b. Transcriptional organization of *Galleria mellonella* densovirus (GmDNV). *8<sup>th</sup> Int. Congr. Virol., Berlin, 1990*, p. 49.
- GROSS O., TIJSSSEN P., WEINBERG D., TAL J., 1990a. Expression of densovirus Gm DNV in *Galleria mellonella* larvae: size analysis and *in vitro* translation of viral transcription products. *J. Invertebr. Pathol.*, **56**, 175-180.
- HOGGAN M.D., 1971. Small DNA viruses. *In : Comparative Virology* (K. Maramorosch, E. Kurstak Eds.), pp. 43-79. Academic Press, New York.

- HOUILLIER M., 1961. Les pullulations de chenilles (*Parasa pallida* MSCHLR.) dans les palmeraies de savane en 1960. *Cah. ORSTOM*, **15**, 1-5.
- HU Y.Y., SEKI H., KAWASE S., 1986. Electron microscopic studies on DNA from a denonucleosis virus Yamanashi isolate of the silkworm *Bombyx mori*. *Appl. Entomol. Zool.*, **21**, 613-619
- HUNTER D.K., HOFFMANN D.F., 1970. A granulosis virus of the almond moth, *Cadra cautella*. *J. Invertebr. Pathol.*, **16**, 400-407
- ISHIMORI N., 1934. Contribution à l'étude de la grasserie du ver à soie (*Bombyx mori*). *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1169-1170.
- JOURDAN M., 1990. Clonage et séquençage du génome infectieux d'un parvovirus d'insecte, le densovirus du lépidoptère *Junonia coenia*. *Thèse. Doct, Univ. Montpellier 2*, 172 pp.
- JOURDAN M., JOUSSET F.X., GERVAIS M., SKORY S., BERGOIN M., DUMAS B., 1990. Cloning of the genome of a densovirus and rescue of infectious virions from recombinant plasmid in the insect host *Spodoptera littoralis*. *Virology*, **179**, 403-409.
- JOUSSET F.X., BARREAU C., BOUBLIK Y., and CORNET M., 1993. A parvo-like virus persistently infecting a C6/36 clone of *Aedes albopictus* mosquito cell line and pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. *Virus Res.*(in press)
- JOUSSET F.X., JOURDAN M., COMPAGNON B., MIALHE E., VEYRUNES J-C., BERGOIN M., 1990. Restriction maps and sequence homologies of two densovirus genomes. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2463-2466.
- 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.D*, **275** , 3043-3046
- JOUSSET, F.X., COMPAGNON, B., and BERGOIN M., 1986. Comparison of the restriction map and infectivity of the genomes of three densovirus. *In* : Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. (Samson R.A., Vlcek J.M., and Peters D. Eds.), pp.121. *Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, The Netherlands.*
- JUCKES I. R. M., 1970. Viruses of the pine emperor moth. *Bull. S. Afr. Soc. Plant Pathol.*, **4**, 18.
- KAWASE S , 1985. Pathology associated with densovirus. *In* : Viral Insecticides for Biological Control (K. Maramorosch, K.E. Sherman, eds.), pp. 197-231. Academic Press, New York.
- KAWASE S., BANDO H., CAI Y.M., 1983. Purification of a denonucleosis virus from silkworm feces. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, **52**, 547-548.
- KELLY D. C., ROBERTSON J. S., 1973. Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. Gen. Virol.*, **20** (suppl.), 17-41.
- KELLY D.C., AYRES M.D., SPENCER L.K., RIVERS C.F., 1980a. Denonucleosis virus 3 : a recent insect parvovirus isolate from *Agraulis vanillae* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Microbiologica*, **3**, 455-460.
- KELLY D.C., BARWISE A.H., WALKER I.O., 1977. DNA contained by two denonucleosis viruses. *J. Virol.*, **21**, 396-407.

- KELLY D.C., BUD H.M., 1978. Densonucleosis virus DNA : analysis of fine structure by electron microscopy and agarose gel electrophoresis. *J. Virol.*, **40**, 33-43.
- KELLY D.C., ELLIOT R.M., 1977. Polyamines contained by two densonucleosis viruses. *J. Virol.*, **21**, 408-410
- KELLY D.C., MOORE N.F., SPILLING C.R., BARWISE A.H., and WALKER I.O., 1980b. Densonucleosis virus structural proteins. *J. Virol.*, **36**, 224-235.
- KOUASSI K.N., 1988. Le baculovirus de *Latoia viridissima*, Lépidoptère Limacodidae, ravageur du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire : Caractérisation et production en culture de cellules. *D.E.A d'Ecologie Trop. Univ. Nat. de Côte d'Ivoire* 102 pp.
- KOUASSI, K. N., FEDIERE, G., LERY, X., PHILIPPE, R., BERGOIN, M., 1991. Mise en évidence d'un baculovirus de polyédrose nucléaire chez *Latoia viridissima*, Lépidoptère Limacodidae, ravageur du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire. *Oléagineux*, **46**(2), 53-59
- KURSTAK E., 1972. Small DNA densonucleosis virus. *Adv. Virus Res.*, **17**, 207-241.
- KURSTAK E., COTE J.R., 1968b. Présence de particules associées avec le virus à ADN de la densonucléose (VDN) chez un invertébré. *Rev.Can.Biol.*, **27**, 357-359.
- KURSTAK E., COTE J.R., 1969. Proposition de classification du virus de la densonucléose (VDN) basée sur l'étude de la structure moléculaire et des propriétés physicochimiques. *C. R. Acad. Sci. D*, **268**, 616-619.
- KURSTAK E., TIJSSEN P., GARZON S., 1977. Densonucleosis viruses (Parvoviridae). *In* : Atlas of Invertebrate and Plant Viruses (K. Maramorosh Ed.), pp. 67-91. Academic Press, New York.
- KURSTAK E., VAGO C., 1967. Transmission du virus de la densonucléose par le parasitisme d'un hyménoptère. *Rev. Can. Biol.*, **26**, 311-316
- KURSTAK, E., VERNOUX, J-P., NIVELEAU, A., and ONJI, P.A., 1971. Visualisation du DNA du virus de la densonucléose (VDN) à chaînes monocaténares complémentaires de polarités inverses plus ou moins. *C. R. Acad. Sci. D*, **272**, 762-765.
- LAUGHLIN C.A., TRATSCHIN J.D., COON H., and CARTER B.J., 1983. Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene*, **23**, 65-73.
- LAVIE P., FRESNAYE J., VAGO C., 1965. L'action de la virose à noyaux denses sur les larves de *Galleria mellonella* dans les ruches. *Ann. Abeille*, **8**, 321-323.
- LEBEDEVA O.P., KUZNETSOVA M.A., ZELENKO A.P., GUDZ-GORBANA.P., 1973. Investigation of a virus disease of the densonucleosis type in a laboratory culture of *Aedes aegypti*. *Acta Virol.*, **17**, 253-256.
- LEBEDINETS N.N., TSARICHKOVA D.B., KARPENKO L.V., KONONKO A.G., BUCHETSKII L.P., 1978. (Etude de l'action du virus de la densonucléose de *Aedes aegypti* L. sur les stades préimaginaux de diverses espèces de moustiques hématophages). En russe. *Mikrobiol. Zh.*, **40**, 352-356.
- LECOUSTRE R., et de REFFYE P., 1986. La théorie des variables régionalisées, ses applications possibles dans le domaine épidémiologique aux recherches agronomiques en particulier sur le palmier à, huile et le cocotier. *Oléagineux*, **41**, 541-548.

- LECOUSTRE R., FARGETTE D., FAUQUET C. and DE REFFYE P., 1989. Analysis and mapping of the spatial spread of African cassava mosaic virus using geostatics and kriging technique. *Phytopathology*, **79**(9) 913-920
- LEPESME P., 1947. Les Insectes des Palmiers. Lechevalier, Paris, 903 pp.
- LI Y., BERGOIN M., 1991. *In vivo* and *in vitro* transcription and translation of structural and non structural genes of *Junonia coenia* densovirus. *4<sup>th</sup> Parvovirus Workshop, Elsinore (Denmark), August 18-26*, p. 47.
- LI Y., BERGOIN M., 1992. Expression of the *Junonia coenia* densovirus (JcDENV) genome. *Abstr. Annu. Meeting Soc. Invertebr. Pathol., Heidelberg (Germany), August 16-21, 1992*, p. 262.
- LI Y., JOUSSET F.X., GIRAUD C., ROLLING F., QUIOT J.M., BERGOIN M., 1990. Comparative efficiency of infection and transfection of three cell lines with the *Junonia coenia* densovirus and its cloned genomic DNA. *Proc. Abstr. 5th inter. Colloq. Invertebr. Pathol. Microbial Control, Adelaide (Australia), 20-24 August 1990*, p.468.
- LI-REN Z., DI-HUA C., HUAI-YU C., SHENG-LIANG.C., 1982. Isolation, purification and structure of flacherie virus of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Virol. Sin.*, **1**, 55-61
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., 1985. A parvo-like virus disease of penaid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **45**, 47-53.
- LONGWORTH J.F., 1978. Small isometric viruses of invertebrates. *Adv. Virus Res.*, **23**, 103-157.
- LONGWORTH J.F., TINSLEY T.W., BARWISE A.H., WALKER I.O., 1968. Purification of a non-occluded virus of *Galleria mellonella*. *J.Gen.Virol.*, **3**, 167-174.
- MACEDO N. and BOTELHO P.S.M., 1988. Controle integrado de broca de cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera, Pyralidae). *Brasil açucarero*, **106**, 2-14
- MACEDO N. and BOTELHO P.S.M., 1986. Ten years of biological control of *D. saccharalis* by *Apanteles flavipes*, in Sao Paulo state (Brazil). *Congr. Society Sugar Cane Technologists*. **19**, August 21-31 Jakarta (IDN) ISSCT, pp. 551-562
- MACEDO N., BOTELHO P.S.M., PAVAN O.H.O, 1989. Utilisation d'insecticides viraux et de régulateurs de croissance pour le contrôle de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) par voie aérienne. *Proc. 20th ISSCT Congr., October 12-21, Sao Paulo (Brazil)*
- MAEDA S., KAWAI T., WATANABE H., 1982. Protein characteristics of a denonucleosis virus of the silkworm *Bombyx mori*. *Abstr. 3rd Int. Colloq. Invertebr. Pathol., Brighton, (United Kingdom )*, p. 222.
- MAEDA S., WATANABE H., 1978. Immunofluorescence observation of the infection of denonucleosis virus in the silkworm *Bombyx mori*. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.*, **22**, 98-101.
- MANIATIS T., FRITSH E.F., SAMBROOK J., 1989. Molecular Cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (New York).
- MARGARIDO L.A.C., et CASTILHO H.J., 1988. Détermination du niveau de dommages économiques du foreur de la canne à sucre, *Diatraea saccharalis* (F.), pour les distilleries d'alcool. *Brasil Açucarero*, **106**, 41-46.

- MARI J., BONAMI J.R., 1988. PC 84, a parvo-like virus from the crab *Carcinus mediterraneus* : pathological aspects, ultrastructure of the agent and first biochemical characterization. *J. Invertebr. Pathol.*, **51**, 145-156.
- MARIAU D., 1982. Les ravageurs phyllophages du palmier à huile et du cocotier, *Oléagineux* , **37**, 3-8
- Mariau D., 1993. La lutte intégrée en palmeraie : bilan . *Oléagineux* (sous presse)
- MARTIGNONI M.E and IWAI P., 1986. A Catalog of Viral Diseases of Insects Mites and Ticks. *4th Ed. Gen. Techn. Rep. PNW-195 Portland OR : US* 51pp.
- MARTIGNONI M.E., IWAI P.J., 1981. A Catalogue of Viral Diseases of Insects, Mites and Ticks. *In : Microbial Control of Pest and Plant Diseases, 1970-1980* (H.D. Burges Ed.),. pp. 897-911. Academic Press, London.
- MATHERON G., 1965. Les variables régionalisées et leur estimation. Une application de la théorie des fonctions aléatoires aux sciences de la nature. Masson, Paris , 305 pp.
- MATTHEWS R. E. F, 1982. Classification and Nomenclature of Viruses. (Fourth Report of the I.C.T.V.). *Intervirology*, **17**, 1-199.
- MEINKOTH J. et WAHL G., 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports, *Anal. Biochem.*, **138**, 267-284
- MEYNADIER G., AMARGIER A., GENTY R., 1977a. Une virose de type denonucléose chez le lépidoptère *Sibine fusca* Stoll. *Oléagineux*, **32**, 357-361.
- MEYNADIER G., GALICHET P.F., VEYRUNES, J.C. and AMARGIER A., 1977b. Mise en évidence d'une denonucléose chez *Diatraea saccharalis* (Lep. Pyralidae). *Entomophaga*, **22**, 115-120.
- MEYNADIER G., MATZ G., VEYRUNES J.C. and BRES N., 1977c. Virose de type denonucléose chez les orthoptères. *Ann. Soc. entomol. Fr.*, **13**, 487-493.
- MEYNADIER G., VAGO C., PLANTEVIN G. and ATGER P., 1964. Virose d'un type inhabituel chez le lépidoptère *Galleria mellonella* L. *Rev. Zool. Agric. Appl.*, **63**, 207-208.
- MIALHE E., QUIOT J.M., PARADIS S., 1984. Etablissement de deux lignées cellulaires de *Spodoptera littoralis* (Lep. : Noctuidae), permissives pour des virus susceptibles d'être utilisés en lutte microbiologique. *Entomophaga*, **29**, 347-350.
- MOORE N.F., KELLY D.C., 1980. Interrelationship of the proteins of two insect parvoviruses (denonucleosis virus type 1 and 2). *Intervirology*, **14**, 160-166.
- MOREL G., VERCAMBRE B., BERGOIN M., LOUIS C., 1981. Une polyédrose cytoplasmique chez le foreur ponctué *Chilo sacchariphagus* BÖJ (Lep. Pyralidae). *Agron. Trop.*, **36**, 378-381
- NAKAGAKI M., KAWASE S., 1980a. DNA of a new parvo-like virus isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, **35**, 124-133.
- NAKAGAKI M., KAWASE S., 1980b. Structural proteins of denonucleosis virus isolated from the silkworm *Bombyx mori* infected with the flacherie virus. *J. Invertebr. Pathol.*, **36**, 166-171.
- NAKAGAKI M., KAWASE S., 1982. Capsid structure of the denonucleosis virus of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, **51**, 420-424.
- NARBONI P., 1979. Application de la méthode régionalisée à des faits du Gabon. *Note statistique N° 18 CTFT, Nogent sur Marne*.

- OUCHTERLONY O., 1948. Antigen antibody reaction in gels. *Ark. Keni. Minter. Geol. B.*, **26**, 16.
- PACUMBABA E.P. et PADOUA L.E., 1988. Criblage d'isolats de *B. thuringiensis* contre les chenilles du cocotier (Lépidoptera : Limacodidae). *Philipp. J. Coconut studies*, **13**, 23-30
- PAVAN O.H.O., BOUCIAS D.G., ALMEIDA L.C., GASPARI J.O, BOTHELHO P.S.M., DEGASPARI N., 1983. Virus de granulose de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) I patogenicidad, repeticion y ultraestructura. *Proc. 17th Congr. Int. soc. Sugar Cane Technologist, La Habana*, **2(2)** pp. 645-659.
- PAYNE C. C., RIVERS C. F., 1976. A provisional classification of cytoplasmic polyhedrosis viruses based on the sizes of the RNA genome segment. *J. Gen. Virol.*, **33**, 71-85.
- PAYNE C.C., 1982. Insect viruses as control agents. *Parasitology*, **84**, 35-77.
- POITOUT S., BUES R., 1970. Elevage de plusieurs espèces de lépidoptères noctuidae sur la milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. *Ann. Zool. Anim.*, **2**, 79-91.
- POLLET A., 1981. *Maliarpha separatella* Ragonot (Pyralidae, Phycitinae) sur le riz irrigué en Côte d'Ivoire centrale (Kotiessou). Données biologiques et mécanismes régulateurs des populations naturelles. *Thèse Doct. Sci. nat., Univ. Paris 6. ORSTOM, Paris* 230 pp.
- QUIOT J. M., 1982. Etablissement d'une lignée cellulaire (SPC-Bm 36) à partir d'ovaires de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Sericologia*, **22**, 25-31.
- QUIOT J.M., ODIER F., BERGOIN M., VAGO C., 1973. Etude de la pathogénèse et titrage d'un virus de denonucléose en culture de cellules de lépidoptères. *C. R. Acad. Sci. D.*, **276**, 2997-2999.
- QUIOT J.M., VAGO C., LUCIANI J., AMARGIER A., 1970. Développement du virus de la denonucléose en cultures organotypiques de lépidoptères. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **95**, 341-348.
- REINGANUM C., O' LOUGHLIN G. T, HOGAN T. W., 1970. A nonoccluded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera : Gryllidae). *J. Invertebr. Pathol.*, **16**, 214-220.
- REINGANUM C., ROBERTSON J. S., TINSLEY T.W, 1978. A new group of RNA viruses from insects. *J. gen. Virol.*, **40**, 195-202.
- RHODE SL. III, and IVERSEN P., 1990. Parvovirus genomes : DNA sequences. *In : Handbook of Parvoviruses* (P. Tijssen, Ed.), **1**, pp 31-57 CRC Press, Boca raton, FL. USA.
- RIBA G., SILVY C., 1989. Combattre les Ravageurs des Cultures : Enjeux et Perspectives. INRA, Paris, 230 pp.
- RIVERS C.F., LONGWORTH J.F., 1972. A nonoccluded virus of *Junonia coenia*. (Nymphalidea : Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.*, **20**, 369-370.
- ROE R.M., HAMMOND A.M.Jr, REGAN T.E. and HENSLEY S.D., 1981. A bibliography of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius), 1887-1990. *Agr. Rev. Manuals*, ARM-S-20
- ROLLING F., 1992. Vecteurs dérivés du densovirus de *Junonia coenia* (JcDNV) exprimant sous forme épisomale ou intégrée des gènes étrangers dans des cellules d'insectes. *Thèse Doct. Aix Marseille 2*, 153 pp.
- ROSE J.A., 1974. Parvovirus reproduction. *In : Comprehensive Virology* (H. Fraenkel-conrat, R.R. Wagner, Eds.), **3**, pp 1-61. Plenum Press, New York.

- SAMULSKI R.J., BERNS K.I., TAN M., MUZYCZKA N., 1982. Cloning of adeno-associated virus into pBR322 : Rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Nat Acad. Sci. USA*, **79**, 2077-2081.
- SAMULSKI R.J., CHANG LS., SHENK T., 1987. A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised *in vitro* and its use to study viral replication. *J. Virol.*, **61**, 3096-3101.
- SAMULSKI R.J., SRIVASTAVA A., BERNS K.I., MUZYCZKA N., 1983. Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids : gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell*, **33**, 135-143.
- SEKI H., 1984. Mode of inheritance of the resistance to the infection with the densovirus (Yamanashi isolate) in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, **53**, 472-475
- SHIMIZU T., 1975. Pathogenicity of an infectious flacherie virus of the silkworm *Bombyx mori*, obtained from sericultural farms in the suburbs of Ina city. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, **44**, 45-48.
- SHIMIZU T., TAUCHI S., ARAKAWA A., 1991. Protein A coated latex linked antisera test for the detection of the densovirus of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, **57**, 124-125
- SIMONDS F.J., FRANZ J.M. et SAILER R.I., 1976. History of biological control. In : Theory and Practice of Biological Control. (C.B. Huffaker, P.S. Messenger Eds.), pp. 17-35 Academic Press, New York. 788 pp.
- SINURAYA L., DESMIER DE CHENON R., 1988. Biological control of an oil palm pest in North Sumatra, *Setothosea asigna* (Van Eecke) (Lepidoptera Limacodidae), using a virus. *Biotrop spec.*, **36**, 85-94
- SIPAYUNG A., DESMIER DE CHENON R., SUDHARTO P., 1989. Les chenilles défoliatrices au nord Sumatra, en Indonésie. *Bull. Pusat Penelitian Marihat (IDN)*, **9**(3), 14-32.
- SMITH K.M., XEROS N, 1954. A comparative study of different types of viruses and their capsules in the polyhedroses and granuloses of insects. *Parasitology*, **44**, 400-406.
- SOUTHERN E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- STEINHAUS E. A., MARSH G. A., 1962. Report of diagnosis of diseased insects 1951-1961. *Hilgardia*, **33**, 426-479.
- STELHE H., 1956. Les insectes nuisibles de la canne à sucre. Leurs parasites naturels et la lutte biologique aux Antilles Françaises *J. Agric. Trop. Bot. Appl.* 71-75
- STITZ, L, HENGARTNER, H., ALTHAGE, A. and ZINKERNAGEL, R. M., 1988. An easy and rapid method to screen large number of antibodies against internal cellular determinants. *J. Immunol. Methods.*, **106**, 211-216.
- SUMMERS M.D., SMITH G.E., 1987. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors Insect Cell Culture Procedures. *Bull. Texas Agric. Exp. Stat*, n° 1555. 56 pp.
- SUN F.L., GUIHUI M., MINGSHU C., 1981. A new insect virus of *Pieris rapae* L. Isolation and characterization of the virus. *Acta Microbiol. Sin.*, **21**, 41-44.

- SUTO C., KAWAMOTO F., KUMADA N., 1979. A new virus isolated from the cockroach, *Periplaneta fuliginosa* (Serville). *Microbiol. Immunol.*, **23**, 207-211.
- SUTTER G.R., 1973. A nonoccluded virus of the army cutworm. *J. Invertebr. Pathol.*, **21**, 62-70.
- TANADA, 1961. The epizootiology of virus diseases in field populations of the Armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth). *J. Insect pathol.*, **3**, 310-323
- THOMAS G.M., POINAR G.O., 1973. Report of diagnoses of diseases insects 1962-1972. *Hilgardia*, **42**, 261-360.
- THOMSON J.V., REDLINGER L.M., 1968. Isolation of a nuclear polyhedrosis virus from the almond moth, *Cadra cautella*. *J. Invertebr. Pathol.*, **10**, 441-444
- TIJSSSEN P, ARELLA M., 1985. Restriction map and structure of the DNV DNA of *Galleria mellonella*. *1st EMBO Workshop Parvoviruses, Grangeneuve (Switzerland)*.
- TIJSSSEN P, Ed., 1990. Handbook of Parvoviruses. CRC Press, Boca Raton (Florida), **1**, 304pp.
- TIJSSSEN P, Ed., 1990. Handbook of parvoviruses. CRC Press, Boca Raton(Florida), **2**, 312 pp.
- TIJSSSEN P., 1990. Complete sequence and organization of genome of *Galleria mellonella* denonucleosis virus (GmDNV). *8<sup>th</sup> int. Congr. Virol., Berlin (Germany)*, P 20-020, p. 240.
- TIJSSSEN P., ARELLA M., KAWASE S., 1990. Molecular biology of denonucleosis virus. *In : Handbook of Parvoviruses (P. Tijssen Ed.)*, **1**, pp. 283-291. CRC Press, Boca Raton, FL. USA.
- TIJSSSEN P., KURSTAK E., 1981. Biochemical, biophysical, and biological properties of denonucleosis virus (parvovirus). III. Common sequences of structural proteins. *J. Virol.*, **37**, 17-23.
- TIJSSSEN P., KURSTAK E., SU T.M., GARZON S., 1982. Denonucleosis virus : unique pathogens of insects. *In : Invertebrate Pathology and Microbial Diseases, Proc. 3rd. int. Colloq. Invertebr. Pathol., Brighton*, pp. 148-153.
- TIJSSSEN P., TIJSSSEN-VAN DER SLIKKE T., KURSTAK E., 1977. Biochemical, biophysical and biological properties of denonucleosis virus. Part 2. Two types of infectious virions. *J. Virol.*, **21**, 225-231.
- TIJSSSEN P., VANDENHURK J., KURSTAK E., 1976. Biochemical, biophysical and biological properties of denonucleosis virus structural proteins. *J. Virol.*, **17**, 686-691.
- TING-WEI C., LING-MEI X., WAN-HUA C., YUAN-YI H., 1980. Signalement de quelques virus d'insectes forestiers. *K'un-ch'ung Hsuek Pao*, **23**, 443-444.
- TIONG R.H.C., MUNROE D.D., 1976. Microbial control of an outbreak of *Darna trima* (MOORE) on oil palm. (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Sarawak (Malaysian Bornéo). *Malaysian Int. Agric. Oil Palm Conf.*, p. 1-16.
- TRUFFAUT N., BERGER G., NIVELEAU A., MAY P., BERGOIN M., VAGO C., 1967. Recherches sur l'acide nucléique du virus de la denonucléose du lépidoptère *Galleria mellonella* L. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **21**, 469-474.
- VAGO C., DUTHOIT J.L. and DELAHAYE F., 1966a. Les lésions nucléaires de la "virose à noyaux denses" du lépidoptère *Galleria mellonella*. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **18**, 344-349

- VAGO C., MEYNADIER G., DUTHOIT J.L., 1964. Etude d'un nouveau type de maladie à virus chez les lépidoptères. *Ann. Epiphyties*, **15**, 473-476.
- VAGO C., QUIOT J. M. and LUCIANI J., 1966b. Infection de culture de tissus de lépidoptères avec le virus purifié de la densonucléose. *C. R. Acad. Sci. D*, **263**, 799-800.
- VAIL P. V., JAY D. L., HUNTER D. K., 1973. Infectivity of a nuclear polyhedrosis virus from the alfalfa looper *Autographa californica* after passage through alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, **21**, 16-20.
- VAN DER GEEST L.P.S., VAN DER LAAN P.A., 1972. Insect pathogens available for distribution. *In : Microbial Control of Insects and Mites* (Burgess, H. D. and Hussey, N. W. Eds.), pp. 733-739, Academic Press, London.
- VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H., 1971. Immunoassay using antigen-enzyme. *FEBS Lett.*, **15**, 232
- VAUGHN J.L., GOODWIN R. H., THOMPSON G.J., Mc CAWLEY P., 1977. The establishment of cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *In Vitro*, **13**, 213-217.
- VIERA J., MESSING J., 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion, mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, **19**, 259-268.
- VOGELSTEIN B., GILLESPIE D., 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 615-619.
- WATANABE H., MAEDA S., 1978. Genetic resistance to peroral infection with a densonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **47**, 209-214.
- WATANABE H., MAEDA S., MATSUI M., SHIMIZU T., 1976. Histopathology of the midgut epithelium of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with a newly isolated virus from the flacherie diseased larvae. *J. Seric. Sci. Jap.*, **45**, 29-34.
- WEISER J., VAGO C., 1966. A newly described virus of the winter moth *Operophtera brumata* Hübner (Lep. Geometridae). *J. Invertebr. Pathol.*, **8**, 314-319.
- WILLIAMS J.R., METCALFE J. R, MUNGOMERY R.W., MATHES R., 1969. Pests of Sugar Cane. *Elsevier, Amsterdam*, 548 pp.
- WRAIGHT S.P. et ROBERTS D.W., 1987. Insect control effort with fungi. *Dev. Industr. Microbiol.*, **28**, suppl. (2), 77-87
- YANISH-PERRON C., VIERA J., MESSING J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13mp18 and puc19 vectors. *Gene*, **33**, 103-199.
- ZEDDAM J.L., 1989. Etude du ribovirus pathogène du lépidoptère *Latoia viridissima* (HOLLAND 1893) ravageur de palmacées en Côte d'Ivoire. Caractérisation du virus, diagnostic sérologique et clonage moléculaire. *Thèse Doct., Univ. Montpellier 2*, 101 pp.

## ANNEXE

## SOLUTIONS TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE

## I. Milieux de culture

## A. Culture de bactéries

## 1°) Milieu LB : pH 7,5

Bactotryptone	10 g/l
Bacto yeast extract	5 g/l
NaCl	5 g/l

## 2°) Milieu LB solide :

Milieu LB	qsp
Agar	15 g / l

Autoclaver LB et LB solide, laisser refroidir jusqu'à 50°C ,  
puis additionner : Ampicilline 50 mg / l

## B. Culture cellulaire

## 1°) Milieu Grace (pH 6,4)

Milieu Grace (Gibco)	qsp
Pénicilline	100 mg / ml
Streptomycine	100 mg / ml
Vitamines	Qsp
Sérum de veau (svf)	15 % v/v

## 2°) Le milieu TG3

Il est constitué par du milieu TC-100 (Gibco) additionné de 0,37 g/l d'acide  $\alpha$ -cétoglutarique, 0,4 g/l de  $\beta$ -D fructose 0,055g/l d'acide fumarique, 0,67 g/l d'acide malique, 0,06 g/l d'acide succinique, 2,7 g/l de saccharose, 0,2 g/l de chlorure de choline, 0,2 g/l de  $\beta$ -alanine, 0,35 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 3,33 g/l d'hydrolysate de lactalbumine, 0,05 g/l de streptomycine, 0,125 g/l de pénicilline, le pH de la solution étant ajusté à 6,2 puis additionné de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco).

**II. Tampons d'extraction des virions et de purification de l'ADN****A. PBS (1X) (pH 7,4)**

NaCl	137 mM
KCl	2,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM

**B. TRIS - SDS (pH 7,8)**

Tris-Hcl	0,05 M
SDS	0,06 % (p/v)

Pour le broyage des larves, additioner 2% d'acide ascorbique et 0,02% de NaN<sub>3</sub>.

**C. TE (pH 8)**

Tris -Hcl	10 mM
EDTA	1 mM

**D. Tampon de transfection HEBS (pH 7,05 à 7,1)**

NaCl	137 mM
D+glucose	6 mM
KCl	5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7 mM
Hepes	20 mM
DNA thymus de veau	15 µg/ml

**III. Tampon d'enzymes et d'électrophorèse****A. Tampon de l'ADN polymérase d'*E. coli* (Klenow)**

Tris-HCl -pH7,2	50 mM
DTT	10 mM
BSA	50 mg/ml

**B. Tampon CIP de déphosphorylation**

Tris - HCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1mM
Zncl <sub>2</sub>	0,1mM
Spermidine	0,1 mM

**C. TEP (pH 8)**

Tris-phosphate	90 mM
EDTA	20 mM

**IV Solutions et tampons d'hybridation****A. SSC (1X) (pH 7)**

NaCl	150 mM
Sodium citrate	15 mM

**B. solution d'hybridation**

5XSSC	qsp
Agent bloquant	0,5 % p/v
N lauryl sarcosine	0,1 %
SDS	0,02 %

**V. Solution de préparation de bactéries compétentes : Pipes**

CaCl <sub>2</sub>	60 mM
glycérol,	15%
Pipes pH 7,5)	10mM

# STUDY OF THE GENOME OF TWO DENSOVIRUSES ISOLATED FROM CULTURE PEST LEPIDOPTERA : *CASPHALIA EXTRANEA* IN COTE D'IVOIRE AND *DIATRAEA SACCHARALIS* IN BRAZIL, APPLICATION TO DIAGNOSIS BY NUCLEIC PROBE.

## SUMMARY

The sizes of the genomic DNA of both *Casphalia extranea* and *Diatraea saccharalis* densoviruses (*Ce*DNV and *Ds*DNV) were estimated to be 4.9 kb and 5.95 kb, respectively. Twenty restriction sites were mapped on the *Ce*DNV DNA and 41 on the *Ds*DNV DNA. The *Hind*III A and D fragments (about 50 % of the genome) of *Ce*DNV DNA were cloned (plasmid pCeHindIIIA+D). The quasi total genome of *Ds*DNV was cloned and the resulting plasmid pDst50 transfected to the lepidopteran Px cell line, (from *plutella xylostella*) generated typical infection. Owing to similarities between *Ds*DNV and *Jc*DNV restriction maps, we constructed chimaeric genomes by substitution of the *Bam*HI internal fragment of *Jc*DNV DNA from recombinant plasmid pBRJH by its *Ds*DNV counterpart. Chimaeric virions consisting of *Ds*DNV inverted terminal repeats and *Bam*HI *Jc*DNV internal fragment were produced indicating that the *Ds*DNV terminal hairpins could act as the replication origin for *Jc*DNV.

We determined the distribution of the *Ce*DNV in natural population of *C. extranea* larvae collected during the 1991 outbreak in the Eloka oil palm plantation. The occurrence of *Ce*DNV was assessed by dot blot DNA-DNA hybridization on nylon membrane using a digoxigenin-11dUTP labeled viral probe (plasmid pCeHindIIIA+D). Two samplings at two weeks interval were performed. The results indicated a weak correlation between the presence of *Ce*DNV and its spatial position. However, globally larvae were distributed and *Ce*DNV spread randomly in the plot. The percentage of infection increased whereas number of larvae decreased significantly.

**Keys words :** Densovirus, *Casphalia extranea*, *Diatraea saccharalis*, restriction map, DNA cloning, transfection, epizootiology, nucleic probe.

1993

KOUASSI Nazaire

Université de Montpellier II - Science et Technique du Languedoc.

**ETUDE DU GENOME DES DENSOVIRUS DE LEPIDOPTERES RAVAGEURS DE CULTURES : *CASPHALIA EXTRANEA* EN COTE D'IVOIRE ET *DIATRAEA SACCHARALIS* AU BRESIL, APPLICATION AU DIAGNOSTIC PAR SONDE NUCLEIQUE.**

**RESUME**

Nous avons analysé le génome des densovirus de *C. extranea* (*CeDNV*) et de *D. saccharalis* (*DsDNV*). Les tailles de ces génomes ont été estimées à 4,9 kb pour le *CeDNV* et à 5,95 kb pour celui du *DsDNV*. Vingt sites de restriction ont été cartographiés sur le génome du *CeDNV* et 41 sites sur celui du *DsDNV*.

La séquence du génome du *CeDNV* correspondant aux fragments *Hind*III A et D (approx. 50% du génome) a été clonée dans le plasmide pEMBL 19+. Le plasmide correspondant, pCeHindIII A+D, nous a servi à la mise au point d'une sonde nucléique. La séquence quasi-complète du génome du *DsDNV* a été clonée dans le même vecteur générant le plasmide pDst50. Ce plasmide transfecté dans la lignée cellulaire Px de *Plutella xylostella* a conduit à une infection typique avec production de virions. Du fait d'analogies entre les cartes de restriction des génomes du *DsDNV* et du *JcDNV*, des génomes chimères ont été construits par substitution réciproque des séquences internes codantes de l'ADN du *JcDNV* cloné (pBRJH) et celles du pDst50. L'analyse des virions chimères montre que les répétitions terminales inversées du *DsDNV* peuvent servir d'origine de réplication pour les séquences codantes du *JcDNV*. Cet échange de séquence ne modifie pas la spécificité d'hôte.

Une méthode de diagnostic de la virose de *C. extranea* par sonde nucléique froide a été mise au point et appliquée à l'analyse de l'état sanitaire des populations larvaires récoltées au cours de deux prélèvements à deux semaines d'intervalle (Septembre-Octobre 1991) dans les plantations de palmiers à huile d'Eloka (Côte d'Ivoire). La présence du virus a été détectée après dépôt de broyat larvaire sur membrane puis hybridation avec la sonde ADN viral cloné (pCeHindIII A+D). L'analyse statistique des résultats effectuée par la méthode des variables régionalisées a montré que la distribution des larves et la dissémination de la virose dans la plantation se faisaient au hasard avec une évolution spatio-temporelle relativement rapide de la virose dans la parcelle choisie.

**Mots clés :** Densovirus, *Casphalia extranea*, *Diatraea saccharalis*, carte de restriction, clonage du génome, transfection, épizootiologie, sonde nucléique.