

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

DICKO OUSMANE-AMIROU

ÉTUDE EXPLORATOIRE DES INTERACTIONS DU
Bacillus thuringiensis ET DU VIRUS DE LA GRANULOSE
CHEZ LA TORDEUSE DES BOURGEONS DE L'ÉPINETTE
(Choristoneura fumiferana) (Clem.)
(Lepidoptera: Tortricidae)

AOÛT 1996

À toute ma Famille et mes Amis...

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
SOMMAIRE.....	x
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
1. TORDEUSE DES BOURGEONS DE L'ÉPINETTE (TBE) <i>CHORISTONEURA FUMIFERANA</i> (CLEMENS).....	9
1.1. Cycle vital de la TBE.....	9
1.2. Distribution géographique de <i>C. fumiferana</i>	14
1.3. Importance économique de <i>C. fumiferana</i>	14
1.4. Écologie et dynamique des populations de <i>C. fumiferana</i>	15
1.5. Moyens de contrôle biologique de <i>C. fumiferana</i>	16
2. LE VIRUS DE LA GRANULOSE (VG).....	19
2.1. Classification.....	20
2.2. Identification du virus de la granulose.....	22
2.3. Morphologie et ultrastructure.....	26
2.3.1. Génome viral.....	30

2.3.2. Protéines virales.....	31
2.4. Pathologies causées par le virus de la granulose.....	32
2.5. Réplication du virus de la granulose.....	34
2.6. Caractéristiques favorisant les virus de la granulose comme insecticide biologique.....	37
3. <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> ET LA LUTTE BIOLOGIQUE.....	39
3.1. Classification.....	42
3.2. Germination, croissance, sporulation et biogenèse du cristal chez <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
3.2.1. Germination.....	46
3.2.2. Division cellulaire	47
3.2.3. Sporulation.....	47
3.2.4. Biogenèse du cristal.....	50
3.3. Toxines insecticides produites par <i>Bacillus thuringiensis</i>	51
3.4. Inclusions parasporales à structure cristalline ou delta-endotoxines de <i>Bacillus thuringiensis</i>	54
3.5. Pathogénicité	56
3.6. Caractéristiques favorisant l'utilisation de <i>Bacillus thuringiensis</i> comme insecticide biologique.....	61
3.7. Désavantages de l'utilisation de <i>Bacillus thuringiensis</i> comme insecticide biologique.....	61
 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	 63
1. DÉTECTION DU VIRUS DE LA GRANULOSE DANS LA POPULATION NATURELLE DE <i>C. FUMIFERANA</i>	64
1.1. Échantillonnage sur le terrain.....	64
1.1.1. Préparation des échantillons larvaires.....	64

1.2. Technique de dépôt direct « touch Blot »	65
1.2.1. Fixation de l'ADN cible.....	65
1.3. Préparation des sondes moléculaires.....	66
1.3.1. Mini-préparation de l'ADN recombinant.....	66
1.4. Marquage des sondes	68
1.5. Hybridation moléculaire.....	69
1.5.1. Préhybridation.....	69
1.5.2. Hybridation.....	70
1.6. Lavage.....	70
1.7. Autoradiographie	71
2. ÉLEVAGE DES LARVES DE <i>C. FUMIFERANA</i>	71
2.1. Production du virus de la granulose	72
3. PURIFICATION DU VIRUS DE LA GRANULOSE (VG).....	73
3.1. Purification partielle	73
3.2. Microscopie électronique	74
3.3. Purification par gradient de glycérol.....	74
4. DÉTERMINATION DES DOSES INSECTICIDES ET CINÉTIQUE D'INFECTIONS PAR ESSAIS BIOLOGIQUES	78
4.1. Essais biologiques avec le virus de la granulose et <i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> HD-1 utilisés individuellement	81
4.2. Essais biologiques avec le mélange virus de la granulose et <i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> HD-1.....	83

RÉSULTATS	90
1. PRÉVALENCE DU VIRUS DE LA GRANULOSE DANS LA POPULATION NATURELLE DE <i>CHORISTONEURA FUMIFERANA</i>	91
2. DÉTERMINATION DU POTENTIEL INSECTICIDE DES DIFFÉRENTS AGENTS MICROBIENS UTILISÉS	96
2.1. Dose létale du virus de la granulose chez les larves de <i>C. fumiferana</i>	96
2.2. Dose létale du <i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1 chez les larves de <i>C. fumiferana</i>	107
2.3. Potentiel insecticide d'un mélange <i>B. thuringiensis var kurstaki</i> . HD-1 et du virus de la granulose sur des larves de <i>C. fumiferana</i>	114
3. SUIVI DE L'INFECTION DE <i>C. FUMIFERANA</i> PAR LE VIRUS DE LA GRANULOSE AU LABORATOIRE PAR LA TECHNIQUE DE L'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE.....	126
DISCUSSION	130
1. PRÉVALENCE DU VIRUS DE LA GRANULOSE DANS LA POPULATION NATURELLE DE <i>C. FUMIFERANA</i>	131
2. DÉTERMINATION DU POTENTIEL INSECTICIDE DES DIFFÉRENTS AGENTS MICROBIENS UTILISÉS	133
CONCLUSION.....	141
REMERCIEMENTS.....	144
BIBLIOGRAPHIE	147

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1:	Cycle vital de <i>Choristoneura fumiferana</i> (Clemens).....	12
FIGURE 2:	Virus de la granulose de <i>Choristoneura fumiferana</i> (CfGV), visualisé par coloration négative en microscopie électronique.....	28
FIGURE 3:	Diagramme schématique de la sporulation chez <i>Bacillus thuringiensis</i>	48
FIGURE 4:	Production et purification du CfGV.....	76
FIGURE 5:	Détermination des doses insecticides des différentes préparations microbiennes chez les larves de 4 ^e stade de <i>C. fumiferana</i>	86
FIGURE 6:	Détermination de l'incidence du CfGV dans la population naturelle de <i>C. fumiferana</i> par hybridation moléculaire	94
FIGURE 7:	Relation entre le pourcentage de mortalité chez les larves de 4 ^e stade de <i>C. fumiferana</i> et la dose (en granules) ingérée du CfGV après 288 heures d'incubation.....	102
FIGURE 8:	Relation entre la mortalité des larves de <i>C. fumiferana</i> et le temps d'incubation à différentes doses de CfGV	104
FIGURE 9:	Relation entre le pourcentage de mortalité chez les larves de 4 ^e stade de <i>C. fumiferana</i> et la dose (en ng) ingérée de <i>B.t.k.</i> HD-1 après 288 heures d'incubation	112
FIGURE 10:	Actions combinées du CfGV et de <i>B.t.k.</i> HD-1 sur des larves de 4 ^e stade de <i>C. fumiferana</i> pendant une période d'observation complète de 288 heures	120
FIGURE 11:	Suivi <i>in situ</i> de l'infection au laboratoire des larves de <i>C. fumiferana</i> en utilisant différentes doses de CfGV après 288 heures d'incubation.....	128

LISTES DES TABLEAUX

TABLEAU I:	Quelques préparations commercialisées à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
TABLEAU II :	Incidence du virus de la granulose dans la population naturelle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette dans la région de Bonaventure (Gaspésie) et dans la région de l'Outaouais (Wakefield).....	93
TABLEAU III:	Cinétique d'infection des larves de <i>C. fumiferana</i> soumises à l'action du virus de la granulose pendant une période d'incubation de 288 heures	97
TABLEAU IV:	Effet de l'administration de <i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> HD-1 sur des larves de <i>C. fumiferana</i> pendant une période d'incubation de 288 heures.....	108
TABLEAU V:	Cinétique d'infection des larves de <i>C. fumiferana</i> soumises aux actions combinées du virus de la granulose et de <i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> HD-1 pendant une période d'observation de 288 heures.....	116
TABLEAU VI:	Pourcentage des différents stades larvaires de <i>C. fumiferana</i> après 288 heures d'observation suite à l'utilisation de différentes doses combinées du virus de la granulose et de <i>B.t.k</i> HD-1.....	124

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	Acide déoxy-ribonucléique
<i>B.t.k.</i> HD-1:	<i>Bacillus thuringiensis var kurstaki</i> HD-1
CfGV:	Virus de la granulose de <i>Choristoneura fumiferana</i>
cpm:	coup par minute
CPV:	Virus de la polyhédrose cytoplasmique
DL ₅₀ :	Dose qui va causer de la mortalité dans 50% de la population testée
EDTA:	Acide éthylène diamine tétraacétique
VG:	Virus de la granulose
g:	force de la gravitation = 9,8 m/s ² dans le cas d'une centrifugation
kb:	kilopaire de base (10 ³ paires de bases)
l:	litre
M:	Molaire
mg:	milligramme (10 ⁻³ gramme)
ng:	nanogramme (10 ⁻⁹ gramme)
nm:	nanomètre (10 ⁻⁹ mètre)
N:	Effectif d'une population
NPV:	Virus de la polyhédrose nucléaire
pb:	paire de bases
PCR:	Réaction de polymérisation en chaîne
rpm:	révolutions par minute
SDS:	Sulfate dodecyl de sodium
TAE:	Tris acétate EDTA
TBE:	Tordeuse de bourgeons de l'épinette
TCA:	Acide trichloroacétique
TE:	Tris-HCl EDTA
μl:	microlitre (10 ⁻⁶ litre)
μCi:	micro Curie

SOMMAIRE

Choristoneura fumiferana (Clemens), plus connue sous le nom de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE), est un lépidoptère ayant des incidences économiques au Canada et aux États-Unis. Parmi les micro-organismes entomopathogènes efficaces contre cet insecte, on retrouve *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 (*B.t.k.* HD-1) et le virus de la granulose de *C. fumiferana* (CfGV) qui possèdent les critères de spécificité et de sécurité essentiels pour leur utilisation dans un programme de contrôle biologique des populations de la TBE.

Dans cette optique, partant d'un échantillon de plus 2000 larves de *C. fumiferana* prélevées sur le terrain, la présence du CfGV dans la population naturelle de l'insecte a été confirmée par les techniques du dépôt direct et de l'hybridation moléculaire. Par la suite, des doses létales (DL_{50}), de 10^5 granules pour le CfGV et de 5.5 ng en qui concerne le *B.t.k.* souche HD-1, ont été obtenus suite à des essais biologiques pratiqués sur un lot de plus de 2000 larves de TBE en élevage. L'utilisation concomitante de ces deux préparations insecticides a permis de mettre en évidence, non seulement l'existence des effets synergiques sur la mortalité, mais aussi un plus grand ralentissement dans le développement des différents stades larvaires chez la TBE. Ainsi, ces résultats représentent une étape importante dans le développement des conditions d'application du CfGV dans les programmes de lutte contre la tordeuse.

Les approches utilisées et les résultats obtenus nous permettent de tirer quelques conclusions sur la dynamique du virus de la granulose (CfGV) dans la population larvaire de la *C. fumiferana* en plus d'évaluer le potentiel du traitement combiné du CfGV et du *B.t.k.* HD-1 en lutte biologique. L'approche développée lors de la présente étude, en plus d'ouvrir la voie sur d'autres projets de recherches reliés au virus de la granulose de *C. fumiferana*, est utilisable pour le développement d'outils de lutte biologique contre d'autres insectes ravageurs de la forêt et du milieu agricole.

INTRODUCTION

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE), *Choristoneura fumiferana* (Clemens) est un insecte ravageur très important en Amérique du Nord. Ce lépidoptère indigène (Miller, 1963) peut avoir des incidences économiques, notamment durant les périodes épidémiques, par les dommages qu'il peut causer aux forêts conifériennes dans l'Est du Canada et des États-Unis. Les larves de la TBE se développent principalement sur le jeune feuillage du sapin baumier (*Abies balsamea* (Mill.) L.) et de l'épinette blanche, (*Picea glauca* (Moench) Voss). Dans une moindre mesure, l'insecte peut causer des dommages à l'épinette rouge (*Picea rubens* Sarg.) et à l'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) BPS).

Au Québec, en période épidémique, l'équivalent de 10 années de récoltes forestières, soit environ 18 millions de mètres cubes de bois, peuvent être détruites en une année par cet insecte (Miller, 1984). Les épidémies de tordeuse sont des phénomènes naturels et cycliques (Blais, 1985) pouvant durer généralement plusieurs années et couvrir de vastes territoires. Il a été démontré que les épidémies de *C. fumiferana*, au cours du vingtième siècle, ont été de plus en plus fréquentes, longues et étendues, par rapport aux deux siècles passés (Blais, 1964; 1985).

Depuis les dernières années, on observe une réduction des dommages causés par l'insecte, cependant, il faut s'attendre dans l'avenir à une nouvelle croissance de la population de *C. fumiferana* compte tenu des variations cycliques

des populations. À ce propos, une augmentation de la TBE est actuellement en progression dans la région de l'Outaouais (Anonyme, 1994) ce qui rend à nouveau d'actualité le problème de la TBE et de ses ravages forestiers.

Afin de réduire les pertes économiques engendrées par la défoliation des résineux, les autorités gouvernementales ont effectué dans le passé des arrosages intensifs au fénitrothion depuis les années 1950 jusqu'au milieu des années 80 (Guertin, 1992). Outre les problèmes de toxicité de ces insecticides, s'ajoute l'accumulation de résidus polluants difficilement biodégradables, le manque de spécificité et la capacité des insectes ravageurs à élaborer des mécanismes de résistance. Au cours des dernières années au Québec, l'utilisation des insecticides chimiques contre la TBE a fait l'objet d'intenses examens, par le Bureau d'Audience Publique sur l'Environnement (BAPE). Cette instance, de plus en plus consciente des risques que constitue ces insecticides pour l'environnement biophysique et la santé, a proposée dans un rapport de la commission sur la protection des forêts une réduction importante de l'utilisation des insecticides chimiques contre la tordeuse (BAPE, 1991).

La lutte biologique comme méthode de protection contre les insectes, constitue une alternative intéressante parce qu'elle fait appel à des agents biologiques naturels spécifiques aux organismes nuisibles visés. En effet, chaque espèce animale possède un grand nombre d'antagonistes qui lui sont associés de

façon caractéristique, soit en tant que micro-organismes pathogènes ou en tant qu'animaux (parasitoïdes) identifiés comme "ennemis naturels". Considérant le caractère ubiquitaire des micro-organismes dans la nature, il n'est pas étonnant de les voir associés à de nombreuses variétés d'insectes (Vincent et Coderre, 1992).

À ce sujet, plusieurs micro-organismes pathogènes aux insectes ont été isolés. Parmi ceux-ci, on retrouve *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (*B.t.*) et les virus qui possèdent les critères de spécificité et de sécurité et donc peuvent être utilisés comme régulateurs efficaces des populations d'insectes sinon pour prévenir leurs épidémies (Barbosa et Wagner 1989; Nadeau 1991).

Durant les 50 dernières années plusieurs bactéries ont été isolées et reconnues comme les micro-organismes le plus souvent associés aux pathologies d'insectes. Environ une centaine d'espèces sont spécifiquement entomopathogènes appartenant surtout aux familles des Pseudomonaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococaceae et Bacillaceae; mais seulement quelques bacilles du type sporulant ont été considérés pour la production de biopesticides (Rajnachel-Messaï, 1990).

Avec un marché de plus de 100 millions \$ U.S., le *B. t.* est le bacille entomophage le mieux connu car le plus intensément étudié et utilisé à l'échelle mondiale. Il accapare environ 80 à 90% du marché actuel des biopesticides et plus

de 400 formulations sont approuvées pour la répression des ravageurs aux États-Unis (Aronson *et al.*, 1986).

Selon le spectre d'action de la bactérie, quatre grands types d'isolats sont à distinguer: ceux qui ne sont actifs que sur les lépidoptères ou les diptères (ordre des moustiques et des simules ou mouches noires) ou les coléoptères (hannetons, scarabées), et ceux qui sont toxiques à la fois pour les lépidoptères et les diptères. Deux souches de *B. t.* sont largement exploitées actuellement en lutte biologique sous forme de biopesticides: le *B. thuringiensis* var *israelensis*, utilisé contre les diptères, en particulier contre les maringouins et les mouches noires, et le *B. thuringiensis* var *kurstaki*, plus particulièrement le sérotype HD-1, utilisé contre les chenilles de lépidoptères (Rajnachapel-Messaï, 1990).

Dans l'euphorie qui a suivi la découverte et l'utilisation du *B. thuringiensis*, dans le contexte de la lutte biologique, plusieurs croyaient avoir remporté la guerre contre les insectes ravageurs. Toutefois, l'utilisation du *B. thuringiensis* a favorisé l'émergence d'insectes pouvant résister à ces « potions miracles ». Il faut donc développer d'autres outils de lutte biologique pour contourner ce phénomène résistance (Johnson et McGaughey, 1987), tout en évitant de revenir aux méthodes polluantes que constituent l'application des insecticides chimiques.

À ce propos, environ 650 espèces de virus pathogènes d'insectes sont connues; ceci inclus des virus à ADN (baculovirus, iridovirus, poxvirus et parvovirus) et les virus à ARN (virus de la polyédrose cytoplasmique (CPV), rhabdovirus, enterovirus et autres) (Khachatourians, 1986).

La granulose, maladie causée par la présence du virus de la granulose (VG), se caractérise par une mortalité rapide des insectes infectés. Environ 150 espèces de lépidoptères, dont *C. fumiferana*, manifestent des niveaux différents de susceptibilité à l'infection par le virus de la granulose. Il a été proposé que le virus de la granulose de *C. fumiferana* (CfGV) pouvait peut-être jouer un rôle dans la régulation des populations larvaires lors des épidémies de la tordeuse, notamment dans le complexe parasitoïde et pathogène (Merzouki, 1989). Cependant, avant d'envisager l'utilisation effective de ces particules virales, il est nécessaire d'évaluer leur potentiel et, dans une certaine mesure, la mise en perspective de leur pouvoir insecticide en concomitance avec d'autres agents déjà éprouvés comme le *B. thuringiensis*. La difficulté dans la détermination du potentiel insecticide du VG réside dans l'absence d'informations sur les doses à soumettre aux insectes et dans la quantification des virus ingérés lors de l'évaluation de leurs effets (Kaup et Ebling, 1993).

C'est dans ce contexte que le présent travail se situe et vise l'amélioration des outils de lutte biologique de la TBE déjà disponibles. De façon plus précise, les objectifs de ce travail ont été dans un premier temps d'évaluer la présence du VG dans les populations larvaires de *C. fumiferana* récoltées en forêt. Par la suite, le potentiel insecticide (dose létale) et le temps d'infection du virus de la granulose de CfGV et / ou du *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 (*B.t.k.* HD-1) ont été évalués en conditions contrôlées. Enfin, les interactions (effets synergiques, indépendants ou antagonistes) découlants de l'utilisation concomitante des préparations du CfGV et *B.t.k.* HD-1 ont été déterminés afin de connaître leurs effets sur l'insecte et sur le développement des différents stades larvaires de *C. fumiferana*. Par ailleurs, l'utilisation des techniques appliquées a permis de suivre l'efficacité de l'infection virale en combinaison ou non avec *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 chez les larves de *C. fumiferana*.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. TORDEUSE DES BOURGEONS DE L'ÉPINETTE(TBE), *CHORISTONEURA FUMIFERANA* (CLEMENS)

Le genre *Choristoneura* inclut 8 espèces et 4 sous-espèces qui se nourrissent tous du feuillage et des cônes de différentes espèces conifériennes (Harvey, 1985). La tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE), a été nommé "*fumiferana*" comme espèce pour la première fois en 1865 par Clemens qui l'a assigné au genre des Tortrix (famille des Tortricidae) en se basant sur des spécimens capturés en Virginie. *Choristoneura fumiferana* (Clem.) est une espèce d'importance économique qui infeste périodiquement de vastes superficies des forêts conifériennes de l'Est du Canada et des États-Unis (Cunningham, 1982).

1.1. Cycle vital de la TBE

Le cycle vital de *C. fumiferana* a été décrit par Miller (1963a). Cette espèce subit une série de mutations pour passer par six stades larvaires avant de devenir chrysalide, puis papillon. Les oeufs sont pondus en juillet et sont généralement déposés en masse de taille et de forme variables sur les aiguilles des branches périphériques de la cime. Ceux-ci, dans des conditions favorables, éclosent huit à douze jours plus tard. Souvent, les critères de distinction entre les différents stades larvaires sont basés sur la taille et la largeur de la capsule céphalique.

L'émergence des larves du premier stade est généralement complétée vers la mi-août. Le premier stade larvaire est très petit, d'aspect jaune-verdâtre avec une capsule céphalique brune ou brun pâle. Les larves migrent alors vers l'extrémité des branches, où une certaine proportion d'entre elles peut être dispersée par les vents. Les larves qui restent ou qui se retrouvent sur un hôte approprié ne se nourrissent pas. Elles se tissent plutôt un hibernaculum soit au niveau des cicatrices de floraison, des pousses de lichens ou d'autres anfractuosités de l'écorce. Ainsi à l'abri, elles subissent une mue et passent l'hiver sous forme de 2^e stade. Les larves ont alors environ 1 mm de long. Au début mai de l'année suivante, les larves sortent de leur abri attirées vers l'extrémité des branches par un phototropisme positif.

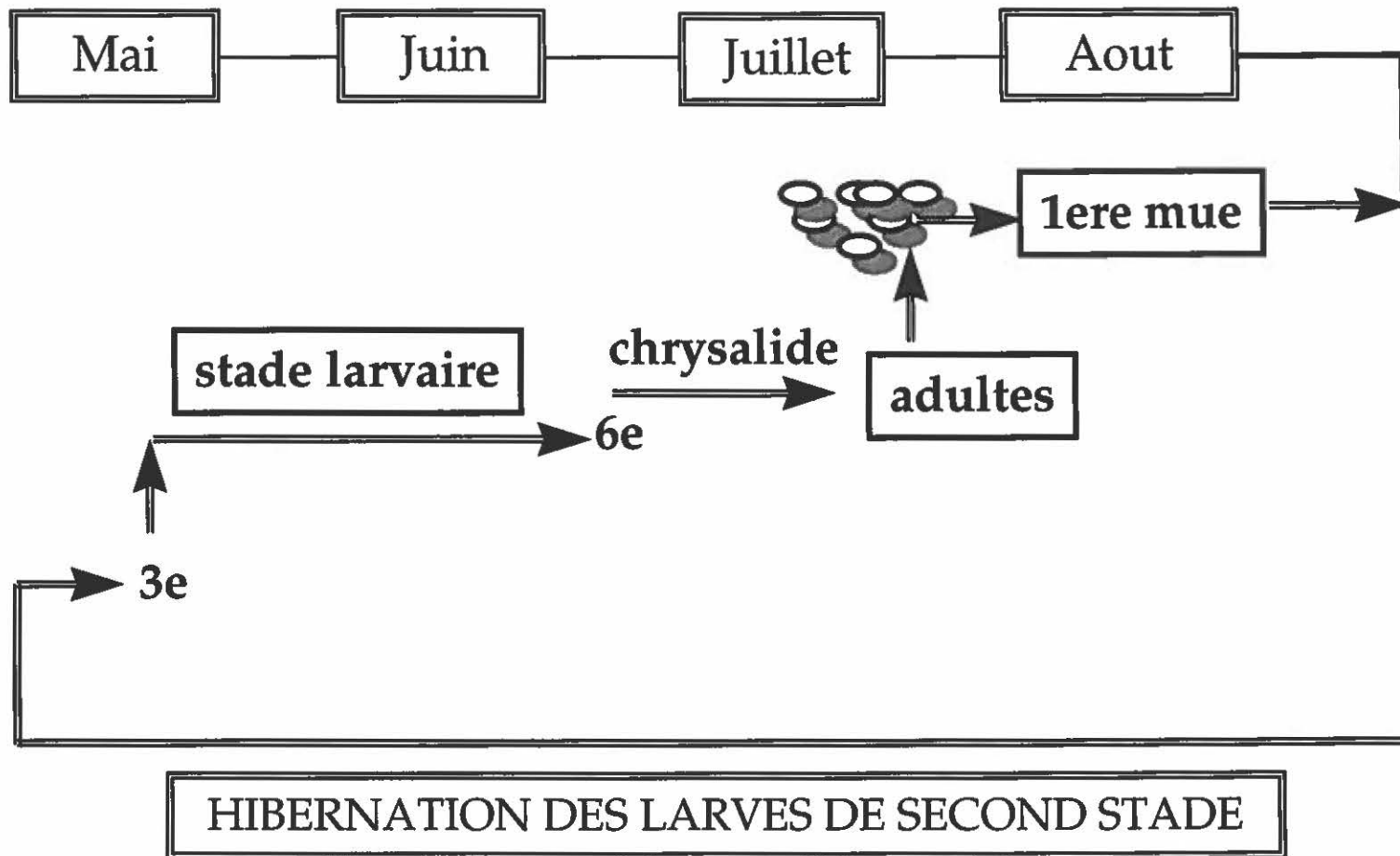
Les larves commencent dès lors à se nourrir préférentiellement des fleurs staminées, sinon des aiguilles âgées d'une ou de deux années ou encore les bourgeons végétatifs en expansion, en attendant le débourrement des nouvelles aiguilles. Lorsque ces dernières apparaissent, les larves commencent à s'en nourrir et poursuivront ainsi leur développement du 3^e au 6^e stade larvaire, sur une période s'étendant du début juin au début juillet. À la fin de leur développement, les larves atteignent une longueur de 18 à 25 mm avec une capsule céphalique brune ou noire. Le corps est plus foncé, parcouru de points jaunâtres le long de la surface dorsale. La majorité des dégâts sont causés par les

insectes du 6^e stade (de fin juin au début juillet), étant donné leur taille beaucoup plus importante (Miller, 1963a).

La larve se métamorphose en chrysalide généralement sur l'arbre hôte. L'adulte dont l'envergure des ailes fait 22 mm, émerge suite à sa métamorphose d'une durée de 8 à 12 jours. C'est un petit papillon de nuit de coloration grise ou brune tachetée d'une longévité d'environ deux semaines qui peut vivre de la mi-juillet au début août. L'oviposition prend place 4 à 10 jours suivant l'accouplement (Miller, 1963a).

FIGURE 1:

Cycle vital de la tordeuse de bourgeons de l'épinette,
Choristoneura fumiferana (Clemens). (tiré de Miller, 1963)



1.2. Distribution géographique de *C. fumiferana*

La TBE est un insecte associé aux forêts boréales, aux grands-lacs, au bassin du fleuve St.-Laurent et aux régions forestières de l'Acadie où les sapins baumiers et les épinettes blanches sont répandus (Rowe, 1972). Au Canada, le Québec, l'Ontario et le Nouveau-Brunswick sont les provinces les plus affectées. Au Québec, l'équivalent de 10 années de récoltes forestières, soit 18 millions de mètres cubes de bois, sont détruits en une année par cet insecte en période épidémique (Miller, 1984). Depuis le début de 1969, l'apparition en milieu forestier québécois de nouveaux foyers d'infestation par *C. fumiferana* était considérée comme épidémique. Cependant, on observe depuis quelques années une nette décroissance de ce phénomène (Kondo et Moody, 1987). En 1986, la distribution géographique des populations de la TBE sur le territoire québécois s'étendait sur une superficie de 2,83 millions d'hectares de forêts, dont 26% subissaient des dommages qualifiés de graves (Bordeleau *et al.*, 1988).

1.3. Importance économique de *C. fumiferana*

La TBE s'attaque de préférence au sapin baumier, (*Abies balsamea* (Mill.) L.) et à l'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss). Elle cause parfois des dommages à l'épinette rouge (*Picea rubens* Sarg.) et à l'épinette noire (*Picea mariana*

(Mill.) BPS) (Greenbank, 1963). Les épidémies de *C. fumiferana* sont un phénomène naturel et cyclique (Blais, 1985). Elles durent généralement plusieurs années et peuvent couvrir de vastes territoires. Durant 10 à 20 ans, les populations sont très élevées et causent les dommages, puis retournent à un niveau endémique (Blais, 1985).

En perspective, malgré une diminution des dommages causés par *C. fumiferana*, on peut s'attendre, dans l'avenir, à une nouvelle croissance de sa population, tant au Québec que dans le reste du Canada et aux États-Unis. Cependant, depuis 1991, une résurgence de la population de la TBE dans une partie de la région de l'Outaouais a été observée, ce qui rend d'actualité le problème relié à cet insecte (Guertin *et al.*, 1996).

1.4. Écologie et dynamique des populations de *C. fumiferana*

Les populations de tordeuses fluctuent considérablement sur de vastes territoires sans que les principales causes de cette fluctuation soient entièrement connues. Plusieurs facteurs, tels que les grandes étendues de forêts de sapins matures (> 40 ans) et de quelques étés chauds et secs successifs, ou la combinaison des deux semblent favoriser la survie de l'insecte et le développement d'épidémies de tordeuses (Blais, 1985). L'origine des épidémies est difficile à

établir car les dégâts sur les arbres ne deviennent apparents qu'après 3 ou 4 années d'augmentation des populations (Blais, 1985). La dispersion des larves et surtout des adultes agit probablement comme stimulateur pour accélérer la croissance d'une épidémie déjà amorcée dans toutes les localités (Romaya, 1984).

1.5 Moyens de contrôles biologiques de *C. fumiferana*

La littérature contient plusieurs exemples de micro-organismes pathogènes qui affectent plusieurs variétés d'insectes. Les micro-organismes entomopathogènes connus incluent certaines espèces de champignons, de protozoaires, de microsporidies, de nématodes, de virus et des bactéries.

Royama (1984) a publié une étude sur la dynamique de population de la TBE. Il perçoit les cycles de population de cet insecte comme une courbe proie-prédateur, sur laquelle les pathogènes de *C. fumiferana* ainsi qu'un facteur de mortalité inconnu auraient un rôle important à jouer (Blais, 1985; Fleming, 1985). Il existe en effet une quinzaine de maladies causées par des micro-organismes chez la TBE. Les agents entomopathogènes, principalement les bactéries, les virus et les microsporidies sont reconnus pour jouer un rôle clef dans la régulation des populations d'insectes et dans une certaine mesure préviennent leurs épidémies (Barbosa et Wagner, 1989; Nadeau, 1991). L'intérêt relié à l'utilisation de ces

organismes réside dans leur haut degré de spécificité vis-à-vis des insectes cibles et de la faible incidence qu'ils peuvent avoir sur les organismes non-cibles. Certains de ces organismes causent des maladies qui peuvent tuer les insectes, réduire leur potentiel de reproduction ou ralentir leur croissance et leur développement. L'étude épidémiologique de ces pathogènes est donc essentielle à une meilleure compréhension des phénomènes de population chez cet insecte (Fleming, 1985).

Il a été démontré que l'utilisation de *B. t.* est un moyen efficace de lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Près de nous, une étude conjointe de l'Institut Armand-Frappier et du Ministère des Ressources Naturelles du Québec a permis d'augmenter l'efficacité insecticide des formulations commerciales de *B. t.* utilisées contre cet insecte (Guertin *et al.*, 1996).

Plusieurs virus sont de plus en plus considérés comme des outils possédant un potentiel réel utilisable dans le contrôle biologique des populations d'insectes ravageurs. L'intérêt des virus d'insectes est qu'ils sont particulièrement résistants à l'action enzymatique durant la décomposition de l'hôte infecté, pouvant permettre une auto-transmission, qu'ils ont un degré de spécificité très élevé et que chaque souche se caractérise par des temps d'action très particuliers. Parmi les virus d'insectes, les baculovirus sont les plus étudiés en lutte biologique (Kurstak et Tijssen, 1982).

Quatre types de virus (le virus de la polyédrose nucléaire, le virus de la granulose qui nous intéresse dans cette étude, le virus de polyédrose cytoplasmique et l'entomopoxvirus) ont été isolés dans les populations naturelles de la TBE (Fleming, 1985). Plusieurs espèces de lépidoptères, dont la TBE, manifestent des susceptibilités à l'infection par le VG. On croit que ce virus peut jouer un rôle important dans la régulation des populations larvaires lors des épidémies de tordeuses (Merzouki, 1989). Ainsi l'utilisation du VG dans le contrôle des populations d'insectes ravageurs demeure une perspective intéressante pour l'avenir.

2. VIRUS DE LA GRANULOSE

Les virus pathogènes d'insectes les mieux connus et les plus diversifiés dans le contexte de la lutte biologique sont les baculovirus (Miller, 1984; Granados et Williams, 1986). Les baculovirus, les entomopoxvirus et les virus de la polyédrose cytoplasmique partagent tous une caractéristique qui est unique aux virus d'insecte, c'est-à-dire de produire des corps d'occlusion; ces virus se présentent donc sous une forme dite «occluse ». Ce terme signifie que les virions sont empaquetés à la fin du cycle de réplication dans une structure paracrystalline de nature protéique appelé "polyèdre" ou "corps d'inclusion". La forme occluse est en général la forme infectieuse des virus d'insectes, celle qui est soluble dans les sucs gastriques de l'hôte (Crook et Jarrett, 1991).

Les Baculoviridae sont spécifiques aux familles et même aux genres d'insectes chez lesquels ils ont été isolés. En raison de cette spécificité, les baculovirus, comme le VG, sont de plus en plus des candidats importants utilisables dans la gestion des populations d'insectes nuisibles en milieux forestiers et agricoles (Tanada *et al.*, 1970). Outre leur spécificité, ces virus ne causent pas de maladies chez les animaux et les humains, ne représentent pas de problèmes de pollution dans l'environnement et possèdent une action à long terme dans le contrôle des insectes ravageurs à cause de leur présence dans les populations naturelles des insectes cibles (Wood *et al.*, 1996). Les virus de la

granulose infectent spécifiquement les insectes spécialement des espèces appartenant à l'ordre des lépidoptères et possiblement quelques insectes de l'ordre hyménoptères. Approximativement 150 espèces susceptibles chez les lépidoptères sont principalement retrouvées dans les familles des Noctuidae et des Tortricidae (Rajnochapel-Messaï, 1990).

Parmi les développements sur l'étude des virus d'insectes citons la manipulation génétique qui permet d'introduire dans le génome viral des gènes codant pour des toxines, afin d'augmenter ou d'ajuster la spécificité de la virulence du biocide vis-à-vis d'hôtes particuliers (Miller *et al.*, 1983; Faulkner *et al.*, 1986). Les progrès de la culture de tissus d'insectes laissent entrevoir la possibilité de la mise au point de techniques industrielles économiques de production de biopesticides viraux (Granados *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1996).

2.1. Classification

Paillot, en 1926, a été le premier à décrire les symptômes d'une maladie, différente de la polyédrose nucléaire, mais d'origine virale chez les larves de *Pieris brassicae*. L'infection par ce virus a été dénommée une première fois "pseudograsserie" par Paillot en 1926 et plutard classifiée comme une granulose par Steinhaus en 1945 après observation au microscope photonique de petites

granules fines dans l'hémocoel des larves infectées. Le nom générique de *Bergoldia* fut donné au VG en l'honneur de Bergold qui, pour la première fois en 1948, a confirmé la nature virale de ces granules lors d'une étude en microscopie électronique des tissus larvaires de *Choristoneura murinana* infectés de virions en forme de bâtonnet dans des corps d'inclusions (capsules) (Tanada *et al.*, 1989).

Weiser a séparé les VG en virus cytoplasmique (*Bergoldia*) et nucléaire (*Steinhausia*) mais le comité sur la nomenclature des virus des insectes a retenu un seul genre: *Bergoldiavirus*. De nos jours, le virus de la granulose fait partie de la famille des *Baculoviridae*: virus enveloppés, à ADN double-brin (90-230 kb), circulaires et non-segmentés, qui tirent leur nom de la forme en bâtonnet de la nucléocapside (Latin *baculum*). La famille des *Baculoviridae* se subdivise en deux sous-famille: les *Eubaculovirinae*, qui possèdent des corps d'inclusion et les *Nudibaculovirinae*, caractérisées par l'absence de corps d'inclusion. Les *Eubaculovirinae* comportent deux genres: les virus de la polyédrose nucléaire (NPV) et les virus de la granulose (VG) qui ne possède qu'une nucléocapside par virion et qu'un virion par corps d'inclusion. Les *Nudibaculovirinae* quant eux ne possèdent qu'une nucléocapside par virion. Comparativement aux NPV, bien peu de choses sont connues sur le VG. La famille des *Baculoviridae* est composée d'un seul genre: *Baculovirus* qui se divise en 3 sous-groupes selon le type d'enveloppe qui contient les virions (Matthews, 1982). Ce sont des virus enveloppés à double

chaîne d'ADN, occlus ou non occlus, qui se répliquent uniquement dans le noyau des cellules hôtes (Tanada *et al.*, 1989).

Il existe aussi un sous-groupe des baculovirus appelé de type *Oryctes* qui a été isolé chez le Coléoptère *Oryctes rhinoceros* (Payne, 1974). Les virions en bâtonnets ne sont pas inclus dans un corps d'inclusion et la transmission est assurée par la forme virale libre.

Les baculovirus sont identifiés selon leur insecte hôte. Citons comme exemple le NPV d'*Autographa californica* (AcNPV), le VG de *Choristoneura fumiferana* (CfGV) qui fait l'objet de cette recherche ainsi que le VG de *Pieris brassicae* (PbGV) (Kelly, 1982).

2.2. Identification du virus de la granulose

Il existe des méthodes de détection fiables et simples à utiliser qui permettent d'évaluer l'implication des VG dans la dynamique des populations larvaires des insectes ravageurs, leur incidence dans la nature, leur cinétique de dissémination, leur pouvoir pathogène et le suivi lors des tests de biosécurité. Dans les paragraphes suivants nous allons détaillé quelques unes de ces méthodes.

L'examen visuel peut être utile lorsque les larves infectées présentent des symptômes caractéristiques des épizooties provoquées par les virus. Les larves sont peu mobiles à un stade d'infection avancé, elles arrêtent de se nourrir et présentent un aspect flasque peu de temps après (David, 1978). Il s'agit d'un examen qui, en plus d'être peu sensible, ne permet pas de discriminer les infections provoquer les virus et les bactéries puisque les larves infectées présentent des symptômes similaires.

Le microscope électronique, grâce à son pouvoir de résolution très élevé, permet une détection efficace, puisqu'il est facile de visualiser les virus de la granulose par simple coloration négative à partir d'échantillons larvaires. Les techniques d'imprégnation négative permettent de voir les structures virales dans leur intégrité.

L'établissement des cartes peptidiques et des profils génomiques de divers VG clivés par des endonucléases de restriction ont permis de différencier entre les souches de VG et d'établir leur degré d'homologie avec les différents membres de la famille des Baculoviridae. Ainsi il a été démontré que les protéines du corps d'inclusion sont plus conservées à l'intérieur du sous-groupe B qu'elles ne le sont avec les protéines du corps d'inclusion du sous-groupe A (Summers et Smith, 1975). C'est une approche qui fait généralement appel à du matériel viral purifié,

elle n'est donc pas recommandée pour la détection directe du virus sur un broyât larvaire.

Plusieurs techniques sérologiques ont été utilisées pour l'identification des VG (Crook et Payne, 1980; Ward *et al.*, 1987). Crawford *et al.*, (1978) en sont arrivés à distinguer la granuline et la polyédrine grâce à des techniques radioimmunologiques (RIA). Crook et Payne (1980) ont réussi à distinguer la granuline de différentes souches de VG par les techniques d'ELISA. Summers et Hoops (1980) ont confirmé la grande similitude des granulines du TnGV et du SfGV par les techniques d'immunodiffusion et de RIA. Cependant, malgré la sensibilité de ces techniques, elles ont une fiabilité limitée due au faible pouvoir de discrimination entre des souches très rapprochées de VG (Ward *et al.*, 1987) et entre certains membres des sous-groupes A et B des baculovirus surtout à cause de nombreuses réactions croisées qui peuvent survenir.

Les sondes d'acides nucléiques sont des séquences précises d'ADN ou d'ARN simple brin capables, dans des conditions d'hybridation précises, de retrouver leurs séquences complémentaires et de s'y hybrider pour former un duplex stable (Spiegelman *et al.*, 1973). Les sondes peuvent être marquées à l'aide d'un isotope radioactif tel que le $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dans le dCTP (Meinkoth et Wahl, 1984). La détection de la réaction d'hybridation se fait par comptage ou par autoradiographie. Les sondes peuvent également être marquées par des

molécules non-radioactives (sondes froides) telle la biotine suite à une incorporation par la technique de déplacement des coupures "nick translation" à l'aide de l'ADN polymérase I ou par attachement direct d'une enzyme à l'acide nucléique telles la phosphatase alcaline ou la peroxydase (Renz et Kurz, 1984). La détection de la réaction d'hybridation fait appel à des systèmes enzymatiques qui transforment un substrat incolore et soluble en un produit coloré et insoluble. Les sondes moléculaires sont utilisées non seulement dans le diagnostic d'infections virales, mais aussi dans la détection de séquences de gènes associés à des maladies génétiques. L'utilisation des sondes moléculaires, en tant que moyen de détection des virus pathogènes d'insectes, est une approche assez récente. Elles se sont avérées plus sensibles et plus spécifiques lors d'une étude comparative pour la détection des NPV que la microscopie photonique ou la RIA (Ward *et al.*, 1987).

Le PCR est une autre approche de la biologie moléculaire qui permet l'amplification *in vitro* des séquences d'ADN ou d'ARN. Le principe de cette technique est basé sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase (Taq polymérase) issue d'une archéobactérie *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988). La Taq polymérase est une enzyme capable de copier un brin d'ADN ou d'ARN matrice en un brin complémentaire par élongation à partir de l'extrémité 3'OH d'une amorce d'oligonucléotides. Chaque cycle se compose de trois (3) étapes successives: une dénaturation à 95°C, une hybridation, à une température de 37°C

à 55°C, des amorces à l'ADN matrice et une étape d'élongation à une température de 70°C à 75°C durant laquelle la Taq polymérase va copier le brin d'ADN matrice.

En théorie, avec le PCR, il devrait être possible d'avoir une augmentation exponentielle de l'ADN initial à la fin de chaque cycle, soit 2 exposant n (n étant le nombre de cycles). En pratique, l'amplification est de l'ordre de 1,85 exposant n après 20 cycles, 1,80 exposant n après 30 cycles et 1,65 exposant n après 40 cycles. La technique de PCR peut ainsi servir à la détection directe du CfGV chez les larves par amplification de la séquence d'un gène précis (Saiki *et al.*, 1988).

2.3. Morphologie et ultrastructure:

Les VG sont de forme ovocylindrique de 300 à 500 nm de longueur variant entre 150 à 350 nm de largeur (Tweeten *et al.*, 1983). Ils possèdent un ADN bicaténaire et circulaire, variant de 70 à 110 kb (Burgess, 1977); dans le cas du CfGV on parle de 107 kb (Arif *et al.*, 1986).

La matrice protéique, qui semble contribuer à la stabilité du virus dans la nature, est constituée principalement d'une matrice cristallisée dont la sous-unité de base est la granuline (Summers et Smith, 1978). Cette matrice protéique est entourée d'une couche électrodense (Kawanishi *et al.*, 1972) dont la nature est encore controversée. Des études de diffraction aux rayons X (Beaton et Filshie, 1976) et les mesures en microscopie électronique (Harrap et Juniper, 1966) ont aussi démontrées que la capsid est composée de sous-unités protéiques imbriquées les unes sur les autres, protégeant ainsi le génome viral des exonucléases (Burley *et al.*, 1982).

La nucléocapside enveloppée en forme de bâtonnet fait 260 à 360 nm de longueur par 30 à 60 nm de largeur (Tweeten *et al.*, 1981). L'enveloppe à triple couches de 5 à 6 nm d'épaisseur a une structure similaire à celle des lipoprotéines, les couches externes sont de nature protéique (Beaton et Filshie, 1976). La capsid virale est formée de sous-unités protéiques assemblées en un réseau régulier. Les études de diffraction (Beaton et Filshie, 1976) et les mesures en microscopie électronique ont démontré que ce réseau est composé de sous-unités protéiques en anneaux imbriquées les unes sur les autres protégeant ainsi le génome viral des exonucléases (Burley *et al.*, 1982).

FIGURE 2:

Le virus de la granulose de *Choristoneura fumiferana* (CfGV),
visualisé par coloration négative en microscopie électronique.

(barre = 200 nm).



—

2.3.1. Génome viral

Le génome des VG est formé d'une molécule d'ADN double brin circulaire. Une proportion de 21 à 24% de ces molécules d'ADN est sous forme superhéliçoïdale, le reste est sous forme circulaire relâchée (Tweeten *et al.*, 1981). Le degré du super enroulement n'a pas été déterminé avec précision puisque la plupart de l'ADN extrait des virions est sous forme circulaire relâchée.

Le génome de 37 microns de longueur, d'un poids moléculaire variant entre 69×10^6 à 111×10^6 (Burgess, 1977), est en association étroite avec un polypeptide fortement basique d'un poids moléculaire d'environ 13k qui semble stabiliser l'ADN dans les nucléocapsides (Tweeten *et al.*, 1981).

Des cartes biophysiques ont confirmé la nature circulaire du génome et son poids moléculaire par addition des différents fragments d'ADN générés par les endonucléases de restriction. Par exemple, la taille du génome CfGV est de l'ordre de 107 kb (Arif *et al.*, 1986). Elles ont également permis la localisation des gènes importants pour les études d'expression et pour la comparaison de génomes de différents VG, entre eux et avec d'autres baculovirus (Ackermann et Smirnoff, 1983).

2.3.2. Protéines virales

Le corps d'inclusion est composé principalement d'une protéine cristallisée de 270 à 378 kDa (Croizier et Croizier, 1977) dont la sous-unité, la granuline est un polypeptide de 25 à 30 kDa qui équivaut au niveau de la structure de base à la polyédrique, la sous unité de la protéine du corps d'inclusion des NPV (Summers et Smith, 1976). Une protéase alcaline est souvent associée au corps d'inclusion (Tweeten *et al.*, 1978). Cette protéase, sous des conditions alcalines similaires à celles de l'intestin moyen des insectes, serait à l'origine de la dissolution de la matrice protéique au niveau de l'intestin moyen des larves infectées libérant ainsi des nucléocapsides enveloppées.

Nagata et Tanada (1983) ont montré que le suc digestif de *Pseudaletia unipuncta* (Pu) possède un haut niveau d'activité protéolytique et que la protéase alcaline peut être un produit (contaminant) du suc digestif qui, sous des conditions ioniques faibles, est absorbé par les corps d'inclusion des VG infectants. En effet, il a été noté chez les NPV que les corps d'inclusion purifiés à partir de larves infectées contiennent des protéases actives tandis que ceux purifiés à partir de cultures cellulaires ne possèdent aucune activité protéolytique (Zummer et Faulkner, 1979). La protéase alcaline facilitant la dissolution des corps d'inclusion n'est pas nécessaire à la réplication des virus et il peut s'agir d'une enzyme fournie par l'insecte hôte.

Yamamoto et Tanada (1980) ont rapporté la présence d'une protéine associée au corps d'inclusion d'environ 120 kDa qui semble favoriser la surinfection par le NPV chez *Pseudaletia unipuncta* (Pu) déjà infecté par le VG. Zhu *et al.*, (1989) et Hukuhara et Zhu (1989) ont purifié à partir de l'enveloppe virale de PuGV un facteur synergique "SyF" (protéine de 98 KDa) qui accroît l'infection par les NPV *in vitro* et *in vivo*.

Les gènes qui codent pour la granuline de TnGV et PbGV ont été séquencés (Chakerian *et al.*, 1976). Hashimoto (1991) a isolé des corps d'inclusion du TnGV une protéine de 104 kd (VEF), qui cause la dégradation de la membrane péritrophique de l'insecte et ensuite séquencé le gène codant pour cette protéine (Hashimoto *et al.*, 1991).

2.4. Pathologies causées par le VG

La pathologie causée par le VG varie selon plusieurs facteurs comme le type, la virulence, le dosage du virus, l'âge de la larve hôte et, plus particulièrement, le type de tissus chez l'hôte susceptible. En général, les larves d'insectes sont plus susceptibles à l'infection par le VG durant les jeunes stades larvaires.

Les symptômes typiques de l'infection par le virus de la granulose incluent la léthargie, une perte d'appétit, un géotropisme négatif, l'augmentation d'une apparence blanchâtre causée par la présence du virus dans les noyaux de l'hypoderme et les tissus adipeux. Les larves mortes par l'action du virus présentent un hémolymphe laiteux, bourré de virus dont la proportion peut atteindre jusqu'à 1×10^9 / larves infectées.

La pathologie du VG entre dans trois catégories de syndromes: le type 1 dans lequel l'hypoderme (l'intégument) est non-infecté mais plusieurs autres organes sont infectés, le type 2 dans lequel l'hypoderme et les autres organes sont infectés et le type 3 dans lequel le principal organe infecté est l'intestin moyen (Tanada et Hess, 1984). La plupart des VG provoquent le syndrome de type 1 ayant les corps gras comme principaux cibles. Dans ce type de syndrome, les larves infectées ont un développement lent et peuvent présenter un aspect plus gros que les larves non-infectées (Tanada, 1959). Dans certains cas, la vie des larves infectées peut être prolongée au-delà du stade normal de la puppe et même jusqu'à l'émergence de l'adulte (Tanada, 1959, Tanada et Hess, 1984). Ces effets pathologiques peuvent être associés au mauvais fonctionnement du système hormonale. La période de l'infection létale dépend cependant largement du dosage du virus, de la virulence, de l'isolat viral et de l'âge de la larve. Les larves ayant subi le syndrome de type 1 démontrent un premier indice de l'infection

par le VG avec une perte d'appétit et des changements progressifs de couleur allant de la couleur normale à une couleur pâle blanchâtre ou laiteuse d'apparence jaunâtre, particulièrement dans la région abdominale (Huger, 1963). A un stade plus avancé de l'infection, les larves deviennent sévèrement tachetées dû à l'hypertrophie des corps gras. Avec l'initiation du changement de la coloration, les larves deviennent progressivement faibles, molles et flasques avec l'appétit fortement réduit. Quelques jours avant la mort, la couleur tourne au brun pour devenir noir à la mort des larves due vraisemblablement à l'invasion et à la multiplication des bactéries.

2.5. Réplication des virus de la granulose

Dans la nature, le cycle d'infection est biphasique: une infection primaire est assurée lors de l'ingestion par la larve de nourriture contaminée de particules virales incluses et une infection secondaire, assurée par les nucléocapsides enveloppées (Tanada et Leuttenegger, 1970; Summers, 1971). La transmission du virus par voie transovarienne reste un éventuel mode de transmission vertical (Granados *et al.*, 1978).

L'infection primaire du virus de granulose s'échelonne sur toute la période larvaire (Granados et Williams, 1986). Lors de cette infection, les corps

d'inclusion se retrouvent dans l'environnement alcalin de l'intestin larvaire, ce qui a pour effet de provoquer la solubilisation de la matrice protéique permettant ainsi la libération de la nucléocapside enveloppée (Summers, 1971). Le VEF en dégradant la membrane péritrophique, favorisera la pénétration du virion à l'intérieur des cellules épithéliales de l'intestin par endocytose. Ainsi, ce sont les cellules épithéliales qui sont susceptibles dans un premiers temps à l'infection virale (Summers, 1971); l'enveloppe virale fusionne aux microvillosités de ces cellules et la nucléocapside se retrouve dans le cytoplasme après absorption par endocytose (Summers, 1971). La nucléocapside traverse ensuite le cytoplasme jusqu'aux pores nucléaires où le génome viral s'introduit environ quatre heures après l'infection laissant la capsidie vide dans le cytoplasme (Granados, 1976; Summers, 1971). Il s'ensuit une phase d'éclipse de 12 à 16 heures pendant laquelle s'effectue la transcription et la réplication de l'ADN viral dans le noyau (Summers, 1971). Les premières nucléocapsides libres, dont la morphogénèse implique apparemment l'assemblage de la capsidie suivie de l'addition d'une nucléoprotéine, sont observées dans les plaques du stroma virogène, site probable de synthèse de l'ADN, 20 heures après l'infection (Summers, 1971). À 24 heures après l'infection, la progéniture virale représentée par les nucléocapsides enveloppées, est observée dans l'hémolymphe de l'insecte (Granados, 1980). L'enveloppe de la nucléocapside est acquise, soit par synthèse de novo (Tweeten *et al.*, 1981), soit simplement par bourgeonnement au niveau des membranes intracytoplasmiques (Tanada et Leutenegger, 1970), ou directement par

bourgeonnement au niveau de la membrane basale (Robertson *et al.*, 1974). Vingt-quatre heures post-infection, les virions se retrouvent dans l'hémolymphe de l'insecte (Granados, 1980).

L'infection secondaire est assurée par les nucléocapsides enveloppées. Le tropisme tissulaire est étroit et le tissu adipeux semble le plus susceptible ainsi que les tubules de Malpighi (Stairs *et al.*, 1966) et l'épiderme (Beegle, 1979). L'adsorption et la pénétration dans les cellules, précédant la viropexie, semblent se faire après l'attachement spécifique d'une partie de l'enveloppe virale à la membrane de la cellule hôte (Tweeten *et al.*, 1981). Les noyaux des cellules infectées s'hypertrophient, la chromatine s'accumule sur les bords des membranes nucléaires et il y a formation du stroma virogène (Tweeten *et al.*, 1981). La formation des nucléocapsides peut se faire soit dans le noyau (Summers, 1971), soit dans le cytoplasme après destruction des noyaux (Arnott et Smith, 1968). L'acquisition de l'enveloppe se fait soit par synthèse de novo (Summers, 1971) soit à partir du réticulum endoplasmique des cellules infectées.

À la fin de l'infection primaire, seules quelques nucléocapsides sont incluses dans la matrice protéique. Cependant lors de l'infection secondaire, il y a cristallisation de la granuline autour de presque toutes les nucléocapsides enveloppées (Tweeten *et al.*, 1981). Les cellules infectées remplies de granules

sont lysées, la dissémination et la transmission des VG dans la nature sont assurées, après la mort de l'insecte, par la forme virale incluse.

2.6. Caractéristiques favorisant les VG comme insecticide biologique

Il existe certaines caractéristiques insecticides principales qui font de ce groupe de virus des candidats intéressants comme biopesticide dans le contrôle des populations larvaires de certains insectes ravageurs:

(i) la grande pathogénicité pour leurs hôtes qui appartiennent uniquement à l'ordre des Lépidoptères. Les VG sont souvent spécifiques au genre, voire même à l'espèce (Chang et Tanada, 1978; Ignoffo, 1968).

(ii) la stabilité: les VG peuvent être conservés pendant de longues périodes sans perdre leur activité (David et Gardiner, 1967a, b).

(iii) Les VG ont des hôtes connus chez les invertébrés seulement, et ne présenteraient aucun danger pour les mammifères et autres vertébrés. Peu résistants par rapport à la radiation ultraviolette, les virus occlus sont par ailleurs tolérants et stables dans les autres milieux protégés. Cela leur confère une longue persistance et une durabilité utiles dans l'optique de la production de biopesticides (Jacques, 1973; Fuxa., 1987).

(iv) leur utilisation est compatible avec d'autres formes de pesticides dans les programmes de lutte intégrée. Ils peuvent être utilisés avec des quantités

minimales d'insecticides chimiques et éviter ainsi l'accumulation de ces derniers dans la nature (Jacques et Long, 1978).

(v) les VG n'ont, pour l'instant, démontrés aucun effet toxique, pathogène, carcinogène ou tératogène vis-à-vis des vertébrés, des plantes ou des invertébrés non-cibles (Groner, 1986).

Le principal désavantage des VG, tout comme les autres virus entomophages demeure la difficulté de les propager en masse à faible coût, compte tenu du caractère obligatoire de leur multiplication à partir de tissus intacts d'insectes convenables (Cunningham, 1987). L'utilisation du virus de la granulose comme alternative aux insecticides chimiques a été de façon générale considérée comme problématique pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le coût de production des pesticides viraux dans la plupart des pays a été considérablement plus élevé que celui des insecticides chimiques. D'autre part, l'avenir commercial du virus entomophage est actuellement incertain, particulièrement si l'on considère l'avance très marquée et accélérée que connaît la production de biopesticides à base de bactéries (Wood *et al.*, 1996).

3. *BACILLUS THURINGIENSIS* ET LA LUTTE BIOLOGIQUE

Les formulations de *B. thuringiensis* sont utilisées depuis plus de deux décennies comme insecticides biologiques pour la répression des ravageurs (Höfte et Whiteley, 1989). Les préparations commerciales à base de spores et de cristaux de delta-endotoxine du *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sont offertes sur le marché dans plusieurs pays; parmi les marques commercialisées au Canada, citons les noms commerciaux tels que "Bactospéine", "Bactur", "Dipel" et "Thuricide" (Rajinchapel-Messaï, 1990).

Le pouvoir toxique de ces bactéries pour les insectes a été remarqué au début du siècle par le japonais Ishiwata (1902) qui a isolé chez des larves de vers à soie (*Bombyx mori*) malades, une bactérie qu'il a alors dénommé *Bacillus sotto*. La dénomination de cette bactérie sous le nom de *Bacillus thuringiensis* vient de Berliner qui en 1911 le fit en souvenir de la ville de Thuringen, en Allemagne (Berliner, 1911). La présence des corps d'inclusions a été décrite plus tard par Berliner en 1915 et ensuite confirmée par Mattes en 1927.

TABLEAU I:

Quelques préparations commercialisées à
base de *Bacillus thuringiensis*. (Tiré de Rajnchapel-Messaï, 1990).

<i>B. thuringiensis</i> souches / variétés	CIBLES	NOMS COMMERCIAUX	COMPAGNIES PRODUCTRICES
H1/<i>thuringiensis</i> ou H3/<i>kurstaki</i>	Larves de Lépidoptères	Dipel Bactospéine Thurcide Foray Biobit Foil/Condor Dendrobacilline	Abbott (États-Unis) Solvay (Belgique) Sandoz (Suisse) Novo Nordisk. (Danemark) Novo Nordisk Ecogen (États-Unis) Glavmikrobioprum (Russie)
H7/<i>aizawai</i>	<i>Galleria mellonella</i> (Teigne des ruches)	Certan Florbac	Sandoz Solvay
H14/<i>israelensis</i>	Larves de Diptères (Moustiques & Simulies)	Vectobac Bactimos Teknar Skeetal	Abbott Solvay Sandoz Novo Nordisk
H8/<i>morrisoni</i> (<i>tenebrionis</i> et San Diego)	Larves de Coléoptères (ex. Doryphore)	DiTerra M-One Trident Novodor	Abbott Mycogen (États-Unis) Sandoz Novo Nordisk

3.1. Classification

Le *B. t.* appartient au groupe des bactéries sporulantes du genre *Bacillus*, de la famille des Bacillaceae. Ce sont des bactéries du sol, Gram⁺, aérobies en forme de bâtonnets, mobiles grâce à des flagelles péritriches, à spore ovale subterminale non déformante, caractérisée par son aptitude à produire, selon les souches, une ou plusieurs inclusions cristallines au moment de la sporulation (Aroson *et al.*, 1986).

Cette espèce est taxonomiquement très proche de *Bacillus cereus* du point de vue de sa similarité dans les propriétés biochimiques (Gonzalez et Dulmage, 1981). En effet, la détermination du % G + C aussi bien que la technique d'hybridation de l'ADN suggèrent une ressemblance génétique entre *B. thuringiensis*, *B. cereus* et même *B. anthracis* un pathogène virulent pour l'homme et les animaux (Kaneko *et al.*, 1978). Cependant, cette ressemblance apparente va contre la nature entomopathogène des différentes sous-espèces de *B. thuringiensis* qui d'importance pratique, trouvent de nombreuses applications dans le contrôle biologique des insectes vecteurs de plusieurs maladies humaines et animales, des ravageurs agricoles et forestiers (de Barjac et Frachon, 1990).

B. thuringiensis est une espèce bactérienne complexe répartie en une vingtaine de variétés ou sérotypes-H, identifiables par des tests sérologiques et

biochimiques, qui produisent plusieurs toxines insecticides, dont la plus utilisée est la delta-endotoxine (Dulmage, 1970). Plusieurs tentatives de classification réalisées sur les différents isolats de *B. thuringiensis* par plusieurs auteurs (Heimpel et Angus, 1959), ont permis de mettre en évidence un grand nombre de caractères communs.

Une des premières approches à être utilisée, pour la classification des *B. thuringiensis*, est le système basé sur la caractérisation biochimique et morphologique qui exploite les techniques microbiologiques conventionnelles (Heimpel et Angus, 1959).

Le système de classification généralement accepté est celui introduit par de Barjac et Bonnefoi (1963; 1973). Depuis son introduction en 1963, cette méthode a permis de mettre de l'ordre dans l'identification des souches de *B. thuringiensis* en basant leur classification sur des caractéristiques sûres, stables et spécifiques c'est-à-dire le sérotypage par l'agglutination des protéines flagellaires dénommées antigènes H (de Barjac et Frachon, 1990). Chaque sérotype correspondant à un groupe biochimique basé sur un antigène H, c'est ainsi que grâce à ce système, 22 sérotypes (sous-espèces) sont connus (de Barjac et Frachon, 1990).

Jusqu'en 1977, on pensait que *B. thuringiensis* était exclusivement inféodé aux lépidoptères (ordre d'insectes comprenant principalement les papillons)

(Bulla *et al.*, 1975). Cela était dû à un manque de connaissances sur les variations observées dans le spectre d'activité chez les différentes sous-espèces de *B. thuringiensis*. En général, la subdivision des isolats de *B. thuringiensis*, utilisant les techniques d'immunodiffusion, d'ELISA et de « Western blot » dans la sérologie des cristaux est aussi valable que celle basée sur les antigènes-H (Krywienczyk *et al.*, 1978). La sérologie des cristaux a en effet, permis de diviser *var kurstaki*, sérotype-H 3a 3b en deux groupes. Conséquemment, cette subdivision a été renforcée par la découverte d'une spécificité d'action des isolats et ces sous-variétés ont été désignées « K-1 » et « K-2 » puis après HD-Nos selon le type de cultures dans lesquelles elles ont été reconnues pour la première fois.

Plusieurs souches de *B. thuringiensis* avec différents spectres d'insectes hôtes ont été identifiées (Burgess, 1981). La plupart des souches de *B. thuringiensis* sont actives contre les larves de certains membres des lépidoptères, mais certains démontrent aussi un pouvoir toxique contre les espèces de diptères. Krieg *et al.*, (1983) ont conçu un système de classification des pathotypes basé sur le spectre d'activité: le pathotype A, qui manifeste une toxicité pour les lépidoptères, exemple: *B. thuringiensis var. kurstaki* (H3a, H3b) (Höfte et Whiteley, 1989).

La technique de séquençage de l'ADN de *B. thuringiensis* a conduit à la caractérisation de différents types de gènes codant pour les cristaux protéiques (Kronstad & Whiteley, 1983). L'identification de tels gènes sur de nouveaux

isolats est maintenant possible par l'utilisation de sondes spécifiques (Visser, 1989) ou d'anticorps monoclonaux (Höfte *et al.*, 1988). Les protéines cristallines insecticides seraient codées par des gènes de 4,5, 5,3 et 6,6 kb ou gènes CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c) (Préfontaine, Brousseau *et al.*, 1987; Höfte et Whiteley, 1989). Ces techniques ont conduit au développement d'outils efficaces pour la comparaison des souches de *B. thuringiensis* et de leurs pathogénicités relatives.

Depuis plusieurs années, l'identification des sous-espèces de *B. t.* repose sur des caractéristiques sérologiques et phénotypiques (de Barjac et Frachon, 1990). Cependant même si une certaine corrélation existe entre le cristal parasporal entomocidal et les antigènes H flagellaires, la sérologie ne permet pas de distinguer entre les différentes souches de *B. thuringiensis* var *kurstaki*. Récemment, une technique d'identification rapide des souches de *B. thuringiensis* a été mise au point en utilisant la réaction de polymérase en chaîne (PCR) multiplex (Bourque *et al.*, 1993). L'amplification de l'ADN a été faite avec des amorces spécifiques sélectionnées à partir des gènes CryI A(a), CryI A(b) et CryI A(c) codant pour 3 cristaux majeurs de *B. thuringiensis* générant ainsi des produits profils de PCR caractéristiques à chaque souche de *B. thuringiensis* sous-espèce *kurstaki* (Adang *et al.*, 1985; Schnepf *et al.*, 1985). La différenciation à l'intérieur de ces souches a été ensuite faite sur la base des profils électrophorétiques des produits de PCR. Le PCR multiplex est une méthode rapide pour la détection et la classification des souches de *B. thuringiensis* sous-espèce *kurstaki* et permet un

meilleur suivi des formulations commerciales et des souches issues de l'environnement (Bourque *et al.*, 1993). Il est possible d'utiliser ce test en combinaison avec les tests biochimiques pour distinguer les sous-espèces les unes des autres (Bourque *et al.*, 1993).

3.2. Germination, croissance, sporulation et biogenèse du cristal chez *B. thuringiensis*

3.2.1. Germination

La germination est une séquence d'événements conduisant la spore à sa conversion en une cellule active pouvant se diviser. La spore est formée par une division asymétrique de la cellule en dormance, jusqu'à ce que les conditions environnementales évoquent certains changements dans la configuration macromoléculaire et subséquemment permettent le début d'activités métaboliques mesurables au niveau de la spore. Une fois cet état physiologique atteint, la spore devient active métaboliquement et entre dans une phase de croissance végétative. Le cycle vital de *B. t.*, comme celui des autres bacilles, est caractérisé par deux étapes distinctes, soit la division des cellules végétatives et le développement de la spore (Fast, 1971).

3.2.2. Division cellulaire

La cellule végétative de *B. t.* est un bâtonnet de 2 à 5 μm de long par 1 μm de large tel qu'illustré à la figure n° 2 tirée de Fast (1981). La division cellulaire se fait par la formation des septa qui apparaissent le long de la membrane cellulaire souvent aux endroits où celle-ci forme des vésicules. Un septum de division est une extension de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique (Betchel *et al.*, 1976; Fast, 1981).

3.2.3. Sporulation

La spore bactérienne en dormance est le stade ultime de la sporulation. Une fois complètement formée, elle représente un état cryobiotique dans lequel les activités métaboliques et de développement sont inexistantes sinon au minimum. Il existe plusieurs stades de développement de la spore chez *B. thuringiensis* passant par: la formation des filaments axiaux (I); la formation des septa (II); l'engouffrement i.e. la première apparition des inclusions ovoïdes et de cristaux parasporaux. Il est à noter qu'il y a un changement dans la coloration des membranes et du cytoplasme suivi d'une formation d'une ébauche de la spore (la préspore) (III); la formation de l'exosporium (IV à VI); la maturation de la spore et la lyse du sporangium (VII).

FIGURE 3:

en haut: Diagramme schématique des différentes étapes de la sporulation de *B. thuringiensis*.
(tiré de Fast, 1981).

en bas: Micrographie des cristaux delta-endotoxines produits par *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1.
(Sharpe *et al.*, 1979).

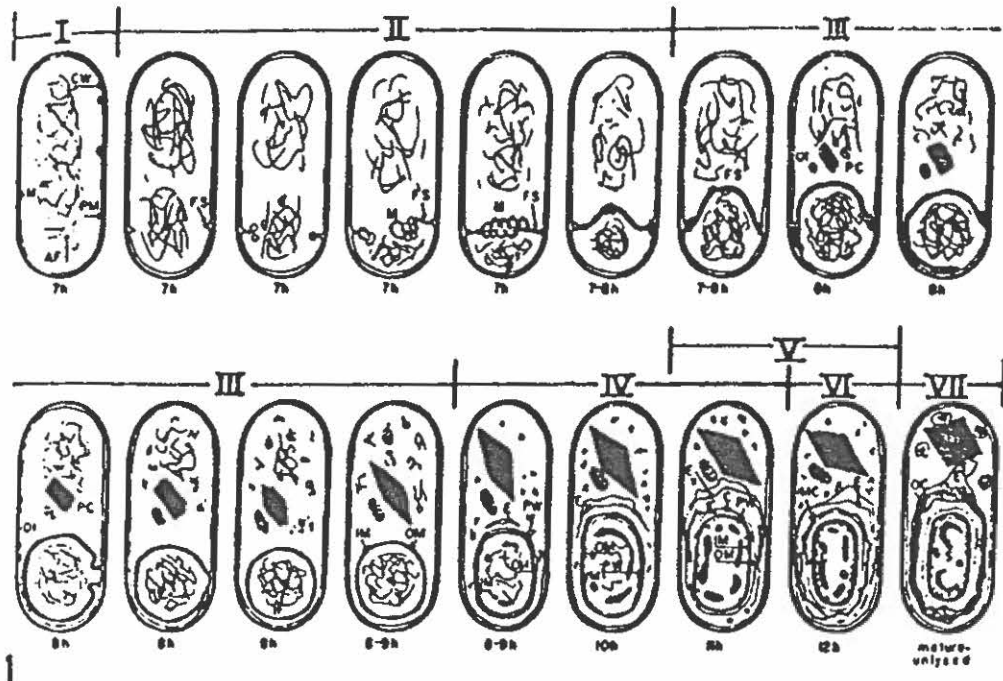


FIG. 1. Diagrammatic scheme of sporulation in *B. thuringiensis*. Abbreviations: M, mesosome; CW, cell wall; PM, plasma membrane; AF, axial filament; FS, forespore septum; IF, incipient forespore; OI, ovoid inclusion; PC, paraspore crystal; F, forespore; IM, inner membrane; OM, outer membrane; PW, primordial cell wall; E, exosporium; LC, lamellar spore coat; OC, outer spore coat; C, cortex; IMC, incorporated mother cell cytoplasm; S, mature spore in an unlysed sporangium.

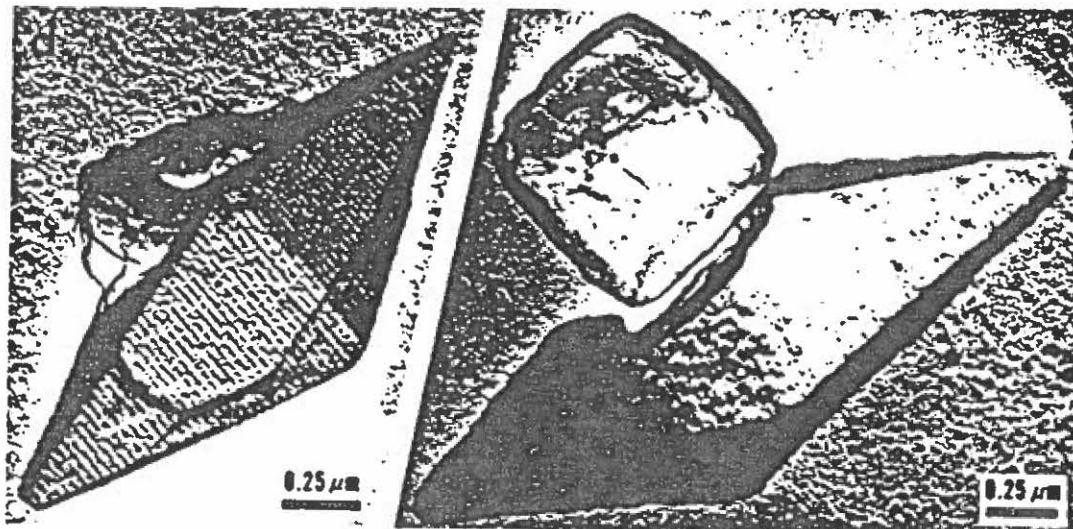


FIGURE 2

3.2.4. Biogenèse du cristal

La biosynthèse du cristal parasporal a lieu en même temps que la sporulation à partir de la membrane de la préspore, débutant simultanément avec la formation des septa au stade II et se terminant après la sporulation au stade IV. Le temps entre son apparition et la sporulation varie selon les différentes souches de *B. t.* et selon le site de synthèse du cristal à l'intérieur de la cellule. Dans le cas de *B. thuringiensis* sub. *kurstaki*, le cristal parasporal est le premier élément observé durant l'engouffrement (stade III). Les cristaux antigéniques peuvent être détectés et le début de la formation des cristaux a été observé au microscope durant la fin du stade II (Sommerville, 1971; Fast, 1981). Une fois sa formation initiée, le cristal protéinique continue d'être synthétisé jusqu'à la fin du stade IV; bien que cette synthèse puisse se poursuivre jusqu'au stade VI (Fast, 1981).

Les événements biochimiques conduisant à la production du cristal débutent à la fin de la phase de croissance logarithmique avec une augmentation de la synthèse des acides nucléiques lorsqu'un ARNm stable codant pour les cristaux protéiniques est produit (Young et Fitz-James, 1959). Il a été bien établi qu'une protéine ayant la solubilité, les caractéristiques antigéniques et chromatographiques ainsi que le poids moléculaire et la composition en acides aminés similaires à ceux du cristal protéinique est associée à la spore de *B. thuringiensis* (Sommerville, 1971). Cette protéine a été localisée dans la face

interne de l'exosporium et dans la membrane de la spore par la technique de marquage aux anticorps.

Des analyses quantitatives ont démontrées que le cristal est composé majoritairement de protéines, l'absence d'acides nucléiques a été démontrée par l'absence de phosphore ou d'un pic d'absorption à 260 nm (Hanney et Fitz-James, 1955, Angus, 1956). Aucune composante lipidique n'a été détectée par l'extraction au chloroforme-méthanol (Bulla *et al.*, 1977), cependant, la présence de 5,6% de carbohydrates consistants en du glucose et du mannose dans un rapport de 2:1 a été détecté dans les cristaux de *B. thuringiensis var kurstaki*. Par ailleurs, Faust *et al.*, (1973) ont mis en évidence la présence de Ca, Fe, Mg et Si à des concentrations significatives par la technique de spectroscopie d'émission (Höfte et Whiteley, 1989).

3.3. Toxines insecticides produites par *Bacillus thuringiensis*

Chez les micro-organismes, les toxines semblent être des produits métaboliques normaux et leur rôle dans la pathogénicité n'est que secondaire. Les toxines bactériennes ont été divisées en plusieurs catégories. Les toxines libérées dans le milieu sont des exotoxines tandis que celles associées à la cellule, habituellement à la paroi cellulaire, sont des endotoxines. En prenant le terme

toxique dans un sens très large, *B. thuringiensis* produit jusqu'à cinq principaux constituants toxiques élaborés au cours de son cycle de croissance. Il s'agit dans l'ordre de leur apparition, des cellules végétatives, des exoenzymes, des exotoxines, des endotoxines et des endospores (généralement appelés spores). Lorsque les spores se retrouvent dans un environnement de croissance approprié, elles germent pour donner naissance à des cellules végétatives qui entrent en phase active de croissance exponentielle. Durant cette période, l'activité enzymatique étant maximale, les enzymes hydrolytiques dégradent les éléments nutritifs du milieu pour favoriser leur absorption par les cellules. Certaines variétés sécrètent aussi des exotoxines: la alpha-exotoxine thermolabile ou "facteur souris", identifiée comme une lécithinase-C par Toumanoff (1953) et la bêta-exotoxine thermostable, ou "facteur mouche" ou encore "thuringiensine". Cette dernière a été, pour la première fois dénommée "bêta-exotoxine" par Heimpel (1967). Elle a été identifiée chimiquement comme un analogue des nucléotides adénines et de l'ATP. Cette exotoxine démontre des effets de toxicité plus accrues lors d'une injection parentérale que lors d'ingestions orales autant chez les insectes que chez les vertébrés. Des effets tératogènes chez les insectes et la possibilité de mutations à amener les autorités à interdire l'utilisation de cette toxine au Canada et aux U.S.A. Après une phase de croissance très active, les cellules entrent en sporulation et produisent de façon simultanée la toxine cristalline: delta-endotoxine (classification par Heimpel, 1967). Alors que la bêta-exotoxine est un poison à large spectre, la delta-endotoxine dans le cristal de *B.*

thuringiensis possède un spectre d'activité limité aux lépidoptères, aux moustiques, aux Chironomides et aux mouches noires (Dubois et Lewis, 1981).

Même si la delta-endotoxine reste le principal facteur, il est difficile d'ignorer l'importance potentielle de la spore lorsque l'on aborde la question du rôle insecticide de la delta-endotoxine. Sommerville *et al.*, (1971) ont démontré que dans certaines conditions un mélange des spores et des cristaux était plus efficace que les cristaux seuls. L'évidence est venue avec les travaux de Burgess *et al.*, (1976) qui ont démontré que l'action des spores se situe dans l'ajout de toxines additionnelles provenant de l'enveloppe de la spore ou d'une infection secondaire provoquée par les spores en germination dans l'intestin des larves (Whiteley et Schnepf, 1986).

En 1974, Gingrich *et al.*, ont rapporté que 4 espèces de poux (*Bovicola bovis*, *B. crassipes*, *B. limbata* et *B. ovis*) étaient susceptibles aux poudres contenant le mélange spores-endotoxines de *B. thuringiensis* var *kurstaki* (HD-1), un isolat qui ne produit pas de beta-exotoxine normalement toxique pour les poux. En se basant sur des expériences antérieures, il paraissait invraisemblable que ces effets toxiques soient dus à la delta-endotoxine; donc les auteurs ont suggérés que la toxicité chez les poux était surtout due à une toute autre entité chimique qu'ils ont dénommé le "facteur de perte" (Dubois et Lewis, 1981).

3.4. Inclusions parasporales à structure cristalline ou delta-endotoxine de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis sérovar H3a3b (sous-espèce *kurstaki*) est largement utilisé pour le contrôle des lépidoptères en agriculture et en foresterie (Falcon, 1971). Cet insecticide biologique est le seul utilisé au Québec (Canada) pour la répression de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Bourque, *et al.*, 1993).

Le principal composé insecticide des préparations commerciales de *B. thuringiensis* actuels est un corps protéinique cristallin formé pendant la sporulation de la bactérie. Ce corps cristallin est aussi appelé cristal, corps parasporal, ou delta-endotoxine (Heimpel et Angus, 1959). Chaque cellule bactérienne forme une spore à une de ses extrémités et un cristal dans l'autre. Lors de la lyse cellulaire, après la sporulation, les cristaux et les spores sont libérés dans le milieu et sédimentent ensemble. Des études en microscopie électronique et par diffraction aux rayons x indiquent que la sous-unité la plus visible du cristal est en forme de bâtonnet bipyramidale avec des dimensions variables de l'ordre de 5 x 15 nm (Norris, 1971) ou 9 x 13,5 nm (Fast, 1981).

Les inclusions parasporales à structure cristalline ou protoxines sont composées de glycoprotéines, dont la masse moléculaire, comprise entre 27 kDa, 65-67 kDa et 133-145 kDa, varie avec les sous-espèces bactériennes. La forme des

cristaux varie également: elle est bipyramidale ou rhomboïdale chez le pathotype A, et irrégulière, cuboïde ou ovoïde chez *B. thuringiensis* var *israelensis*. Il a été démontré que les sucres alimentaires influent sur la forme des cristaux; ceux-ci apparaissent au début du développement du septum de la spore en formation, au cours de la sporulation, avec le commencement de la synthèse des protéines de la toxine (Geiser, *et al.*, 1986).

Le cristal en tant que structure ne constitue pas la delta-endotoxine. La toxine serait plutôt une partie des molécules produites après solubilisation du cristal par des conditions de milieu alcalin, des tampons alcalins réducteurs ou par une variété d'enzymes donnant ainsi des molécules de différentes tailles dont certaines sont toxiques et d'autres non. Les delta-endotoxines issues de différents isolats de *B. thuringiensis* peuvent différer quantitativement et qualitativement par leurs activités insecticides. Les inclusions cristallines de *B. thuringiensis* se dissolvent dans l'intestin moyen libérant un ou plusieurs cristaux protéiniques entomocides (aussi appelés delta-endotoxines) ayant une masse moléculaire de 27 à 140 kilodaltons (kd) (Höfte et Whiteley, 1989). Ces cristaux sont des toxines actives pouvant interagir avec les cellules épithéliales de l'intestin moyen des larves d'insectes cibles.

3.5. Pathogénicité

Pour produire des effets pathogènes, un micro-organisme doit entrer dans l'organisme hôte, interférer avec les mécanismes de défense et causer des dommages aux tissus de l'hôte au profit de la multiplication du pathogène, souvent précédés d'une prise massive de contrôle de la victime par la libération de toxines. La pathogénicité d'une bactérie peut donc être définie comme sa capacité de causer des dommages se manifestant par une maladie normalement mortelle chez l'hôte infecté. Le mode de pathogénicité de *B. thuringiensis* est de provoquer une paralysie stomacale de l'hôte par libération de la delta-endotoxine (Lüthy et Ebersold, 1981).

B. thuringiensis produit un cristal protéinique, la delta-endotoxine qui appartient à la famille des protéines Cry (Höfte et Whiteley, 1989). La majeure partie des toxines produites par *B. thuringiensis* sous-espèce *kurstaki* HD-1 est représentée par trois sortes de protéines appartenant à la classe de CryI A désignée CryI A(a), CryI A(b) et CryI A(c) (Höfte et Whiteley, 1989). Même si ces trois protéines ont une homologie en acides aminés de 80% (Adang, Idler et Rocheleau, 1987) elles démontrent des différences dans leur spectre d'activité contre les insectes de l'ordre des lépidoptères (van Frankenhuysen et Brousseau, 1992). Par exemple, la CryI A(a) seule est toxique pour les larves de *Bombyx mori*,

tandis que toutes les 3 sortes de protéines sont toxiques pour les larves de *C. fumiferana*.

Lorsque les larves des lépidoptères susceptibles ingèrent les cristaux toxiques produits par les bactéries, les toxines sont dissoutes dans l'intestin moyen ce qui donne lieu à des symptômes pathologiques produits par les delta-endotoxines. Dépendamment de la dose des toxines et des espèces d'insectes en cause, la réponse aux toxines peut varier de la cessation temporaire de l'alimentation des larves à la paralysie complète des pièces buccales et stomacales. La delta-endotoxine est une protoxine qui est convertie en une toxine active par des enzymes protéolytiques présentes dans l'intestin moyen des insectes cibles (Lüthy, 1980).

Plusieurs spécialistes s'accordent pour dire que les delta-endotoxines agissent généralement en premier lieu sur les cellules épithéliales de la membrane intestinale des larves. En effet, des examens en microscopie révèlent que les cellules épithéliales gonflent et éclatent complètement sous l'effet des delta-endotoxines. L'absence de période de latence avant l'apparition de premiers symptômes, suggère que les toxines n'ont pas besoin d'être internalisées pour médier la cytotoxicité (Knowles et Ellar, 1987).

Selon Angus (1968), la valinomycine (un transporteur des ions potassium K^+) a des effets mimétiques des toxines sur l'intestin moyen des larves du ver à soie. Il suggère donc que la delta-endotoxine pourrait fonctionner comme un transporteur des ions K^+ causant des altérations de la perméabilité des cellules épithéliales de la membrane de l'intestin moyen en désorganisant la régulation du transport des ions K^+ . En effet, lorsque les larves des vers à soie ingèrent les cristaux toxiques elles arrêtent immédiatement de s'alimenter et leurs corps subissent une paralysie graduelle; ce phénomène s'accompagne par une augmentation de la concentration des ions K^+ dans l'hémolymphe des larves.

Des études histopathologiques utilisant des techniques de microscopie électronique ont permis une bonne compréhension des effets causés par les toxines chez les larves. En effet, il semble que ces toxines provoquent la disparition des involutions basales, un gonflement des microvillosités apicales, la vésiculation du réticulum endoplasmique concomitamment avec la perte des ribosomes et des effets traumatiques au niveau des mitochondries (Nishiitsustsuji-Uwo et Endo, 1980; Lüthy, 1982; Perci et Fast, 1983). Des cultures cellulaires de tissus d'insectes ont aussi démontrées plusieurs des mêmes symptômes (Nishiitsustsuji-Uwo et Endo, 1979; Ebersold *et al.*, 1980; Nishiitsustsuji *et al.*, 1980). Selon ces mêmes auteurs, ces effets surviennent aussi vite que 5 minutes après le traitement; tandis que Fast et Donahue (1971) ont démontré que les changements métaboliques sont détectables une minute après le

traitement et se poursuivent pendant 10 à 15 minutes avec la désorganisation métabolique qui s'en suit.

Fast a aussi rapporté que le contenu en ATP des cultures cellulaires des tissus d'insectes étaient réduit essentiellement à zéro 5 minutes après traitement avec la toxine de *B. thuringiensis*. Fast et Morrison (1972), après étude de la dynamique du transport ionique (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) entre les tissus du tube digestif et l'hémolymphe, ont conclu que les variations de concentrations de K^+ n'étaient qu'un effet secondaire découlant d'une altération de l'épithélium du tube digestif plutôt que d'une altération spécifique du transport des ions K^+ .

D'après Faust et coll. (1974), la delta-endotoxine pourrait affecter la phosphorylation oxydative par la formation de complexes avec les intermédiaires des produits de réaction. Il en découle une désintégration irréversible de la paroi du tube digestif lorsque l'ATP endogène devient un facteur limitant.

Knowles et Ellar, 1987, ont étudiés les effets de toxines de différentes souches de *B. thuringiensis* sur la perméabilité des cultures cellulaires de tissus d'insectes en utilisant de petites molécules marquées radioactivement. Après traitement avec les toxines, ils observèrent une libération rapide de petites molécules des cellules. Sur la base de ces observations, les auteurs ont proposés que les préparations de toxines de *B. thuringiensis* provoquaient une lyse

osmotique en induisant la formation de petits pores (de 0,5 à 1 nm de diamètre) dans la membrane des cellules épithéliales résultant en un flux net des ions et s'accompagnant d'une entrée massive d'eau provoquant le gonflement des cellules et leur lyse subséquente.

Des épreuves d'électrophysiologie et de biochimie (Knowles et Ellar, 1986) démontrent que ces toxines provoquent des pores dans la membrane cellulaire de l'intestin moyen causant ainsi une rupture de la balance osmotique. Conséquemment les cellules gonflent sous l'effet d'un flux osmotique et éventuellement éclatent. Certains auteurs suggèrent que le pH (Jaquet, Hütter et Lüthy, 1987) et les protéases (Haider, Knowles et Ellar, 1986) dans l'intestin de l'insecte jouent un rôle dans l'activation de la protoxine de *B. thuringiensis*.

Pour la plupart des toxines de *B. thuringiensis*, l'existence de sites de fixation hautement spécifiques sur les cellules épithéliales de l'intestin moyen des larves a été démontrée (Hofmann *et al.*, 1988). La technique de marquage au ^{125}I a permis de démontrer l'existence de récepteurs spécifiques sur la membrane plasmique des cellules épithéliales de l'intestin des insectes cibles (Lüthy et Ebersold, 1981; Hofmann, Lüthy, Hütter et Pliska, 1988). La base moléculaire de la spécificité des inclusions protéiques cristallines de *B. thuringiensis* pour les récepteurs membranaires a été confirmée par Van Rie *et al.*, (1990) par marquage des toxines au ^{125}I .

3.6. Caractéristiques favorisant l'utilisation de *B. thuringiensis* comme insecticide biologique

De toutes les bactéries pathogènes des insectes, *B. thuringiensis* présente certains avantages pour son utilisation dans la lutte biologique. Les bacilles n'étant pas des parasites cellulaires, ils ont en principe l'avantage sur les virus et les protozoaires de pouvoir être cultivés en masse *in vitro* dans des milieux de cultures simples et peu coûteux, ou par des méthodes de fermentations traditionnelles (Dulmage et Rhodes, 1971; Yousteen *et al.*, 1984). La production de la spore stable permet son utilisation directe avec les équipements conventionnels dans le contrôle des insectes nuisibles. Ces bactéries, spécifiques d'espèces, n'attaquent pas les humains, les autres mammifères ou la faune non-cible. D'autre part, la persistance des spores dans l'environnement permet d'avoir un certain contrôle à long terme sur les insectes.

3.7. Désavantages

B. thuringiensis induit rarement des épizooties, excepté dans le cas où les insectes présents en nuées sont confinés à un endroit isolé (Ex. dans un grenier).

Les préparations des spores ou des cristaux parasporaux de *B. t.*, une fois appliquées aux feuillages sont lessivées par les pluies et peuvent être inactivées par les rayons du soleil. Ceci fait qu'une seule application n'offre qu'une protection à court terme.

D'autre part, il existe une possibilité de résistance de l'insecte à l'insecticide microbiologique (McGaughey, 1990; McGaughey et Johnson, 1987; Goldman *et al.*, 1986). La résistance au *B.t.* a déjà été observée sur le terrain et dans les souches sélectionnées au laboratoire. Dans certains cas, cette résistance est associée à une réduction de l'affinité des récepteurs pour les toxines (Rajinchapel-Messaï, 1993). En effet, l'action du *B.t.* est due à la fixation des delta-endotoxines sur des molécules réceptrices pouvant subir des mutations induisant ainsi des résistances. La perte de toxicité peut aussi résulter d'une modification de l'activité des enzymes de détoxification, essentiellement les estérases et les mono-oxygénases à cytochrome P450 (Bergé, 1987).

Finalement comme autre désavantage, l'action du *B.t.* se manifestant dans l'intestin moyen des larves d'insectes, les toxines insecticides doivent être ingérées pour être efficaces.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. DÉTECTION DU VIRUS DE LA GRANULOSE DANS LA POPULATION NATURELLE DE LA TBE

1.1. Échantillonnage sur le terrain

La première étape du projet fut d'abord de recueillir, de façon aléatoire, sur les sites de Wakefield et de la Gaspésie, des branches d'épinettes infestées par *C. fumiferana* et de prélever les larves de la TBE dans le but d'évaluer chez ces dernières la présence du VG. L'échantillonnage des larves sur les différents sites qui font l'objet d'un suivi annuel a été effectué en collaboration entre les équipes du Ministère des Ressources naturelles du Québec et de l'Institut Armand-Frappier.

1.1.1. Préparation des échantillons larvaires

Les larves de *C. fumiferana* de différents stades ont été recueillies sur le terrain et placées de façon individuelle dans des microtubes de 1,5 ml pour le diagnostic de la présence du virus de la granuloze par la technique de dépôt direct ("touch blot") mise au point dans nos laboratoires (Nadeau, 1991).

1.2. Technique du dépôt direct "touch blot"

Avec cette technique, la larve est broyée dans le microtube avec un volume d'eau équivalent au volume occupé par la larve. De ce broyât, 3 μ l de la suspension ont été déposés directement sur une membrane de Nylon de 0,2 μ m (ICN, Biotrans Nylon Membranes. Irvin, California) prétraitée au SSC 10X (dilution $1/2$ de SSC 20X: 175,3 g de NaCl et 88,2 g de citrate de Na dans 800 ml de H₂O distillée; le pH est ajusté à 7,5). Les témoins constitués d'ADN et de granules purifiés ont été déposés de façon analogue, mais à raison d'un volume de 1 μ l. Les extraits larvaires, les témoins positifs et négatifs ainsi placés sur membrane de Nylon sont séchés à la température de la pièce.

1.2.1. Fixation de l'ADN cible

Une fois tous les échantillons séchés à l'air, la dénaturation de l'ADN est faite en plaçant les membranes sur un coussin imbibé de NaOH 0,5M / NaCl 1,5M, et incubées à 65°C pendant 30 min. afin de dissoudre tous les corps d'inclusions viraux. Les membranes sont alors retirées et neutralisées sur un coussin de Tris-HCl 0,5M / NaCl 1M, pH 7,0, durant 2 min. À la suite de ceci, les membranes sont lavées sur un coussin de SSC 10X pendant 5 min. à la température de la pièce et séchées à l'air avant d'être cuites à 80°C, pour la fixation de l'ADN, dans un four à vide (Napco, Modèle 5831, USA) durant

1 heure. Les membranes ainsi traitées et gardées à la température de la pièce dans des sacs de plastique sont prêtes pour l'hybridation.

Plusieurs membranes ont été préparées de cette façon avec 1200 échantillons de Wakefield (dans la région de l'Outaouais) et 1100 échantillons de la Gaspésie (M.R.C. Bonaventure) pour la technique d'hybridation moléculaire, en utilisant comme sonde une séquence de la granuline préparée dans nos laboratoires de l'Institut Armand-Frappier (Merzouki, 1989). Sur chaque membrane, en plus d'une cinquantaine d'échantillons de broyât de larves ramassées sur le terrain, des témoins positifs (1 μ l d'ADN de sonde non-radioactive, 2 μ l de CfGV) et des témoins négatifs (3 μ l de broyât de larves non infectées, 100 ng d'ADN de thymus de veau) ont été déposés.

1.3. Préparation des sondes moléculaires

1.3.1. Mini-préparation de l'ADN recombinant

Cette étape consiste à faire une purification, à petite échelle ou mini-préparation, de l'ADN plasmidique tel que décrit dans la trousse de purification de l'ADN "Magic Minipreps" (Promega, Madison, USA).

Partant de colonies bactériennes E. coli XL1-Blue rec A (Bullock *et al.*, 1987) recombinantes conservées dans des cryotubes Nunc (Inter Med, Danmark) au congélateur à -70°C avec 40% de glycérol, des mini-préparations de l'ADN plasmidique contenant la séquence de la granuline ont été effectuées. Ces clones déjà disponibles au laboratoire avaient été préparées précédemment dans nos laboratoires (Merzouki, 1989).

Initialement, les colonies de bactéries recombinantes ont été inoculées dans 3 ml de bouillon LB (1 litre de ce bouillon contient 10 g de Bacto-tryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl à pH 7,5) contenant de l'ampicilline (concentration de 100 µg/ml). Après incubation, sous forte agitation des tubes à 37°C pendant 18 heures, les bactéries ont été centrifugées à 12000 x g pendant 5 minutes et le culot bactérien a été resuspendu dans un volume de 200 µl d'une solution contenant 50 mM de Tris-HCl, 10 mM d'EDTA et 100 µg/ml de RNase A, le tout à pH 7,5. La lyse bactérienne s'est effectuée dans 200 µl d'une solution de lyse: NaOH 0,2 M et SDS 1% et la suspension a été mélangée par inversion (3 à 4 fois) avant de neutraliser le mélange dans 200 µl d'une solution de 1,32 M d'acétate de potassium à pH 4,8. Le mélange a été ensuite centrifugé à 12000 x g pendant 5 minutes. La purification de l'ADN plasmidique contenant le gène de la granuline fut poursuivie selon le protocole expérimental décrit dans la trousse de purification d'ADN. L'avantage de cette technique se situe au niveau de sa vitesse d'exécution et de la pureté complète du matériel obtenu grâce à une mini-colonne

à base de silicone. Les plasmides obtenus par cette technique de purification peuvent être directement utilisés pour le séquençage de l'ADN, la digestion par enzymes de restriction, l'électrophorèse ou le marquage radioactif de sondes.

1.4. Marquage des sondes

Les ADN et les ARN peuvent être marqués par incorporation métabolique de l'un ou de l'autre des nucléotides radioactifs parmi une large sélection disponible commercialement (Fafard, 1989). Bien qu'il existe plusieurs trousse commerciales de marquage de l'ADN, seulement deux méthodes sont couramment utilisées: la technique de déplacement des coupures "nick-translation" et celle des amorces aléatoires "Random Priming".

La trousse de la compagnie BRL Gibco ("Random primer DNA Labelling System") a été utilisée. Dans cette technique, 100 ng d'ADN de la sonde sont dénaturés dans un volume final de 20 μ l d'eau stérile à 95°C pendant 5 à 10 minutes, puis immédiatement transférés dans un bain de glace pour éviter la renaturation. Un mélange préalable contenant 15 μ l de tampon (Random Primer Buffer Mixture), les différents hexanucléotides: ATP, GTP et TTP, à raison de 2 μ l, est ajouté à la sonde. À ceci, 5 μ l de [α -32P]d-CTP (approximativement 50

μCi) et 1 μl de l'enzyme ADN polymérase, fragment de la Klenow sont ajoutés. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 90 minutes.

1.5. Hybridation moléculaire

1.5.1. Préhybridation

Le protocole d'hybridation du "kit" commercial d'Amersham a été suivi à la lettre après le marquage des sondes. Les membranes ont été scellés dans des sacs à hybridation (BRL), en présence de 0,1 ml de solution d'hybridation par cm^2 de membrane. Cette solution est obtenue par mélange de 50% formamide déionisée à du SSPE 5X (NaCl 0,75 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ 0,05 M et EDTA 0,005 M à pH 7,4) et une solution de Denhart 5X (1,0 g/L ficoll 400, 1,0 g/L polyvinylpyrrolidone et 1,0 g/L d'albumine bovine sérique), en plus de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN de sperme de hareng dénaturé et du sulfate de dextran 5%, SDS 5%. Le tout est incubé sous agitation à 42°C pendant 3 heures: période correspondant à la préhybridation et étape qui consiste en la saturation des séquences non-spécifiques par l'ADN du sperme de hareng.

1.5.2. Hybridation

Après la période de préhybridation, la sonde est ajoutée et l'hybridation est effectuée pendant toute la nuit dans un incubateur à 42°C sous agitation. Plus précisément, la sonde marquée radioactivement, (10^5 à 10^6 CPM/ml de solution d'hybridation) (volume final de 150 à 200 μ l) est dénaturée par ébullition dans un bain d'eau à 95°C pendant 5 minutes puis refroidi dans un bain de glace, ensuite ajoutée à la solution d'hybridation et le tout est incubé sous agitation, à une température de 42°C, pendant une nuit.

1.6. Lavage

Les membranes issues de cette étape d'hybridation furent lavées trois fois avec solution de SSC 2X, 0.2% SDS à 60°C ensuite trois autre fois avec une solution de SSC 0,2X, 0,2% SDS à 60°C pour éliminer l'excédent de radioactivité et enfin trois derniers lavages avec une solution de SSC 0,2X, 0,1% SDS à la température de la pièce. Chaque lavage a été fait sous agitation, pendant 10 minutes, dans 500 ml de la solution de lavage.

1.7. Autoradiographie

Une autoradiographie des membranes marquées est obtenue par exposition de ces dernières sur un film (Kodak XRP-1) contenu dans une cassette autoradiographique placée à -70°C pendant une période pouvant aller de 24 heures à 74 heures. Le développement du film est fait à l'aide d'un appareil à révélation automatique OMAT-M-20.

2. ÉLEVAGE DES LARVES DE *C. FUMIFERANA*

Les larves saines de tordeuses de second stade livrées (l'IRRF, Sault-Ste-Marie) dans des rouleaux de coton fromage et de parafilms sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. Les cotons fromages sont dénudés de la couche de parafilm et découpés en petits morceaux d'environ 1 cm^2 contenant 10 à 20 larves de 2^e stade. Les petites pièces de coton fromage contenant les larves de tordeuses sont par la suite individuellement déposées dans des godets contenant de la nourriture artificielle de McMorran (1965), lesquels sont ensuite incubées à une température de 25°C , humidité relative 70%, photopériode 16-8 (lumière-Obscurité) jusqu'à l'obtention de larves à la fin du 3^e stade, début 4^e stade. Ainsi,

ces larves sont prêtes à être utilisées soit pour la production du virus à grande échelle ou pour les tests d'essais biologiques.

2.1. Production du virus de la granulose

Le CfGV a été amplifié *in vivo* par infection de larves saines de 3^e et 4^e stades à partir de l'élevage effectué comme décrit précédemment. Le virus d'origine provient des larves recueillies dans la région de Bonaventure en Gaspésie. Les larves ont été infectées par groupe de dix dans des godets contenant de la nourriture artificielle en déposant dans chacun un aliquot de 15 µl à 20 µl de la suspension virale concentrée à 1×10^9 granules/ml. Après cette première opération, les larves infectées (vivantes et mortes) ont été ramassées et une extraction suivie d'une purification des virus ont été faites. De cette première étape d'infection / extraction / purification, d'autres productions du VG ont été faites par passages successifs selon la même technique décrite précédemment et ensuite une purification du virus a été faite selon la procédure qui suit.

3. PURIFICATION DU VIRUS DE LA GRANULOSE (VG)

3.1. Purification partielle

Cette étape consiste tout d'abord à homogénéiser les larves infectées, à l'aide d'un mélangeur électrique, dans un volume égal de tampon PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, pH 6,0; 50 mM NaCl, 0,01% phénylthiouréa).

L'homogénat obtenu est ensuite filtré à travers 3 épaisseurs de coton fromage. Le filtrat est centrifugé une première fois à 1000 x g pendant 5 min. (International Portable Refrigerated Centrifuge; Model PR-2). Le surnageant clarifié est encore centrifugé à 16000 rpm pendant 20 minutes (rotor SS-34, centrifugeuse Sorval) de sorte que les granules se retrouvent dans le culot. Celui-ci est par la suite resuspendu dans un tampon TE pH 8,0; 0,1% SDS. Deux (2) à trois (3) lavages successifs des granules sont par la suite effectués dans le tampon TE pH 8,0; 0,1% SDS en centrifugeant à 16000 rpm pendant 20 minutes (rotor SS34, centrifugeuse Sorval) afin d'obtenir un culot propre.

À la fin de ces centrifugations, il faut se débarrasser du surnageant et resuspendre le culot dans de l'eau stérile. Il est suggéré d'effectuer un (1) ou deux (2) lavages en centrifugeant à 16000 rpm pendant 20 minutes (rotor SS34, centrifugeuse Sorval) des granules dans de l'eau stérile pour se débarrasser du

SDS. À ce stade, il est possible d'observer les granules en microscopie électronique.

3.2. Microscopie électronique (ME) (technique Airfuge)

Dans cette technique, 100 µl de l'échantillon à examiner (diluer 1/10) sont prélevés et fixés sur une grille par centrifugation à 120 000 x g (20 psi) pendant 5 minutes dans une centrifugeuse AIRFUGE, Beckman. Une coloration négative est faite en plongeant chaque grille individuellement, pendant environ une minute, dans une goutte de PTA. Après séchage, les grilles sont observées au microscope électronique (ME).

3.3. Purification par gradient de glycérol

Les granules ont été par la suite purifiées de façon plus poussée par centrifugation (12 min., 175 000 g) sur un gradient de glycérol (30%-80%).

Après centrifugation, les fractions sont recueillies individuellement et une série de lavages à l'eau stérile est effectuée pour se débarrasser du glycérol et ensuite les différentes fractions sont observées en microscopie électronique. Les

fractions contenant des granules, sans contaminants, sont rassemblées et centrifugées deux (2) fois avec de l'eau stérile (20 min., 16000 rpm, rotor SS-34, centrifugeuse Sorval). Les granules purifiées et resuspendues dans de l'eau stérile sont ensuite quantifiées par comptage sur billes de latex en microscopie électronique.

Par cette technique, 2 ml de suspension de CfGV pures à une concentration de 10^{11} granules/ml ont été obtenus. Plusieurs dilutions partant de 10^{11} granules/ml à 10^4 granules/ml ont été faites en partant de la suspension mère de 10^{11} granules/ml. La figure 4 qui suit, résume les différentes étapes ayant conduit à l'obtention d'une suspension de CfGV pure.

FIGURE 4:

Production et purification du virus
de la granulose de *C. fumiferana*.

LARVES DU TERRAIN
INFECTÉES PAR LE CfGV

EXTRACTION ET PURIFICATION
CONC. 10^9 GRANULES/ML

10 larves de 4^e
stade/godet

INCORPORATION DE 20 μ L DU CfGV DANS
DES GODETS CONTENANT DE LA
NOURRITURE ARTIFICIELLE DE McMORRAN

incubation: $T_0=25^{\circ}\text{C}$; HR
(%)=60%
PHOTOPÉRIODE: 16:8 (L:O)

Broyage dans tampon
PBS + sol. NaCl + sol.
phénylthiouréat

Filtration sur
coton fromage

CENTRIFUGATIONS: 16000 RPM
sol. Tampon TE pH 8,0; 0,1% SDS

LAVAGES

Resuspension

GRADIENT DE GLYCEROL
(30%-80%)

LAVAGES SUCCESSIFS

MICROSCOPIE
ELECTRONIQUE
TECHNIQUE AIRFUGE

DÉTECTION PAR
HYBRIDATION
MOLÉCULAIRE

4. DÉTERMINATION DES DOSES INSECTICIDES ET CINÉTIQUE D'INFECTION PAR ESSAIS BIOLOGIQUES

Le titre insecticide de différentes préparations a été déterminé par des essais sur des larves maintenues en conditions contrôlées, tel que résumé dans la figure 5. Ces épreuves biologiques à choix forcées (Guertin et Albert, 1992) consistent à placer une larve dans une unité expérimentale contenant un petit morceau de nourriture artificielle à laquelle on a incorporé une dose établie de la préparation microbienne à tester (CfVG et / ou *B.t.k.* HD-1). L'unité expérimentale d'une surface totale de 2,0 cm² correspond à une arène de dimension de 1,7 x 1,6 cm approximativement, d'une capacité approximative de 3,5 ml, dans laquelle la larve est mise en présence de nos préparations insecticides. L'élevage, en présence des différents insecticides à différentes doses, s'est déroulé en chambre de croissance à 25°C avec une photopériode égale à 16:8 (lumière:obscurité). Les lectures sont faites aux 48 heures pendant une période de 12 jours (288 heures). La dose létale pour 50% de la population larvaire (DL₅₀), évaluée pour chaque préparation, permettra de ressortir le potentiel insecticide de chacune d'elles. Pour effectuer cette expérience, le choix des doses a été fait de façon à avoir celles-ci de part et d'autre de la valeur probable de la DL₅₀ (dose à laquelle une mortalité de 50% de la population de larves est obtenue) et aussi à en être rapproché le plus possible.

La particularité d'un essai biologique est la variabilité dans les réponses des organismes testés, soit la difficulté de reproduire exactement les mêmes résultats, cela malgré un maintien de conditions expérimentales contrôlées. Afin de minimiser les variations dans les essais biologiques, des larves de *C. fumiferana* uniformes (4^e stades) et de qualité physiologique semblable furent utilisées; une nourriture artificielle fraîchement préparée (McMorran) et stérile est employée pour l'élevage des larves et la conduite des essais biologiques. Les substances insecticides à tester ont été administrées de la façon la plus uniforme possible et ensuite un contrôle rigoureux des conditions environnementales (température, humidité relative, photopériode) d'incubation des larves de TBE a été effectué. Des témoins inoculés avec du H₂O stérile ont été utilisés pour chacun des essais biologiques. L'inoculation et les prises de lectures ont été faites de façon méticuleuse, en commençant avec les témoins et ensuite en procédant dans un ordre de dilutions croissantes, pour éviter toute contamination dans les différents blocs expérimentaux.

Les valeurs de mortalité larvaire obtenues des témoins ont été utilisées dans chaque cas pour standardiser les taux de mortalité dus au virus et/ou à la bactérie par l'utilisation de l'équation d'Abbott (1959). Ceci permet ainsi de considérer que toutes les mortalités larvaires observées dans les blocs expérimentaux contenant les différentes dilutions d'insecticides sont dues à l'action de ces dernières uniquement. Les résultats découlants de cette

expérimentation sont présentés sous forme de tableaux et de graphiques. Pour une meilleure compréhension des tableaux de résultats (III à V) sur les essais biologiques, quelques explications s'imposent.

Dans la première colonne de chaque tableau nous avons les différentes doses d'insecticides utilisées; la seconde colonne montre les effectifs (N = nombre de larves de 4^e stade de *C. fumiferana* utilisées pour chaque dose d'insecticides testée); la troisième colonne nous indique les différents pourcentages de mortalité obtenus pour chaque dose testée; la quatrième, quant à elle, nous donne les différents pourcentages de mortalité corrigés par rapport à la mortalité obtenue dans les témoins. Associées aux différentes valeurs de mortalité corrigées, il y a des lettres qui nous permettent de faire une comparaison multiple des moyennes, cela dans le but de déterminer les différences significatives associées à chaque traitement. De façon plus précise, cela signifie que les valeurs de mortalité ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative. Au bas du tableau, sont indiquées les analyses statistiques qui nous permettent de valider nos résultats. À ce niveau, est représenté, la source de variation associée au modèle de mortalité correspondant à la dose ingérée, le modèle qui indique que la mortalité est proportionnelle à la dose. Le modèle nous informe que lorsque la probabilité est égale à 0.05 (à $p=0,05$), cela signifie que le modèle est accepté, c'est-à-dire que la dose a une influence sur la mortalité. Le test de F sur les moyennes observées de la mortalité corrigée est

un rapport entre la moyenne des carrés du modèle sur la moyenne des carrés de l'erreur. Ainsi, plus ce rapport est grand, plus le modèle explique la variabilité observée au niveau des tests (Scherrer, 1984).

4.1. Essais biologiques avec le virus de la granulose et

***B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 utilisés individuellement.**

En ce qui concerne le virus de la granulose, partant d'une solution virale stock de 10^{11} granules/ml, plusieurs dilutions des préparations virales suivantes ont été faites: 10^6 granules/ml, 10^7 granules/ml, 10^8 granules/ml, 10^9 granules/ml, 10^{10} granules/ml, 10^{11} granules/ml (soit respectivement, 10^3 granules, 10^4 granules, 10^5 granules, 10^6 granules, 10^7 granules, 10^8 granules) et de l'eau distillée stérilisée servant de témoin, nous avons utilisé des larves de 4^e stades et des blocs expérimentaux stériles (Linbro, Flow Laboratories, Inc. McLean, Virginia) pour effectuer l'évaluation du titre insecticide du CfGV. Chacun bloc expérimental est muni de 24 arènes (ou puits) à fond plat de 1,6 cm de diamètre par 1,7 cm de profondeur et d'une capacité de 3,5 ml.

Pour chaque essai (i.e. soit le contrôle H₂O, le virus à 10^3 granules, 10^4 granules, 10^5 granules, 10^6 granules, 10^7 granules, 10^8 granules), 2 blocs expérimentaux de 24 arènes chacun ont été utilisés. Dans chaque arène une petite

quantité de nourriture d'environ 3 mm de long par 1 mm de large a été ajoutée. Les différentes solutions furent appliquées de façon uniforme sur la nourriture à raison de 2 blocs expérimentaux par solution à tester, donc un total 48 arènes par solution à tester. A la suite de ceci des larves de 4^e stade ayant un état morphologique le plus uniforme possible ont été placées individuellement dans chaque arène (une arène = une larve de 4^e stade). Les blocs expérimentaux sont fermés dans un premier temps, par un papier filtre Whatman (de même dimension que les blocs) imbibé d'eau pour assurer l'humidité dans les arènes et ensuite le couvercle normal des blocs y est apposé par dessus. Les blocs expérimentaux sont incubés dans une chambre d'incubation à une température de 25°C, humidité relative 70%, photopériode 16-8. Après 24 heures d'incubation en chambre d'élevage, les arènes contenant des larves ayant ingérées en totalité le petit morceau de nourriture artificielle imbibé de la solution à tester ont été considérées. En effet, pour ces dernières larves 24 heures post-ingestion, nous avons ajouté de la nourriture artificielle saine (i.e. exempt d'insecticide) et les blocs expérimentaux sont ensuite retournés en chambre d'incubation et des lectures successives ont été effectuées à raison de 48 heures d'intervalle dans le but d'établir le pourcentage de mortalité dans le cas de chaque essai. Ainsi des lectures aux 48 heures pendant une période de 288 heures post-ingestion ont été effectuées et les doses létales ainsi que les temps d'infection efficaces ont été évalués.

Les transformations sur une échelle logit des taux de mortalité larvaires causées par le CfGV ont permis de tracer des droites de régression de type linéaire avec un intervalle de confiance de 95%. L'équation d'Abbott a été utilisée pour obtenir des valeurs de mortalité corrigées qui tiennent uniquement des mortalités larvaires causées par l'action de CfGV seule.

Dans le cas de l'insecticide bactérien, partant d'une formulation commerciale de *B. thuringiensis* var *kurstaki* souche HD-1 (ABBOTT Laboratories, North Chicago) pure, une série de dilutions à partir d'une solution mère de 1 mg/ml a été effectuée. Après avoir soumis plusieurs doses aux larves, 6 solutions diluées de 10^2 ng, 10^1 ng, 10^0 ng, 10^{-1} ng, 10^{-2} ng et 10^{-3} ng de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 ont été utilisées pour conduire les essais biologiques selon la même méthode décrite précédemment.

4.2. Essais biologiques avec le mélange CfGV et *B.t.k.* HD-1

Après avoir obtenu les DL_{50} pour le virus de la granulose de *C. fumiferana* (CfGV) et le *B. thuringiensis* var *kurstaki* souche HD-1, des mélanges de doses inférieures et égales aux DL_{50} des préparations précédentes ont été faites. Ainsi, le potentiel insecticide de 9 différentes doses du mélange CfGV et *B.t.k.* HD-1

a été déterminé selon la même procédure décrite dans la section 4.1. Ainsi, des doses de 10^3 granules, 10^4 granules et 10^5 granules ont été utilisées et mélangées, dans chaque cas, avec des doses de 10^{-2} ng, 10^{-1} ng et 1 ng de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1, pour donner les combinaisons de doses en granules de CfGV et en ng de *B.t.k.* HD-1 respectives suivantes: $10^3 + 10^{-2}$, $10^3 + 10^{-1}$, $10^3 + 10^0$, $10^4 + 10^{-2}$, $10^4 + 10^{-1}$, $10^4 + 10^0$, $10^5 + 10^{-2}$, $10^5 + 10^{-1}$ et $10^5 + 10^0$.

Il convient d'ajouter qu'avant de réussir à procéder de façon convenablement dans ces expérimentations, il a fallu standardiser autant la dimension des morceaux de nourriture artificielle à utiliser initialement pour s'assurer qu'une larve pouvait les ingérer en 24 heures au maximum sans difficulté. Il a fallu aussi standardiser la quantité d'eau à utiliser, ainsi que la fréquence, pour imbiber le papier Wattman ceci pour éviter d'avoir de l'eau dans les arènes donc de changer les dilutions de nos doses d'insecticides. Il a aussi fallu essayer plusieurs blocs expérimentaux ayant des arènes de différentes dimensions pour assurer aux larves un espace vital convenable pendant la durée des tests. Nous avons vérifié que le développement des larves dans les arènes, en présence de la nourriture artificielle saine, se faisait sans problème jusqu'au stade adulte avant de procéder finalement aux essais biologiques. La période d'incubation totale ainsi que les intervalles de lectures ont été déterminés à partir de plusieurs essais effectués afin de standardiser la technique ainsi que les différentes étapes de l'expérience. Par exemple, au cours de ces essais de

standardisation, il a été remarqué qu'après 24 heures d'incubation, les effets du virus de la granulose sur les larves n'étaient pas assez prononcés pour pouvoir justifier des lectures aux 24 heures. De la même façon, en incubant des larves de *C. fumiferana* de 4^e stade sans la présence d'insecticides, nous avons remarqué qu'après 12 jours d'incubation, la plupart des larves atteignaient le stade de prépupe ou de puppe, ainsi, il n'étaient pas du tout utile de pousser l'expérience au delà de 12 jours d'incubation. En faisant des essais biologiques avec 3 doses de virus (10^6 granules, 10^8 granules, 10^{11} granules) et ensuite 3 doses de bactéries (20 ng, 200 ng et 2000 ng) nous avons remarqué que le taux de mortalité tendait vers 100% pour les doses maximales (10^{11} granules de CfGV et 2000 ng de *B.t.k.* HD-1), cela pour une période d'incubation de 2 semaines.

D'autre part, l'accumulation de déchets dans les arènes expérimentales provoquait la mortalité chez les larves après une période d'incubation supérieure à 2 semaines. Ayant ainsi standardisé toute la procédure pour les essais biologiques, la DL_{50} et les temps d'infection efficaces ont été déterminés pour chacune des préparations insecticides.

A l'issus de cette démarche laborieuse, des données nous renseignant sur différentes doses létales et différents temps d'infections efficaces pour chacune des dilutions virales et/ou bactériennes ont été obtenues.

FIGURE 5:

Détermination des doses insecticides de différentes préparations microbiennes chez les larves de 4^e stade de *C. fumiferana*.

LARVES DE 2^e STADE DE
C. fumiferana

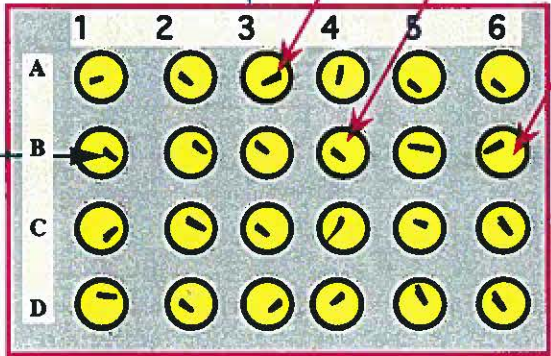
élevage des
larves de
C. fumiferana

Nourriture artificielle
de McMORRAN

DOSES DE
CfGV ET/OU
B.t.k. HD-1

2ul de chaque dose

4^o stade larvaire
d'insecticide sur chaque morceau
de nourriture artificielle

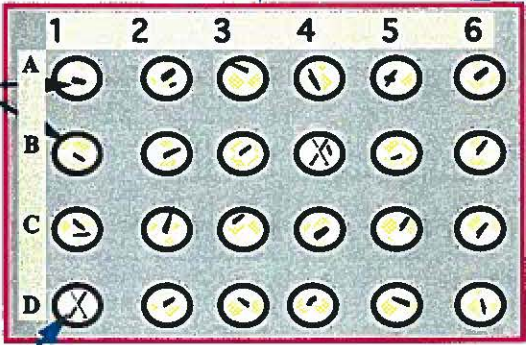


Bloc
expérimental
de 24 arènes

Incubation en chambre
environnementale
24hres

T° = 25°C
H.R.(%) = 60%
Photopériode: 16:8 (L:O)

ARENES AVEC
TBE
+ INSECTICIDES
(*B.t.k.* HD-1
et/ou CfGV)
+ NOURRITURE
ARTIFICIELLE



arène sans la
TBE

*AJOUT DE
NOURRITRE
ARTIFICIELLE
DE Mc MORRAN
*INCUBATION

*LECTURES AUX 48 HEURES
PENDANT 288 HEURES

Analyses statistiques

L'analyse statistique utilisée pour étudier les effets de la mortalité sur la dose est une analyse factorielle à un critère de classification qui est la dose. Cette méthode, qui s'applique indifféremment aux grands et aux petits échantillons, permet d'analyser les sources de variations de l'ensemble des données (Scherrer, 1984). Le modèle utilisé exprime que la mortalité est proportionnelle à la dose. Lorsque $\alpha=0,05$ (ou $p=0,05$), le modèle est accepté i.e. que la dose a une influence sur la mortalité (ainsi, mortalité = dose).

Par la suite un test de Duncan a été fait. Celui-ci réalise une comparaison multiple des moyennes afin de déterminer les différences significatives associées à chaque traitement. Les moyennes étant basées sur les valeurs observées de mortalité.

Le test de F réalisé est le rapport entre la moyenne des carrés du modèle sur la moyenne des carrés de l'erreur. Ainsi plus ce rapport est grand (associé au degré de liberté) plus le modèle est accepté. Ainsi, le modèle explique la variabilité observé au niveau des tests.

La probabilité P associée au test, exprime que lorsque P est inférieur à 0,05, le test est significatif, donc l'hypothèse que la dose influence la mortalité est

acceptée. Cependant, lorsque P est supérieur à 0,05, le test est non significatif, donc l'hypothèse que la dose influence la mortalité est rejetée.

Dans le cas où il y avait mortalité au niveau des témoins, les données ont été transformées en utilisant la formule d'Abbott (Abbott, 1925) qui consiste à donner une valeur de mortalité corrigée selon le modèle suivant:

$$\% \text{Mortalité corrigée} = \frac{\% \text{Mt}_{(x)} - \% \text{Mdc}_{(x)}}{\% \text{Mt}_{(x)}} \quad (\text{à un temps } x)$$

Où $\% \text{Mt}_{(x)}$ exprime le % de la mortalité chez le témoin (à un temps x) et $\% \text{Mdc}_{(x)}$, le % de la mortalité causée par la dose du pesticide ingérée (à un temps x).

RÉSULTATS

1. PRÉVALENCE DU VIRUS DE LA GRANULOSE DANS LA POPULATION NATURELLE DE *C. FUMIFERANA*.

La première étape du projet consistait à vérifier la présence du virus de la granulose dans la population naturelle de *C. fumiferana* à partir d'échantillons récoltés sur le terrain. Environ 1100 échantillons de tordeuses de 3^e au 6^e stade larvaire ont été recueillis à l'été 1993 et 1994 en Gaspésie puis 1200 à Wakefield en été 1994. Ces échantillons ont été disposés de façon individuelle dans des microtubes de 1,5 ml pour le diagnostic du virus de la granulose par la technique de dépôt direct. Subséquemment, cette détection a été confirmée par observation au microscope électronique d'agrégats de granules de forme ovocylindrique après extraction du CfGV des extraits larvaires broyés.

Les résultats obtenus au cours de ces essais entrepris avec 600 et 500 échantillons larvaires recueillis en 1993 et en 1994 respectivement dans les sites de Bonaventure en Gaspésie et 1200 à Wakefield en 1994 ont confirmés la présence du virus de la granulose dans la population naturelle de la tordeuse. Les pourcentages des larves infectées par le CfGV ont été obtenus par hybridation moléculaire en utilisant comme sonde une séquence génomique du virus de la granulose.

Tel qu'illustré dans le tableau II, la prévalence du virus de la granulose dans la région de la Gaspésie était de 4,3% en 1993 et de 2,7% en 1994. Par contre, en 1994, dans la région de l'Outaouais, le pourcentage du virus de la granulose observé était inférieur à 0,1%.

La figure 6 est une représentation d'une des autoradiographies de la détermination de l'incidence du CfGV dans la population de la tordeuse en Gaspésie. L'hybridation a été faite en utilisant une sonde mise au point dans nos laboratoires (Merzouki, 1989). Dans cette figure 6 qui est un exemple de résultats de détection du CfGV dans les échantillons récoltés sur le terrain, nous pouvons constater qu'il n'y a qu'un seul échantillon (en C) qui s'est révélé fortement positif avec une intensité de signal assez prononcée, présentant un halo noir qui diffuse plus ou moins. Sur la même figure, nous avons les témoins négatifs (en D) et les témoins positifs (en A et B). Tel que déjà mentionné, le témoin A correspond au dépôt sur la membrane d'hybridation de 1 µl d'ADN de la sonde et le témoin B à 1 µl d'une suspension du virus granulose. Le témoin négatif (en D) utilisé représente 1 µl d'ADN du thymus de veau (1 µg/ml) et 3 µl d'un broyat larvaire de la TBE saine (non-infectée). La révélation par autoradiographie donne des signaux forts pour les témoins positifs (en A et B) tandis qu'aucun signal n'est détecté pour les dépôts correspondants aux témoins négatifs (en D).

TABLEAU II:

Incidence du virus de la granulose dans la population naturelle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette dans la région de Bonaventure (Gaspésie) et dans la région de l'Outaouais (Wakefield).

Sites et Années	Nombre de larves par le CfGV ^a	% de larves infectées
GASPÉSIE 1993	600	4,3
GASPÉSIE 1994	500	2,7
OUTAOUAIS 1994	1200	< 0,1

^a Les pourcentages de larves infectées par le CfGV ont été obtenus par hybridation moléculaire selon la technique décrite à la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

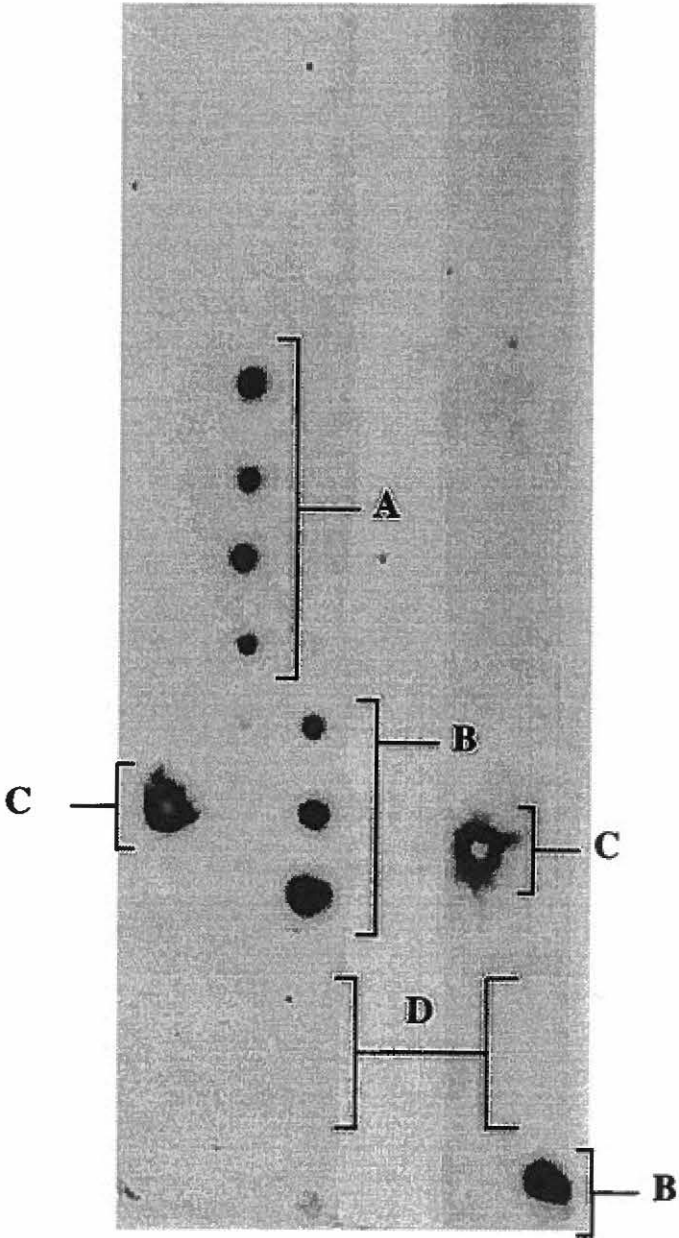
FIGURE 6:

Détermination de l'incidence du CfGV dans la population naturelle de *C. fumiferana* par hybridation moléculaire en utilisant comme sonde une séquence génomique spécifique au CfGV.

LÉGENDE:

- A** : témoin positif correspondant à 1 µl d'ADN de la sonde non marquée.
- B** : témoin positif correspondant à 2 µl d'une suspension de CfGV purifiée au laboratoire
- C** : Échantillon positif d'un dépôt d'un broyât larvaire récolté dans la région de la Gaspésie.
- D** : témoins négatifs correspondant au dépôt sur membrane de 3 µl de broyât d'une larve de *C. fumiferana* saine et 3 µl d'ADN de thymus de veau (100 ng).

Autoradiographie de la détermination de l'incidence
du CfGV dans la population naturelle de *C. fumiferana*



2. DÉTERMINATION DU POTENTIEL INSECTICIDE DES DIFFÉRENTS AGENTS MICROBIENS UTILISÉS

Tous les résultats obtenus de ces essais biologiques sont présentés sous formes de tableaux et de graphiques.

2.1. Dose létale du virus de granulose sur *C. fumiferana*

Le tableau III résume les résultats obtenus des essais biologiques conduits avec le virus de la granulose sur des larves de 4^e stade de *C. fumiferana* à différents temps d'incubation. Nous pouvons voir que le pourcentage de mortalité des larves de *C. fumiferana* soumises à l'action de CfGV dépend directement de la dose de virus ingérée et, pour une même dose, cette mortalité dépend aussi du temps d'exposition avec l'agent viral. Ainsi, plus la dose de granules ingérée est grande, plus le pourcentage de mortalité est grand. Ce même tableau nous montre que l'intervalle de dose efficace se situe entre 2×10^5 et 2×10^8 granules, ce qui correspond à un intervalle de temps efficace d'exposition au virus entre 192 heures et 288 heures. Par rapport à ces valeurs, nous pouvons aussi constater que la valeur de P de diminue (0,49 à 0,0034) et que les valeurs associées au test de F augmentent (1 à 13,25). L'analyse statistique nous confirme donc que la dose virale utilisée influence la mortalité des larves de *C. fumiferana*.

TABLEAU III:

Cinétique d'infection des larves de *C. fumiferana* soumises à l'action du virus de la granulose pendant une période d'incubation de 288 heures.

LÉGENDE:

- 1 correspond à la valeur de la mortalité par la formule d'Abbott;
- 2 pour chaque colonne, le test de Duncan que les valeurs de mortalité corrigée ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative;
- 3 source de variation associée au modèle de mortalité correspondant à la dose ingérée.
- 4 degré de liberté
- 5 moyennes des carrés
- 6 test de F sur les moyennes observées de la mortalité corrigée
- 7 probabilité associée au test statistique.

TABLEAU III :

Doses (granules) CfGV	N	48 HEURES			96 HEURES			144 HEURES					
		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%) ¹		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)				
2.0 x 10 ³	86	0,0	0,0 a ²		0,0	... b		2,3	... c				
2.0 x 10 ⁴	82	0,0	0,0 a		0,0	... b		1,2	... c				
2.0 x 10 ⁵	78	0,0	0,0 a		3,9	1,1 ab		14,1	11,4 abc				
2.0 x 10 ⁶	82	0,0	0,0 a		1,2	... b		9,8	7,8 bc				
2.0 x 10 ⁷	76	0,0	0,0 a		13,2	10,2 a		21,1	18,1 ab				
2.0 x 10 ⁸	68	1,5	2,0 a		4,4	1,8 ab		25,0	23,6 a				
ANALYSES STATISTIQUES													
SOURCES ³		dl ⁴	Moy. Car. ⁵	F ⁶	P ⁷	dl	Moy. Car.	F	P	dl	Moy. Car.	F	P
Modèle		5	1,33	1,00	0,49	5	46,65	3,63	0,074	5	197,59	5,84	0,027
Erreur		6	1,33			6	12,86			6	33,85		

suite...

TABLEAU III: (suite)

Doses (granules) CfGV	N	192 HEURES			240 HEURES			288 HEURES					
		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%) ¹		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)				
2.0 x 10 ³	86	7,0	4,5 c ²		11,6	6,8 d		36,1	31,6 d				
2.0 x 10 ⁴	82	6,1	3,7 c		17,1	12,5 cd		46,3	42,6 cd				
2.0 x 10 ⁵	78	28,2	26,4 b		39,7	36,6 bc		60,3	57,4 bc				
2.0 x 10 ⁶	82	34,2	32,4 b		51,2	47,7 ab		70,7	67,6 ab				
2.0 x 10 ⁷	76	39,5	37,3 b		69,7	68,3 a		81,6	80,7 a				
2.0 x 10 ⁸	68	55,9	53,2 a		76,5	75,1 a		88,2	88,0 a				
ANALYSES STATISTIQUES													
SOURCES ³		dl ⁴	Moy. Car. ⁵	F ⁶	P ⁷	dl	Moy. Car.	F	P	dl	Moy. Car.	F	P
Modèle		5	747,57	27,21	0,0005	5	1583,22	12,74	0,0038	5	951,14	13,25	0,0034
Erreur		6	27,48			6	124,28			6	71,78		

Les transformations sur une échelle logit des taux de mortalité dues au CfGV ont permis de tracer des droites de régression linéaire dont l'équation est de la forme $Y = a + bx$. La figure 7 montre la représentation graphique de la relation directement proportionnelle entre le pourcentage de mortalité larvaire et la dose ingérée de CfGV. La valeur déterminée de la DL_{50} pour cette expérience, par projection de l'axe des ordonnées sur l'axe des abscisses nous indique qu'elle se situe très près de 8×10^4 granules. La valeur estimée de la DL_{50} , lors du traitement de nos données par un programme statistique (POLO-PC), se situe exactement à 101177.120, soit $1,012 \times 10^5$ granules avec un intervalle de confiance de 95%. Ces valeurs de DL_{50} étant très proches les unes des autres, il est permis de dire que nos résultats sont valables.

Les graphiques représentés par la figure 8 (a, b, c, et d) nous montrent la relation entre la mortalité et le temps d'incubation pour différentes doses de virus ingérées. Ainsi, sur ces différents tracés graphiques nous voyons que plus la dose augmente moins il faut du temps pour atteindre un temps d'infection efficace, c'est-à-dire, moins il faut de temps pour atteindre un taux de mortalité qui va toucher au moins 50% de la population larvaire. Avec 2×10^5 granules il faut à peu près 288 heures pour avoir 50% de la mortalité, tandis que avec une dose de 2×10^6 granules il faut un peu plus de 240 heures, et enfin pour la dose de

2×10^8 granules, il faut seulement 194 heures pour avoir 50% de mortalité dans la population testée.

Lors de cette expérience, il a été aussi possible de constater que les virus, en plus de causer la mortalité chez les larves de *C. fumiferana*, provoquaient une réduction tant au niveau du développement que de la croissance chez les larves. En effet, à des doses de 10^5 à 10^8 granules, la majorité des larves étaient à un 5^e stade de développement, cela après 12 jours d'incubation en présence du CfGV (données non-reportées dans les tableaux). Lorsque l'on compare les larves soumises à l'action du virus et celles utilisées comme témoin, on note que ces dernières atteignaient facilement le niveau pupe ou prépupe dans la majorité des cas. Les faibles taux de croissance et de développement larvaires à des doses supérieures ou égales à 10^5 granules peuvent-être attribuables à la difficulté éprouvée par les larves virosées de se nourrir de façon adéquate d'où la difficulté de progresser au niveau de leur stade de développement dûe à des désordres physiologiques.

FIGURE 7:

Relation entre le pourcentage de mortalité des larves de 4^e stade de *C. fumiferana* et la dose (en granules) ingérée du virus de la granulose de *C. fumiferana* (CfGV) après 288 heures d'incubation.

Valeur de la DL₅₀ déterminée par méthode graphique par projection de l'axe des ordonnées sur l'axe des abscisses se situe autour de 8×10^4 granules de CfGV ingérées.

Pourcentage de la mortalité (I.C.95%)
(Échelle LOGIT)

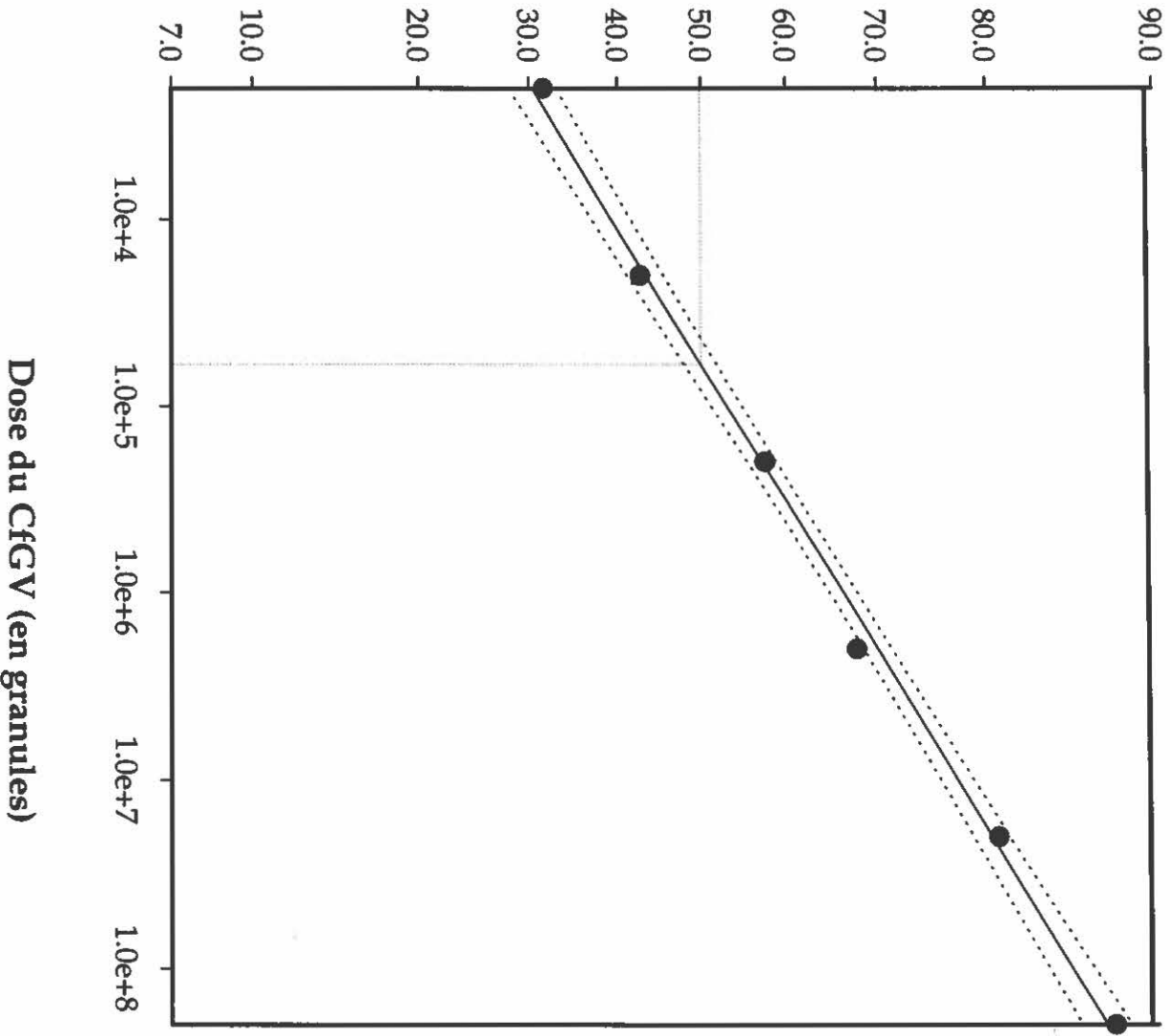
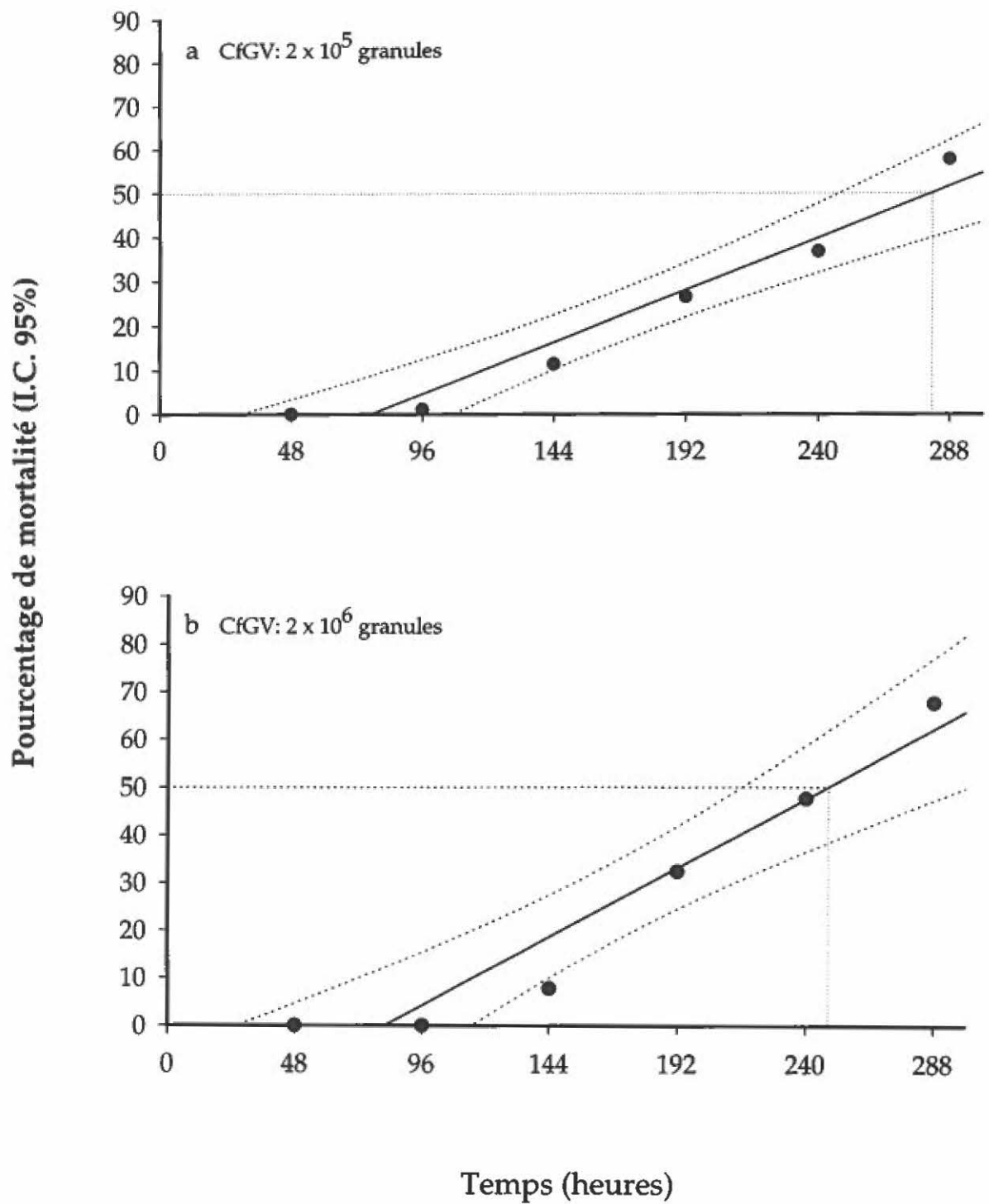


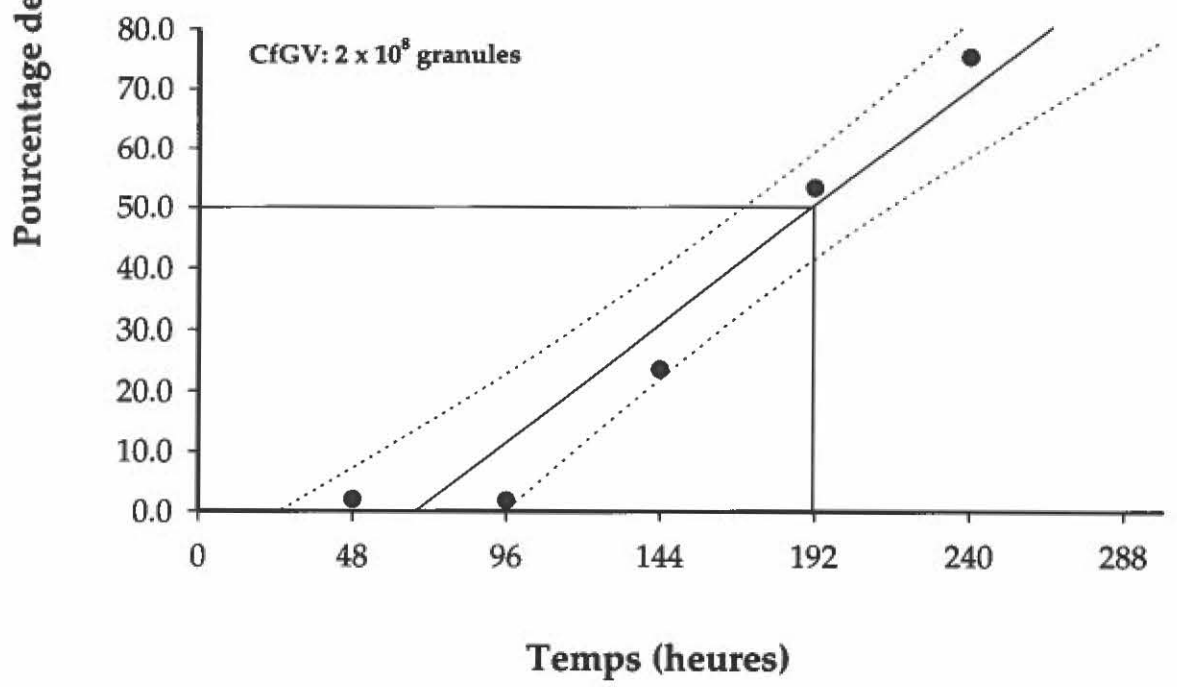
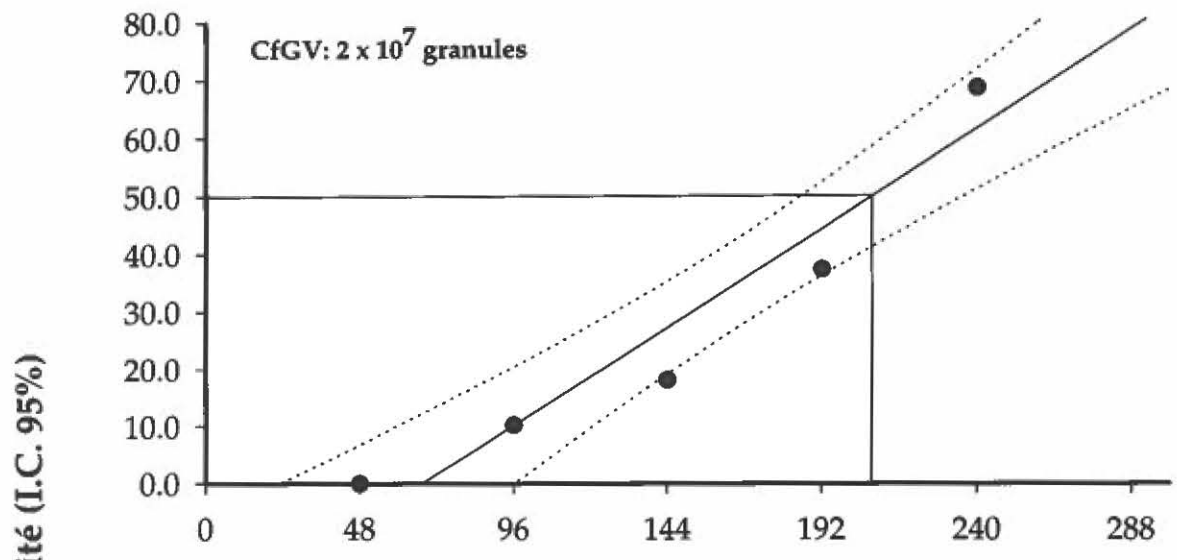
FIGURE 8:

Courbes de la relation entre la mortalité des larves de *C. fumiferana* et le temps d'exposition à différentes doses de CfGV:

- a** Dose 2×10^5 granules de CfGV
- b** Dose 2×10^6 granules de CfGV
- c** Dose 2×10^7 granules de CfGV
- d** Dose 2×10^8 granules de CfGV

remarque: 2 μ l de chacune des doses de CfGV en granules a été utilisé pour les infections.





2.2. Dose létale du *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 sur *Choristoneura fumiferana*

Dans le cas de *B. thuringiensis* var *kurstaki*, une solution stock de 1 mg/ml de la formulation Dipel HD-1 commerciale pure de la compagnie ABBOTT a été utilisée. Partant de celle-ci des dilutions successives ont été faites et les doses létales ainsi que les temps d'infection efficaces sont évalués.

Le tableau IV indique l'effet de l'application de différentes doses de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 sur la mortalité des larves de *C. fumiferana*. Les valeurs obtenues et analysées sont celles de la mortalité corrigée en utilisant, encore une fois, la formule d'Abbott. Comme déjà expliqué précédemment, nous pouvons dans ce cas aussi, de la même façon, constater la même relation entre les doses de cristaux de bactérie ingérées et les différents pourcentages de mortalité obtenus. Ainsi, plus la dose des cristaux delta-entoxines est grande plus le pourcentage de mortalité est grand. D'autre part, il est possible de voir, dans ce même tableau, que la mortalité est aussi proportionnelle au temps d'incubation. De la même façon, Les valeurs statistiques de F et de P confirment la validité de nos résultats. Pour cette expérience il a été constaté une mortalité beaucoup plus rapide chez les jeunes stades larvaires, tandis que les larves qui arrivaient à dépasser le 5^e stade subissaient la pupaison avant de mourir par l'action de la delta-endotoxine ou d'une septicémie.

TABLEAU IV:

Effet de l'administration de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 sur des larves de *C. fumiferana* pendant une période d'incubation de 288 heures.

LEGENDE (voir tableau III)

TABLEAU IV :

Doses (ng)	N	48 HEURES			96 HEURES			144 HEURES					
		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%) ¹		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)				
2x 10 ⁻³	88	2,3	2,4	a ²	3,4	3,5	a	3,4	3,7	a			
2x 10 ⁻²	93	1,1	1,1	a	3,2	3,3	a	7,5	7,6	a			
2x 10 ⁻¹	89	1,1	1,2	a	1,1	1,2	a	9,0	9,4	a			
2x 10 ⁰	83	2,4	2,2	a	2,4	2,2	a	10,8	10,8	a			
2x 10 ¹	91	1,1	1,2	a	3,3	3,5	a	11,0	11,4	a			
2x 10 ²	86	0,0	0,0	a	3,4	1,3	a	11,6	12,9	a			
ANALYSES STATISTIQUES													
SOURCES ³		dl ⁴	Moy. Car. ⁵	F ⁶	p ⁷	dl	Moy. Car.	F	P	dl	Moy. Car.	F	P
Modèle		5	1,52	0,31	0,89	5	2,47	0,17	0,97	5	21,84	0,31	0,89
Erreur		6	4,92			6	14,88			6	70,40		

suite...

TABLEAU IV : (suite)

Doses (ng)	N	192 HEURES			240 HEURES			288 HEURES					
		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%) ¹		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)				
2x 10 ⁻³	88	8,0	8,1 c ²		25,0	23,1 bc		29,6	27,7 c				
2x 10 ⁻²	93	10,8	10,8 bc		20,4	17,5 c		35,5	33,1 bc				
2x 10 ⁻¹	89	18,0	18,0 ab		37,1	33,8 abc		53,9	51,1 ab				
2x 10 ⁰	83	24,1	24,7 a		47,0	44,9 ab		66,3	65,2 a				
2x 10 ¹	91	23,1	23,1 a		45,1	42,5 abc		69,2	68,0 a				
2x 10 ²	86	24,4	24,6 a		54,7	52,7 a		74,4	73,4 a				
ANALYSES STATISTIQUES													
SOURCES ³		dl ⁴	Moy. Car. ⁵	F ⁶	p ⁷	dl	Moy. Car.	F	P	dl	Moy. Car.	F	P
Modèle		5	105,88	9,80	0,0075	5	365,71	3,59	0,08	5	731,09	9,33	0,0085
Erreur		6	10,80			6	101,90			6	78,40		

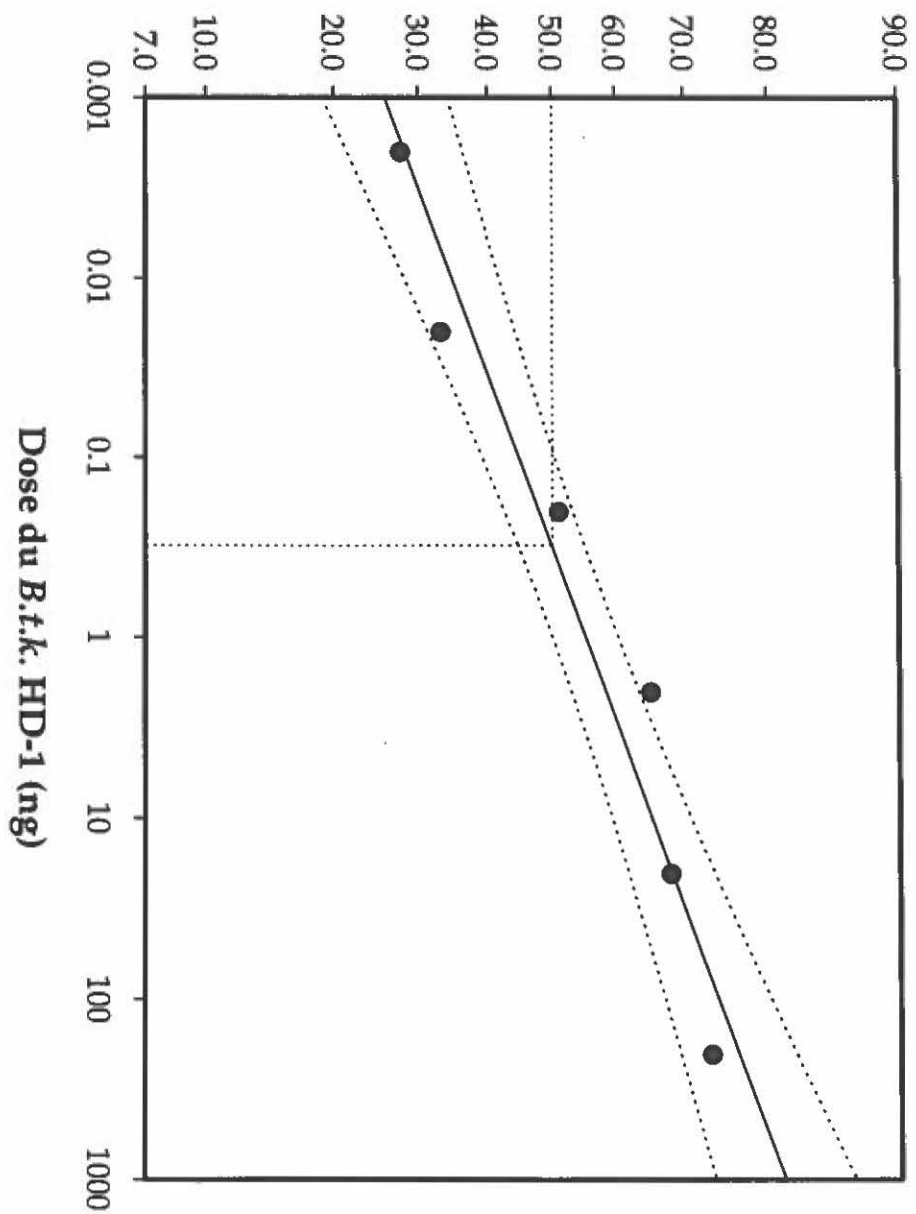
La figure 9 montre la représentation graphique de la relation entre la dose ingérée et la mortalité. Brièvement, il est possible dans ce cas aussi de constater que la mortalité dépend de la dose de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 ingérée. La valeur déterminée de la DL_{50} , pour cette expérience, par projection de l'axe des ordonnées sur l'axe des abscisses nous indique que la DL_{50} se situe entre 0,1 et 1 ng de la formulation commerciale de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 ingérée pour un temps d'incubation post-288 heures. Lorsque déterminé par calcul statistique de nos résultats sur le programme d'ordinateur POLO-PC, cette DL_{50} se situe exactement à 5,5 ng de la formulation de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 utilisée avec un intervalle de confiance de 95%. La différence n'étant pas grande entre la valeur obtenue par la projection sur le graphique et celle déterminée par le programme d'ordinateur, nous pouvons affirmer la validité de nos résultats.

FIGURE 9:

Relation entre le pourcentage de mortalité des larves de 4^e stade de *C. fumiferana* et la dose (en ng) ingérée de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 après 288 heures d'incubation.

Valeur de la DL₅₀ déterminée par méthode graphique par projection de l'axe des ordonnées sur l'axe des abscisses se situe entre 0,1 et 1 ng (autour de 0,5 ng) de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1.

Pourcentage de la mortalité (I.C.95%)
(échelle LOGIT)



2.3. Potentiel insecticide d'un mélange *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 et du virus de la granulose sur des larves de *C. fumiferana*

L'utilisation des deux insecticides en concomitance a été faite après avoir déterminé séparément les doses du virus de la granulose et de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 qui provoquent 50% de mortalité des larves de *C. fumiferana*. Cette première étape nous a ainsi permis d'évaluer le potentiel du mélange *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 / CfGV comme insecticide en soumettant des larves de *C. fumiferana* à l'action de 9 doses de cette préparation.

Tel que illustré dans le tableau V des résultats, le pourcentage de la mortalité des larves est fonction des doses appliquées et du niveau d'infection. De plus, il est a constaté qu'en considérant une même dose de CfGV 10^3 granules, lorsque les doses de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 sont variées de 10^{-2} , 10^{-1} à 1 ng, la mortalité augmente selon une proportion de 10% de mortalité en comparaison avec la même dose de CfGV lorsque cet insecticide est appliqué tout seul comme préparation. En poursuivant la même analyse avec une dose fixe de CfGV à 10^4 granules, en combinaison avec différentes doses de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 de 10^{-2} , 10^{-1} à 1 ng on observe, non seulement une augmentation de la mortalité de 24% par rapport aux combinaisons précédentes, mais aussi une augmentation de 10% par rapport à la même dose de CfGV lorsque celui-ci est employé tout seul. Les mêmes remarques sont valables pour la dose fixe de

CfGV à 10^5 granules, en combinaison avec différentes doses de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 de 10^{-2} , 10^{-1} et de 1 ng. De la même façon, en considérant une dose de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 fixe (e.g. à 1 ng) et en faisant varier le CfGV de 10^3 granules, à 10^4 granules puis à 10^5 granules, la mortalité des larves augmente selon une proportion d'environ 10% dans ce cas aussi, comparativement à l'utilisation du *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 tout seul.

Il a été observé ainsi avec cette expérience que l'utilisation combinée des deux préparations, en plus de permettre de diminuer les doses normalement utilisées pour obtenir une DL_{50} , provoque une mortalité plus grande des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Cependant, cette combinaison des deux insecticides permet d'obtenir une DL_{50} dans les mêmes délais, c'est-à-dire après 240 heures d'incubation, que lorsque le CfGV ou le *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 sont utilisés individuellement. Cette DL_{50} a été obtenu avec les doses combinées de CfGV à 10^4 granules et de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 à 1 ng. En utilisant les doses combinées de CfGV à 10^3 granules et de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 à 1 ng, on obtient une mortalité de 47,2%, après 288 heures d'incubation, ce qui est aussi très près de la DL_{50} .

TABLEAU V:

Cinétique d'infection des larves de *C. fumiferana* soumises aux actions combinées du virus de la granulose et de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 pendant une période d'observation de 288 heures.

LEGENDE (voir tableau III)

TABLEAU V:

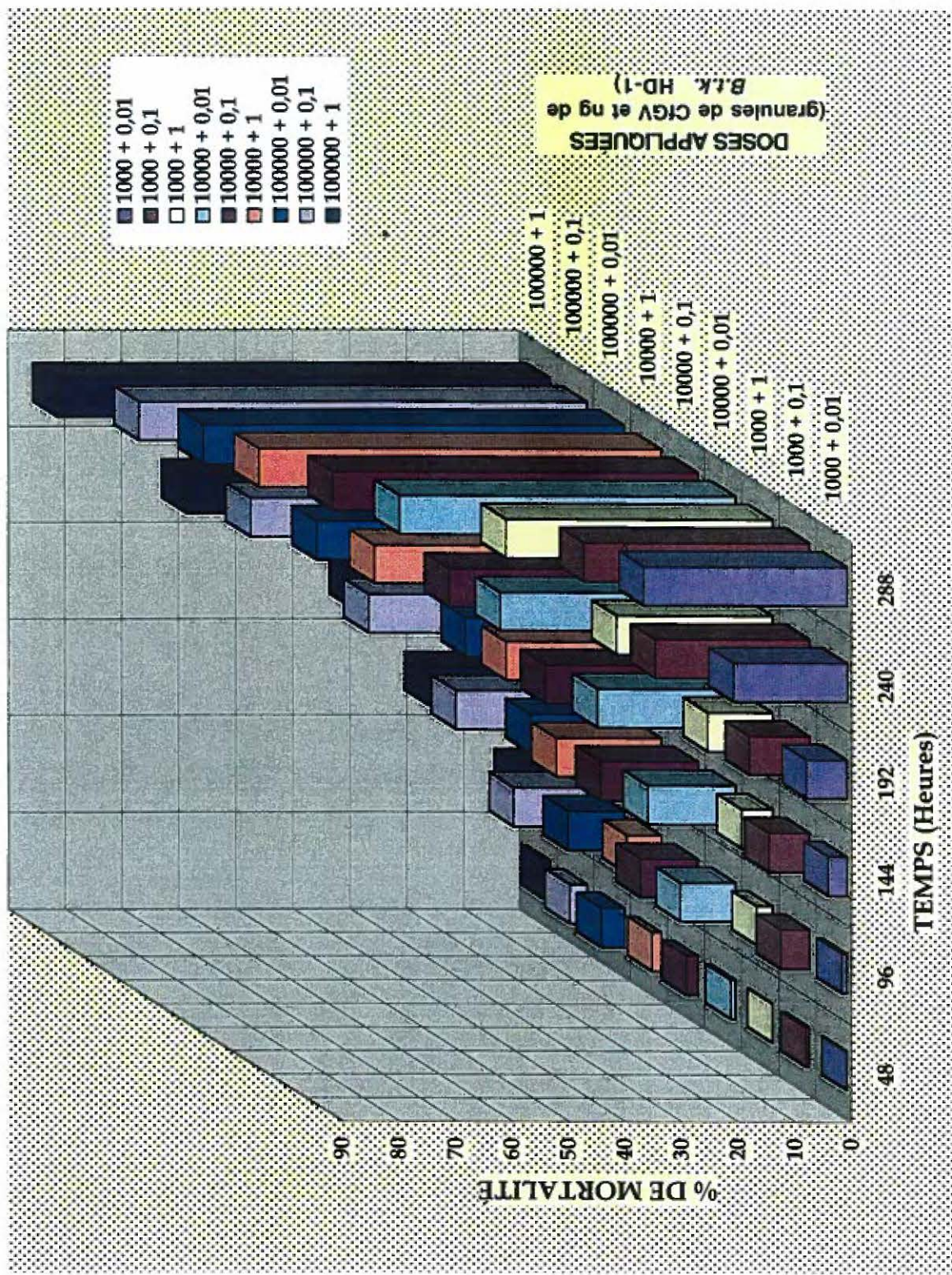
Doses(2ng) CfGV B.t.k. HD-1	N	48 HEURES		96 HEURES		144 HEURES						
		Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%) ¹	Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)	Mortalité (%)	Mortalité Corrigée (%)					
10 ³ + 10 ⁻²	125	0,0	0,0 a ²	0,8	0,9 a	3,2	... d					
10 ³ + 10 ⁻¹	132	0,8	0,7 a	4,6	5,1 a	10,0	7,2 bcd					
10 ³ + 10 ⁰	108	0,0	0,0 a	2,8	2,8 a	5,6	5,5 cd					
10 ⁴ + 10 ⁻²	151	0,7	0,8 a	8,6	9,7 a	16,6	15,5 abc					
10 ⁴ + 10 ⁻¹	148	2,0	2,1 a	8,8	10,2 a	18,9	17,3 abc					
10 ⁴ + 10 ⁰	110	1,8	1,6 a	6,4	6,1 a	19,1	18,6 abc					
10 ⁵ + 10 ⁻²	131	3,8	4,1 a	9,9	10,0 a	19,9	16,7 abc					
10 ⁵ + 10 ⁻¹	153	2,6	3,1 a	12,4	13,1 a	25,5	23,3 a					
10 ⁵ + 10 ⁰	107	0,9	0,9 a	5,6	5,6 a	21,5	21,5 a					
ANALYSES STATISTIQUES												
SOURCES ³	dl ⁴	Moy. Car. ⁵	F ⁶	p ⁷	dl	Moy. Car.	F	P	dl	Moy. Car.	F	P
Modèle	8	5,35	1,26	0,334	8	44,50	0,88	0,556	8	181,37	3,41	0,0194
Erreur	15	4,25			15	50,68			15	53,14		

suite...

Une représentation graphique sous forme d'un histogramme en 3 dimensions a été faite dans le but de mieux visualiser la relation entre la dose, le pourcentage de mortalité et le délai de mortalité (figures 10). Sur ce graphique, il est ainsi possible de voir une progression directement proportionnelle entre la dose, le pourcentage de mortalité et le temps d'observation. Les différences entre les valeurs de mortalité larvaires, pour les différentes doses, deviennent significatives à partir des premières 144 heures d'incubation. Cette différence va en augmentant dans un rapport de plus 10% à 15% pour chacune des périodes subséquentes de lecture (à 192, 240, 288 heures), cela pour chacune des doses combinées de CfGV et *B. t. k.* HD-1 testées. D'autre part, il est possible d'observer que la mortalité dans les populations larvaires testées survient très tôt au début de la période d'incubation. Elle se manifeste, au début, plus lentement, comparativement à l'effet produit par le *B. t. k.* HD-1, mais plus rapidement par rapport à l'effet provoqué par CfGV, pour ensuite se traduire par une infection plus rapide, plus agressive dans une plus grande partie de la population larvaire de *C. fumiferana*. Étant donné la multitude de combinaisons possibles des deux insecticides utilisés, est-il évident d'établir une DL₅₀ fixe. Cependant, force est de constater que pour cette expérience, que la dose de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 soit maintenue constante et que celles du CfGV soit variées, ou inversement, il a toujours été possible d'atteindre une DL₅₀. L'analyse des résultats faites sous l'angle du graphique ou du tableau nous démontre ainsi l'existence d'effets synergiques ou additifs de l'utilisation combinée du CfGV et

FIGURE 10:

Actions combinées du virus de la granulose et de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1, sur des larves de 4^e stade de *C. fumiferana*, pendant une période d'observation complète de 288 heures.



du *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. En effet, pour les mêmes doses de CfGV ou du *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1, utilisées individuellement, une augmentation de 10% de la mortalité chez les larves de tordeuses testées est obtenue lorsque les deux insecticides sont utilisés en concomitance.

Le tableau VI présente les étapes de développement des différents stades larvaires sous l'action combinée du virus de la granulose et de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1. Dans la population témoin, nous constatons que 14% des larves étaient au 5^e stade de développement, tandis que 44% se trouvaient au 6^e stade et 40% au stade de la chrysalide. Ainsi, plus la dose augmente, plus le développement larvaire est ralenti. Par exemple, lorsque l'on considère la dose maximale de la combinaison virus/bactérie (celle de 10⁵ granules + 1 ng), on remarque que 9% et 7% seulement atteignent respectivement le 6^e stade et le stade de la chrysalide, alors que 19% et 65% restent au 4^e et au 5^e stade respectivement. Ainsi, ceci nous indique que l'action combinée des deux insecticides en plus de jouer sur la mortalité, agit aussi en retardant considérablement le développement des différents stades larvaires. De façon globale, il est à remarquer que pour chaque dose du mélange d'insecticides utilisée, la majorité des larves étaient au 5^e stade de développement. Ainsi, le retard provoqué dans le développement des stades larvaires pourrait constituer un aspect très important dans un programme de lutte contre un organisme

ravageur, notamment en empêchant celui-ci de compléter son cycle vital dans les délais habituels. Ceci pourrait avoir des conséquences, qui ont pour effet d'empêcher ce ravageur d'atteindre le stade adulte, stade auquel l'accouplement a lieu à moment précis du cycle vital de cet insecte.

TABLEAU VI:

Pourcentage des différents stades larvaires de *C. fumiferana* après 288 heures d'observation suite à l'utilisation de différentes doses combinées du virus de la granulose et de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1.

TABLEAU VI:

Doses(2 μ l) CfGV <i>B.t.k.</i> HD-1	N	% des Différents Stades Larvaires			
		4 ^e	5 ^e	6 ^e	Chrysalide
Témoin	140	2	14	44	40
$10^3 + 10^{-2}$	125	2	35	35	28
$10^3 + 10^{-1}$	132	4	39	33	24
$10^3 + 10^0$	108	8	37	22	33
$10^4 + 10^{-2}$	151	9	40	30	21
$10^4 + 10^{-1}$	148	12	35	34	19
$10^4 + 10^0$	110	14	51	21	14
$10^5 + 10^{-2}$	131	12	58	22	8
$10^5 + 10^{-1}$	153	16	53	26	5
$10^5 + 10^0$	107	19	65	9	7

3. SUIVI DE L'INFECTION DE *C. FUMIFERANA* PAR LE VIRUS DE LA GRANULOSE AU LABORATOIRE PAR LA TECHNIQUE DE L'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE

L'hybridation moléculaire, comme méthode, a permis de visualiser l'infection par le CfGV. En effet, les résultats des autoradiographies obtenus démontrent des différences très marquées autant dans le nombre qu'au niveau des intensités des différents signaux obtenus selon la dose de virus utilisée.

La figure 11, montre la représentation d'une des membranes obtenues après autoradiographie de l'infection au laboratoire de larves de *C. fumiferana* avec différentes doses de CfGV. De façon plus précise, Il s'agit de résultats d'autoradiographie des dépôts directs sur membrane d'hybridation effectués avec les doses de CfGV de 10^7 et 10^8 granules sur des larves issues des infections faites au laboratoire pour la détermination de la cinétique d'infection du CfGV. Sur cette figure, A1 et A2 représentent les témoins positifs (A2 est une indication du dépôt de 1 μ l de l'ADN de la sonde utilisé et A1, 1 μ l de la suspension du virus de la granulose purifiée). En B se trouve la position des témoins négatifs utilisés (1 μ l d'ADN de thymus de veau et 3 μ l de broyât larvaire non-infecté). La ligne de séparation situe la frontière entre les larves infectées par une dose de CfGV de 10^7 et une dose de 10^8 granules. Les signaux d'intensité très forte obtenus démontrent la présence du virus de la granulose dans les broyâts larvaires

déposés sur la membrane d'hybridation. Avec les échantillons déposés, il faut noter que pour la dose de 10^7 granules, un signal positif est obtenu dans 70% des cas, tandis que pour la dose de 10^8 granules, un signal positif dans 75% des dépôts sur membrane d'hybridation est obtenu. Cette partie de l'expérience confirme donc le type de virus qui agit en tant que élément pathogène (le CfGV), en plus d'attester que le niveau d'infection (donc le % de mortalité) dépend de la dose de CfGV appliquée dans chaque cas. Ces résultats représentent ainsi un support supplémentaire pour valider notre démarche dans la détermination de la DL_{50} du CfGV.

FIGURE 11:

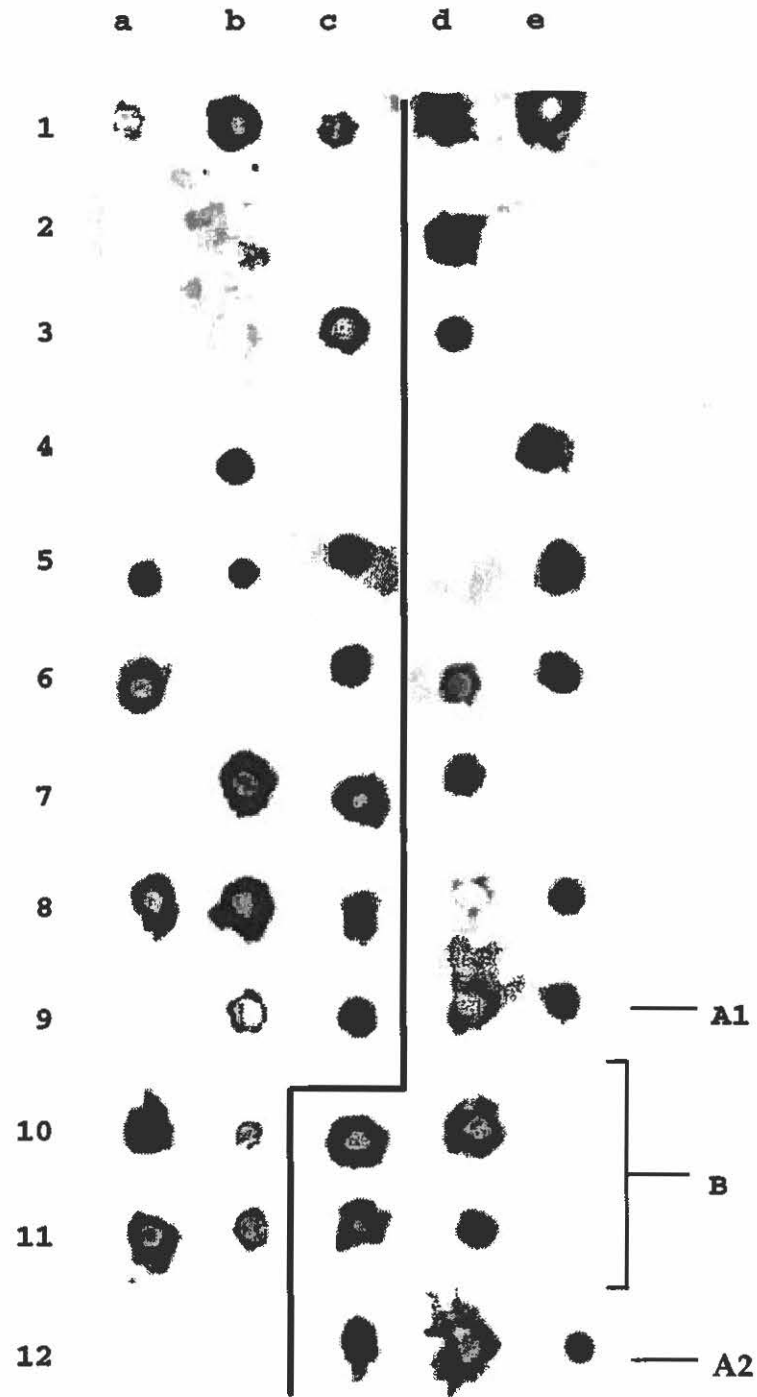
Suivi *in situ* de l'infection au laboratoire des larves de *C. fumiferana* en utilisant différentes doses de CfGV. L'hybridation moléculaire des membranes a été faite en utilisant comme sonde une séquence génomique spécifique au CfGV.

LÉGENDE:

- A1:** témoin positif correspondant à 2 µl d'une suspension de CfGV purifiée au laboratoire.
- A2:** témoin positif correspondant à 1 µl d'ADN de la sonde non marquée.
- B:** témoins négatifs correspondant au dépôt sur membrane de 3 µl de broyât d'une larve de *C. fumiferana* saine et 3 µl d'ADN de thymus de veau (100 ng).

Les autres signaux (positifs et négatifs) sont des dépôts de broyâts larvaires infectés au laboratoire par des doses de 10^7 et 10^8 granules de CfGV, respectivement à gauche et à droite de la ligne frontière.

Autoradiographie de l'infection au laboratoire
de *C. fumiferana* par différentes doses de CfGV



DISCUSSION

1. PRÉVALENCE DU VIRUS DE LA GRANULOSE DANS LA POPULATION NATURELLE DE *C. FUMIFERANA*.

Les agents pathogènes affectant les insectes (bactéries, virus et microsporidies), sont reconnus pour jouer un rôle majeur dans la régulation des populations d'insectes et dans une certaine mesure pour prévenir leurs épidémies (Barbosa et Wagner, 1989, Nadeau, 1991).

La transmission horizontale des infections par les baculovirus dans la nature est initiée par la dispersion des corps d'inclusion provenant des insectes morts. En se basant sur cela, des chercheurs ont estimés que le rendement en virus chez des larves d'insectes infectées augmente de façon remarquable au moment de l'infection, pouvant excéder 10^{10} corps d'inclusion/larve, pour les NPV et 10^{11} corps d'inclusion/larve, pour les VG. (Smith et Crook, 1993).

La première étape du projet a consisté en la vérification de la présence du CfGV, à partir d'échantillons de larves de *C. fumiferana* récoltées sur le terrain, par hybridation moléculaire en utilisant la technique de dépôt direct. Cette étape est une d'importance pour évaluer le potentiel insecticide du virus de la granulose sinon pour la validation du choix de cet agent dans la régulation des populations larvaires de *C. fumiferana* donc son utilisation comme outil dans un programme de lutte contre cet insecte.

Les résultats du diagnostic obtenus au cours des essais entrepris avec 1200 échantillons de Wakefield et 1100 échantillons de la Gaspésie en utilisant comme sonde une séquence cible du CfGV ont permis de mettre en évidence la présence du virus de la granulose dans la population naturelle de *C. fumiferana*. Les résultats obtenus, dans cette partie de notre travail, se sont révélés positifs dans quelques-uns des échantillons analysés, cependant dans une plus grande proportion pour les larves récoltées en Gaspésie. La différence dans la présence du CfVG entre ces deux régions est explicable par le fait qu'il y a déjà eu dans le passé une épidémie de tordeuse en Gaspésie. L'incidence plus importante du VG en Gaspésie pourrait s'expliquer par l'âge de la population de la tordeuse. En effet, les populations de la Gaspésie sont issues de la dernière épidémie, donc plus susceptibles au relation dépendante avec les pathogènes et parasitoïdes. De la même façon, la faible incidence du VG dans la population de l'Outaouais pourrait s'expliquer par le fait qu'il s'agit peut-être d'un début d'épidémie, donc une période de latence dans le délais d'installation des ennemis naturels de la tordeuse (virus, bactérie et parasitoïdes). D'autre part, il existe une relation dépendante entre les agents biologiques de contrôle et les populations de ravageurs. Ainsi, pendant une période d'épidémie, lorsque la population des ravageurs est à un maximum, on assiste à un début d'installation des pathogènes et des parasitoïdes. Avec l'augmentation de ces dernières, il se produit une chute dans la population des ravageurs au point où, lorsque le taux des ennemies

naturels (virus, bactérie et parasitoïdes) est à son maximum, la population des ravageurs décroît de façon considérable, jusqu'à un point où les deux populations sont à un niveau minimum. Ainsi, la présence de la tordeuse dans la région de l'Outaouais ainsi que la détection du CfGV dans la population de la *C. fumiferana*, mettent en perspective une possibilité d'un début d'épidémie mais ceci est à confirmer par un suivi annuel de l'évolution de la population de la tordeuse ainsi que du rôle du CfGV dans la dynamique des populations larvaires.

2. DÉTERMINATION DU POTENTIEL INSECTICIDE DES DIFFÉRENTS AGENTS MICROBIENS UTILISÉS

Ayant déterminé l'incidence du VG dans la population naturelle de la tordeuse, le second volet de notre recherche a été ensuite entrepris. Les activités de recherche se rattachant à ce deuxième volet se divisent en deux parties: l'évaluation du potentiel insecticide du virus de la granulose de *C. fumiferana* et celui de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 dans un premier temps, et ensuite la combinaison proprement dite des doses insecticides efficaces de ces deux préparations, cela dans le but de déterminer les effets synergiques, indépendants ou d'interférence découlant de l'utilisation en concomitance des préparations de CfVG et du *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 sur les larves de *C. fumiferana*. Un suivi de l'infection par le CfGV *in-situ* a été faite par la technique d'hybridation moléculaire.

Pour déterminer le potentiel insecticide des différentes préparations sélectionnées (virus et/ou bactéries), différents paramètres sont évalués par des essais biologiques. Un essai biologique est une expérience dans laquelle un organisme vivant, la larve de *C. fumiferana*, est directement utilisée comme sujet à tester. Cet essai mesure une réponse du type "tout ou rien" donc la mort ou la survie de l'organisme visé lorsque celui-ci est exposé à un pesticide. Généralement, un pesticide représente toute substance synthétique ou naturelle ou tout organisme qui nuis à un autre organisme jugé indésirable. Ainsi, les essais biologiques effectués sont des expériences utilisant comme pesticides le virus de la granulose de CfGV, le *B.t.k.* HD-1 et un mélange CfVG/*B.t.k.* HD-1 pour mesurer la mort ou la survie ou le ralentissement de la croissance des larves de *C. fumiferana* testées.

Pour ce qui est du CfGV, une relation de dépendance entre la mortalité, le temps d'incubation et la dose ingérée a été notée. La DL_{50} obtenue par l'action du CfGV se situe à $1,01 \times 10^5$ granules, après 288 heures d'incubation. Ce résultat est obtenu avec un intervalle de confiance de 95% et une probabilité associée au test statistique égale à 0,0034, ce qui signifie que ce résultat est valable. Selon une recherche récente, on estime la DL_{50} d'une souche du virus de la granulose de *Pieris brassicae* à 6×10^5 corps d'inclusion (Smith et Crook, 1993). Nous voyons

donc que notre DL_{50} se situe très près de celle trouvée par d'autres chercheurs pour le virus de la granulose.

D'autre part, nous constatons dans cette expérience, qu'il a été non seulement possible de déterminer, avec un intervalle de confiance de 95%, la DL_{50} , mais aussi de prédire, avec une certaine précision, le temps d'incubation nécessaire, à une dose donnée, pour obtenir un certain pourcentage de mortalité souhaité. Les résultats nous démontrent aussi qu'il est impossible d'obtenir 50% de mortalité pour toutes les doses testées à des temps d'incubation inférieurs à 192 heures, mais après ce temps, la DL_{50} est atteinte et dépendante de la dose à appliquée. L'analyse statistique, par le test de Duncan, ne démontre pas de différence significative pour toutes les doses appliquées avant le temps d'incubation de 192 heures en présence du virus. Cependant, après ce temps, les valeurs de mortalité corrigées commencent à différer selon des proportions dépendantes du temps d'incubation et de la dose ingérée.

Des études ont démontré qu'une seule application de VG contre les populations du vers de la pomme de terre a donné une efficacité de contrôle équivalente à 8 ou 10 applications de pesticides chimiques (Smith, 1975). Le traitement par le CfGV, en 1979, de régions forestières infectées a réduit de 74% les populations larvaires sans pour autant épargner les arbres des dégâts de la tordeuse (Cunningham, 1982). Ceci est dû vraisemblablement au fait que le

CfGV ne tue pas rapidement l'insecte s'il n'a pas été pulvérisé au cours du stade larvaire le plus susceptible à l'infection virale.

L'utilisation des essais biologiques sur des insectes pour déterminer le pouvoir insecticide des formulations de *B. thuringiensis* est courante depuis plus de 40 ans. Aujourd'hui toutes les préparations de *B. thuringiensis* produites aux États-Unis contre les lépidoptères sont standardisées à une concentration létale 50% de 16,000 unités internationales/mg (Beegle, 1985). Plus récemment, une utilisation d'une concentration égale à 600 unités internationales/ml de *B. thuringiensis var kurstaki* a donné une moyenne de 30% de mortalité dans une population d'insectes aquatiques après 9 jours d'incubation (Kreutzweiser *et al.*, 1992).

Il a été démontré que l'utilisation de *B. thuringiensis* peut être un moyen efficace de lutte contre *C. fumiferana*. Récemment, une étude conjointe de l'Institut Armand-Frappier et du ministère des forêts du Québec a permis d'augmenter l'efficacité insecticide des formulations de *B. thuringiensis* utilisées contre *C. fumiferana* (Guertin *et al.*, 1996).

Dans notre travail aussi il a été question d'évaluer l'action de la formulation commerciale de *B. thuringiensis var kurstaki* HD-1 sur *C. fumiferana*. Il a été noté dans ce cas aussi que le pourcentage de mortalité est directement relié à

la dose du complexe spores-cristaux delta-endotoxines de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 ingérés. Les pourcentages de mortalité ajustés par la formule d'Abbott, indiquent que l'intervalle de dose efficace se situe entre 0,1 ng et 1 ng, correspondant à un temps d'infection efficace de 12 jours d'incubation.

Dans cette expérience, il a été constaté que l'action de *B. thuringiensis* est de provoquer une mortalité rapide chez les jeunes stades larvaires. Ainsi, contrairement au virus de la granulose, *B. thuringiensis* cause une plus grande mortalité chez les jeunes stades larvaires, mais celles qui échappent à l'action des delta-endotoxines arrivent rapidement à la pupaison et deviennent ainsi vulnérable aux stades de prépupe et de chrysalide. Ce phénomène pourrait être dû à l'action des delta-endotoxines, qui en plus de provoquer une paralysie des pièces buccales, empêchant les larves de se nourrir de façon adéquate, vont avoir une action lytique sur les cellules épithéliales de l'intestin moyen des larves, provoquant ainsi la mortalité à court terme. Chez les larves qui se développent jusqu'au stade de la chrysalide, il peut y avoir induction de la germination des spores bactériennes, donc les larves meurent à moyen terme, par des actions combinées d'une septicémie et des effets toxiques de la delta-endotoxine. Ainsi, la rapidité du développement larvaire à des doses de bactéries supérieures ou égales à 1,0 ng peut-être attribuable au fait que les larves qui demeurent vivantes après une certaine période d'infection vont développer une septicémie causée par la germination des spores bactériennes ingérées. Il est possible que ces larves

étant dans un certain état de stress mobilisent toute leur énergie pour passer à des stades subséquents. En effet, à des doses de 2 ng à 200 ng, la majorité des larves étaient au stade de prépupe et de la chrysalide, cela après 12 jours d'incubation en présence de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1. Ces résultats comparés au témoin, démontrent que ces derniers avaient des stades aussi avancés après 12 jours d'incubation mais dans une proportion un peu moins grande.

Des expériences ont déjà été effectuées en laboratoire, dans le passé, pour évaluer les effets de trois concentrations différentes du virus de la granulose et une application standard de *B. thuringiensis* Berliner, sur les paramètres biologiques de la teigne de la pomme de terre, *Phthorimaea operculella* (Von Arx *et al.*, 1989). Cette étude rapporte un faible taux de survie (0,4%) lorsque les larves de la teigne étaient élevées sur des tubercules traités avec *B. thuringiensis* (200 mg Thuricide/kg de pomme de terre). L'application d'un traitement avec la plus faible concentration de GV, réduit de manière plus significative le taux de survie de *Phthorimaea operculella* (Von Arx *et al.*, 1989).

D'autres chercheurs ont aussi rapporté la présence de bactéries sporulantes lors de la production *in vivo* du virus de la polyédrose nucléaire (Dispavirus) (Belkosky et Kaup, 1994). Il est donc possible d'envisager que la coexistence entre virus et bactéries entomopathogènes chez un même insecte pourrait être exploitable dans un programme de lutte contre un insecte ravageur.

Afin d'évaluer le potentiel du mélange *B. thuringiensis var kurstaki* HD-1 / CfGV comme insecticide, des larves ont été soumises à l'action de 9 doses de cette préparation. Dans ce cas aussi, il a été remarqué que la mortalité des larves est fonction des doses appliquées et du temps d'incubation. La combinaison de *B. thuringiensis var kurstaki* HD-1 et du CfGV ont des effets synergiques sur le développement des stades larvaires et sur la mortalité causée aux larves de *C. fumiferana*. En effet, l'augmentation par un pourcentage de mortalité de 10% dans chaque cas de l'utilisation des insecticides combinés, comparativement à l'utilisation du CfGV et *B.t.k.* HD-1 individuellement, nous prouve qu'il existe des interactions du type synergique.

Durant les trois dernières décades, des essais biologiques ont été fait avec pour objectif de sélectionner des souches microbiennes prometteuses contre plusieurs insectes de l'ordre des lépidoptères (Dulmage *et al.*, 1981). L'approche utilisée dans notre travail nous apporte comme possibilité non seulement d'utiliser des doses réduites d'insecticides, ainsi avec une économie d'échelle, avec un temps d'exposition réduit permettant ainsi un meilleur rendement, tout en évitant de subir des délais d'attente causés par les intempéries au moment des applications des insecticides sur le terrains. Cette réduction dans le temps d'action augmente donc la perspective de l'efficacité d'un traitement faisant appel à l'utilisation concomitante des deux insecticides.

Le principe de l'hybridation moléculaire est un basé sur la détection de séquences d'acides nucléiques à l'aide d'une fonction (Spiegelman et al., 1973; Meinkoth et Wahl, 1984). L'hybridation moléculaire, comme outil, nous a permis de visualiser l'infection par le CfGV. En effet, les résultats des autoradiographies obtenus démontrent des différences très marquées dans les intensités des signaux selon la dose de virus utilisée.

CONCLUSION

La lutte biologique s'exerce naturellement de façon spontanée dans la majorité de nos écosystèmes agricoles ou forestiers. Le CfGV et le *B. thuringiensis* var *kurstaki* sont relativement spécifiques d'un nombre limité d'espèces d'hôtes potentiels, par les maladies qu'ils causent. Leur emploi comme agents de lutte permet donc une intervention précise sans risque d'effets secondaires néfastes sur les ennemis naturels du ravageur visé.

L'un des objectifs fixés dans cette étude prospective est d'apporter un éclairage neuf sur l'utilisation en concomitance d'agents pathogènes comme le virus de la granulose de *C. fumiferana* et *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

Cette étude a permis d'évaluer le potentiel du CfGV comme moyen de lutte à court et moyen terme pouvant s'intégrer dans la stratégie d'intervention efficace contre la TBE. D'autre part, elle met en perspective la pertinence de l'utilisation de la combinaison du virus de granulose de *C. fumiferana* et de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 comme substance insecticide viable parmi les moyens de lutte déjà disponibles contre la tordeuse. La combinaison des deux insecticides a comme avantage, les effets quasi instantanés obtenus dans un délai d'intervention relativement court avec des doses plus réduites d'insecticides.

Les résultats issus des objectifs de ce travail ont permis d'établir la dynamique du virus de la granulose (CfGV) dans la population larvaire de la TBE. La biologie moléculaire comme outil a permis d'établir la mesure de l'incidence du virus dans la population naturelle de la *C. fumiferana* et le suivi *in-situ* du CfVG lors des infections en laboratoire avec différentes doses.

Ce travail ouvre aussi la porte à d'autres sujets de recherches. En effet, il sera possible lors de projets ultérieurs, d'isoler et d'identifier différentes souches virales pour constituer des banques d'isolats de différents VG, ou encore la préparation de sondes moléculaires propres à ces différents isolats viraux retrouvés dans la population naturelle de la tordeuse.

Enfin, l'approche développée lors de cette étude pourra être utilisée pour le développement de moyens de lutte biologique contre d'autres insectes ravageurs de la forêt et du milieu agricole.

REMERCIEMENTS

Ma plus grande reconnaissance va tout particulièrement aux Drs. Max Arella et Claude Guertin mais aussi à Mr. Jean Cabana dont la rencontre, au tout départ, ma permis de prendre conscience de toute l'importance de la lutte biologique.

Je voudrais remercier vivement le docteur Claude Guertin et le docteur Max Arella ainsi que le docteur Klupfell d'avoir accepté de diriger ce travail et pour leur disponibilité en tout temps, mais plus particulièrement pour leur grande patience témoignée à mon égard.

Mes plus sincères remerciements et ma plus vive reconnaissance vont à mes parents (en Afrique et au Canada) et mes amis, pour leur aide et support de tous les jours.

Je remercie madame Micheline Letarte pour l'encadrement et toute l'aide apportée à moi et aux autres tout au long de mon séjour.

Je remercie le Docteur Abderrazzak Merzouki pour son support et son aide.

Mes remerciements vont aussi à Madame Nicole Mayeu et Madame Suzanne Dion pour leurs aides et leurs supports.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Mr. Dan Belkosky pour son aide.

Mes remerciements vont aussi à Mr. Benoît Hébert et à Mr. Aliou Bâh pour leur aide.

Je remercie également, très chaleureusement tout le personnel des Centres de Recherche en Virologie et de Microbiologie Appliquée, du régistariat, de la fondation Armand-Frappier, de la direction générale, de la direction scientifique, de la microscopie électronique, de l'informatique, de l'audio-visuel et de la bibliothèque pour tout support apporté à un moment ou à un autre.

Mes remerciements vont aussi à tous ceux et celles qui m'ont moralement et matériellement supporté jusque là.

Je voudrais particulièrement mentionner que l'approche proposée de même que l'ensemble des travaux de laboratoire associé à ce projet sont directement liés aux recherches du Dr. Claude Guertin. Les travaux ont été réalisés grâce à une subvention du Ministère des Ressources Naturelles accordée au Dr. Claude Guertin. Je tiens encore une fois à remercier vivement le docteur Claude Guertin à qui je dois beaucoup pour m'avoir soutenu du début à la fin du présent travail.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Ent. 18:265-267.
- ACKERMANN, H.-W. 1983. A morphological investigation of 23 baculoviruses. J. Invert. Pathol. 41:269-280.
- ADAMS J.R. et J.R. BONAMI. 1989. Atlas of invertebrate virus. eds. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor Boston London. Chap.1. pp.1-9. 37-59.
- ADANG, M.L., M.J. STAVER, T.A. ROCHELEAU, J. LEIGHTON, R.F. BAKER et D.V. THOMPSON. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. Gene, 36:289-300.
- AIZAWA, K. et T. AKIHIKO. 1983. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. Appl. Env. Microb. 45,(2):576-580.
- ALBERT, P.J. et C. GUERTIN. 1992. La résistance des plantes hôtes à la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepdoptera: Tortricidae). In C. VINCENT et D. CODERRE. 1992. Lutte biologique. Gaëtan Morin éditeur, Boucherville, Québec, Canada. Chap. 21 pp.409-417.
- ANGUS, T.A. 1970. Implications of some recent studies of *Bacillus thuringiensis*-A personal purview. Proc. IVth Int. Colloq. Insect Pathol., pp.183-189.
- ANGUS, T.A. et J.R. NORRIS. 1968. A comparison of toxicity of some varieties of *Bacillus thuringiensis* Berliner for silkworm larvae. J. Invert. Pathol. 11:289-295.
- ANONYME. 1994. Insectes et maladies des arbres. Québec 1993. Ministère des Ressources Naturelles du Québec et Ressources Naturelles du Canada. Publ. No FQ94-3023

- ANTHONY, S. et D. PANG. 1993. Use of synthetic peptides to probe functional domains of a *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Invert. Pathol.* 61:260-266.
- ARELLA, M. et S. BELLONCIK. 1987. Studies on detection and applications of viral pesticides. *In* proceedings of the International congress of virology, Edmonton, Canada.
- ARIF, B.M. 1986. The structure of the viral genome. *In* Current topics in microbiology and immunology: The molecular biology of baculoviruses, vol.131. W. Doerfler et P. Böhm, eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 21-29.
- ARIF, B.M., G. ZHANG et P. JAMIESON. 1986. A comparison of three granulosis viruses isolated from *Choristoneura* ssp. *J. Invert. Pathol.* 48:180-186.
- ARONSON A. et D. WU. 1990. Specificity in vivo and in vitro of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxine active on lepidoptera. *In* New Directory in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases. Alan R. Liss, Inc. pp. 547-559.
- ARONSON, A. I., W. BECKMAN et P. DUNN. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50:1-24.
- BÂH, A., C. GUERTIN, O.A. DICKO, Y. BERGERON, M. ARELLA et J. CABANA. 1996. Potentiel du virus de la granulose comme agent de lutte biologique contre la TBE. *Compte rendu du séminaire sur la TBE.* Ministère des Ressources Naturelles du Québec. Publ. No RN96-3006.
- BAPE. 1991a. Rapport d'enquête et d'audience publique. Programme de pulvérisations aériennes contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (1985-1989). Bureau d'audience publiques sur l'environnement, rapport spécial numéro 2, Québec.

- BAPE. 1991b. Rapport de la commission sur la protection des forêts. Des forêts en santé. Bureau d'audience publiques sur l'environnement, rapport spécial numéro 2, Québec.
- BARBOSA, P. et M.R. WAGNER, 1989. Introduction to forest and shade tree insects. Academic Press. New York.
- BECHTEL, D. B. et L. A. BULLA, JR. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 127,(3):1472-1481.
- BEEGLE, C. C. 1989. Bioassay Methods for Quantification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. In Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. Chap.3 Eds. Mycogen Corporation & Sandoz Crop Protection Corporation. pp.14-21.
- BEEGLE, C.C. 1979. Histopathology and bioassay of *Plathypena scabra* granulosis virus. J. Invert. Pathol. 32:325-331.
- BERGÉ, J.B. 1987. Insectes contre insecticides: la résistance s'organise. Biofuture, 63:45-50
- BERGOLD, G.H. 1951. The polyhedral disease of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). Can. J. Zool. 29:17-23.
- BERGOLD, G.H. 1963. The molecular structure of some insect virus inclusion bodies. J. Ultrastr. Res. 8:360-368.
- BILIMORIA, S.L. 1986. Taxonomy and identification of baculoviruses. In Biology of the baculoviruses. R.R. Granados et B.A. Federici, eds. CRC Press, Boca Raton, Florida. Chap. vol.1,pp.37-59.

- BIRD, F.T. 1976. Effect of mixed infection of two strains of granulosis virus of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) on the formation of viral inclusion bodies. *Can. Entomol.* 108:865-871.
- BLAIS, J.R. 1964. Spruce budworm outbreaks in the past three centuries in the Laurentide Park, Québec. *Forest Chronicle*, 44:17-23.
- BLAIS, J.R. 1983. Trends in the frequency, extent, and severity of spruce budworm outbreaks in Eastern Canada. *Can. J. For. Res.* 13:539-549.
- BLAIS, J.R. 1985. The ecology of the eastern spruce budworm: a review and discussion. *In* Recent advances in spruce budworms research: proceedings of the CANUSA spruce budworm research symposium, Bangor, Maine, Sept. 16-20, 1984. C.J. Sanders, ed. Ottawa. pp. 49-58.
- BLISSARD, G. W. et G. F. ROHRMANN. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 35:127-155.
- BORDELEAU, C., D. GUERIN, L. INNES, D. LACHANCE, ET R. PICHER. 1988. Insectes et maladies des arbres, Québec 1987. Supplément de FORÊT CONSERVATION, 54, 10.
- BOURQUE, S.N., J.R. VALÉRO, J. MERCIER, M.C. LAVOIE et R.C. LEVESQUE. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:(2) pp. 523-527.
- BRITTEN, R.J. et E.H. DAVIDSON. 1985. Hybridisation strategy. *In* Nucleic acid hybridisation: A practical approach. Ed. by Hames, B.D. and S.J. Higgins. IRL Press. Oxford. Washington DC. pp.3-14.

- BROUSSEAU, R., A. SAINT-ONGE, G. PRÉFONTAINE, L. MASSON et J. CABANA. 1993. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59,(1):114-119.
- BULLA L.A. et M. P. STARR. 1975. (Ed). Bacterial as insect pathogens. *Ann. Rev. Microbiol.* 29:163-190.
- BURAND, J.P., C.Y. KAWANISHI et Y.S. HUANG. 1986. Persistent baculovirus infections *In Biology of the baculoviruses*. R.R. Granados and B.A. Federici, eds. CRC Press, Boca Raton, Florida. vol.1 Chap.8, pp.159-175.
- BURGESS, H. D. 1980. Progress in Microbial Control of Pests. Identification of Bacteria Found in Insects (G.E. BUCHER). pp.7-34. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*.(H. de BARJAC). pp.35-43.
- BURGESS, S. 1977. Molecular weights of lepidopteran baculovirus DNAs: Derivatioin by electron micro scopy. *J. Gen.Virol.* 37:501-510.
- BURLEY, S.K., A. MILLER, K.A. HARRAP et D.J. KELLY. 1982. Structure of the baculovirus nucleocapsid. *Virology*, 120: 433-440.
- CHANG, P. et Y. TANADA. 1978. Serological study on transmission of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (lepidoptera: Noctuidae), to other lepidopterous species. *J. Invert. Pathol.* 31:106-117.
- CHILCOTT, C. N. et P. J. WIGLEY. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats. in New Zealand. *J. Invert. Pathol.* 61:244-247.
- CROIZIER, B.M. et L. CROIZIER. 1977. Evaluation du poids moléculaire de la protéine des corps d'inclusion de divers baculovirus. *Arch. Virol.* 55:247-250.

- CROOK, N. E. et P. JARRETT. 1991. Viral and bacteria pathogens of insects. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement 70:91S-96S.
- CROOK, N.E. et C.C. PAYNE. 1980. Comparison of three methods of ELISA for baculoviruses. J. Gen. Virol. 46:29-37.
- CROOK, N.E., 1981. A Comparison of the granulosis viruses from *Pieris brassicae* and *Pieris rapae*. Virology, 115:173-181.
- CUNNINGHAM J.C. 1982. Field trials with baculoviruses: control of forest insect pests In Microbial and viral pesticides, E. Kurstak, eds. Marcel Dekker, N.Y., 1982. pp. 181-384.
- CUNNINGHAM J.C. et G.M. HOWSE. 1984. Eastern spruce budworm viruses: application and assessment. In Biological control programmes against insects and weeds in Canada, 1969-1980. J.S. Kelleher and M.A. Hulme, eds. Commonwealth Agricultural Bureaux, Ottawa, 1984. pp. 248-259.
- DAVID, W.A.L. et B.O.C. GARDINER. 1967. The persistence of a granulosis virus of *Pieris brassicae* in soil and in sand. J. Invert. Pathol. 9:342-347.
- De BARJAC, H. 1981. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In H.D. BURGESS, eds. Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980. Academic Press, Inc. New York. pp. 35-43.
- De BARJAC, H. et A. BONNEFOI. 1962. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga, 8:5-31.
- De BARJAC, H. et E. FRACHON. 1990. Classification des souches de *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga, 35(2) pp.233-240.
- DENHARDT, D.T. 1966. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 23:641-646.

- DESMARTEAUX, D., G. CHARPENTIER et M. ARELLA. 1992. A simple method for the extraction of baculovirus DNA. *J. Virol. Methods*, 37:235-240.
- DUBOIS, N.R. et F.B. LEWIS. 1981. What is *Bacillus thuringiensis*. *J. Arboriculture*, 7(9): 233-240.
- DULMAGE, H. T. 1970. Production of the spore-delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 16:385-389.
- DULMAGE, H. T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In H.D. Burgess, eds. *Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980*. Academic Press, London. pp. 193-222.
- DULMAGE, H. T., O. P. BOENING, C. S. REHNBORG et G. D. HANSEN. 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *J. Invertebr. Pathol.* 18(2):240-245.
- EVANS, H.F. 1986. Ecology and epizootology of baculoviruses. In *Biology of the baculoviruses vol.2*, R.R. Granados et B.A. Federici, eds. CRC press, Boca Raton, Florida. Chap.4, pp.89-132.
- FALCON, L. A. 1971. Use of bacteria for microbial control. In H.D. Burges and N.W. Hussey, eds., *microbial control of insects and mites*. Academic Press, Inc., New York. pp. 67-95.
- FALCON, L.A. 1985. Development and use of microbial insecticides. In *Biological control in agricultural IMP systems*. Academic Press, Orlando, 589 pp. 229-242.
- FAST, P.G. 1981. The Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. In "Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980." (H.D. BURGESS, Ed.), Vol. 2, Academic Press, New York/London. chap.12, pp.223-248.

- FAST, P.G. et T.P. DONAHUE. 1971. The delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. II. On the mode of action. *J. Invertebr. Pathol.* 18:135-138.
- FAULKNER, P. et E.B. CARSTENS. 1986. An overview of the structure and replication of baculoviruses. *In* Current topics in microbiology and immunology: the molecular biology of baculoviruses, vol.131. W. Doerfler et P. Böhm, eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1-19.
- FAUST, R.M., G.M. HALLAM et R.S. TRAVERS. 1974. Degradation of the parasporal crystal produced by *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*. *J. Invertebr. Pathol.* 24:365-373.
- FEDERICI, B.A. 1986. Ultrastructure of baculoviruses. *In* Biology of the baculoviruses vol.1, R.R. Granados et B.A. Federici, eds. CRC Press, Boca Raton, Florida. Chap.3, pp.61-88.
- FLEMING, R.A. 1985. The role of infectious disease in the population dynamics of the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) *In* Recent advances in spruce budworms research: proceedings of the CANUSA spruce budworm research symposium, Bangor, Maine, Sept. 16-20, 1984. C.J. Sanders, eds. Ottawa. pp. 108-111.
- GARCZYNSKI, S.F., J. W. CRIM et M. J. ADANG, 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57,(10):2816-2820.
- GEISER, M., S. SCHWEITZER et C. GRIMM. 1986. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the kurhd1 gene of subsp. *kurstaki* HD1. *Gene*, 48:109-118.

- GONZALEZ, J. M., H. T. DULMAGE et B. C. CARLTON. 1981. Correlation between specific and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 5:351-365.
- GRANADOS, R. R. et K.A. WILLIAMS. 1986. *In vivo* infection and replication of baculoviruses. *In Biology of the baculoviruses vol.1*, R.R. Granados and B.A. Federici, eds. CRC Press, Boca Raton, Florida. Vol.1 chap.4, pp. 89-108.
- GRANADOS, R.R. 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnology and Bioengineering* 22:1377-1405.
- GREENBANK, D.O. 1963. Host species and spruce budworm. *In: The dynamics of epidemic spruce budworm populations*, pp. 219-223 (Morris, ed.). *Mem. Entomol. Soc. Can.* 31.
- GRIECO, V.M. et K.D. SPENCE. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and light visible. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:906-910.
- GRIECO, V.M., D. MOFFET et K.D. SPENCE. 1979. Inhibition of active K⁺ transportation in the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut after injection of *Bacillus thuringiensis* endotoxine. *J. Insect. Physiol.* 25:283-288.
- GRIECO, V.M., L.J. FANCHER et K.D. SPENCE. 1980. Scanning electron microscopy of the disruption of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Invert. Pathol.* 35:186-189.
- GRONER, A. 1986. Specificity et safety of baculoviruses. *In Granados, R.R., and B.A. Federici (Eds), The biology of baculoviruses*. Florida: CRC Press. pp.177-202.

- GUERTIN, C. 1992. Interaction between the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae), and white spruce, *Picea glauca* (Moench) Voss, its host plant: variations in foliar carbohydrate and amino acid content and insect feeding behaviour. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy at Concordia University. p.138.
- HANNEY, C. L. et P. FITZ-JAMES. 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Can. J. Microbiol.* 1:694-710.
- HARDY, Y.L., A. LAFOND et L. HAMEL. 1983. The epidemiology of the current spruce budworm outbreak in Québec. *For. Sci.* 29:715-725.
- HARPER, J.D. 1986. Interaction between baculoviruses and other entomopathogens, chemical pesticides, and parasitoids. *In* Biology of the baculoviruses vol.1, R.R. Granados and B.A. Federicis, eds CRC Press, Boca Raton, Florida. Vol.2, chap.5, pp.134-155.
- HARRAP, K.A. et C.C. PAYNE. 1979. The structural properties and identification of insect viruses. *Adv. Virus Res.* 25:273-355.
- HARVEY, G.T. 1985. The taxonomy of the coniferaphagous *Choristoneura* (Lepidoptera:Tortricidae). A Review. *In* Recent advances in spruce budworms research: proceedings of the CANUSA spruce budworm research symposium, Bangor, Maine, Sept. 16-20, 1984. C.J. Sanders, eds. Ottawa. pp. 16-59.
- 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. *J. Gen. Virol.* 72:2645-2651.
- HEIMPEL, A.M. et T.A. ANGUS. 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 1:152-170.

- HOFMANN, C., H. VANDERBRUGGEN, H. HÖFTE, J. VAN RIE, S. JANSENS, H. VANDERBRUGGEN et H. VAN MELLAERT. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxine is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midgut.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7844-7848.
- HÖFTE H., J. VAN-RIE, S. JANSENS, A. VAN HOUTVEN, H. VANDERBRUGGEN et M. VAECK. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 54,(8):2010-2017.
- HÖFTE, H. et WHITELEY. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242-255.
- HUBER H.E. et P. LÜTHY. 1981. *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin: composition and activation. In Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Davidson, ed. Allaheld, Osmun (Totowa, N.J.). Chap. 8, pp.209-234.
- HUBER, H. E., P. LÜTHY, H.-R. EBERSOLD et J.-L. CORDIER, 1981. The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: size, linkage and toxicity. J. Gen. Microbiol. 129:14-18.
- HÜBER, J. 1986. Use of baculoviruses in pest management programs. In Biology of the baculoviruses vol.1, R.R. Granados et B.A. Federici, eds CRC Press, Boca Raton, Florida. Vol.2, Chap.7, pp.181-202.
- HUGHES, P. R. et H. A. WOOD, 1996. *In vivo* production, stabilization, and infectivity of baculovirus pre-occluded virions. Appl. Environ. Microbiol. 62:105-108.

- HUKUHURA, T. et J.-R. BONAMI. 1992. Viruses of insects. *In* Atlas of invertebrate virus, Reoviridae. J.-R. Adams et J.-R. Bonami, eds. CRC Press Inc. Boca Raton, U.S.A. Chap. 15, pp. 383-434.
- HURTAK D.C. et W.E. BARTON. 1991. A simple technique for determining relative toxicities of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* formulations against larvae blackflies (diptera: Simuliidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7,(2):313-315.
- IGNOFFO, C.M. 1968. Specificity of insect viruses. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 14:23-40.
- JAKES, R.P. et D.R. LONG. 1978. Efficacy of mixtures of *Bacillus thuringiensis*, virus and chlordimeform against insects on cabbage. *Can. Entomol.* 110:443-448.
- JAKES, F., R. HUTTER et P. LÜTHY. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:500-504.
- JOHNSON, D. E. 1981. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein toward cultured insect tissue. *J. Invert. Pathol.* 38:94-101.
- JOHNSON, D.E., 1994. Cellular toxicities and membrane binding characteristics of insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* toward cultured insect cells. *J. Invert. Pathol.* 63:123-129.
- KANEKO, K., R. NOZAKI et K. AIZAWA. 1978. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Immunol.* 22:639-641.
- KAUPP, W.J. et P.M. EBLING, 1993. Horseradish peroxidase-labelled probes and enhanced chemiluminescence to detect baculoviruses in gypsy moth and eastern spruce budworm larvae. *J. Virol. Meth.* 44:89-98.

- KELLY, D.C. 1982. Baculovirus replication. Review article. *J. Gen. Virol.* 63, 1-13.
- KHACHATOURIANS, G.K. 1986. Production and use of biological pest control agents. *Trends Biotech.* 4:120-124.
- KNOWLES, B.H. et D.J. ELLAR, 1986. Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* lepidopteran-specific delta-endotoxin. *J. Cell. Sci.* 83:89-101.
- KONDO, E.S. et B.H. MOODY. 1987. Forest insects and disease conditions in Canada, 1986. Forest Insect and Disease Survey, Canadian Forestry Service, Ottawa (1987), 128 p.
- KREUTZWEISER, D. P., S. B. HOLMES, S. S. CAPELL et D. C. EICHENBERG, 1992. Lethal and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on aquatic insects in laboratory bioassays and outdoor stream channels. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49:252-258.
- KRONSTADT, J.W., H.E. SCHNEPF et H.R. WHITELEY. 1983. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Bacteriol.* 154:419-428.
- KRYWIENCZYK, J. H.T. DULMAGE et P.G. FAST. 1978. Occurrence of two serologically distinct group within *Bacillus thuringiensis* serotype 3ab var *kurstaki*. *J. Invertebr. Pathol.* 31:372
- KURSTAK, E. et P. TIJSSEN, 1982. Microbial and viral pesticides: modes of action, safety et future prospects. *In* Microbial and viral pesticides, E. Kurstak, eds. Marcel Dekker, New York, 1982. pp.181-202.

- LAMBERT, B., H. HÖFTE, K. ANNYS, S. JANSENS, P. SOETAERT et M. PEFEROEN. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2536-2542.
- LEE, L. H. 1992. Characterization of nonradioactive hybridization probes for detecting infectious bursal disease virus. *J. Virol. Methods*, 38:81-92.
- LEORA SOFTWARE. 1994. POLO-PC. Probit and logit analysis. Copyright by LeOra software. Berkeley, California. 28 p.
- LEPAGE, P. 1989. Detection du virus de la granulose de la piéride du chou, *Artogeia rapae*. par hybridation moléculaires. Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, 130 pp.
- LÜTHY, P. et H.R. EBERSOLD. 1981. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: histopathology and molecular mode of action. In *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*. Davidson, ed. Allenheld, Osmun (Toyowa, NJ). Chap. 17, pp.235-267.
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH et J. SAMBROOK, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- MARTINEAU, R. 1985. Insectes nuisibles des forêts de l'est du Canada. Éd. Marcel Broquet Inc. Chap.1, pp. 8-11.
- MATTHEWS, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy on Viruses. *Intervirology*, 17:1-179.

- McDOWELL, D. G. et N. H. MANN, 1991. Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* strain HD1-DIPEL. *PLASMID*, 25:113-120.
- McGAUGHEY, W.H., 1975. Compatibility of *Bacillus thuringiensis* and granulosis virus treatments of stored grain with four grain fumigants. *J. Invert. Pathol.* 26:247-250.
- McGAUGHEY, W.H., 1990. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. In *New Directory in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Alan R. Liss, Inc. pp. 583-598.
- McMORRAN, A.R., 1965. Synthetic diet for the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 97:68-72.
- MEINKOTH, J. et G. WAHL. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138:267-284
- MERZOUKI, A., 1989. Développement et applications d'approches biomoléculaires dans la détection du virus de la granulose de *Choristoneura fumiferana* (CfGV). Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier, Laval, Québec. pp 124.
- METTUS A.M. et A. MACALUSO. 1990. Expression of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxine genes during vegetative growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 56,(4):1128-1134.
- MILLER, C.A. 1963b. Parasites and the spruce budworm. In the dynamics of epidemic spruce budworm populations. R.F. Morris, ed. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 31:228-244.

- MILLER, C.A. 1984. *Choristoneura fumiferana* (Clemens), the spruce budworm: pest status *In* Biological control programmes against insects and weeds in Canada, 1969-1980. J.S. Kelleher and M. A. Hulme, Eds., Commonwealth Agricultural Bureaux, Ottawa, 1984. 323 p.
- MILLER, C.A., 1963a. The spruce budworm: the bionomics of the spruce budworm. *In* The dynamics of epidemic spruce budworm populations. R.F. Morris, ed. Memoirs of the Entomological Society of Canada., 31:12-19.
- MILLER, L.K., A.J. LINGG et L.A. BULLA, Jr. 1983. Bacterial, viral and fungal insecticides. *Sciences*, 219: 715-721.
- MORRIS, R.F. 1963. Introduction to the dynamics of epidemic spruce budworm populations. *In* The dynamics of epidemic spruce budworm populations. R.F. Morris, eds. Memoirs of the Entomological Society of Canada. 31:7-12.
- MURPHY, D.W., S.S. SOHI et P.G. FAST. 1976. *Bacillus thuringiensis* enzyme-digested δ -endotoxine: effect on cultured insect cells. *Science*, 194:954-956.
- NADEAU, M., 1991. Développement et application de l'hybridation moléculaire pour la détection du virus de la polyédrose nucléaire de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (VPNMCf). Mémoire de maîtrise. Institut Armand-frappier, Laval, Québec. pp 138.
- NAGATA, M. et Y. TANADA. 1983. Origin of alkaline protease associated with the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Arch. Virol.* 76:245-256.
- NAVON, A. et M. KLEIN. 1990. *Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana*, and *Spodoptera littoralis* larvae based on standardized diets. *J. Invert. Pathol.* 55:387-393.

- NISHIITSUTSUJI, U.J. et Y. ENDO. 1979. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxine; Effect on TN-368 cells. *J. Invert. Pathol.* 34:267-275.
- NISHIITSUTSUJI, U.J. et Y. ENDO. 1980. Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* delta-Endotoxin: General Characteristics of Intoxicated *Bombyx* Larvae. *J. Invert. Pathol.* 35:219-228.
- OGIWARA, K., L.S. INDRASITH, S. ASANO et H. HORI. 1992. Processing of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invert. Pathol.* 60:121-126.
- PANG, A.S.D., 1993. Use of synthetic peptides to probe functional domains of a *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Invert. Pathol.* 61:260-266.
- PANG, A.S.D., 1994. Detection of *Choristoneura fumiferana* brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by crossed affinity immunoelectrophoresis. *Biochemical and Biophysical Researc communication.* 199,(3):1194-1199.
- PAYNE, C.C. 1988. Pathogens for control of insect: where next? *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B 318, 225-248.
- PAYNE, C.C. et D.C. KELLY. 1981. Identification of insect and mite viruses. *In* *Microbial control of insects and mites*, 2nd eds. D. BURGESS, eds. Academic Press. New York.
- POINAR, G.O. jr. et G.M. THOMAS. 1985. *Laboratory guide to insect pathogens and parasites.* Plenum Press, New York, 392 p.
- PREFONTAINE, G., P. FAST, P.C.K. LAU, M.A. HEFFORD, Z.HANNA et R. BROUSSEAU. 1987. Use of oligonucleotide probes to study the relatedness of delta-endotoxin genes among *Bacillus thuringiensis* subspecies and strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2802-2814.

- PRISSON, R. 1985. Production of insect pathogenic viruses in cell culture. *Biotechnology* 2:71-83.
- RAJNCHAPEL-MESSAIĀ, J. 1990. Les biopesticides. Dossier. *Biofutur*, 92:23-34.
- RAJNCHAPEL-MESSAIĀ, J. 1993. *Bacillus thuringiensis*, les insectes font de la résistance. *Biofutur*, 127:33-38.
- RENZ, M. et C. KURZ. 1984. A colorimetric method for DNA hybridization. *Nuc. Ac. Res.* 12:248-251.
- ROBERTSON J.S., K.A. HARRAP et J.F. LONGWORTH. 1974. Baculovirus morphogenesis:the acquisition of the virus envelope. *J. Invert. Pathol.* 23:248-251.
- ROHRMANN, G. F. 1992. Review article Baculovirus structural proteins. *J. Virol.* 73:749-761.
- ROWE, J.S. 1972. Forest regions of Canada. Can. For. Serv. Ottawa. Publ. No. 1300. 172 p.
- ROYAMA, T. 1984. Population dynamics of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.): a reinterpretation of life table studies from the Green River Project. *Ecol. Monog.* 54:429-462.
- SAS INSTITUTE INC. 1985. SAS user's guide: Statistics. Version 5. Sas Institute Inc. North Carolina.
- SAIKI, R.K., D.H. GELFAND, S. STOFFEL, S.J. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS et H.A. ERLICH. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

- SCHERRER, B. 1984. Biostatistique. Gaëtan Morin éditeur. Chicoutimi, Québec, Canada. 850 p.
- SCHNEPF, H., H.C. WONG et H.R. WHITELEY. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. 260:6264-6272.
- SCOTTI, P.D. et J.F. LONGWORTH. 1978. Purification of polyhedra from insect extracts contaminated with a small isometric virus. J. Invert. Pathol. 32:216-218.
- SHAPIRO, M. 1986. In vivo production of baculoviruses *In Biology of the baculoviruses* vol.2, R.R. Granados and B.A. Federici, eds. CRC Press. Boca Raton, Florida. Chap.2, pp.31-61.
- SHARPE, E.S. et F.L. BAKER, 1979. Ultrastructure of the unusual crystal of the HD-1 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Invert. Pathol. 34:320-322.
- SMITH I.R.L. et N.E. CROOK. 1993. Characterization of new baculovirus genotypes arising from inoculation of *Pieris brassicae* with granulosis viruses. J. Gen. Virol. 74:415-424.
- SOMMERVILLE, H.J. 1971. Formation of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*. Eur. J. Biochem. 18:226-237.
- SUMMERS, M.D. 1977. Baculoviruses (*Baculoviridae*). *In The Atlas of plant and animal viruses*, Maramorosh, K.(Ed), Academic Press. New YORK.
- SUMMERS, M.D. et G.E. SMITH. 1975. *Trichoplusia ni* granulosis virus granulin: a phenol phosphorylated protein. J. Virol. 16:1108-1116.

- TANADA, Y. et R.J. LEUTTENEGGER. 1970. Multiplication of granulosis virus in larval midgut cells of *Trichoplusia ni* and possible pathways of invasion into the hemocoel. *J. Ultrastr. Res.* 30:389-600.
- TOMPKINS G.J. 1992. Purification of invertebrate viruses. *In Atlas of invertebrate virus*, Reoviridae. J.-R. Adams et J.-R. Bonami, eds. CRC Press Inc. Boca Raton, U.S.A. Chap. 15, pp. 383-434.
- TWEETEN, K.A., L.A. BULLA et R.A. CONSIGLI. 1978. Characterization of an alkaline protease associated with a granulosis virus *Plodia interpunctella*. *J. Virol.* 33:877-886.
- TWEETEN, K.A., L.A. BULLA et R.A. CONSIGLI. 1981. Applied and molecular aspects of insect granulosis virus. *Microbiol. Rev.* 3:379-408.
- VAGO, C. et M.BERGOIN. 1963. Développement des virus d'insectes à corps d'inclusions du lépidoptère *Lymantria dispar* en culture cellulaire. *Entomophaga*, 8:253-261.
- VALERO, J.R. 1990. Microbiologie contre la tordeuse. Recherches à Forêts Canada, Région du Québec. *L'Aubelle* Decembre:12-15.
- VAN FRANKENHUYZEN, K., J.L. GRINGORTEN, R.E. MILNE, D. GAUTHIER, M. PUSZTAI, R. BROUSSEAU et L. MASSON, 1991. Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest lepidoptera. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1650-1655.
- VAN FRANKENHUYZEN, K., R. MILNE, R. BROUSSEAU et L. MASSON. 1992. Comparative toxicity of the HD-1 and NRD-12 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to defoliating forest lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 59:149-154.

- VAN RIE, J., S. JANSSENS, H. HÖFTE, D. DEGHEELE et H. VAN MELLAERT. 1990. Receptors on brush border membrane of the insect midgut as determinants of specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1378-1385.
- VAN RIE, J., W.H. Mc GAUGHEY, D.E. JOHNSON, B.D. BARNETT et VAN MELLAERT. 1990. Mechanism of insect resistance to microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 247:72-74.
- VINCENT, C. et D. CODERRE. 1992. La lutte biologique. Gaëtan Morin éditeur. Boucherville, Québec, Canada. Chap. 2 pp. 19-88.
- VISSER, B. 1989. A screening for the presence of four different crystal protein gene types in 25 *Bacillus thuringiensis* strains. *FEMS Microbiol. Letters* 58:121-124
- VOLKMAN, L.E. et D.L. KNUDSON. 1986. *In vitro* REPLICATION OF BACULOVIRUSES. In GRANADOS, R.R., and B.A. FEDERICI, eds. The biology of baculoviruses. Florida. CRC Press. pp.109-128.
- VON ARX, R. et F. GEBHARDT. 1990. Effects of a granulosis virus, and *Bacillus thuringiensis* on life-table parameters of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculalla*. *Entomophaga*, 35,(1):151-159.
- VON TERSCH, M.A., H.L. ROBBINS, C.S. JANY et T.B. JOHNSON. 1991. Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* gene cloning and characterization and comparison with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(c) toxins. *Appl. Env. Microbiol.* 57,(2):349-358.

- WARD, V.K., S.B. FLEMING et J. KALMAKOFF. 1987. Comparison of a DNA-DNA dot-blot hybridisation assay with light microscopy and radioimmunoassay for the detection of a nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol. Meth.* 15:65-73.
- WHITELEY, J.R. et H.E. SCHNEPF. 1986. The molecular biology of parasporal body formation of *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. microbiol.* 40:549-576.
- WIDNER, W. R. et H.R. WHITELEY, 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J. Bacteriol.* 171,(2):965-974.
- WILLIAM, M. M. W.M., L. MASSON, R. BROUSSEAU et J.T. TRUMBLE, 1990. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 56,(8):2480-2483.
- WOOD, H. A., 1996. Genetically enhanced baculovirus insecticides. *In* Molecular biological control of pests and diseases of plants. Ed. by M. Gunasekaran and D.J. Weber. CRC Press, Boca Raton FL pp. 91-104.
- WU, D. et A. I. ARONSON. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* 267,(4):2311-2317.
- YAMAMOTO T. et Y. TANADA. 1978. Biochemical properties of viral envelopes of insect baculoviruses and their role in infectivity. *J. Invertebr. Pathol.* 32:202-211.

- YAMAMOTO T. et Y. TANADA. 1980. Physico-chemical properties and location of capsule component, in particular the synergistic factor, in the occlusion body of granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Virology*, 107:434-440.
- YAMAMOTO T., 1983. Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. *J. Gen. Microbiol.* 129:2595-2603.
- YOUNG, I.E. et P.C. FITZ-JAMES. 1959. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation . II. Spore and parasporal protein formation in *Bacillus cereus* var *alesti*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6:483-498.
- ZELANZNY, B., D. STEPHAN et J. HAMACHER, 1994. Irregular crystal formation in some isolates of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* 63: 229-234.
- ZHU, Y., T. HUKUHARA et K. TAMURA. 1989. Location of a synergistic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invert. Pathol.* 54:49-56.