

Etude du Ribovirus de *Latoia viridissima* Holland, ravageur de palmacae en Afrique de l'Ouest.

Caractérisation - Diagnostic sérologique - Suivi épidémiologique

J.L. ZEDDAM (1), R. PHILIPPE (2), J.C. VEYRUNES (3), G. FEDIERE (1), D. MARIAU (4), M. BERGOIN (3)

Résumé. — Les chenilles du lépidoptère Limacodidae *Latoia viridissima* (Holland 1893) représentent un des principaux défoliateurs de Palmacées en Côte-d'Ivoire. Une revue des entomopathogènes locaux régulant les populations naturelles de ce ravageur a précédemment montré que l'agent de contrôle le plus efficace était un virus. Une caractérisation physico-chimique du virus responsable des épizooties en précise ici plusieurs propriétés essentielles. Parmi celles-ci la nature du génome (ARN monocaténaire polyadénylé) le rapprochant clairement des Picornaviridae. Cependant, une composition polypeptidique particulière le distingue des quelques membres de cette famille actuellement connus chez les insectes, membres avec lesquels, par ailleurs, aucune parenté antigénique n'est relevée. Afin de détecter rapidement et à faible coût ce ribovirus, appelé LvV, dans les échantillons biologiques, un test unimunoenzymatique (ELISA) faisant intervenir la technique en "sandwich" a été mis au point. Les seuils minimaux de sensibilité du test ont été établis pour du virus purifié et du virus se trouvant en présence de fortes concentrations de tissus de l'hôte. A l'aide de cet outil de diagnostic sérologique, l'aspect épidémiologique de la maladie se développant en plantation a pu être abordé. Le suivi mené sur le terrain durant trois mois au cours de deux pullulations successives de *L. viridissima* a précisé l'incidence de la virose à l'émergence des jeunes chenilles, son évolution chez les différents stades larvaires et son impact sur la démographie du ravageur, par ailleurs, le clonage moléculaire du génome viral a été entrepris, donnant les premières indications sur l'organisation de l'ARN de LvV. A partir de la partie d'ADN complémentaire ainsi obtenue, différents types de sondes nucléiques ont été construits faisant intervenir des marquages radioactifs ou à l'aide de nucléotides biotinylés. La capacité de ces diverses sondes, à ADN bicaténaires ou à ARN monocaténaires (ribosondes) à détecter l'ARN viral, a été testée.

Mots clés : *Latoia viridissima*, huile de palme, ribovirus, clonage génome.

INTRODUCTION

Dans les écosystèmes artificiels créés par l'homme, en particulier les agroécosystèmes, certaines composantes du milieu favorisent les pullulations de populations animales ou végétales responsables d'importantes pertes économiques. Les moyens de lutte contre ces nuisibles font le plus souvent appel à des pesticides chimiques qui, bien que généralement efficaces, ont un coût élevé et ne sont pas exempts de graves inconvénients ; les plus connus étant leur toxicité pour l'environnement et l'apparition de phénomènes de résistance chez les populations cibles. Aussi, une voie de recherche plus biologique consistant à tirer partie de l'existence de microorganismes régulant naturellement les populations animales et végétales connaît-elle un essor important. L'IRHO mène depuis plusieurs années des études dans ce domaine particulier de la lutte microbiologique à l'aide de champignons, bactéries et virus (Fedièrre *et al*, 1981 ; Desmier de Chenon *et al*, 1988). Des résultats encourageants de régulation des larves de Limacodidae, par épandage de suspensions à base de virus isolés lors d'épizooties naturelles, ont été enregistrés dans les palmeraies de Colombie, d'Indonésie et de Côte-d'Ivoire (Genty et Mariau, 1975 ; Ginting et Desmier de Chenon, 1987). Dans ce dernier pays ce sont les

larves du lépidoptère Limacodidae *Latoia viridissima* (Holland, 1893) qui provoquent les défoliations les plus importantes sur le palmier à huile. (Fig.1 et 2).

La survenue d'épizooties périodiques dans les populations de ce ravageur a conduit à s'intéresser à l'agent causal de la maladie : un virus à RNA ou Ribovirus, quelques unes des caractéristiques physicochimiques ont déjà été établies (Fedièrre 1983, 1990 ; Zeddarn 1989) notamment la taille des particules (30 nm de diamètre), la densité (1.34 en cscl), le poids du génome, le type et la composition du polypeptide.

RESULTATS

1. — Symptomatologie et mortalité

Les symptômes associés à la maladie consistent en une réduction puis un arrêt de l'alimentation. Parallèlement, les déplacements des larves deviennent erratiques. Lorsque la maladie frappe les premiers stades larvaires, les individus, initialement groupés en colonies, perdent leur instinct grégaire et se dispersent. Il apparaît un brunissement progressif des différentes parties de l'insecte atteint qui finit par s'immobiliser puis mourir. (Fig. 3)

Des individus apparemment sains, déposés sur des palmes badigeonnées avec un broyat de larves récoltées mortes, présentent rapidement les mêmes symptômes. Lors de ces expériences la mortalité atteint pratiquement 100 % en moins de 8 jours.

(1) ORSTOM Entomovirology laboratory-Fac. of Agric. CAIRO University (Egypt).
(2) IRHO/CIRAD - station de la Mé 13 BP 989 Abidjan 13 Côte-d'Ivoire
(3) INRA station du pathologie comparée 30380 St Christol-lez-Ales
(4) IRHO/CIRAD - division entomologie -BP 5035-34032 Montpellier cedex (France).
Communication présentée à International Conference on palms and palms products for 50th anniversary celebration of NIFOR 22-25 Nov. 1989-Benin City-Nigeria.

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 34.424 ex 1

Cote : B

26 SEP. 1991

M Puz



FIG. 1. — Dégâts sur palmier à huile provoqués par les attaques des chenilles de *Latoia viridissima*. — (Damage caused to oil palm tree by caterpillars of *Latoia viridissima*).

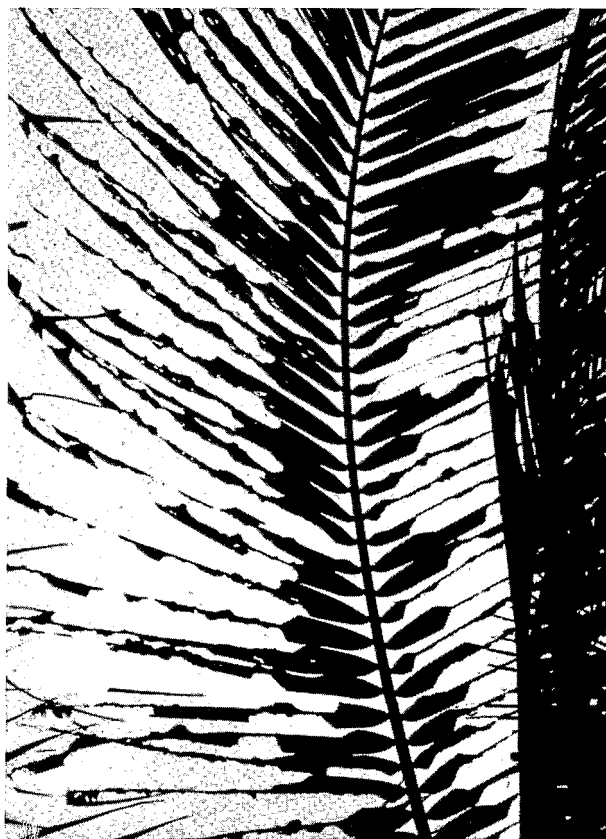


FIG. 2. — Détail d'une palme attaquée par des chenilles de *Latoia viridissima*. — (Detail of damaged palm after attacks by caterpillars of *Latoia viridissima*).

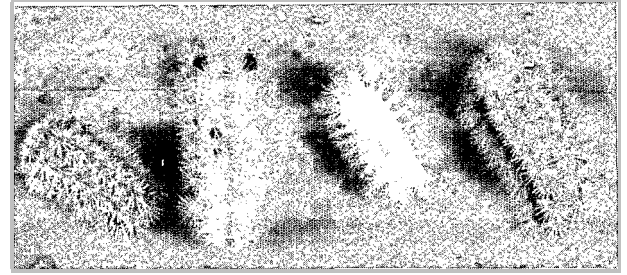


FIG. 3. — Chenilles saines et malades de *Latoia viridissima*. De gauche à droite : chenille à un stade avancé de la maladie, chenille saine au 6^e stade larvaire, chenille saine au dernier stade larvaire, chenille morte de virose. — (Healthy and diseased caterpillars of *Latoia viridissima*. From the left to the right : highly virus-diseased caterpillar - healthy 6th instar caterpillar - healthy last instar caterpillar - virus-dead larvae).

2. — Etude physico-chimique du virus de *Latoia viridissima*

L'observation au microscope électronique des broyats de larves contaminées, soit naturellement, soit expérimentalement, révèle la présence de nombreuses particules d'allure virale. Une purification poussée a permis l'isolement d'un virus icosaédrique. Les virions apparaissent fréquemment confinés dans des vésicules, par groupes de quelques dizaines. (Fig. 4)

Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, les protéines constitutives des particules virales apparaissent sous forme de 4 bandes. Les 2 bandes majeures font respectivement 31 kd (kilodaltons) et 29 kd ; les 2 mineures font 49 kd et 41 kd. (Fig. 5)

Les réactions colorimétriques à l'orcinol et la diphénylamine ont indiqué, chez le virus de *L. viridissima*, la présence d'ARN et l'absence d'ADN.

Après extraction du matériel génétique à partir des particules virales, les électrophorèses révèlent l'existence d'une taille homogène pour les molécules d'ARN. Cet acide nucléique est monocaténaire et son poids moléculaire a été estimé à environ 9,3 kilobases (kb) par électrophorèse en gel d'agarose en conditions dénaturantes. (Fig. 6)

Un fractionnement sur colonne de cellulose-oligo (dT) a révélé que les molécules d'acide nucléique possèdent une séquence polyadénylée.

Cette étude a montré que le virus de *L. viridissima* présente un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques le rapprochant de la famille des Picornaviridae (Rueckert, 1985). Ces propriétés communes concernent la taille et la densité des virions, la taille et la nature de l'acide nucléique ainsi que la présence d'une séquence polyadénylée génomique. Cependant, le nombre et les poids moléculaires des diverses protéines présentent un caractère particulier qui individualise nettement le virus de *L. viridissima* des picornavirus d'insectes actuellement connus. Par ailleurs, une première étude sérologique a montré l'absence de parentés antigéniques entre le virus de *L. viridissima* et deux des picornavirus d'invertébrés les mieux connus, c'est-à-dire le virus de la paralysie du grillon (CrPV) et le virus C de la drosophile (DCV).

3. — Etude épidémiologique

Après avoir ainsi caractérisé l'agent pathogène responsable de la maladie observé chez les chenilles de *L. viridissima*

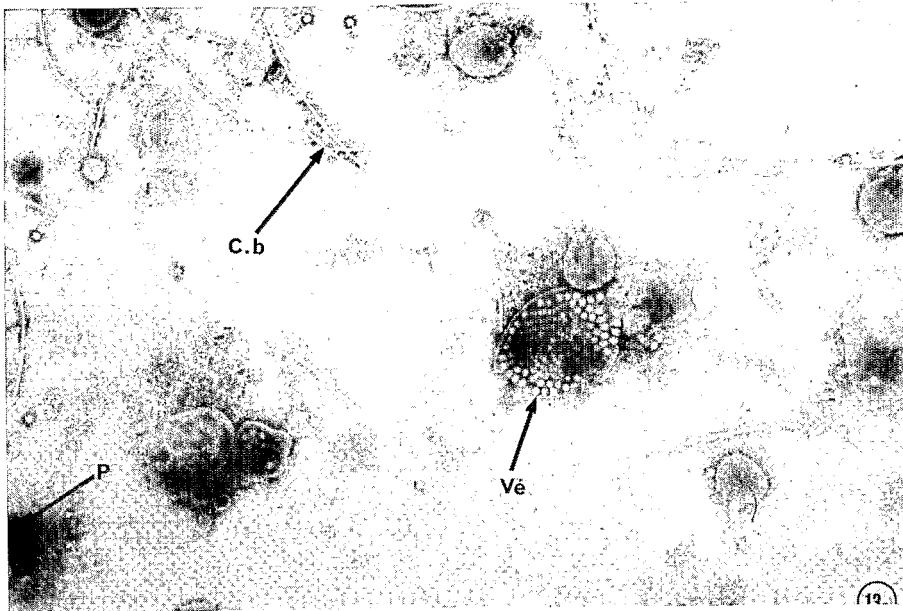


FIG. 4. — Broyat de larves virosées observé au microscope électronique (x environ 10^5 fois). — (*Squashed virus-dead larvae analyzed by electron microscope (around $x 10^5$).*)
Vé = vésicules contenant les virions — (*vesicles containing virions*)
Cb = cils bactériens — (*bacterial flagella*).

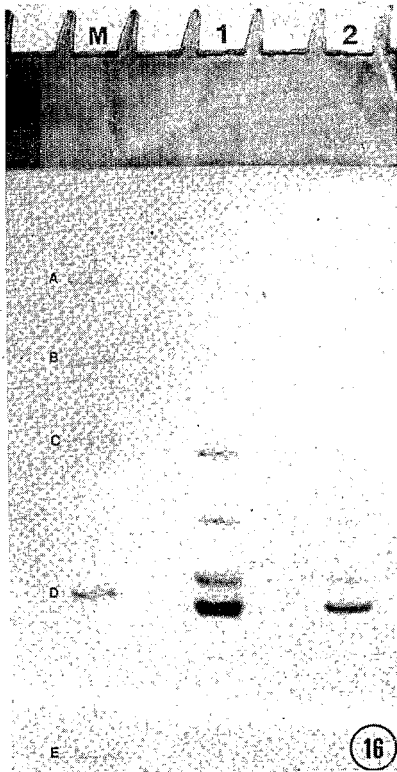


FIG. 5. — Electrophorégramme des polypeptides du petit ribovirus de *La-toia viridissima* en gel polyacrylamide à 17,5 % piste M : échelle de poids moléculaires de protéines
(A : Phosphorylase b 94 kd ; B : sérumalbumine bovine 67 kd ; c : ovalbumine 43 kd ; D : anhydrase carbonique 30 kd ; E : inhibiteur de trypsine de soja 20,1 kd ; F : lactalbumine 14,4 kd).
— (*Polypeptides electrophoretic analysis of *L. viridissima* ribovirus on 17,5 % polyacrilamide gel slab.*)
(*Polypeptides electrophoresis analysis of *L. viridissima* ribovirus on 17,5 % polyacrilamide gel slab.*)
track M : molecular weight standards for proteins
A : phosphorylase b 94 kd
B : bovine serumalbumine 67 kd
C : ovalbumine 43 kd
D : carbonic anhydrase 30 kd
E : soy trypsin inhibitor 20,1 kd
F : lactalbumine 14,4 kd
tracks 2 and 3 proteins of *L. viridissima* virus 2 different concentrations).

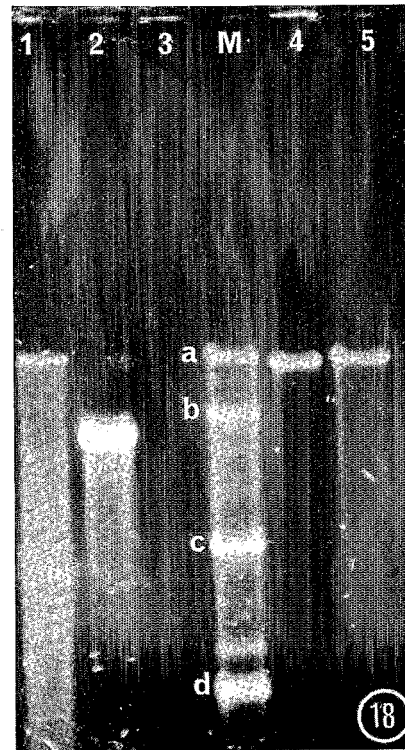


FIG. 6. — Electrophorégramme d'ARN viraux en conditions dénaturantes (gel d'agarose à 0,8 % ; hydroxyméthylmercure 5 mM). — (*Viral RNA electrophoretic analysis under denaturing conditions (0,8 % agarose gel slab ; 5 nM hydroxymethylmercuric).*)
piste 1 : ARN du virus C de la drosophile (DCV)
(track 1 : *Drosophila C virus RNA (DCV)*)
piste 2 : ARN du poliovirus souche Sabin (7,3 kb)
(track 2 : *Sabin poliovirus RNA (7,3 kb)*)
piste 3 : Acide nucléique du virus de *L. viridissima* traité aux ribonucléoses.
(track 3 : *Nucleic acid of *L. viridissima* virus after incubator with ribonucleases*)
piste 4 : Acide nucléique du virus de *L. viridissima*
(track 4 : *Nucleic acid of *L. viridissima* virus*)
piste 5 : ARN du virus de la paralysie du grillon (GPV)
(track 5 : *Cricket paralysis virus RNA (GPV)*)
piste M : échelle de poids moléculaire d'ARN (a : 9,5 kb ; b : 7,5 kb ; c : 4,4 kb ; d : 2,4 kb).
(track M : *RNA molecular weight standards - a : 9,5 kb ; b : 7,5 kb ; c : 4,4 kb ; d : 2,4 kb.*)

ma, nous avons entrepris de rechercher sa présence en plantation dans les populations naturelles du ravageur.

Pour ce suivi épidémiologique, nous avons mis au point un test DAS-ELISA ("double-antibody sandwich enzyme-linked-immunosorbent assay"; Engwall et Pearlman, 1971; Van Weemen et Schuur, 1971) spécifique du virus recherché.

Les anticorps ont été produits en Côte-d'Ivoire par injection de virus purifié à des lapins. Le conjugué a été préparé par couplage des anticorps avec la phosphatase alcaline à l'aide du glutaraldéhyde (Avrameas, 1969). Préalablement à leur utilisation, les réactifs sont épuisés contre un broyat larvaire à 500 mg/ml afin de réduire le bruit de fond dû aux réactions non spécifiques. L'étalonnage de notre test ELISA a été réalisé en analysant les réponses obtenues après traitement d'échantillons renfermant soit le virus pur soit ce même virus ajouté à des quantités connues d'un broyat de chenilles.

Lorsque l'on dose le virus pur, le seuil de détection du test ELISA atteint 0,12 ng de virus par millilitre. En présence de tissus de l'hôte, la sensibilité du test varie entre 1,2 et 12 ng de virus par millilitre.

Afin de contrôler la possibilité d'utiliser notre test ELISA comme support d'une étude épidémiologique de terrain, nous avons suivi l'incidence de la maladie sur plusieurs parcelles de palmiers à huile de la station de la Mé (Côte-d'Ivoire). Nous présentons ici les résultats obtenus pour l'une de ces parcelles sur laquelle un échantillonnage hebdomadaire a été réalisé.

Dans cette parcelle, plus de la moitié des chenilles testées par ELISA sont déjà positives le 19 septembre 1986, premier jour de l'étude. Les toutes premières chenilles mortes sont signalées le 7 octobre alors que la présence de la virose chez un fort pourcentage d'individus est déjà détectée depuis presque 3 semaines. A partir de cette date, la maladie provoque une chute constante du nombre de larves présentes dans la parcelle. Au 28 octobre, la mortalité a atteint presque 100 %, le petit nombre de chenilles encore vivantes étant porteuses du virus. Elles finissent par mourir rapidement ou par se nymphoser.

Exceptionnellement, en cette fin d'année 1986, la biologie de *L. viridissima* est apparue un peu particulière puisque la ponte s'est étalée sur presque deux mois, depuis la fin de septembre jusqu'à la mi-novembre. Aussi, après l'élimination de la première population, apparaît une nouvelle génération vers le début novembre qui fait très rapidement remonter le nombre de chenilles présentes (environ 25 chenilles/palme le 19 novembre).

Les colonies correspondant à la nouvelle génération sont, à la fois, moins nombreuses qu'en septembre et porteuses du virus à un très fort taux, bien supérieur à celui rencontré chez les colonies de la première pullulation. Dans ces conditions, la mortalité augmente rapidement; par exemple, en 8 jours (du 19 au 27 novembre), l'indice de chenilles par palme passe de 24,6 à 1,8. Finalement, la quasi-totalité du ravageur disparaît du fait de la virose.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence plusieurs faits significatifs concernant la maladie :

— d'abord que le virus peut être présent dès les premiers stades larvaires chez une fraction importante de la population. Le test ELISA permet de diagnostiquer sa présence avant l'apparition de toute mortalité ;

— le déclenchement de la maladie (et l'apparition de mortalités massives) survient brusquement dans l'ensemble de la population indépendamment, semble-t-il, des dates de contamination respectives des individus. Il conviendrait sur un plan pratique de rechercher le ou les facteurs induisant ce déclenchement ;

— lorsqu'une nouvelle pullulation de *L. viridissima* émerge dans un milieu très enrichi en virus (cas de la seconde génération dans notre étude), la mortalité intervient beaucoup plus précocement et donc sur des stades plus jeunes, ce qui conduit à une réduction très importante des populations du ravageur au cycle suivant.

— le mode de contamination des chenilles reste, pour l'instant, inconnu mais il faut noter qu'au sein d'une même colonie les larves ne sont pas uniformément infectées, certaines répondant positivement à l'ELISA d'autres négativement.

4. — Sondes nucléiques et diagnostic viral

Nous avons réalisé une transcription inverse de l'ARN extrait des particules virales après hybridation avec un acide oligothymidylique de synthèse servant d'amorce (Maniatis *et al.*, 1982). Les ADN complémentaires (ADNc) ainsi obtenus ont été bicaténerisés puis insérés au site *Pst* I du plasmide pBR 322. Les plasmides recombinants ont servi à transformer des bactéries compétentes. (Fig.7)

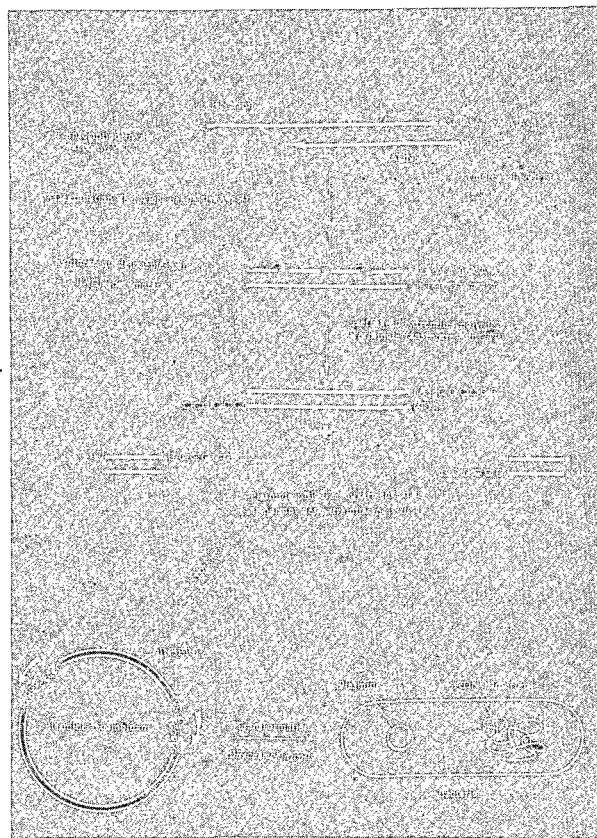


FIG. 7. — Schéma d'obtention d'ADN complémentaire à partir d'ARN viral et stratégie de clonage. — (Cloning strategy : from viral RNA to complementary DNA cloned in pBR 322 plasmid).

Plus de 800 clones bactériens ont été analysés dont 40 contenaient des inserts égaux ou supérieurs à 1,5 kilopaire de bases (kpb). Le plus gros plasmide, pLV 1631, renferme un insert de 4,5 kpb correspondant à environ la moitié du génome viral. Après vérification de la nature virale de cet insert, nous en avons établi la cartographie physique pour 13 enzymes de restriction différentes (Fig.8).

Nous avons sous-cloné dans le plasmide pUC 19, un fragment d'environ 1 kpb provenant de l'insert viral de pLV 1631. A partir de ce plasmide, il est possible de produire des sondes ADN bicaténerisées marquées soit radioactivement soit à l'aide de nucléotides biotinylés.

L'utilisation de la sonde radio-marquée par translation de césure ("nick-translation"; Rigby *et al.*, 1977) se traduit,

après autoradiographie, par l'apparition d'un fort signal d'hybridation chez les chenilles de *L. viridissima* virosées directement écrasées sur les filtres d'hybridation (technique de "squash-blot" ; Czosneck et Navot, 1988). Cette technique de "squash-blot", outre sa simplicité, présente l'avantage d'être rapide puisqu'il suffit de moins de 24 heures pour disposer d'un résultat sur les échantillons testés.

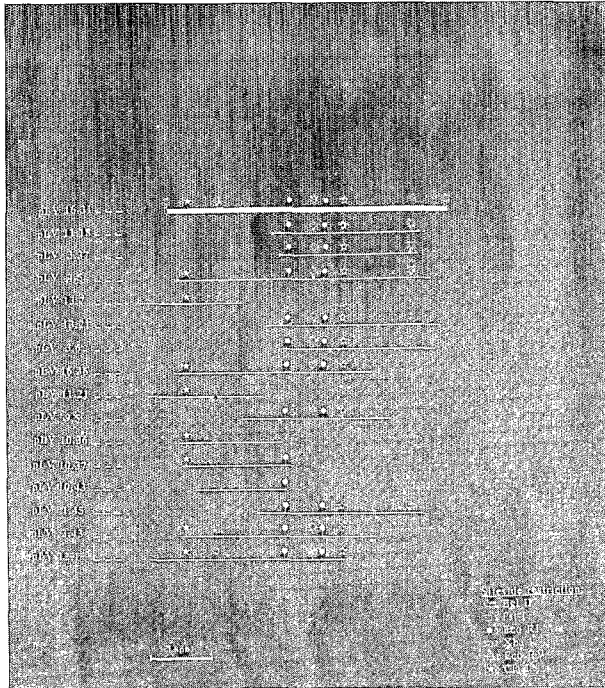


FIG. 8. — Carte physique de restriction de pLV 16.31 et des quinze autres inserts de haut poids moléculaire. — (The largest 15 plasmids restriction map, including pLV 16.31).

Avec un marquage "froid", c'est-à-dire non radioactif, de cette même sonde, les tests de sensibilité ont indiqué que le seuil de détection se situait entre 500 et 50 picogrammes (pg) d'ARN viral.

CONCLUSION

Le travail réalisé par les équipes de l'IRHO et de l'ORSTOM a permis de montrer qu'un nouveau petit virus proche des Picornaviridae d'insectes est responsable des épizooties observées en plantation dans les populations de *L. viridissima*. Lorsqu'elle se développe, l'efficacité de la maladie est

telle qu'aucun traitement contre le ravageur n'est nécessaire.

Le test ELISA mis au point pour détecter ce virus doit permettre de mieux cerner les modalités de déclenchement et d'évolution de la virose. Les premiers résultats obtenus au cours de l'enquête épidémiologique réalisée sont d'autant plus intéressants qu'il ne semble pas qu'un petit virus à ARN d'insecte ait fait l'objet d'une étude analogue. En effet, l'application du test ELISA à la détection de ce type d'entomopathogènes est encore très peu développée (Zeddiam, 1989). Pourtant, ce test offre de multiples intérêts ; d'abord, son prix de revient est faible et il se réalise en un nombre réduit d'étapes ce qui permet de traiter simultanément et rapidement une grande quantité d'échantillons (Zrein, 1986) ; en outre, c'est un outil particulièrement bien adapté au terrain parce qu'il ne nécessite pas de connaissances scientifiques particulières pour être mis en application.

L'intérêt principal du recours à un test de diagnostic sérologique réside dans le fait qu'il devient possible de détecter sans ambiguïté la virose à un stade précoce de la maladie alors que les symptômes n'en sont pas encore apparus. Avant la mise au point de ce test, la présence de la virose dans les populations du ravageur ne se révélait que lorsque la mortalité intervenait c'est-à-dire à son stade ultime. Désormais, avec le test ELISA il est possible de suivre l'évolution de la maladie. On peut donc décider de recourir ou non à des traitements contre le ravageur suivant le niveau d'incidence de la virose dans les populations de *L. viridissima*. En effet, d'un point de vue appliqué, il est envisageable de déterminer un niveau d'incidence de la maladie au-dessus duquel l'épizootie va se déclencher rapidement ce qui permet d'éviter des traitements insecticides. Dans le même ordre d'idée, ce test constitue également un bon moyen pour suivre l'impact de traitements à base de suspensions virales et donc d'établir les conditions optimales pour la résiliation de tels traitements puisqu'à terme nous espérons que le virus de *L. viridissima* pourra tenir un rôle actif dans le cadre d'une lutte intégrée.

L'obtention de sondes nucléiques complète et amplifie les moyens de diagnostic disponibles pour mettre en évidence le virus. La sensibilité de ce type de sonde permet la détection de très faibles quantités de virions (Mitchell *et al.* 1988). Elles représentent un outil d'investigation précieux pour l'étude des aspects moléculaires de la multiplication virale. Sur un plan plus appliqué, il faut noter qu'à la différence de la technique ELISA fondée sur la détection des composants protéiques externes du virus, les sondes nucléiques reconnaissent les séquences virales de l'acide nucléique. La spécificité des ribosondes peut donc être établie en fonction de la séquence du génome viral à partir de laquelle elles sont produites. Ainsi, il est possible d'obtenir, soit des ribosondes à large spectre capables de détecter plusieurs virus ayant une certaine homologie de séquences, soit des ribosondes qui détectent un seul type de virus. (Cova *et al.* 1988).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AVRAMEAS S. (1969). — Coupling to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugate for the detection of antigens and antibodies. *Immunochem.*, 6, 43-52.
- [2] COVA L., KOPECKA H., AYMARD M., GIRARD M. (1988). — Use for CNRA probes for the detection of Enteroviruses by molecular hybridization. *J. Med. Virol.*, 24, 11-18.
- [3] CZOSNEK H., NAVOT N., (1988). — Virus detection in squash-blot of plants and insects. Applications in diagnostics, epidemiology and breeding. *In biotechnology in Agriculture. Advances in biotechnological processes.* 9, 83-96, A. Mizrahi, ED. Alan R. Liss, New York.
- [4] DESMIER DE CHENON R., MARIU D., MONSARRAT P., FEDIERE G., SIPAYUNG A. (1988). — Recherches sur les agents entomopathogènes d'origine virale chez les lépidoptères défoliateurs du palmier à huile et du cocotier. *Oléagineux*, 43, (3), 107-117.
- [5] ENGVALL E., PEARLMAN P. (1972). — Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, 109, 129-135.
- [6] FEDIERE G. (1983). — Recherches sur des viroses épizootiques de lépidoptères *Limacodidae* ravageurs de *Palmacées*. Thèse Doct. 3^e cycle, Univ. Sci. Techn. Languedoc, Montpellier (France), Juin 1983, 103 P.
- [7] FEDIERE G., DESMIER DE CHENON R., MARIU D., MONSARRAT P. (1981). — Mise en évidence de maladies à épizootie de type densonucléose chez deux chenilles de lépidoptères *Limacodidae* phyllo-

phages du palmier et du cocotier en Côte-d'Ivoire. *Abstr. Colloq. Protect. Cult. trop.*, Lyon (France) p. 62.

- [8] FEDIERE G., PHILIPPE R., VEYRUNES J.C., MONSARRAT P. (1990). — Biological control of the oil palm pest *Latoia viridissima* (Lepidoptera Limacodidae), in Côte-d'Ivoire, by a new Picornavirus. *Entomophaga*, 35 (2), 78-85.
- [9] GENTY P., MARIAU D. (1975). — Utilisation d'un germe entomopathogène dans la lutte contre *Sibine fusca* (Limacodidae). *Oléagineux*, 30, (8-9), 349-354.
- [10] GINTING C.U., DESMIER DE CHENON R. (1987). — Nouvelles perspectives biologiques pour le contrôle d'un ravageur très important du

cocotier en Indonésie: *Parasa lepida* Cramer, Limacodidae par l'utilisation de virus. *Oléagineux*, 42, (3), 107-118.

- [11] MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982). — Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 545 p.
- [12] RIGBY P.W.J., DIECKMANN H., RHODES C., BERG P. (1977). — Labelling deoxyribonucleic acid to high activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, 113, 237-251.
- [13] RUECKERT R.R. (1985). — Picornaviruses and their replication. *In Fundamental Virology*. B. N. Fields Ed., Raven Press, New York. 768 p.
- [14] VAN WEEMEN B. K., SCHUURS A. H. (1971). — Immunoassay using antigenenzyme conjugates. *F.E.B.S. Lett.*, 15, 232.

SUMMARY

Study of the Ribovirus of *Latoia viridissima* Holland, a palm pest in West Africa - Characterization - Diagnosis - Serology and epidemiological monitoring

J.L. ZEDDAM, R. PHILIPPE, J.C. VEYRUNES, G. FEDIERE, D. MARIAU and M. BERGOIN, *Oléagineux*, 1990, 45, N° 11, P 493-500.

Caterpillars of the Limacodid lepidopteran *Latoia viridissima* (Holland 1893) are one of the main leaf-eating palm pests in Côte-d'Ivoire. A previous review of the local entomopathogens regulating natural populations of this pest showed that the most effective control agent was a virus. A physico-chemical characterization of the virus responsible for the epizootics indicates here several of its basic properties, including type of genome (single-stranded polyanadenylated RNA), clearly indicating its resemblance to the picornaviruses. However, its particular polypeptidic composition distinguishes it from some members of this family currently found in insects, members with which, incidentally, no antigenic relationship has been detected. In order to detect this ribovirus, known as LvV, rapidly and cheaply in biological samples, an immuno-enzymatic test has been developed (ELISA), which brings into play the sandwich technique. The minimum sensitivity thresholds for the test were established for the purified virus and for the virus found in host tissue. Using this serological diagnosis tool, it was possible to investigate the epidemiological aspect of the disease developing on a plantation. Monitoring in the field for three months during two successive *L. viridissima* outbreaks provided precise details of virosis incidence as young larvae emerged, its development at different instars and its impact on the pest population. In addition, molecular cloning of the viral genome has been undertaken and provides the first indications of how LvV RNA is organized. Using the complementary DNA part obtained in this way, different types of nucleic probes have been manufactured, involving radioactive markers or biotinylated nucleotides. The ability of these various probes, with either double-stranded DNA or single-stranded RNA (ribo-probes), to detect the viral RNA has been tested.

RESUMEN

Estudio del ribovirus of *Latoia viridissima* Holland, plaga de las palmáceas en el África Occidental - Caracterización - Diagnóstico Serológico - Seguimiento epidemiológico.

J.L. ZEDDAM, R. PHILIPPE, J.C. VEYRUNES, G. FEDIERE, D. MARIAU and M. BERGOIN, *Oléagineux*, 1990, 45, N° 11, P 493-500.

Las larvas del lepidóptero Limacodidae *Latoia viridissima* (Holland, 1893) constituyen uno de los principales defoliadores de las palmáceas en Côte-d'Ivoire. Ya se pasó revista a los entomopatógenos locales que mantienen a las poblaciones naturales de esta plaga en un nivel constante de donde resultó que el agente de control más eficaz era un virus. Mediante una caracterización físico-química, se indican varias propiedades esenciales del virus responsable de las epizootias. Entre las mismas, la índole del genoma (ARN de simple cadena poliadenilado), lo asemejan mucho a los Picornaviridae. Sin embargo, se diferencia de los pocos miembros de esta familia ahora conocidos entre los insectos por una composición de polipéptidos especial; además, no se llega a apreciar ningún parentesco con esos miembros desde el punto de vista de los antígenos. Con el fin de detectar rápida y económicamente a este ribovirus, llamado LvV, entre las muestras biológicas, se ha desarrollado una prueba inmunoenzimática (ELISA), que recurre a la técnica llamada "en sandwich". Los umbrales mínimos de sensibilidad de la prueba se establecieron para virus purificado y virus frente a elevadas concentraciones de tejido del hospedero. Con este instrumento de diagnóstico serológico, se ha logrado acometer el aspecto epidemiológico de la enfermedad que se está desarrollando en la plantación. El seguimiento realizado en el campo durante tres meses en dos pululaciones sucesivas de *L. viridissima* aclaró la incidencia de la virosis en el momento de emerger las larvas jóvenes, la evolución de ésta en los varios estados larvales y su impacto en la demografía de la plaga. Por otra parte, se acometió la clonación molecular del genoma viral, que proporciona las primeras indicaciones sobre la organización del ARN y del LvV. Varios tipos de sondas nucleicas han sido construídos en la base de la parte de ADN de complemento obtenida de este modo; para ello se utilizaron marcaciones radioactivas o nucleótidos biotinilados (biotinylated nucleotides). Se ha probado la capacidad de estas varias sondas de ADN de doble cadena o ARN de simple cadena (ribosondas) para detectar el ARN viral.

Study of the Ribovirus of *Latoia viridissima* Holland, a palm pest in West Africa Characterization - Diagnosis - Serology and epidemiological monitoring

J.L. ZEDDAM, R. PHILIPPE, J.C. VEYRUNES, G. FEDIERE, D. MARIAU and M. BERGOIN

Key words : *Latoia viridissima*, oil palm, ribovirus, genome cloning.

INTRODUCTION

In the artificial ecosystems created by man, in particular agro-eco-systems, certain environmental components favour the multiplication of animal or plant populations responsible for considerable economic losses. The methods for controlling these pests most frequently have recourse to chemical pesticides which, although generally effective, are costly and not without serious drawbacks. The best known of which are their toxicity for the environment and the appearance of resistance phenomena in the largest populations. Hence, more biologically-based research, consisting in making use of the existence of micro-organisms which regulate animal and plant populations naturally, has made considerable progress. For several years, IRHO has been carrying out studies in this particular field of microbiological control using fungi, bacteria and viruses (Fédière *et al.*, 1981 ; Desmier de Chenon *et al.*, 1988). Encouraging results have been recorded in regulating Limacodid larvae by spreading suspensions of viruses isolated during natural epizootics, in oil palm plantations in Colombia, Indonesia and Côte-d'Ivoire (Genty and Mariau, 1975 ; Ginting and Desmier de Chenon, 1987). In Côte-d'Ivoire, the most severe oil palm defoliation is caused by the larvae of the Limacodid lepidopteran *Latoia viridissima* (Holland, 1893) (Fig. 1 et 2). The occurrence of periodic epizootics in populations of this pest has led to interest in the disease's causal agent : an RNA virus or ribovirus, some of whose physico-chemical characteristics have already been established (Fédière, 1983-1990 ; Zeddám 1989), notably particle size (30 nm. indiameter), density (1,34 CscI), genome weight and type and polypeptide composition.

RESULTS

1. — Symptomatology and mortality

The symptoms associated with the disease consist of a reduction and then a halt in feeding. At the same time, larva movements become erratic. When the disease strikes the first larval instars, the individuals, initially grouped together in colonies, lose their social instinct and disperse. Gradual browning of various parts of the affected insect becomes apparent, and the insect is eventually immobilized and dies. (Fig.3).

Apparently healthy individuals, placed on fronds daubed with triturated larvae collected when dead, rapidly show the same symptoms. During such experiments, mortality reaches almost 100 % in under 8 days.

2. — Physico-chemical study of the *Latoia viridissima* virus

Observation under an electron microscope of liquidized larvae, either naturally or experimentally contaminated, reveals the existence of numerous particles which appear to be viruses. Extended purification made it possible to isolate an icosahedric virus. The virions frequently appear in vesicles, in groups of a few dozen. (Fig. 4).

After electrophoresis in polyacrylamide gel under denaturing conditions, the proteins which make up the virus particles appear

in four bands. The two major bands are 31 kd (kilodaltons) and 29 kd respectively ; the two minor bands are 49 kd and 41 kd. (Fig. 5).

Colorimetric reactions with orcinol and diphenylamine have shown the presence of RNA and the absence of DNA in the *Latoia viridissima* virus.

After extracting genetic material from virus particles electrophoresis reveals the uniform size of RNA molecules. This nucleic acid is single-stranded, and its molecular weight has been estimated at round 9.3 kilobases (kb) by electrophoresis in agarose gel under denaturing conditions. (Fig. 6).

Fractionation on a cellulose-oligo (dT) column revealed that the nucleic acid molecules have a polyadenylic sequence.

This study showed that the *L. viridissima* virus presents a certain number of physico-chemical characteristics similar to those of the *Picornaviridae* family (Rueckert, 1985). The common properties concern virion size and density, the size and nature of the nucleic acid, as well as the presence of a polyadenylic genome sequence. However, the number and molecular weights of the various proteins are specific, and clearly distinguish the *L. viridissima* virus from currently known insect picornaviruses. In addition, a preliminary serological study has revealed the absence of antigenic links between the *L. viridissima* virus and two of the best known invertebrate picornaviruses, i.e. the cricket paralysis virus (CrPV) and the drosophila C virus (DCV).

3. — Epidemiological study

After characterizing the pathogen responsible for the disease observed in *L. viridissima* caterpillars, we undertook to study its presence on plantations, amongst natural pest populations.

For the purpose of this epidemiological study, we developed a specific DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : Engvall and Pearlman, 1971 ; Van Weemen and Schuur 1971) for the virus in question.

The antibodies were produced in Côte-d'Ivoire by injecting rabbits with the purified virus. The conjugate was prepared by coupling the antibodies with alkaline phosphatase, using glutaraldehyde (Avrameas, 1969). Before use, the reagents are used up on liquidized larvae at 500 mg/ml in order to reduce background noise caused by non-specific reactions. Our ELISA test was calibrated by analysing the results obtained after processing samples containing either the pure virus or the virus mixed with known quantities of triturated caterpillars.

When titrating the pure virus, the detection threshold for the ELISA test reaches 0.12 ng of virus per millilitre. In the presence of host tissues, the sensitivity of the test varies between 1.2 and 12 ng of virus per millilitre.

In order to check the possibility of using our ELISA test as backup for an epidemiological fields study, we monitored disease incidence on several oil palm plots at the La Mé station (Côte-d'Ivoire). We shall now give the results obtained for one of these plots, in which weekly samples were taken.

In this plot, more than half of the caterpillars tested with ELISA were already positive on 19th september 1986, the first day of the study. The first dead caterpillars were observed on 7th october, whilst the viral disease had been detected in a large percentage of

individuals almost 3 weeks previously. From this date on, the disease led to a constant fall in the number of larvae present in the plot. By 28th October, mortality had reached almost 100 % with the small number of caterpillars still alive carrying the virus. These caterpillars died rapidly or pupated.

Exceptionally, at the end of 1986, the biology of *L. viridissima* seemed somewhat unusual, since egg-laying lasted almost two months, from the end of September to mid-November. Hence, after elimination of the first generation, a new generation appeared towards the beginning of November, which rapidly increased the number of caterpillars present (around 25 caterpillars/frond by 19th November).

The colonies corresponding to the new generation were both more numerous than in September and showed very high virus rates, much higher than those seen in the colonies from the first outbreak. Under these conditions, mortality increased rapidly; for example, in 8 days (from 19th to 27th November), the caterpillar index per frond dropped from 24.6 to 1.8. Eventually, almost all of the pest population died from the viral disease.

This study enabled us to reveal several significant facts about the disease :

- firstly, that the virus can be present in a large proportion of the population right from the first larval instars. The ELISA test makes it possible to diagnose its presence before the start of mortality ;

- the disease - and the massive mortality rates - are triggered suddenly in the population as a whole, and, it seems, independently of the respective contamination dates for the different individuals. From a practical point of view, it would be a good idea to seek out this trigger factor or factors ;

- when a new generation of *L. viridissima* emerges in an environment rich in the virus (as was the case with the second generation in our study), mortality occurs much earlier, and thus in younger instars, which leads to a very significant reduction in pest populations in the following cycle ;

- the way in which caterpillars are contaminated remains a mystery for the time being, but it should be noted that within the same colony, larvae are not uniformly infected, since certain respond positively to ELISA and others negatively.

4. — Nucleic probes and viral diagnosis

We carried out a reverse transcription of RNA extracted from virus particles after hybridization with a synthetic oligothymidylic acid, which serves as a primer (Maniatis *et al.*, 1982). The complementary DNAs (DNAC) obtained in this way were made double-stranded and then inserted into the Pst I site of the pBR 322 plasmid. Recombinant plasmids were used to transform the relevant bacteria (Fig. 7). More than 800 bacterial clones were analysed, 40 of which contained inserts equal to or exceeding 1.5 kilobases (kbp). The largest plasmid, pLV 1631, contains an insert of 4.5 kbp, corresponding to around half of the viral genome. After checking the viral nature of this insert, we established its physical mapping for 13 different restriction enzymes (Fig. 8). In the plasmid pUC 19, we sub-cloned a fragment of around 1 kbp, taken from the pLV 1631 viral insert. It is possible to produce double-stranded DNA probes from this plasmid, labeled either radioactively or using biotinylated nucleotides.

A probe labeled radioactively by nick translation (Ribby *et al.*, 1977), is expressed, after autoradiography, by the appearance of a high hybridization signal in virus-infected *L. viridissima* caterpillars which are crushed directly onto hybridization filters (the "squash-blot" technique; Czosneck and Navot, 1988). Besides its simplicity, the squash-blot technique has the advantage of being quick, because it takes less than 24 hours to obtain a result for the samples tested.

Using "cold", i.e. non-radioactive labelling of the same probe, sensitivity tests showed that the detection threshold is between 500 and 50 picogrammes (pg) of viral RNA.

CONCLUSION

The work carried out by IRHO and ORSTOM research teams over recent years has shown that a new small RNA virus resembling insect *Picornaviridae* is responsible for the epizootics observed in *L. viridissima* populations on plantations. When it develops, the virus is so effective that no other treatment is needed against the pest.

The ELISA test, developed for detecting this viral disease should help to pinpoint the ways in which the virus is triggered and develops. Preliminary results obtained during the epidemiological study are all the more interesting in that apparently, no similar studies have been carried out on small RNA insect viruses. In fact, the use of the ELISA test for detecting this type of entomopathogen is still very limited (Zeddani, 1989). However, this test offers many advantages: firstly, its low cost, and the fact that it is carried out in a limited number of stages, which means that large numbers of samples can be processed simultaneously and quickly (Zrein, 1986); in addition, it is a tool particularly well adapted to field work, since its use does not call for particular scientific knowledge.

The main interest of using a serological diagnosis test lies in the fact that it becomes possible to detect the viral disease at an early stage, without ambiguity, before the symptoms appear. Before this test was developed, the presence of the viral disease in pest populations was only revealed when mortality began, i.e. in its final stage. Now, with the ELISA test, it is possible to monitor disease development. Decisions can then be made whether to use treatments to control the pest, according to viral disease incidence in *L. viridissima* populations. In fact, from a practical point of view, the idea is being considered of determining disease incidence levels beyond which an epizootic will be triggered rapidly, thus avoiding the need for insecticide treatments. Along the same line of thought, this test is also a good way of monitoring the impact of treatments using virus suspensions, and hence of identifying the optimum conditions for applying such treatments, since we hope that eventually, the *L. viridissima* virus will play an active role in integrated control.

Obtaining nucleic probes completes and amplifies the available means of diagnosis for detecting the virus. The sensitivity of this type of probe means that very low virion quantities can be detected (Mitchell *et al.*, 1988). They are a valuable research tool for studying the molecular aspects of viral multiplication. From a more practical point of view, it should be noted that contrary to the ELISA technique, based on detecting the external protein components of the virus, nucleic probes recognize the viral sequences of the nucleic acid. The specificity of riboprobes can thus be selected according to the section of the viral genome from which the probes will be made. Hence it is possible to have either large spectrum riboprobes capable of detecting various viruses with certain sequence similarities or riboprobes which only detect a single type of virus (Cova *et al.*, 1988).