

UNIVERSITE DU QUEBEC  
MEMOIRE  
PRESENTÉ A  
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE ES SCIENCES (ENVIRONNEMENT)

PAR  
NORMAND BELLEMARE  
B. SC. (BIOLOGIE)

EFFETS D'UNE POLYÉDROSE CYTOPLASMIQUE CHEZ LE  
VER-GRIS BLANC EUXOA SCANDENS (RILEY)  
(LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)

JUILLET 1980

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

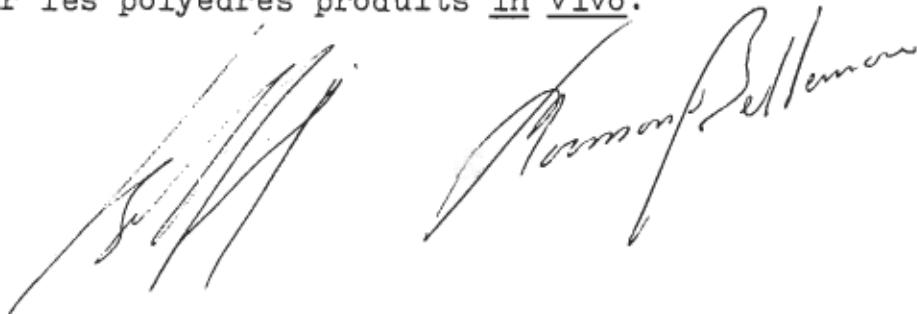
EFFETS D'UNE POLYEDROSE CYTOPLASMIQUE  
CHEZ LE VER-GRIS BLANC "EUXOA SCANDENS" (RILEY)  
(LEPIDOPTERA NOCTUIDAE)"

RESUME

Des recherches sur une polyédrose cytoplasmique diagnostiquée chez le ver-gris blanc Euxoa scandens ont été effectuées au laboratoire. Les résultats de ces travaux ont démontré qu'un virus des polyédroses cytoplasmiques (CPV) est hautement pathogène pour les larves de cet insecte. Les doses infectieuses médianes (DI 50) des polyèdres ont été à ce propos évaluées. Les larves du 3<sup>e</sup> stade traitées par les polyèdres viraux se sont avérées plus susceptibles à l'infection virale que celles du 4<sup>e</sup> stade. Chez l'insecte virosé, l'allongement significatif de la durée de la période larvaire et la diminution du poids des chrysalides par rapport aux témoins ont été notés. Certaines anomalies ont été observées chez les adultes provenant de larves infectées et la transmission du virus d'une génération de E. scandens à l'autre a été démontrée.

Les polyèdres produits lors de l'infection des larves d'E. scandens sont de forme paraspérique. Par contre, l'infection de cellules de L. dispar cultivées in vitro par le virus produit in vivo a conduit à la formation de polyèdres exclusivement cubiques. Mais, les polyèdres extraits des cellules infectées in vitro ont induit à nouveau des inclusions virales

de forme paraspérique. Les polyèdres obtenus lors du premier passage du CPV in vitro ont causé chez E. scandens des effets caractéristiques d'une polyédrose cytoplasmique. Néanmoins, les taux d'infection larvaire ont été inférieurs à ceux obtenus par les polyèdres produits in vivo.

A handwritten signature consisting of two parts. The first part on the left is a stylized, cursive "N". The second part on the right is "Norman Bellmore" written in a more standard cursive script.

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	i
LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
REMERCIEMENTS.....	ix
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I - Revue bibliographique.....	4
1. Cycle biologique d' <u>Euxoa scandens</u> (Riley).....	4
2. Virus des polyédroses cytoplasmiques (CPV).....	6
2.1 Caractéristiques des CPV.....	6
2.2 Réplication des CPV chez les insectes.....	8
2.3 Modes de transmission des CPV chez les insectes..	9
2.3.1 De larves à larves (transmission horizontale).....	9
2.3.2 D'une génération à l'autre (transmission verticale).....	9
2.4 Réplication des CPV en culture cellulaire.....	12
2.5 Utilisation des CPV en lutte biologique.....	13
CHAPITRE II - Matériels et méthodes.....	15
1. Récolte des larves d' <u>E. scandens</u> en pleine nature.....	15
2. Technique d'élevage d' <u>E. scandens</u> au laboratoire.....	15
2.1 Les oeufs.....	16
2.2 Les larves.....	16
2.3 Les prénymphes et les nymphes.....	17

2.4 Les adultes.....	18
3. Méthode de production des polyèdres viraux chez la larve.....	18
4. Méthode d'infection des larves du 3 <sup>e</sup> et 4 <sup>e</sup> stades larvaires.....	19
5. Critères de diagnostic de l'infection virale.....	20
6. Méthode d'évaluation des doses infectieuses médianes (DI 50).....	20
7. Etudes des effets du CPV sur les stades immatures et matures d' <u>E. scandens</u> .....	21
8. Evaluation de la transmission du CPV à la génération suivante.....	22
9. Etude comparative des polyèdres produits <u>in vivo</u> et <u>in vitro</u> .....	23
9.1 Production de polyèdres viraux sur cellules de <u>L. dispar</u> cultivées <u>in vitro</u> .....	23
9.1.1 Maintien de la lignée cellulaire.....	23
9.1.2 Technique d'infection des cultures cellulaires.....	23
9.2 Expériences de réinfections des larves et de celles cultivées <u>in vitro</u> .....	24
9.3 Comparaison de certains effets suite à l'infection des larves par les polyèdres produits <u>in vivo</u> et sur cellules cultivées <u>in vitro</u> .....	25
CHAPITRE III - Résultats.....	26
1. Effets du CPV sur <u>E. scandens</u> .....	26
1.1 Caractéristiques générales de la polyédrose cytoplasmique d' <u>E. scandens</u> .....	26
1.2 Doses infectieuses médianes (DI 50) des polyèdres produits <u>in vivo</u> .....	30
1.3 Répercussion de l'infection virale sur la durée des stades larvaires.....	30

1.4	Effets du CPV sur le poids, la longueur et la durée de la période nymphale des chrysalides.....	40
1.5	Symptômes de l'infection virale chez l'adulte....	46
1.6	Evaluation des taux de transmission du CPV à la génération suivante.....	46
2.	Comparaison des CPV produits <u>in vivo</u> et <u>in vitro</u> .....	49
	DISCUSSION.....	67
	CONCLUSION.....	77
	BIBLIOGRAPHIE.....	80
	APPENDICE I .....	90
	APPENDICE II .....	92
	APPENDICE III .....	93
	APPENDICE IV .....	94
	APPENDICE V .....	95

## LISTE DES FIGURES

### Figures

- 1 Cycle biologique d'E. scandens tel que décrit par Hudson et Wood (1930)..... 5
- 2 Mode de transmission horizontale (A) et verticale (B) du CPV chez les lépidoptères. Li: larve infectée; Pi: papillon infecté..... 10
- 3 Larve de 7<sup>e</sup> stade saine (A) et infectée par le CPV (B).... 28
- 4 Aspect macroscopique de l'intestin moyen d'une larve d'E. scandens saine (A) et infectée par le CPV (B). Intestin moyen infecté (→)..... 28
- 5 Frottis de l'intestin moyen infecté par le CPV. Coloration au Buffalo-Black (Sikorowski & al., 1971). P: polyèdres x 600 ..... 28
- 6 Coupe transversale de l'intestin moyen infecté par le CPV. Coloration Vago-Amargier (1963) x 130. LI: lumière intestinale; P: polyèdres..... 28
- 7 Représentation graphique des doses infectieuses des polyèdres produits in vivo. Infection au 3<sup>e</sup> (A) et 4<sup>e</sup> (B) stades larvaires d'E. scandens. Les lignes pointillées représentent les intervalles de confiance à 95%..... 31
- 8 Allure des décalages dans le temps des stades larvaires et prénymphe d'E. scandens en fonction de la dose de polyèdres produits in vivo administrée aux larves. Nombre de larves de 4<sup>e</sup> (SL<sub>4</sub>), 5<sup>e</sup> (SL<sub>5</sub>), 6<sup>e</sup> (SL<sub>6</sub>), 7<sup>e</sup> (SL<sub>7</sub>) stades et prénymphe (PN) en fonction du temps. Traitement des larves par le CPV au 3<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>3</sub>). A: insectes sains (témoins). B, C, D: infection larvaire par respectivement  $10^3$ ,  $10^5$  et  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve. Le temps zéro correspond pour les larves des lots A, B, C, D au passage au 4<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>4</sub>) de la première larve du lot..... 33

## Figures

- 9 Allure des décalages dans le temps des stades larvaires et prénymphe d'E. scandens en fonction de la dose de polyèdres produits in vivo administrée aux larves. Nombre de larves de 5<sup>e</sup> (SL<sub>5</sub>), 6<sup>e</sup> (SL<sub>6</sub>), 7<sup>e</sup> (SL<sub>7</sub>) stades et prénymphes (PN) en fonction du temps. Traitement des larves par le CPV au 4<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>4</sub>). A: insectes sains (témoins). B, C, D: infection larvaire par respectivement 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 5 x 10<sup>6</sup> polyèdres par larve. Le temps zéro correspond pour les larves des lots A, B, C, D au passage au 5<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>5</sub>) de la première larve du lot..... 35
- 10 Chrysalides provenant d'une larve infectée par le CPV (A) et saine (B)..... 41
- 11 Chrysalides issues de larves infectées par le CPV. Noter les malformations (→)..... 41
- 12 Relation entre le poids des chrysalides mâles ainsi que femelles et la durée de la période larvaire. Infection au 3<sup>e</sup> (A) et 4<sup>e</sup> (B) stades larvaires (SL) d'E. scandens par les polyèdres produits in vivo..... 45
- 13 Relation entre la période nymphale et le poids de chrysalides mâles ainsi que femelles issues de larves traitées au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades par le CPV produit in vivo.... 47
- 14 Adultes infectés par le CPV (A) et sains (B)..... 48
- 15 Frottis du méconium provenant d'un adulte infecté par le CPV. Coloration au Bleu de Méthylène 5%. P: polyèdres x 2000..... 48
- 16 Forme paraspérique des polyèdres viraux produits in vivo. Coloration au Buffalo-Black (Sikorowski & al., 1971). P: polyèdres x 1050..... 51
- 17 Forme cubique des polyèdres viraux produits dans les cellules de L. dispar cultivées in vitro. P: polyèdres x 1500..... 51

Figures

- 18 Représentation graphique des doses infectieuses des polyèdres produits in vitro. Infection au 3<sup>e</sup> (A) et 4<sup>e</sup> (B) stades larvaires d'E. scandens. Les lignes pointillées représentent les intervalles de confiance à 95%..... 53
- 19 Allure des décalages dans le temps des stades larvaires et prénymphe d'E. scandens en fonction de la dose de polyèdres produits in vitro administrée aux larves. Nombre de larves de 4<sup>e</sup> (SL<sub>4</sub>), 5<sup>e</sup> (SL<sub>5</sub>), 6<sup>e</sup> (SL<sub>6</sub>), 7<sup>e</sup> (SL<sub>7</sub>) stades et prénymphes(PN) en fonction du temps. Traitement des larves par le CPV au 3<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>3</sub>). A: insectes sains (témoins). B, C, D: infection larvaire par respectivement  $10^3$ ,  $10^5$  et  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve. Le temps zéro correspond pour les larves des lots A, B, C, D au passage au 4<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>4</sub>) de la première larve du lot..... 55
- 20 Allure des décalages dans le temps des stades larvaires et prénymphe d'E. scandens en fonction de la dose de polyèdres produits in vitro administrée aux larves. Nombre de larves de 5<sup>e</sup> (SL<sub>5</sub>), 6<sup>e</sup> (SL<sub>6</sub>), 7<sup>e</sup> (SL<sub>7</sub>) stades et prénymphes(PN) en fonction du temps. Traitement des larves par le CPV au 4<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>4</sub>). A: insectes sains (témoins). B, C, D: infection larvaire par respectivement  $10^3$ ,  $10^5$  et  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve. Le temps zéro correspond pour les larves des lots A, B, C, D au passage au 5<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>5</sub>) de la première larve du lot..... 57
- 21 Relation entre le poids des chrysalides mâles ainsi que femelles et la durée de la période larvaire. Infection au 3<sup>e</sup> (A) et 4<sup>e</sup> (B) stades larvaires (SL) d'E. scandens par les polyèdres produits in vitro..... 63
- 22 Relation entre la période nymphale et le poids de chrysalides mâles ainsi que femelles issues de larves traitées au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades par le CPV produit in vitro..... 65

## LISTE DES TABLEAUX

### Tableaux

- |   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | Effets de l'infection par différentes concentrations de polyèdres produits <u>in vivo</u> sur l'évolution des stades larvaires d' <u>E. scandens</u> . Infection au 3 <sup>e</sup> stade.....         | 37 |
| 2 | Effets de l'infection par différentes concentrations de polyèdres produits <u>in vivo</u> sur l'évolution des stades larvaires d' <u>E. scandens</u> . Infection au 4 <sup>e</sup> stade.....         | 38 |
| 3 | Effets du virus produit <u>in vivo</u> sur la durée de la période nymphale, sur le poids et sur la longueur des chrysalides d' <u>E. scandens</u> . Traitement au 3 <sup>e</sup> stade larvaire.....  | 42 |
| 4 | Effets du virus produit <u>in vivo</u> sur la durée de la période nymphale, sur le poids et sur la longueur des chrysalides d' <u>E. scandens</u> . Traitement au 4 <sup>e</sup> stade larvaire.....  | 43 |
| 5 | Transmission à la génération suivante du CPV produit <u>in vivo</u> .....   | 50 |
| 6 | Effets de l'infection par différentes concentrations de polyèdres produits <u>in vitro</u> sur l'évolution des stades larvaires d' <u>E. scandens</u> . Infection au 3 <sup>e</sup> stade.....        | 59 |
| 7 | Effets de l'infection par différentes concentrations de polyèdres produits <u>in vitro</u> sur l'évolution des stades larvaires d' <u>E. scandens</u> . Infection au 4 <sup>e</sup> stade.....        | 60 |
| 8 | Effets du virus produit <u>in vitro</u> sur la durée de la période nymphale, sur le poids et sur la longueur des chrysalides d' <u>E. scandens</u> . Traitement au 3 <sup>e</sup> stade larvaire..... | 61 |
| 9 | Effets du virus produit <u>in vitro</u> sur la durée de la période nymphale, sur le poids et sur la longueur des chrysalides d' <u>E. scandens</u> . Traitement au 4 <sup>e</sup> stade larvaire..... | 62 |

Tableaux

10	Transmission à la génération suivante du CPV produit <u>in vitro</u> .....	66
----	---	----

## REMERCIEMENTS

Je tiens personnellement à manifester toute ma reconnaissance:

Au Dr Serge Belloncik, directeur de ce projet, pour sa participation assidue et son encouragement tout au long des travaux;

Au Dr Antoine Aubin, pour ces judicieux conseils portant sur le traitement statistique des résultats;

A M. Marcel Dupré (Ferme expérimentale, gouvernement du Canada, l'Assomption, P.Q.) pour sa collaboration lors de la collecte des larves;

A Johanne Dionne, Françoise Caron et Micheline Boulianee, pour leur précieuse aide technique;

A Roger Savignac, pour l'aide apportée lors de la prise de photographies;

Aux Docteurs P. P. Leucosevicius et G. Mailloux pour leurs encouragements;

A Agriculture Canada, à la direction générale de l'enseignement supérieur du Québec, au Conseil national des recherches du Canada ainsi qu'à l'Université du Québec à Trois-Rivières pour leurs apports financiers.

## INTRODUCTION

Ces dernières années, d'importants dégâts causés aux plantations de tabac par les larves de ver-gris principalement par Euxoa messoria (Harris) et Euxoa scandens (Riley) (Ritchot & al., 1977) ont été rapportés régulièrement dans les régions de Lavaltrie, l'Assomption et Lanoraie (Province de Québec).

Les dommages sont causés par les larves vers la mi-mai dès la plantation des jeunes plants de tabac. Les larves sectionnent aléatoirement le plant de tabac, mangent les feuilles ou la partie apicale du plant favorisant ainsi le développement de surgeons. Ces dommages causés au tabac ont été évalués à 19% en 1978 (G. Mailloux, communication personnelle). Cette valeur peut toutefois fluctuer grandement en raison de la population de vers-gris variant d'une année à l'autre. Ces dégâts entraînent ainsi une hausse du coût de la production et une baisse de rentabilité d'un champ. Le seul moyen actuellement préconisé contre ces insectes ravageurs repose particulièrement

sur l'utilisation massive des insecticides chimiques. Ces derniers, bien qu'efficaces, comportent certains inconvénients telles une action non sélective, l'apparition d'espèces résistantes et une persistance dans le milieu (Van Den Bosch & Messenger, 1973).

Récemment, un virus (CPV) responsable d'une polyédrose cytoplasmique a été isolé (Quiot & Belloncik, 1977) à partir de larves d'E. scandens provenant d'une récolte en plein champ (région de Lanoraie) mais élevées au laboratoire de la ferme expérimentale de l'Assomption (Gouvernement du Canada). Des études épidémiologiques menées au cours des trois années suivantes dans la région de Lanoraie ne nous ont pas permis de réisoler ce virus. La polyédrose cytoplasmique détectée serait probablement due à une contamination virale de laboratoire ou à une activation de virose latente telle que signalée par Smith (1976) dans le cas d'autres viroses cytoplasmiques ou bien encore à un taux insignifiant d'infection en plein champ.

Quiot et Belloncik (1977) ont par ailleurs montré que les virus pouvaient se répliquer dans les cellules de Lymantria dispar cultivées in vitro. La forme des polyèdres produits sur culture cellulaire fut exclusivement cubique, comparativement à la forme majoritairement paraphérique des polyèdres retrouvés chez les insectes infectés.

Il nous a donc paru intéressant au cours de cette étude menée au laboratoire dans des conditions environnementales contrôlées, d'évaluer l'infectiosité des polyèdres du CPV exogène aux populations locales de vers-gris, chez E. scandens

dans une perspective de lutte intégrée à long terme. L'infectiosité du CPV chez E. scandens a été vérifiée par l'évaluation des doses infectieuses médianes (DI 50), des répercussions caractéristiques de la polyédrose cytoplasmique sur les stades immatures et matures de l'insecte ainsi que des taux de transmission du CPV à la génération suivante.

En culture cellulaire et chez la larve, les formes différentes de polyèdres synthétisés nous ont incité, aucun travail n'ayant été fait en ce sens, à savoir si nous étions en présence de deux types distincts de CPV. A cet effet, de nombreux passages du CPV produit en culture cellulaire chez les larves d'E. scandens ont été effectués et vice versa. En outre, une étude comparative de la pathogénicité des polyèdres viraux obtenus par infection des larves d'E. scandens à celles des inclusions synthétisées après un premier passage du CPV sur culture cellulaire fut menée; pathogénicité évaluée au même titre que pour les CPV produits chez l'insecte.

## CHAPITRE I

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

#### 1. Cycle biologique d'*Euxoa scandens* (Riley)

Espèce univoltine, *E. scandens* communément appelée le ver-gris blanc fait partie de l'ordre des Lépidoptères et de la famille des Noctuidae. Son habitat est confiné à un type de sol particulièrement sablonneux. *E. scandens* est une espèce phytopophage et polyphage. Sa présence a été signalée au Québec sur le tabac (Ritchot & al., 1977), en Ontario et au Manitoba sur de nombreuses plantes potagères (Beirne, 1971) et sur les asperges dans l'Etat du Michigan (Lambert & al., 1976).

Le cycle biologique d'*E. scandens* a été décrit pour la première fois par Hudson et Wood (1930). La figure 1 montre les différents temps d'apparition des divers stades tels qu'observés par ces chercheurs en Ontario. Les oeufs sont généralement détectés dès la mi-juillet jusqu'à la première semaine

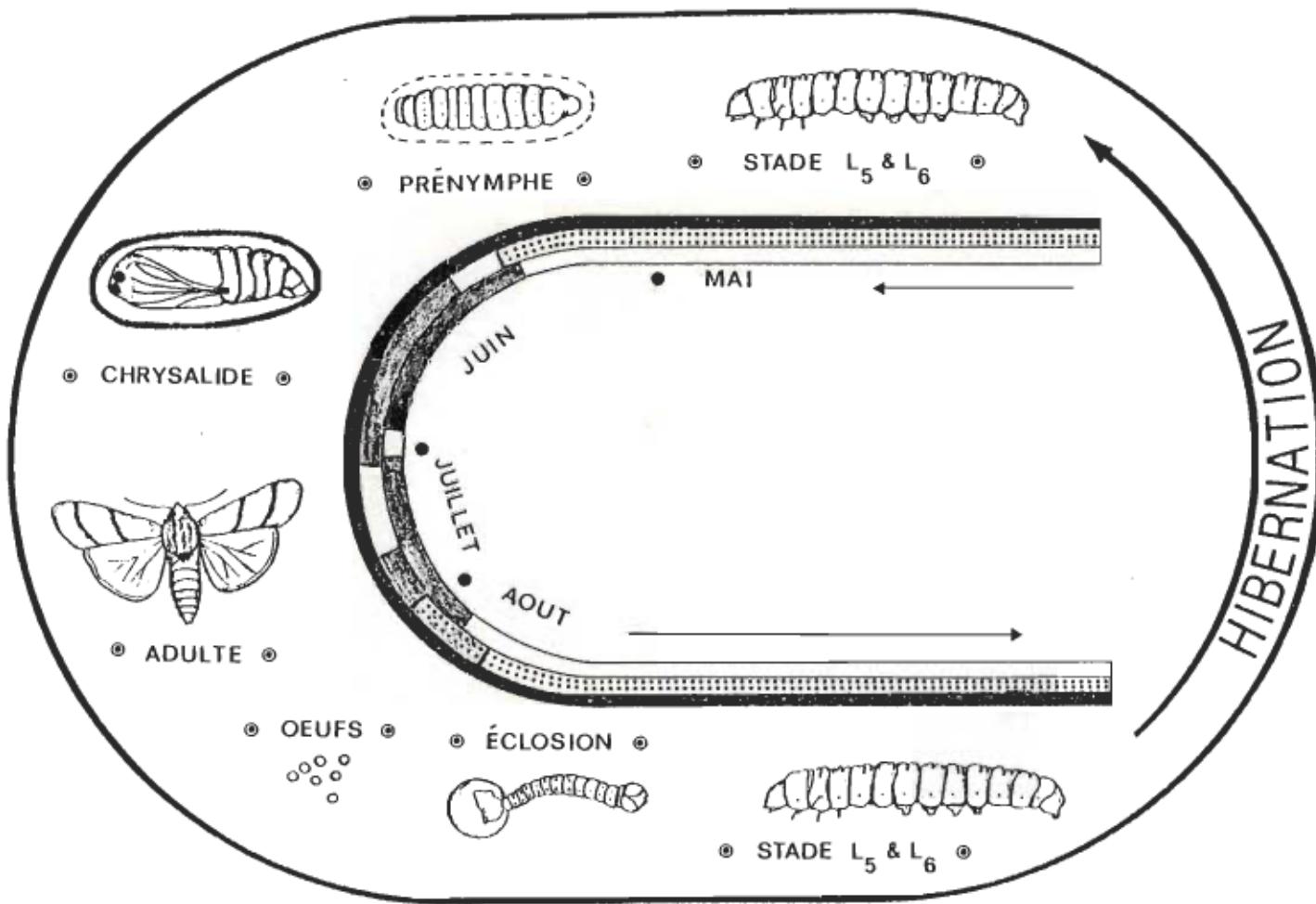


Figure 1.- Cycle biologique d'*Euxoa scandens* tel que décrit par Hudson et Wood (1930).

d'août. Les larves sont observées de juillet jusqu'en juin de l'année suivante, hibernant au 5<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> stade larvaire. Les prénymphes sont observées au cours des trois dernières semaines de juin et les nymphes dès la mi-juin jusqu'aux premiers jours de juillet. La présence des adultes a été notée dès les premiers jours de juillet jusqu'au début août.

## 2. Virus des polyédroses cytoplasmiques (CPV)

### 2.1 Caractéristiques des CPV

La découverte de la première polyédrose cytoplasmique a été effectuée par Smith et Wyckoff (1950) chez les lépidoptères Arctia caja et A. villica. Depuis, plus d'une centaine de virus responsables de polyédrose cytoplasmique ont été décrits (Smith 1976). Généralement limités aux lépidoptères, quelques cas de ce type de virose ont été observés chez les hyménoptères (Longworth & Spilling, 1970), les diptères (Anthony & al., 1973; Federici & al., 1973), les coléoptères et les neuroptères (Martignoni & Iwai, 1977) ainsi que chez un crustacé Daphnia sp (Federici & Hazard, 1975).

Le virus responsable de la polyédrose cytoplasmique de Bombyx mori a été employé comme modèle descriptif pour le groupe des CPV. Observé par Hosaka et Aizawa (1964), la particule virale a une forme icosaédrique de diamètre variant entre 60-70 nm. Constitué d'un corps dense entouré d'une coque externe (Lewandowski & Traynor, 1972), le virion a été caractérisé par la présence de douze projections tubulaires situées aux sommets du corps viral (Hosaka & Aizawa, 1964; Miura & al., 1969).

Le diamètre et la longueur des projections tubulaires ont été respectivement de 12 nm (Asai & al., 1972) et 20 nm (Miura & al., 1969). Miyajima et Kawase (1969) ainsi qu'Asai & al. (1972) ont suggéré que ces structures tubulaires pouvaient servir de site d'adsorption du virus sur les cellules hôtes.

Les particules virales sont incluses en grand nombre à l'intérieur de matrices cristallines de nature protéinique appelées "polyèdres" (Smith & Xéros, 1953). Le nombre de particules virales incluses par polyèdre a été estimé par Arnott & al. (1968) à plusieurs milliers. Cependant, pour certain type de CPV, uniquement une particule virale par polyèdre fut observée (Federici, 1973; Anthony & al., 1973). Dans le cas de certaines polyédroses cytoplasmiques, une forte proportion des particules virales ne sont pas incluses dans les polyèdres formés. Selon Hayashi (1970), le nombre de particules virales non incluses peut représenter plus de 70% du nombre total des particules formées chez un insecte.

Les polyèdres cytoplasmiques sont de taille et de forme variables. Des formes octoèdres, tétraèdres et parasphériques ont été observées par Hukuhara et Hashimoto (1966). Il fut admis par ailleurs que ces formes distinctes de polyèdres étaient déterminées par le génome du virus (Payne & Harrap, 1977). Aruga & al. (1963) ont observé que la taille des polyèdres était dépendante de la position du polyèdre formé au niveau de l'intestin moyen. Les plus gros polyèdres furent retrouvés dans la partie antérieure de l'intestin moyen et les plus petits dans la

partie postérieure.

## 2.2 RéPLICATION DES CPV CHEZ LES INSECTES

Chez les insectes, l'infection par le CPV survient en général lors de l'ingestion orale de polyèdres par les larves. Les polyèdres ingérés sont alors dissous par les sucs alcalins de l'intestin moyen (Faust & Adams, 1966; Dadd, 1970) où les particules virales sont libérées. Cependant, les particules virales non protégées par les protéines constituant le polyèdre ne sont apparemment pas infectieuses quand elles sont injectées per os, bien qu'elles peuvent causer l'infection de l'intestin moyen si elles sont injectées dans l'hémocoel (Faust & Cantwell, 1968).

Selon l'hypothèse de Kobayashi (1971), lors de l'infection, les virions sont adsorbés par leurs projections, spécifiquement au niveau des cellules épithéliales de l'intestin moyen, puis l'acide nucléique du virus est injecté dans le cytoplasme des cellules à travers ces projections. L'ARN et les protéines structurales des virus sont ensuite synthétisés formant des plaques virogènes (Xéros, 1956) où l'assemblage des constituants structuraux a lieu. Progressivement, à proximité des stromas virogènes, se forment des matrices cristallines où s'effectuent la synthèse des protéines structurales des polyèdres (Arnott & al., 1968). Ces protéines qui cristallisent, incluent de nombreuses particules virales formant les polyèdres viraux. Finalement, l'éclatement des cellules infectées survient suite à la désintégration de la membrane cytoplasmique (Kobayashi, 1971).

Les polyèdres viraux sont relachés au niveau de la lumière intestinale et retrouvés dans les excréments des larves.

L'infection virale est confinée uniquement au niveau des cellules épithéliales bordant l'intérieur de l'intestin moyen et n'atteint pas les cellules régénératrices. Ceci est une des causes de la nature chronique plutôt que létale de la polyédrose cytoplasmique (Payne & Harrap, 1977; Yamagushi, 1977).

### 2.3 Modes de transmission des CPV chez les insectes

#### 2.3.1 De larves à larves (transmission horizontale)

Le mode de transmission du CPV chez les larves dans la nature s'effectue principalement par l'ingestion de plantes contaminées par les excréments (figure 2) ou par les cadavres d'insectes infectés (Smith, 1976). D'autre part, selon Longworth (1973), la migration et la prédatation sont des facteurs très importants dans la dissémination de l'agent pathogène. Le cannibalisme pratiqué par certaines espèces (Longworth, 1973), le parasitisme (David, 1965), le vent ainsi que la pluie (Vago & Bergoin, 1968; Bird, 1961) peuvent contribuer à la dissémination des polyèdres.

#### 2.3.2 D'une génération à l'autre (transmission verticale)

La transmission du CPV à la génération suivante a été étudiée par différents chercheurs. Hukuhara (1962) a prétendu que le CPV retrouvé chez B. mori était transmis à la génération suivante par le germe. Aruga et Nagashima (1962) ont suggéré

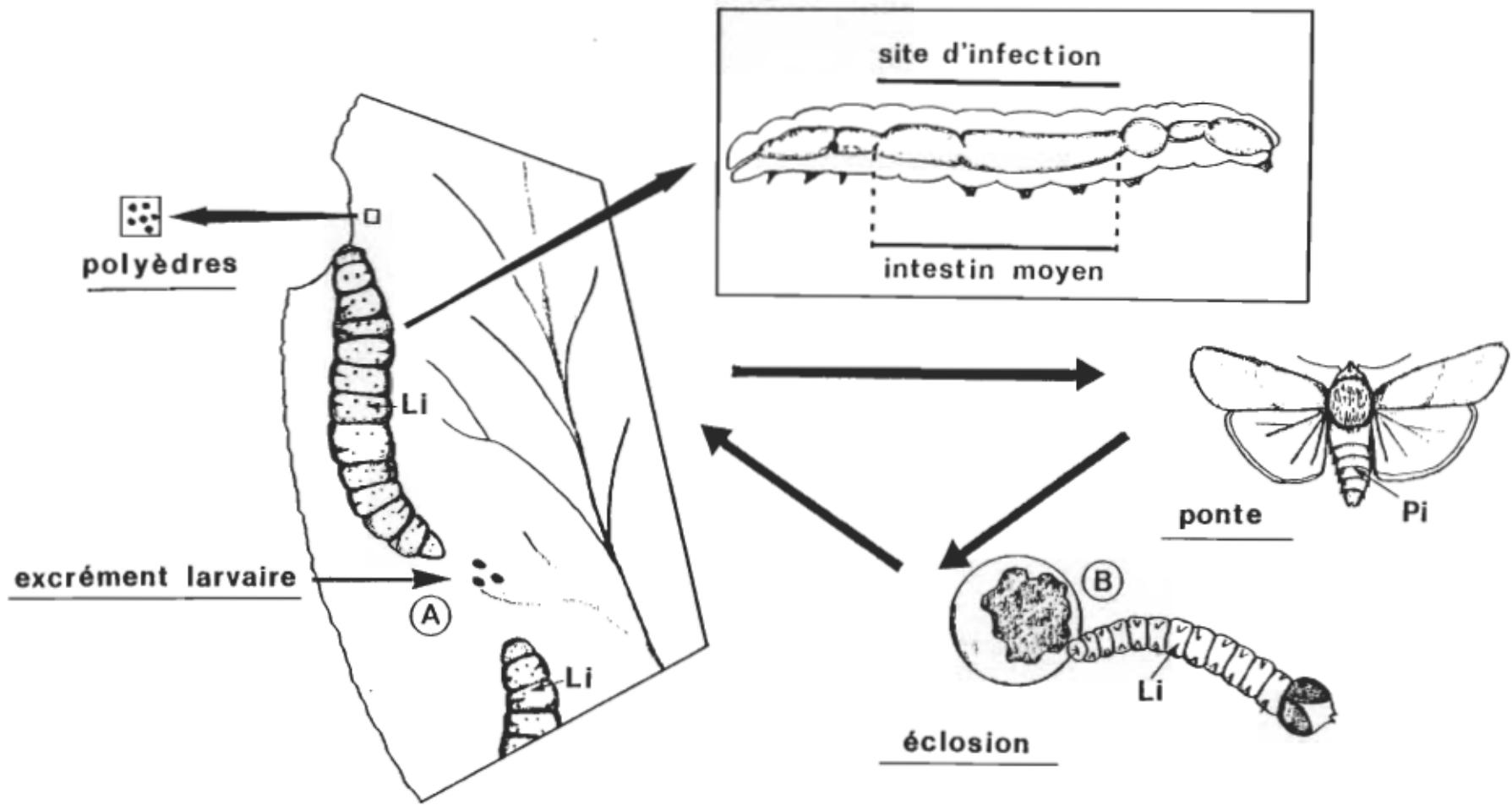


Figure 2. - Mode de transmission horizontale (A) et verticale (B) du CPV chez les lépidoptères. Li: larve infectée; Pi: papillon infecté.

que le CPV de B. mori était transmis de génération en génération lors de la ponte des oeufs. Sikorowski & al. (1973) ainsi que Mery et Dulmage (1975) ont démontré que le CPV retrouvé chez Héliothis virescens L. était transmis d'une génération à l'autre à la surface des oeufs lors de la ponte. Les larves seraient infectées au cours de leur émergence de l'oeuf lors de l'ingestion d'une partie du chorion contaminé par le CPV (figure 2).

Une interprétation du mode de transmission du CPV à la surface de l'oeuf a été émise par Mery et Dulmage (1975). A partir d'examens microscopiques des différents organes des femelles d'H. virescens infectées et accouplées, de nombreux polyèdres cytoplasmiques furent retrouvés au niveau de la bourse copulatrice, la partie rectale et à la base des ailes. Cependant, aucun polyèdre n'a été observé au niveau des ovarioles. Ces chercheurs ont suggéré que la partie rectale et l'extrémité des ailes étaient souillées au moment ou peu de temps après l'émergence de l'adulte lors de l'expulsion par l'anus du méconium (produit d'excrétion formé au cours de la période nymphale) contenant de nombreux polyèdres. Quant à la bourse copulatrice, elle était probablement souillée au moment de l'accouplement lors de la pénétration de l'endophallus entraînant des polyèdres. La surface des oeufs serait donc contaminée par le CPV au moment de la ponte, soit au niveau de l'oviducte et à la sortie de ces derniers par les fèces ou par contact des ailes contaminées sur les oeufs. Chez H. virescens, le taux moyen de transmission du CPV à la génération suivante a été évalué à 70% (Sikorowski &

al., 1973).

#### 2.4 RéPLICATION DES CPV EN CULTURE CELLULAIRE

Ces dernières années, l'avènement des cultures de tissus d'insecte a permis d'approfondir nos connaissances quant à la réplication in vitro des virus pathogènes aux insectes.

Les premières observations relatives au développement du CPV en culture cellulaire ont été effectuées imprévisiblement par Grace (1962 a) sur primoculture établie à partir d'ovaires d'Antheraea eucalypti. D'autre part, Vago et Bergoin (1963) furent les premiers à provoquer une maladie expérimentale par inoculation de virus libres (CPV) retrouvés chez Lymantria dispar à une primoculture établie à partir d'ovaires du même insecte. Ces mêmes chercheurs ont observé que la cytopathologie des cellules infectées in vitro était identique à celle observée in vivo.

Plus tard, la réplication du CPV en culture cellulaire continue, établie à partir d'ovaires de Trichoplusia ni, a été observée par Granados & al. (1974). Grace (1962 a) ainsi que Granados & al. (1974) ont noté une variation dans la forme des polyèdres produits sur cellules cultivées in vitro. Les polyèdres étaient en grande majorité, mais non exclusivement de forme cubique. Ces mêmes chercheurs ont aussi montré, sans pour autant quantifier leurs observations, que les polyèdres produits in vitro étaient virulents pour l'hôte d'origine.

Récemment Quiot et Belloncik (1977) ont observé la réplication du CPV isolé chez E. scandens dans les cellules de

L. dispar cultivées in vitro. Contrairement à la forme paraspérique des polyèdres observés chez les larves d'E. scandens infectées, la totalité des polyèdres produits in vitro étaient exclusivement de forme cubique.

## 2.5 Utilisation des CPV en lutte biologique

Des expériences effectuées sur de vastes parcelles de terrain forestier, ont démontré l'efficacité des CPV utilisés seuls ou combinés à d'autres agents pathogènes dans le contrôle des insectes ravageurs.

Le traitement le plus spectaculaire, suite à l'utilisation du CPV, a été mené contre la chenille processionnaire Thaumetopoea pityocampa, ravageur des forêts de pin (Grison & al., 1959; Biliotti, 1959). Le traitement a été effectué sur une superficie de 500 hectares à raison de  $4.8 \times 10^8$  polyèdres/hectare. Quatre mois après le traitement, le taux de mortalité larvaire attribuable à la maladie virale a été approximativement de 75% et la presque totalité des larves survivantes, présentes sur les lieux étaient infectées.

Homologué au Japon, le CPV seul ou combiné avec Bacillus thuringiensis contre Dendrolimus spectabilis (Katagiri & al., 1977), s'est avéré très efficace dans le contrôle à long terme de cet insecte. Les taux de mortalité, attribuable à l'infection virale, observés chez D. spectabilis en pleine nature ont été très satisfaisants. Ces mêmes auteurs ont obtenu des résultats intéressants quant à l'augmentation du taux de mortalité de

larves virosées durant l'hibernation en comparaison des populations non infectées.

Malgré ces succès, résultants de l'introduction de CPV exogéniques au sein de populations d'insectes nuisibles, ce système naturel a été souvent abandonné du fait qu'il n'a pu atteindre des niveaux de contrôle à court terme aussi efficace que ceux causés par l'application d'insecticides chimiques. Jusqu'à présent, les virus des polyédroses nucléaires (NPV) ont été les plus utilisés lors du contrôle d'insectes ravageurs. Ceci est attribuable à leur efficacité de contrôle à court terme, mais aussi au fait qu'ils n'ont aucune parenté avec les virus des vertébrés impliquant moins de risques pour ces derniers. Mais tel qu'indiqué par Tinsley \* (1980), un intérêt plus grand devrait être porté à l'utilisation des CPV car ils pourraient présenter en lutte biologique une importance plus que généralement admise dans le contrôle des insectes nuisibles. L'utilisation des CPV serait d'autant plus justifiée que l'addition du CPV à des suspensions de NPV (1 CPV/200 NPV) améliorerait l'action des virus des polyédroses nucléaires (Cunningham, 1980)\*.

---

\* Workshop on insect pest management with microbial agents.  
May 12-15, 1980.

## CHAPITRE II

### MATERIELS ET METHODES

#### 1. Récolte des larves d'*E. scandens* en pleine nature

Les larves d'*E. scandens* ont été ramassées dans les champs de tabac de la région de Berthierville en avril et mai 1977. En majorité, elles furent retrouvées en bordure des quadrats de seigle où le terrain est élevé et sablonneux. En ce temps de l'année, les larves avaient atteint le 6<sup>e</sup> ou 7<sup>e</sup> stade larvaire.

#### 2. Technique d'élevage d'*E. scandens* au laboratoire

Au laboratoire, les adultes résultant des larves ramassées sur le terrain ont donné des oeufs viables servant à l'élevage aseptique d'*E. scandens*.

## 2.1 Les oeufs

Les oeufs ont été retirés tous les jours des cages destinées à la ponte et placés dans des fioles (17 mm de diamètre x 50 mm de hauteur). Ces oeufs ont été incubés dans une chambre de croissance (model I-23L, Controlled Environmental Equipment) à une température de 25° C et soumis à une photopériode de 10 hres ainsi qu'à un taux d'humidité de 70%. Quatre jours après la ponte des oeufs, ces derniers ont été désinfectés à l'hypochlorite de sodium 0.5% pendant 10 minutes, lavés à l'eau distillée stérile et séchés à l'air sur un filtre dans un entonnoir de type Buchner. Les oeufs ainsi traités ont été à nouveau incubés aux mêmes conditions d'élevage décrites plus haut.

## 2.2 Les larves

Dès l'émergence des larves, celles-ci ont été transférées à l'aide d'un fin pinceau dans des boîtes de pétri (25 larves/boîte) contenant une parcelle de diète (Hinks & Byer, 1976) (Appendice 1). Cependant, le formol à cause de son action antivirale (Vail & al., 1968; Ignoffo & Garcia, 1968) a été substitué par l'hydrochlorure de tétracycline à raison de 50 mg/litre de diète préparée (Bell & Kanavel, 1976). La condensation de l'eau à l'intérieur des contenants servant à l'élevage des jeunes larves a été minimisée en plaçant entre le couvercle et le contenu une bande de papier filtre. Les conditions d'élevage larvaire, tel que la température, l'humidité et la photopériode ont été les mêmes que pour l'incubation des oeufs.

Les stades larvaires ont été déterminés par une mesure des capsules céphaliques rejetées lors des mues (M. Marcel Dupré, communication personnelle) (Appendice 2). Parvenues au 3<sup>e</sup> stade, les larves ont été transférées individuellement dans des boîtes en plastique clair (4.5 x 2.3 x 2 cm; Canus Equipment Ltd) contenant une parcelle de diète (1.5 cm<sup>3</sup>). L'élevage individuel a été nécessaire à partir du 3<sup>e</sup> stade afin d'éviter le cannibalisme et favoriser un développement larvaire homogène. La diète a été remplacée chaque semaine. La manipulation des larves a été effectuée à l'aide de pinces désinfectées dans une solution comprenant 5% d'acide acétique glacial dans de l'alcool éthylique 70%. Tous les contenants ont été désinfectés à l'hypochlorite de sodium 1.5% pendant 2 heures.

### 2.3 Les prénymphes et les nymphes

Les premiers signes visuels nous permettant de distinguer le stade prénymphal ont été la contraction du corps larvaire, une diminution de la translucidité cuticulaire et l'apparition de corps gras blanc laiteux sous la cuticule larvaire (Hinks & Byer, 1976). Dès ces premiers signes, tout apport de nourriture à la prénymphe fut discontinué. Les prénymphes ont été placées dans de nouveaux contenants et maintenues en chambre de croissance jusqu'au moment de l'émergence des nymphes.

Vingt-quatre heures après l'émergence des nymphes celles-ci ont été transférées séparément dans des fioles contenant 15 ml d'une solution d'agar solidifiée (Simmons & Sikorowski, 1973) et une rondelle de papier d'aluminium éliminant le contact

nymphé-gélose. Le sexe des futurs adultes fut déterminé au stade nymphal (Cheng, 1970).

#### 2.4 Les adultes

Peu de temps après l'émergence des adultes, ceux-ci ont été transférés dans des cages (11.5 x 9 x 15 cm) destinées à la ponte à raison d'un couple par cage. Ces adultes ont été nourris d'une solution de miel 10% contenue dans une fiole équipée d'une tige de coton pourvoyant la solution nutritive. Les cages ont été placées sur du sable (1 cm d'épaisseur) passé au tamis (27 mailles/cm) sur lequel les femelles ont déposé leurs oeufs. Pour récolter ces oeufs, le sable a été passé au tamis 16 mailles/cm .

#### 3. Méthode de production des polyèdres viraux chez la larve

Des groupes de 25 larves ont été infectées sur parcelle de laitue ( $3 \text{ cm}^2$ ) préalablement lavée et séchée sur laquelle a été vaporisée une suspension virale de  $10^7$  polyèdres par ml. Après quarante-huit heures, la totalité de la laitue ayant été mangée, les larves ont été transférées dans des contenants de plastique (10 x 18 pouces) contenant la diète. Parvenues au 7<sup>e</sup> stade, les larves infectées ont été disséquées, après anesthésie à l'éther. Leur intestin a été prélevé et broyé dans un homogénéisateur de type Virtis à raison d'un intestin par ml d'eau distillée stérile. Les débris larvaires ont été éliminés par filtration grossière sur huit couches de gaze. Le filtrat a été centrifugé à 5000 g pendant 30 minutes (Centrifugeuse Sorval RC-5, munie de la tête SS-34). Le surnageant contenant

les virus non inclus dans les polyèdres a été dilué dix fois dans une solution PBS (Appendice 3) et purifié par filtration sur membrane millipore 0.45  $\mu$ . Le culot contenant les polyèdres viraux a été lavé à l'eau distillée stérile. Pour les polyèdres, ce processus de semi-purification a été répété trois fois. Les suspensions de virus non inclus et de polyèdres viraux ont été conservées à -20° C jusqu'à utilisation. Par ailleurs, des suspensions en virus libres ont été obtenues par dissolution des polyèdres dans une solution de carbonate de sodium 2% (Quiot & Belloncik, 1977).

La concentration des polyèdres viraux a été déterminée à l'aide d'un hémacymètre de type Bright-Line Counting Chamber au grossissement 450x. Le nombre de polyèdres en suspension fut évalué à  $[2.06 \pm 0.08] \times 10^9$  polyèdres/ml. Huit dilutions décimales ont été préparées à partir de cette suspension polyédrale mère.

#### 4. Méthode d'infection des larves du 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades larvaires

L'infection individuelle des larves a été nécessaire pour connaître exactement la quantité de polyèdres viraux ingérés par larve.

Des disques de laitue (7 mm de diamètre) lavés et rincés à l'eau distillée stérile ont servi de support aux polyèdres viraux. Cinq  $\mu$ l de polyèdres viraux en suspension ont été déposés sur chacun des disques de laitue à l'aide d'un micro-applicateur. Après assèchement de la goutte de virus, la parcelle de laitue a été déposée avec une larve dans le fond d'une

petite fiole stérile et élevée aux mêmes conditions d'élevage citées antérieurement. Après consommation totale de la laitue, donc de l'inoculum viral, les larves ont été transférées individuellement dans des boîtes de plastique clair contenant un cube de diète.

#### 5. Critères de diagnostic de l'infection virale

Quinze jours après le traitement, l'infection virale a été détectée chez la larve après dissection, notamment par l'aspect laiteux de l'intestin moyen et la présence de polyèdres vitaux dans les frottis de ce dernier, colorés suivant la technique de Sikorowski & al. (1971) (Appendice 4). D'autre part des coupes transversales de larves infectées ont été faites et fixées dans le liquide de Bouin puis colorées selon la technique de Vago et Amargier (1963) (Appendice 5) afin de localiser les sites de l'infection virale.

#### 6. Méthode d'évaluation des doses infectieuses médianes (DI 50)

Les doses infectieuses médianes (DI 50), c'est-à-dire les doses de polyèdres vitaux produits infectant 50% des larves traitées ont été évaluées chez les larves du 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades. Les larves ont été infectées selon la technique décrite en 4. Les diverses concentrations de polyèdres vitaux administrées aux larves du 3<sup>e</sup> stade ont été de 0 (témoin),  $1 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  et  $1 \times 10^5$  polyèdres/larve. Pour les larves traitées au 4<sup>e</sup> stade, nous avons utilisé les mêmes doses, plus celle de  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve.

Des groupes de 30 larves par dose ont été traitées et chaque traitement fut répété trois fois.

L'infection virale a été détectée selon les critères décrits antérieurement. Le nombre de larves infectées suite à l'administration des diverses concentrations de polyèdres viraux a servi à déterminer, suivant la méthode d'analyse probit de Daum (1970), les valeurs des doses infectieuses médianes (DI 50).

#### 7. Etudes des effets du CPV sur les stades immatures et matures d'*E. scandens*.

Afin de déterminer et d'évaluer les divers symptômes causés par la polyédrose cytoplasmique sur différents stades de l'insecte (larvaire, nymphal et adulte), des larves du 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades ont été traitées par le virus. Les concentrations de polyèdres viraux utilisées ont été de 0(témoin),  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  et  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve. Des lots de 50 larves par dose de polyèdres ont été infectées et chaque traitement a été répété trois fois.

Le nombre de larves ayant changé de stade, déterminé par le rejet d'une 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> mue ainsi que le nombre de pré-nymphes apparues, pour les larves traitées au 3<sup>e</sup> stade, a été enregistré journalièrement. Des observations similaires débutant au 5<sup>e</sup> stade, marquées par le rejet de la 4<sup>e</sup> mue, ont été effectuées chez les larves traitées au 4<sup>e</sup> stade. Une analyse probit (Daum, 1970) a été effectuée sur ces résultats recueillis.

En considérant comme jour zéro celui où la première

larve a passé au 4<sup>e</sup> stade, marqué par le rejet de la 3<sup>e</sup> mue pour les larves traitées au 3<sup>e</sup> stade, les durées comprises entre le jour zéro et le jour relatif au 4<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> stades ou du passage à l'état prénymphe de 50% d'individus traités et non traités ont été évaluées. Dans le cas des larves traitées au 4<sup>e</sup> stade, le jour zéro a été celui où la première larve a passé au 5<sup>e</sup> stade suite au rejet de la 4<sup>e</sup> mue.

La durée de la période nymphale ainsi que le poids et la longueur des nymphes ont été évalués pour des groupes de 40 chrysalides par dose de polyèdres administrée aux larves. Les résultats ont été soumis à une analyse de variance pour déterminer les différences dues aux divers traitements et le test de Student-Newman-Kewls a été utilisé pour comparer les moyennes.

Dès l'émergence des adultes, la maladie virale a été détectée par la présence de polyèdres viraux dans les frottis effectués à partir du méconium et colorés au Bleu de Méthylène 5%. Chez les adultes infectés, toutes formes d'anomalies sérieuses au niveau de leurs ailes pouvant altérer leur mode de reproduction et tout déplacement de leur part ont été observées.

#### 8. Evaluation de la transmission du CPV à la génération suivante

Les taux de transmission à la génération suivante du CPV ont été évalués comme suit: des larves du 3<sup>e</sup> stade ont été infectées par les polyèdres viraux à des doses causant 100%

d'infection ( $5 \times 10^6$  polyèdres par larve) et ensuite élevées comme décrit antérieurement. Les adultes résultant ont été accouplés et ont donné des oeufs viables qui n'ont pas été traités à l'hypochlorite de sodium. Des groupes de 100 larves par couple d'adultes ont servi à déterminer le pourcentage d'individus infectés à la génération suivante. Un frottis de l'intestin moyen de chacune des larves a été effectué et coloré selon la technique de Sikorowski & al. (1971) pour vérifier la présence de polyèdres viraux donc de l'infection.

## 9. Etude comparative des polyèdres produits in vivo et in vitro

### 9.1 Production de polyèdres viraux sur cellules de *L. dispar* cultivées in vitro

#### 9.1.1 Maintien de la lignée cellulaire

La lignée cellulaire (SCLd 135) établie à partir du lépidoptère *L. dispar* (Quiot, 1976) a été maintenue en fiole Falcon ( $75 \text{ cm}^2$ ) dans le milieu de Grace (1962 b) additionné de sérum de veau foetal (Gibco) à une concentration de 20%.

#### 9.1.2 Technique d'infection des cultures cellulaires

Les cellules de *L. dispar* ont été ensemencées en fiole Falcon ( $25 \text{ cm}^2$ ) à raison de  $2 \times 10^6$  cellules par fiole. Après vingt-quatre heures, le milieu de culture a été remplacé par 0.5 ml de suspension de virus non inclus obtenu selon la technique décrite antérieurement. Suite à une adsorption de deux heures à  $28^\circ \text{ C}$ , le milieu de culture contenant 20% de sérum de

veau foetal a été ajouté. Après une semaine d'infection, les polyèdres ont été recueillis par dissociation des cellules aux ultrasons (75 W, 60 secondes; appareil de type Megason Ultra-sonic Desintegrator) dans le milieu de culture et par centrifugation de ce dernier à 5000 g pendant 30 minutes. Les polyèdres contenus dans le culot ont été remis en suspension dans de l'eau distillée stérile et conservés à -20° C.

Le nombre de polyèdres, déterminé à l'aide d'un hémacymètre, fut évalué à  $[2.00 \pm 0.07] \times 10^9$  polyèdres/ml. Huit dilutions décimales ont été préparées à partir de cette suspension polyédrale mère.

#### 9.2 Expériences de réinfections des larves et de cellules cultivées in vitro

Des polyèdres obtenus lors de deux passages in vitro de virus libres ou inclus provenant de larves infectées ont été administrés aux larves d'E. scandens. Les virions synthétisés ont été repassés sur les cultures cellulaires de L. dispar et ainsi de suite. Les techniques d'infection des larves et des cellules in vitro ont été décrites aux paragraphes 3 et 9.1.2 respectivement.

Les polyèdres viraux extraits d'intestins ainsi que de cellules infectées par traitement aux ultrasons ont été observés en microscopie photonique après coloration des frottis selon la technique de Sikorowski & al. (1971).

9.3 Comparaison de certains effets suite à l'infection des larves par les polyèdres produits in vivo et sur celles cultivées in vitro

Parallèlement à l'étude évaluant la pathogénicité des polyèdres viraux produits in vivo chez E. scandens, nous avons effectué une même série d'expériences vérifiant la virulence des CPV obtenus en culture cellulaire sur l'insecte. Les valeurs DI 50, les effets du CPV produit in vitro sur les stades immatures et matures de l'insecte ainsi que la transmission du virus à la génération suivante ont été évaluées selon les mêmes critères et procédures que décrits aux paragraphes 5, 6, 7 et 8.

## CHAPITRE III

### RESULTATS

#### 1. Effets du CPV sur E. scandens

##### 1.1 Caractéristiques générales de la polyédrose cytoplasmique d'E. scandens

Les larves infectées par le CPV produit in vivo ont montré des symptômes externes très caractéristiques de la maladie virale. Les signes les plus apparents furent la perte graduelle de l'appétit et une réduction considérable de leur taille (figure 3). Plus difficilement décelable, nous avons observé chez les larves infectées, une légère diminution de leur teinte blanchâtre et de leur possibilité à se mouvoir, par rapport aux individus sains. Par ailleurs, l'examen microscopique d'excréments de larves malades a permis de détecter la présence de nombreux polyèdres viraux dans ces derniers.

Chez les sujets infectés, une seule pression au niveau de la partie médiane du corps larvaire, nous permettait de distinguer l'aspect blanchâtre de l'intestin moyen, perçu au travers de la cuticule larvaire. A la dissection des larves atteintes de la polyédrose cytoplasmique, nous pouvions discerner l'état anormal de l'intestin moyen. Ce dernier était hypertrophié, opaque, de couleur blanc laiteux ainsi que d'une extrême fragilité (figure 4). Occasionnellement, nous pouvions observer l'état congestionné de l'oesophage effectuant des mouvements pour pousser les aliments au niveau de l'intestin moyen, lequel était partiellement bloqué dû au renflement des cellules épithéliales bordant l'intérieur de ce dernier.

Des frottis effectués à partir de fragments de l'intestin moyen, de l'oesophage, de gonades et de tissus adipeux ont démontré que l'intestin moyen était le seul affecté par la maladie virale, où la présence de nombreux corps d'inclusion exclusivement de forme paraspérique fut détectée (figure 5).

Les coupes histologiques d'intestins moyens ont permis d'observer l'état hypertrophié des cellules épithéliales causé par l'accumulation massive de polyèdres intracytoplasmiques (figure 6). Suite aux mêmes observations, la présence de polyèdres viraux extracellulaires a été détectée au niveau de la lumière intestinale, résultant de la dégénérescence et de l'éclatement des cellules épithéliales infectées.

Figure 3

Larve de 7<sup>e</sup> stade saine (A) et infectée par le CPV (B).

Figure 4

Aspect macroscopique de l'intestin moyen d'une larve d'E.

scandens saine (A) et infectée par le CPV (B).

Intestin moyen infecté (→).

Figure 5

Frottis de l'intestin moyen infecté par le CPV. Coloration au Buffalo-Black (Sikorowski & al., 1971).

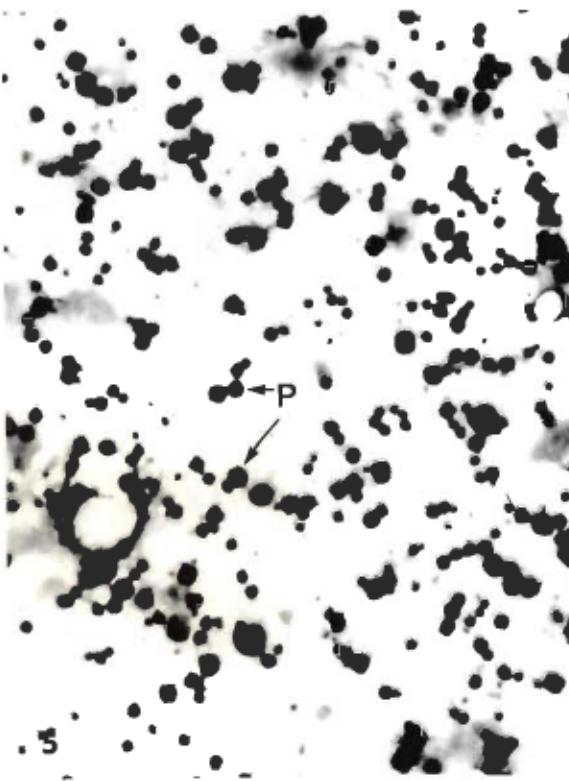
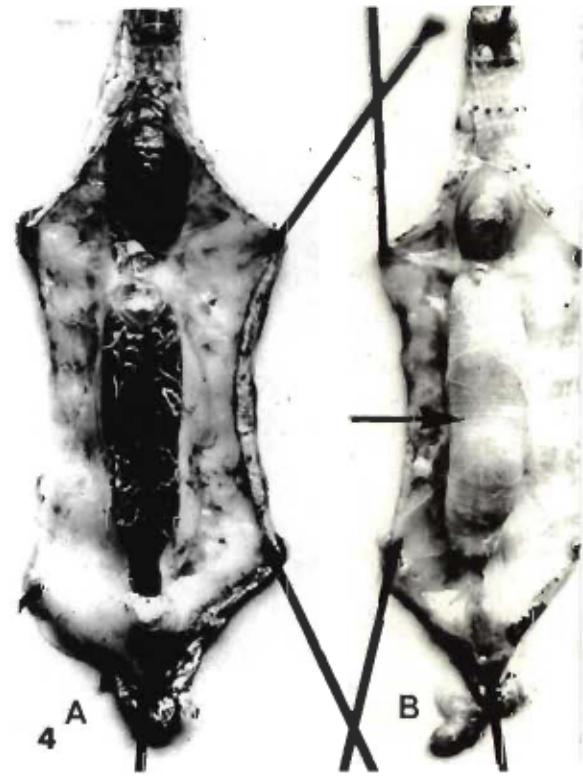
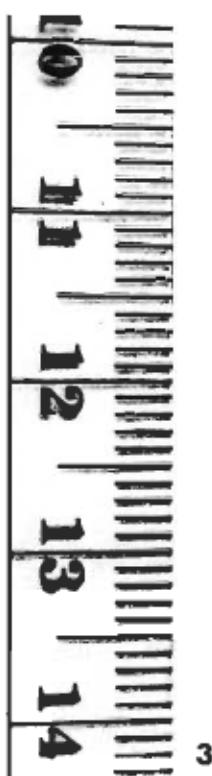
P: polyèdres x 600.

Figure 6

Coupe transversale de l'intestin moyen infecté par le CPV. Coloration Vago-Amargier (1963) x 130.

LI: lumière intestinale;

P : polyèdres.



## 1.2 Doses infectieuses médianes (DI 50) des polyèdres produits in vivo

Les doses de polyèdres viraux nécessaires pour entraîner des taux d'infection de 10% à 90% des sujets traités au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades larvaires furent déterminées. Cependant, les valeurs des doses infectieuses médianes (DI 50) ont été celles qui ont retenu notre attention.

Les valeurs DI 50 obtenues sont représentées à la figure 7. Les larves traitées au 3<sup>e</sup> stade ont montré une plus grande susceptibilité à l'infection virale que celles du 4<sup>e</sup> stade. Les valeurs DI 50 ont été de  $6.2 \times 10^2$  et  $2.9 \times 10^3$  polyèdres/larve respectivement dans le cas du 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades larvaires; valeurs différant significativement au niveau 5%. Par ailleurs, l'analyse comparative des deux courbes illustrées aux figures 7a et 7b, nous indique qu'il n'y a pas de différence significative au niveau 5% entre la valeur de leur pente étant respectivement de 0.8804 et 0.7875. Le parallélisme entre ces deux courbes dénote donc que les valeurs des doses infectieuses (DI) 10% à 90%, relatives à l'administration de polyèdres viraux, ont toujours été significativement supérieures dans le cas du traitement des larves du 4<sup>e</sup> stade. Autrement dit, une quantité plus importante de polyèdres viraux d'environ 4.7 fois a été nécessaire pour obtenir les mêmes taux d'infection chez les larves traitées au 4<sup>e</sup> stade.

## 1.3 Répercussion de l'infection virale sur la durée des stades larvaires

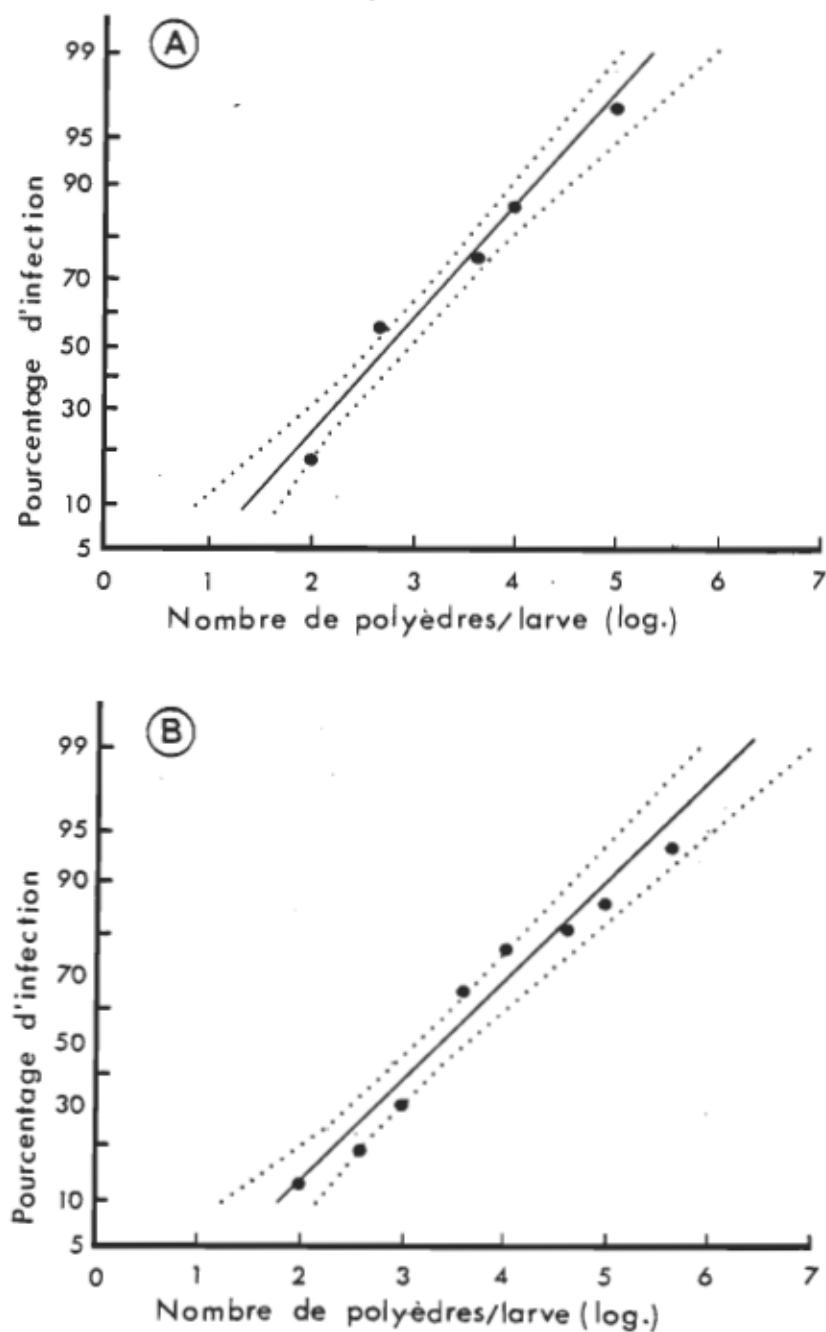


Figure 7. -Représentation graphique des doses infectieuses des polyèdres produits *in vivo*. Infection au 3<sup>e</sup> (A) et 4<sup>e</sup> (B) stades larvaires d'*E. scandens*. Les lignes pointillées représentent les intervalles de confiance à 95%.

Les répercussions de la polyédrose cytoplasmique sur la durée de la période larvaire, plus particulièrement sur la durée de certains stades au cours de cette même période, ont été déterminées. A cet effet, nous avons enregistré journalièrement les divers changements de stades marqués par le rejet des mues et l'apparition des prénymphes provenant de larves traitées au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades, représentés respectivement aux figures 8 et 9.

Les valeurs consignées aux tableaux 1 et 2 nous renseignent sur la durée de chacun des stades des larves traitées respectivement au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades par le CPV produit in vivo. à différentes concentrations. Nous avons noté une augmentation significative de la période larvaire en fonction de la dose de virus administrée dans le cas de larves traitées au 3<sup>e</sup> stade. A forte dose, cette augmentation a atteint une valeur de 43.9% (9.95 jours) de la période normale (Tableau 1). Par contre, quelles que soient les concentrations de polyèdres viraux ingérés par les larves du 3<sup>e</sup> stade, des retards vraiment significatifs à effectuer chacun des stades ont été notés qu'à partir du 5<sup>e</sup> stade. Parvenues à la fin de ce dernier stade, nous pouvons observer dans le cas des larves traitées avec  $5 \times 10^6$  polyèdres/larve, une augmentation de leur période de 6.5 jours par rapport au témoin.

Par ailleurs, nous avons remarqué lors d'observations non quantifiées, que l'elongation de la période larvaire s'est manifestée non seulement au cours de la période active des

FIGURE 8

Allure des décalages dans le temps des stades larvaires et prénymphe d'*E. scandens* en fonction de la dose de polyèdres produits in vivo administrée aux larves. Nombre de larves de 4<sup>e</sup> ( $SL_4$ ), 5<sup>e</sup> ( $SL_5$ ), 6<sup>e</sup> ( $SL_6$ ), 7<sup>e</sup> ( $SL_7$ ) stades et prénymphes (PN) en fonction du temps.

Traitements des larves par le CPV au 3<sup>e</sup> stade larvaire ( $SL_3$ ).

A: insectes sains (témoins).

B, C, D: infection larvaire par respectivement  $10^3$ ,  $10^5$  et  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve.

Le temps zéro correspond pour les larves des lots A, B, C, D au passage au 4<sup>e</sup> stade larvaire ( $SL_4$ ) de la première larve du lot.

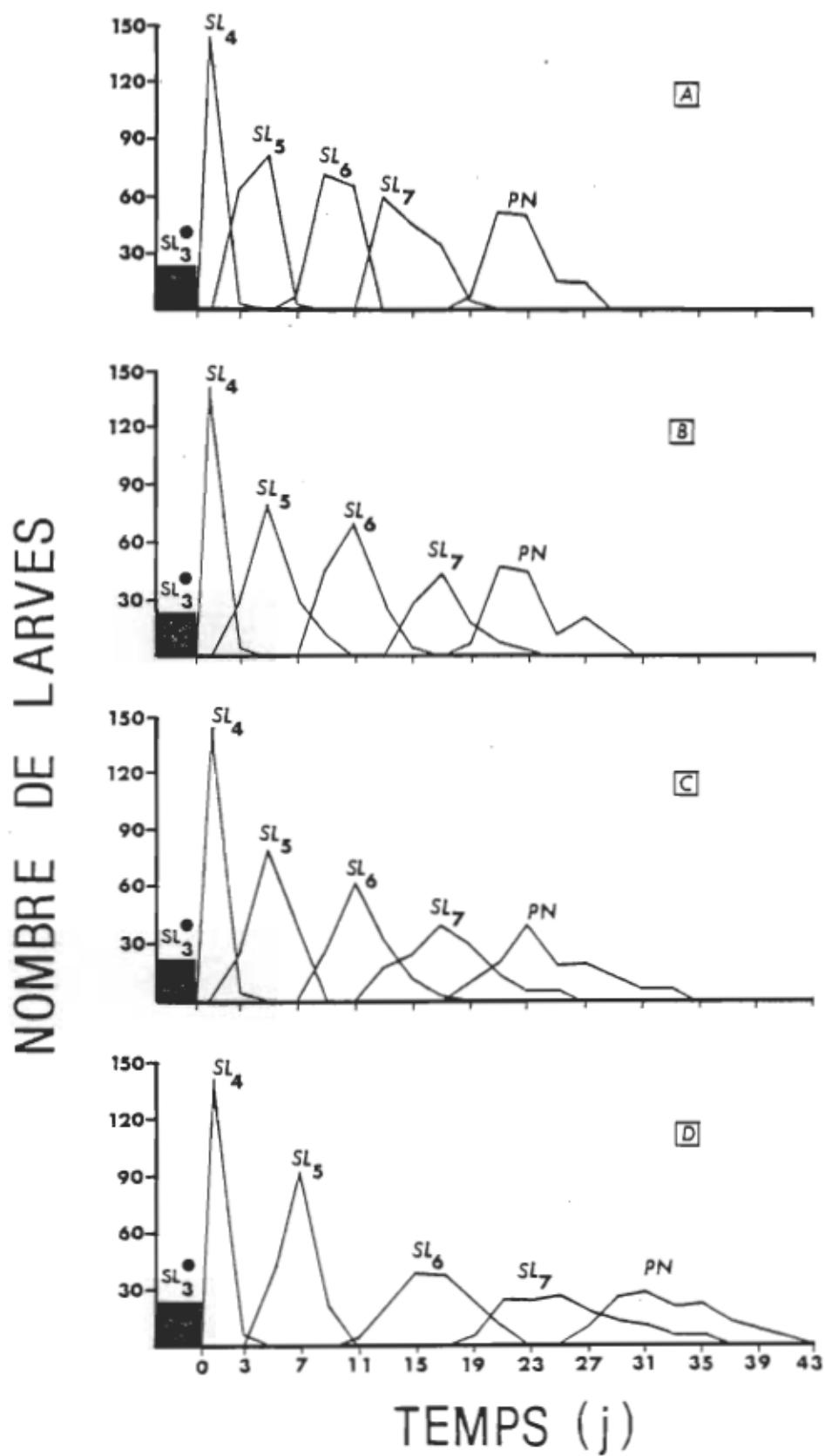


FIGURE 9

Allure des décalages dans le temps des stades larvaires et prénymphe d'E. scandens en fonction de la dose de polyèdres produits in vivo administrée aux larves. Nombre de larves de 5<sup>e</sup> (SL<sub>5</sub>), 6<sup>e</sup> (SL<sub>6</sub>), 7<sup>e</sup> (SL<sub>7</sub>) stades et prénymphes(PN) en fonction du temps.

Traitemennt des larves par le CPV au 4<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>4</sub>).

A: insectes sains (témoins).

B, C, D: infection larvaire par respectivement  $10^3$ ,  $10^5$  et  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve.

Le temps zéro correspond pour les larves des lots A, B, C, D au passage au 5<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>5</sub>) de la première larve du lot.

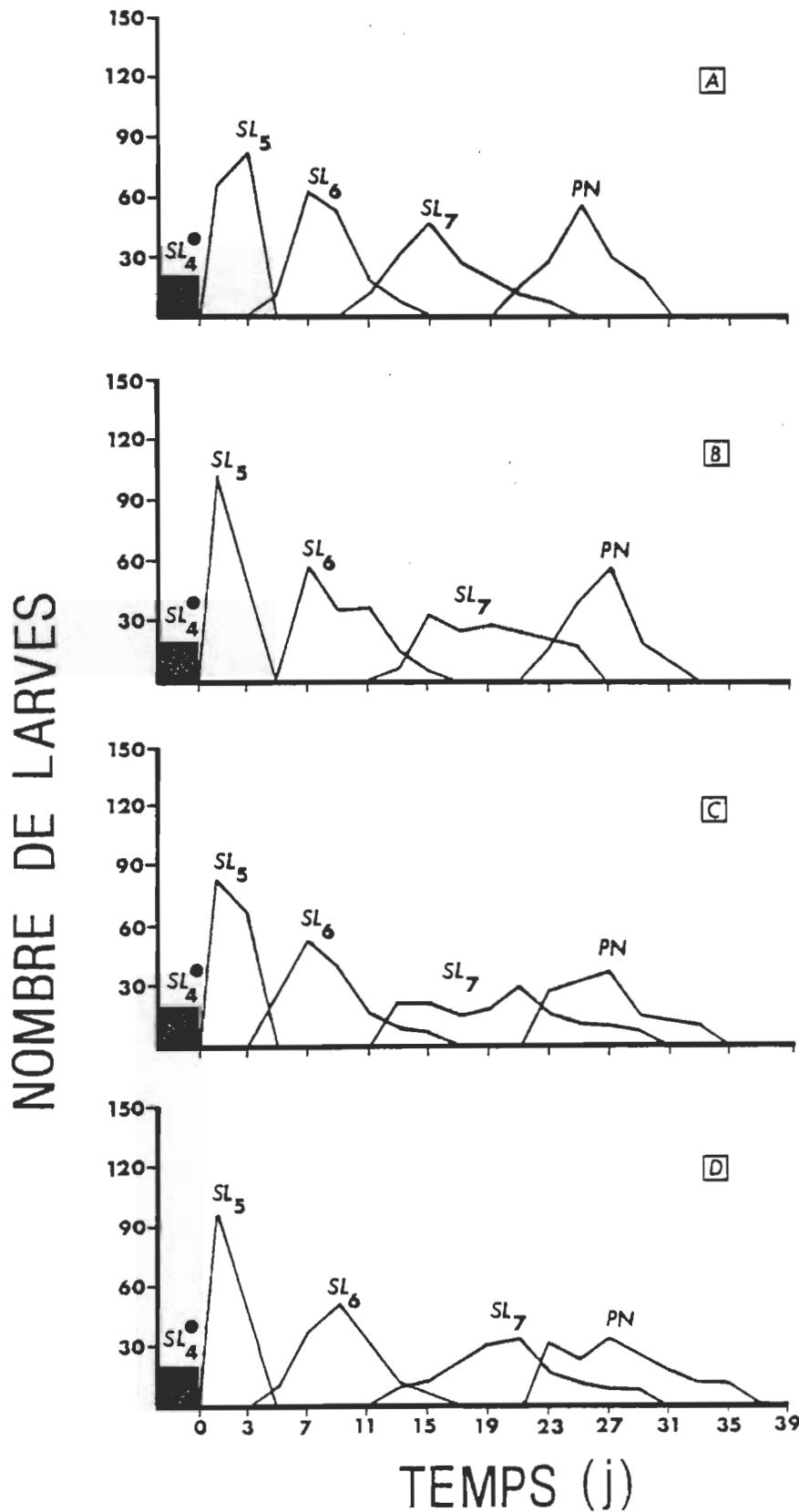


TABLEAU 1

Effets de l'infection par différentes concentrations de polyèdres produits in vivo sur l'évolution des stades larvaires d'E. scandens.

Infection au 3<sup>e</sup> stade

Concentrations (polyèdres/ larve)	Durées (j) <sup>1</sup>					Apparition des prénymphes
	3 <sup>e</sup> mue	4 <sup>e</sup> mue	5 <sup>e</sup> mue	6 <sup>e</sup> mue	SL <sub>7</sub>	
0	0.60 + 0.20 - 0.37 <sup>a(2)</sup>	4.20 + 0.14 - 0.17 <sup>a</sup>	9.67 + 0.47 - 0.50 <sup>a</sup>	14.77 + 0.17 - 0.17 <sup>a</sup>	22.74 + 0.37 - 0.38 <sup>a</sup>	
1 x 10 <sup>3</sup>	0.88 + 0.12 - 0.17 <sup>a</sup>	5.26 + 0.18 - 0.19 <sup>b</sup>	10.92 + 0.40 - 0.42 <sup>b</sup>	15.84 + 0.22 - 0.22 <sup>b</sup>	23.26 + 0.45 - 0.44 <sup>a</sup>	
1 x 10 <sup>5</sup>	0.68 + 0.16 - 0.27 <sup>a</sup>	5.19 + 0.15 - 0.16 <sup>b</sup>	11.36 + 0.17 - 0.18 <sup>b</sup>	17.61 + 0.47 - 0.50 <sup>c</sup>	24.81 + 0.26 - 0.27 <sup>b</sup>	
5 x 10 <sup>6</sup>	1.24 + 0.08 - 0.08 <sup>b</sup>	6.76 + 0.15 - 0.16 <sup>c</sup>	16.24 + 0.21 - 0.21 <sup>c</sup>	25.63 + 0.38 - 0.39 <sup>d</sup>	32.69 + 0.25 - 0.26 <sup>c</sup>	

(1) Temps pris par 50% des larves d'un lot pour atteindre les 4<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> stades larvaires (SL<sub>4</sub>, SL<sub>5</sub>, SL<sub>6</sub>, SL<sub>7</sub>) marqué par le rejet des mues et le stade prénymphal.

Temps zéro: passage de la 1<sup>ère</sup> larve du lot au SL<sub>4</sub>.

(2) Dans chaque colonne verticale, les intervalles de confiances à 95% des valeurs suivies par les mêmes lettres se chevauchent (analyse probit)

TABLEAU 2

Effets de l'infection par différentes concentrations de polyèdres produits in vivo sur l'évolution des stades larvaires d'E. scandens.

Infection au 4<sup>e</sup> stade

Concentrations (polyèdres/ larve)	Durées (j) <sup>1</sup>				Apparition des prénymphes
	4 <sup>e</sup> mue	5 <sup>e</sup> mue	6 <sup>e</sup> mue	SL <sub>5</sub> → SL <sub>6</sub> → SL <sub>7</sub>	
0	1.65 + 0.21 - 0.21 a(2)	8.26 + 0.18 - 0.19 a	16.15 + 0.39 - 0.40 a		25.14 + 0.19 - 0.19 a
1 x 10 <sup>3</sup>	1.69 + 0.10 - 0.11 a	9.27 + 0.33 - 0.34 b	18.97 + 0.26 - 0.26 b		26.38 + 0.19 - 0.19 b
1 x 10 <sup>5</sup>	1.84 + 0.12 - 0.12 a	8.38 + 0.44 - 0.48 a	19.42 + 0.30 - 0.31 b		26.66 + 0.46 - 0.50 b
5 x 10 <sup>6</sup>	1.74 + 0.13 - 0.14 a	9.28 + 0.19 - 0.19 b	20.50 + 0.37 - 0.37 c		27.87 + 0.26 - 0.26 c

- (1) Temps pris par 50% des larves d'un lot pour atteindre les 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> stades larvaires (SL<sub>5</sub>, SL<sub>6</sub>, SL<sub>7</sub>) marqué par le rejet des mues et le stade prénymphal.  
Temps zéro: passage de la 1<sup>ère</sup> larve du lot au SL<sub>5</sub>.
- (2) Dans chaque colonne verticale, les intervalles de confiances à 95% des valeurs suivies par les mêmes lettres se chevauchent (analyse probit)

larves à chacun des stades, mais aussi au moment où ces dernières ont effectué leurs mues. Autrement dit, au temps où surviennent leurs mues, les larves entrent dans une phase léthargique durant laquelle elles sont incapables de se mouvoir et de se nourrir. Le temps mis par les larves fortement infectées à accomplir chacune de leurs mues a été manifestement plus long que celui des larves saines.

Chez les larves traitées au 4<sup>e</sup> stade, les conséquences de la maladie virale sur la durée de la période larvaire ont été beaucoup moins considérables que celles des larves traitées au 3<sup>e</sup> stade. Nous avons noté une augmentation de cette période en fonction des doses croissantes de polyèdres viraux de 4.9 à 10.8% (Tableau 2). Mais pour ces mêmes larves traitées avec  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve, nous pouvions déjà observer un allongement de cette période de 27% à la fin du 6<sup>e</sup> stade.

La faible augmentation du temps total passé à l'état larvaire dans le cas des chenilles traitées au 4<sup>e</sup> stade a été causée par la diminution de la durée du 7<sup>e</sup> stade. A forte dose, cette diminution a été de 1.6 jours par rapport à la durée normale du 7<sup>e</sup> stade (Tableau 2). Dans le cas des larves traitées au 3<sup>e</sup> stade, cette diminution de la durée du 7<sup>e</sup> stade a été beaucoup moins évidente, étant de 0.85 jour (Tableau 1).

La mortalité des larves attribuable à la maladie virale fut détectée par la présence massive de polyèdres viraux dans les frottis d'intestin moyen de cadavres larvaires. A la dose de  $5 \times 10^6$  polyèdres/larve, les taux de mortalité larvaire

enregistrés depuis l'infection au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades jusqu'à l'apparition des prénymphes furent de 6.6 et 5.4%. Aucune relation n'a pu être établie entre les taux de mortalité larvaire et l'augmentation des doses de polyèdres viraux administrées.

#### 1.4 Effets du CPV sur le poids, la longueur et la durée de la période nymphale des chrysalides

Au stade nymphal, le symptôme le plus apparent de la maladie virale a été la réduction de la taille des chrysalides (figure 10). Par ailleurs, diverses malformations au niveau du corps nymphal ont été observées (figure 11).

Le poids, la longueur ainsi que la durée de la période nymphale de chrysalides mâles et femelles issues de larves traitées respectivement au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades, sont présentés aux tableaux 3 et 4. Les durées moyennes des périodes nymphales enregistrées tant pour les chrysalides mâles que femelles n'ont pas été affectées significativement par la maladie virale. Cependant, une légère diminution de la période nymphale a été observée en fonction de l'augmentation des doses de polyèdres viraux administrées aux larves de 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades.

A une dose de  $5 \times 10^6$  polyèdres/larve, nous avons noté par rapport au témoin une diminution significative du poids moyen des chrysalides mâles et femelles issues de larves traitées au 3<sup>e</sup> stade respectivement de 13.2 et 14.5% (Tableau 3). La longueur moyenne des chrysalides malades a diminué également en fonction de l'augmentation des doses de polyèdres viraux

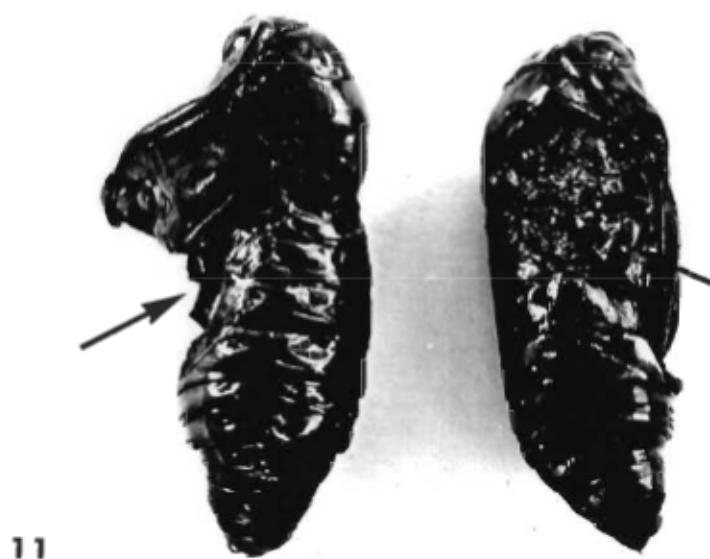


Figure 10. - Chrysalides provenant d'une larve infectée par le CPV (A) et saine (B).

Figure 11. - Chrysalides issues de larves infectées par le CPV. Noter les malformations (→).

TABLEAU 3

Effets du virus produit in vivo sur la durée de la période nymphale,  
sur le poids et sur la longueur des chrysalides d'E. scandens.

Traitements au 3<sup>e</sup> stade larvaire

Concen- trations (polyèdres/ larve)	<u>CHRY SALIDES MALES</u>			<u>CHRY SALIDES FEMELLES</u>		
	Période (1) nymphale	Poids (2)	Longueur (3)	Période (1) nymphale	Poids (2)	Longueur (3)
0	23.0	405.1 a(4)	19.1 a	23.1	415.9 a	19.1 a
1 x 10 <sup>3</sup>	22.5	375.3 ab	18.8 a	22.6	384.2 ab	18.7 a
1 x 10 <sup>5</sup>	22.2	365.8 b	18.3 ab	22.2	371.1 b	18.5 a
5 x 10 <sup>6</sup>	22.1	351.8 b	17.9 b	21.8	355.9 b	18.0 b

(1) Temps moyen en jour

(2) Poids moyen en mg

(3) Longueur moyenne en mm

(4) Dans chaque colonne relative aux poids et longueurs, les moyennes suivies par la même lettre ne diffèrent pas au niveau 5% (Test de Student-Newman-Kewls)

TABLEAU 4

Effets du virus produit in vivo sur la durée de la période nymphale,  
sur le poids et sur la longueur des chrysalides d'E. scandens.

Traitements au 4<sup>e</sup> stade larvaire

Concen- trations (polyèdres/ larve)	<u>CHRY SALIDES MALES</u>			<u>CHRY SALIDES FEMELLES</u>		
	Période (1) nymphale	Poids (2)	Longueur (3)	Période (1) nymphale	Poids (2)	Longueur (3)
0	23.2	427.0 a(4)	19.6 a	23.2	438.8 a	19.7 a
1 x 10 <sup>3</sup>	22.7	376.0 b	18.4 b	22.7	390.6 b	18.9 b
1 x 10 <sup>5</sup>	22.5	363.5 b	18.4 b	22.5	371.2 b	18.4 b
5 x 10 <sup>6</sup>	22.4	361.4 b	18.2 b	22.4	368.1 b	18.4 b

(1) Temps moyen en jour

(2) Poids moyen en mg

(3) Longueur moyenne en mm

(4) Dans chaque colonne relative aux poids et longueurs, les moyennes suivies par la même lettre ne diffèrent pas au niveau 5% (Test de Student-Newman-Kewls)

administrées. A forte dose, cette diminution a été de 1.2 mm dans le cas des chrysalides mâles et de 1.1 mm chez les femelles (Tableau 3). Une diminution de la longueur et du poids moyen des chrysalides a été aussi notée lorsque des larves de 4<sup>e</sup> stade ont été traitées au CPV (Tableau 4).

Aucune différence significative n'a été déterminée entre le poids moyen des chrysalides de chaque groupe infecté, mais ces derniers étaient différents au niveau 5% du groupe non traité. A forte dose, cette diminution du poids moyen des chrysalides mâles et femelles fut respectivement de 15.4 et 16.2% (Tableau 4); en ce qui a trait à la longueur de ces dernières, elle fut diminuée de 1.4 et 1.3 mm par rapport aux témoins.

Par ailleurs, des frottis de chrysalides présentant de tels symptômes de l'infection virale ont révélé la présence de nombreux polyèdres, donc la persistance du virus dans les nymphes.

Au niveau des populations non traitées et traitées au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades par le CPV, une analyse de régression a été effectuée afin d'évaluer la relation entre le poids moyen des chrysalides et la durée de la période larvaire (figure 12). Aucune relation significative (au niveau 5%) entre ces deux variables n'a été notée par analyse du facteur " r " (coefficient de corrélation). L'ensemble des résultats reflète bien cependant le rapport pouvant exister entre l'augmentation de la période larvaire chez les individus traités et la diminution correspondante du poids des chrysalides infectées.

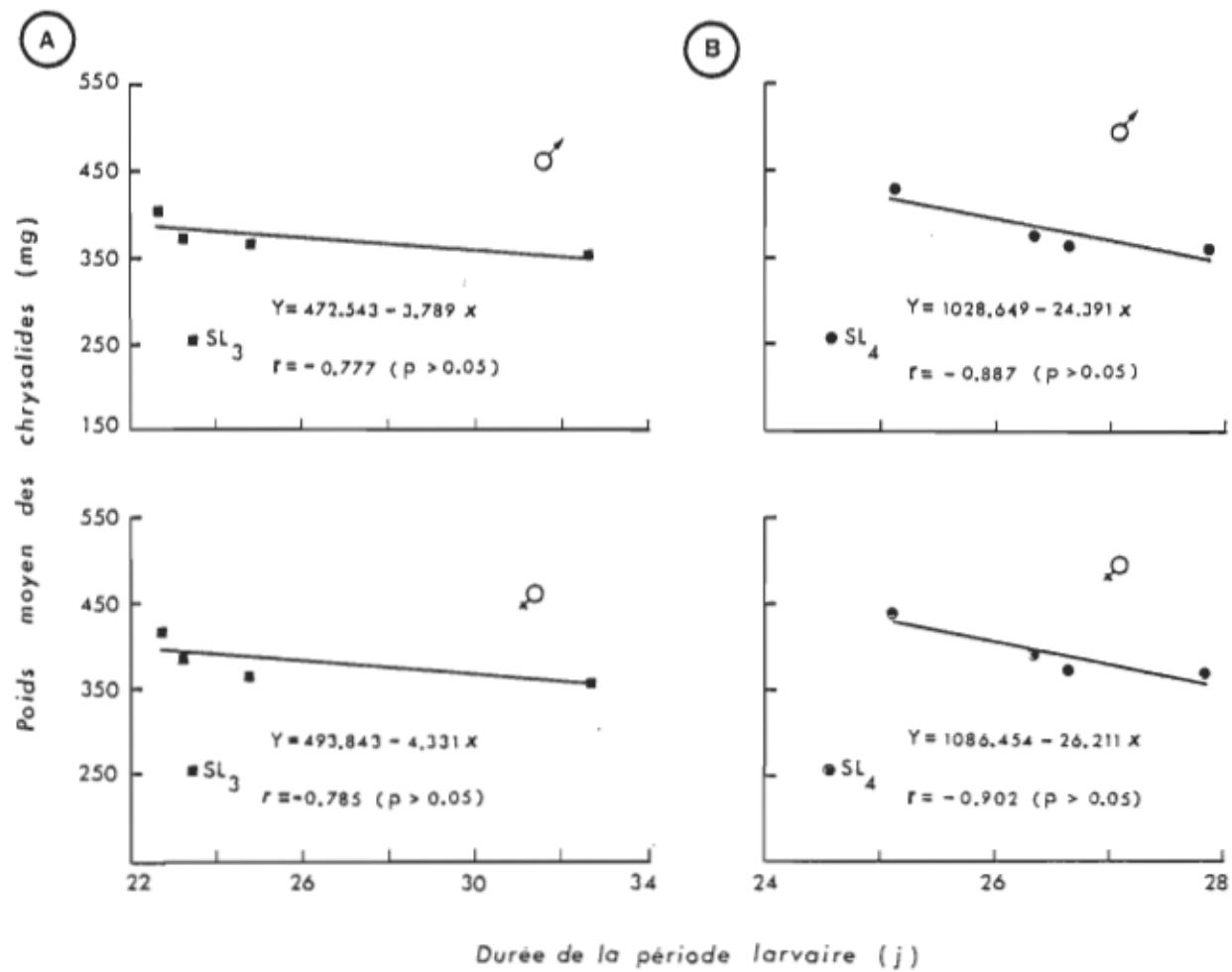


Figure 12. - Relation entre le poids des chrysalides mâles ainsi que femelles et la durée de la période larvaire.  
Infection au 3<sup>e</sup> (A) et 4<sup>e</sup> (B) stades larvaires (SL) d'E. scandens par les polyèdres produits in vivo.

D'autre part, une analyse de régression a été menée pour évaluer la relation entre la diminution de la période nymphale et celle du poids des chrysalides issues de larves traitées au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades (figure 13). Une corrélation positive (au niveau 5%) entre ces deux variables a été notée, tant pour les chrysalides mâles que femelles. Les lignes de régression présentent toutes des pentes positives. Cependant, les valeurs calculées des pentes furent plus élevées dans le cas des chrysalides issues de larves traitées au 3<sup>e</sup> stade que celles du 4<sup>e</sup> stade. Cette hausse reflète bien l'accélération du développement des chrysalides fortement infectées.

#### 1.5 Symptômes de l'infection virale chez l'adulte

Parmi les adultes provenant de larves traitées par le CPV, un grand nombre d'entre eux ont présenté de sérieuses malformations au niveau de leurs ailes par rapport aux adultes sains (figure 14). De ce fait, tout envol et accouplement ont été rendus impossible et la mort survenait quelques heures après leur émergence comparativement à deux semaines pour les adultes non infectés. Cependant, un petit nombre d'adultes infectés ne présentant aucune malformation ont pu être accouplé et assuré une progéniture. Par ailleurs, la présence de nombreux polyèdres viraux a été détectée dans les frottis effectués à partir du méconium rejeté par les adultes infectés (figure 15).

#### 1.6 Evaluation des taux de transmission du CPV à la génération suivante

La transmission de la polyédrose cytoplasmique à la

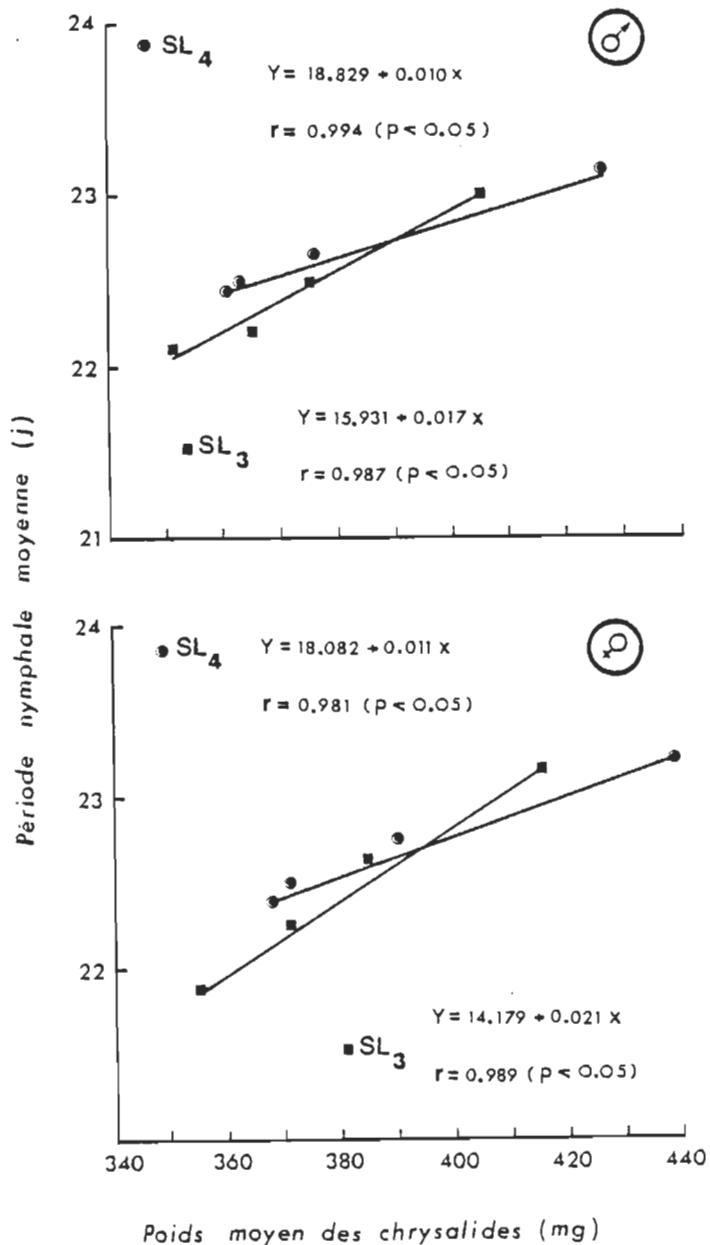


Figure 13. - Relation entre la période nymphale et le poids de chrysalides mâles ainsi que femelles issues de larves traitées au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades par le CPV produit in vivo.

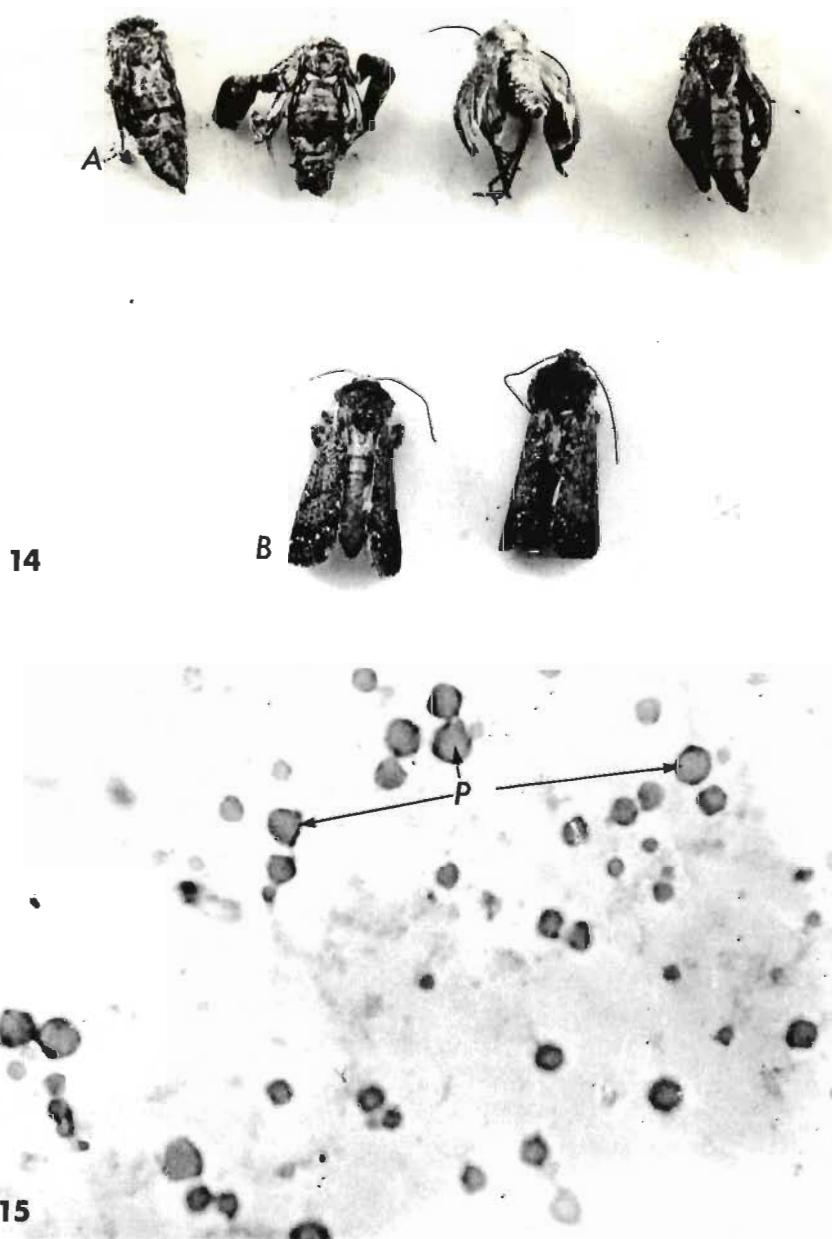


Figure 14. - Adultes infectés par le CPV (A) et sains (B).

Figure 15. - Frottis du méconium provenant d'un adulte infecté par le CPV. Coloration au Bleu de Méthylène 5%.  
P: polyèdres x 2000.

génération suivante a été démontrée (Tableau 5). Les symptômes caractéristiques de la maladie virale tels que l'aspect blanchâtre de l'intestin moyen et la présence de polyèdres vitaux dans les frottis de ces derniers ont été détectés lors de nos expériences chez 78 à 86% des larves de 2<sup>e</sup> génération provenant d'une population d'E. scandens infectée par le CPV produit in vivo.

## 2. Comparaison des CPV produits in vivo et in vitro

L'administration aux larves d'E. scandens de polyèdres de forme cubique, obtenus après un premier passage du CPV in vitro, a reproduit l'infection caractéristique de ce virus et il a été noté la synthèse dans les cellules de l'intestin moyen de polyèdres de forme, en très grande majorité paraspérique (figure 16), donc identique à celle isolée à l'origine in vivo. Cette forme s'est maintenue à travers les divers passages in vivo du virus par transmission horizontale ou par les oeufs de l'insecte. De même, la réinfection in vitro de L. dispar par les virions libres ou inclus a conduit à la formation constante de polyèdres cubiques (figure 17). Cette dernière forme a persisté au cours de deux passages du CPV in vitro à partir de virus libres ou inclus. Par contre, la forme paraspérique a réapparu lors de la réinfection expérimentale de larves par des polyèdres obtenus au cours de ces passages sur cellules in vitro.

Les diverses caractéristiques de la maladie virale chez les larves d'E. scandens infectées par le CPV produit sur

## TABLEAU 5

Transmission à la génération suivante du CPV  
produit in vivo

---

Larves de 1 <sup>ère</sup> génération	Nombre de larves de 2 <sup>e</sup> génération examinées par couple	Nombre de larves de 2 <sup>e</sup> génération infectées par le CPV
Témoin	100	0
	100	0
	100	0
Infectées par des <sup>(1)</sup> polyèdres produits <u>in vivo</u>	100	86
	100	85
	100	78

---

(1) Les larves de 1<sup>ère</sup> génération ont été infectées par  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve. Le taux d'infection visé et obtenu a été de 100%.

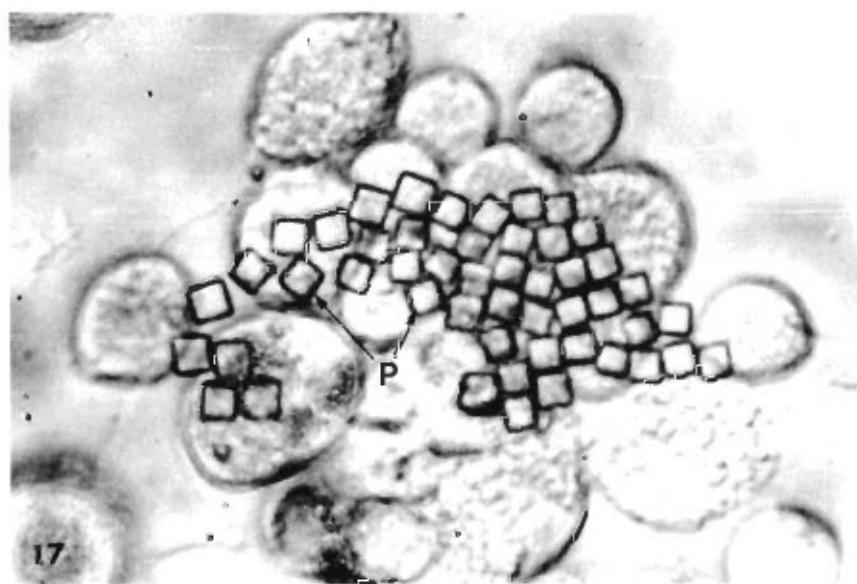
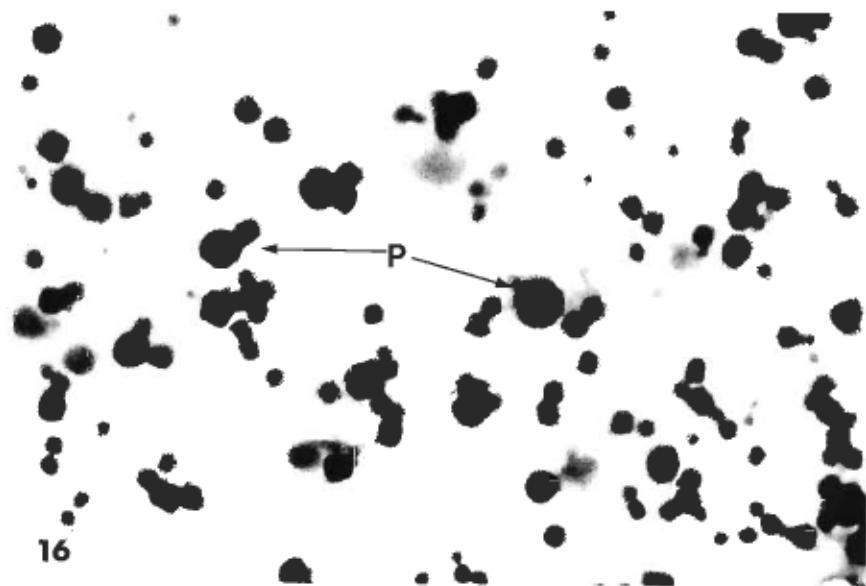


Figure 16. - Forme paraspérique des polyèdres viraux produits in vivo. Coloration au Buffalo-Black (Sikorowski & al., 1971). P: polyèdres x 1050.

Figure 17. - Forme cubique des polyèdres viraux produits dans les cellules de L. dispar cultivées in vitro. P: polyèdres x 1500.

culture cellulaire furent identiques à celles observées dans le cas des larves infectées par le CPV produit in vivo: perte d'appétit, réduction de la taille larvaire, présence de polyèdres viraux de forme paraspérique au niveau de l'intestin moyen et des excréments larvaires.

Les doses infectieuses médianes des polyèdres viraux produits in vitro furent plus élevées que celles obtenues lors du traitement larvaire par le CPV produit in vivo. En d'autres mots, des quantités plus importantes de polyèdres cubiques ont été nécessaires pour initier l'infection chez les larves du 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades. En particulier, pour atteindre le taux d'infection 50%, il a fallu administrer aux larves respectivement  $2.7 \times 10^3$  et  $3.1 \times 10^3$  polyèdres cubiques/larve (figure 18); valeurs ne différant pas significativement au niveau 5%. Aucun parallélisme entre les courbes des figures 18a et 18b n'a été noté, les pentes étant respectivement de 0.9418 et 1.2075. A faible dose de polyèdres cubiques, nous observions un phénomène analogue au traitement des larves par le CPV produit in vivo, c'est-à-dire qu'il faut plus de polyèdres viraux pour obtenir les mêmes taux d'infection chez les larves traitées au 4<sup>e</sup> stade. Par contre, aux fortes concentrations en polyèdres viraux nous avons noté le phénomène inverse pour le cas des larves traitées au 4<sup>e</sup> stade par le CPV produit in vitro (figure 18).

Les répercussions de la maladie virale causée par le CPV produit in vitro sur la durée de la période larvaire furent évaluées au même titre que dans le cas des larves traitées au

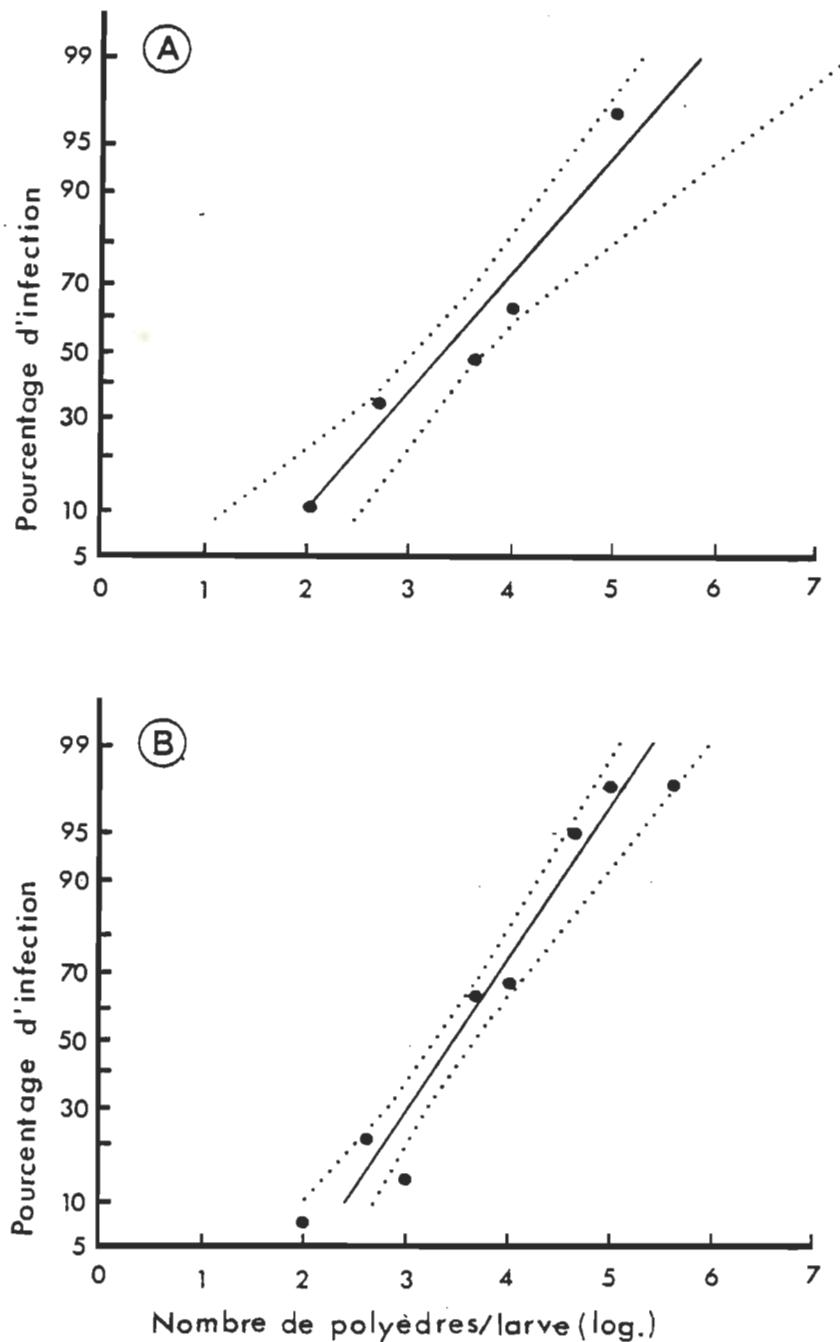


Figure 18. - Représentation graphique des doses infectieuses des polyèdres produits *in vitro*. Infection au 3<sup>e</sup> (A) et 4<sup>e</sup> (B) stades larvaires d'*E. scandens*. Les lignes pointillées représentent les intervalles de confiance à 95%.

$3^e$  et  $4^e$  stades par le CPV produit in vivo; c'est-à-dire en enregistrant journalièrement les divers changements de stades marqués par le rejet des mues (figures 19 et 20). Comme ce fut le cas lors de l'infection des larves par le CPV produit in vivo, nous avons noté une augmentation significative de cette période correspondant aux larves traitées au  $3^e$  stade (Tableau 6). A la dose de  $5 \times 10^6$  polyèdres/larve, cette augmentation a été par rapport au témoin de 38.7% (8.82 jours). Pour ce qui est des larves traitées au  $4^e$  stade (Tableau 7), cette augmentation bien que légère fut de 5.7% (1.4 jours).

Au stade nymphal, l'infection causée par les polyèdres cubiques a entraîné comme dans le cas des polyèdres synthétisés in vivo, une diminution significative du poids et de la longueur des chrysalides (Tableaux 8 et 9). La période nymphale n'a pas été sérieusement affectée par la maladie virale. Le poids des chrysalides mâles et femelles fut diminué respectivement de 14.8 et 15.6% (Tableau 8) dans le cas des chrysalides provenant de larves traitées au  $3^e$  stade, ainsi que de 15.2 et 14.8% (Tableau 9) pour celles issues de larves traitées au  $4^e$  stade.

Une relation entre le poids moyen des chrysalides et la durée de la période larvaire a été notée uniquement dans le cas des chrysalides mâles et femelles issues de larves traitées au  $4^e$  stade (figure 21). Par ailleurs, comme ce fut le cas lors de l'infection causée par le CPV produit in vivo, nous avons noté une corrélation positive entre la diminution de la période nymphale et celle du poids des chrysalides mâles et femelles

FIGURE 19

Allure des décalages dans le temps des stades larvaires et prénymphe d'*E. scandens* en fonction de la dose de polyèdres produits in vitro administrée aux larves. Nombre de larves de 4<sup>e</sup> (SL<sub>4</sub>), 5<sup>e</sup> (SL<sub>5</sub>), 6<sup>e</sup> (SL<sub>6</sub>), 7<sup>e</sup> (SL<sub>7</sub>) stades et prénympthes (PN) en fonction du temps.

Traitements des larves par le CPV au 3<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>3</sub>).

A: insectes sains (témoins).

B, C, D: infection larvaire par respectivement  $10^3$ ,  $10^5$  et  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve.

Le temps zéro correspond pour les larves des lots A, B, C, D au passage au 4<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>4</sub>) de la première larve du lot.

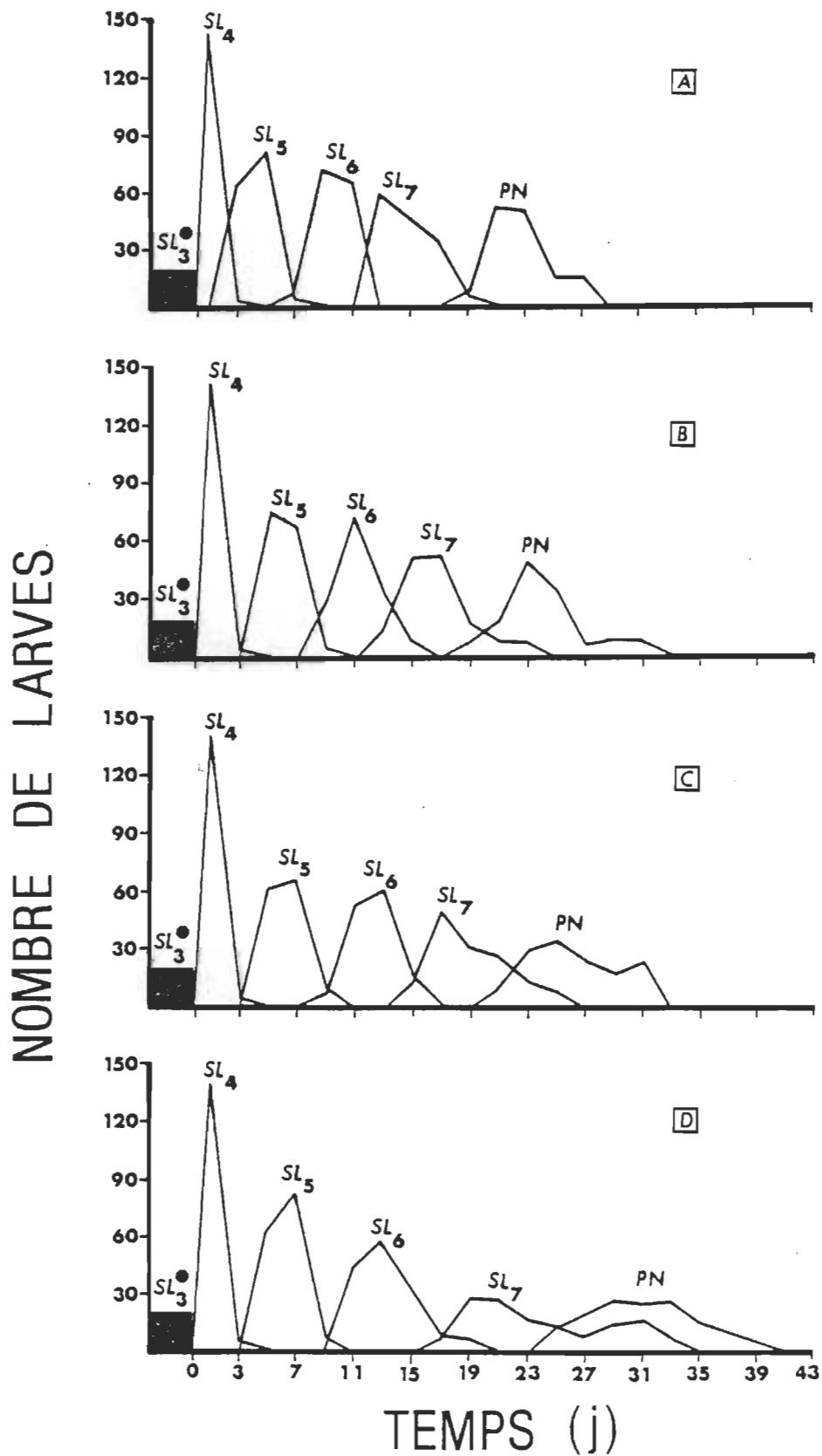


FIGURE 20

Allure des décalages dans le temps des stades larvaires et prénymphe d'E. scandens en fonction de la dose de polyèdres produits in vitro administrée aux larves. Nombre de larves de 5<sup>e</sup> (SL<sub>5</sub>), 6<sup>e</sup> (SL<sub>6</sub>), 7<sup>e</sup> (SL<sub>7</sub>) stades et prénymphes (PN) en fonction du temps.

Traitements des larves par le CPV au 4<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>4</sub>).

A: insectes sains (témoins).

B, C, D: infection larvaire par respectivement  $10^3$ ,  $10^5$  et  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve.

Le temps zéro correspond pour les larves des lots A, B, C, D au passage au 5<sup>e</sup> stade larvaire (SL<sub>5</sub>) de la première larve du lot.

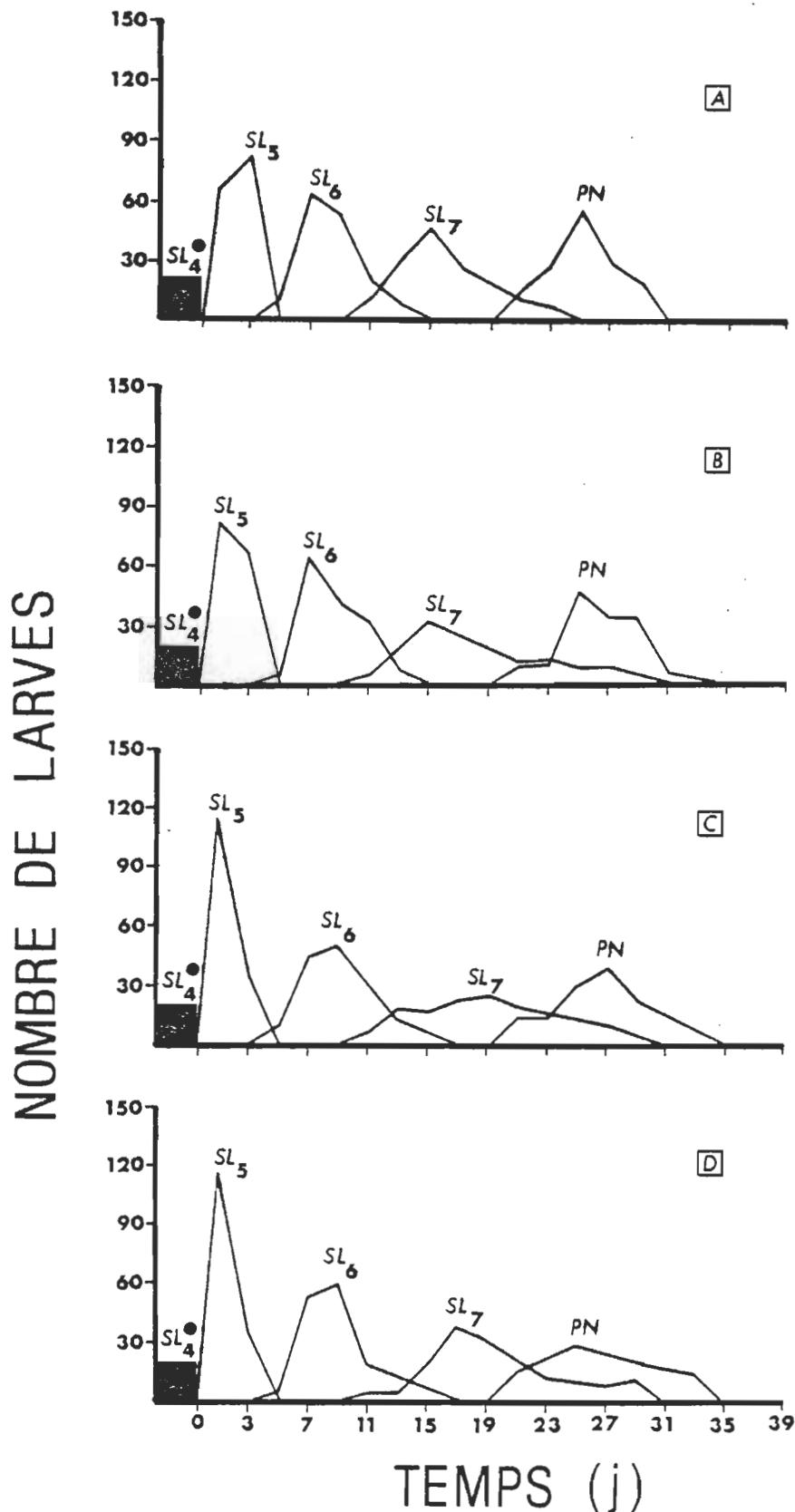


TABLEAU 6

Effets de l'infection par différentes concentrations de polyèdres produits in vitro sur l'évolution des stades larvaires d'E. scandens.

Infection au 3<sup>e</sup> stade

Concentrations (polyèdres/ larve)	Durées (j) <sup>1</sup>					Apparition des prénymphes
	3 <sup>e</sup> mue	4 <sup>e</sup> mue	5 <sup>e</sup> mue	6 <sup>e</sup> mue		
0	0.60 + 0.20 - 0.37a(2)	4.19 + 0.14a - 0.17a	9.67 + 0.47a - 0.50a	14.77 + 0.17a - 0.17a	22.74 + 0.37a - 0.38a	
1 x 10 <sup>3</sup>	0.73 + 0.15a - 0.24a	5.93 + 0.13b - 0.13b	11.26 + 0.39b - 0.42b	16.85 + 0.79b - 0.90b	23.85 + 0.41b - 0.43b	
1 x 10 <sup>5</sup>	0.77 + 0.14a - 0.21a	6.33 + 0.12b - 0.12b	12.21 + 0.16c - 0.16c	18.94 + 0.38c - 0.40c	26.18 + 0.23c - 0.23c	
5 x 10 <sup>6</sup>	0.97 + 0.08b - 0.10b	6.15 + 0.15b - 0.16b	13.37 + 0.46d - 0.49d	23.85 + 0.49d - 0.50d	31.56 + 0.26d - 0.27d	

- (1) Temps pris par 50% des larves d'un lot pour atteindre les 4<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> stades larvaires (SL<sub>4</sub>, SL<sub>5</sub>, SL<sub>6</sub>, SL<sub>7</sub>) marqué par le rejet des mues et le stade prénymphal.  
 Temps zéro: passage de la 1<sup>ère</sup> larve du lot au SL<sub>4</sub>.
- (2) Dans chaque colonne verticale, les intervalles de confiances à 95% des valeurs suivies par les mêmes lettres se chevauchent (analyse probit).

TABLEAU 7

Effets de l'infection par différentes concentrations de polyèdres produits in vitro sur l'évolution des stades larvaires d'E. scandens.

Infection au 4<sup>e</sup> stade

Concentrations (polyèdres/ larve)	Durées (j) <sup>1</sup>				Apparition des prénymphes
	4 <sup>e</sup> mue	5 <sup>e</sup> mue	6 <sup>e</sup> mue	SL <sub>5</sub> → SL <sub>6</sub> → SL <sub>7</sub>	
0	1.65 + 0.21 - 0.21 a(2)	8.26 + 0.18 - 0.19 a	16.15 + 0.39 - 0.40 a		25.14 + 0.19 - 0.19 a
1 x 10 <sup>3</sup>	1.70 + 0.43 - 0.49 a	8.56 + 0.33 - 0.35 ab	18.52 + 0.52 - 0.54 b		26.09 + 0.19 - 0.19 b
1 x 10 <sup>5</sup>	1.72 + 0.43 - 0.44 a	9.14 + 0.35 - 0.36 b	18.69 + 0.63 - 0.65 b		26.49 + 0.23 - 0.23 bc
5 x 10 <sup>6</sup>	1.68 + 0.45 - 0.48 a	9.00 + 0.65 - 0.73 ab	19.56 + 0.52 - 0.54 b		26.58 + 0.25 - 0.26 c

(1) Temps pris par 50% des larves d'un lot pour atteindre les 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> stades larvaires (SL<sub>5</sub>, SL<sub>6</sub>, SL<sub>7</sub>) marqué par le rejet des mues et le stade prénymphal.  
Temps zéro: passage de la 1<sup>ère</sup> larve du lot au SL<sub>5</sub>.

(2) Dans chaque colonne verticale, les intervalles de confiances à 95% des valeurs suivies par les mêmes lettres se chevauchent (analyse probit)

TABLEAU 8

Effets du virus produit in vitro sur la durée de la période nymphale,  
sur le poids et sur la longueur des chrysalides d'E. scandens.

Traitements au 3<sup>e</sup> stade larvaire

Concen- trations (polyèdres/ larve)	<u>CHRY SALIDES MALES</u>			<u>CHRY SALIDES FEMELLES</u>		
	Période (1) nymphale	Poids (2)	Longueur (3)	Période (1) nymphale	Poids (2)	Longueur (3)
0	23.0	405.1 a(4)	19.0 a	23.1	415.9 a	19.1 a
1 x 10 <sup>3</sup>	22.4	374.3 ab	18.3 b	22.5	375.4 b	18.6 a
1 x 10 <sup>5</sup>	22.0	355.5 b	18.3 ab	22.0	364.8 b	18.6 a
5 x 10 <sup>6</sup>	21.6	345.0 b	18.1 b	21.9	351.1 b	18.1 b

(1) Temps moyen en jour

(2) Poids moyen en mg

(3) Longueur moyenne en mm

(4) Dans chaque colonne relative aux poids et longueurs, les moyennes suivies par la même lettre ne diffèrent pas au niveau 5% (Test de Student-Newman-Kewls)

TABLEAU 9

Effets du virus produit in vitro sur la durée de la période nymphale,  
sur le poids et sur la longueur des chrysalides d'E. scandens.

Traitements au 4<sup>e</sup> stade larvaire

Concen- trations (polyèdres/ larve)	<u>CHRY SALIDES MALES</u>			<u>CHRY SALIDES FEMELLES</u>		
	Période (1) nymphale	Poids (2)	Longueur (3)	Période (1) nymphale	Poids (2)	Longueur (3)
0	23.2	427.0 a(4)	19.6 a	23.2	438.8 a	19.7 a
1 x 10 <sup>3</sup>	22.6	378.1 b	18.4 b	22.5	386.5 b	18.7 b
1 x 10 <sup>5</sup>	22.4	369.0 b	18.7 b	22.4	375.4 b	18.5 b
5 x 10 <sup>6</sup>	22.3	362.5 b	18.4 b	22.3	373.9 b	18.4 b

(1) Temps moyen en jour

(2) Poids moyen en mg

(3) Longueur moyenne en mm

(4) Dans chaque colonne relative aux poids et longueurs, les moyennes suivies par la même lettre ne diffèrent pas au niveau 5% (Test de Student-Newman-Kewls)

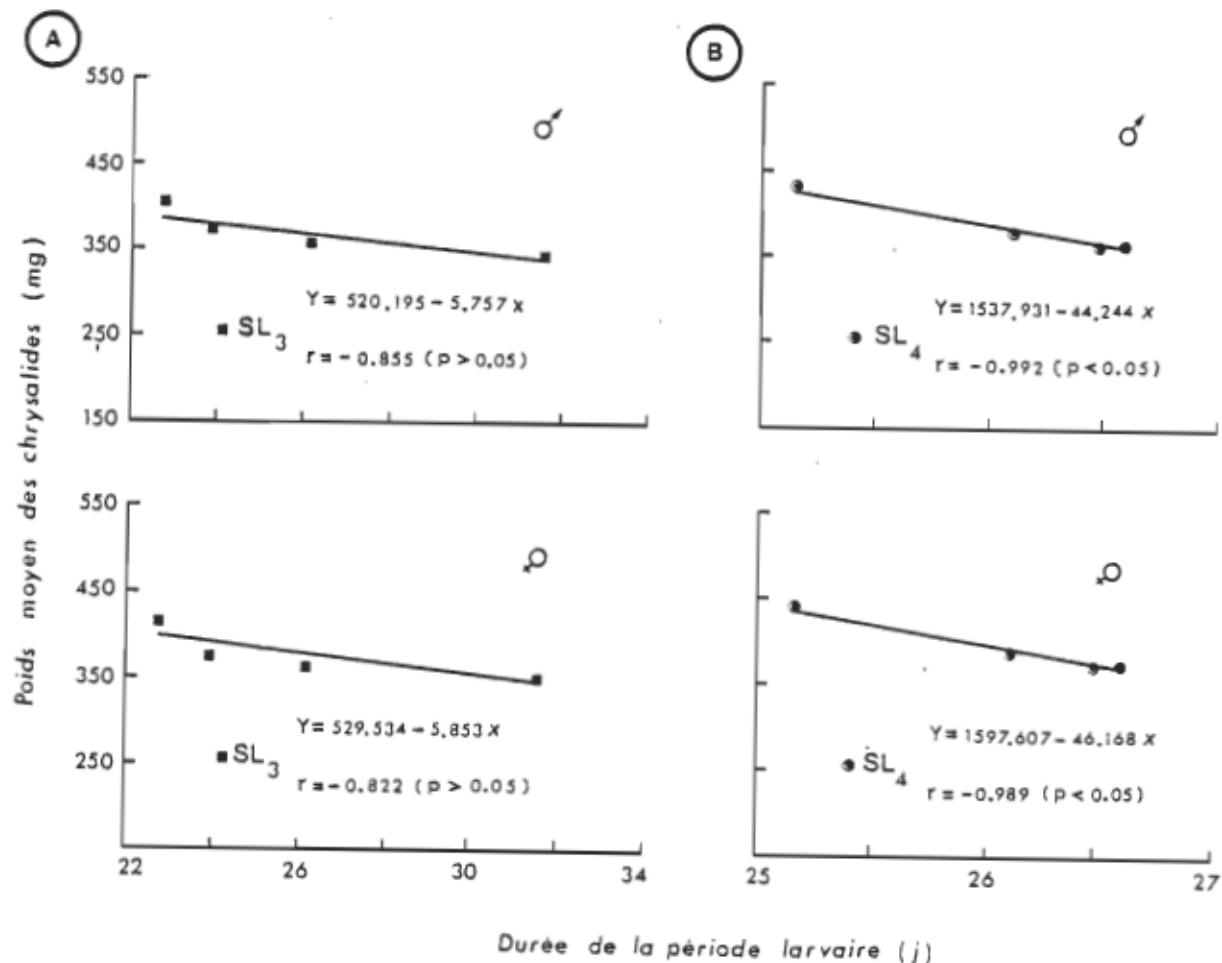


Figure 21. - Relation entre le poids des chrysalides mâles ainsi que femelles et la durée de la période larvaire. Infection au 3<sup>e</sup> (A) et 4<sup>e</sup> (B) stades larvaires (SL) d'*E. scandens* par les polyèdres produits in vitro.

provenant de larves traitées au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades par les polyèdres cubiques (figure 22).

Au stade adulte, les répercussions de la maladie virale causées par le CPV produit in vitro sont identiques à celles causées par l'infection du CPV produit in vivo. En ce qui a trait au CPV produit in vitro, la transmission verticale du virus à la génération suivante a été obtenue (Tableau 10)

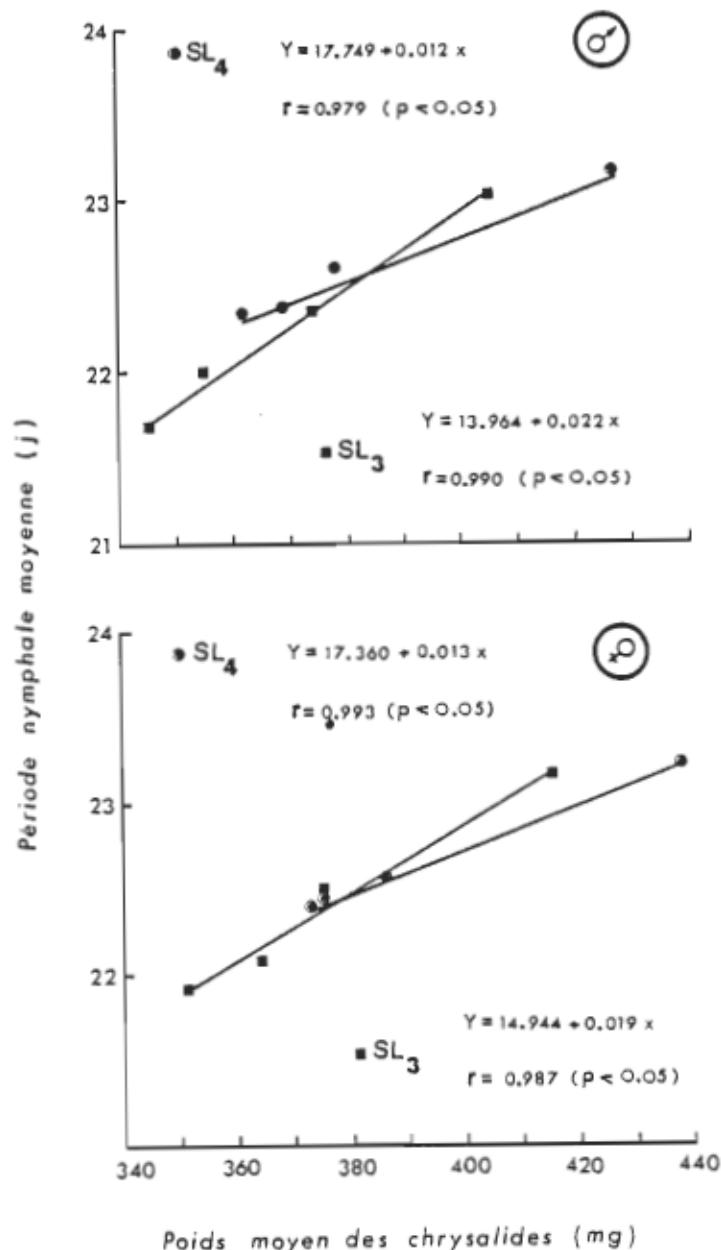


Figure 22. - Relation entre la période nymphale et le poids de chrysalides mâles ainsi que femelles issues de larves traitées au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades par le CPV produit in vitro.

TABLEAU 10

Transmission à la génération suivante du CPV  
produit in vitro

Larves de 1 <sup>ère</sup> génération	Nombre de larves de 2 <sup>e</sup> génération examinées par couple	Nombre de larves de 2 <sup>e</sup> génération infectées par le CPV
Témoin	100	0
	100	0
	100	0
Infectées par des <sup>(1)</sup> polyèdres produits <u>in vitro</u>	100	97
	100	83
	100	78

(1) Les larves de 1<sup>ère</sup> génération ont été infectées par  $5 \times 10^6$  polyèdres par larve. Le taux d'infection visé et obtenu a été de 100%.

## DISCUSSION

Les réinfections expérimentales des larves d'E. scandens par le CPV isolé par Quiot et Belloncik (1977) d'une part et par les polyèdres viraux obtenus après un premier passage du CPV en culture cellulaire de L. dispar d'autre part ont été réussies.

Nos observations, caractérisant les divers symptômes de la polyédrose cytoplasmique causée par le CPV produit *in vivo* chez E. scandens, obtenues lors de nos travaux ont été conformes à celles décrites à propos d'autres polyédroses cytoplasmiques de Lépidoptères (Neilson, 1965; Ignoffo & Adams, 1966; Vail & al., 1969; Vail & Gough, 1970; Simmons & Sikorowski, 1973; Magnoler, 1974; Bell & Kanavel, 1976; Smith, 1976).

Les inoculums viraux utilisés au cours de cette étude se sont révélés hautement infectieux pour les larves d'E. scandens. Les larves traitées au 3<sup>e</sup> stade ont montré une plus grande

susceptibilité au CPV produit in vivo que les larves traitées au 4<sup>e</sup> stade. Il a fallu 4.7 fois plus de polyèdres/larve pour causer une infection chez 50% des larves traitées au 4<sup>e</sup> stade. Cette susceptibilité de l'infection réduite chez les larves du 4<sup>e</sup> stade serait attribuable à une résistance accrue avec l'âge larvaire (Longworth, 1973) ou en partie selon Ignoffo (1966) par l'augmentation normale du poids du corps larvaire servant à diluer une dose constante de virus.

Malgré la grande susceptibilité des larves du 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades au CPV, nous avons observé au laboratoire qu'un faible taux de mortalité non proportionnel au nombre de polyèdres ingérés. Ceci s'explique par la nature de l'infection qui est chronique et très localisée. Le virus se multiplie en effet uniquement au niveau des cellules épithéliales bordant l'intérieur de l'intestin moyen et ne peut pas atteindre les cellules régénératrices (Payne et Harrap, 1977; Yamagushi, 1977).

Dû à la nature chronique et très localisée de la maladie virale causée par le CPV, la mortalité larvaire ne pourrait être utilisée ici comme seul critère d'évaluation de l'infectiosité du CPV pour E. scandens; bien que dans le cas d'autres entomovirus tels les Baculovirus l'infectiosité des polyèdres peut être évaluée par le taux de mortalité larvaire (Mackinnon & al., 1976). La mortalité chez E. scandens virosé devrait être évaluée à tous les stades (larvaire, nymphal et adulte) et sur plusieurs générations. En effet, des modifications d'ordre métabolique sans pour autant être létales pour les larves, peuvent avoir des répercussions quantitatives ou qualitatives sur

les stades postérieurs de l'hôte et sur les générations suivantes (Baud 1955, 1972).

Au stade larvaire les nombreuses répercussions de la maladie virale sur E. scandens, causées par le CPV, telles la nonchalance des larves infectées, la perte graduelle de l'appétit ainsi que la réduction de la taille larvaire, seraient attribuables selon Magnoler (1974), dans le cas d'expériences effectuées sur P. dispar, à une diminution du métabolisme larvaire induit par un débalancement humorale occasionné par la formation de virus et de polyèdres au niveau de l'intestin moyen. De façon plus concrète, cette perte de l'appétit observée chez les larves infectées serait en partie rattachée, selon Kawase et Hayashi (1965), à une baisse du taux d'acides aminés libres au niveau de l'hémolymphe et de l'intestin moyen, induite par la formation du CPV chez l'insecte. D'autre part, Magnoler (1974) tira profit des observations effectuées par ces deux derniers chercheurs, en proposant que le changement de la teinte de l'hôte infecté, tel que noté lors de notre étude, serait probablement dû à un débalancement humorale ou à une réduction de l'activité de certains enzymes responsables de la synthèse d'acides aminés compris dans le processus de la pigmentation.

L'inanition cause, selon Kopec (1924), un retard dans le développement larvaire. La prolongation de la période larvaire notée chez E. scandens infecté par le CPV serait probablement une conséquence de l'inanition causée par l'infection virale suite à la perte d'appétit des larves. D'autre part, cette

prolongation de la période larvaire pourrait s'expliquer en partie par l'augmentation de la durée d'inactivation des larves avant d'effectuer chacune de leurs mues, attribuable, selon notre hypothèse, à une déficience dans le fonctionnement des glandes exuviales (Glandes de Verson), occasionnée par la formation du CPV, prolongeant ainsi cette période d'inactivation avant la mue.

Au dernier stade actif de la vie larvaire d'E. scandens traité au 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades, une diminution du temps passé au 7<sup>e</sup> stade a été observée en fonction des doses croissantes de polyèdres viraux. Cette diminution de la durée du 7<sup>e</sup> stade, contrairement à la prolongation des stades antérieurs chez l'insecte virosé n'a pas pu être encore expliquée.

Il a été noté chez les larves traitées au 3<sup>e</sup> stade et déjà parvenues à la fin de leur 5<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> stade, une augmentation très significative de la durée passée à l'état larvaire. Par ailleurs, comme fut observé par M. Dupré (communication personnelle) ainsi que nous-mêmes au cours de nos trois années d'observations, les larves d'E. scandens normalement retrouvées dans la nature en automne et au printemps ont démontré qu'elles hibernaient au 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> stades. Donc, reconnaissant que les larves d'E. scandens hibernent à des stades bien déterminés, les larves traitées au 3<sup>e</sup> stade ne seraient probablement pas en mesure de parvenir au 5<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> stade pour hiberner dû à la prolongation des stades antérieurs. Cependant les larves traitées au 4<sup>e</sup> stade peuvent hiberner, mais nombreuses seront celles qui

ne pourront compléter adéquatement leur hibernation dû à une insuffisance en réserve énergétique attribuable à la maladie virale. Bell (1977) ainsi que Sikorowski et Thompson (1979), pour des expériences effectuées respectivement sur P. gossypiella et H. virescens en laboratoire, ont observé parmi les larves infectées en diapause, une augmentation du taux de mortalité de 28 et 54%. Bell (1977) a indiqué que cette hausse du taux de mortalité larvaire, en période de diapause était attribuable à une forte baisse du taux de lipides (69%) causé par l'infection virale. Par ailleurs, pour des expériences effectuées dans la nature, Katagiri & al. (1977) ont noté de hauts taux de mortalité des larves de D. spectabilis en hibernation, traitées par le CPV. Dans le cas du traitement des larves d'E. scandens au 4<sup>e</sup> stade, ces dernières ne seraient pas incommodées par la maladie virale, en ce qui a trait à leur arrivée au terme du 5<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> stade pour hiberner, étant donné les répercussions peu significatives de la polyédrose cytoplasmique sur la durée des stades avant leur hibernation.

Le poids et la longueur des chrysalides d'E. scandens provenant de larves infectées par le CPV ont été significativement inférieurs à ceux provenant des larves non traitées. La diminution du poids des chrysalides mâles et femelles serait une répercussion, selon Bell et Kanavel (1977) dans le cas d'expériences effectuées sur P. gossypiella, de la baisse du taux de lipides et protéines au niveau de l'intestin moyen et de l'hémolymphe des larves infectées; lipides et protéines nécessaires aux chrysalides pour compléter adéquatement leur

période nymphale. De plus, ces mêmes chercheurs ont indiqué que cette diminution en réserves énergétiques du taux de lipides et protéines, au niveau des chrysalides, serait une conséquence probable de la prolongation de la période larvaire chez les larves infectées. Autrement dit, cette diminution du taux de lipides et protéines chez les larves infectées résulterait de la formation de virus et de polyèdres en plus d'une demande énergétique plus grande de la part des larves infectées pour parvenir à la fin de leur période larvaire considérablement allongée.

Shorey (1963), Cheng (1972) ainsi que Lorimer (1979), étudiant l'effet de différents paramètres, dont le poids des chrysalides sur la fécondité d'adultes respectivement de T. ni, E. messoria et M. dissstria, ont démontré qu'une diminution du poids des nymphes entraînait une baisse de fécondité. Par ailleurs, des observations analogues ont été effectuées démontrant la baisse de fécondité chez les adultes résultant de chrysalides de petites tailles issues de larves infectées par un virus à polyédrose cytoplasmique (Bullock & al., 1970; Vail & Gough, 1970; Simmons & Sikorowski, 1973; Sikorowski & Thompson, 1979). Ainsi, en fonction de nos résultats, quant au poids des chrysalides infectées et aux anomalies au niveau des ailes chez les adultes empêchant l'accouplement de ces derniers, la polyédrose cytoplasmique d'E. scandens, causée par le CPV produit in vivo ou in vitro, serait sans aucun doute un moyen efficace de réduction des taux de population de cet insecte à la génération suivante.

La réduction de la taille des chrysalides et la diminution de la période nymphale n'ont pas été les seuls symptômes attribuables à l'infection virale enregistrés chez les chrysalides infectées d'E. scandens. De sérieuses malformations au niveau du thorax ont été notées. Ces malformations furent produites au cours de la métamorphose de la larve en chrysalide , s'effectuant au stade prénymphal. Dû à leur état, aucune d'entre elles n'a pu parvenir au stade adulte.

Malgré les nombreuses répercussions de la polyédrose cytoplasmique observées aux différents stades d'E. scandens (larve, nymphe et adulte), certains adultes infectés ne présentant aucune malformation ont eu la possibilité de se reproduire et d'assurer ainsi leur progéniture. Mery et Dulmage (1975) ont démontré, dans le cas d'expériences effectuées sur H. virescens, que le virus était transmis à la surface de l'oeuf (transmission verticale), lors de la ponte des adultes infectés. La polyédrose cytoplasmique, transmise à la génération suivante d'E. scandens, a été observée chez 78% et plus des sujets. Tel qu'observé par Sikorowski & al. (1973) dans le cas d'expériences effectuées sur H. virescens infecté par un CPV, un faible pourcentage des larves de la génération  $F_1$  n'était pas infectées. Ceci serait attribuable au mode même de transmission du CPV par lequel certains oeufs ne viendraient pas toujours en contact avec les parties génitales de la femelle, souillées par le CPV lors de l'expulsion du méconium.

Quant aux observations effectuées lors de la production

massive de polyèdres viraux utilisés au cours de cette étude, la forme paraspérique des polyèdres produits chez les larves infectées s'est toujours maintenue après plusieurs passages du CPV in vivo. De même, l'infection in vitro de L. dispar par les virus libres ou inclus, obtenus in vivo, a conduit à la formation constante de polyèdres cubiques. Par contre, la forme paraspérique des polyèdres a réapparu lors de la réinfection expérimentale de larves par les polyèdres cubiques obtenus en culture cellulaire. Nos résultats seraient donc en accord avec l'hypothèse de Granados & al. (1974) et Smith (1976) suivant laquelle les conditions de culture seraient en partie à l'origine des variations de formes des polyèdres. Nous ne serions donc pas en présence de deux différents types de CPV ou d'une sélection en culture cellulaire d'un CPV s'incluant différemment. Il s'agirait plutôt d'une cristallisation différente des protéines constituant les polyèdres dans deux systèmes cellulaires et conditions de culture (in vivo- in vitro) distinctes. Les premiers résultats de fractionnement électrophorétique des protéines des polyèdres du CPV d'E. scandens produits in vivo et sur cellules in vitro ont d'ailleurs montré une identité dans la composition en nombre et poids moléculaire des polypeptides de ces deux types de corps d'inclusion (Grancher & al., 1978).

Au stade larvaire, l'intensité des symptômes observés, suite à l'infection des larves par le CPV produit in vitro, fut identique à celle observée chez les larves infectées par le CPV produit chez l'insecte. Cependant, quant à la susceptibilité

des larves du 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stades au CPV produit in vitro, elle a été différente. Tant chez les larves traitées au 3<sup>e</sup> qu'au 4<sup>e</sup> stade, les quantités de polyèdres viraux nécessaires à l'infection de la moitié des sujets traités ont été plus élevées dans le cas des polyèdres cubiques produits en culture cellulaire. Cette baisse d'infectiosité des polyèdres obtenus après uniquement un premier passage du CPV in vitro n'a pas été expliquée. Nous pourrions néanmoins émettre les hypothèses suivantes: Les polyèdres produits in vitro seraient dissous plus difficilement par les succs alcalins, en comparaison avec les polyèdres d'origine larvaire, probablement dû à la cristallisation différente des protéines d'inclusions virales. La difficulté des polyèdres cubiques à se dissoudre au niveau de l'intestin moyen des larves, entraînerait une libération d'un nombre restreint de virus infectieux. Dans le même sens que cette première hypothèse, nous avons noté, à cet effet, une plus grande résistance des polyèdres cubiques à la dissolution chimique par le carbonate de sodium. La baisse de virulence des polyèdres cubiques pourrait être attribuable à une quantité moindre de virus inclus dans ces derniers. Actuellement, une étude a été entreprise afin de vérifier la richesse en particules virales des deux types de CPV selon la technique du titrage d'infectiosité mis au point par Belloncik et Chagnon (1980).

L'infection virale causée par le CPV produit in vitro et in vivo, ne nous a toutefois pas permis de différencier la virulence de ces deux types de CPV, en ce qui a trait à la prolongation de la durée des périodes larvaires occasionnée par

ces deux derniers, à diverses doses virales. La différence d'environ une journée, entre les divers traitements par le CPV produit in vivo ou in vitro, serait négligeable considérant le fait qu'au cours de la durée larvaire les observations ont été effectuées journalièrement et que l'âge larvaire, au moment de l'infection, a pu varier entre 12 et 24 heures.

Quant aux répercussions de la maladie virale causées par le CPV produit in vitro au stade nymphal et adulte d'E. scandens, elles furent identiques à celles observées lors de l'infection causée par le CPV produit in vivo. Dans le cas aussi des deux types d'inoculum, la transmission verticale du virus a été obtenue avec une efficacité comparable.

## CONCLUSION

Au stade larvaire, la nonchalance des larves infectées et la perte graduelle de leur appétit pourraient avoir des implications importantes quant à la diminution des ravages causés aux plantations de tabac par E. scandens. Les taux de mortalité larvaires enregistrés en laboratoire, causée par la polyédrose cytoplasmique, ne rendent pas nécessairement compte des taux réels de mortalité pouvant être obtenus à la suite d'un éventuel traitement d'E. scandens en pleine nature. Toute perturbation métabolique occasionnée en période larvaire par l'infection virale, suivie des divers stress de l'environnement, des conditions défavorables d'alimentation ainsi que l'hibernation larvaire, devraient accroître le taux de mortalité. De plus, la diminution en réserve lipidique devrait entraîner une plus faible résistance des larves infectées aux insecticides (Fast 1964) dans le cadre de programme de contrôle intégré de cet insecte.

Les répercussions de l'infection virale au stade larvaire ont été manifestement plus grandes chez les larves traitées au 3<sup>e</sup> stade qu'au 4<sup>e</sup> stade. Donc, un traitement plus tôt des jeunes larves d'E. scandens pourrait contribuer à l'amplification des symptômes causés par la polyédrose cytoplasmique au stade larvaire.

Au stade nymphal, la réduction de la taille des chrysalides infectées et les nombreuses anomalies observées chez ces dernières seraient des signes précurseurs de la baisse du taux de fécondité des adultes. Cette diminution du taux de fécondité pourrait avoir un impact considérable au niveau de la population d'E. scandens, au cours des années, étant donné le fait que la CPV est transmis d'une génération à l'autre.

Donc, tous ces effets, d'ordre physiologique, suivis de la transmission verticale du virus assurant la persistance de l'infection virale mériteraient d'être exploités dans le cadre d'un programme de contrôle intégré d'E. scandens.

Quant aux polyèdres provenant d'un premier passage du CPV en culture cellulaire de L. dispar, tout en étant moins infectieux que ceux obtenus de l'hôte d'origine en terme de nombre d'individus malades, induisent chez E. scandens des perturbations d'ordre physiologique en moyenne aussi importantes que celles occasionnées par les polyèdres viraux obtenus in vivo.

La production de polyèdres en culture cellulaire serait donc une alternative intéressante pour l'obtention d'inclusions virales pathogènes pour E. scandens. Mais, considérant les

coûts occasionnés par les cultures cellulaires (Hurpin, 1978), il n'est pas actuellement avantageux de produire les virus uniquement sur cellules cultivées in vitro. Par contre, les virus libres synthétisés chez la larve n'ont aucune utilité lors de la production massive des polyèdres in vivo. Il serait donc intéressant d'envisager les cultures cellulaires en tant que système parallèle complémentaire d'obtention de polyèdres par l'utilisation de ce supplément d'inoculum viral.

De cette étude traitant des effets du CPV sur E. scandens, important ravageur du tabac, une attention toute particulière devra être portée sur d'autres espèces de vers-gris d'importance économique aussi grande qu'E. scandens, tels qu'Euxoa messoria, E. tessellata et E. ochrogaster (Ritchot & al., 1977). A cet effet, la réinfection des larves d'E. messoria, par le CPV isolé chez E. scandens, a été réussie.

Des travaux sont actuellement en cours en microparcelles afin d'évaluer, dans les conditions naturelles d'environnement, le potentiel du CPV en tant que moyen de régulation des populations de vers-gris.

## BIBLIOGRAPHIE

ANTHONY, D. W., E. I. HAZARD & S.W. CROSBY. 1973. A virus disease in Anopheles quadrimaculatus. J. Invertebr. Patho., 22: 1-5.

ARNOTT, H. J., K. M. SMITH & S. L. FULLILOVE. 1968. Ultra-structure of a cytoplasmic polyhedrosis virus affecting the monarch butterfly Danaus plexippus. J. Ultrastr. Res., 24: 479-507.

ARUGA, H. & E. NAGASHIMA. 1962. Generation-to-generation transmission of the cytoplasmic polyhedrosis virus of Bombyx mori Linn. J. Insect Pathol., 4: 313-320.

ARUGA, H., N. YOSHITAKE & H. WATANABE. 1963. Some factors controlling the size of the cytoplasmic polyhedron of Bombyx mori L. J. Invertebr. Pathol., 5: 72-77.

ASAII, J., F. KAWAMOTO & S. KAWASE. 1972. On the structure of the cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol., 19: 279-280.

BAUD, L. 1955. Influence d'une sous-alimentation quantitative au cours du dernier intermue larvaire de Bombyx mori L. sur son développement ultérieur et sur celui de la génération suivante. Revue du ver à soie, 2: 75-109.

BAUD, L. 1972. Contribution à l'étude de la physiologie du jeûne chez un insecte; 1. Analyse de quelques caractères biochimiques au cours du jeûne absolu chez la chenille de Bombyx mori L. Anim. 4(4): 497-506.

- BEIRNE, B. P. 1971. Pest insects of annual crop plants in Canada. Part I, Lepidoptera; II. Diptera; III, Coleoptera. Ent. Soc. Can., Ottawa. #78. 123 pp.
- BELL, M. R. 1977. Pink bollworm: Effect of infection by a cytoplasmic polyhedrosis virus on diapausing larvae. Ann. Ent. Soc. Amer., 70(5): 675-677.
- BELL, M. R. & R. F. KANAVEL. 1976. Effect of dose cytoplasmic polyhedrosis virus on infection, mortality, development rate, and larval and pupal weights of the pink bollworm. J. Invertebr. Pathol., 28: 121-126.
- BELL, M. R. & R. F. KANAVEL. 1977. The effect of a cytoplasmic polyhedrosis virus on lipid and protein content pupae of the pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Kansas Int. Soc., 25(3): 359-362.
- BELLONCIK, S. & A. CHAGNON. 1980. Titration of a cytoplasmic polyhedrosis virus by a tissue microculture assay: Some application. Intervirology. 13: 28-32.
- BILLOTTI, E. 1959. Observations épizootiologiques sur la processionnaire du pin. Revue de Pathologie végétale et d'Entomologie agricole de France, 38(2): 149-155.
- BIRD, F. T. 1961. Transmission of some insect viruses with particular reference to ovarian transmission and its importance in the development of epizootie. J. Insect Pathol., 3: 352-380.
- BULLOCK, H. R., E. MARTINEZ & C. W. STUERMER. 1970. Cytoplasmic polyhedrosis virus and the development and fecundity of the pink bollworm. J. Invertebr. Pathol., 15: 109-112.

- CHENG, H. H. 1970. Characters for distinguishing the sex of pupae of the dark-sided cutworm, Euxoa messoria (Harris), (Lepidoptera; Noctuidae). Can. J. Zool., 48: 587-588.
- CHENG, H. H. 1972. Oviposition and longevity of the dark-sided cutworm Euxoa messoria (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory. Can. Ent., 104: 919-925.
- DADD, R. H. 1970. Digestion in insects. Chem. Zool., 5: 117-145.
- DAUM, R. J. 1970. Revision of two computer programs for probit analysis. Bull. Ent. Soc. Amer., 16: 10-15.
- DAVID, W. A. L. 1965. The granulosis virus of Pieris brassicae L. in relation to natural limitation and biological control. Ann. Appl. Biol., 56: 331-334.
- FAST, P. G. 1964. Insect lipids. Mem. Soc. Can., 37: 50.
- FAUST, R. M. & G. E. CANTWELL. 1968. Inducement of cytoplasmic polyhedrosis by the intrahaemocoelic injection of free virus particules into the silkworm, Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol., 11: 119-122.
- FAUST, R. M. & J. R. ADAMS. 1966. The silicon content of nuclear and cytoplasmic viral inclusion bodies causing polyhedrosis in Lepidoptera. J. Invertebr. Pathol., 8: 526-530.
- FEDERICI, B. A. 1973. Preliminary studies on a cytoplasmic polyhedrosis virus of Aedes taeniorhynchus. Intern. Colloq. Insect Pathol. Microb. Contr., p.34(1), Oxford, Sept. 1973.

- FEDERICI, B. A., E. I. HAZARD & D. W. ANTHONY. 1973. A new cytoplasmic polyhedrosis virus from chironomids collected in Florida. *J. Invertebr. Pathol.*, 22: 136-138.
- FEDERICI, B. A. & E. I. HAZARD. 1975. Iridovirus and cytoplasmic polyhedrosis virus in the freshwater daphnid Simocephalus expinosus. *Nature (London)*, 254: 327-328.
- GRACE, T. D. C. 1962a. The development of a cytoplasmic polyhedrosis virus in insect cells grow in vitro. *Virology*, 18: 33-42.
- GRACE, T. D. C. 1962b. Establishment of four strains of cells from insect grow in vitro. *Nature*, 195: 788-789.
- GRANADOS, R. R., W. J. MC CARTHY & M. NAUGHTON. 1974. Replication of a cytoplasmic polyhedrosis virus in an established cell line of Trichoplusia ni cells. *Virology*, 59: 584-660.
- GRANCHER, S., J. BOISVERT & S. BELLONCIK. 1978. Composition des polyèdres et du virus d'E. scandens. Abst. 28<sup>e</sup> Réunion Ann. Soc. Can. Microb. Vol. #26.
- GRISON, P., R. MAURY & C. VAGO. 1959. La lutte contre la processionnaire du pin Thaumetopoea pityocampa (Schiff) dans le Massif du Ventoux. Essai d'utilisation pratique d'un virus spécifique. *Revue Forestière Française*, 5: 353-370.
- HAYASHI, Y. 1970. Occluded and free virions in midgut cells, of Malacosoma disstria infected with cytoplasmic polyhedrosis (CPV). *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 442-450.
- HINKS, C. F. & J. R. BYERS. 1976. Biosystematics of the genus Euxoa (Lepidoptera: Noctuidae) V. Rearing procedures, and life cycles of 36 species. *Can. Ent.*, 108: 1345-1357.

HOSAKA, Y. & K. AIZAWA. 1964. The fine structure of the polyhedrosis virus of the silkworm (Bombyx mori L.). J. Insect Pathol., 6: 53-77.

HUDSON, H. F. & A. A. WOOD. 1930. The life-history of the white cutworm Euxoa scandens Riley. Rep. Ent. Soc. Ont., 60: 67-70.

HUKUHARA, T. 1962. Generation-to-generation transmission of the cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, Bombyx mori Linn. J. Insect Pathol., 4: 132-135.

HUKUHARA, T. & Y. HASHIMOTO. 1966. Studies of two strains of cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., 8: 184-192.

HURPIN, B. 1978. Les virus d'insectes et leur utilisation en lutte biologique. Bull. Tech. Minist. Agric., #332-333: 477-489.

IGNOFFO, C. M. 1966. Effects of age on mortality of Heliothis zea and H. virescens larvae exposed to a nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., 8: 279-282.

IGNOFFO, C. M. & J. R. ADAMS. 1966. A cytoplasmic polyhedrosis virus Smithiavirus pectiniphorae sp. n. of the pink bollworm, Pectinophora gossypiella (Saunders). J. Invertebr. Pathol., 8: 59-66.

IGNOFFO, C. M. & C. GARCIA. 1968. Formalin inactivation of nuclear-polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., 10: 430-432.

KATAGIRI, K., Z. IWATA, T. KUSHIBA, Y. FUKUIZUMI & H. TSHIZUKA. 1977. Effects of application of BT, CPV and a mixture of BT and CPV on the survival rate in populations of the caterpillar, Dendrolimus spectabilis. J. Jap. For. Soc., 59(12): 442-448.

- KAWASE, S. & Y. HAYASHI. 1965. Nucleic-acid and protein changes in blood and midgut of the silkworm Bombyx mori L., during the course of cytoplasmic polyhedrosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 7: 49-54.
- KOBAYASHI, M. 1971. In "The cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm" (H. Aruga and Y. Tanada, eds), Univer. of Tokyo Press, 103-128.
- KOPEC, S. 1924. Studies on the influence of inanition on the development and the duration of life in insects. *Biol. Bull.*, 46: 1-21.
- LAMBERT, E. P., D. L. HAYNES & D. C. CRESS. 1976. Dynamics of the white cutworm, Euxoa scandens, on asparagus. *Proceedings North central branch-E.S.A.*, 31: 46.
- LEWANDOWSKI, L. J. & B. L. TRAYNOR. 1972. Comparaison of the structure and polypeptide composition of three double-stranded ribonucleic acid-containing viruses (diplonaviruses): Cytoplasmic polyhedrosis virus, wound tumor virus, and reovirus. *J. Virol.*, 10: 1053-1070.
- LONGWORTH, J. F. 1973. Viruses and Lepidoptera. In "Viruses and Invertebrates". A. J. Gibbs Ed. North-Holland and American Elsevier Press, 428-441.
- LONGWORTH, J. F. & C. R. SPILLING. 1970. A cytoplasmic polyhedrosis of the Larch sawfly, Anoplonyx destructor. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 276-280.
- LORIMER, N. 1979. Patterns of variation in some quantitative characters of Malacosoma disstria. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 72(2): 275-280.

- MacKINNON, E. A., J. F. HENDERSON, D. B. STOLTZ & P. FAULKNER. 1974. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage in vitro. *J. Ultr. Res.*, 49: 419-435.
- MAGNOLER, A. 1974. Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on larval and post-larval stages of the gypsy moth, Proteria dispar. *J. Invertebr. Pathol.*, 23: 263-274.
- MARTIGNONI, M. E. & P.J. IWAI. 1977. A catalog of viral diseases of insects and mites. USDA forest service general technical report PNW-40, 28 pp.
- MERY, C. & H. T. DULMAGE. 1975. Transmission, diagnosis, and control of cytoplasmic polyhedrosis virus in colonies of Heliothis virescens. *J. Invertebr. Pathol.*, 26: 75-79.
- MIURA, K., I. FUJII-KAWATA, H. IWATA & S. KAWASE. 1969. Electron microscopic observations of a cytoplasmic polyhedrosis virus from the silkworm. *J. Invertebr. Pathol.*, 14: 262-265.
- MIYAJIMA, S. & S. KAWASE. 1969. Haemagglutination with cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, Bombyx mori. *Virology*, 39: 347-348.
- NEILSON, M. M. 1965. Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on adult Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.*, 7: 306-314.
- PAYNE, C. C. & K. A. HARRAP. 1977. Cytoplasmic polyhedrosis. In "The atlas of insect and plant viruses". K. Maramorosh Ed. Academic Press, 105-111.
- QUIOT, J. M. 1976. Etablissement d'une lignée cellulaire (SCld 135) à partir d'ovaires du Lépidoptère Lymantria dispar. *L. C. R. Acad. Sci. Paris, Série D*, 282(5): 465-468.

QUIOT, J. M. & S. BELLONCIK. 1977. Caractérisation d'une polyédrose cytoplasmique chez le Lépidoptère Euxoa scandens (Noctuidae: Agrotinae). Etudes in vivo et in vitro. Arch. Virol., 55: 145-153.

RITCHOT, C., G. RIOUX, M. A. RICHARD, M. O'c RIVARD, M. LETENDRE, J. M. BEAUSOLEIL & C. MORIN. 1977. Principaux insectes des cultures au Québec en 1976. Ann. Soc. Ent. Québec, 22: 128-131.

SHOREY, H. H. 1963. The biology of Trichoplusia ni (Lepidoptera: Noctuidae). II Factor affecting adult fecundity and longevity. Ann. Ent. Soc. Amer., 56: 476-480.

SIKOROWSKI, P.P. & A. C. THOMPSON. 1979. Effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on diapausing Heliothis virescens. J. Invertebr. Pathol., 33: 66-70.

SIKOROWSKI, P. P., G. L. ANDREWS & J. R. BROOME. 1973. Trans-ovum transmission of a cytoplasmic polyhedrosis virus of Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol., 21: 41-45.

SIKOROWSKI, P. P. , J. R. BROOME & G. L. ANDREWS. 1971. Simple methods for detection of cytoplasmic polyhedrosis virus in Heliothis virescens. J. Invertebr. Pathol., 17: 451-452.

SIMMONS, C. & P. P. SIKOROWSKI. 1973. A laboratory study of the effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol., 22: 369-371.

SMITH, K. M. 1976. The polyhedroses: Cytoplasmic polyhedrosis (CPV). In "Virus-insect relationships", K. Smith Ed. Longman London and New-York, 42-59.

- SMITH, K. M. & R. W. G. WYCKOFF. 1950. Structure within polyhedra associated with viruses disease. *Nature*, 166: 861.
- SMITH, K. M. & N. XEROS. 1953. Studies on the cross-transmission of polyhedral viruses: Experiments with a new virus from Pyrameis cardui, the painted lady butterfly. *Parasitology*, 43: 178-185.
- VAGO, C. & A. AMARGIER. 1963. Coloration histologique pour la différenciation des corps d'inclusion polyédriques de virus d'insectes. *Ann. Epiphyties*, 14: 269-274.
- VAGO, C. & M. BERGOIN. 1963. Développement des virus à corps d'inclusion du Lépidoptère, Lymantria dispar, en cultures cellulaires. *Entomophaga*, 8: 253-361.
- VAGO, C. & M. BERGOIN. 1968. Viruses of invertebrates. *Adv. Virus Res.*, 13: 247-303.
- VAIL, P. V. & D. GOUGH. 1970. Effects of cytoplasmic polyhedrosis on cabbage loopers and their progeny. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 397-400.
- VAIL, P. V., I. M. HALL & D. GOUGH. 1969. Influence of a cytoplasmic polyhedrosis on various developmental stages of the cabbage looper. *J. Invertebr. Pathol.*, 14: 237-244.
- VAIL, P. V., T. J. HENNEBERRY, A. N. KISHABA & K. Y. ARAKAWA. 1968. Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. *J. Invertebr. Pathol.*, 10: 84-93.
- VAN DEN BOSCH, R. & P. S. MESSENGER. 1973. Biological control. Intext Educational Publisher. 242 pp.

XEROS, N. 1956. The virogenic stroma in nuclear and cytoplasmic polyhedrosis. *Nature*, 178: 412-413.

YAMAGUSHI, K. 1977. Regeneration of the midgut epithelial cells in the silkworm, Bombyx mori, infected with the cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Sericult. Sci. Japan*, 46(2): 179-180.

APPENDICE IDIETE SYNTHETIQUE AYANT SERVI A L'ELEVAGED'E. SCANDENS1. Composition

A)	Haricots blancs hydratés.....	: 854 g
	Levure de bière.....	: 128 g
	Germe de blé.....	: 200 g
B)	Acide ascorbique.....	: 13 g
	Acide sorbique.....	: 4 g
	Hydrochlorure de tétracycline.....	: 150 g
	Méthyl-p-hydroxybenzoate.....	: 8 g
C)	Agar.....	: 100 g
	Eau distillée stérile.....	: 2 l

2. Préparation

- Dans un contenant de trois litres, placer deux litres d'eau distillée stérile froide. A cette eau, ajouter 100 g d'agar (liste C) et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète de ce dernier.

- Autoclaver les haricots, la levure de bière ainsi que le germe de blé dans des contenants séparés pour une période

de 20 minutes.

- Dans un mélangeur, placer les haricots ainsi que la moitié de la solution d'agar et mélanger jusqu'à ce que la texture du mélange devienne crémeuse. Par la suite, ajouter les composés de la liste B et mélanger à nouveau. Après, le reste de la solution d'agar est ajoutée au mélange de même que la levure de bière et le germe de blé. Quand tout a été entièrement mélangé, verser le mélange dans des contenants de plastique et laisser à la température de la pièce jusqu'à ce que la diète se soit solidifiée.

- Conserver à 4° C.

APPENDICE II

DETERMINATION DES STADES LARVAIRES D'*E. SCANDENS*  
PAR LA MESURE DES CAPSULES CEPHALIQUES REJETEES  
LORS DES DIVERSES MUES

Largeur moyenne (mm) de la capsule céphalique rejetée lors des mues	Stade atteint par les larves lors de la mesure
---	---

---

1<sup>e</sup> mue ( 0.30 ) ..... 2<sup>e</sup> stade

2<sup>e</sup> mue ( 0.44 ) ..... 3<sup>e</sup> stade

3<sup>e</sup> mue ( 0.69 ) ..... 4<sup>e</sup> stade

4<sup>e</sup> mue ( 1.06 ) ..... 5<sup>e</sup> stade

5<sup>e</sup> mue ( 1.51 ) ..... 6<sup>e</sup> stade

6<sup>e</sup> mue ( 2.05 ) ..... 7<sup>e</sup> stade

---

APPENDICE IIIP.B.S.

## (PHOSPHATE-BUFFERED SALINE)

Solution A

NaCl.....	8.00 g
KCl.....	0.20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.20 g
Eau bidistillée.....	800 ml

Solution B

CaCl <sub>2</sub> .....	0.10 g
Eau bidistillée.....	100 ml

Solution C

MgCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O.....	0.10 g
Eau bidistillée.....	100 ml

On dissout les sels dans l'ordre indiqué. Puis on autoclave les solutions mères à 100° C pendant 10 minutes.

On mélange les solutions A, B et C après refroidissement.

On conserve le tampon à 4° C jusqu'à utilisation.

APPENDICE IVMETHODE DE COLORATION DES POLYEDRES (FROTTIS)SELON SIKOROWSKI & al. (1971)1. Préparation du colorant

Buffalo Black NBR.....	0.1 g
Alcool méthylique 100%.....	50 ml
Eau distillée.....	20 ml
Acide acétique glacial.....	30 ml

La solution colorante doit être préparée le jour même de son utilisation.

2. Technique de coloration

- Fixer le frottis à 50° C pendant 10 minutes.
- Placer la lame sur une plaque chauffante (40° C).
- Recouvrir le frottis de la solution colorante (5 min.).
- Renouveler le colorant pour éviter le séchage.
- Laver à l'eau distillée stérile.
- Sécher et examiner à l'immersion (1000x).

3. Résultats

Les polyèdres cytoplasmiques sont colorés en bleu marine.

APPENDICE V

COLORATION HISTOLOGIQUE POUR LA DIFFERENTIATION  
DES CORPS D'INCLUSION POLYEDRIQUES DE VIRUS  
D'INSECTES (VAGO & AMARGIER, 1963)

Après fixation des tissus dans le liquide de Bouin pendant 4 à 10 jours, déshydratation, inclusion dans la paraffine, confection des coupes sur un microtome, déparaffinage et hydratation des coupes placées sur lame de verre :

- Solution A ..... : 3-10 minutes
- Eau courante ..... : 3-5 minutes
- Solution B à 60° C ..... : 1 heure
- Rincer à l'alcool éthylique 40% ..... : Rincer rapidement
- Différenciation et coloration avec
  - la Solution C ..... : 15 minutes
  - Alcool éthylique 50% ..... : 1 minute
  - Alcool éthylique 70% ..... : 1 minute
  - Alcool éthylique 90% ..... : 1 minute
  - Alcool éthylique absolu ..... : 1 minute
  - Xylol + Alcool 100% ..... : 1 minute
  - Xylol (2 bains) ..... : 1 minute
  - Monter à l'Eukitt

Résultats:

Polyèdres cytoplasmiques- rouge

Tissus adipeux- bleuâtre

Cellule de la paroi intestinale- vert ou gris bleu

Préparation des colorants

1) Solution A

a) Hématine.....: 1 g

Alcool éthylique 95%.....: 100 ml

b) Eau distillée chaude.....: 900 ml

Alun de potasse.....: 50 g

Mélanger a et b, filtrer et ajouter 1 ml d'acide acétique pour chaque 100 ml du mélange

2) Solution B

a) Aniline.....: 10 ml

Eau distillée.....: 200 ml

Ajouter "Fushine acide" jusqu'à saturation

b) Bleu de méthylène.....: 1 g

Eau distillée.....: 100 ml

Mélanger 3 ml de b dans 100 ml de a.

3) Solution C

Jaune de métanile à 1% dans l'alcool éthylique 40%

### Fixateur de Bouin

Solution aqueuse saturée d'acide picrique.....	75 ml
Formol.....	20 ml
Acide acétique.....	5 ml

Après fixation des tissus dans le liquide de Bouin pendant 4 à 10 jours, le fixateur est remplacé par de l'alcool à 95% qui sera renouvelé au moins deux fois ou jusqu'à élimination de l'excédent d'acide picrique sous forme de coloration jaunâtre du bain d'alcool.

### Déparaffinage des coupes

Xylol (2 bains).....	1 minute
Alcool éthylique absolu.....	1 minute
Alcool éthylique 95%.....	1 minute
Alcool éthylique 80%.....	1 minute
Alcool éthylique 70%.....	1 minute
Alcool éthylique 50%.....	1 minute
Alcool éthylique 30%.....	1 minute
Eau distillée.....	1 minute (ou plus)