

**Annie Bourassa**

**Caractérisation des gènes *enhancin* et *egt* du granulovirus de  
*Choristoneura fumiferana***

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences  
(M. Sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Dr Richard Villemur, président du jury  
Dr Samir Mounir, examinateur externe  
Dr Claude Guertin, directeur de recherche  
Dr Aderrazzak Merzouki, codirecteur de recherche

Novembre 2000  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
Institut Armand-Frappier  
Université du Québec

©droits réservés de Annie Bourassa, 2000

## Résumé

Les objectifs de ce projet portaient sur la vérification de la présence des gènes *enhancin* et *egt* chez le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) ainsi que le clonage, le séquençage et la caractérisation des ces gènes. Des gènes homologues à l'*enhancin* de TnGV et à l'*egt* d'AcMNPV ont été retrouvés chez le ChfuGV. En plus de posséder des homologies importantes avec le gène *enhancin* de TnGV, l'*enhancin* de ChfuGV possède de fortes similarités avec d'autres gènes semblables chez certains baculovirus. De plus, ce gène possède un motif HEXXH associé à une fonction métalloprotéase. Le gène *egt* de ChfuGV possède des homologies avec les *egt* de plusieurs baculovirus dont AcMNPV. Huit régions, où les homologies sont plus importantes, sont retrouvées en comparant les séquences des *egt*. De plus, l'*egt* de ChfuGV possède une identité plus importante (52%) avec l'*egt* du baculovirus LaolGV. Les gènes *egt* incluant celui du ChfuGV possèdent des similarités avec les gènes codant pour les UDP-glucuronosyltransférases, famille d'enzymes ayant une fonction similaire aux EGT.

Les connaissances obtenues lors de ce projet ont permis d'identifier et d'étudier deux gènes du ChfuGV améliorant ainsi nos connaissances au niveau de la biologie moléculaire de ce virus, un domaine où peu d'études ont été effectuées jusqu'à maintenant. De plus, les données obtenues pourront éventuellement servir à l'amélioration du ChfuGV comme agent de lutte biologique contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

## Table des matières

Table des matières.....	i
Résumé.....	iv
Remerciement .....	v
Liste des figures .....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	2
1.1 Tordeuse des bourgeons de l'épinette ( <i>Choristoneura fumiferana</i> Clem.) .....	3
1.1.1 Généralités .....	3
1.1.2 Cycle de vie de <i>C. fumiferana</i> .....	3
1.1.3 Périodes épidémiques des populations de <i>C. fumiferana</i> .....	4
1.1.4 Prévention et contrôle des pertes de matières ligneuses .....	5
1.2 Baculovirus .....	6
1.2.1 Généralités .....	6
1.2.2 Avantages des baculovirus en lutte biologique.....	6
1.3 Granulovirus .....	7
1.3.1 Morphologie et ultrastructure .....	7
1.3.2 Protéines des granulovirus .....	10
1.3.3 Infection et réplication .....	11
1.4 Enhancin .....	14
1.4.1 Généralités .....	14
1.4.2 Rôle de la protéine enhancin dans l'infectivité .....	15

1.4.3 Mode d'action des enhancin chez les granuloovirus .....	15
1.4.4 Gène <i>enhancin</i> .....	16
1.5 Ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase .....	17
1.5.1 Généralités .....	17
1.5.2 Mode d'action.....	17
1.5.3 Gène <i>egt</i> .....	18
1.5.4 Homologies des gènes <i>egt</i> et UDP-glucuronosyltransférases.....	20
1.6 Hypothèse et objectifs.....	20
 CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	 22
2.1 Production virale et extraction de l'ADN.....	23
2.1.1 Production et quantification virale.....	23
2.1.2 Extraction de l'ADN viral.....	24
2.2 Amplification, clonage et séquençage du gène <i>enhancin</i> de ChfuGV.....	25
2.2.1 Amplification par PCR de l' <i>enhancin</i> de ChfuGV.....	25
2.2.2 Clonage des fragments 1, 2 et 3 de l' <i>enhancin</i> de ChfuGV .....	28
2.2.3 Séquençage des plasmides recombinants.....	34
2.3 Amplification, clonage et séquençage du gène <i>egt</i> de ChfuGV .....	35
2.3.1 Amplification par PCR de l' <i>egt</i> de ChfuGV .....	35
2.3.2 Clonage de l' <i>egt</i> de ChfuGV dans le vecteur pCR <sup>®</sup> 2.1.....	38
2.3.3 Purification des colonies positives et séquençage .....	39
 CHAPITRE 3: RÉSULTATS .....	 41
3.1 Production virale et extraction de l'ADN.....	42
3.2 Caractérisation moléculaire du gène <i>enhancin</i> .....	42
3.3. Caractérisation moléculaire du gène <i>egt</i> du ChfuGV .....	56

CHAPITRE 4: DISCUSSION .....	71
4.1 Généralités .....	72
4.2 Caractérisation du gène <i>enhancin</i> de ChfuGV .....	72
4.3 Caractérisation du gène <i>egt</i> de ChfuGV .....	73
CONCLUSION.....	78
LISTE DES RÉFÉRENCES .....	81
APPENDICES .....	94

## Remerciement

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Claude Guertin, pour son support moral et financier ainsi que mon codirecteur Abderazzak Merzouki pour ses nombreux conseils. De plus, j'aimerais souligner la participation des docteurs Maximilien Arella et Jean Bergeron dans la réalisation de ce projet.

J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire pour leurs amitiés et leurs aides précieuses.

En terminant, j'aimerais dire merci à mes parents, ma sœur et à mon copain pour leurs encouragements et leur amour.

## Liste des figures

FIGURE 1:	Granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i> .....	9
FIGURE 2:	Stratégie d'amplification et de séquençage du gène <i>enhancin</i> de ChfuGV .....	27
FIGURE 3:	Clonage des fragments 1, 2 et 3 du gène <i>enhancin</i> de ChfuGV dans le vecteur pCR <sup>®</sup> 2.1 .....	30
FIGURE 4:	Amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification et le séquençage de l' <i>egt</i> de ChfuGV .....	37
FIGURE 5:	Amplification par PCR des 3 fragments couvrant l'ensemble du gène <i>enhancin</i> de ChfuGV .....	46
FIGURE 6:	Sélection de plasmides comprenant le fragment 1, 2 ou 3 du gène <i>enhancin</i> de ChfuGV .....	48
FIGURE 7:	Séquences nucléotidique et en acides aminés déduits du gène codant pour la protéine <i>enhancin</i> du ChfuGV .....	50
FIGURE 8:	Profils d'hydrophobicité des séquences en acides aminés des gènes <i>enhancin</i> des baculovirus selon Kyte et Doolittle .....	52
FIGURE 9:	Arbre phylogénique généré à partir des séquences déduites en acides aminés des <i>enhancin</i> des baculovirus .....	54
FIGURE 10:	Amplification par PCR du gène <i>egt</i> de ChfuGV .....	59
FIGURE 11:	Plasmides recombinants comprenant le gène <i>egt</i> de ChfuGV .....	61
FIGURE 12:	Séquences nucléotidique et en acides aminés déduits du gène codant pour la protéine EGT du ChfuGV .....	63

FIGURE 13: Comparaison des régions V, VI, VII et VIII entre les EGT et certaines séquences d'UDP-glucuronosyltransférases.....	68
FIGURE 14: Arbre phylogénétique des EGT de baculovirus et des UDP-glucuronosyltransférases.....	70

## Liste des tableaux

TABLEAU 1: Comparaison des séquences en nucléotides (nt) et déduites en acides aminés (aa) des gènes <i>enhancin</i> des baculovirus .....	55
TABLEAU 2: Comparaison des promoteurs des différents gènes <i>egt</i> répertoriés .....	64
TABLEAU 3: Comparaison des séquences en nucléotides (nt) et déduites en acides aminés (aa) des gènes <i>egt</i> des baculovirus .....	65
TABLEAU 4: Comparaison des séquences en acides aminés du gène <i>egt</i> de ChfuGV avec les séquences en acides aminés des gènes <i>egt</i> des baculovirus .....	66

## Liste des abréviations

AcMNPV:	nucléopolyhédrovirus d' <i>Autographa californica</i>
BmNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Bombyx mori</i>
BusuNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Buzura suppressaria</i> ,
CfMNPV :	nucléopolyhédrovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
CfMNPV(DEF):	nucléopolyhédrovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i> défectif
CpGV:	granulovirus de <i>Cydia pomonella</i>
EaGV:	granulovirus d' <i>Estigmene acrea</i>
EGT:	ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase
<i>egt</i> :	gène codant pour l'ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase
EGTA:	éthylène glycol-bis-( $\beta$ -aminoéthyl éther) acide <i>N, N, N' N'</i> - tétraacétique
EppoNPV:	nucléopolyhédrovirus d' <i>Epiphyas posvittana</i>
EppoNPV:	nucléopolyhédrovirus d' <i>Epiphyas posvittana</i>
GV:	granulovirus
HearGV:	granulovirus d' <i>Helicoverpa armigera</i>
HearNPV:	nucléopolyhédrovirus d' <i>Heliothis armigera</i>
HumUGT:	UDP-glucuronosyltransférase de l'estradiol humain
HzSNPV:	nucléopolyhédrovirus d' <i>Helicoverpa zea</i> ,
LaolGV:	granulovirus de <i>Lacanobia oleracea</i>
LdMNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Lymantria dispar</i>
MbMNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Mamestra brassicae</i>
MeUGT:	UDP-glucosyltransférase de <i>Manihot esculenta</i>
MNPV:	nucléopolyhédrovirus à plusieurs virions par enveloppe
NPV:	nucléopolyhédrovirus
OpMNPV:	nucléopolyhédrovirus d' <i>Orgia pseudosugata</i> ,
OV:	virus inclus
PrGV:	granulovirus de <i>Pieris repae</i>
PsunGV:	granulovirus de <i>Pseudaletia unipuncta</i>
PTA:	acide phosphotungstique

PuNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Pseudaletia unipuncta</i>
RatUGT:	UDP-galactosyltransférase de la céramide du rat
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SeGV:	granulovirus de <i>Spodoptera exigia</i>
SeNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Spodoptera exigia</i>
SF:	facteur synergistique
SIUGT:	UDP-glucosyltransférase de la macrolide de <i>Streptomyces lividans</i>
SNPV:	nucléopolyhédrovirus à un virion par enveloppe
SpliNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Spodoptera littoralis</i>
SpltNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Spodoptera litura</i>
SrGV:	granulovirus de <i>Scotogramma trifolii</i>
TnGV:	granulovirus de <i>Trichoplusia ni</i>
TnNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Trichoplusia ni</i>
UDP:	uridyl diphosphate
VEF:	facteur d'accroissement viral
XnGV:	granulovirus de <i>Xestia c-nigrum</i>
XnNPV:	nucléopolyhédrovirus de <i>Xestia c-nigrum</i>
ZmUGT:	flavanol 3-o-glucosyltransférase de <i>Zea mays</i>

## Introduction

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (*C. fumiferana*) est l'un des plus importants ravageurs des peuplements de sapins baumiers et d'épinettes blanches en Amérique du Nord (Base nationale de données sur les forêts, 1996). Des études antérieures ont démontré le potentiel insecticide du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) contre la tordeuse (Guertin, 1995; Forté, 1999). Cependant, peu d'études ont été effectuées au sujet de la caractérisation moléculaire du ChfuGV.

Ce projet de recherche portait sur l'identification et la caractérisation des gènes *enhancin* et *egt* du baculovirus ChfuGV. La protéine "enhancin" retrouvée chez certains baculovirus accélère le processus d'infection de certains nucléopolyhédrovirus (NPV) ou granulovirus (GV). De plus, l'enhancin d'AcMNPV est capable d'améliorer l'efficacité de l'endotoxine du *Bacillus thuringiensis* (Bt), insecticide actuellement utilisé dans la lutte contre plusieurs insectes ravageurs (Corsaro *et al.*, 1993) dont la tordeuse des bourgeons de l'épinette. D'autre part, la protéine EGT (ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase) causerait un délai dans la mort des insectes (O'Reilly et Miller, 1991). O'Reilly (1995) a proposé que cette protéine ait comme fonction principale l'augmentation de la progéniture virale. L'identification de ces deux protéines chez certains baculovirus a donc permis d'imaginer des stratégies pour accélérer le temps d'action des baculovirus telles l'utilisation de la protéine enhancin dans les préparations d'insecticides et/ou la délétion du gène *egt* chez certains baculovirus (Corsaro *et al.*, 1993; O'Reilly et Miller, 1991).

L'identification et la caractérisation des gènes *enhancin* et *egt* chez le ChfuGV permettront d'approfondir les connaissances au niveau du génome du ChfuGV et des granulovirus en général. De plus, les informations acquises pourront éventuellement servir à l'amélioration du pouvoir biopesticide du ChfuGV dans le contrôle des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

## **CHAPITRE 1: Revue bibliographique**

## 1.1 Tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem.)

### 1.1.1 Généralités

*Choristoneura fumiferana*, le plus important ravageur des peuplements de conifères en Amérique du Nord, est un lépidoptère de la famille des Tortricidae (Cunningham, 1985; Gray, 1998). Les deux principaux hôtes de cet insecte sont l'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss) et le sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill) (Bonneau *et al.*, 1999). La tordeuse des bourgeons de l'épinette peut cependant se nourrir de plusieurs autres espèces tels le mélèze larcin (*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch), l'épinette rouge (*Picea rubens* Sarg.), l'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) et la pruche du Canada (*Tsuga canadensis* (L.) Carr.) (Harvey, 1985).

La distribution géographique de la tordeuse des bourgeons de l'épinette suit de très près celle de ces hôtes principaux. On retrouve cet insecte sur un territoire qui s'étend des provinces maritimes jusqu'en Colombie-Britannique en passant par l'état de la Virginie et remontant jusqu'à la vallée de la rivière Mackenzie et au Yukon (Harvey, 1985). Au Canada, les provinces les plus durement touchées par les épidémies de *C. fumiferana* sont le Nouveau-Brunswick, le Québec et l'Ontario (Mattson *et al.*, 1988).

### 1.1.2 Cycle de vie de *C. fumiferana*

La tordeuse des bourgeons de l'épinette est un insecte univoltine, c'est-à-dire que son cycle de vie dure un an (Mattson *et al.*, 1988). Il comprend un stade œuf, six stades larvaires, un stade chrysalide et un stade papillon (Bonneau *et al.*, 1999). Les œufs sont déposés par les papillons sur la surface inférieure des aiguilles des arbres hôtes entre la mi-juillet et la mi-août (Talerico, 1984; Bonneau *et al.*, 1999). Après 10 à 14 jours d'incubation, les larves de premier stade émergent et passent l'hiver dans un abri de soie appelé "hibernaculum" (Mattson *et al.*, 1988). Les larves subissent une

première mue à l'intérieur de leur abri afin de passer au deuxième stade (Mattson *et al.*, 1988). Vers la fin du mois d'avril, les larves de deuxième stade sortent de leur hibernaculum et débutent leur comportement d'alimentation. Les larves se nourrissent principalement des nouveaux bourgeons jusqu'à leur sixième stade (Nigam, 1995). Au début du mois de juillet, les larves se transforment graduellement en chrysalide d'où émergent les adultes (papillons) à la mi-juillet. Les adultes ne vivent qu'une dizaine de jour, le temps de l'accouplement et de la ponte (Bonneau *et al.*, 1999).

### 1.1.3 Périodes épidémiques des populations de *C. fumiferana*

Les populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette sont caractérisées par des périodes épidémiques récurrentes (Gray *et al.* 1998). Au cours du 20<sup>ième</sup> siècle, trois infestations généralisées de la tordeuse ont eu lieu dans la province de Québec, soit en 1910, 1940 et 1967 (Lachance, 1995). Une 4<sup>ième</sup> infestation a débuté en 1992 (Bonneau *et al.*, 1999). Selon Royama (1984) et Blais (1985), les épidémies de tordeuses sont un phénomène naturel et cyclique qui apparaît toutes les 35 à 40 ans. Selon ces auteurs, les cycles épidémiques de *C. fumiferana* seraient régis par un phénomène appelé "pullulation-effondrement" qui suggère qu'en vieillissant, les peuplements d'arbres deviennent plus susceptibles aux attaques de tordeuses, à cause notamment d'une augmentation des sources de nourriture (Morris, 1963; Blais, 1985). Ces épidémies persistent jusqu'à ce que toute nourriture soit consommée, ce qui entraîne une mortalité très élevée des arbres. Cependant, d'autres facteurs peuvent entraîner le déclin des populations de *C. fumiferana* et ce malgré une disponibilité de la nourriture (Régnière et Lysyk, 1995). Ces facteurs sont le climat, les prédateurs, le parasitisme et les maladies (Blais, 1985). Dans ce contexte, il faut considérer le rôle du granuloovirus de *C. fumiferana*, le ChfuGV, dans la dynamique des populations de *C. fumiferana*.

#### 1.1.4 Prévention et contrôle des pertes de matières ligneuses

Durant les périodes épidémiques, les populations de tordeuses sont très élevées et causent des ravages importants (Gray *et al.* 1998). Des mortalités de 80 à 90 % ont été enregistrées dans les sapinières lors des épidémies de tordeuses (Blais, 1983). Plusieurs moyens sont mis en place afin de prévenir les pertes de matières ligneuses. Ces moyens sont l'identification des peuplements d'arbres à risques, la récolte des arbres vulnérables avant le début d'une épidémie de *C. fumiferana*, la modification dans la composition d'un peuplement au profit d'essences plus résistantes à la tordeuse ou la récupération des arbres morts depuis peu de temps (Bonneau *et al.*, 1999).

La pulvérisation d'insecticides est l'unique moyen de contrôle direct des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Kettela, 1995; Nigam, 1995). Depuis la rationalisation de l'utilisation d'insecticides chimiques en milieu forestier au Québec (BAPE, 1991), seules des préparations de biopesticides à base de l'endotoxine du *Bacillus thuringiensis* sont utilisées dans les programmes de contrôle des populations de *C. fumiferana*. Les préparations à base de *Bacillus thuringiensis* présentent cependant certains désavantages, i) elles s'attaquent non seulement à l'insecte ciblé, mais aux lépidoptères en général (Cunningham, 1985) et ii) ces préparations pourraient éventuellement être à l'origine de l'émergence d'insectes résistants, comme c'est le cas de *Plodia interpunctella*, *Ephestia cautella* (McGaughey et Beeman, 1988), *Plutella xylostella* (Tabashnik *et al.*, 1990) et *Heliothis virescens* (Tabashnik, 1992).

Afin de diversifier les moyens de lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette, le baculovirus ChfuGV, entomopathogène retrouvé de façon naturelle chez les populations de l'insecte, pourrait être utilisé comme biopesticide (Guertin, 1995; Forté, 1999).

## **1.2 Baculovirus**

### **1.2.1 Généralités**

La famille Baculoviridae comprend des virus à ADN double brin, circulaire et super-enroulé. Leur génome est composé d'une molécule d'ADN de 88 à 153 kpb comprise à l'intérieur d'une nucléocapside enveloppée (Burgess, 1977). Les baculovirus ont un corps d'inclusion (matrice protéique) qui protège la nucléocapside enveloppée des rayonnements ultra-violet (Tanada et Hess, 1991; Jarvis et Garcia 1994).

La famille Baculoviridae comprend deux genres, soit les granulovirus (GV) et les nucléopolyhédrovirus (NPV). Les granulovirus ont un aspect granulaire et les nucléopolyhédrovirus sont de forme polyhédrique. Les GV possèdent un seul virion à l'intérieur d'un même corps d'inclusion (Crook, 1994) tandis que les NPV contiennent plusieurs virions à l'intérieur de leur corps d'inclusion (Rohrman, 1986). Une sous-division existe chez les NPV. Les SNPV comprennent un seul virion par enveloppe et les MNPV possèdent plusieurs virions dans une même enveloppe (Fields 1996).

### **1.2.2 Avantages des baculovirus en lutte biologique**

Les baculovirus sont un groupe de virus qui infecte plus de 600 espèces d'arthropodes (Charlton et Volkman, 1993). Cependant, pris individuellement, leur spectre d'hôte est très limité. Chaque espèce de baculovirus infecte normalement un ou quelques hôtes rapprochés phylogénétiquement. De façon plus précise, les granulovirus sont reconnus pour n'infecter que des espèces appartenant à la famille des Lépidoptères, plus particulièrement les genres Noctuidae et Tortricidae (Tanada et Hess, 1991). Les baculovirus sont appelés d'après le nom de leur hôte naturel suivi de leur genre (GV, SNPV ou MNPV) (ICTV, 1998).

Plusieurs NPV ont déjà été homologués au Canada comme insecticides biologiques. En foresterie, on peut notamment citer l'utilisation du Lecontvirus contre

le diprion de Leconte, du Sertifervirus contre le diprion du pin sylvestre, du Disparvirus contre la spongieuse ou du Virtuss contre la chenille à houppes du Douglas (Service canadien des forêts, 1998). Dans le secteur agricole, plusieurs espèces de GV ont été utilisées avec succès dans le contrôle des populations d'insectes nuisibles, notamment contre *Phthrimaea operculella* (teigne de la pomme de terre) (Reed et Springett, 1971) ou *Plodia interpunctella* (pyrale indienne de la farine) (McGaughney, 1975)

## 1.3 Granulovirus

### 1.3.1 Morphologie et ultrastructure

Les granulovirus inclus ont une forme généralement ovocylindrique d'environ 300 à 500 nm de longueur par 120 à 350 nm de largeur (Bergold, 1963). La nucléocapside enveloppée fait de 260 à 360 nm de longueur par 30 à 60 nm de largeur (Tweeten *et al.*, 1981) (Figure 1). L'enveloppe, qui pourrait être d'origine cellulaire, est composée de 3 couches protéiques, de 5 à 6 nm d'épaisseur (Beaton et Filshie, 1976). La capsid est formée de sous-unités protéiques assemblées en anneaux imbriqués les uns sur les autres protégeant ainsi le génome viral des exonucléases (Burley *et al.*, 1982).

Le processus d'infection des granulovirus, similaire à celui des nucléopolyhédrovirus, possède deux phénotypes: un premier phénotype avec un corps d'inclusion entourant la nucléocapside enveloppée (OV "virus inclus") et un deuxième phénotype ne possédant pas de corps d'inclusion (BV "virus bourgeonnant") (Rohrmann, 1992). Les OV peuvent persister longtemps dans l'environnement et les BV sont responsables de la propagation du virus de cellules à cellules à l'intérieur de l'insecte (Rohrmann, 1992).

**Figure 1: Granulovirus de *Choristoneura fumiferana***

Photo prise en microscopie électronique, du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV).

a: corps d'inclusion

b: nucléocapside enveloppée



### 1.3.2 Protéines des granulovirus

Les granulovirus possèdent un large génome ayant le potentiel de coder pour plus de 100 protéines. Plusieurs de ces protéines n'ont pas encore été étudiées, principalement parce que les lignées cellulaires permissives pour la réplication des GV sont rares (Tanada et Hess, 1991; Winstanley et Crook, 1993; Crook *et al.*, 1997 et Léry *et al.*, 1997).

#### 1.3.2.1 Protéines associées à la nucléocapside enveloppée

Des analyses sur gel de polyacrylamide ont montré que les nucléocapsides enveloppées des GV de *Pieris brassicae*, *Plodia interpunctella*, *Pseudaletia unipuncta*, *Trichoplusia ni* et *Spodoptera frugiperda* possèdent entre 12 et 20 protéines structurales dont les poids moléculaires varient entre 12 et 160K. Les protéines p16, p38 et p88 semblent associés à l'enveloppe des nucléocapsides (Consigli *et al.*, 1986). Hayakawa et collaborateurs (1999) ont démontré la présence d'une protéine homologue à la p74 des NPV qui serait associée à l'enveloppe de la nucléocapside du phénotype des virus inclus (OV). La p74 serait nécessaire à l'infection *in vivo* car les virus dont la p74 a été déléetée ne sont pas infectieux. Consigli et collaborateurs (1986) ont observé une protéine p63/64 chez les GV de *P. interpunctella*, *P. brassicae* et *T. ni*, qui pourrait être responsable de l'attachement des virions à leurs cellules hôtes lors de l'infection secondaire, comme c'est le cas pour les NPV (Volkman *et al.*, 1984). La nucléocapside serait composée de deux protéines majeures, soit la p39 et la p12 qui auraient une fonction similaire à celle des histones, soit la condensation de l'ADN (Burley *et al.*, 1982).

#### 1.3.2.2 Protéines associées au corps d'inclusion

Le corps d'inclusion est une matrice protéique, composée principalement de la protéine granuline qui s'apparente à la polyhédrine chez les NPV, qui permet le

maintien de l'état infectieux du virion dans l'environnement (Akiyoshi *et al.*, 1985). La granuline est une protéine hyperexprimée et produite tardivement lors de l'infection. Cette protéine possède un poids moléculaire d'environ 28 kDa (Russel et Consigli, 1986). Le gène de la granuline du ChfuGV a été identifié et code pour une protéine de 248 acides aminés avec un poids de 29 kDa (Bah *et al.*, 1997). Des homologies supérieures à 80 % sont retrouvées au niveau des gènes codant pour la granuline du GV de *C. fumiferana*, *T. ni*, *P. Brassicae* et *Cryptophlebia leucotreta*.

D'autres protéines comme des protéases exogènes et des protéines enhancin sont parfois associées au corps d'inclusion (Rohrman, 1992). Les protéases possèdent des propriétés similaires aux protéases isolées de l'intestin de l'insecte (Rubinstein et Polson, 1983). Il est possible que certaines protéases observées dans le corps d'inclusion puissent être acquises lors de la désintégration de l'insecte (Rohrman, 1992).

Le corps d'inclusion est recouvert d'une fine couche d'hydrates de carbone. Cette enveloppe semble étroitement associée à une protéine nommée p10 qui est exprimée tardivement lors de l'infection. La protéine p10 serait responsable de la formation des structures fibrillaires observées dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées (Russel *et al.*, 1991). Williams et collaborateurs (1989) ont démontré que la délétion du gène de la p10 affecte la formation de l'enveloppe du corps d'inclusion. Le rôle exact de cette couche reste encore à élucider (Rohrman, 1992).

### **1.3.3 Infection et réplication**

#### **1.3.3.1 Infection primaire**

Le cycle d'infection des granulovirus est biphasique (Consigli *et al.*, 1986). L'infection primaire est initiée suite à l'ingestion par les insectes de virus inclus (OV). Dans l'environnement alcalin de l'intestin moyen de l'insecte, le corps d'inclusion est dissout ce qui libère les nucléocapsides enveloppées (Tanada et Hess, 1991). La dissolution de la matrice protéique permet également de relâcher la protéine enhancin

qui provoquerait la dégradation temporaire de la membrane péritrophique (membrane protectrice recouvrant l'épithélium intestinal), facilitant ainsi le passage des nucléocapsides enveloppées vers leurs cellules cibles (Granados et Corsaro, 1990). Une fusion de l'enveloppe, possiblement via la p74 (Rohrmann, 1992), avec la membrane des cellules cylindriques de l'intestin de l'insecte, permet à la nucléocapside d'entrer dans le cytoplasme de la cellule. La nucléocapside se rend alors vers le noyau de la cellule hôte à l'aide des microtubules (Blissard et Rohrmann, 1990). La nucléocapside s'attache ensuite sur les pores nucléaires afin d'insérer l'ADN viral dans le noyau. C'est à cet endroit que la réplication aura lieu (Hess et Falcon, 1987; Tanada et Hess, 1991).

#### **1.3.3.1.1 Protéines associées à la phase précoce de la réplication**

La phase précoce de la réplication des baculovirus est caractérisée par la production des protéines nécessaires à l'initiation de la phase tardive. L'ADN polymérase virale (Ahrens et Rohrmann, 1995), l'hélicase (Hodgeman, 1988; Bideshi *et al.*, 1998) et les protéines IE-1/IE-0, IE-2 et PE-38, impliquées dans la régulation des gènes, seront produites durant la phase précoce de la réplication (Guarino et Summers, 1986; Fields, 1996). De plus, Clem (1991), Crook (1997) et Bideshi (1999) et leurs collaborateurs respectifs ont démontré que la production de protéines telles *p35* (AcMNPV), *Cp-iap* (CpGV) ou *Xn-iap* (XnGV) aurait un rôle à jouer dans l'inhibition de l'apoptose au niveau des cellules infectées. O'Reilly et Miller (1989) ont également montré que la protéine EGT d'AcMNPV, sécrétée par les cellules infectées, serait impliquée dans le contrôle du déroulement de la mue. Miller (1996) rapporte que les protéines *lef-1* et *lef-2* d'AcMNPV sont exprimées durant la phase précoce de la réplication. Ces protéines seront éventuellement impliquées dans l'expression des gènes tardifs (Passarelli et Miller 1993 a,b; Merrington *et al.*, 1996; Yang et Miller, 1999).

La transcription des gènes précoces est assurée par l'ARN polymérase II de la cellule hôte (Hoopes et Rohrmann, 1991; Kool *et al.*, 1995). Plusieurs promoteurs précoces des baculovirus possèdent des boîtes TATA et la séquence CAGT (Blissard et Rohrmann 1990, Blissard *et al.*, 1992).

### 1.3.3.1.2 Protéines associées à la phase tardive de la réplication

Chez les baculovirus, la phase tardive de la réplication consiste en i) la réplication de l'ADN viral ii) l'expression de protéines tardives à l'aide de *lef-1* et *lef-2* et iii) l'assemblage de virions bourgeonnants (phénotype BV).

L'ARN polymérase virale, produite durant la phase précoce, permet la transcription des gènes tardifs en reconnaissant le motif A/G/TTAAG (Blissard et Rohrmann 1990; Gross *et al.*, 1993; Kool *et al.*, 1995). Les protéines exprimées durant la phase tardive sont surtout les protéines structurales des virions bourgeonnants (BV) telles la p12, la p39 et possiblement la gp64 (Burley *et al.*, 1982; Pearson *et al.*, 1988; Whitford *et al.*, 1989). L'extrémité conique des nucléocapsides, assemblées dans le noyau, sera recouverte de péplomères composés possiblement de la protéine gp64 qui servira de molécule d'attachement lors de l'infection secondaire (Blissard et Rohrmann, 1990).

Les virions nouvellement formés sortent par bourgeonnement du côté basal des cellules cylindriques de l'épithélium de l'intestin et rejoignent l'hémolymphe de l'insecte (Tananda et Hess, 1991).

### 1.3.3.2 Infection secondaire

L'infection secondaire est initiée par les virions bourgeonnants (BV) qui vont éventuellement atteindre plusieurs organes, tels que les corps gras, la trachée et l'épiderme (Faulkner, 1981).

L'entrée des virions dans les cellules cibles s'effectue par endocytose (Charlton et Volkman, 1993). La fusion entre l'enveloppe du virion bourgeonnant (BV) et l'endosome permet l'entrée de la nucléocapside dans le cytoplasme. L'ADN viral sera éventuellement injecté dans le noyau de la cellule, lieu de la réplication. À la fin du

processus de réplication le phénotype OV est exprimé, c'est-à-dire que les virions produits sont recouverts d'un corps d'inclusion (Rohrman, 1992). La granuline est alors produite en abondance permettant la formation du corps d'inclusion qui recouvre les virions (Tanada et Hess, 1991). La fin de l'infection secondaire se culmine en la mort de l'insecte et la libération des virions inclus (phénotype OV) dans l'environnement (Consigli *et al.*, 1986).

## 1.4 Enhancin

### 1.4.1 Généralités

Tanada (1959) a démontré qu'il existait une relation synergistique entre le NPV et le GV de *Pseudaletia unipuncta* (PuNPV et PsunGV) lors d'une infection mixte. Cette relation se traduisait en une augmentation de la susceptibilité à l'infection suivie d'une mort plus rapide des larves. La synergie entre les deux virus a alors été attribuée à un facteur synergistique retrouvé dans le PsunGV. Plus récemment, ce facteur a été appelé "viral enhancing factor" (VEF) (Granados et Corsaro, 1990; Hashimoto *et al.*, 1991; Gallo *et al.*, 1991) ou enhancin (Roelvink *et al.*, 1995; Lepore *et al.*, 1996; Wang et Granados, 1997).

Tanada et Hukuhara (1971) ont localisé la protéine enhancin de PsunGV dans le corps d'inclusion du virus. La purification de cette protéine a permis d'évaluer son poids à 104 kDa (Tanada *et al.*, 1973). Derksen et Granados (1988) ont identifié deux autres protéines ayant des fonctions similaires à l'enhancin de PsunGV chez les granulovirus de *Trichoplusia ni* (TnGV) et *Xestia c-nigrum* (XnGV).

Les protéines enhancin, fréquemment retrouvées chez des GV, facilitent le processus d'infection de certains NPV et GV *in vivo* et/ou *in vitro* (Tanada et Hara, 1975; Lepore *et al.*, 1996). Les enhancin peuvent aussi augmenter la toxicité, *in vivo*, des formulations de *Bt* (Corsaro *et al.*, 1993). De plus, ces protéines semblent faciliter

l'infection des virus possédant l'enhancin (Tanada et Hara, 1975; Granados et Corsaro, 1990; Rohrmann, 1992; Miller, 1996).

#### **1.4.2 Rôle de la protéine enhancin dans l'infectivité**

Plusieurs recherches décrivent l'effet de l'enhancin des granulovirus sur l'infection par des baculovirus et les conclusions divergent selon les systèmes étudiés. Dans un cas, l'enhancin diminuait le potentiel infectieux d'un NPV (Nakagaki *et al.*, 1987). Dans d'autres cas, l'enhancin n'avait aucun effet (Hukuhara et Zhu 1988, 1989). Cependant, la majorité des études montraient un accroissement de l'infectivité des baculovirus lorsque combinés avec un enhancin (Tanada et Hara, 1975; Ohba et Tanada, 1984; Hukuhara *et al.*, 1987; Corsaro *et al.*, 1993). Corsaro et collaborateurs (1993) ont même observé que l'enhancin pouvait causer une augmentation du potentiel insecticide de certaines préparations à base de Bt.

#### **1.4.3 Mode d'action des enhancin chez les granulovirus**

Tanada et Hara (1975) ont proposé que l'enhancin de PsunGV agit comme molécule d'attachement entre les virions enveloppés et la membrane cellulaire des cellules hôtes. Cette hypothèse est supportée par des observations en microscopie électronique. De grandes quantités d'anticorps dirigés contre l'enhancin de PsunGV ont localisé la protéine près des membranes des cellules épithéliales de l'intestin de l'insecte. Uchima et collaborateurs (1988) suggèrent la présence de sites spécifiques pour la liaison de l'enhancin de PsunGV sur l'épithélium intestinal. Cependant, cette observation n'a jamais été confirmée par d'autres auteurs.

Par ailleurs, Derksen et Granados (1988) proposent un second mode d'action selon lequel les enhancin auraient une activité enzymatique qui agit au niveau de la membrane péritrophique de l'intestin de l'insecte. La membrane péritrophique, composée de chitine et de protéines, constitue une des premières lignes de défense

contre l'invasion de l'insecte par les microorganismes (McFarlane, 1985). Derksen et Granados (1988) ont prélevé des membranes péritrophiques de larves de *T. ni* infectées par le TnGV. Sur gel de polyacrylamide, les protéines des membranes péritrophiques des larves infectées présentent un profil de migration différent par rapport aux témoins. Corsaro et collaborateurs (1993) ont repris cette expérience avec l'enhancin purifiée de TnGV et des membranes péritrophiques provenant des insectes *T. ni*, *H. zea*, *P. unipuncta* et *S. exigua*. La conclusion fut la même; les profils de migration étaient différents entre les membranes traitées avec l'enhancin et les témoins. Wang et Granados (1997) ont ensuite démontré que l'enhancin de TnGV dégrade la mucine, protéine majeure de la membrane péritrophique de *T. ni*.

#### 1.4.4 Gène *enhancin*

Un gène *enhancin* a été identifié chez TnGV (Hashimoto *et al.*, 1991), PsunGV (Roelvink *et al.*, 1995), HearGV (GV d'*Heliothis armigera*) (Roelvink *et al.*, 1995), XnGV (Goto et Maeda, 1997) et LdMNPV (Bischoff et Slavicek, 1997). Hashimoto et collaborateurs (1991) ont montré que le gène *enhancin* de TnGV possède un cadre de lecture de 2703 bases codant pour une protéine de 901 acides aminés et un poids moléculaire de 104 kDa. L'utilisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines du corps d'inclusion de TnGV a révélé la présence d'une protéine *enhancin* de 101 kDa (Hashimoto *et al.*, 1991). La séquence en acides aminés de l'*enhancin* de TnGV comprend 12 sites possibles de N-glycosylation (NXS/T) (Hashimoto *et al.*, 1991). Les gènes *enhancin* de PsunGV et TnGV présentent des identités de l'ordre de 99 % (Corsaro et Granados, 1993). Les gènes *enhancin* de PsunGV, TnGV et HearGV possèdent des motifs de promoteur tardif, G/T/ATAAG, suggérant ainsi que les protéines *enhancin* sont exprimées tard lors de l'infection (Rohrmann, 1986; Roelvink *et al.*, 1995). En effet, l'ARNm du gène *enhancin* est détectable seulement 4 jours suivant l'infection (Roelvink *et al.*, 1995).

Hashimoto et collaborateurs (1991) ont démontré la présence d'un motif de liaison canonique du zinc de type HEXXH dans les séquences des gènes *enhancin* de

TnGV, PsunGV et HearGV. Ce motif caractérise les structures primaires de la plupart des métalloprotéases. Lepore et collaborateurs (1996) ont par la suite démontré que l'utilisation de l'EGTA ou la phénanthroline sont capables de prévenir la dégradation de la membrane péritrophique par l'enhancin de TnGV, prouvant ainsi que cette protéine est une métalloprotéase.

## **1.5 Ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase**

### **1.5.1 Généralités**

L'expression de la protéine EGT chez les baculovirus semble permettre la régulation du développement de l'insecte en causant un retard de mue (O'Reilly, 1995). Normalement, la mue provoque un arrêt temporaire de l'alimentation de la larve. La libération de la protéine EGT provoque la poursuite du comportement alimentaire en éliminant prématurément les hormones responsables de la mue, l'ecdysone et la 20-hydroxyecdysone. De plus, O'Reilly et Miller (1991) ont observé que le nombre de virus produit par les cellules *S. frugiperda* infectées avec AcMNPV de type sauvage (AcMNPV/*egt+*) est plus élevé que la quantité de virus obtenu par ces mêmes cellules infectées avec AcMNPV dont l'*egt* a été délété (AcMNPV/*egt-*). Cette augmentation du rendement de la réplication virale est corrélée avec l'augmentation en grosseur des larves due à l'inhibition de la mue (les larves poursuivent leur comportement d'alimentation). Une des fonctions possibles de l'EGT serait donc de favoriser la multiplication virale (O'Reilly, 1995).

### **1.5.2 Mode d'action**

Le mécanisme d'élimination naturelle de l'ecdysone et de la 20-hydroxyecdysone implique l'association préalable de ces hormones à une molécule de glucose (Oberlander, 1985). Les protéines EGT des baculovirus, sécrétées dans l'hémolymphe à partir des cellules infectées, agissent en catalysant la réaction naturelle

d'élimination de l'ecdysone et de la 20-hydroxyecdysone de façon prématurée, empêchant ainsi l'initiation de la mue (O'Reilly et Miller, 1989; O'Reilly *et al.*, 1992; O'Reilly, 1995). Ceci explique le ralentissement de la mue observé chez les insectes *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni* et *Lymantria dispar* infectés par des baculovirus possédant la protéine EGT soit de AcMNPV ou de LdMNPV (O'Reilly et Miller, 1989; Elridge *et al.*, 1992; Burand et Park, 1992). De plus, à toutes les doses essayées, les insectes infectés avec des mutants *egt*, les larves succombent plus rapidement à l'infection que les insectes infectés par le virus sauvage (O'Reilly, 1995). Les mécanismes par lesquels le temps de mortalité est réduit ne sont pas encore bien compris. Cependant, des observations effectuées par O'Reilly (1995) indiquent que la plupart des insectes infectés avec des mutants *egt*- meurent durant ou juste après la mue, suggérant ainsi que le stress associé avec ce phénomène biologique est mal supporté par les insectes infectés. Une délétion du gène *egt* chez les baculovirus utilisés comme insecticide pourrait ainsi permettre une diminution du temps d'action de ces virus (O'Reilly et Miller 1991). De plus, des larves de *S. frugiperda* infectées avec AcMNPV *egt*- consomment de 30 à 40 % moins de nourriture artificielle que les larves infectées par le type sauvage (Elridge *et al.*, 1992).

### 1.5.3 Gène *egt*

Le gène *egt* a été identifié pour la première fois dans le génome d'AcMNPV et il est considéré non essentiel pour la réplication virale (O'Reilly & Miller, 1989). Le gène *egt* d'AcMNPV possède 1473 nucléotides codant pour une protéine de 491 acides aminés avec un poids moléculaire de 56 kDa. La séquence du gène *egt* a été identifiée chez 14 NPV et un GV (AcMNPV, O'Reilly et Miller, 1989; LdMNPV, Riegel *et al.*, 1994; NPV de *Bombyx mori* (BmNPV), Maeda, 1994; CfMNPV et CfMNPV(DEF), Barret *et al.*, 1995; NPV de *Mamestra brassicae* (MbMNPV), Clarke *et al.*, 1996; NPV d'*Orgia pseudosugata* (OpMNPV), Rohrman, 1996; NPV de *Buzura suppressaria* (BusuNPV), Hu *et al.*, 1997; NPV d'*Helicoverpa zea* (HzNPV), Popham *et al.*, 1997; NPV de *Spodoptera littoralis* (SpliNPV), Smith, 1997; NPV de *Spodoptera litura*

(SpliNPV), Croizier, 1996; NPV d'*Epiphyas posvittana* (EppoNPV), Graves et Ward, 1998; NPV d'*Heliothis armigera* NPV (HearNPV), Chen *et al.*, 1998; LaolGV, Smith et Goodale, 1998). O'Reilly (1995) a démontré la présence de sept sites possibles de N-glycosylation dans la séquence du gène *egt* d'AcMNPV. Evans et O'Reilly, (1999) ont montré, par des expériences effectuées en présence de tunicamycine (inhibiteur de N-glycosylation), que la protéine EGT d'AcMNPV est effectivement glycosylée.

Un signal peptidique de 18 acides aminés, communément retrouvés chez les protéines sécrétées, est retrouvé chez l'EGT d'AcMNPV suggérant que cette protéine serait retrouvée en milieu extracellulaire (O'Reilly *et al.*, 1992). En effet, O'Reilly et collaborateurs (1992) ont purifié la protéine EGT à partir du milieu de culture des cellules de *S. frugiperda* infectées par AcMNPV. La séquence protéique de l'EGT purifiée à partir du milieu extracellulaires commence 18 acides aminés après le codon d'initiation prédit de la séquence en nucléotides. Le signal peptidique serait donc clivé avant que la protéine ne soit excrétée à l'extérieur des cellules infectées (O'Reilly *et al.*, 1992). *In vivo*, O'Reilly (1995) a également démontré la présence de l'EGT tronqué dans l'hémocèle des insectes infectés.

Le gène *egt* du GV de *Lacanobia oleracea* (LaolGV) possède une boîte TATA et un motif de promoteur tardif (GTAAG) (Smith et Goodale, 1998). Cependant, les gènes *egt* d'AcMNPV et de CfMNPV possèdent un motif de promoteur précoce (CAGT) (O'Reilly et Miller, 1990; Barret *et al.*, 1995). Pris ensemble, ces motifs suggèrent que les protéines EGT sont produites tout le long de la vie de l'insecte. En effet, Evans et O'Reilly (1999) ont démontré que la protéine EGT est détectable à partir de 6 heures jusqu'à 72 heures suivant l'infection.

O'Reilly (1995) a trouvé cinq domaines homologues entre les gènes *egt* de baculovirus provenant de CfMNPV, de LdMNPV, de SpliNPV et de OpMNPV. Hu et collaborateurs (1997) ont trouvé 5 régions additionnelles possédant un minimum de 70 % d'homologie, à un endroit donné, dans les séquences des *egt* de BusuNPV, SpliNPV, MbMNPV, AcMNPV, BmNPV, CfMNPV, CfMNPV (DEF), LdMNPV et LaolGV.

#### 1.5.4 Homologies des gènes *egt* et UDP-glucuronosyltransférases

Le gène *egt* d'AcMNPV démontre des homologies avec des gènes codant pour des UDP-glucuronosyltransférases de mammifères tels le rat (Mackenzie, 1987), la souris (Kimura et Owens, 1987) et l'humain (Jackson *et al.*, 1987) (O'Reilly et Miller, 1989). Ces observations suggèrent que les EGT et les UDP-glucuronosyltransférases font partie de la même famille d'enzymes qui catalyse la conjugaison d'une variété de substrats lipophiliques tels les hormones avec l'acide glucuronique, le glucose ou le galactose (O'Reilly, 1995). Ces réactions de conjugaison sont d'une importance capitale dans l'élimination d'une multitude de composés et de toxines (Burchell et Coughtrie, 1989).

### 1.6 Hypothèse et objectifs

Étant donné que le pouvoir insecticide du ChfuGV contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette a été établi (Forté *et al.*, 1999), une caractérisation des facteurs viraux pouvant influencer les propriétés de cette pathogénécité a été entreprise lors de ce projet. Plusieurs études ont démontré l'action importante de 2 protéines qui peuvent modifier l'efficacité des baculovirus comme biopesticides. Les gènes correspondants à ces protéines ont été identifiés et caractérisés chez plusieurs baculovirus. L'identification et la caractérisation de ces deux gènes chez le ChfuGV pourraient donc élargir nos connaissances sur ce virus mal connu et alimenter les recherches futures avec des moyens d'améliorer son potentiel insecticide.

Ce projet de recherche a donc comme hypothèse que les gènes *enhancin* et *egt* sont présents chez le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* et qu'ils possèdent des caractéristiques communes avec les gènes *enhancin* et *egt* d'autres baculovirus. Les objectifs étaient d'abord d'isoler (amplification et clonage) et de caractériser

(séquençage et analyse des séquences) les gènes *enhancin* et *egt* de ChfuGV. De plus, une comparaison des séquences obtenues avec les gènes *enhancin* et *egt* d'autres baculovirus a permis d'identifier des caractéristiques importantes de ces gènes.

## **CHAPITRE 2: Matériels et méthodes**

## 2.1 Production virale et extraction de l'ADN

### 2.1.1 Production et quantification virale

La production virale a été effectuée selon la technique décrite par Forté et collaborateurs (1999). Brièvement, le ChfuGV a été produit en infectant des larves de tordeuse des bourgeons de l'épinette de 2<sup>ième</sup> stade (provenant du FPMI; Forest and Pest Management Institute, Sault-Sainte-Marie, Ontario). Les larves ont été placées dans des godets contenant de la nourriture artificielle (Grisdale-Wilson, 1988). Les godets ont ensuite été entreposés dans une chambre environnementale (Growth Cabinet, Sanyo, Caltec scientifique).

Un volume de 50 µl d'une suspension de départ de  $4 \times 10^8$  granules viraux/ml d'eau a été étalé à la surface de la nourriture artificielle contenue dans les godets. Les larves de 4<sup>ième</sup> stade ont été introduites dans chacun des godets. Douze jours suivant l'infection, les larves ont été recueillies et conservées à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la purification virale.

La technique de purification virale utilisée était basée sur celle décrite par Tompkins (1991). Les larves infectées ont été homogénéisées dans du SDS 1 % et le broyat a été filtré à travers trois épaisseurs de coton fromage afin d'éliminer les débris larvaires. Après une incubation de 30 minutes, le filtrat a été centrifugé à 300 x g durant 5 minutes afin d'éliminer les débris larvaires et cellulaires en suspension. Afin de culotter le virus, le surnageant a été transféré dans un tube et centrifugé à 10 000 x g durant 25 minutes. Trois lavages du culot ont été effectués avec de l'eau distillée stérile puis le virus a été resuspendu dans de l'eau distillée et placé sur un gradient de glycérol discontinu (de 60 % à 90 % V/V). Une centrifugation du gradient à 80 000 x g (ultra-centrifugeuse Sorvall, rotor Beckman SW41) durant 45 minutes a permis de récupérer le ChfuGV, à l'aide d'une pipette pasteur, dans la fraction de glycérol 80 %. Le glycérol a été éliminé à l'aide de trois lavages successifs avec de l'eau distillée suivie d'une

centrifugation à 10 000 g durant 30 minutes. La préparation virale a été conservée à 4°C jusqu'à son utilisation pour l'extraction de l'ADN.

La préparation virale a été quantifiée selon la méthode décrite par Alain et collaborateurs (1989). Brièvement, un volume de 100 µl d'une dilution 1/100 de la suspension virale a été mélangée avec un volume égal d'une solution de  $3,51 \times 10^8$  billes de latex (S130-3 polystyrene latex, Agar Scientific). Ce mélange a été déposé sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone par la technique Airfuge (Alain *et al.*, 1989). Après trois lavages avec de l'eau distillée, les grilles ont été séchées sur papier buvard et colorées au PTA (acide phosphotungstique 3 %, pH 6) durant 3 minutes. Le PTA permet la coloration négative de l'échantillon afin de le visualiser en microscopie électronique (Phillips 300). La concentration des granules de ChfuGV a été déduite à partir de la concentration connue des billes de latex.

### **2.1.2 Extraction de l'ADN viral**

L'extraction de l'ADN viral a été effectuée selon la technique décrite par Sambrook et collaborateurs (1989). Les virions purifiés ont été digérés avec de la protéinase K (200 µg/ml) en présence de SDS 1% à 37°C durant 2 heures. Les protéines virales ainsi digérées ont d'abord été éliminées avec un volume égal de phénol (USB™), un volume de phénol-chloroforme (1:1) et un volume égal de chloroforme-isoamyl alcool (24 :1). L'ADN virale présent dans la phase aqueuse a été précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M, pH 5.2 (Fisher Scientifique) et 2,5 volumes d'éthanol 100 % froid pendant 1 heure à -20 °C. Après une centrifugation de 10 minutes à 12 000 x g, le culot d'ADN ainsi purifié a été lavé 2 fois avec de l'éthanol 70 % puis séché et dissout dans 100 µl d'eau stérile. La pureté, la qualité et la quantité ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose.

## 2.2 Amplification, clonage et séquençage du gène *enhancin* de ChfuGV

### 2.2.1 Amplification par PCR de l'*enhancin* de ChfuGV

L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant des amorces oligonucléotidiques dessinées à partir des séquences de gènes *enhancin* de TnGV (Hashimoto *et al.*, 1991), PsunGV (Roelvink *et al.*, 1995) et HearGV (Goto et Maeda, 1997). Ces amorces ont été choisies de façon à permettre l'amplification du gène *enhancin* de ChfuGV en 3 fragments qui se chevauchent (Figure 2). Les amorces sens *enh1F*, *enh2F*, *enh3F* et anti-sens *enh1R*, *enh2R*, *enh3R* ont été synthétisées dans le but d'amplifier le gène *enhancin* de ChfuGV des régions -24 à +2714 (Figure 2).

Pour toutes les réactions d'amplification, 100 ng d'ADN génomique du ChfuGV ont été utilisés dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant 5 µl de tampon 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4 et 500 mM KCl, Gibco BRL), 1.5 µl 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco-BRL), 1 µl 0.2 mM de dNTP (Gibco-BRL) et 2 µl des amorces sens *enh1F*, *enh2F* ou *enh3F* et 2 µl des amorces anti-sens *enh1R*, *enh2R* ou *enh3R* ajustées à 50 pmol/µl. Les témoins positifs et négatifs comprenaient 100 ng d'ADN génomique de TnGV et 30 ng d'ADN de sperme de hareng respectivement en plus des autres produits décrits précédemment.

Les paramètres expérimentaux au cours du cycle d'amplification ont été choisis comme suit: départ à chaud durant 7 minutes à 94°C, ajout d'une unité de *Taq* polymérase (Gibco-BRL) aux mélanges réactionnels, dénaturation de l'ADN matrice pendant 45 secondes à 94°C, appariement des amorces durant 45 secondes à 55°C et élongation de l'ADN par la *Taq* polymérase durant 45 secondes à 72°C. La dénaturation, l'appariement des amorces et l'élongation de l'ADN ont été effectués 45 fois. Une élongation supplémentaire de 10 minutes a été réalisée à 72°C à la fin des 45 cycles. L'appareil utilisé fut le Thermocycleur Perkin Elmer cetus 9600.

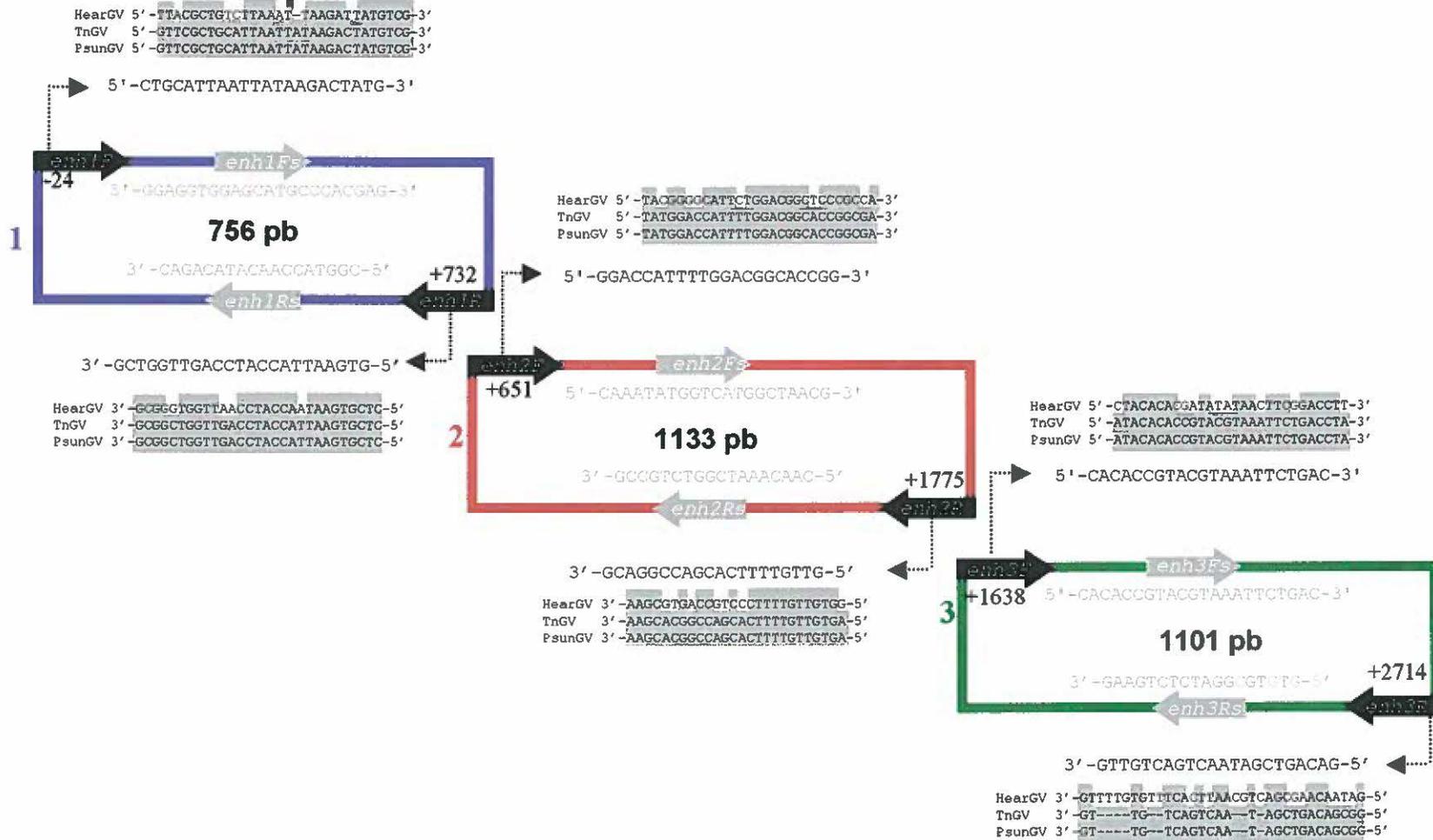
**Figure 2: Stratégies d'amplification et de séquençage du gène *enhancin* de ChfuGV**

Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification (flèches noires) ont été conçues à partir de la comparaison des séquences des gènes *enhancin* de TnGV, PsunGV et HearGV. Le gène *enhancin* de ChfuGV fut amplifié en 3 fragments qui se chevauchent.

Les amorces oligonucléotidiques pour le séquençage (flèches grises) ont été dessinées à partir de la séquence d'*enhancin* de ChfuGV obtenue lors des premiers séquençages.

# enhancin

2703 pb



Une deuxième amplification a été effectuée dans les mêmes conditions où l'ADN matrice utilisé provenait des mélanges réactionnels du 1<sup>er</sup> PCR. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose et purifiés à l'aide de la trousse "gene clean" (Bio/can Scientific) selon les directives du fabricant. Brièvement, à l'aide d'une lame de rasoir, les bandes correspondantes aux fragments 1 (~750 pb), 2 (~1130 pb) et 3 (~1100 pb) de l'*enhancer* de ChfuGV ont été excisées du gel d'agarose et mélangées avec une solution d'iodure de sodium (NaI) afin de dissoudre l'agarose. Une suspension de billes de silice a été ajoutée au mélange afin d'adsorber l'ADN. Une centrifugation de 10 minutes à 10 000 x g suivie de trois lavages successifs du culot ont été effectués avec 300 µl de la solution "New Wash" (NaCl/éthanol/eau) froid. Afin de séparer les billes de silice de l'ADN, une incubation du culot a été effectuée à 55°C, durant 3 minutes, avec 10 µl d'eau distillée stérile. Une centrifugation de 30 secondes à 10 000 x g a permis de récupérer le surnageant contenant l'ADN purifié. L'ADN fut quantifié par une lecture au spectrophotomètre à 260 nm.

### 2.2.2 Clonage des fragments 1, 2 et 3 de l'*enhancer* de ChfuGV

Le clonage des fragments 1, 2 et 3 de l'*enhancer* de ChfuGV a été effectué à l'aide de la trousse "TA cloning kit" (Invitrogen, Co, San Diego, Ca). Le vecteur pCR@2.1, fourni dans cette trousse, a la particularité de présenter à ces extrémités 3' des bases déoxythymidines (T) libres (Figure 3). Puisque la *Taq* polymérase ajoutée à l'extrémité 3' des fragments d'ADN amplifiés une déoxyadénosine (A) libre, l'appariement des bases complémentaires du vecteur et des produits de PCR permet un clonage rapide.

**Figure 3: Clonage des fragments 1, 2 et 3 du gène *enhancin* de ChfuGV dans le vecteur pCR®2.1**

La carte génomique du vecteur pCR®2.1 présente le promoteur *Plac*, la séquence du fragment *lacZα* et les gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine pour la sélection des bactéries recombinantes. Le vecteur pCR®2.1 présente un site de clonage multiple (SCM) comprenant plusieurs régions de restriction dont le site *EcoRI* utilisé lors des digestions enzymatiques. Pour le séquençage de l'insert, le vecteur possède des sites pour les amorces sens et anti-sens M13, un site pour l'amorce universelle et un site pour une amorce anti-sens sur le promoteur T7. L'origine *ColEI* permet la réplication et la production d'un nombre de copies élevées de plasmides dans la bactérie *E. coli*. Le vecteur possède aussi une origine de transcription (l'origine *f1*). L'orientation de la transcription est indiquée par les flèches. Le vecteur possède 3,9 Kb.

Amorce anti-sens M13

CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA  
GTC CTT TGT CGA TAC TGG TAC TAA TGC GGT TCG AAC CAT GGC TCG AGC CTA GGT GAT

HindIII KpnI SacI BamHI SpeI

BstXI EcoRI

EcoRI

GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG GAA TTC GGC TT [redacted] A GCC GAA TTC TGC  
CAT TGC CGG CGG TCA CAC GAC CTT AAG CCG A [redacted] TT CGG CTT AAG ACG

AvaI  
PaeR7I

EcoRV

BstXI

NotI

XhoI

NsiI

XbaI

ApaI

AGA TAT CCA TCA CAC TGG CGG CCG CTC GAG CAT GCA TCT AGA GGG CCC AAT TCG CCC  
TCT ATA GGT AGT GTG ACC GCC GGC GAG CTC GTA CGT AGA TCT CCC GGG TTA AGC GGG

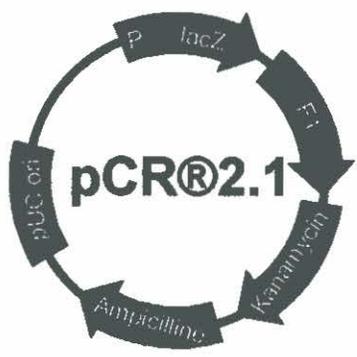
Promoteur T7

Amorce sens M13

Amorce sens M13

TAT AGT GAG TCG TAT TAC AAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA AAC  
ATA TCA CTC AGC ATA ATG TTA AGT GAC CGG CAG CAA AAT GTT GCA GCA CTG ACC CTT TTG

Amorce universelle



### 2.2.2.1 Ligation dans le vecteur pCR®2.1

Trois réactions de ligation ont été effectuées afin de permettre la liaison de chaque fragment de l'*enhancin* de ChfuGV au vecteur pCR®2.1. Pour chacune des réactions, 50 ng d'ADN purifié a été utilisé dans un volume réactionnel final de 10 µl comprenant 2 µl du vecteur PCR 2.1 (25 ng/µl), 1 µl (8U Weiss) de l'enzyme ADN ligase du phage T4 et 1 µl de tampon de ligation 10X (60 mM Tris-HCl pH 7.5; 60 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; 1 mg/ml de BSA (bovine serum albumine); 70 mM β-mercaptoéthanol; 1mM d'adénosine triphosphate (ATP); 20 mM DDT (dithiothréitol) et 10 mM de spermidine). Les mélanges réactionnels ont été incubés à 14°C durant 16 heures avant d'être entreposés à -20°C jusqu'à l'étape de la transformation bactérienne.

### 2.2.2.2 Transformation bactérienne

L'introduction du plasmide à l'intérieur des cellules compétentes *E. coli* invαF' a permis la production d'une grande quantité d'ADN. Un volume de 2 µl des produits de ligation a été ajouté à des tubes contenant 50 µl de cellules compétentes *E. coli* invαF (Invitrogen). L'entrée des plasmides dans les cellules compétentes a été réalisée en soumettant les cellules à un choc thermique: les tubes ont été incubés dans un bain de glace durant 30 minutes, transférés à 42°C durant 30 secondes et déposés dans un second bain de glace durant 2 minutes. Après l'ajout de 250 µl de milieu nutritif SOC (2 % p/p tryptone (Difco), 10 mM NaCl (produits chimiques américains, Montréal, Canada), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Sigma), 20 mM de glucose (Difco) pH 7.0), les tubes ont été incubés à 37°C sous agitation constante (125 rotations par minute) durant 1 heure. Cette étape avait pour but de régénérer les parois bactériennes endommagées lors du choc thermique. Des volumes de 50 µl et 200 µl des produits de transformation ont été étalés sur des plats de pétri contenant 20 ml de milieu nutritif 2xYT (1.6% p/v de tryptone (Difco), 1% d'extrait de levure (Difco), 0,5% p/v de NaCl pH 7,0, 1,5%

agar (Sigma)), 50 µg/ml de l'antibiotique kanamycine (Boehringer Mannheim, Allemagne) et 40 mg/ml du substrat chromogène bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, Diagnostic Chemicals Limited, USA). Les pétris ont été placés dans un incubateur à 37°C durant 18 heures.

### **2.2.2.3 Sélection des colonies recombinantes**

La sélection des colonies recombinantes s'est fait par  $\alpha$ -complémentation. Seules les colonies transformées ont pu croître sur les géloses contenant de la kanamycine puisque le vecteur pCR®2.1 possède un gène de résistance à cet antibiotique. De plus, le X-gal a permis une sélection phénotypique; les colonies recombinantes étaient blanches par rapport aux colonies non-recombinantes qui étaient bleues. En effet, l'insertion d'un fragment d'ADN dans le vecteur pCR®2.1 interfère avec la production de la β-galactosidase dans les bactéries contenant le vecteur et l'insert (colonies blanches). Par contre, les bactéries comprenant le vecteur seul peuvent produire la β-galactosidase et dégrader le X-gal en un produit bleu (colonies bleues).

### **2.2.2.4 Mini-préparation de l'ADN recombinant**

L'ADN des colonies blanches a été extrait par la technique "Boiling miniprep" décrite par Sambrook et collaborateurs (1989). Les colonies blanches recombinantes ont été repiquées dans 3 ml de milieu nutritif 2xYT (pH 7, 1.6% p/v de tryptone (Difco), 1% d'extrait de levure (Difco), 0,5% p/v de NaCl (Difco)) contenant 50 µg/ml de kanamycine (Boehringer Mannheim) et incubées 18 heures à 37°C sous agitation constante (250 r.p.m.). Les cultures bactériennes ont ensuite été centrifugées à 10 000 x g durant 2 minutes afin d'éliminer le milieu de culture. La lyse des cellules bactériennes a été effectuée en ajoutant aux tubes 0,3 ml de milieu STET (0.5% v/v de Triton X-100 (Sigma); 50 mM d'EDTA pH 8,0; 50 mM Tris-HCl pH 7,5), 20 µl de lysosyme (10 mg/ml dans 50 mM Tris-HCl pH 8,3; GibcoBRL) et 5 µl de ribonucléase A (1 mg/ml d'eau stérile; Boehringer Mannheim). Les tubes ont alors été incubés pour une période de 5 minutes à la température de la pièce avant d'être placés dans un bain-marie à

100°C durant 2 minutes. Après centrifugation à 10 000 x g durant 5 minutes, les débris cellulaires ont été enlevés à l'aide d'un cure-dent stérile. Afin de précipiter l'ADN plasmidique, une solution à -20°C de 0,3 ml d'isopropanol 75% et de 2,5 M d'acétate d'ammonium dans des proportions de 3:1 a été ajoutée aux surnageants. Une centrifugation à 10 000 x g durant 5 minutes a permis de récupérer l'ADN plasmidique dans le culot. Deux lavages successifs du culot ont été effectués avec 0,3 ml d'éthanol 70 % froid (-20°C). L'excès d'éthanol a été évaporé à l'aide de la ventilation sous une hotte chimique durant 20 minutes. Le culot a alors été dissout dans 50 µl d'eau distillée stérile.

#### **2.2.2.5 Digestion enzymatique des colonies recombinantes**

La présence des inserts a été confirmée par une digestion enzymatique avec l'endonucléase de restriction *EcoRI* (GibcoBRL). Pour chaque réaction de digestion, un volume de 2 µl d'ADN plasmidique a été ajouté à 1 µl de tampon de réaction 10X (0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M MgCl<sub>2</sub>; 1 M NaCl; GibcoBRL) et 0,5 µl (5 unités) d'enzyme *EcoRI* (GibcoBRL). Le volume du mélange réactionnel a été ajusté à 10 µl avec de l'eau distillée stérile et le tout a été incubé à 37°C durant 1 heure.

#### **2.2.2.6 Isolement de clones positifs en vue du séquençage**

L'ADN plasmidique des clones choisis a été isolé par une technique de lyse alcaline avec la trousse "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche) selon la méthode décrite par le manufacturier. Les colonies recombinantes ont été ensemencées dans 1.5 ml de milieu nutritif LB à un pH de 7 (1% tryptone (Difco), 0,5% d'extrait de levure (Difco) et 1% de NaCl (Difco)) comprenant 50 µg/ml de kanamycine (Boehringer Mannheim). Après une incubation à 37°C durant 18 heures sous agitation de 250 r.p.m., les cultures bactériennes ont été centrifugées à 12 000 x g durant 2 minutes. Les culots bactériens ont été resuspendus dans un volume de 250 µl d'une solution composée de

100 µg/ml de RNase A, 50 mM de Tris-HCl et 10 mM d'EDTA à un pH de 8.0. Les parois bactériennes ont été brisées en présence de 250 µl d'une solution de lyse (0,2 M de NaOH et 1% de SDS). Un volume de 350 µl d'une solution comprenant 4 M d'hydrochloride de guanidine et 0,5 M d'acétate de potassium à pH 4,2 a ensuite été ajouté au mélange réactionnel. Les tubes ont alors été mélangés par inversion et incubés sur glace pour 5 minutes avant d'être centrifugés à 13 000 x g durant 10 minutes. Les surnageants contenant l'ADN plasmidique ont été récupérés et transférés dans des tubes comprenant un filtre composé d'une résine de fibres de verre. Ces tubes ont été insérés dans des contenants collecteurs de polypropylène de 2 ml et centrifugés à 13 000 x g durant 40 secondes. La résine ayant fixé l'ADN a été lavée avec 700 µl d'une solution composée de 20 mM de NaCl, 80 % éthanol (v/v) et 2 mM de Tris-HCl à pH 7,5. Une centrifugation à 13 000 x g durant 40 secondes a permis d'éliminer le tampon de lavage. L'ADN purifié a été élué dans un tube eppendorf avec 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl et 1 mM d'EDTA, pH 8,5) par centrifugation à 13 000 x g durant 30 secondes. La qualité et la quantité de l'ADN ont été évaluées par électrophorèse en gel d'agarose.

### 2.2.3 Séquençage des plasmides recombinants

Le séquençage de l'ADN plasmidique a été réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique "ALF" (Automated Laser Fluorescent DNA sequencer; Pharmacia Biotech) selon la méthode de Sanger et collaborateurs (1977). Cette technique est basée sur l'ajout de didéoxynucléotides avec l'ADN polymérase du phage T7 (Pharmacia Biotech) pour la synthèse de la chaîne d'ADN. L'amorce universelle sens (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'), située en amont du site de restriction *EcoR1* du vecteur pCR®2.1, ainsi que l'amorce anti-sens M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGA-3'), située en aval, ont été utilisées pour le séquençage. Plusieurs amorces internes supplémentaires sens et anti-sens, dessinées à partir des séquences obtenues avec les amorces universelle et M13, ont également été utilisées afin de compléter la séquence du gène *enhancin* de ChfuGV (Figure 2).

L'analyse des séquences, la traduction en acides aminés ainsi que la comparaison de cette séquence avec les gènes *enhancin* déjà publiés ont été effectuées à l'aide du logiciel "Geneworks 2.4" (Intelligenetics Inc., Mountain View, CA,USA).

## 2.3 Amplification, clonage et séquençage du gène *egt* de ChfuGV

### 2.3.1 Amplification par PCR de l'*egt* de ChfuGV

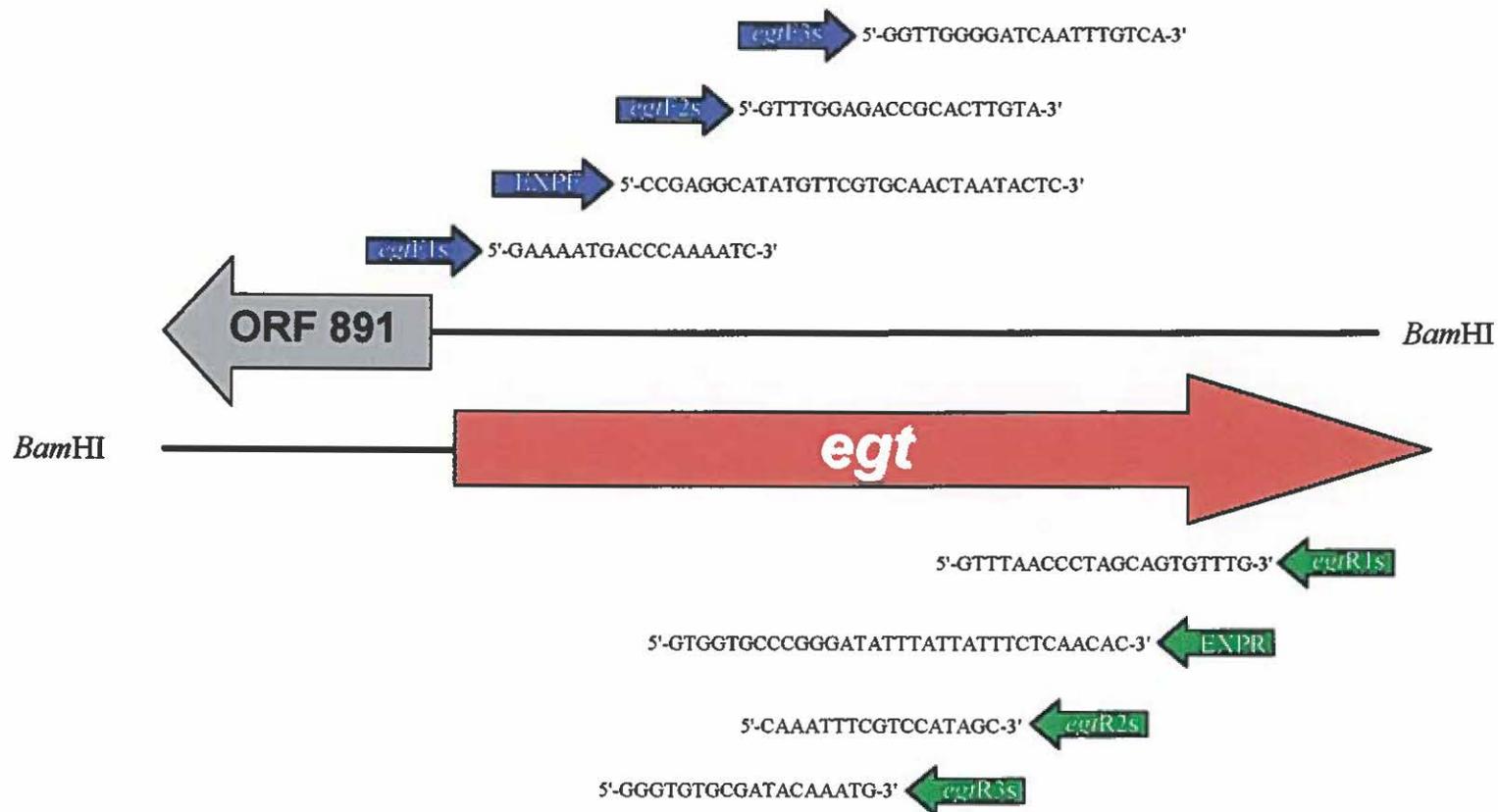
L'amplification par PCR du gène *egt* de ChfuGV a été effectuée grâce au séquençage préalable de l'ORF 891 situé en amont de l'*egt*. Bah et collaborateurs (1999) avaient proposé la présence, en sens inverse de l'ORF 891, du début d'un gène ayant des similarités avec l'*egt* de LaolGV. L'ORF 891 avait été séquençé à l'aide d'un clone provenant de la génothèque *Bam*H1 du ChfuGV. Lors de ce projet, une amorce sens, *egt*F1s, a été dessinée à partir de la séquence inverse et complémentaire du promoteur de l'ORF 891 (Figure 4). À chaque séquence obtenue, une nouvelle amorce était dessinée afin de continuer le séquençage du gène *egt* putatif à partir du clone. Les amorces sens *egt*F2s et *egt*F3s et anti-sens *egt*R1s, *egt*R2s et *egt*R3s ont été utilisées pour le séquençage du brin positif et négatif de l'*egt* putatif (Figure 4). Les séquences obtenues ont permis de dessiner les amorces EXPF et EXPR en vue de l'amplification par PCR du gène *egt* à partir du génome complet du ChfuGV (Figure 4). De plus, ces amorces comprennent les sites de restriction *Nde*I (EXPF) et *Sma*I (EXPR) en vue du clonage éventuel de l'*egt* de ChfuGV dans le vecteur d'expression, Impact™T7 (Biolabs® Inc., New England).

Le gène *egt* a été amplifié par PCR dans un volume final de réaction de 50 µl comprenant 13 ng d'ADN génomique de ChfuGV, 5 µl de tampon 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4 et 500 mM KCl, Gibco BRL), 1.5 µl 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco-BRL), 1 µl 0.2 mM dNTP (Gibco-BRL), 2 µl de l'amorce sens (EXPF) 50 pmol/µl et 2 µl de l'amorce anti-sens (EXPR) 50 pmol/µl. Le volume réactionnel a été complété à 50 µl avec de l'eau distillée stérile. Les témoins positifs et négatifs comprenaient les réactifs décrits précédemment à l'exception de l'ADN, qui a été remplacé par 3 ng d'ADN du

**Figure 4: Amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification et le séquençage de l'*egt* de ChfuGV**

Les amorces oligonucléotidiques sens et anti-sens utilisées pour l'amplification ou le séquençage de l'*egt* de ChfuGV sont représentées par des flèches bleues et vertes respectivement. La première amorce, à être synthétisée (*egtF1s*) fut dessinée à partir de la séquence du promoteur de l'ORF 891 du ChfuGV.

Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour le séquençage de l'*egt* à partir de la génothèque *BamH1* de ChfuGV sont identifiées *egtF1s*, *egtF2s*, *egtF3s*, *egtR1s*, *egtR2s* et *egtR3s*. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification de l'*egt* sont identifiées EXPF et EXPR.



clone provenant de la génothèque *Bam*H1 de ChfuGV (clone #606) ou 30 ng d'ADN de sperme de hareng, respectivement.

Les tubes ont été déposés dans le support du thermocycleur PerkinElmer cetus 9600 et un départ à chaud a été effectué à 94°C durant 7 minutes. Une unité de *Taq* polymérase a ensuite été ajoutée au mélange (Gibco-BRL). Les tubes ont alors été soumis à 35 cycles d'amplification. Chaque cycle était défini par une dénaturation de l'ADN génomique à 94°C durant 45 secondes, l'appariement des amorces à 57°C durant 45 secondes et l'élongation de l'ADN à 72°C durant 45 secondes. À la fin des 35 cycles, une élongation supplémentaire a été effectuée à 72°C durant 10 minutes. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose et purifiés avec la trousse "gene clean" (Bio/can Scientific) selon les recommandations du manufacturier.

### **2.3.2 Clonage de l'*egt* de ChfuGV dans le vecteur pCR®2.1**

Des techniques similaires à celles utilisées lors du clonage de l'*enhancin* ont été employées. Une ligation dans le vecteur de séquençage pCR®2.1 (voir section 2.2.2.1) et une transformation bactérienne (2.2.2.2) ont été effectuées avec les produits d'amplification. À la suite de la technique de transformation bactérienne, les plasmides recombinants ont été extraits des colonies recombinantes blanches.

#### **2.3.2.1 Extraction des plasmides recombinants**

Une extraction plasmidique ultra-rapide par lyse alcaline a été effectuée à l'aide de la technique décrite par Cormack et Somssich (1997). Les colonies blanches ont été repiquées dans 3 ml de milieu nutritif LB (1% tryptone (Difco), 0,5% d'extrait de levure (Difco) et 1% de NaCl (Difco) à un pH de 7) contenant 50 µg/ml de kanamycine (Boehringer Mannheim) et incubées à 37°C sous agitation à 250 r.p.m. durant 18 heures. Un volume de 0,2 ml des suspensions bactériennes a été transféré dans des

tubes contenant 0,2 ml d'une solution de lyse constituée de 1% de SDS (GibcoBRL) et 0,2 N de NaOH (Fisher Scientifique). Afin de précipiter l'ADN plasmidique, 0,2 ml d'une solution d'acétate de potassium (Fisher Scientifique) 3 M à pH 5,5 a été ajoutée au mélange réactionnel. Les tubes ont alors été mélangés par inversion et une centrifugation à 14 000 x g a été effectuée durant 2 minutes dans le but d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants contenant l'ADN plasmidique ont alors été mélangés avec un volume de 0,5 ml d'isopropanol 100 % avant d'être centrifugés à 14 000 x g durant 1 minute. Les culots comprenant l'ADN plasmidique ont été dissous dans 50 µl d'une solution TE (10 mM de Tris-HCl à pH de 8,0 (GibcoBRL), 1 mM d'EDTA (Mallinckrodt) et 10 µg/ml de ribonucléase pancréatique A (Boehringer Mannheim)). Les tubes ont été conservés à 4°C jusqu'à la digestion enzymatique.

### **2.3.2.2 Digestions enzymatiques des colonies recombinantes**

Une digestion enzymatique avec les enzymes de restriction *NdeI* et *SmaI* a été effectuée sur les plasmides recombinants dans le but de vérifier la présence des inserts. Un volume de 2 µl d'ADN plasmidique a été ajouté à 1 µl de tampon 10X (100 mM Tris-acétate, pH 7,5, 100 mM d'acétate de magnésium et 500 mM d'acétate de potassium (Pharmacia), 0,5 µl (5 unités) d'enzyme de restriction *NdeI*, 0,5 µl (5 unités) d'enzyme de restriction *SmaI* (4 unités) et 4 µl d'eau distillée stérile. Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C durant 1 heure.

### **2.3.3 Purification des colonies positives et séquençage**

Deux clones provenant de réactions d'amplification différentes ont été choisis pour le séquençage. L'ADN plasmidique a alors été purifié par une technique de lyse alcaline avec la trousse "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche) selon la méthode décrite à la section 2.2.2.6. La composition en nucléotides de l'ADN plasmidique a été révélée à l'aide d'un séquenceur automatique "ABI PRISM 310 Genetic Analyser

(Perkin Elmer)" selon la méthode de Sanger et collaborateurs (1977). Cette technique est basée sur l'ajout de didéoxynucléotides avec la Taq polymérase pour la synthèse de la chaîne d'ADN. Les amorces anti-sens M13 et universelle du vecteur pCR®2.1 ainsi que les amorces internes sens *egtF2s*, *egtF3s* et anti-sens *egtR1s*, *egtR2s* ont été utilisées pour le séquençage du gène *egt* de ChfuGV. Ces amorces sont les mêmes que celles utilisées lors du séquençage de l'*egt* à partir de la génothèque *Bam*HI de ChfuGV (voir section 2.3.1).

## **CHAPITRE 3: Résultats**

### 3.1 Production virale et extraction de l'ADN

La production du virus *in vivo* a permis d'obtenir des concentrations de  $10^{11}$  granules/ml. Un volume de 300  $\mu$ l de cette suspension purifiée a généré des concentrations d'ADN génomique viral variant entre 100 et 300 ng/ $\mu$ l.

### 3.2 Caractérisation moléculaire du gène *enhancin*

**Amplification par PCR:** Les paires d'amorces *enh1F* et *enh1R*, *enh2F* et *enh2R* ainsi que *enh3F* et *enh3R* ont permis l'amplification des fragments 1 (756 pb), 2 (1133 pb) et 3 (1101 pb) couvrant l'ensemble du gène *enhancin* de ChfuGV (Figure 5). L'utilisation des mêmes paires d'amorces a permis d'amplifier des fragments similaires en utilisant comme ADN matrice le génome de TnGV. Les conditions de PCR excessive utilisées sont possiblement reliées au nombre restreint de virus ChfuGV possédant le gène *enhancin*. En fait, il est possible que 2 ou plusieurs souches de virus ChfuGV soient présentes dans la préparation virale.

**Clonage et séquençage:** Trois clones recombinants correspondant aux fragments de 756 pb, 1133 pb et 1101 pb ont été séquencés afin de couvrir complètement le gène *enhancin* de ChfuGV (Figures 6 et 7). La séquence nucléotidiques du gène *enhancin* de ChfuGV comprend un cadre de lecture de 2703 bases codant pour une protéine de 901 acides aminés et d'un poids moléculaire prédit d'environ 100 kDa (Figure 7). Ces données correspondent à la longueur et au poids de l'*enhancin* de TnGV (Hashimoto *et al.*, 1991). Un pourcentage de 47 % de GC est observé dans la séquence en nucléotides. La protéine *enhancin* de ChfuGV est relativement abondante en résidus non polaires tels des leucines (9,41 %) et des valines (8,42 %), et en résidus polaires non chargés tels des asparagines (7,86 %) et des thréonines (6,20 %). Ces données sont similaires à celles publiées par Hashimoto et collaborateurs (1991) au sujet de l'*enhancin* de TnGV.

**Comparaison des séquences des gènes *enhancin* et de leurs protéines déduites chez les baculovirus:** Les séquences déduites en acides aminés à partir des séquences nucléotidiques des gènes *enhancin* des granulovirus varient entre 898 et 901 acides aminés. La séquence correspondante chez le nucléopolyhédrovirus de *L. dispar* est de 782 acides aminés (Tableau 1). Les études comparatives des séquences en acides nucléiques et en acides aminés des *enhancin* de ChfuGV, TnGV, PsunGV, HearGV et XnGV ont montré des pourcentages d'homologies variant entre 77% et 99%. Ce sont les séquences des gènes *enhancin* de ChfuGV, TnGV et PsunGV qui ont montré les plus grandes similarités (98 % à 99 %). Les *enhancin* de HearGV et de XnGV forment un groupe dont l'homologie est de 79 % en acides aminés avec l'*enhancin* de ChfuGV. Les niveaux d'identité chutent entre 14 et 22 % lorsque les séquences des *enhancin* des granulovirus sont comparées avec celle du nucléopolyhédrovirus de *L. dispar* (Tableau 1).

À l'intérieur de la séquence prédite en acides aminés de l'*enhancin* de ChfuGV, plusieurs similarités sont retrouvées avec les *enhancin* des autres granulovirus. Un motif de liaison canonique du zinc de type HEXXH est conservé en position 244 et six sites potentiels de N-glycosylation (NXS/T) sont retrouvés en position 65-67, 306-308, 339-341, 540-542, 595-597 et 621-623 (Appendice A).

**Profil d'hydrophobicité de l'*enhancin* de ChfuGV:** Le profil d'hydrophobicité de l'*enhancin* de ChfuGV a permis de déterminer 40 régions distinctes (Figure 8). À l'exception des régions 7, 8, 13, 18 et 30, les profils d'hydrophobicité sont conservés chez les *enhancin* des granulovirus. Cependant, l'*enhancin* de LdMNPV présente plusieurs différences (Figure 8).

**Arbre phylogénétique:** Un arbre phylogénétique a été généré en comparant les 6 séquences déduites en acides aminés à partir des séquences nucléotidiques des *enhancin* de ChfuGV, TnGV, PsunGV, HearGV, XnGV et LdMNPV. Cet arbre comprend trois branches, l'une regroupant les séquences des *enhancin* de ChfuGV, PsunGV et TnGV, l'autre, les *enhancin* de HearGV et de XnGV et la dernière

comprenant l'enhancin de LdMNPV (Figure 9). Ces données ont permis de suggérer le niveau de parenté entre les différents virus. Le ChfuGV, PsunGV et le TnGV sont apparemment plus rapprochés phylogénétiquement que le HearGV et le XnGV. De plus, les différences majeures retrouvées entre les séquences des enhancin des granulovirus et celle de LdMNPV suggèrent un éloignement phylogénétique plus important de ce dernier avec les granulovirus.

**Figure 5: Amplification par PCR des 3 fragments couvrant l'ensemble du gène *enhancin* de ChfuGV**

**A: Fragment 1**

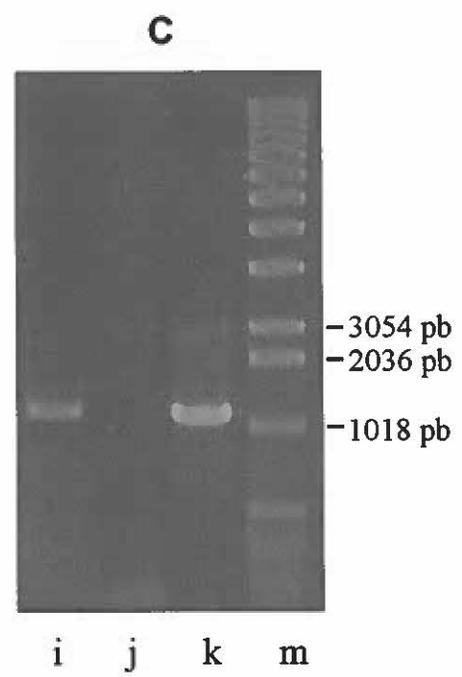
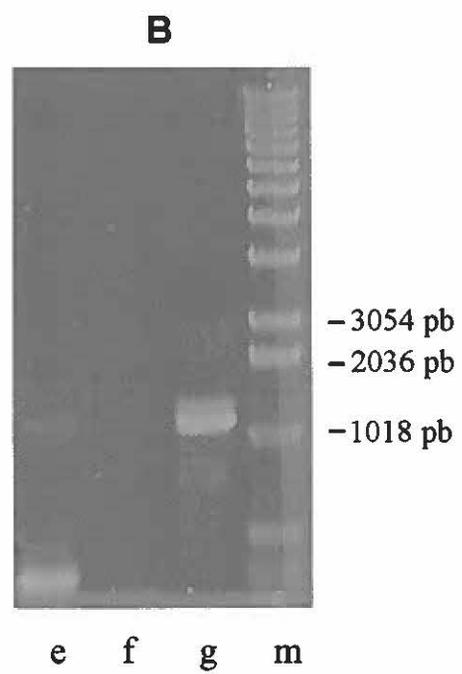
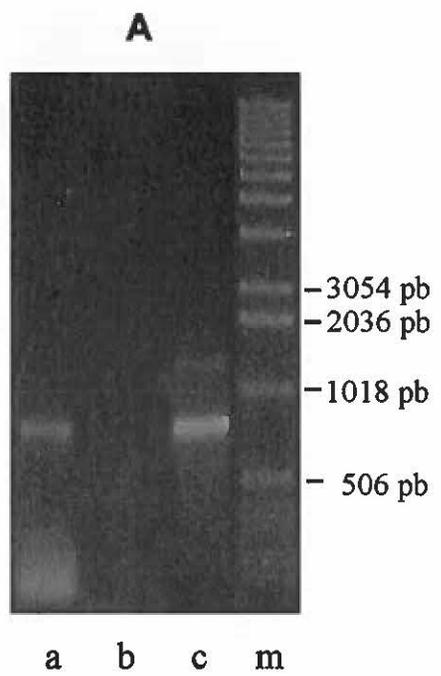
- a: amplification du fragment 1 de l'*enhancin* de ChfuGV (756 pb)
- b: témoin négatif
- c: amplification du fragment 1 de l'*enhancin* de TnGV; témoin positif
- m: marqueur de poids moléculaire 1 kb

**B: Fragment 2**

- e: amplification du fragment 2 de l'*enhancin* de ChfuGV (1133 pb)
- f: témoin négatif
- g: amplification du fragment 2 de l'*enhancin* de TnGV; témoin positif
- m: marqueur de poids moléculaire 1 kb

**C: Fragment 3**

- i: amplifications du fragment 3 de l'*enhancin* de ChfuGV (1101 pb)
- j: témoin négatif
- k: amplification du fragment 3 de l'*enhancin* de TnGV; témoin positif
- m: marqueur de poids moléculaire 1 kb



**Figure 6: Sélection de plasmides comprenant le fragment 1, 2 ou 3 du gène *enhancin* de ChfuGV**

**A: Fragment 1**

a: clone positif digéré par *EcoR1* libérant l'insert de 756 pb correspondant au fragment 1 de l'*enhancin* de ChfuGV

m: marqueur de poids moléculaire 1 kb

**B: Fragment 2**

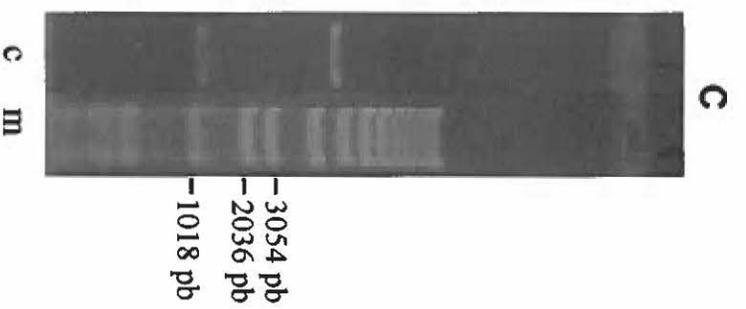
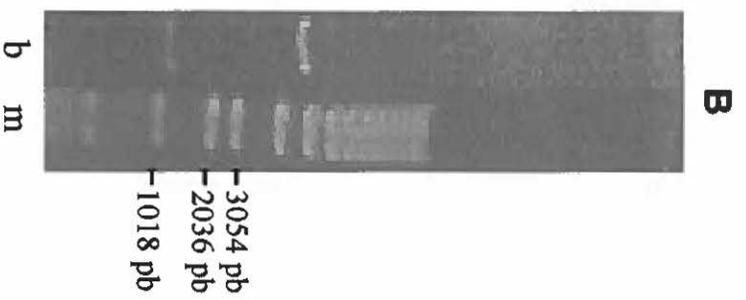
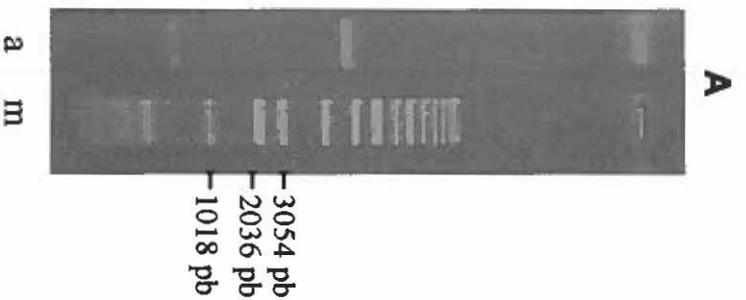
b: clone positif digéré par *EcoRI* libérant l'insert de 1133 pb correspondant au fragment 2 de l'*enhancin* de ChfuGV

m: marqueur de poids moléculaire 1 kb

**C: Fragment 3**

c: clone positif digéré par *EcoRI* libérant l'insert de 1101 pb correspondant au fragment 3 de l'*enhancin* de ChfuGV

m: marqueur de poids moléculaire 1 kb



**Figure 7: Séquence nucléotidique et en acides aminés déduits du gène codant pour la protéine enhancin du ChfuGV**

Rouge: Codons d'initiation (ATG) et de terminaison (TAA)

*Italique*: Régions 5' et 3' non-codantes

Bleu: Motif de liaison canonique du zinc

Orange: Cystéines conservées chez les enhancin de baculovirus

Vert: Sites possibles de N-glycosylation conservés chez les enhancin de baculovirus

GCAGCCGAATTCTGCATTAATTATAAGACTATG

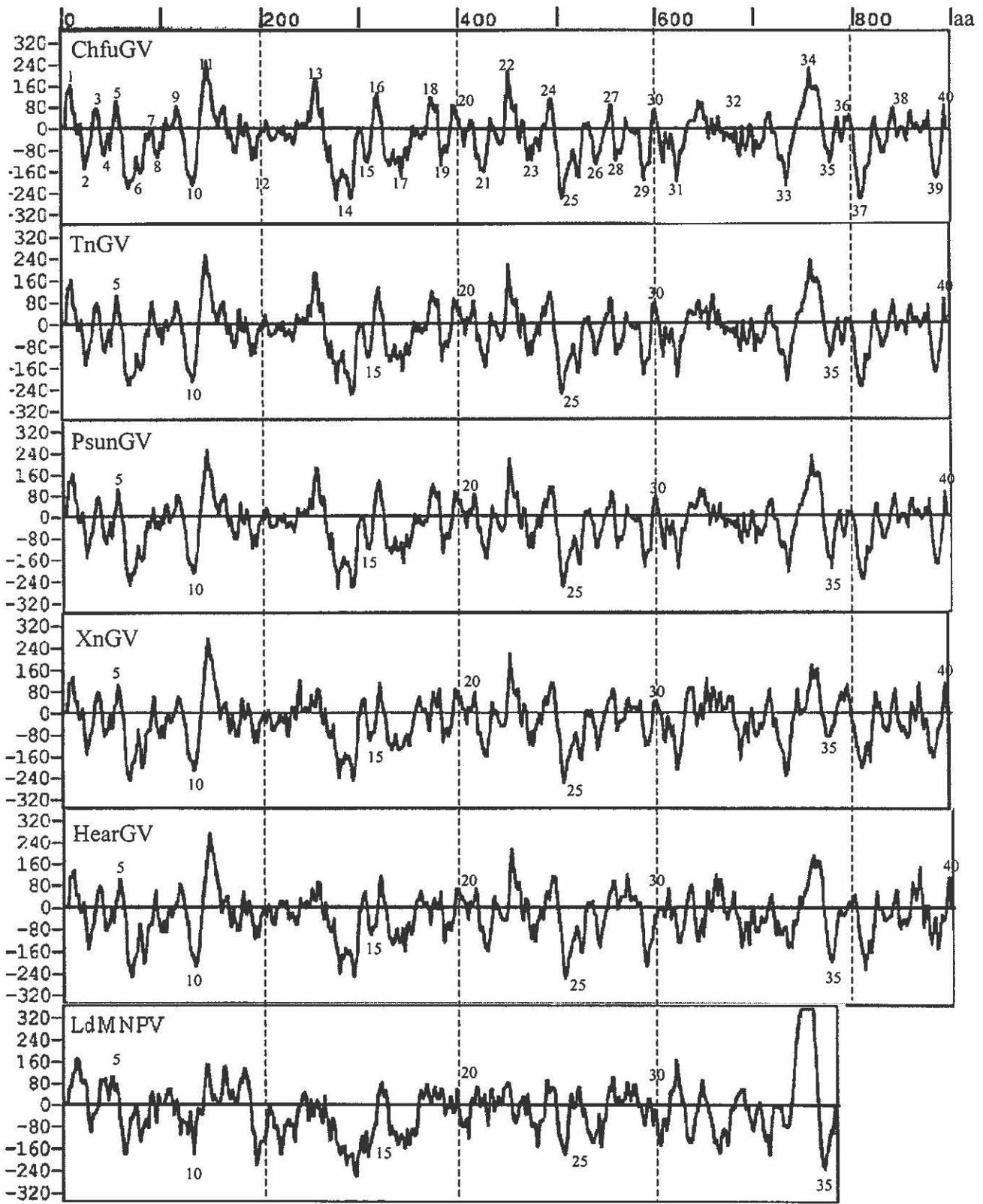
**ATG**TCGTACAAAGTGATTGTACCCGCTACCGTGCTACCGCCGTGGCTCAGAGTCGGTGAGAATTGGATAT 70  
 M S Y K V I V P A T V L P P W L R V G E N W I F 24  
 TCGCAAGACACAGACGCACCGAGGTGGGAGTCGTTCTACCGCGAACACGAAATTTTCGTGTACGAGCAGA 140  
 A R H R R T E V G V V L P A N T K F R V R A D 47  
 TTTCTCTAGGGCGGGCTTCACCCGACCCGTAATAGTGCGCCTCTTGAACAACAACCGTAGCACTGAACGA 210  
 F S R A G F T R P V I V R L L N N N R S T E R 70  
 GAAATCAACTTGAACAACGACCAATGGATGGAGGTGGAGCATGCCACGAGAGTGTGCCGTTTGTTCGATT 280  
 E I N L N N D Q W M E V E H A H E S V P F V D W 94  
 GGCCGGTGGACGAAAGGAACACTATGGTCGAAGTGTATTTTGAATCGACGGACCACACATACCGCTACC 350  
 P V D E R N T M V E V Y F E I D G P H I P L P 117  
 CGTGTACGTGTTCAACACGAGACCCGTCGAACACTTTAAGAGCGAGTATCGCCAAAGTTTCGTCTGGCTAC 420  
 V Y V F N T R P V E H F K S E Y R Q S S S G Y 140  
 TGCTTTCTATATTTGGACCTGGTCTGTATGTTGGTACCGCCCGCTAGCAAAAACGCTTTATTGGACGTGA 490  
C F L Y L D L V C M L V P P A S K N A L L D V N 164  
 ACATTTTCGAGCTTCATCAATTTTATAACGAAATCATTAACTATGATGACCTGTGCCGCTTGGTCGA 560  
 I F E L H Q F Y N E I I N Y Y D D L C G L V E 187  
 GGATCCATACGCAGACACTGTTCGATTTCGAATTTACCCAACAAGGCTGCTTTTCGTGAAAGCTGATGCTGGC 630  
 D P Y A D T V D S N L P N K A A F V K A D A G 210  
 GGTCCGGGTGGTGCATATATGGACCATTTTGGACGGCACCGGCGAGCTCAAACCTTGGTGATTACCTCA 700  
 G P G G A Y Y G P F W T A P A S S N L G D Y L R 234  
 GAATATCGCCGACCAACTGGATGGTAATTCACGAGCTGGGTTCATGCATACGATTTTGTGTTTACCGTCAA 770  
 I S P T N W M V I **H E L G H** A Y D F V F T V N 257  
 CACTATACTCATTGAAATTTGGAACAACCTTTTATGCGATCGCATCCAATACAAGTGGATGAACAAAACC 840  
 T I L I E I W N N S L C D R I Q Y K W M N K T 280  
 AAAAGACAACAACCTGGCTCGCGTCTATGAAAATAGACGACCGCAGAAAGAGGGCGACCATTACGGCGCTGA 910  
 K R Q Q L A R V Y E N R R P Q K E A T I Q A L I 304  
 TCGACAATAACAGCCCGTTCGATAATTGGGGCTTTTTTGGAGAGGCTGATAATATTCACGTGGCTGTACAA 980  
 D N N S P F D N W G F F E R L I I F T W L Y N 327  
 CCCGCAAAGAGGACTAGACACATTGCGTAACATCAACCATTTCGTACAGGGTGCACGCCACCCGCAACTCT 1050  
 P Q R G L D T L R N I N H S Y R V H A T R N S 350  
 TCTATACCGTACCCGCAAATATGGTCATGGCTAACGACTTCTGCTTACGACAACTTTTGGTTATATTTTA 1120  
 S I P Y P Q I W S W L T T S A Y D N F W L Y F N 374  
 ATTTGGTAGGCGTGTACCCGGCAGACTTTTACGTAAACGAACACAACAAAGTTGTTTCATTTCAATCTACA 1190  
 L V G V Y P A D F Y V N E H N K V V H F N L H 397  
 CTTAAGAGCTCTGGCGTTGGGGCAGAGTGCAGCTTATCCCATTAATATATAATTACAGACTTTGATCTG 1260  
 L R A L A L G Q S A R Y P I K Y I I T D F D L 420  
 TGGAGCAAAAACCTACGACATTAACAGTATTAGAGAGTAATTTTCGATCTGGTTATACCAGAAGAATTGC 1330  
 W S K N Y D I K Q Y L E S N F D L V I P E E L R 444  
 GGCAGACCGATTTGTTGGCAGACGTGAGGGTGGTTTGTGTGATTGACGATCCGTCGCAGATTGTGGGCGA 1400  
 Q T D L L A D V R V V C V I D D P S Q I V G E 467

ACCGTTTAGCGTGTACGACGGTAACGAGCGAGTGTTCGAGAGTACGGTGGCCACGGACAGAAACATGTAT	1470
P F S V Y D G N E R V F E S T V A T D R N M Y	490
CTGGTGGGCGTGGGTCCGGGAGTGTACACGTTGCGTGGCCACGGCGAAAAACAAACGCTACAAACTCC	1540
L V G V G P G V Y T L R A P R G K N K R Y K L H	514
ATTTGGCACATTCGCCCAGAGAGCCCGTTCATCCGGCCAACGACCACATGTATCTGCTCGTGACGTATCC	1610
L A H S P R E P V H P A N D H M Y L L V T Y P	537
CTACTACAATCAAACGTTGACATACACACCGAACGTAATTTCTGACCTAGCCGTCGACATGGCTCATTG	1680
Y Y <u>N Q T</u> L T Y T P N V N S D L A V D M A H L	560
TTCGGCAGCAACGATCGTAGGTATGTAGCCACGATATATTTCAATCCATTCGAACAAACAGTCACCGTAC	1750
F G S N D R R Y V A T I Y F N P F E Q T V T V H	584
ATCTAAACAATATTCGTGCCGGTTCGTGAAAACAACACTACCCTGTACTTTGAAATGGTAATTAGCAACCC	1820
L N N I R A G R E N <u>N T T</u> L Y F E M V I S N P	607
GTTCAACGGGCAGAGCCAAACTTTCACTATACTCGAAGACAATCCCACTTTACGACAAGGCTACTACAA	1890
F N G Q S Q T F T I L E D <u>N P T</u> L R Q G Y Y K	630
TTTGACGGGTACAGTACAGCTCCATAAGGCTGAATATGAGCGTCGCGGGTTCGGCTATTATTTGGCGATA	1960
F D A V T Y S S I R L N M S V A G R L L F G D T	654
CATTTTTGCCGGAGGGTACCACCACGCTGACCATGTTCCCAAATCAAGTACTTGAGCCCAATTTGTTTCC	2030
F L P E G T T T L T M F P N Q V L E P N L F P	677
AGACGGTCCGCCTTGAATAGGACATTGGCAGACTAAGAGAACAGGCCGCCTTCCCTAGATAATTATTCA	2100
D G S A L N R T L A R L R E Q A A F L D N Y S	700
CAACTTATGTATATTGAAAACGAGTTGCGCGACAGCATTTATTTGGCCTCCCAGTTGGTAGATCCTGCGT	2170
Q L M Y I E N E L R D S I Y L A S Q L V D P A S	724
CAGACGAATTTGTAAAGTATTATCCAGACTACTTCAGAGATCCGCACACGTACGTGTACCTGTTTCGTTT	2240
D E F V K Y Y P D Y F R D P H T Y V Y L F R F	747
CAGAGGTCTGGGTGATTTTCGTGTTATTAGACTTGCAGATTGTACCATTGCTAAATTTGGCCACTGTACGT	2310
R G L G D F V L L D L Q I V P L L N L A T V R	770
ATAGCCAACATCCAAAACGGTCCCCTACTCGTACTTCGATACTTTGTATTTTAAAGTGGGGTTGCGCGACA	2380
I A N I Q N G P H S Y F D T L Y F K V G L R D T	794
CAAACGGTTCGATTGTGTTTTTCGTGTTTCGCGCCGTGGCAACGAGCCGACACCCGAACACCATAAATT	2450
N G A I V F S C S R R G N E P T T P E H H K F	817
TGAAGTGTACAGTGGTTACACCGTAGAATTGTTTCATGCGGGAACCCGGTAATCGATTACAATTGATTGTG	2520
E V Y S G Y T V E L F M R E P G N R L Q L I V	840
AACAAAATGCTTGACACAGCGTTGCCGTCTACTCAAAACATTTTCGCTCGCATCACCGCACTCAATTAG	2590
N K M L D T A L P S T Q N I F A R I T D T Q L V	864
TGGTGGGGGATACGAGCATTGAAGATAACCTTGTAAACGAGTATTAATGTAGATTGTGGCGACGACGACAA	2660
V G D T S I E D N L V T S I N V D <u>C</u> G D D D N	887
CCAAAAGATAAGAGTTGTGAAACGTTAAAAATGATAGCGTTC <u>TAA</u> TAAACGTTCAACAGTCAGTTATCGA	2730
Q K I R V V E T L K M I A F	901
CTGTCTAGAGGCTGC	2745

**Figure 8: Profils d'hydrophobicité des séquences en acides aminés des gènes *enhancin* des baculovirus selon Kyte et Doolittle**

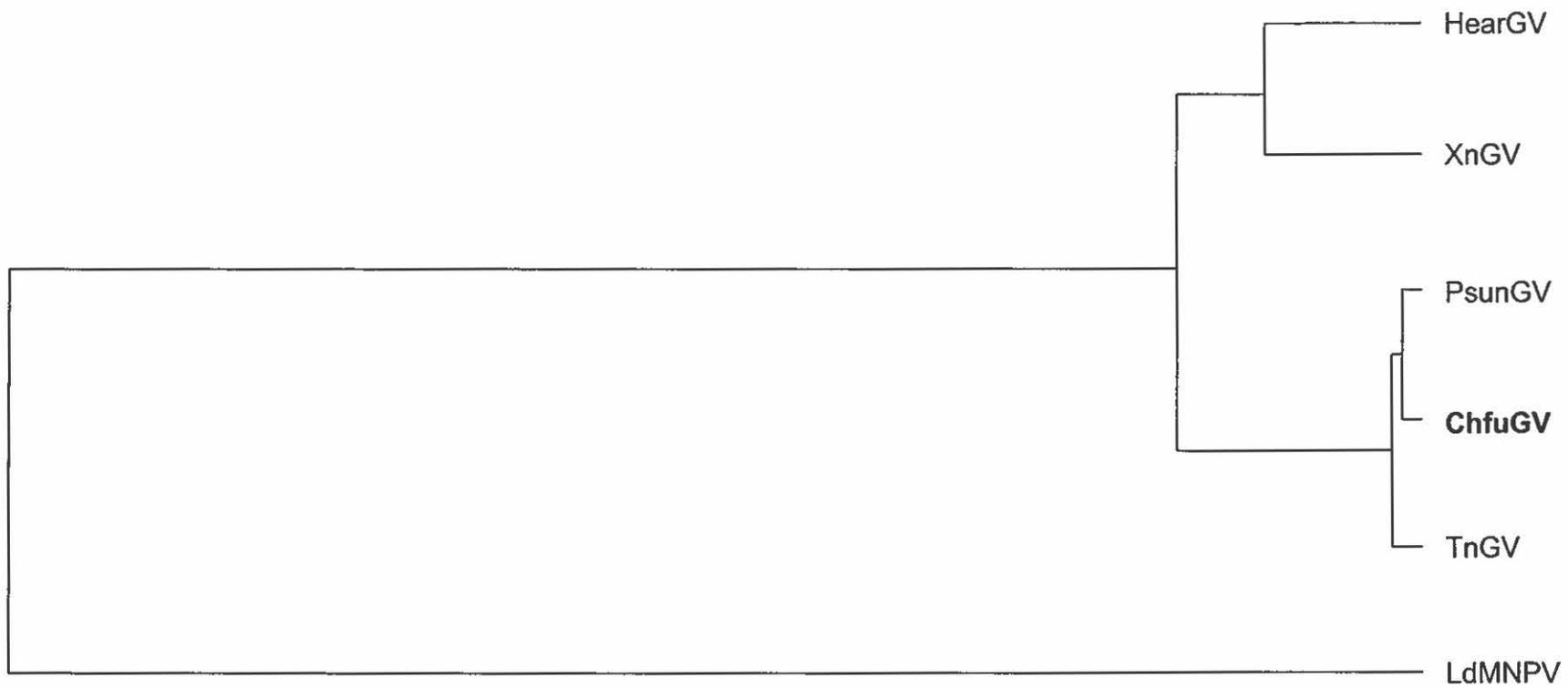
Les valeurs indiquées en abscisse représentent la position des acides aminés dans les différentes séquences des *enhancin* de ChfuvGV, TnGV, PsunGV, HearGV, XnGV<sup>1</sup> et LdMNPV.

<sup>1</sup>: ORF 154



**Figure 9: Arbre phylogénique généré à partir des séquences déduites en acides aminés des enhancin des baculovirus**

La longueur des lignes horizontales reliant une séquence à une autre indique la distance génétique estimée entre ces deux séquences (Neim, 1987).



**Tableau 1: Comparaison des séquences en nucléotides (nt) et déduites en acides aminés (aa) des gènes *enhancin* des baculovirus**

	<i>ChfuGV</i>	<i>PsunGV</i>	<i>TnGV</i>	<i>HearGV</i>	<i>XnGV</i> <sup>1</sup>	<i>LdMNPV</i>				
Nombre d'aa	901	901	901	902	898	782				
% nt <sup>1</sup> V/S % aa <sup>1</sup>	% nt	% aa	% nt	% aa	% nt	% aa	% nt	% aa	% nt	% aa
<b>ChfuGV</b>	99	98	99	98	77	79	78	79	*	22
<b>PsunGV</b>			99	98	72	77	78	77	*	22
<b>TnGV</b>					77	76	78	79	*	22
<b>HearGV</b>							84	87	*	25
<b>XnGV</b>									*	14
<b>LdMNPV</b>										

<sup>1</sup>: ORF 154 de XnGV

\*Les séquences nucléotidiques des *enhancin* de GV étaient trop différentes de la séquence d'*enhancin* de LdMNPV pour qu'il soit possible de les comparer.

### 3.3. Caractérisation moléculaire du gène *egt* du ChfuGV

**Amplification par PCR:** Les amorces EXPF et EXPR ont permis l'amplification d'un fragment de 1344 pb à partir de l'ADN génomique du ChfuGV correspondant à la longueur attendue du gène *egt* de ChfuGV (Figure 10). L'amplification à partir d'un clone de la génothèque *Bam*H1 a permis d'amplifier un fragment de grandeur comparable au gène *egt* provenant de l'ADN génomique.

**Clonage et séquençage:** Le séquençage des clones positifs a permis de déterminer les caractéristiques de l'*egt* de ChfuGV qui possède un cadre de lecture de 1344 bases codant pour une protéine prédite de 448 acides aminés et d'un poids moléculaire prédit d'environ 50 kDa (Figures 11 et 12). Un pourcentage de 35 % de GC est observé au niveau de la séquence nucléotidique. Les acides aminés prédominants dans la séquence en acides aminés sont des valines à 11,38%, des leucines à 9,42%, des asparagines à 9,15%, des isoleucines à 8,26% et des lysines à 6,20%. La séquence du gène *egt* de ChfuGV possède 7 sites possibles de N-glycosylation (N-X-S/T). Le site possible de N-glycosylation en position 99 est conservé dans les séquences en nucléotides de tous les *egt* de baculovirus. Un signal peptidique de 17 acides aminés est retrouvé au niveau de la région aminée de la séquence prédite en acides aminés de l'*egt* de ChfuGV.

**Comparaison des séquences des gènes *egt* chez les granulovirus:** La région promotrice du gène de l'*egt* de ChfuGV possède trois motifs de boîtes TATA aux positions - 38, - 72 et - 77 de la séquence nucléotidique (Figure 12). La majorité des séquences des gènes *egt* possèdent un motif de boîte TATA et/ou un motif CAGT associé aux promoteurs précoces des protéines des baculovirus (Tableau 2). Le nombre d'acides aminés déduits des séquences des gènes *egt* est de 448 pour le ChfuGV et de 460 pour le LaolGV. Pour ce qui est des NPV, le nombre d'acides aminés déduits des séquences des gènes *egt* varient entre 489 à 560 acides aminés (Tableau 3). La

comparaison des séquences prédites en acides aminés entre les gènes *egt* de ChfuGV et de LaolGV montre une homologie de 52% alors que les pourcentages d'homologie retrouvés avec les séquences des *egt* de NPV varient entre 30% et 36%. Les comparaisons effectuées entre les *egt* de NPV varient entre 35% et 99% (Tableau 3). L'alignement de toutes les séquences d'*egt* répertoriés permet de distinguer huit régions homologues où les similarités sont plus importantes (Appendice B, Tableau 4).

Un alignement des *egt* de baculovirus avec plusieurs UDP-glucuronosyltransférases de poisson (*Pleuronectes platessa*, Leaver, 1999) ou de mammifères (le rat, *Rattus rattus*, Lazard *et al.*, 1991, *Rattus norvegicus*, Coffman *et al.*, 1995; la souris, *Mus musculus*, Koiwai *et al.*, 1995; le lapin, *Oryctolagus cuniculus*, Tukey *et al.*, 1996; le bovin, *Bos taurus*, Yokota, 1997; le chat, *Felis catus*, Yokota, 1998; le mouton, *Ovis aries*, Kobayashi *et al.*, 1999; le macaque, *Macaca fascicularis*, Belanger *et al.*, 1999 et l'homme, *Homo sapiens*, Erps *et al.*, 1994 ) a permis de montrer des homologies au niveau des séquences en acides aminés. Trente-quatre acides aminés sont positionnés de façon identique dans 77 % des séquences étudiées des UDP-glycosyltransférases (EGT et UDP-glucuronosyltransférases) (Figure 13). Les régions V, VI, VII, VIII sont celles présentant le plus de similarités.

**Arbre phylogénique:** Un arbre phylogénétique a été généré après comparaison du gène *egt* du ChfuGV avec 15 gènes *egt* de baculovirus et 10 séquences d'UDP-glucuronosyltransférases de mammifères et de poisson (Figure 14). L'analyse de l'arbre phylogénique a permis de définir un lien entre les ecdystéroïdes UDP-glucosyltransférases (EGT) et les UDP-glucuronosyltransférases. Au niveau des *egt*, deux groupes sont présents soit, les *egt* de GV comprenant les séquences d'*egt* de LaolGV et de ChfuGV et les *egt* de NPV (Figure 14).

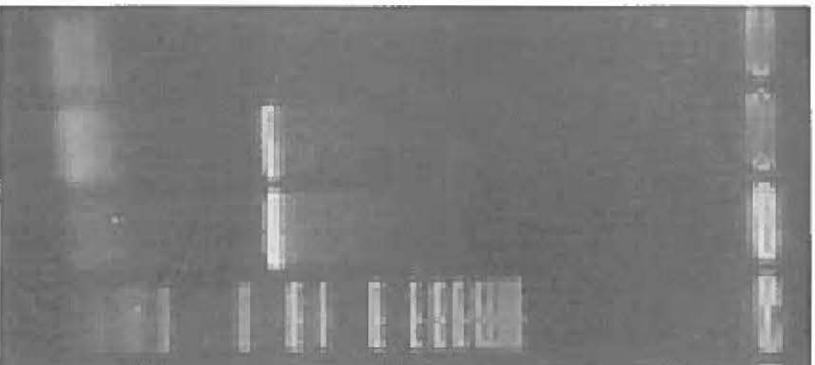
**Figure 10: Amplification par PCR du gène *egt* de ChfuGV**

a: témoin négatif

b: amplification du gène *egt* à partir de l'ADN génomique du ChfuGV

c: amplification du gène *egt* de ChfuGV à partir d'un clone provenant de la génothèque *Bam*HI de ChfuGV; témoin positif

m: marqueurs de poids moléculaire 1 Kb



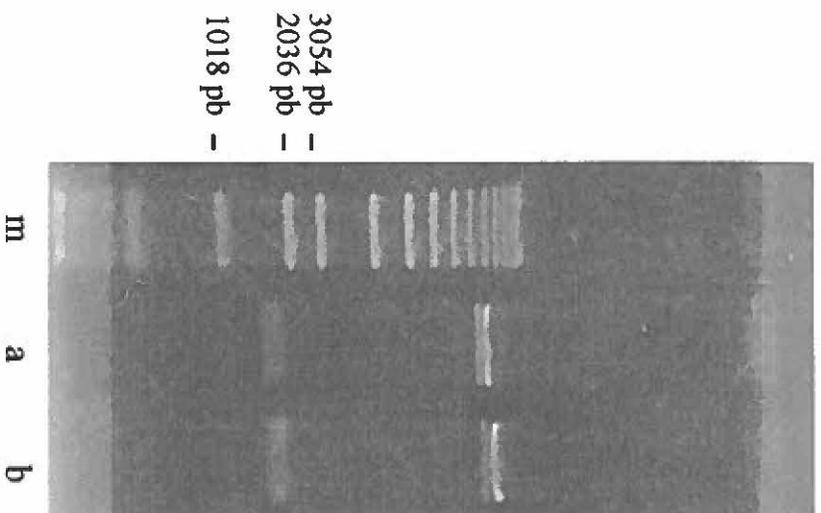
- 3054 pb  
- 2036 pb  
- 1018 pb

a b c m

**Figure 11: Plasmides recombinants comprenant le gène *egt* de ChfuGV**

m: marqueur de poids moléculaire 1 kb

a-b: clones positifs digérés avec l'enzyme de restriction *EcoR*I



**Figure 12: Séquences nucléotidique et en acides aminés déduite du gène codant pour la protéine EGT du ChfuGV**

Rouge: Codons d'initiation (ATG) et de terminaison (TAA)

*Italique*: Régions non-codantes 5' et 3'

Gras: Boîtes TATA

Ombragé: Signal peptidique

Orange: Cystéines conservées chez les protéines EGT

Vert: Sites possibles de N-glycosylation conservés chez les protéines EGT

La séquence du gène *egt* de ChfuGV a été déposée dans "Genbank nucleotide sequence database" sous le numéro d'accession AF058690.

Q I E K W L F Q T R L D I M < début de l'ORF 891  
 TTGAATCTCTTTTGACAAAAATTGTGTCTCAATCTATCATTTTGAAAATGACCCAAAAATCATCTGCGC 70  
 AACAAACATTTATATTATATTTCTGCATTTTAAACAGGTTAGTTGGCTATATAAACGTTGCGCTTAACTA 140  
 TCACCTCATTGCTTATCATGTTTCGTGCAACTAATACTCGTCGTCCTGGCGCGTGTGTTTGTGTTGTTTCGTC 210  
                   M F V Q L I L V V L A P C F V C S S 18  
 AAATATTTGTGTGTGTTTCCCACACCGGCGTTGAGTCATCAGTCTGTGTTTGCAGCGTACGTCGATAAG 280  
 N I L C V F P T P A L S H Q S V F A A Y V D K 41  
 TTAGTTATTGCTGGACACAACGTTACCGTGATCACACCTATGCCGCGTGGAGTTTACGATGTTACGGAAA 350  
 L V I A G H N V T V I T P M P R G V Q H V T E I 65  
 TAGATTGTCAACTAAAAAGTATTCGTGAATTTGGTGAAAAATTCGACATCATTGAAAAACGAGGTCCT 420  
 D C S T K N V F V N L V K N S T S L K K R G L 88  
 AGTAGCCGACGAATTGACAGTAACTGCTGAAAATTATACACCAATAATAGATATGGTGGTGGAGCAGATA 490  
 V A D E L T V T A E N Y T P I I D M V V E Q I 111  
 AAAAGTTACAATGTTACGAATTTGTTAAAAACAAGATAATAATTTTGGTTGTTATGTGAAGCAT 560  
 K S Y N V T N L L K N K D N N F D L V V C E A Y 135  
 ACCTTGATATAATTTTAAATATTTGGTCATTTGTATCGCACACCCATAATAAAATTTTCATCCGGCTATGG 630  
 L D I I L I F G H L Y R T P I I K F S S G Y G 158  
 TACCAACGAAAATTTTAAACAATGAACGCGGATGTGAAATACAATTCGGTGGTGTATCCCAACCTGTGG 700  
 T N E N F K T M N A D V K Y N S V V Y P N L W 181  
 CGGTCAAACCTTTTCAAATGAAAATATTGAACAAGCGCTGAATACCGAATGGCAAAGTTGAAACAATAC 770  
 R S N F S N E N I E Q A L N T E W Q K L K Q I Q 205  
 AGAATATTCGATTACAAAAATGTTTGGAGACCGCACTTCTACTATTTCTGTAATGCAGCAAAGTGTGAA 840  
 N I R L Q K L F G D R T S T I S V M Q Q S V K 228  
 ATTGTTATTTGTCAATGTACCCACGTTTGGACAGCGACAGACCTGTTGGCGAAAACGTGCAATATTTG 910  
 L L F V N V P H V F D S D R P V G E N V Q Y L 251  
 GGTGGTATTCATTTAAAAAACACGACCGGTGCGCGATATAAAATTAATAGAATTTTGAATCAAAAA 980  
 G G I H L K K P R P V R D I K L I E F L N Q K T 275  
 CGAATATAATTTATGTTAGCTTTGGATCTATTTGGACGCGCTGCTATGGACGAAAGTTTGTGACAGA 1050  
 N I I Y V S F G S I L D A A A M D E S L L T E 298  
 ATTTGTGAAAGTGTACTAAATTTAATGTGCTGTGGAAGATAGACAATGTTGTTAGTTCAAATTC AAT 1120  
 F V K V F T K F N V L W K I D N V V S S K F N 321  
 TTATCCGATAATTTTGAAGTAGAAATGGTTTCCCTCAAAGAGATATTTTAAATCATCCCAATGTAAAA 1190  
 L S D N I L T R N W F P Q R D I L N H P N V K L 345  
 TATTTATAACACAAGGAGGTGTTCAATCTGTGGACGAAGCTGTGATAGCGAAATACCGCTTATTTGTAT 1260  
 F I T Q G G V Q S V D E A V D S E I P L I C I 368  
 TCCAATGGTTGGGGATCAATTTGTCAATTGTCGTAGAATAGATCAATTAATATTTGGTGTGGTCGTAAT 1330  
 P M V G D Q F V N C R R I D Q L N I G V V V N 391  
 ATTTTAAAGTTAGAAAGCGAAAATTTGTATAAAAAAATTAACGACGTAATGAACGATACTACTATTGTGG 1400  
 I L K L E S E N L Y K K I N D V M N D T T I V D 415  
 ATAAAAATTCACGCTTTAAAGAAAAATATTCACGACGCACCTATGAAACCATTGCATAAAGCTTTGTGGTA 1470  
 K I H A L K K N I H D A P M K P L H K A L W Y 438  
 TACCCAAAAGTGTGAGAAATAATAAATATTGATTTATAAAATAGTGTTTTATTTAAATTTTGTGTTTGT 1540  
 T Q K V L R N N K Y 448  
 TTTTACGATACCTTAAACAATAGCGATTATTATTAGAGTCCCAATACAAACACTGCTAGGGTTAAACA 1610

**Tableau 2: Comparaison des promoteurs des différents gènes *egt* répertoriés.**

<b>Gènes <i>egt</i></b>	<b>Motifs de promoteurs précoces</b>	<b>Motifs de promoteurs tardifs</b>
ChfuGV	TATA (4 fois)	
LaolGV	TATA (2 fois)	GTAAG
EcobNPV	TATA, CAGT	
BusuNPV	TATA (4 fois)	
LdMNPV		GTAAG
MbMNPV	TATA	
EppoNPV	TATA (2 fois)	
CfMNPV(DEF)	TATA	
OpMNPV	TATA	
CfMNPV	CAGT	
BmNPV	TATA (2 fois), CAGT	
AcMNPV	TATA, CAGT	
HZNPV	CAGT, TATA	ATAAG
HearNPV	TATA (2 fois)	ATAAG



**Tableau 4: Comparaison des séquences en acides aminés du gène *egt* de ChfuGV avec les séquences en acides aminés des gènes *egt* des baculovirus**

Régions homologues		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Nombre de résidus par région		37	52	57	35	10	6	56	12
<b>GV</b>	<b>LaolGV</b>	76	54	54	63	60	67	64	67
<b>NPV</b>	<b>EcobNPV</b>	46	42	42	57	60	67	52	58
	<b>BusuNPV</b>	57	40	44	54	60	33	55	75
	<b>LdMNPV</b>	59	44	47	60	60	67	50	67
	<b>MbMNPV</b>	54	40	51	57	70	50	46	67
	<b>EppoNPV</b>	57	46	47	49	70	67	52	42
	<b>CfMNPV(DEF)</b>	64	40	47	54	60	67	52	42
	<b>OpMNPV</b>	59	44	40	49	60	67	46	42
	<b>CfMNPV</b>	57	40	46	54	70	67	46	42
	<b>BmNPV</b>	54	40	51	54	70	50	48	50
	<b>AcMNPV</b>	54	46	51	54	70	50	52	50
	<b>SpltNPV</b>	49	37	40	54	60	67	57	67
	<b>SpliNPV</b>	49	37	47	54	50	67	57	67
	<b>HzNPV</b>	51	31	49	60	50	67	54	58
<b>HearNPV</b>	51	31	49	60	50	67	54	58	

**Figure 13: Comparaison des régions V, VI, VII et VIII entre les EGT et certaines séquences d'UDP-glucuronosyltransférases**

Les séquences montrant une homologie d'au moins 77 % sont indiquées par des régions ombragées. Les flèches verticales représentent 35 acides aminés conservés à l'intérieur de 77% des séquences d'UDP-glycosyltransférases (UDP-glucuronosyltransférases et les EGT). Les tirets indiquent l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement. Les chiffres romains représentent quatre des 8 régions conservées chez les EGT.

		-----V-----				
ChfuGV	-----	-----EFL	NQ--KTNIY	VSGSILDAA	AMDESLLTEF	299
LaolGV	-----	-----SFM	EK--HHIVY	ASFGSGIDL	NMDANLIAEF	304
EcobNPV	QI-AP----	-LSSYVAWIL	NNS-TKGAVY	VSGSTIKVA	DMDYDFLQML	326
BusuNPV	TI-KP----	-MSNYVQNFL	DNS-TRGVY	VSGSSITSK	NMAPEFLSMI	317
LdMNPV	RA-EP----	-LSEAVARFL	DES-RRGVY	VSGSGLATE	DMDADMAAAL	369
MbMNPV	RP-DS----	-MYGMVREFL	DNA-TTGAIY	VSGSAISSE	DMEPEFIEML	335
EppoNPV	QP-QN----	-LQKTLERQL	NAS-VNGIVY	VSGSSIDTK	SIHDEFLQML	313
CfMNPV (DEF)	PP-QR----	-LDIELEKRL	NAS-VNGTVY	VSGSSIDTN	SIHAEFLEML	314
OpMNPV	LP-QR----	-LDAPLERRL	NES-VDGAVY	VSGSGIDTN	SIHAEFLOML	311
CfMNPV	PS-HK----	-LTAALERRL	NES-VDGAIY	VSGSSIDTN	SIHAEFIQML	313
BmNPV	APLTK----	-LSPVIDAKM	NKS-KSGAIY	VSGSSIDTK	SFANEFFYML	314
AcMNPV	APLTK----	-LSPVINAQM	NKS-KSGTIY	VSGSSIDTK	SFANEFLYML	314
SpltNPV	TTAYABE---	-IDDDLAEFL	ENS-TMGVY	VSGSSVRVS	DMSNMLDVF	321
SpliNPV	VTVADE---	-IDNDLAEFL	ENS-TMGVY	VSLGSSVRVS	DMSNMLNVF	324
HzSNPV	NDVDEQQ--T	-MDYNLMQFL	NNS-TNGVVY	VSGTTSIRVS	DMDDEFLFEF	320
HearNPV	NDINEQQ--T	-MDYNLMQFL	NNS-TNGVVY	VSGTTSIRVS	DMDDEFLFEF	320
M.musculus	INCVT--KK-	PLSQEFEAYV	NASGEHGIVV	FSLGSMVSEI	PEKKAM--EI	322
H.sapiens	INCAN--GK-	PLSQEFEAYI	NASGEHGIVV	FSLGSMVSEI	PEKKAM--AI	323
R.norvegicus	INCAG--KK-	ALSQEFEAYV	NASGEHGIVV	FSLGSMVSEI	PEKKAM--EI	324
F.catus	INCAG--KN-	PLSQEFEAYV	NASGEHGIVV	FSLGSMVSEI	PKEKAM--EI	322
B.taurus	SSCKK--QG-	VLSQEFEAYV	NASGEHGIVV	FSLGSMVSEI	PEQKAM--EI	318
O.aries	INCQKLIQK-	PLSEEFAYV	NASGEHGIVI	FSLGSMVSEI	PEQKAM--EI	321
O.cuniculus	LHCKP--AQ-	PLPKEMEEFV	QSSGEEGVV	FSLGSMISNL	TEERAN--VI	318
M.fascicularis	LHCKP--AK-	PLPKEMEEFV	QSSGDNVVV	FSLGSMVSNM	SEERAN--VI	324
R.rattus	LHCKP--AK-	PLPKEMEEFV	QTSGEHGVV	FSLGSMVKNL	TEEKAN--LI	322
P.platessa	INCAEKKNA	SLPADLEEFV	QSGDDGFI I	FTLGSMLPDM	PQEKAQ--HF	324



		---VI---	-----VII-----			
ChfuGV	VKVFTK---F	NVLWKIDNVV	S-SKFNLSDN	ILTRNWFPPQ	DI-----L	338
LaolGV	VRVFNSI-PY	AVLWKVDSSI	H-LKHNISSN	VHTQSWFPQR	DV-----L	345
EcobNPV	LRTFTKL-PY	NVVWKYD-GD	T-ENIHIPQN	VYLQTFWDQY	SL-----L	366
BusuNPV	IETFKL-PY	DIAWKFD-IV	P-EVNNLPEN	VLIQDWYDQY	SV-----L	357
LdMNPV	LDAFKMM-PY	DVLWKHD-GR	V-DGLTIPAN	VFVQKWFAQF	EV-----L	409
MbMNPV	LRVFEKL-PY	SILWKYD-GY	M-NRM--PAN	VFVQSWFEQY	NL-----L	373
EppoNPV	VNTFTGLNLR	TVLWKVDDAV	V-DSIKLPPN	VITQNWFNQR	AV-----L	355
CfMNPV (DEF)	LDTFAKLDNR	TVLWKVDDAV	A-KSVVLPAN	VIAQKWFNQR	AV-----L	356
OpMNPV	LDTFANLNNY	TVLWKVDDAV	A-ASVALPRN	VLAQKWFNSQT	AV-----L	353
CfMNPV	LESFVQLNNY	TVLWKVDDTV	P-ASVKLPSN	VVTQKWFDPQR	AV-----L	355
BmNPV	INTFKALDNY	TILWKIDDEV	V-KNITLPAN	VITQNWFNQR	AV-----L	356
AcMNPV	INTFKTLDNY	TILWKIDDEV	V-KNITLPAN	VITQNWFNQR	AV-----L	356
SpltNPV	IETFRSI-PY	RVLWKVDKSD	T-IIDNLPAN	VLIQRWFPQR	RV-----L	362
SpliNPV	VETFRSI-PY	RVLWKVDKSD	K-IFDNIPSN	VLIQRWFPQR	RV-----L	365
HzSNPV	ITAFKQL-PY	NILWKTD-GM	P-MEHLVLPKN	VLTQTWLPQH	HV-----L	360
HearNPV	ITAFKQL-PY	NILWKTD-GM	P-MEHLVLPKN	VLTQTWLPQH	HV-----L	360
M.musculus	AEALGRI-PQ	TVLWRYTGTR	P-SNLAKNTI	--LVKWLPQN	DL-----L	361
H.sapiens	ADALGKI-PQ	TVLWRYTGTR	P-SNLANNTI	--LVKWLPQN	DL-----L	362
R.norvegicus	AEALGRI-PQ	TVLWRYTGTR	P-SNLAKNTI	--LVKWLPQN	DL-----L	363
F.catus	ADALGKI-PQ	TVLWRYTGTP	P-PNLAKNTI	--LVKWLPQN	DL-----L	361
B.taurus	ADALGKI-PQ	TVLWRYTGTP	P-PNLAKNTK	--LVKWLPQN	DL-----L	357
O.aries	ADALGKI-PQ	TVLWRYTGTP	P-PNLAKNTK	--LVKWLPQN	DL-----L	360
O.cuniculus	ASTLAQL-PQ	KVLWKFDGKK	P-DNLGTNTQ	--LYKWIPQN	DL-----L	357
M.fascicularis	ASALAKI-PQ	KVLWRFNGNK	P-DTLGLNTQ	--LYKWLPQN	DL-----L	363
R.rattus	ASALAQI-PQ	KVLWRYKGGI	P-ATLGSNTR	--LFDWIPQN	DL-----L	361
P.platessa	LDAFRQI-PQ	RVVWRHAGDP	RCVEIRRSPT	QGFTQKROTD	EVATSERTPW	373



-----						
ChfuGV	NHPNVKLFIT	QGGVQSVDEA	VDSEIPLICI	PMVGDQFVNC	RRIDQLNIGV	388
LaolGV	NHPHIKVFIT	QGGVQSTDEA	VNSGVPMIGI	PIMGDQFYNV	RRYTELGIGE	395
EcobNPV	HHKNVKAFVT	QGGVQSIDEA	IDAGVPLIGL	PMMGDQSFNT	NKFVELEIGC	416
BusuNPV	HHVNVKVFVT	QGGVQSTDEA	IDALVPLVGV	PMMGDQFFHT	NKYAELSIGC	407
LdMNPV	QHKNVKAFVT	QAGVQSTDEA	VENLVPLVGV	PLMGDQAFNA	HRYVELGIGV	459
MbMNPV	HHKNVRAFVT	QGGVQSTDEA	VEAIVPMVGM	PMMGDQAYNM	NKIVELGLGK	423
EppoNPV	HHKNTVAFVT	QGGVQSTDEA	LHAQVPMVCL	PMMGDQFHHA	NKLQEFKVAR	405
CfMNPV (DEF)	NHRNVVAFVT	QGGVQSSDEA	LHARVPMVCL	PMMGDQFHHS	AKLEQFGVAR	406
OpMNPV	RHKNVVAFVT	QAGLQSSDEA	LQARVPMVCL	PMMGDQFHHA	RKLQQFGVAR	403
CfMNPV	HHKVVAFVVM	QAGLQSSDEA	LESRVPMVCL	PMMGDQFHHA	RKLQQFGVAR	405
BmNPV	RHKKMAAFIT	QGGVQSSDEA	LEAGIPMVCL	PMMGDQFYHA	HKLQQLGVAR	406
AcMNPV	RHKKMAAFIT	QGGVQSSDEA	LEAGIPMVCL	PMMGDQFYHA	HKLQQLGVAR	406
SpltNPV	KHRNVKVFIT	QGGVQSTDEA	IDAGVPMVGV	PIMGDQFYNV	NMYETHGIGR	412
SpliNPV	KHRNVKVFIT	QGGVQSTDEA	IDAGVPMVGV	PIMGDQFYNV	YMYETYGIGR	415
HzSNPV	KHSNVVAFVT	QGGVQSTDEA	IDACVPLIGI	PFMGDQAYNT	NKYEELGIGR	410
HearNPV	KHSNVVAFVT	PGGMQSTDEA	IDACVPLIGI	PFMGDQAYNT	NKYEELGIGR	410
M.musculus	GHPKTRAFIT	HSGSHGIYEG	ICNGVPMVMM	PLFGDQMDNA	KRMETRAGAV	411
H.sapiens	GHPMTRAFIT	HAGSHGVYES	ICNGVPMVMM	PLFGDQMDNA	KRMETKAGAV	412
R.norvegicus	GHPKARAFIT	HSGSHGIYEG	ICNGVPMVMM	PLFGDQMDNA	KRMETRAGAV	413
F.catus	GHPKARAFIT	HSGSHGIYEG	ICNGVPMVMM	PLFGDQMDNA	KRMETRAGAV	411
B.taurus	GHPKTRAFIT	HSGSHGIYEG	ICNGVPMVMM	PLFGDQMDNA	KRMETRAGAV	407
O.aries	GQPKTRAFIT	HSGSHGVYEG	ICNGVPMVMM	PLFGDQMDNA	ERMETRAGAI	410
O.cuniculus	GHTVSKAFIT	HGGANGVFEA	IYHGIPMVGL	PLFADQHDNL	AHMRAKGAAI	407
M.fascicularis	GHPKTRAFIT	HGGANGIYEA	IYHGIPMVGV	PLFADQPDNI	AHMKAKGAAV	413
R.rattus	GHPKTRAFIT	HGGTNGIYEA	IYHGIPMVGV	PMFADQPDNI	AHMKAKGAAV	411
P.platessa	SHPEARLFLT	HGGSHSVYEG	ICNAVPLLMF	PLFAEQGDNG	LRMVTRGAAE	423

↑   ↑↑   ↑   ↑   ↑↑   ↑   ↑↑

-----						
ChfuGV	VVNILKLESE	NLYKKINDVM	NDTT--IVDK	IHALKKNIHD	APMK--PLHK	434
LaolGV	KVNILRLEEE	GLDRKIKNLV	HNKS--YELN	IKRLNLFISD	TPVK--PLRK	441
EcobNPV	TLDTLTVTSD	QLVTAIVATV	ENPK--FRHN	LKNLRHTMRH	QPIT--ALNK	462
BusuNPV	AVDTLTVNSL	QLMRAIVDAA	TSAK--YRNG	LRHLRQIINH	QPMT--PLHK	453
LdMNPV	ALDATRLTAA	DLARAVEQVT	SDRA--YREN	LERLRRLLRH	QCAS--PTHK	505
MbMNPV	VVDTVRVNAE	QLIEAIVDVA	ESPK--YRKR	LRELRHMIHH	QPMT--PLQK	469
EppoNPV	TLNVDVVSAS	QLILAITDVI	VNKK-IYQTR	MAELRAVIDY	DEIA--PADK	452
CfMNPV (DEF)	ALNTVTVSAA	QLALAVGDVI	ADRL-AYQLR	MTNLLNVVAF	DEAT--PADK	453
OpMNPV	ALDTAAVSAP	QLQLAIREVI	ADGE-AYRAR	IDKLRAVVE-	HDAA--PDEK	449
CfMNPV	TLDTAVVSAA	QLTLAIGEVI	ADAE-AYRAR	IDDLRAVLE-	HDAA--PAEK	451
BmNPV	ALDVTVSSD	QLLLAINDVL	FNAP-TYKKH	MAELYALINN	DKATFPPLDK	455
AcMNPV	ALDVTVSSD	QLLVAINDVL	FNAP-TYKKH	MAELYALINH	DKATFPPLDK	455
SpltNPV	SVDTLTVDAR	LLIEIVMDVA	NNVKYK-TET	LS-LRDAIMD	QPMR--PLEK	458
SpliNPV	GVDTLTVDAR	QLTEIVMDVA	DNEKYK-NGT	LW-LRDAIMD	QPMR--PLEK	461
HzSNPV	NLDPVTLTSH	ILVSAVL DVT	VNNKSRYTDN	IKALNRSTNY	RTRK--PMEK	458
HearNPV	NLDPVTLTSH	ILVSAVL DVT	VNNKSRYTDN	IKALNRSTNY	RTRK--PMEK	458
M.musculus	TLNVLEMTAD	DLENALKTVI	NNKS--YKEN	IMRLSSLHKD	RPVE--PLDL	457
H.sapiens	TLNVLEMTSE	DLENALKAVI	NDKS--YKEN	IMRLSSLHKD	RPVE--PLDL	458
R.norvegicus	TLNVLEMTAD	DLENALKTVI	NNKS--YKEN	IMRLSSLHKD	RPVE--PLDL	459
F.catus	TLNVLEMTSE	DLANALKAVI	NDKS--YKEN	IMRLSSLHKD	RPVE--PLDL	457
B.taurus	TLNVLEMSSE	DLEKALKAVI	NEKT--YKEN	IMRLSRLHKD	RPVE--PLDL	453
O.aries	TLNVLEMSSG	DLENALKAVI	NEKS--YKEN	IMRLSRLHKD	RPVE--PLDL	456
O.cuniculus	RLDWTMSSS	DFLNALKTVI	NDPS--YKEK	AMTLSRIHHD	QPMK--PLDQ	453
M.fascicularis	RLDFDTMSSS	DLLNALKTVI	NDPI--YKEN	AMKLSRIHHD	QPVK--PLDR	459
R.rattus	EVNMNTMTSA	DLLSAVRAVI	NEPF--YKEN	AMRLSRIHHD	QPVK--PLDR	457
P.platessa	TLNIYDVTSD	TLLAALNKIL	KNKS--YKEK	ITEMSQIHHD	RPVA--PLDL	469

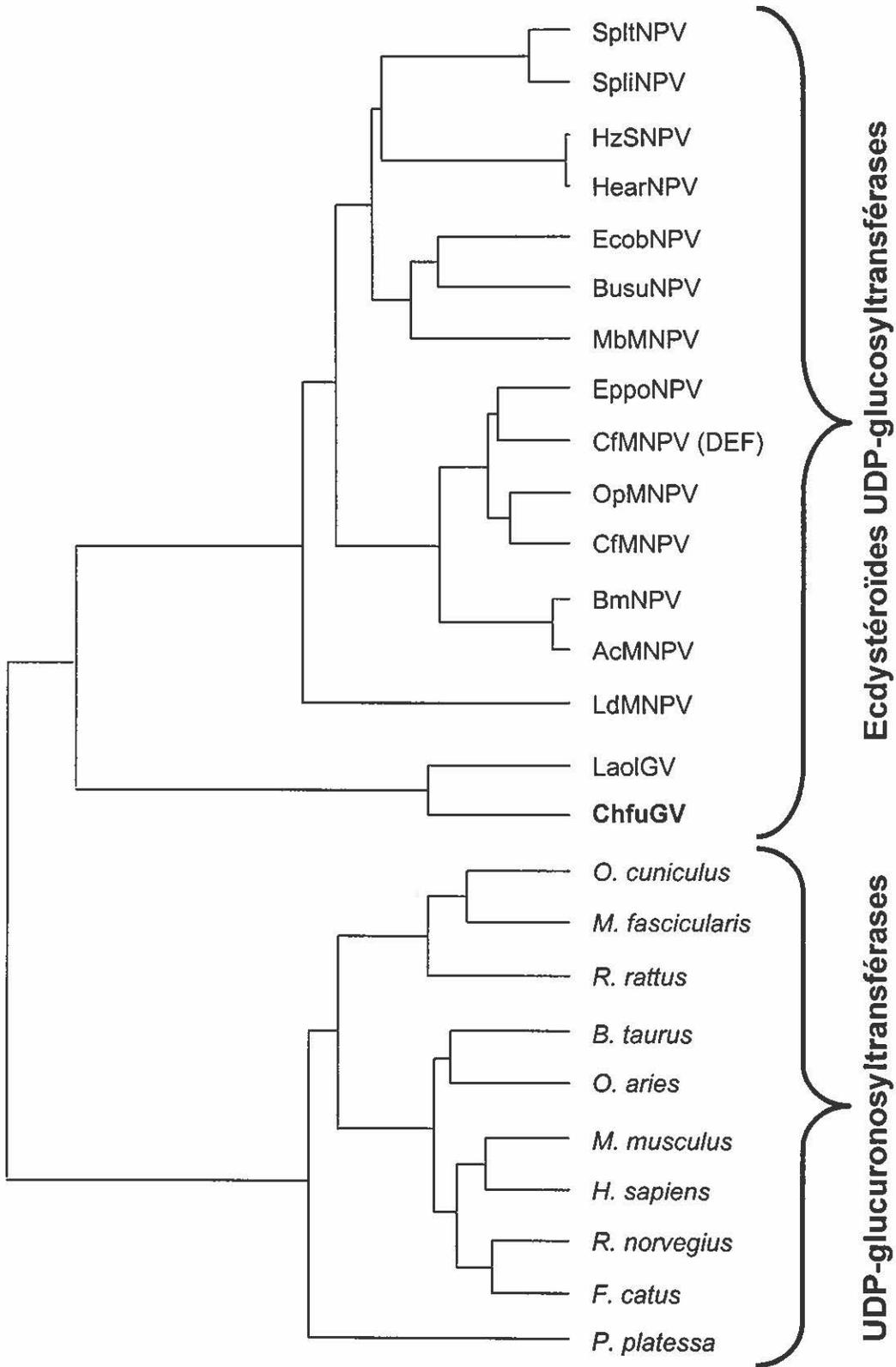
↑↑   ↑   ↑   ↑   ↑   ↑

-VIII--

ChfuGV	ALWYTQKVLN	N-----	-----	-----	-----	445
LaolGV	ALWFTNYVLR	NK-----	-----	-----	-----	453
EcobNPV	AIWYTEHVI-	N-G--KNNYS	---LK----	P	KAANVSYGTY AMIHILVPFT	501
BusuNPV	AIWYTEHVI-	RHG--KNDNT	--WLK----	T	KAANVGYSYD FMMYILFPLV	494
LdMNPV	AVWYTEHAL-	RRD--GDA--	---LK----	T	KAANVDYAEY CMSDLLAPLL	543
MbMNPV	AVWYTEHVIE	SRR--RVVPT	--MLK----	T	RAANVNYSYD IMSYVFPFI	511
EppoNPV	AIKFTEVERIK	FGH--DITYP	ARSLK----	S	PAANLDQSNY FI---SFPL-	492
CfMNPV (DEF)	AIKFTEVERIR	FGH--DITRS	ECSLK----	S	PSANTDYSYD FV---RFPL-	493
OpMNPV	AVKFTEVERIK	FNN--DVNWP	ARSLK----	T	TAANMAYSYD FV---RFPL-	489
CfMNPV	AVKFTEVERII	FKH--DMTRP	ARTLK----	T	TSANIAYSYD FL---RFPL-	491
BmNPV	AIKFTEVERIR	YRH--DISRR	LYSLK----	T	TAANVPYSNY YMYKSVLS--	497
AcMNPV	AIKFTEVERIR	YRH--DISRQ	LYSLK----	T	TAANVPYSNY YMYKSVFS--	497
SpltnPV	AVWYTEHVAR	RKG--AKKH-	---LG----	T	RAANVTYSKY AMFDLVLPL	498
SpltnPV	AVWYTEHVAR	RKG--AKKH-	---LG----	T	RAANVTYSKY AMFDLILPML	501
HzSNPV	AIWYTEHVID	N-G--KNPI-	---LK----	T	KAANVSYSKY YMSDIIVPVI	497
HearNPV	AIWYTEHVID	N-G--KNPI-	---LK----	T	KAANVSYSKY YMSDIIVPAI	497
M.musculus	AVFWVEYVMR	HKGAPHLRPA	AHDLTWYQYH	SLDVIGFLLA	IVLTVVFIVF	507
H.sapiens	AVFWVEFVMR	HKGAPHLRPA	AHDLTWYQYH	SLDVIGFLLA	VVLTVAFITF	508
R.norvegicus	AVFWVEYVMR	HKGAPHLRPA	AHDLTWYQYH	SLDVIGFLLA	IVLTVVFIVY	509
F.catus	AVFWVEFVMR	HKGAPHLRPA	AHDLTWYQYH	SVDVIGFLLA	IVLGIVFITY	507
B.taurus	AVFWVEFVMR	HKGASHLRPA	AHDLTWYQYH	SLDVIGFLLA	VTLTVIFITF	503
O.aries	AVFWVEFVMR	HKGASHLRPA	AHDLTWYQYH	SLDVIGFLLA	VTLTVIFITF	506
O.cuniculus	AIFWIEFVMR	HKGAKHLRVA	AHDLTWYQYH	SLDVIGFLLA	CLTITTYLVI	503
M.fascicularis	AVFWIEFVMR	HKGAKHLRVA	AHDLTWYQYH	SLDVIGFLLA	CVATVIFIIT	509
R.rattus	AVFWIEFVMR	HKGAKHLRVA	AHDLTWYQYH	SLDVIGFLLA	CMASAILLVI	507
P.platessa	AIFWIEFVIR	HKGASHLRVA	AHELNWIQYH	SLDVFGFILL	ILLTVLWVTL	519







Ecdystéroïdes UDP-glucosyltransférases

UDP-glucuronosyltransférases

## **CHAPITRE 4: Discussion**

## 4.1 Généralités

Bien qu'il n'existe pas encore de culture cellulaire pour la production du ChfuGV et des granulovirus en général, la production *in vivo* demeure un excellent moyen d'accumuler des quantités suffisantes de virus pour leur étude génomique. De plus, la production *in vivo* présente l'avantage de conserver l'intégrité du génome viral, tandis que les passages sériés en culture cellulaire provoquent presque invariablement des mutations génomiques. Enfin, l'ADN extrait du ChfuGV produit *in vivo* était convenable pour les études sur les gènes *enhancin* et *egt*.

## 4.2 Caractérisation du gène *enhancin* de ChfuGV

L'amplification d'un gène de la taille recherchée avec les amorces dessinées à partir des gènes *enhancin* de TnGV, PsunGV et HearGV suggérait déjà la présence de l'*enhancin* chez le ChfuGV. L'alignement de la séquence obtenue avec les autres *enhancin* connus de granulovirus, tant au niveau des acides nucléiques qu'au niveau des acides aminés correspondants, a renforcé le fait que le ChfuGV possède un gène *enhancin*. En effet, des identités très élevées, atteignant même 99 % avec les séquences de PsunGV et de TnGV, ont été obtenues. Avec les données précédentes, le profil d'hydrophobicité a confirmé la nature de la protéine déduite du gène *enhancin* chez le ChfuGV, qui présente un graphique presque identique à celui des autres *enhancin* de granulovirus.

Lors de l'étude de la séquence déduite en acides aminés du gène *enhancin* de ChfuGV, plusieurs motifs d'importance post-traductionnelle ont été retrouvés. Le motif de liaison canonique du zinc de type HEXXH généralement associé aux métalloprotéases y est présent. Ce motif est également retrouvé aux mêmes endroits sur les autres *enhancin*, et on lui attribue une activité enzymatique zinc-dépendante. Cette ressemblance suggère que l'*enhancin* du ChfuGV ait la même activité que les autres *enhancin*, soit de catalyser la dégradation de la membrane péritrophique, facilitant ainsi l'infection des cellules épithéliales par le virus (Derksen et Granados 1990). Par

ailleurs, il y a six motifs de N-glycosylation (NXS/T) chez l'enhancin de ChfuGV, qui sont aussi conservés chez les autres enhancin de granulovirus. Cette observation vient suggérer l'importance possible de la glycosylation de l'enzyme pour sa fonctionnalité. Bref, la découverte et la caractérisation de l'enhancin chez le ChfuGV viennent supporter l'hypothèse que ces protéines sont hautement conservées chez les granulovirus.

Puisque les enhancins ont de si fortes similarités, il est probable que le promoteur de l'enhancin de ChfuGV soit du type G/T/ATAAG, comme c'est le cas chez les autres virus. Ce motif est celui d'un promoteur tardif, qui concorde bien avec le fait que les enhancin sont des protéines structurales du corps d'inclusion, et donc produites tardivement durant l'infection.

Beaucoup moins de connaissances ont été accumulées sur les enhancin chez les NPV car seule la séquence d'un enhancin putatif chez LdMNPV a été décrite. Une explication pour cette divergence est dévoilée lors de la construction d'un arbre phylogénétique. Bien qu'il soit possible de faire des regroupements avec certains granulovirus, il devient apparent que les granulovirus semblent avoir évolué séparément des nucléopolyédrovirus. La comparaison des profils d'hydrophobicité vient supporter cette hypothèse, car celui de l'enhancin du LdMNPV est nettement divergent de ceux observés chez les granulovirus. Il demeure possible que les NPV ne possèdent généralement pas d'enhancin, mais qu'une autre protéine pourrait jouer le même rôle.

### 4.3 Caractérisation du gène *egt* de ChfuGV

La séquence du gène *egt* de ChfuGV montre la présence de 7 sites possibles de N-glycosylation dont un de ces sites est conservé à l'intérieur des 15 séquences d'*egt* de baculovirus. Evans et O'Reilly (1999) ont en effet démontré que la protéine EGT est glycosylée et que cette glycosylation augmente la masse moléculaire de l'EGT d'AcMNPV de 11 kDa. Toutes ces données suggèrent que la protéine EGT de ChfuGV est glycosylée.

L'étude de la région promotrice de l'*egt* de ChfuGV a révélé de fortes similarités avec celles des gènes *egt* chez d'autres baculovirus. Les boîtes TATA sont retrouvées chez presque tous les promoteurs des gènes *egt*, et l'*egt* de ChfuGV en possède trois. Le motif TATA est reconnu par l'ARN polymérase II eucaryotique (Blissard *et al.*, 1992) et est donc considérée comme un promoteur précoce. Quelques gènes *egt* ont également d'autres motifs précoces, tel CAGT, et/ou tardifs, tel A/G/TAAG. L'*egt* de ChfuGV ne possède cependant pas ces motifs supplémentaires. Ces données pourraient suggérer que les protéines EGT seraient transcrites tôt dans l'infection par l'ARN polymérase II de la cellule hôte et, dans certains cas, pourraient également être transcrites tardivement par l'ARN polymérase virale. Une production continue de la protéine EGT pourrait ralentir le développement de l'insecte tout au long de l'infection et ainsi permettre une augmentation de la multiplication virale. Cette hypothèse serait en accord avec les observations de Evans et O'Reilly (1999) qui ont démontré que la protéine EGT d'AcMNPV est détectable à partir de 6 heures et jusqu'à 72 heures suivant l'infection. À la lumière de ces observations, les baculovirus ayant un gène *egt* ne contenant que des motifs précoces dans leurs promoteurs pourraient sembler désavantagés, car ils ne produiraient l'EGT qu'au début de l'infection. Cependant, l'EGT pourrait être produit tout au long de la maladie par une succession de cellules qui serait dans la phase précoce de l'infection. De plus, l'absence d'un motif tardif dans le promoteur de l'*egt* de ChfuGV ne certifie pas un arrêt de la production de la protéine chez des cellules en phase tardive de l'infection.

Un signal peptidique de 17 acides aminés se retrouve dans la région aminée de la protéine déduite du gène *egt* de ChfuGV ce qui suggère que la protéine produite serait sécrétée. O'Reilly et Miller (1990) ont détecté un signal peptidique chez l'EGT de AcMNPV, et les études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la protéine se retrouve dans l'hémolymphe des insectes infectés et dans les fluides extracellulaires. De plus, l'EGT de AcMNPV isolé à l'extérieur des cellules infectées ne possédait plus de signal peptidique suggérant ainsi que la protéine est sécrétée et qu'elle perde son signal

peptidique. La présence des signaux peptidiques dans les séquences d'EGT d'AcMNPV et de ChfuGV laisse croire que le scénario d'excrétion et de la perte du signal peptidique seraient également retrouvés chez l'EGT de ChfuGV.

La séquence du gène *egt* de ChfuGV présente 8 régions possédant de fortes homologues avec la séquence de l'*egt* chez LaolGV (région 1: 76 %, région 2 et 3: 54 %, région 4: 63 %, région 5: 60 %, région 6: 67 %, région 7: 64 % et région 8: 67 %). Ces mêmes 8 régions sont également retrouvées dans les séquences des *egt* de NPV répertoriées, quoique les pourcentages d'identité soient plus faibles (région 1: 46 %-64 %, région 2: 31 %-46 %, région 3: 42 %-51 %, région 4: 49 %-60 %, région 5: 50-70 %, région 6: 33 %-67 %, région 7: 46 %-57 % et région 8: 42 %-75 %). La conservation de ces régions chez les *egt* suggère que le site actif de l'enzyme pourrait être formé par un ou plusieurs de ces domaines. Chez les *egt* de NPV, il existe également une 9<sup>ième</sup> région conservée à la fin du gène qui demeure absente chez les GV. Ces données permettent de faire des rapprochements entre les deux gènes *egt* de GV, qui pourraient former un sous-groupe à l'intérieur des *egt* de baculovirus. Cette ségrégation est supportée par l'alignement des séquences prédites en acides aminés; l'EGT du ChfuGV est identique à 52 % avec celui de LaolGV, et ce pourcentage diminue entre 30 et 36 % avec les EGT de NPV.

Le premier alignement d'une séquence de gène *egt* et de 3 UDP-glucuronosyltransférases avait permis de distinguer 7 acides aminés conservés, menant à la constatation éventuelle que les deux enzymes auraient des rôles similaires, soit la conjugaison d'une hormone et d'un sucre (O'Reilly *et al.*, 1991). L'importance de ces 7 acides aminés a plus tard été appuyée par une abolition de l'activité enzymatique lors de la substitution du premier de ces acides aminés dans l'UDP-glucuronosyltransférase de la bilirubine humaine (Erps *et al.*, 1994). Ainsi, la présence de ces mêmes 7 acides aminés chez l'EGT prédit de ChfuGV (position 283, 331, 334, 351, 357, 364 et 369) soutient le rôle essentiel qui serait joué par ces acides aminés dans l'activité de l'enzyme et confirme une fois de plus la nature du gène séquencé.

Un alignement plus complet incluant l'EGT de ChfuGV, l'EGT d'autres baculovirus, et plusieurs UDP-glucuronosyltransférases (26 séquences au total) a permis de reconnaître les 8 régions conservées chez les EGT, et 35 acides aminés conservés dans la plupart des séquences. Ces 35 résidus conservés se retrouvent principalement dans les régions I, V et VII, communes à toutes les séquences d'EGT et d'UDP-glucuronosyltransférases de mammifères et de poisson. Les régions II, III, IV, VI, VIII semblent être spécifiques aux EGT des baculovirus. Ces observations suggèrent que la liaison des sucres serait effectuée par les régions communes (I, V et VII), car cette activité est partagée par les deux familles d'enzyme (EGT et UDP-glucuronosyltransférase). Les régions propres aux EGT pourraient, pour leur part, être impliquées dans la reconnaissance de l'ecdysone et/ou de la 20-hydroxyecdysone. L'identification et la caractérisation de la séquence de l'EGT de ChfuGV aux séquences déjà connues permettent donc de solidifier la théorie que les EGT et les UDP-glucuronosyltransférases ont une activité comparable et que le site d'attachement du sucre est probablement le même.

L'arbre phylogénétique construit avec les 26 séquences mentionnées ci-haut schématise et supporte très bien les hypothèses avancées lors des alignements. La présence des deux familles d'enzyme, soit les EGT et les UDP-glucuronosyltransférases, est apparente. À l'intérieur de la famille des EGT, la séquence obtenue chez le ChfuGV a permis de concrétiser l'éloignement phylogénétique relatif des GV et des NPV. Des arbres phylogénétiques avec d'autres protéines permettront possiblement de confirmer un embranchement donnant lieu aux NPV et un autre aux GV.

Un retard de développement significatif a été observé chez des larves de *C. fumiferana* infectées avec le ChfuGV. Des observations similaires ont été notées chez d'autres insectes infectés par des baculovirus où l'implication de l'EGT a été confirmée (O'Reilly et Miller, 1989; Burand *et al.*, 1996). Il est donc probable que l'EGT de ChfuGV est exprimé et est responsable du retard de développement observé chez *C. fumiferana*.

L'étude de la région promotrice, l'alignement des séquences, la construction de l'arbre phylogénétique et l'effet sur la croissance larvaire ont tous permis de confirmer la présence et l'identité d'un gène *egt* chez le ChfuGV. La comparaison de l'EGT de ChfuGV avec d'autres enzymes similaires a aussi permis de le situer dans la grande famille des UDP-glycosyltransférases.

## **Conclusion**

La réalisation de ce projet a permis un avancement des connaissances de la biologie moléculaire du ChfuGV, un domaine où peu d'études ont été faites jusqu'à maintenant. Ce projet de recherche portait spécifiquement sur l'identification et la caractérisation des gènes *enhancin* et *egt* du ChfuGV. Les séquences obtenues ont permis de conclure que le ChfuGV contient les gènes codant pour les protéines *enhancin* et EGT. Des comparaisons avec des gènes homologues chez d'autres baculovirus ont permis d'observer que le gène *enhancin* de ChfuGV possède des identités importantes avec les gènes *enhancin* des granulovirus répertoriés jusqu'à maintenant. La présence du motif HEXXH a permis de suggérer que l'*enhancin* de ChfuGV, si elle est exprimée, est une métalloprotéase tout comme l'*enhancin* de TnGV (Lepore *et al.*, 1996). Dans le cas des *egt*, bien que les homologies observées sont relativement faibles, il a été possible d'identifier 8 régions conservées. De plus, certaines de ces régions possèdent des similarités avec les gènes d'une autre famille d'enzyme soit, les UDP-glucuronosyltransférases.

Les connaissances acquises au sujet du gène *enhancin* de ChfuGV pourront aussi servir à l'amélioration du Bt ou du ChfuGV en lutte biologique dans le contrôle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. En effet, en désorganisant une des premières lignes de défense de l'insecte, l'*enhancin* recombinante de ChfuGV pourrait être conjointement utilisée avec l'endotoxine du Bt. La dégradation temporaire de la membrane péritrophique par l'*enhancin* recombinante du ChfuGV pourrait favoriser une augmentation de la toxicité du Bt. De plus, de nouvelles approches telles la production de plants transgéniques comprenant le gène *enhancin* de ChfuGV pourrait continuellement dégrader la membrane péritrophique de l'insecte. Cela permettrait aux pathogènes naturels de traverser la membrane protectrice des cellules épithéliales de l'intestin et de causer une infection et éventuellement la mort de l'insecte.

L'étude des *egt*/EGT a deux utilités: une amélioration du temps d'action des baculovirus et l'élaboration d'un modèle d'étude des UDP-glycosyltransférases. D'après les expériences effectuées par O'Reilly et Miller (1989), Eldridge et collaborateurs (1992) et Burand et Park (1992), les larves infectées aux baculovirus (AcMNPV ou

LdMNPV) dont l'*egt* a été délété meurent plus rapidement par rapport au témoins. Donc, lorsqu'une culture cellulaire permissive au ChfuGV sera disponible, la délétion du gène *egt* pourra être effectuée dans le but d'accélérer le temps d'action du ChfuGV. D'autre part, les homologues existantes entre les gènes *egt* et les gènes d'UDP-glucuronosyltransférases, enzymes de la même famille, pourraient permettre l'élaboration d'un modèle d'étude de cette famille d'enzymes. Des mutations au niveau du gène codant pour certaines UDP-glucuronosyltransférases chez l'homme sont impliquées dans des maladies graves telles le syndrome de Crigler-Najjar (Erps *et al.*, 1994). Étant donné que les EGT sont possiblement sécrétés, il serait plus facile de les étudier que les UDP-glucuronosyltransférases qui agissent et demeurent à l'intérieur des cellules (Evans et O'Reilly, 1998).

## Liste des références

- Ahrens, C. H., G. F. Rohrmann. 1995. "Identification of essential *trans*-acting regions required for DNA replication of the *Orgyia pseudosugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: *lef-1* is an essential replication gene." Virology 207: 417-428.
- Akiyoshi, A., R. Chakerian, G. F. Rohrmann, M. H. Nesson et G. S., Beaudreau. 1985. "Cloning and sequencing of the granulin gene from the *Trichoplusia ni* granulosis virus." Virology 141: 328-332.
- Alain, R., L. Berthiaume et M. Trudel. 1989. "Microscopie électronique". Dans: P. Payment et M. Trudel (éd.), Manuel de techniques virologiques. Presses de l'Université du Québec, Sillery, P 107-119.
- Bah, A., J. Bergeron, M. Arella, C.J. Lucarotti et C. Guertin. 1997. "Identification and sequence analyses of the granulin gene of *Choristoneura fumiferana* granulovirus." Archives of Virology 142: 1577-1584.
- Bah, A., C. J. Lucarotti, M. Arella et C. Guertin. 1999. "*Choristoneura fumiferana* granulovirus: sequence analysis and 5' characterization of ORF 891." Archives of Virology 144: 737-746.
- BAPE. 1991. "Rapport de la Commission sur la protection des forêts." Rapport spécial numéro 2. Gouvernement du Québec.
- Barret, J. W., P. J. Krell et B. M. Arif. 1995. "Characterization, sequencing and phylogeny of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from two distinct nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Choristoneura fumiferana*." Journal of General Virology 76: 2447-2456.
- Base Nationale de Données sur les Forêts (BNDF). 1996. Abrégé de statistiques forestières canadiennes. Conseil canadien des ministres des forêts. Ottawa. 234 pp.
- Beaton, S. D. et B. K. Filshie. 1976. "Comparative ultrastructural studies of insect granulosis and nuclear polyhedrosis viruses." Journal of General Virology 31: 151-161.
- Belanger, G., O. Barbier, D. W. Hum et A. Belanger. 1999. "Molecular cloning, expression and characterization of a monkey steroid UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B19, that conjugates testosterone." European Journal of Biochemistry 260: 701-708.
- Bergold, G. H. 1963. "The molecular structure of some insect virus inclusion bodies." Journal of Ultrastructure Research 8: 360-378.

- Bideshi, D. K., A.T. Anwar et B. A. Federici. 1999. "A baculovirus anti-apoptosis gene homolog of the *Trichoplusia ni* granulovirus." Virus Genes 19:95-101.
- Bideshi, D. K., R. H. Hice, B. Ge et B. A. Federici. 1998. "Molecular characterization and expression of the *Trichoplusia ni* granulovirus helicase gene." Journal of General Virology 79:1309-1319.
- Bischoff, D. S. et J. M. Slavicek. 1997. "Molecular analysis of an enhancin gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus." Journal of Virology 71: 8133-8140.
- Blais, J. R. 1983. "Trends in the frequency, extend, and severity of spruce budworm outbreaks in eastern Canada." Canada Journal of Forest Research. 13: 539-547.
- Blais, J. R. 1985. "The ecology of the eastern spruce: a review and discussion." Dans C. J., Sanders, R. W. Stark, E. J. Mullins et J. Murphy (éd.), Recent Advances in Spruce Budworms Research. Ottawa: Canusa. P 49-59.
- Blissard, G. W. et G. F. Rohrman. 1990. "Baculovirus diversity and molecular biology." Annual review of entomology 35: 127-155
- Blissard, G. W., P. H. Kogan, R. Wei et G. F. Rohrman. 1992. "A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription." Virology 190: 783-793.
- Bonneau G., C. Bordeleau, B. Boulet, M. Chabot, J. G., Davidson, J. Garneau, D. Moranville, P. Therrien. 1999. La tordeuse des bourgeons de l'épinette: approche de gestion intégrée des épidémies. Ministère des ressources naturelles. Québec. RN99-3072.
- Burgess, S. 1977. "Molecular weights of lepidopteran baculovirus DNA's derivatization by electron microscopy." Journal of General Virology 37:501-510.
- Burchel B. et M. Coughtrie. 1989. "UDP-glucuronosyltransferases." Pharmacology and Therapeutics 43:261-289.
- Burley, S. K., A. Miller, K. A. Harrap et D. C. Kelly. 1982. "Structure of the Baculovirus nucleocapsid." Virology 120: 433.
- Burand, J. et E. Park. 1992. "Effect of nuclear polyhedrosis virus infection on the development and the pupation of gypsy moth larvae." Journal of Invertebrate Pathology 60: 171-175.
- Chen, X., Z. Hu, J. A. Jehle et J. M. Vlak. 1998. "Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase of *Heliothis armigera* nucleopolyhedrovirus." National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accèsion: AF000009.

- Charlton, C. A. et L. E. Volkman. 1993. Baculoviruses, vertebrates viruses, and cytoskeletons. Dans: Beckage N. E., S. N. Thompson et B. A. Federici (éd.), Parasites and pathogens of insects (Volume 2). Academic Press. San Diego. pp 103-125.
- Clarke, E. E., M. Tristem, J. S. Cory et D. R. O'Reilly. 1996. "Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from the *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus." Journal of General Virology 77: 2865-2871.
- Clem, R. J., M. Fechheimer et L. K. Miller. 1991. "Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells." Science 254:1388-1390.
- Coffman, B. L., M. D. Green, C. D. King et T. R. Tephly. 1995. "Cloning and stable expression of a cDNA encoding a rat liver UDP-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase 1.1) that catalyzes the glucuronidation of opioids and bilirubin." Molecular Pharmacology 47: 1101-1105.
- Consigli, R. A., D. L. Russel et M. E. Wilson. 1986. "The biochemistry and Molecular biology of the granulosis virus that infects *Plodia interpunctella*." Current Topics in Microbiology and Immunology, volume 131: 69-101.
- Cormack R. S. et I. E. Somssich. 1997. "Rapid amplification of genomic ends (RAGE) as a simple method to clone flanking genomic DNA." Gene 194: 273-276.
- Corsaro, B. G., M. Gijzen, P. Wang et R. R. Granados. 1993. "Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis." Dans: Beckage, N. E., S. N. Thompson et B.A. Federici (éd.), Parasites and pathogens of insects (Volume 2: Pathogens). Academic Press. San Diego pp 127-145.
- Croizier, G. M. J. 1996. "Map location, nucleotide sequence and start of transcription of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus." National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accèsion: X99073.
- Crook, N. E. 1994. "Granulosis viruses." Dans: Webster R. G. et A. Granoff (éd.) Encyclopedia of Virology. Academic Press. London. P127-130.
- Crook, N. E., J. D. James, I. R. L. Smith et D. Winstanley. 1997. "Comprehensive physical map of *Cydia pomonella* granulovirus genome and sequence analysis of the granulins gene region." Journal of General Virology 78: 965-974.
- Cunningham, J. C. 1985. "Biorationals for control of spruce budworms." Dans: Sanders, C. J., R. W. Stark, E. J. Mullins et J. Murphy (éd.), Recent Advances in Spruce Budworms Research. Ottawa: Canusa. P 320-349.

- Derksen, A. C. G. et R. R. Granados. 1988. "Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infection." Virology 167: 242-250.
- Elridge, R., D. R. O'Reilly, B. D. Hammock et L. K. Miller. 1992. "Insecticidal properties of genetically engineered baculoviruses expressing an insect juvenile hormone esterase gene." Applied and Environmental Microbiology 58: 1583-1591.
- Erps, L. T., J. K. Ritter, J. H. Hersh, D. Blossom, N. C. Martin et I. S. Owens. 1994. "Identification of two single base substitutions in the UGT1 gene locus which abolish bilirubin uridine diphosphate glucuronosyltransferase activity *in vitro*." The Journal of Clinical Investigation 93:564-570.
- Evans, P. O et D. R. O'Reilly. 1999. "Expression and structural characterization of baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase." Journal of General Virology 80: 485-492.
- Faulkner P. 1981. "Baculovirus." Dans: Davidson E. W. (éd.) Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Allanheld, Osmun, et Co., Totowa, New Jersey, p5-38.
- Federici, B.A. 1993. "Viral pathobiology in relation to insect control." Dans: N. E. Beckage, S. N. Thompson & B. A. Federici (éd.). Parasites and pathogens of insects (Volume 2). Academic Press. San Diego. P 81-101.
- Forté A. J., C. Guertin et J. Cabana. 1999. "Pathogenicity of a granulovirus towards *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae)." The Canadian Entomologist 131: 725-727.
- Gallo, L. G., B. G. Corsaro, P. R. Hughes et R. R. Granados. 1991. "*In vivo* enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae)." Journal of Invertebrate Pathology 58: 203-210.
- Goto, C. et S. Maeda. 1997. "Viral enhancing factor of *Xestia c-nigrum* granulovirus." National Center of Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accèsion: U70917.
- Gray, D., J. Régnière et B. Boulet. 1998. "Prédiction de la défoliation par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec." Centre de foresterie des Laurentides Volume # 7. Ministère des Ressources naturelles du Québec.
- Granados, R. R. et B. G. Corsaro. 1990. "Baculovirus enhancing proteins and their implication for insect control." Proceeding of the International Colloquium of Invertebrate Pathology and Microbial Control. Australia, pp. 174-178.

- Graves, S., et V. K. Ward. 1998. "Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase of *Epiphyas postvittana*." National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accèsion: AF052502.
- Grisdale, D. G. et G. G. Wilson. "Guidelines for rearing spruce budworm received from the Forest Pest Management Institute." Sault-Sainte-Marie. 10 p.
- Gross, C. H., G. M. Wolgamot, R. L. Russel, M. N. Pearson et G. F. Rohrmann. 1993. "A 37 kDa glycoprotein from a baculovirus of *Orgyia pseudosugata* is localized to cytoplasmic inclusion bodies." Journal of Virology 67: 469-475.
- Guarino L. A. et M. D. Summers. 1986. "Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene." Journal of Virology. 57: 563-571.
- Guertin, C. 1995. "Étude du potentiel insecticide de certains virus, du *Bacillus thuringiensis* et de certaines substances phagostimulantes contre les insectes défoliants de la forêt." Ministère des ressources naturelles du Québec. Rapport sur l'avancement des travaux. Projet 10240S.
- Harvey, G. T. 1985. "The taxonomy of the coniferophagous *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae)." Dans: Sanders, C. J., R. W. Stark, E. J. Mullins et J. Murphy (éd.), Recent Advances in Spruce Budworms Research. Ottawa: Canusa. pp 16-48.
- Hashimoto, Y., B. G. Corsaro et R. R. Granados. 1991. "Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus." Journal of General Virology 72: 2645-2651.
- Hayakawa, T., R. Ko, K. Okano, S. I. Seong, C. Goto et S. Maeda. 1999. "Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome." Virology 262 (2): 277-297.
- Hess, R. T. et L. A. Falcon. 1987. "Temporal events in the invasion of the codling moth, *Cydia pomonella*, by a granulosis virus: an electron microscope study." Journal of Invertebrate Pathology 50:85-105.
- Hodgeman, T. C. 1988. "A new superfamily of replicative proteins." Nature 333: 22-23.
- Hoopes, R. R. et G. F. Rohrmann. 1991. "*In vitro* transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 4513-4517.

- Hu, Z. H., R. Broer, J. Westerlaken, J. W. M. Martens, F. Jin, J. A. Jehle, L. M. Wang et J. M. Vlak. 1997. "Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria*." Virus Research 47: 91-97.
- Hukuhara, T., K. Tamura, Y. Zhu, A. Hiroaki et Y. Tanada. 1987. "Synergistic factor shows specificity in enhancing nuclear polyhedrosis virus infections." Applied Entomology and Zoology 22: 235-236.
- Hukuhara, T., Y. Zhu. 1988. "The effect on the synergistic factor on the *in vitro* infectivity of nuclear polyhedrosis viruses." Dans: Invertebrate and Fish Tissue Culture. Kudora, Y., E. Kurstak et K. Maramorosch (éd.). Jpn. Sci.Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin. pp.159-162.
- Hukuhara, T. et Y. Zhu. 1989. "Enhancement of the *in vitro* infectivity of a nuclear polyhedrosis virus by a factor in the capsule of a granulosis virus." Journal of Invertebrate Pathology 54: 71-78.
- ICTV, (International Committee on Taxonomy of Viruses.) 1998. Family baculoviridae. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_bacul.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_bacul.htm).
- Jackson, M. R., L. R. McCarthy, D. Harding, S. Wilson, M. W. Coughtrie et B. Burchell. 1987. "Cloning of human liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase cDNA." Biochemical Journal 242: 581-588.
- Jarvis, D. L. et A. Garcia, Jr. 1994. "Long-term stability of baculoviruses stored under various conditions." Biotechniques 16:508-512.
- Kimura, T. et I. S. Owens. 1987. "Mouse UDP glucuronosyltransferase. CDNA and complete amino acid sequence and regulation." European Journal of Biochemistry 168: 515-521.
- Kettela E. G. 1995. "Élaboration de stratégies de lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) au stade adulte par pulvérisation d'insecticide." Dans Armstrong J. A. et W. G. H. Ives (éd.), Insectes forestiers ravageurs au Canada. Ressources Naturelles Canada. Ottawa. pp 113-117.
- Kobayashi, T., A. Tatano, H. Yokota, T. Onaga, T. Watanabe et A. Yuasa. 1999. "Small intestinal UDP-glucuronosyltransferase sheUGT1A07: partial purification and cDNA cloning from sheep small intestine." Archives of Biochemistry and Biophysics. 364:143-152.
- Kool M., C. H. Ahrens, J. M. Vlak et G. F Rohrmann. 1995. "Replication of baculovirus DNA." Journal of General Virology 76: 2103-2118.

- Koiwai, O., K. Hasada, Y. Yasui, Y. Sakai, H. Sato et T. Watanabe. 1995. "Isolation of cDNA for mouse phenol and bilirubin UDP-glucuronosyltransferases and mapping of the mouse gene for phenol UDP-glucuronosyltransferase (Ugt1a1) to chromosome 1 by restriction fragment length variations." Biochemical Genetics 33: 111-122.
- Lachance D. 1995. "Insectes forestiers ravageurs dans la Région du Québec." Dans Armstrong J. A. et W. G. H. Ives (éd.), Insectes forestiers ravageurs au Canada. Ressources Naturelles Canada. Ottawa. pp 27-39.
- Lazard, D., K. Zupko, Y. Poria, P. Nef, J. Lazarovits, S. Horn, M. Khen et D. Lancet. 1991. "Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyltransferase." Nature 349: 790-793.
- Leaver, M. J. 1999. "Structure and expression of a piscine UDP-glucuronosyltransferase gene." National Center of Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accèsion: CAB51369.
- Lepore, L. S., P. R. Roelvink et R. R. Granados. 1996. "Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease." Journal of Invertebrate Pathology 58: 203-210.
- Léry, X., J. Giannotti, A. Taha, M. Ravalec et S. Abol-Ela. 1997. "Multiplication of a granulosis virus isolated from the potato tuber moth in a new established cell line of *Phthorimaea operculella*." In vitro Cellular and Developmental Biology-Animal Subscriptions 33: 640-646.
- Maeda, S. 1994. "Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus." National Center of Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accèsion: AAC63689.
- Mackenzie, P. I. 1987. "Rat liver UDP-glucuronosyltransferase. Identification of cDNA encoding two enzymes which glucuronidate testosterone, dihydrotestosterone, and beta-estradiol." Journal of Biological Chemistry 262: 9744-9749.
- Mattson, W. J., G. A. Simmons et J. A. Witter. 1988. "The spruce budworm in eastern North America." Dans: Berryman, A. A (éd.), Dynamics of forest insect populations. Plenum Publishing Corporation. New York. pp 309-330.
- McFarlane J. E., 1985. "Nutrition and digestive organs." Dans: Blum, M. S. (éd.), Fundamentals of Insect Physiology. New York: John Wiley and Sons, Inc. p. 59-89.
- McGaughey, V. H. 1975. "A granulosis virus for indian meal moth control in stored wheat and corn." Journal of Economic Entomology 68: 346-348.

- McGaughey W. H., et Beeman R. W. 1988. "Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae)." Journal of Economic Entomology 81:28-33.
- Merrington, C. L., P. A. Kitts, L. A. King, R. D. Possee. 1996. "An *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *lef-2* mutant: consequences for DNA replication and very late gene expression." Virology 217:338-348.
- Miller, L. K. 1996. "Insect viruses." Dans Fields, B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman et S. E. Straus. Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. pp 533-556.
- Morris, R. F. 1963. "The development of predictive equations for the spruce budworm based on key-factor analysis." Dans: Morris R. F. (éd.). The dynamics of epidemic spruce budworm populations. Memoirs of Entomological Society of Canada. 31: 116-129.
- Nakagaki, M., M. Ohba et Y. Tanada. 1987, " Specificity of receptor sites of insect cells for the synergistic factor of an insect baculovirus." Journal of Invertebrate Pathology 50: 169-175.
- Nigam P. C. 1995. "Tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) Réaction des larves aux insecticides." Dans Armstrong J. A. et W. G. H. Ives (éd.), Insectes forestiers ravageurs au Canada. Ressources Naturelles Canada. Ottawa. pp 107-112.
- Ohba, M. et Y. Tanada. 1983. " A synergistic factor enhances the in vitro infection of an insect baculovirus." Naturwissenschaften 70: 613-615.
- Ohba, M. et Y. Tanada. 1984. " A synergistic factor of an insect granulosis virus agglutinates insect cells." Experientia 40: 742-744.
- O'Reilly, D. R. 1995. "Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases." Insect Biochemistry and Molecular Biology 25: 541-550.
- O'Reilly, D. R. et L. K. Miller. 1989. "A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase." Science 245: 1110-1112.
- O'Reilly, D. R. et L. K. Miller. 1990. "Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene." Journal of Virology 64: 1321-1328.
- O'Reilly, D. R. et L. K. Miller. 1991. "Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene." Biotechnology 9: 1086-1089.

- O'Reilly, D. R., M. R. Brown et L. K. Miller. 1992. "Alteration of ecdysteroid metabolism due to baculovirus infection of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: host ecdysteroids are conjugated with galactose." Insect Biochemistry and Molecular Biology 22: 313-320.
- Passarelli, A. L. et L. K. Miller. 1993 a. "Identification and characterization of *lef-1*, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression." Journal of Virology 67: 3481-3488.
- Passarelli, A. L. et L. K. Miller. 1993 b. "Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: *ie-1*, *ie-n*, and *lef-2*." Journal of Virology 67: 2149-2158.
- Pearson M. N., R. L. Q. Russel, G. F. Rohrmann, G. S. Beaudreau. 1988. " p30, A major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location." Virology 167: 407-413.
- Popham, H. J. R., Y. Li et L. K. Miller. 1997. "Genetic mprovement of *Helicoverpa zea* nuclear polyhedrosis virus as a biopesticide." Biological Control 10: 83-91.
- Reed, E. M. et B. P. Springett. 1971. "Large-scale fiels testing of a granulosis virus for the control of the potato moth (*Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep., Gelechiidae))." Bulletin of Entomological Research 61: 223-233.
- Régnière, J. et T. J. Lysyk. 1995. "Dynamique des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*)." Dans Armstrong J. A. et W. G. H. Ives (éd.), Insectes forestiers ravageurs au Canada. Ressources Naturelles Canada. Ottawa. P 95-106.
- Riegel, C. I., C. Lanner-Herrera et J. M. Slavicek. 1994. "Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of the *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus." Journal of General Virology 75: 829-838.
- Roelvink, P. W., G. Bartholomew, G. Corsaro et R. Granados. 1995. "Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancing genes." Journal of General Virology 76: 2693-2705.
- Rohrmann, G. F. 1986. "Polyhedrin structure" Journal of General Virology 67: 1499-1513.
- Rohrmann G. F. 1992. "Baculovirus structural proteins." Journal of General Virology 73: 749-761.

- Rohrmann, G. F. 1996. "Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase of *Orgyia pseudosugata* nuclear polyhedrosis virus." National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accèsion: U75930.
- Royama, T., 1984. "Population dynamics of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana*." Ecological Monographs 54: 429-462.
- Rubinstein, R. et A. Polson. 1983. "Midgut and viral associated protease of *Heliothis armigera*." Intervirology 19: 16-25.
- Russel, D. L. et R. A. Consigli. 1986. "Two-dimensional polyacrylamide gel analysis of *Plodia interpunctella* granulosis virus." Journal of Virology 60: 82-89.
- Russel, R. L. Q., M. N. Pearson et G. F. Rohrmann. 1991. "Immunolectron microscopic examination of *Orgyia pseudosugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cells: time course and localization of major polyhedron-associated proteins." Journal of General Virology 72: 275-283.
- Sambrook J., E. F. Fritsch et F. Maniatis. 1989. "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger F., S. Nicklen et A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 74: 5463-5467.
- Service canadien des forêts (SCF). 1998. "Lutte contre les ravageurs: biotechnologie au SCF." [Http://nrca.gc.ca/cfs/proj/sci-tech/prog/biotech/pest\\_f.html](Http://nrca.gc.ca/cfs/proj/sci-tech/prog/biotech/pest_f.html).
- Smith, I. R. L. 1997. "Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus." National Center of Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accèsion: AJ003131.
- Smith, I. et C. Goodale. 1998. "Sequence and *in vivo* transcription of *Lacanobia oleracea* granulovirus *egt*." Journal of General Virology 79: 405-413.
- Tabashnik, B. E. 1992. "Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamond moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae), and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae)." Journal of Economic Entomology 85: 1551-1559.
- Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Finson et M. W. Johnson. 1990. "Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae)." Journal of Economic Entomology 83:1671-1676.

- Talerico, R. L. 1984 "General biology of the spruce budworm and its hosts." Dans: Schmitt, D. M., D. G. Grimble et J. L. Searcy (éd.), Managing the spruce budworm in Eastern North America. Canusa. Washinton pp 1-10.
- Tanada, Y. 1959. "Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). Journal of Insect Pathology 1: 215-231.
- Tanada, Y. et S. Hara. 1975. "Enzyme synergistic for insect viruses". Nature 254: 328-329.
- Tanada, Y. et R. T. Hess. 1991. "Baculoviridae. Granulosis viruses." Dans: Adams, J. R. et J. R. Bonami (éd.), Atlas of invertebrate viruses. CRC Press Inc. Boca Raton. P.227-257.
- Tanada, Y., M. Himeno et E. M. Omi. 1973. "Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear polyhedrosis virus of the armyworm." Journal of Invertebrate Pathology 21: 31-90.
- Tanada, Y. et T. Hukuhara. 1971. "Enhanced infection of nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, by a factor in the capsule of a granulosis virus." Journal of Invertebrate Pathology 17: 116-126.
- Tompkins, G. J. 1991. "Purification of invertebrate viruses." Dans: Adams, J. R. et J. R. Bonami (éd.), Atlas of invertebrate viruses. CRC Press Inc. Boca Raton. P 31-40.
- Tukey, R. H., Q. Li, X. Lou, M.-A. Peyronneau et P. Obermayer.1996. "Expression of functional domains of rabbit liver UGT2B16 and UGT2B13." National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accèsion: AAB71494.
- Tweeten K. A., L. A. Bulla JR. et R. A. Consigli. 1981. "Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses." Microbiological Reviews 45: 379-408.
- Uchima, K., J. P. Harvey, E. M. Omi et Y. Tanada. 1988. "Binding sites on the midgut cell membrane for the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm (*Pseudaletia unipuncta*)." Insect Biochemistry 18: 645-650.
- Volkman, L. E. et P. A. Goldsmith, R. T. Hess et P. Faulkner. 1984. "Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: identification of the target antigen." Virology 133: 354-362.
- Wang, P. et R. R. Granados. 1997. "An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 6977-6982.

- Whitford, M., S. Stewart, J. Kuzio et P. Faulkner. 1989. "Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67 an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus." Journal of Virology 63:1393-1399.
- Williams, G. V. D. Z. Rohel, J. Kuzio et P. Faulkner. 1989. "A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants." Journal of General Virology 70: 187-202.
- Winstanley D. et N. E. Crook 1993. "Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures." Journal of General Virology 74: 1599-1609.
- Yang S., L. K. Miller. 1999. "Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1." Journal of Virology 73:3404-3409.
- Yokota, H. 1997. "UDP-glucuronosyltransferase of *Bos taurus*." National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accession: BAA23359.
- Yokota, H. 1998. "UDP-glucuronosyltransferase of *Felis catus*." National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, numéro d'accession: BAA24692.

## **Appendices**

**Appendice A: Comparaison des séquences prédites en acides aminés des enhancin de granulovirus**

Bleu: Motif de liaison canonique du zinc

Orange: Cystéines conservées

Vert: Sites possibles de N-glycosylation conservés

Régions ombragées: Acides aminés identiques dans 60 % ou plus des séquences

Tirets: Acide aminé non présent à un endroit donné

ChfuGV	MSYKVIVPATVLPWLRVGENWIFARHRRTEVGVVLPANTKFRVRADFSR	50
PsunGV	MSYKVIVPATVLPWLRVGENWIFARHRRTEVGVVLPANTKFRVRADFSR	50
TnGV	MSYKVIVPATVLPWLRVGENWIFARHRRTEVGVVLPANTKFRVRADFSR	50
XcGV	MSYNVIVPTTVLPPWLRIGQNWIFARHRRTEVGVVLPANTKFRVRADFAK	50
HearGV	MSYNVIVPTTVLPPWLRIGQNWIFARHRRTEVGVVLPANTKFRVRADFAK	50
ChfuGV	AGFTRPVIVRLLNNRSTEREINLNNDQWMEVEHAHESVPFVDWVPVDERN	100
PsunGV	AGFTRPVIVRLLNNNRNTEREINLNNDQWMEVEHAHESVPFVDWVPVGERN	100
TnGV	AGFTRPVIVRLLNNNRSTEREINLNNDQWMEVEHAHESVPFVDWLVGKKN	100
XcGV	WGITRPPVIVRLLNNNRNTEREINLTNDQWIEMEHEHECVPFVDWVPVGEKN	100
HearGV	WGITRPPVIVRLLNNNRNTEREINLTNDQWIEMEHEHECVPFVDWVPVGEKN	100
ChfuGV	TMVEVYFEIDGPHIPLPVYVFNTRPVEHFKSEYRQSSSGYCFLYLDLVC	150
PsunGV	IMAEVYFEIDGPHIPLPVYVFNTRPVEHFKSEYRQSSSGYCFLYLDLVC	150
TnGV	TMAEVYFEIDGPHIPLPVYVFNTRPVEHFKSEYRQSSSGYCFLYLDLVC	150
XcGV	TMAEVHFEIDGPHIQLPVYVFNTRPVENFKSEYRQSSSGYCFLYLDLVC	150
HearGV	TMAEVHFEIDGPHIPLPVYVFNTRPVENFKSEYRQSSSGYCFLYLDLVC	150
ChfuGV	LVP PASKNALLDVNI FELHQFYNEI INYDDL CGLVEDPYADTVDSNLPN	200
PsunGV	LVP PASKNALLDVNI FELHQFYNEI INYDDL CGLVEDPYADTVDSNLPN	200
TnGV	LVP PASKNALLDVNI FELHQFYNEI INYDDL CGLVEDPYADTVDSNLPN	200
XcGV	LVP PASKNVLLD TDL FELHQFYNEI INYDDL CGLVEDPYADTVDSNLPN	200
HearGV	LVP PASKNVLLD TDL FELHQFYNEI INYDDL CGLVEDPYADTVDSNLPN	200
ChfuGV	KAAFVKADAGGGGGAYYGPFWTAPASSNLGDYLRI SPTNWMVI HELGHAY	250
PsunGV	KAAFVKADAGGGGGAYYGPFWTAPASSNLGDYLRI SPTNWMVI HELGHAY	250
TnGV	KAAFVKADAGGGGGAYYGPFWTAPASSNLGDYLRI SPTNWMVI HELGHAY	250
XcGV	KAAFVKADGGGGGGAYYGPFWTAPANTSLRDYLVV SPTNWMVI HELGHAY	250
HearGV	KAAFVKADGGGGGGAYYGAFTAPASTNLGEYLRV SPTNWMVI HELGHAY	250
ChfuGV	DFVFTVNTILIEIWNSL CDRIQYKWMNKT KRQQLARVYENRRPQKEATI	300
PsunGV	DFVFTVNTILIEIWNSL CDRIQYKWMNKT KRQQLARVYENRRPQKEATI	300
TnGV	DFVFTVNTILIEIWNSL CDRIQYKWMNKT KRQQLARVYENRRPQKEATI	300
XcGV	DFVFTVNTRLIEIWNSF CDRIQYTWMNKT KRQQLARI YENQRPQKEAAI	300
HearGV	DFVFTVNTRLIEIWNSF CDRIQYTWMNKT KRQQLARI YENQRPQKEAAI	300
ChfuGV	QALIDNNSPFDNWGFFERLII FTWLYNPQRGLD TLRNINHSYRVHATRNS	350
PsunGV	QALIDNNSPFDNWGFFERLII FTWLYNPQRGLD TLRNINHSYRVHATRNS	350
TnGV	QALIDNNSPFDNWGFFERLII FTWLYNPQRGLD TLRNINHSYRVHATRNS	350
XcGV	QALIDNNV PFDNWDFFEKLSI FAWLYNPQRGLD TLRNINHSYRVHTTRVP	350
HearGV	QALIDNNV PFDNWDFFEKLSI FAWLYNPQRGLD TLRNINHSYRLHAARNP	350
ChfuGV	SIPYPQIWSWLTTSAYDNFWLYFNLVGVYPADFYVNEHNKVVHFNHLHRA	400
PsunGV	SIPYPQIWSWLTTSAYDNFWLYFNLVGVYPADFYVNEHNKVVHFNHLHRA	400
TnGV	SIPYPQIWSWLTTSAYDNFWLYFNLVGVYPADFYVNEHNKVVHFNHLHRA	400
XcGV	STPYPQIWAWLMSCGYDNFWLYFNRI GLFPADFYINEHDKVVHFNHLHRA	400
HearGV	VTPYPQIWAWLMSCGYDNFWLYFNRI GLYPADFYINEHNKVVHFNHLMRA	400

ChfuGV	LALGQSARYPIKYIITDFDLWSKNYDIKQYLESNFDLVIPEELRQTDLLA	450
PsunGV	LALGQSVRYPIKYIITDFDLVSKNYDIKQYLESNFDLVIPEELRQTDLLA	450
TnGV	LALGQSVRYPIKYIITDFDLVSKNYDIKQYLESNFDLVIPEELRQTDLLA	450
XcGV	LALGQSVRYPIKYIITDFDLVQKNYDIKQYLESNFDLVIPEELRQTDLVA	450
HearGV	LALGQSVRYPIKYIITDFDLQKNYDIKQYLESNFDLVIPEELRQTDLVA	450
ChfuGV	DVRVVCVIDDPSQIVGEPFVSVDGNERVFESTVATDRNMYLVGVGPGVYT	500
PsunGV	DVRVVCVIDDPSQIVGEPFVSVDGNERVFESTVATDGNMYLVGVGPGVYT	500
TnGV	DVRVVCVIDDPSQIVGEPFVSVDGNERVFESTVATDGNMYLVGVGPGVYT	500
XcGV	DVRVVCVIDDPSQIVGEPFSLYDNERVFESTVATDGNMYLVGVGPGVYT	500
HearGV	DVRVVCVIDDPSQIIGEPFSLYDNERVFESTVATDGNMYLVGVGPGVYT	500
ChfuGV	LRAPRGKNKRYKLHLAHSPREPVHPANDHMYLLVTYPYQNQLTYTPNVN	550
PsunGV	LRAPRGKNKRYKLHLAHSPREPVHPANDHMYLLVTYPYQNQLTYTPNVN	550
TnGV	LRAPRGKNKRYKLHLAHSPREPVHPANDHMYLLVTYPYQNQLTYTPNVN	550
XcGV	LRAPRGKDKRYKLHLAHSKPEPVHPANDHMYLLITHPYQNQLTYTPVYV	550
HearGV	LRAPRGKDKRYKLHLAHSKPEPVHPANDHMYLLVTYPYQNQLTYTRYIT	550
ChfuGV	SDLAVDMAHLFGSNDRRYVATIYFNPFEQTVTVHLNIRAGRENNTTLYF	600
PsunGV	SDLAVDMAHLFGSNDRRYVATIYFNPFEQTVTVHLNIRAGRENNTTLYF	600
TnGV	SDLAVDMAHLFGSNDRRYVATIYFNPFEQTVTVHLNIRAGRENNTTLYF	600
XcGV	SDLAVDMAHLFG-NDRSYVATIYFNTIEQITITVYLNNIRAGRAYNTTPYF	599
HearGV	SDLAIDAHLFG-TDRLYVATIYFDALQQTIVTVYLNIRTGRENNTTLYF	599
ChfuGV	EMVISNPFNGQSQTFTILEDNPTLRQGYKFDVAVTYSSIRLNMSVAGRLL	650
PsunGV	EMVISNPFNGQSQTFTILEDNPTLRQGYKFDVVTYSSIRLNMSVAGRLL	650
TnGV	EMVISNPFNGQSQTFTILEDNPTLRQGYKFDVVTYSSIRLNMSVAGRLL	650
XcGV	EMVIVNQTNGTSQTFTILEDNETMRQGYTFRAVTFSMIRLNISTNDRLL	649
HearGV	EMEIHNPFIGTSSKFTLLEDNVTMRQGYKFPVAVTFSSIRLHIRDDNRML	649
ChfuGV	FGDTFLPEGTTTLMFNPQVLEPNLFPDGSALNRTLARLREQAAFLDNYS	700
PsunGV	FGDTFLPEGTTTLMFNPQVLEPNLFPDGSALNRTLARLREQAAFLDNYS	700
TnGV	FRRYIFAGGTTTLMFNPQVLEPNLFPDGSALNRTLARLREQAAFLDNYS	700
XcGV	LVDQFLPAGEFMLFMMQHQQLIGNGILPDGSIINSTYERVKEQAAFIESHK	699
HearGV	LVDKYLPAQDTLLFMFPNQIVDNNIFPDGSILTSTYNRIKEQAAFIENHK	699
ChfuGV	QLMYIENELRDSIYLASQLVDPASDEFVKYYPDYFRDPHTYVYLFRRFGL	750
PsunGV	QLMYIENELRDSIYLASQLVDPASDEFVKYYPDYFRDPHTYVYLFRRFGL	750
TnGV	QLMYIENELRDTIYLASQLVDPASDEFVKYYPDYFRDPHTYVYLFRRFGL	750
XcGV	QLLYIENELRDSIYLAAQFVDSSTNEFLKYYPDYFRDPHTYVYLFRRFGL	749
HearGV	QLLYIENELRDSIYLASQFVNSDSNEFLKYYPDYFRDPHTFSYLFRRFGL	749

ChfuGV	GDFVLLDLQIVPLLNLATVRIANIQNGPHSYFDTLYFKVGLRDTNGAIVF	800
PsunGV	GDFVLLDLQIVPLLNLATVRIANNHNGPHSYFDTLYFKVELRDTNGAIVF	800
TnGV	GDFVLLDLQIVPLLNLATVRIANIQNGPHSYFDTLYFKVELRDTNGAIVF	800
XcGV	GDNLLDMQIVPVLNLATVRINNYGSGPHLYFDTTYLGVEVLDASNTVVF	799
HearGV	GDFMLLELQIVPILNLASVRVGNHNGPHSYFNTTYLSVEVRDTSGGVVF	799

ChfuGV	SCSRRGNEPTTPEHHKFEVYSGYTVLEFMREPGNRLQLIVNKMLDTALPS	850
PsunGV	SYSRRGNEPMTPEHHKFEVYSGYTVLEFMREPGNRLQLIVNKMLDTALPS	850
TnGV	SYSRRGNEPMTPEHHKFEVYSGYTVLEFMREPGNRLQLIVNKMLDTALPS	850
XcGV	SYSRRGNEPMIHEQHKEVYKGYAHLFIQEPGNRLQLMVNKVLDALPR	849
HearGV	SYSRLGNEPMTHEHHKFEVFKDYTIHLFIQEPGQRLQLIVNKTLDTALPN	849

ChfuGV	TQNI FARITDTQLVVGDTSI--EDNLVTSINVDGDDDNQKIRVVETLKM	898
PsunGV	TQNI FARITDTQLVVGDTSI--EDNLVTSINVDGDDDNQKIRVVETLKM	898
TnGV	TQNI FARITDTQLVVGDTSI--EDNLVTSINVDGDDDNQKIRVVETLKM	898
XcGV	TQNI YARLTQTQLVVGQNI IINDGY-TSSNSDGD--QQ-IRVVETLKM	895
HearGV	SQNI YARLTATQLVVGQSIIISDDNDFVPPPPRVNCGDQQIRVVETLKM	899

ChfuGV	IAF	901
PsunGV	IAF	901
TnGV	IAF	901
XcGV	IAF	898
HearGV	IAF	902

## **Appendice B: Comparaison des séquences prédites en acides aminés des EGT de baculovirus**

Régions ombragées: Acides aminés identiques dans au moins 50% des séquences

Tirets: Acides aminés non présents à un endroit donné

Chiffres romains:

I à VIII: régions conservées chez les EGT de GV et de NPV

IX: région conservée chez les NPV seulement

ChfuGV	MFVQ	-----	-----	-----	-----	LI	6
LaolGV	MFIS	-----	-----	-----	-----	IL	6
EcobNPV	MSSS	-----	QIR	-----	F	LF	10
BusuNPV	M	-----	-----	-----	Y	LL	4
LdMNPV	MRSRFDPRAPR	NDVTPKASGQ	RVRGDPSPRA	RGLYKYGTRG	RPSLVDDSTR		50
MbMNPV	MGHL	-----	HIV	-----	HW	RLTMNGA	16
EppoNPV	MHFA	-----	-----	-----	-----	VI	6
CfMNPV (DEF)	MIFI	-----	-----	-----	-----	LL	6
OpMNPV	MVFL	-----	-----	-----	-----	II	6
CfMPV	MASL	-----	-----	-----	-----	II	6
BmNPV	MTILC	-----	-----	-----	-----	WI	7
AcMNPV	MTILC	-----	-----	-----	-----	WI	7
SpltNPV	M-KM	-----	-----	-----	-----	II	5
SpliNPV	M-KMI	-----	-----	-----	-----	II	6
HzSNPV	MYKQIITM	-----	-----	-----	-----	LL	10
HearNPV	MYKQIITM	-----	-----	-----	-----	LL	10

-----I-----						
ChfuGV	---LVVLAPC	-----FV	CSSNILCVFP	TPALSHQSVF	AAYVDKLVIA	45
LaolGV	---LLAVE	-----RI	LCANILCVFP	TPAYSHQSVF	SAYIDKLSWA	45
EcobNPV	--GIIVVCVV	QYI----DNV	GGAKLLALET	TPSYSHQSVF	KVYIEGLAEK	54
BusuNPV	---IIFWLAK	-----QC	HGAKLLAVMP	TPSYSHQSVF	KVYIESLAER	44
LdMNPV	RNDTMTAYLI	VFCLCCWSAA	RSANILAYFP	TPSYSHQSVF	RAYVELLAER	100
MbMNPV	-IAALELCLV	MV-----HQQ	HAVRILAVFP	TPAYSHHSVF	KVYIEALAER	60
EppoNPV	---LTLIA-A	-----QA	HAANILAVLP	TPAYSHHLVY	KAYVOALANK	44
CfMNPV (DEF)	---TTLIavg	-----GA	QTANILAVLP	TPAYSHHLVY	QAYVOALADK	45
OpMNPV	---ALTLAT	-----GA	RAASILAVLP	TPAYSHHVY	RAYVHALVKN	45
CfMNPV	---ALTLAA	-----DA	QTANILAVLP	TPAYSHHAVY	KAYVHALAKN	45
BmNPV	---ALLSTLT	-----AV	NAVNILAVFP	TPAYSHHIVY	KVYIEALAEK	46
AcMNPV	---ALLSTLT	-----AV	NAANILAVFP	TPAYSHHIVY	KVYIEALAEK	46
SpltNPV	---LVVILHA	LRNS-----	AAVRVLCMFP	TPSYSHQTVF	NVYVNALKR	46
SpliNPV	---VVSH-HV	LRNS-----	AAVRVLCMFP	TPSYSHQTVF	DVYVNALRR	46
HzSNPV	---LVLFLSV	L-----	DGARILCVFP	VPSYSHHAVE	EAYTNALASR	48
HearNPV	---LVLFLSV	L-----	DGARILCVFP	VPSYSHHAVE	EAYTNALASR	48

ChfuGV	GHNVTWITP	-----MPRGV	---QHVTETD	CS-TK-NVEV	NIVKNSTSLK	84
LaolGV	GHNVTWITP	-----MPRAV	---DHVHOV	SSLV-HYFN	NLIKNSTMIK	85
EcobNPV	GHEVVL-KPS	TE-IIYEVSR	Y--PNIETD	ATLSR-HYFK	QLVRDSAVSR	99
BusuNPV	GHTIVIKKPT	TR-VFYDDRF	S--DNITEID	ATMSE-FYFS	ELFTNASVFR	90
LdMNPV	GHAIVTIREL	TR-VDFN-RN	A--GNLITD	LDGDG-LLL-	-LMKASTTHR	143
MbMNPV	GHDVVVVKST	DR-INYANRN	GLRGNVSEID	ASLSQ-EYYG	RIMRHAGVFR	108
EppoNPV	CHNVTVIKQ	LL-NYVDSNA	HWCGHIEOLE	ADMSS-EQYK	KLVSSSGAFR	92
CfMNPV (DEF)	CHNVTVKEQ	LL-DYAAANK	QRCGRIEOLD	ADMSS-QQYK	KLVASSGAFR	93
OpMNPV	CHNVTVIKQ	LL-DYAVQDE	--CGRVEOLD	ADMSA-QQYK	KLVASSGVER	91
CfMNPV	CHNVTAVKPR	LL-DYALLNE	--CGRIEOLD	ADMSL-EQYQ	KLMAGSGAFR	91
BmNPV	CHNVTVVKPK	LF-AYSTKTY	--CGNITEVN	SDMSV-KQYK	KLVNTSAMFR	92
AcMNPV	CHNVTVVKPK	LF-AYSTKTY	--CGNITEVN	ADMSV-EQYK	KLVANSAMFR	92
SpltNPV	GHSLVVISEK	I--HNHSHRN	HHHENLTEID	VGLVTNNEFK	KILQDSKVS	94
SpliNPV	GHSLVVISEK	IHNHNHSHRN	HRHENLTEID	VGSVTNNEFK	RLLQDSKVS	96
HzSNPV	GHTIVRITP	-----FPTKK	NDSSNVITD	VSLSK-DYFK	SLVDRSRLEK	91
HearNPV	GHTIVRITP	-----FPTKK	NDSSNVITD	VSLSK-DYFK	SLVDRSRLEK	91

-----II-----

ChfuGV	KRGLVADEL	VTAENYTPII	DMVVEQIKSY	NVTNLI-KNK	DNNEFDLVCE	133
LaolGV	KRGVVADETT	VTKENYMGLI	NLVAHEIKSP	NVTRLL-RNK	GNKFDLIVCE	134
EcobNPV	KRGLVADTMS	VTAHNYMGLV	KMISEQLKLP	QIKNLIEMRT	IMNFDLLITE	149
BusuNPV	KRGI VADSKT	VTSANYLGLV	HMISNOFKLP	AVKQLIEHRH	RLQEDVLITE	140
LdMNPV	KRGI VADTDT	VTADNYEALV	RMVDROIHSE	PFQRHL-KSA	RRGYDLLVVE	192
MbMNPV	KRGI VADSST	VTAHNYMGLV	RMMSDOEDLP	IVKSFIEEAH	KHKFDLLITE	158
EppoNPV	KRGVVADETT	VTANNYMGLI	DMFKDOENNV	NVQQFT--LC	NRTFDVVVVE	140
CfMNPV (DEF)	KRGVVSDETT	VTAENYMGLV	EMFRDOEDNA	HVRSFL--AT	NRTFDVVVVE	141
OpMNPV	KRGVVADETT	VTADNYMGLI	EMFKDOEDNA	NVRRFL--ST	NRTFDVVVVE	139
CfMNPV	KRGVVADETT	VTADNYMSLI	EMFKDOEDNA	NVRHFL--AS	NRTFDVVVVE	139
BmNPV	KRGVVSDDTT	VTAANYLGLI	EMFKDOEDNI	NVRNLI--AN	NOTFDLVVVE	140
AcMNPV	KRGVVSDDTT	VTAANYLGLI	EMFKDOEDNI	NVRNLI--AN	NOTFDLVVVE	140
SpltNPV	KRGI VSDAST	VTRVNYMGLV	RMISAOEHE	QVKRLI--KS	KRTFDVIIIE	142
SpliNPV	KRGI VSDSST	VTRVNYLGLA	RMISAOEHE	QVKRLI--RS	NOTFDVIVIE	144
HzSNPV	KRGI VSETSS	VTARNYISLV	HMLIDQESVE	SVRQLI--ES	NNVFDLLVTE	139
HearNPV	KRGI VSETSS	VTARNYISLV	HMLIDQESME	SVRQLI--ES	NNVFDLLVTE	139

-----III-----

ChfuGV	AYLDIILIFG	HLY-RTEILK	FSSGYGTNEN	EKMNAADV KY	NSVVPNLWR	182
LaolGV	AYVSMILVFG	AIY-DAPVIO	FSSGYAIPEN	FETVGGVEAR	NHIKHPNIWR	183
EcobNPV	AEMDYPLVMS	HLEGNLEVVQ	ISSGHGLAEN	FETMGAVSR-	HELYYPNVWR	198
BusuNPV	AFIDYPLVFS	YLEGDLEIIO	ISSGHGVAEN	FETMGAVSR-	HELYYPNMWR	189
LdMNPV	AFVDYALIAS	HLEGDVEVVQ	ISSGHATAEN	FETMGATSR-	HEPRYPNLWR	241
MbMNPV	AYIDYPLVFS	HLEGDLEVVQ	ISSGYAVAEN	FETMGAVSR-	HEVYYPNLWR	207
EppoNPV	AFADYALVFG	HLERPAPVIO	LAPGYGLDEN	EDTAGAVAR-	HPKYYPNIWR	189
CfMNPV (DEF)	AFADYALVFG	HLERPAPVIO	LAPGYGLAEN	EDAVGAVGR-	HEVHYYPNIWR	190
OpMNPV	AFADYALVFG	HLERPAPVIO	LAPGYGLAEN	EERRRAVAR-	HPLHYPTFGA	188
CfMNPV	ASADYELVFG	HLERPATVIO	LAPGYGLAEN	EDAAGAVAR-	HEVHYYPNIWR	188
BmNPV	AFADYALVFG	HLYDPAPVIO	LAPGYGLAEN	EDTVGAVAR-	HPVHHYPNIWR	189
AcMNPV	AFADYALVFG	HLYDPAPVIO	LAPGYGLAEN	EDTVGAVAR-	HEVHHYPNIWR	189
SpltNPV	AFVSMPLILS	YFFKNAPVIL	ISSGHGVAEN	FETMGAVAR-	HEVYYPNMWR	191
SpliNPV	AFVSMPLILS	YFFKDPVIO	ISSGHGTAEN	FETMGAVAR-	HEVYYPNMWR	193
HzSNPV	AFLDYPLVFS	HLEGDVEVIO	ISSGHALAEN	FETMGAVSR-	HELYYPNLWR	188
HearNPV	AFLDYPLVFS	HLEGDVEVIO	ISSGHALAEN	FETMGAVSR-	HELYYPNLWR	188

ChfuGV	SNE----SNE	NIEQALNTEW	QK-----TKQ	IQNIRLOKLF	GD-RTSTISV	222
LaolGV	SDE----SKS	NFEQLMTENY	LK-NEWALLE	KEQENMLKRD	EG-YHDMCQ	227
EcobNPV	NNEN-NLNIW	QTVNELYMEL	RLYNEFALLK	AEQEKMMKIO	FGNDVPELDT	247
BusuNPV	DRET-NLNVW	ETINEIMMEM	RLQNEFSLLA	EEQNKLTAHQ	FGIGVPTVQK	238
LdMNPV	FNEG-PLSVW	DGVRELYTEL	RLQREFGILA	DRQDALLKRR	FGPEAPGLRE	290
MbMNPV	DKES-GLNVW	QOSMKCTLSW	RYRMNLVNWP	DEQNALLKRO	FGESTETIQE	256
EppoNPV	STFVGGTAGA	LSEWRLYNEF	EL-----LA-	RYSDKLLKIO	FGPTTETIRE	233
CfMNPV (DEF)	SSSIGNADGA	LIEWRLYNEF	EL-----LA-	RRSDALLKLO	FGPNTETIRQ	234
OpMNPV	AALT-RRGGA	LSEWRLLNEF	EL-----LA-	RRSDELLKQO	FGKSTETIRQ	231
CfMNPV	SSFSGEAAGA	LSEWRLLNEF	EL-----LAS	QRSNELLKQO	FGLDTETIRQ	233
BmNPV	NNEDDTKANL	MTEMRLYKEF	KI-----LA-	NMSNALLKQO	FGPDTETITEE	233
AcMNPV	SNEDDTEANV	MTEMRLYKEF	KI-----LA-	NMSNALLKQO	FGPNTETITEK	233
SpltNPV	DREKD-LSVW	QTVROVTEI	RLYREFSOLD	ADQNAMMKRO	FGTKVEDVDV	240
SpliNPV	DREKG-LSVW	QTVROVTEI	RLYMEFSQLD	ADQSAMMKRO	FGSKVEDVDA	242
HzSNPV	NKEQN-LNVW	EIITEIYTEL	VLYLEFARLA	DEQTKMLRHQ	FGPNTESVVEE	237
HearNPV	NKEQN-LNVW	EIITEIYTEL	VLYLEFARLA	DEQTKMLRHQ	FGPNTESVVEE	237

-----IV-----						
ChfuGV	MQQSVKLLFV	NVPHVFDSDR	PVGENVOYLG	G-IHLKKPRP	-VR----	DIK 266
LaolGV	LKSRVLMIFI	NVPAVEDNRR	DVSNNIQYLG	G-IHLKKPRT	-VR----	DSR 271
EcobNPV	LRDNVQLLLV	NAHATFDNRR	PVPPSVQYMG	G-LHLHKKQI	-AP---	LSSY 292
BusuNPV	LRDRVQQLLV	NTHAVFDNRR	PVPPSVQYMG	G-LHLHKKTI	-KP---	MSNY 283
LdMNPV	LRSRVRLLFV	NVHSMFDNRR	PVPPSVQYLG	G-LHLHDRRA	-EP---	LSEA 335
MbMNPV	LRNRVQLLFV	NTHATFDNRR	PVPPSVQYLG	A-LHLHDKRP	-DS---	MYGM 301
EppoNPV	LRNNVQLLLL	NLHPVYDNNR	PVPPSVQYLG	GGIHLTQTOP	-QN---	LQKT 279
CfMNPV (DEF)	LRNNVQLLLL	NLHPVYDNNR	PVPPSVQYLG	GGIHLTLEPP	-QR---	LDIE 280
OpMNPV	LRDNVQQLLL	NLHPVYDNNR	PVPPSVQYLG	GGIHLAQALP	-QR---	LDAP 277
CfMNPV	LRDNVQQLLL	NLHPVYDNNR	PVPPSVQYLG	GGIHLISQAPS	-HK---	LTAA 279
BmNPV	LRNKVQQLLL	NLHEIFDNNR	PVPSVQYLG	GGIHLVKSAP	LTK---	LSPV 280
AcMNPV	LRNKVQQLLL	NLHEIFDNNR	PVPSVQYLG	GGIHLVKSAP	LTK---	LSPV 280
SpltnNPV	LRNVHMLFV	NTHMFDNRR	PVPSVQYLG	G-IHID-ETT	AYAEE-	IDDD 287
SplnNPV	LRKNVHMMFV	NTHEVFDNRR	PVPSVQYLG	G-IHIDPAVT	SVADE-	IDND 290
HzSNPV	LRQRVQLLFV	NTHLEFDNRR	PVPPSVQYLG	S-LHLDRNND	VDEQOTM	DYN 286
HearNPV	LRQRVQLLFV	NTHLEFDNRR	PVPPSVQYLG	S-LHLDRNND	INEQOTM	DYN 286

-----V-----						
ChfuGV	LIEFLNQKTN	-IIVSFGSI	LDAAMDES L	LTEFVKVETK	---FNVLW	KI 312
LaolGV	LLSFMKHHI	-IIVSFGSG	LTVLNM DANL	IAEFVRVENS	IP-YAVLW	KV 319
EcobNPV	VAWILNNSTK	GAVVVSFGST	EKVADMDYDF	LQMLRLET K	L-PYNVW	WKY 341
BusuNPV	VQNFIDNSTR	GVVVSFGSS	LTSKNMAPEF	LSMIIE TEKL	V-PYDIAW	KF 332
LdMNPV	VARFLDESRR	GVVVSFGSG	LATEDMDADM	AAALDFAEK M	-PYDVLW	KH 384
MbMNPV	VREFLDNATT	GAVVVSFGSA	LSSEDM EPEF	IEMLLRVEEK	L-PYSILW	KY 350
EppoNPV	LERQLNASVN	GIVVVSFGSS	LDTKSIHDEF	LQMLVNTFTG	LNNRTVLW	KV 329
CfMNPV (DEF)	LEKRLNASVN	GTIVVVSFGSS	LDTNSIHAEF	LEMILLDTFAK	LDNRTVLW	KV 330
OpMNPV	LERRINESVD	GAVVVSFGSG	LDTNSIHAEF	LQMLLDTEAN	LNNYTVLW	KV 327
CfMNPV	LERRINESVD	GAVVVSFGSS	LDTNSIHAEF	LQMLLESEFVQ	LNNYTVLW	KV 329
BmNPV	IDAKMNSKSKS	GAVVVSFGSS	LDTKSFANEF	FYMLINTEKA	LDNYTILW	KI 330
AcMNPV	INAQMNSKSKS	GTIVVVSFGSS	LDTKSFANEF	FYMLINTEKT	LDNYTILW	KI 330
SpltnNPV	LAEFLENSTM	GVVVSFGSS	VRVSDMDSNM	LDVFIETERS	I-PYRVLW	KV 336
SplnNPV	LAEFLENSTM	GVVVSFGSS	VRVSDMDSNM	LNVFVEIERS	I-PYRVLW	KV 339
HzSNPV	LMQFLNNSTN	GVVVSFGTS	LRVSDMDDEF	LFEFITA EKQ	L-PYNILW	KT 335
HearNPV	LMQFLNNSTN	GVVVSFGTS	LRVSDMDDEF	LFEFITA EKQ	L-PYNILW	KT 335

-----VII-----						
ChfuGV	DNVVSSKFN	SDNILTRNWF	PORDIENHPN	VKLFITOGGV	QSVDEAVDSE	362
LaolGV	DSSIHLKHN	SSNVHTOSWF	PORDVINHPH	IKVFITOGGV	QSTDEAVNSG	369
EcobNPV	D-GD ENIHI	PQNVYLQTFE	DQYSLHHKN	VKAFTVTOGGV	QSIDEAIDAG	390
BusuNPV	D-IVPEVNNL	PENVLIQDWY	DQYSLHHVN	VKVFVTOGGV	QSTDEAIDAL	381
LdMNPV	D-GRVDGLTI	PANVFQKWE	AQFEVLOHKN	VKAFTVTOAGV	QSTDEAVENL	433
MbMNPV	D-GYMNRM--	PANVFQSWF	EQYNLIHHKN	VRAFVTOGGV	QSTDEAVEAI	397
EppoNPV	DDAVVDSIKL	PPNVITONWF	NQRAVLHHKN	TVAFVTOGGL	QSSDEALHAQ	379
CfMNPV (DEF)	DDAVAKSVVL	PRNVIAOKWF	NQRAVLNHRN	VVAFVTOGGL	QSSDEALHAR	380
OpMNPV	DDAVALSVAT	PRNVLAOKWF	SQAVLRHKN	VVAFVTOAGL	QSSDEALQAR	377
CfNPV	DDTVPASVKL	ESNVVTKWE	DQRAVLHHKK	VVAFVMOAGL	QSSDEALESR	379
BmNPV	DDEVVKNITL	PANVITONWF	NQRAVLRHKK	MAAFITOGGL	QSSDEALEAG	380
AcMNPV	DDEVVKNITL	PANVITONWF	NQRAVLRHKK	MAAFITOGGL	QSSDEALEAG	380
SpltnNPV	DKSDTIIDNL	ESNVLIQRFW	PQRRVLKHRN	VKVFITOGGV	QSTDEAIDAG	386
SplnNPV	DKSDKIFDNI	ESNVLIQRFW	PQRRVLKHRN	VKVFITOGGV	QSTDEAIDAG	389
HzSNPV	D-GMPMEHVT	PKNVLTOTWL	PQHHVLKHSN	VVAFVTOGGM	QSTDEAIDAC	384
HearNPV	D-GMPMEHVT	PKNVLTOTWL	PQHHVLKHSN	VVAFVTPGGM	QSTDEAIDAC	384

ChfuGV	IFLICIPMVG	DOEVNCRRID	QLNIGVVVNI	LKLESENYK	KINDVMNDTT	412
LaolGV	VPMIGIPIMG	DOEYNVRRYT	ELGIGEKVNI	LRLEEGLDR	KIKNLVHNS	419
EcobNPV	VPLIGLPMMG	DQSFNTNKVF	ELEIGCTLDT	LTVTSQIVT	ATVATVENPK	440
BusuNPV	VPLVGVPMMG	DQEFHTNKYA	ELSIGCAVDT	LTVNSLOIMR	ATVDAATSAC	431
LdMNPV	VPLVGVPLMG	DOAFNAHRV	ELGIGVALDA	TRLTAADHAR	AVEQVTSARA	483
MbMNPV	VPMVGMPPMG	DOAYNMNKIV	ELGLGKVVDT	VRVNAEOLIE	ATVDVAESPK	447
EppoNPV	VPMVCLPMMG	DOEHHANKLQ	EFKVARTINT	VDVSASQIIL	AITDVIIVNKK	429
CfMNPV (DEF)	VPMVCLPMMG	DOEHHSAKLE	QFGVARALNT	VTVSAQIAL	AVGDMADRL	430
OpMNPV	VPMVCLPMMG	DOEHHARKLQ	QFGVARALDT	AAVSAPQIOL	ATREVIADGE	427
CfMNPV	VPMVCLPMMG	DOEHHARKLQ	QFGVARTLDT	AVVSAQITL	ATGEVIADAE	429
BmNPV	IFMVCLPMMG	DOEYHAHKLQ	QLGVARALDT	VTVSSDQLL	AINDVLFNAS	430
AcMNPV	IFMVCLPMMG	DOEYHAHKLQ	QLGVARALDT	VTVSSDQLLV	AINDVLFNAP	430
SpltNPV	VPMVGVPIMG	DOEYNVNYME	THGIGRSVDT	LTVDARLIE	IVMDVANNVK	436
SpliNPV	VPMVGVPIMG	DOEYNVNYME	TYGIGRGVDT	LTVDAROLTE	IVMDVADNEK	439
HzSNPV	VPLIGIEFMG	DOAYNTNKYE	ELGIGRNLDP	VTLTSHILVS	AVLDMVNNK	434
HearNPV	VPLIGIEFMG	DOAYNTNKYE	ELGIGRNLDP	VTLTSHILVS	AVLDMVNNK	434

-----VIII-----

ChfuGV	--IVDKIHAT	KKNIHDAPMK	--PLHKALWY	TOKVLRN---	-NKY-----	448
LaolGV	--VELNIKRL	NLFISDTPVK	--PLRKALWF	TNYVLRNKDA	IDK-----	458
EcobNPV	--FRHNLKNI	RHTMRHQPI	--ALNKALWY	TEHVI-N-GK	NNYS---LKP	481
BusuNPV	--VRNGLRHL	ROIINHQPMT	--PLHKALWY	TEHVI-RHGK	NDNT---WIKT	474
LdMNPV	--YRENLERE	RRLLRHQCAS	--PTHKAVWY	TEHAL-RRDG	DA-----LKT	523
MbMNPV	--YRKRLREI	RHMIHQPMT	--PQKAVWY	TEHVIESRRR	VVPT---MLKT	491
EppoNPV	--IQTRMAEL	RAVIDYDEIA	--PADKAIKF	TERVIKFGHD	ITYPARSIKS	476
CfMNPV (DEF)	--AYQLRMTNI	LNVVAFDEAT	--PADKAIKF	TERVIRFGHD	ITRSECSIKS	477
OpMNPV	--AYRARIDKL	RAVVE-HDAA	--PDEKAVKF	TERVIKFENN	VNWPARSILKT	473
CfMNPV	--AYRARIDDL	RAVLE-HDAA	--PAEKAVKF	TERVIFKHD	MTRPARTLKT	475
BmNPV	--TYKKHMAEL	YALINNDKAT	FPPLDKAIKF	TERVIRYRHD	ISRRLYSILKT	479
AcMNPV	--TYKKHMAEL	YALINHDKAT	FPPLDKAIKF	TERVIRYRHD	ISRQLYSILKT	479
SpltNPV	YK-TETLS-L	RDAIMDQPMR	--PLEKAVWY	TEHVARRKG	KKH---LGT	478
SpliNPV	YK-NGTLW-L	RDAIMDQPMR	--PLEKAVWY	TEHVARRKG	KKH---LGT	481
HzSNPV	SRYTDNIKAL	NRSTNYRTRK	--PMEKAIWY	TEHVION-GK	NPI---LKT	477
HearNPV	SRYTDNIKAL	NRSTNYRTRK	--PMEKAIWY	TEHVION-GK	NPI---LKT	477

-----IX-----

ChfuGV	-----	-----	-----	-----	-----	448
LaolGV	-----	F K-----	-----	-----	-----	460
EcobNPV	KAANVSXGTY	AMIHILVPFT	AIFVMNNLQO	LLRSTFVSI	-----	520
BusuNPV	KAANVGYSDY	FMYILFPLV	SVTAMNQLQO	LMRLTFFSM	-----	513
LdMNPV	KAANVDYAEY	CMSDLLAPLL	SVSLMSHLHS	LIRMFVW--	-----	560
MbMNPV	RAANVNSDY	IMSIVFVPI	MFTVMNHLRQ	LLKMNMV--	-----	528
EppoNPV	PAANLDQSNY	FI---SFPL-	-----	-----	-----	492
CfMNPV (DEF)	PSANTDYSDY	FV---RFPL-	-----	-----	-----	493
OpMNPV	TAANMAYSDY	FV---RFPL-	-----	-----	-----	489
CfMNPV	TSANIAYSKY	FL---RFPL-	-----	-----	-----	491
BmNPV	TAANVPYSNY	YMYKSVLS--	-----	-----	IVMNHIAHF	506
AcMNPV	TAANVPYSNY	YMYKSVFS--	-----	-----	IVMNH_LTHF	506
SpltNPV	RAANVTYSKY	AMFDLVLPL	ITIFSMYL--	--Q-KL---	-----	509
SpliNPV	RAANVTYSKY	AMFDLILPML	ITIFSTYL--	--Q-KILSI	-----	515
HzSNPV	KAANVSYSKY	YMSDIIVPVI	TFLVMTHLQO	AIR-RLVVI	-----	515
HearNPV	KAANVSYSKY	YMSDIIVPAI	TFLVMTHLQO	AIR-RLVVI	-----	515