

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Caractérisation du gène *pk-1* du granulovirus
de *Choristoneura fumiferana* codant potentiellement
pour une protéine kinase**

Par
Paresa Giannopoulos

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences
(M. Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Présidente du jury	Dre Monique Lacroix
Examinatrice externe	Dre Lucie Lamontagne
Examinatrice interne	Dre Monique Lacroix
Directeur de recherche	Dr Claude Guertin
Codirecteur de recherche	Dr Jean-François Laliberté

mars 2004

Résumé

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana*, est le plus important insecte ravageur des forêts de résineux en Amérique du Nord. Pour contrôler les populations de cet insecte, on envisage l'utilisation du granulovirus de la tordeuse (ChfuGV) dans les programmes de lutte. La caractérisation moléculaire du génome du ChfuGV est une étape prioritaire à franchir afin de permettre une compréhension de l'interaction virus-hôte. Dans ce cadre, ce projet a permis l'étude du gène *pk-1* du ChfuGV. Ce gène est homologue au gène *pk-1* du nucléopolyédrovirus d'*Autographa californica* (AcMNPV), le prototype des baculovirus.

Le gène *pk-1* du ChfuGV a été repêché dans le fragment de 11 kb de la banque génomique *BamH* I. Contrairement à l'AcMNPV qui exprime le gène *pk-1* dans les phases tardives de l'infection virale, le gène *pk-1* du ChfuGV est exprimé entre 2 et 72 h.p.i., tel que démontré par RT-PCR. Cette expression est supportée par la présence des motifs de promoteurs précoce et tardif dans la région 5'UTR. Les résultats par buvardage Northern indiquent que les transcrits sont multiples et de tailles variables, soit 2.4 kb, 1.2 kb et 0.4 kb. De plus, il y a superposition des transcrits des gènes *pk-1* et *granuline*. La séquence d'acides aminés déduite (PK-1) du gène *pk-1* contient tous les sous-domaines catalytiques conservés des protéines kinases de type Ser/Thr, indiquant que le gène coderait pour une protéine kinase active. Les analyses phylogénétiques démontrent que la séquence déduite de la protéine PK-1 du ChfuGV ressemble à celle du granulovirus de *Phthorimaea operculalla* (PoGV). De plus, l'analyse BLAST-protéine démontre que la séquence de la protéine PK-1 du ChfuGV semble partager une homologie avec diverses kinases associées à l'apoptose. Cependant, une fonction apoptotique de la protéine PK-1 du ChfuGV reste à être démontrée.

Ce projet a permis d'approfondir nos connaissances en ce qui concerne la biologie moléculaire du ChfuGV et des baculovirus en général. Pour conclure, le gène *pk-1* du ChfuGV possède un degré de similarité peu élevé par rapport au gène *pk-1* du AcMNPV, puisqu'ils diffèrent en ce qui a trait aux motifs du promoteur, aux propriétés physico-chimiques des protéines déduites, à

III

l'expression transcriptionnelle. Le tout est renforcé par l'analyse phylogénétique qui montre une dissociation entre ces deux protéines.



Étudiant



Directeur de recherche

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier ma famille qui m'a encouragée dans la poursuite de mes études. Ma reconnaissance va à Kia Rashidan pour m'avoir initiée aux domaines de biologie moléculaire et de bioinformatique, pour son aide continue, ses suggestions et ses encouragements à travers les stages d'été ainsi que le projet de maîtrise. J'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr Claude Guertin pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour ses conseils et pour son support financier. J'aimerais aussi remercier mon codirecteur Dr Jean-François Laliberté de m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour ses nombreux conseils. Je tiens aussi à remercier Dr Zahra Agharbaoui pour son aide dans les buvardages Northern.

Table des matières

Résumé.....	II
Remerciements.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	IX
Liste des abréviations.....	X
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1. Avantages des baculovirus en lutte biologique.....	3
1.2. Baculovirus.....	4
1.2.1. Généralités.....	4
1.2.2. Infection baculovirale.....	4
1.2.3. Expression des gènes baculoviraux.....	7
1.2.4. Protéines baculovirales.....	11
1.2.4.1. Protéines régulatrices.....	11
1.2.4.2. Protéines structurales.....	11
1.3. <i>Choristoneura fumiferana</i>	12
1.4. Granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>	12
1.5. Gène <i>pk-1</i> du nucléopolyédrovirus de <i>Autographa californica</i>	18
1.6. Phosphorylation baculovirale.....	19
1.7. Hypothèse et objectifs.....	21
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
2.1. Production virale.....	22
2.1.1. Production <i>in vivo</i> du ChfuGV et quantification virale.....	22
2.1.2. Purification des nucléocapsides enveloppées	23
2.1.3. Extraction des acides nucléiques.....	24
2.1.3.1. Extraction de l'ADN viral	24
2.1.3.2. Extraction de l'ARN total	24
2.2. Amplification, clonage et séquençage du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	26
2.2.1. Localisation du gène <i>pk-1</i> dans le fragment de 11 kb de la banque génomique <i>BamH I</i> du ChfuGV	26
2.2.2. Amplification du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	26
2.2.3. Clonage et séquençage du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	27
2.3. Étude de l'expression transcriptionnelle du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	29
2.3.1. Transcription inverse et polymérisation en chaîne (RT-PCR).....	29
2.3.2. Buvarage de type Northern	32
2.4. Analyses bioinformatiques.....	34

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	36
3.1. Caractérisation moléculaire du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	36
3.1.1. Amplification, clonage et séquençage du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	36
3.1.2. Carte physique de la région du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV et de certains baculovirus.....	36
3.1.3. Analyse de la séquence du promoteur du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV	36
3.1.4. Caractérisation de la séquence déduite en acides aminés (PK-1) du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	46
3.1.5. Analyse phylogénétique de la protéine kinase PK-1 du ChfuGV.....	47
3.1.6. Prédiction de la fonction de la protéine kinase PK-1 du ChfuGV.....	55
3.2. Analyse transcriptionnelle du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	62
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	75
4.1. Caractérisation moléculaire du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	75
4.1.1. Analyse de la séquence nucléotidique du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	75
4.1.2. Caractérisation de la séquence déduite PK-1 du ChfuGV.....	80
4.2. Analyse transcriptionnelle du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	92
CONCLUSION.....	96
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	98
ANNEXE I.....	121

Liste des figures

Figure 1 :	Cycle d'infection baculovirale.....	5
Figure 2 :	Phases d'expression des gènes baculoviraux.....	9
Figure 3 :	<i>Choristoneura fumiferana</i>	13
Figure 4 :	Granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>	16
Figure 5 :	Vecteur de clonage pCR2.1.....	30
Figure 6 :	Amplification du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	38
Figure 7 :	Organisation du gène <i>pk-1</i> à l'intérieur des génomes de certains baculovirus, incluant ChfuGV.....	40
Figure 8 :	Séquence nucléotidique et séquence déduite en acides aminés (PK-1) de la région du promoteur du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	42
Figure 9 :	Prédiction des sites potentiels des modifications post-traductionnelles dans la séquence déduite de la protéine PK-1 du ChfuGV.....	49
Figure 10 :	Comparaison des profils d'hydrophobicité prédits des séquences déduites des protéines PK-1 du ChfuGV et de certains baculovirus.....	51
Figure 11 :	Alignement multiple des séquences déduites des protéines PK-1 du ChfuGV et de certains baculovirus.....	58
Figure 12 :	Arbre phylogénétique des séquences déduites des protéines kinases PK-1 de certains baculovirus.....	60
Figure 13 :	Comparaison des profils d'hydrophobicité prédits de la séquence déduite de la protéine PK-1 du ChfuGV et de certaines protéines kinases DAPk.....	63
Figure 14 :	Alignement multiple de la séquence déduite PK-1 du ChfuGV et de certaines protéines kinases DAPk.....	65
Figure 15 :	Cinétique de l'expression transcriptionnelle du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV.....	69

VIII

Figure 16 :	Hybridation de type Northern en utilisant les sondes spécifiques aux transcrits des gènes <i>pk-1</i> et <i>granuline</i> du ChfuGV.....	71
Figure 17 :	Scénario d'apparition des transcrits du gène <i>pk-1</i> du ChfuGV basé sur la position des signaux de polyadénylation.....	73
Figure 18 :	Voies d'inhibition et d'induction de l'apoptose dans la cellule hôte.....	90

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Présence et positions des motifs de promoteurs situés en amont des codons d'initiation ATG des gènes <i>pk-1</i> de certains baculovirus.....	45
Tableau 2 :	Comparaison de la composition en résidus (%), des points isoélectriques et des poids moléculaires des protéines déduites PK-1 du ChfuGV et de certains baculovirus.....	48
Tableau 3 :	Liste des séquences similaires à la protéine déduite PK-1 du ChfuGV, obtenues par l'analyse BLAST-protéine.....	56
Tableau 4 :	Pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences des protéines déduites PK-1 de certains baculovirus.....	57
Tableau 5 :	Nombre de résidus partagés entre la protéine PK-1 du ChfuGV et certaines protéines DAPk.....	67

Liste des abréviations

aa	:	acide aminé
AcMNPV	:	nucléopolyédrovirus d' <i>Autographa californica</i>
ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
AfNPV	:	nucléopolyédrovirus d' <i>Anagrapha falcifera</i>
AgNPV	:	nucléopolyédrovirus d' <i>Anticarsia gemmatalis</i>
AoGV	:	granulovirus d' <i>Adoxophyes orana</i>
ARN	:	acide ribonucléique
ARNt	:	ARN de transfert
ARNm	:	ARN messenger
BmNPV	:	nucléopolyédrovirus de <i>Bombyx mori</i>
BV	:	virus bourgeonnant (non-inclus), « budded virus »
CfDEFNPV	:	nucléopolyédrovirus défectif de <i>Choristoneura fumiferana</i>
ChfuGV	:	granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
CfMNPV	:	nucléopolyédrovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
CpGV	:	granulovirus de <i>Cydia pomonella</i>
DAPk	:	protéine kinase associée à la mort cellulaire, « death-associated protein kinase »
DEPC	:	diéthyl puercarbonate
D.O.	:	densité optique
<i>egt</i>	:	gène codant pour l'ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase
EpapGV	:	granulovirus d' <i>Epinotta aporema</i>
EppoNPV	:	nucléopolyédrovirus d' <i>Epiphyas postvittana</i>
GV	:	granulovirus
HaNPV	:	nucléopolyédrovirus d' <i>Helicoverpa armigera</i>
h.p.i.	:	heure(s) post- infection
HzSNPV	:	nucléopolyédrovirus d' <i>Helicoverpa zea</i>
IAP	:	Protéine inhibitrice de l'apoptose, « Inhibitor of apoptosis protein »
CITV	:	Comité international de Taxonomie des virus
LdMNPV	:	nucléopolyédrovirus de <i>Lymantria dispar</i>
Lef	:	facteur d'expression tardif, « late expression factor »
McNPV	:	nucléopolyédrovirus de <i>Mamestra configurata</i>
MNPV	:	nucléopolyédrovirus à plusieurs virions par enveloppe
MOPS	:	acide 4-morpholinopropanesulfonique
NCBI	:	« National Center for Biotechnology Information »
NPV	:	nucléopolyédrovirus
NT	:	non-traduite, « untraslated region : UTR »
OpMNPV	:	nucléopolyédrovirus d' <i>Orgyia pseudotsugata</i>
ORF	:	cadre de lecture ouvert, « open reading frame »

XI

OV	:	virus inclus, (ou ODV « occlusion-derived virus »)
pb	:	paires de base
PCR	:	réaction de polymérisation en chaîne, « polymerase chain reaction »
pI	:	point isoélectrique
PiGV	:	granulovirus de <i>Plodia interpunctella</i>
Pk	:	protéine kinase
PoGV	:	granulovirus de <i>Phthorimaea operculella</i>
PTA	:	acide phosphotungstique
p/v	:	poids/volume
PxGV	:	granulovirus de <i>Plutella xylostella</i>
RNAse	:	ribonucléase
RT	:	transcription inverse
SDS	:	sulfate de dodécyle sodique
SeNPV	:	nucléopolyédrovirus de <i>Spodoptera exigua</i>
SINPV	:	nucléopolyédrovirus de <i>Spodoptera littoralis</i>
SNPV	:	nucléopolyédrovirus à un virion par enveloppe
UV	:	ultraviolet
v/v	:	volume/volume
XcGV	:	granulovirus de <i>Xestia c-nigrum</i>

Introduction

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem), est un insecte considéré comme le plus important ravageur des peuplements de sapins et d'épinettes blanches en Amérique du Nord. Le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) est un baculovirus indigène des populations de la tordeuse. On envisage l'intégration du ChfuGV dans la régie de lutte contre les populations de cet insecte ravageur. En effet, les propriétés insecticides du ChfuGV ont déjà été établies (Guertin, 1995; Forté, Guertin et Cabana, 1999). La caractérisation moléculaire de ce virus est une étape importante dans la compréhension des mécanismes de régulation des gènes impliqués dans l'infection virale. Ces études fournissent des éléments essentiels permettant d'approfondir nos connaissances sur les interactions entre ce virus et son hôte.

Ce projet porte sur la caractérisation du gène *pk-1* du ChfuGV, un homologue du gène *pk-1* du nucléopolyédrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV), le prototype des baculovirus. Chez le AcMNPV, le gène *pk-1* est exprimé dans les phases tardives et très tardives de l'infection virale. L'expression de ce gène donne des transcrits de tailles variables et qui se superposent. La séquence d'acides aminés possède les sous-domaines catalytiques conservés chez toutes les protéines kinases de type Ser/Thr. La protéine kinase du AcMNPV a été exprimée et son activité catalytique a été démontrée. Elle est capable de réaliser la phosphorylation *in vitro* du substrat d'histone H1, habituellement modifié par les kinases du cycle cellulaire. Elle interagit avec une autre protéine, appelée PKIP, laquelle possède probablement un signal de localisation nucléaire. De plus, cette interaction semble stimuler l'activité kinase. Le rôle précis de la protéine PKIP par rapport à PK-1 du AcMNPV n'a pas encore été clairement élucidé. Il semblerait qu'elle remplit une fonction importante dans l'infection puisque des analyses mutationnelles des gènes *pk-1* et *pkip*, empêchent la terminaison du cycle d'infection (Reilly et Guarino, 1994; Fan, Thirunavukkarasu et Weaver, 1996; Fan, McLachlin et Weaver, 1998).

La caractérisation du gène *pk-1* du ChfuGV permettra d'approfondir les connaissances sur la biologie du ChfuGV. Ce travail s'inscrit dans une démarche plus globale visant à la

caractérisation génomique et protéomique du ChfuGV afin de comprendre les interactions entre ce virus et son hôte.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1.1. Avantages des baculovirus en lutte biologique

Les baculovirus possèdent un spectre d'hôte relativement étroit se répliquant principalement à l'intérieur des arthropodes. Les baculovirus attaquent particulièrement les insectes de l'ordre des Lépidoptères (Ignoffo, 1968) et plus spécifiquement, les familles *Noctuidae* et *Tortricidae* (Tanada et Hess, 1991). Rarement, il peut arriver que certains baculovirus possèdent un spectre d'hôtes plus large. C'est notamment le cas de l'AcMNPV qui infecte 32 espèces d'insectes de 12 familles différentes. Toutefois, dans la majorité des cas, la spécificité des baculovirus est limitée à quelques espèces d'insectes très rapprochées à l'intérieur d'un même genre ou d'une famille (Hostetter et Puttler, 1991). Les baculovirus ont été isolés principalement chez les Lépidoptères et ils sont nommés selon le CITV d'après l'insecte hôte qu'ils infectent, suivi du type de corps d'inclusion duquel ils sont formés.

Les baculovirus sont considérés comme d'intéressants outils de lutte biologique contre certains insectes ravageurs forestiers et agricoles. Les baculovirus sont sécuritaires pour l'environnement car ils ne semblent pas affecter les insectes non-ciblés et les vertébrés (Hartig *et al.*, 1989; Hartig, Cardon et Kawanishi, 1991). Aucun phénomène de résistance d'insectes n'a été observé après un traitement à base de baculovirus. D'ailleurs, certains baculovirus sont déjà utilisés comme agents de lutte biologique, notamment au Brésil, en Chine et aux États-Unis (Moscardi, 1999; Zhang, Zhang et Sun, 1996). Des produits à base de granulovirus (GV), tel que CpGV et AoGV ont déjà été commercialisés (Crook, 1991; Wormleaton et Winstanley, 2001). L'usage des baculovirus reste toutefois limité dû au temps de réponse trop long entre l'application et la mort éventuelle de l'insecte. De plus, le spectre d'hôte trop étroit défavorise leur commercialisation. Il faut davantage étudier la biologie des baculovirus afin de mieux comprendre le mécanisme d'infection. Ainsi, il sera possible d'améliorer leur potentiel insecticide. Plus précisément, il s'agira de déterminer les gènes impliqués entre autres, dans la pathogénicité, la virulence et le spectre d'hôte.

1.2. Baculovirus

1.2.1. Généralités

Parmi les familles de virus affectant les insectes, les baculovirus (*Baculoviridae*) sont divisés en deux genres, les nucléopolyédrovirus (NPV) (Rohrmann, 1999) et les GV (Winstanley et O'Reilly, 1999). Le génome des baculovirus est constitué d'un ADN circulaire double brin superenroulé d'une longueur variant de 90-160 kpb (Blissard et Rohrmann, 1990). Le génome des baculovirus contient environ 200 gènes. Certains gènes peuvent se superposer et la lecture peut se faire de façon bidirectionnelle sur chacun des deux brins (Maeda, 1989). La morphologie générale des baculovirus comprend une structure protéique et une membrane lipidique entourant l'ADN appelée nucléocapside enveloppée. De plus, les baculovirus possèdent aussi une fine couche appelée tégument, située entre la nucléocapside et l'enveloppe (Blissard, 1996). La nucléocapside enveloppée est entourée d'une couche protéique paracristalline nommée corps d'inclusion. Ce dernier sert de protection contre les facteurs environnementaux (i.e. dessiccation, UV et nucléases), lorsque le virus se retrouve à l'extérieur d'une cellule hôte (Jarvis et Garcia, 1994).

Le corps d'inclusion est composé majoritairement d'une protéine paracristalline appelée polyédrine pour les NPV et granuline pour les GV. Les particules virales sont en forme de granules chez le GV et en forme de bâtonnets chez les NPV. Les GV n'ont qu'un seul virion par nucléocapside et une seule nucléocapside par enveloppe (Crook, 1991). Les NPV, au contraire, possèdent plusieurs virions par nucléocapside et une (SNPV) ou plusieurs nucléocapsides (MNPV) par enveloppe (Miller, 1996).

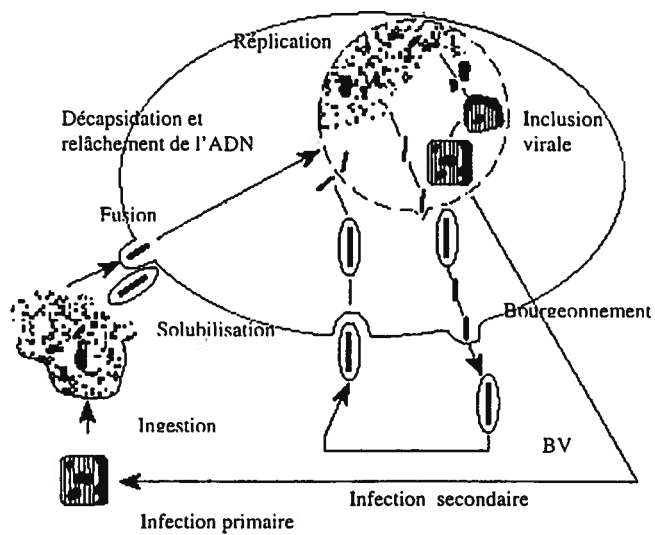
1.2.2. Infection baculovirale

Pour les deux genres de baculovirus, il existe deux phénotypes de virions qui apparaissent à des moments différents durant l'infection : les virus inclus ou OV qui possèdent un corps d'inclusion et les virus non-inclus ou bourgeonnants, appelés aussi BV (Rohrmann, 1992). Ces deux phénotypes se distinguent par leurs structures et leurs morphologies (Braunagel et Summers, 1994).

Figure 1 Cycle d'infection baculovirale (Adapté à partir de « A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures », M. D. Summers and G. E. Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555).

Abréviation

BV : virus bourgeonnant (non-inclus)



Le mécanisme d'infection des baculovirus est constitué de deux phases : l'infection primaire et l'infection secondaire. L'infection primaire est initiée suite à l'ingestion par les insectes du virus inclus. Dans l'environnement alcalin ($\text{pH} > 9,5$) de l'intestin moyen de l'insecte, la solubilisation du corps d'inclusion libère la nucléocapside enveloppée, laquelle fusionne à une cellule épithéliale de l'intestin moyen (Wang, Hammer et Granados, 1997). Une fois dans le cytoplasme, la nucléocapside se rend jusqu'au noyau de la cellule hôte à l'aide des filaments de microtubules (Charlton et Volkman, 1993). L'ADN viral inclus dans la nucléocapside est relâché dans le noyau, lieu de la réplication virale (Tanada et Hess, 1991).

L'assemblage des particules virales libres, appelées virions, se fait dans une structure spécifique à l'intérieur du noyau appelée stroma virogénique (Rohrmann, 1999). Les nucléocapsides par la suite bourgeonnent donnant des virus non-inclus qui se propagent pour infecter d'autres tissus de l'hôte. L'infection secondaire est initiée par les BV qui vont éventuellement atteindre plusieurs organes, tels que le corps gras, la trachée et l'épiderme, via l'hémolymphe, ou système circulatoire de la larve (Granados et Lawler, 1981; Faulkner, 1981). À la fin du cycle d'infection, les virions ne bourgeonnent plus de la membrane plasmique, et acquièrent leur membrane lipidique autrement. En effet, elle serait dérivée de la membrane nucléaire ou fabriquée *de novo* (Tanada et Hess, 1991). Les virions sont ensuite inclus dans la couche d'inclusion donnant le phénotype OV (Tanada et Hess, 1991). Il y a fabrication abondante des OV menant à la lyse cellulaire et à la libération des particules virales dans l'environnement (Consigli, Russel et Wilson, 1986). L'infection baculovirale, décrite globalement, fait intervenir plusieurs protéines dont la plupart restent à être déterminées.

1.2.3. Expression des gènes baculoviraux

Il existe trois catégories de gènes baculoviraux : précoces, tardifs et très tardifs (Friesen, 1997; Lu et Miller, 1997). Tous les gènes sont généralement localisés aléatoirement à travers le génome (Kool *et al.*, 1993). Les gènes sont exprimés en cascade au niveau transcriptionnel, où chaque phase successive est dépendante de la phase précédente (Dobos et Cochran, 1980).

L'expression des gènes tardifs et très tardifs se fait après l'amorce de la réplication virale. La transition de la phase précoce à tardive est caractérisée par l'arrêt de la réplication et la synthèse de protéines de l'hôte. Certaines régions génomiques, appelées séquences répétées homologues peuvent avoir un effet sur l'expression génique. Les séquences sont constituées de palindromes imparfaits de 30 pb contenant un site d'enzyme de restriction *EcoR* I (Guarino, Gonzales et Summers, 1986). Ces régions faciliteraient la transcription des gènes précoces et serviraient aussi comme des points d'origines de la réplication de l'ADN baculoviral (Ayers *et al.*, 1994).

Les gènes précoces et tardifs/très tardifs possèdent des motifs de promoteurs précoces ((T/C)AGT) et tardifs/très tardifs ((A/T/G)TAAG), régulant leur expression (Blissard et Rohrmann, 1990; Garrity, Chang et Blissard, 1997; Morris et Miller, 1994). Certains gènes, tels que *gp64* (protéine structurale), *pp31* (protéine associée au stroma virogénique) et *egt* (protéine bloquant la mue) peuvent avoir des motifs de promoteurs précoce et tardif en tandem (Blissard et Rohrmann, 1989; Guarino et Smith, 1992, Chen *et al.*, 1997). La boîte TATA est présente en amont du site d'initiation de la transcription des gènes précoces (Blissard *et al.*, 1992), mais absente dans les gènes tardifs. Les gènes précoces possèdent des promoteurs ressemblant à ceux de l'hôte. En effet, le motif de promoteur précoce ressemble à l'initiateur transcriptionnel au motif TCAGT, spécifique aux arthropodes (consensus (A/C/T)CA(G/T)T) permettant une transcription par l'ARN polymérase de l'hôte (Cherbas et Cherbas, 1993; Edwards, Severson et Hagedson, 1998). Cependant, les gènes tardifs nécessitent l'ARN polymérase II codée par le virus (Guarino *et al.*, 1998).

La machinerie transcriptionnelle, ainsi que les éléments de régulation en *cis* semblent être conservés chez tous les eucaryotes, incluant les métazoaires (i.e. *Drosophila* et autres insectes) (Arnosti, 2003). Puisque les baculovirus se sont adaptés à leurs cellules hôtes pour survivre, plusieurs éléments de régulation retrouvés chez les insectes sont conservés dans les promoteurs de gènes baculoviraux. Ces éléments, tant présents dans les promoteurs des gènes précoces et tardifs, peuvent être reconnus par les facteurs de transcription de l'hôte. Par exemple, certains gènes précoces comme le *gp64* de l'OpMNPV et le *pe38* du AcMNPV possèdent le motif GATA, lequel est reconnu par des facteurs de transcription de l'hôte (Kogan et Blissard, 1994;

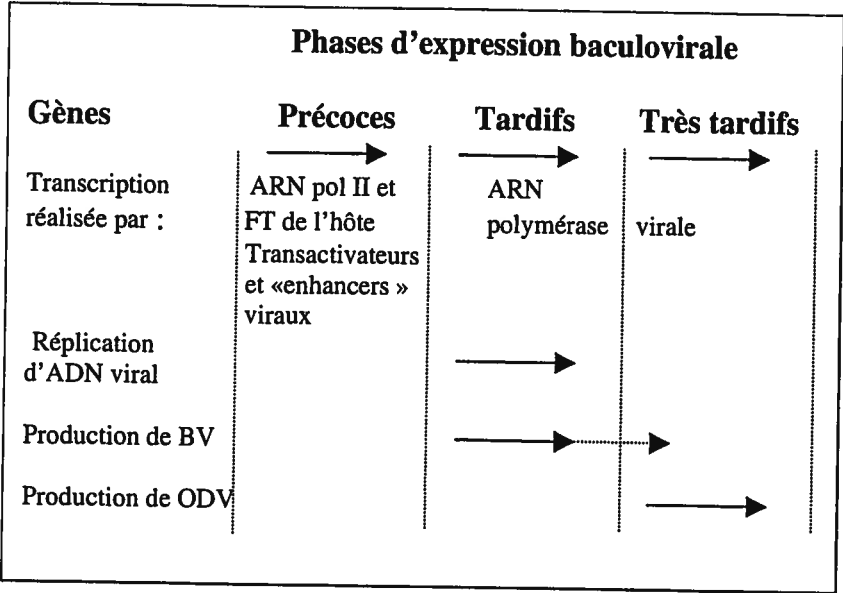
Figure 2 Phases d'expression des gènes baculoviraux (Adapté à partir de Hajós, 2000)

Abréviations

FT : facteur de transcription

BV : virus bourgeonnant (non-inclus)

ODV : virus inclus (OV), « occlusion-derived virus »



Krappa *et al.*, 1992). Le motif du gène *gp64* de l'OpMNPV peut aussi être reconnu par des facteurs de transcription de l'hôte. Enfin, certains gènes tardifs peuvent aussi être reconnus par la machinerie transcriptionnelle de l'hôte (Hasnain *et al.*, 1997).

1.2.4. Protéines baculovirales

1.2.4.1. Protéines régulatrices

Les protéines régulatrices incluent celles impliquées dans la réplication et la transcription du baculovirus. Elles peuvent être le résultat à la fois de gènes précoces et tardifs. Il existe de nombreux exemples de protéines régulatrices, notamment l'ADN polymérase ou dnapol (Ahrens et Rohrmann, 1995), l'ADN hélicase ou p143 (Maeda, Kamita et Kondo, 1993), les protéines LEF impliquées dans l'expression tardive (Lu et Miller, 1995; Chen et Thiem, 1997) et les protéines IE-1, IE-2 et PE-38, dont les produits régulent la transcription (Guarino et Summers, 1986). D'autres protéines de régulation sont associées à la modification des processus de l'hôte, comme l'EGT qui bloque la mue (O'Reilly et Miller, 1989), la dismutase de Cu/Zn superoxide (Tomalski, Eldridge et Miller, 1991), l'ubiquitine (Guarino, 1990), la protéine similaire à la conotoxine-omega (i.e. protéine régulatrice de la pompe ionique de Ca^{2+}) (Eldridge, Li et Miller, 1992) et la p10, une protéine impliquée dans l'assemblage de microtubules et la lyse cellulaire (Cheley *et al.*, 1992). Les protéines régulatrices chitinase et cathepsine facilitant la libération des corps d'inclusion et la liquéfaction des larves infectées (Hawtin *et al.*, 1995; Slack, Kuzio et Faulkner, 1995).

1.2.4.2. Protéines structurales

Les protéines structurales proviennent de gènes tardifs et très tardifs. Ces protéines peuvent être associées strictement aux phénotypes BV ou OV. Par exemple, les protéines granuline et polyédrine sont uniquement présentes sur l'OV (Bah *et al.*, 1997; Rohrmann, 1986). Parmi les protéines de l'enveloppe de l'OV, il y a l'OV-E18, l'OV-E35, l'OV-E25, l'OV-E56 et l'OV-E66 (Braunagel *et al.*, 1996a, Russell et Rohrmann, 1993; Braunagel *et al.*, 1996b; Hong, Braunagel et Summers, 1994). Il existe d'autres protéines structurales, comme la p6.9K de la capsidie assemblant l'ADN viral (Wilson et Price, 1988), la *gp64* (retrouvée sur l'enveloppe du BV) impliquée dans la fusion membranaire (Rohrmann, 1992), *gp41* (spécifique au tégument de

l'OV) (Whitford et Faulkner, 1992) et la p74 de la capsidie associée à l'infectivité de l'OV (Kuzio, Jacques et Faulkner, 1989). Des protéines sont associées à la capsidie comme la p39 (Blissard *et al.*, 1989), la p25 (Goh, 1993), la p80/87 (Lu et Carstens, 1992; Müller *et al.*, 1990) et la p91 (Russell et Rohrmann, 1997).

1.3. *Choristoneura fumiferana*

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), est un insecte de l'ordre des Lépidoptères et de la famille des *Tortricidae* (Gray, Régnière et Boulet, 1998). La tordeuse des bourgeons de l'épinette cause de façon cyclique d'importantes défoliations des forêts de résineux de l'est du Canada (Mattson, Simmons et Witter, 1988). Ses hôtes préférenciels sont le sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill) et l'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss) (Bonneau *et al.*, 1999). Les populations de *C. fumiferana* sont caractérisées par des épidémies cycliques (Washburn, Kirkpatrick et Volkman, 1996). Durant la dernière période épidémique dans la province du Québec, laquelle a duré approximativement 30 années, la tordeuse des bourgeons de l'épinette a amené des pertes estimées à près de 14 milliards de dollars.

Plusieurs approches ont été développées pour lutter contre les populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Actuellement, les insecticides à base de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (B.t.) sont les seuls autorisés dans la lutte contre ce ravageur. *B. thuringiensis* est capable de produire une toxine qui provoque une toxicémie chez les larves de *C. fumiferana*. Cependant, les insecticides à base de *B. thuringiensis* sont peu spécifiques (Cunningham, 1985) et une utilisation répétée et prolongée peut entraîner le développement éventuel d'une résistance (Tabashnik *et al.*, 1990). Il est alors important d'établir d'autres approches de lutte biologique.

1.4. Granulovirus de *Choristoneura fumiferana*

Le baculovirus étudié dans ce projet est le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV). Le génome du ChfuGV mesure environ 107 kpb (Arif, Guangyu et Jamieson, 1986). Ce virus se retrouve naturellement dans la tordeuse des bourgeons de l'épinette. *C. fumiferana* est aussi affecté par d'autres populations virales, notamment par CfMNPV et CfDEFNPV (Feng *et al.*,

Figure 3 *Choristoneura fumiferana* (Tiré de Miller, 2003)



2001). Présentement, peu d'informations sont connues sur le ChfuGV. L'absence de lignée cellulaire permissive pour le ChfuGV et pour les GV en général, ralentit la caractérisation moléculaire (Crook *et al.*, 1997; Winstanley et Crook, 1993).

Tel que mentionné, les baculovirus se divisent en deux genres, les GV et les NPV. Les GV possèdent quelques caractéristiques qui leurs sont propres. Par exemple, ils diffèrent morphologiquement des NPV par leurs corps d'inclusion qui possèdent une forme ovocylindrique mesurant 120 à 350 nm de largeur par 300 à 500 nm de longueur (Crook, 1991).

Pour débiter la réplication, les nucléocapsides des GV restent dans le cytoplasme en s'alignant au niveau du pore nucléaire et injectent l'ADN viral dans le noyau (Summers, 1971). Contrairement aux GV, les nucléocapsides des NPV entrent dans le noyau avant de relâcher l'ADN par décapsidation (Granados, 1978). De plus, durant l'infection par les GV, il y a une fusion entre le noyau et les régions cytoplasmiques. Ainsi, les virus d'inclusion pour les GV ne sont pas fabriqués uniquement dans le noyau (Crook *et al.*, 1997). La membrane nucléaire éclate avant l'inclusion dans la granuline des particules virales.

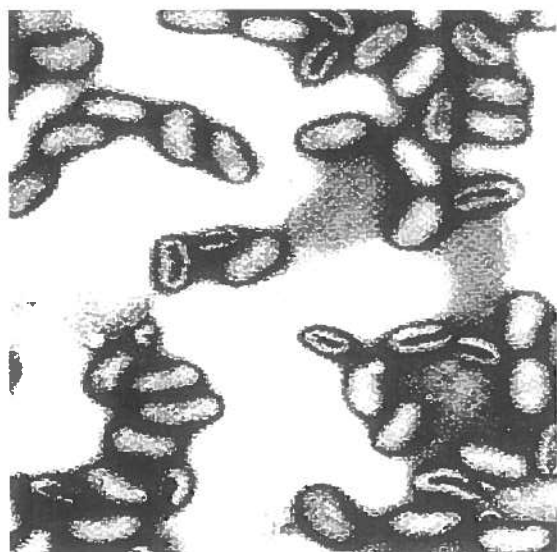
Les GV possèdent un spectre d'hôte plus étroit par rapport aux NPV, souvent restreint à une espèce (Murphey *et al.*, 1995). Les GV peuvent démontrer des spécificités tissulaires variables. Par exemple, il y a trois niveaux de tropisme tissulaire, affectant soit : 1) le corps gras uniquement 2) plusieurs tissus (corps gras, épiderme, etc.), avec les NPV et 3) l'épithélium du corps gras uniquement (Federici, 1997). Les granulovirus peuvent être subdivisés en deux classes, ayant soit une vitesse d'attaque rapide, affectant plusieurs tissus, ou lente, affectant seulement le corps gras ou l'épithélium du corps gras (Winstanley et O'Reilly, 1999). L'infectivité du phénotype OV chez les granulovirus est facilitée par la protéine « enhancin » (Gijzen, Roelvink et Granados, 1995)

Une fraction du génome de ChfuGV a été séquencée. Certains gènes du ChfuGV ont déjà été caractérisés, dont les suivants : la *granuline* (Bah *et al.*, 1997), l'*ORF891* (Bah *et al.*, 1999), l'*ie-1* (Rashidan *et al.*, 2002b), l'*egt* (Bourassa, 2000), le gène « *enhancin* » (Bourassa, 2000) et

Figure 4 Granulovirus de *Choristoneura fumiferana*

(Photo prise en microscopie électronique; agrandissement : 200 00X)





l'*odvp-6e/odv-e56* (Rashidan *et al.*, 2002a). D'autres gènes, séquencés au complet ou partiellement, ont simplement été déposés dans la banque de données GenBank. Il y a entre autres les gènes suivants : *ADN polymérase*, *iap*, *gp41*, *p91*, *lef-11*, *sod*, *ubiquitine*, *odv-e18*, *p49*, *p10* et *p74*. Il y a aussi d'autres cadres de lecture ouverts (ORF) sans fonctions connues qui ont été identifiés.

1.5. Gène *pk-1* du nucléopolyédrovirus de *Autographa californica*

Le nucléopolyédrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) correspond au baculovirus prototype de la famille *Baculoviridae*. Plusieurs gènes de AcMNPV ont été caractérisés, notamment le gène *pk-1* (Reilly et Guarino, 1994). Selon ses auteurs, le gène *pk-1* coderait pour une protéine kinase de type Ser/Thr capable de transférer un groupe γ -phosphorylé sur le groupement hydroxyle du résidu Ser/Thr du substrat (Hanks et Hunter, 1995). Le gène *pk-1* possède un ORF de 816 paires de bases codant pour une protéine de 272 acides aminés, l'équivalent d'un poids moléculaire de 32 kDa.

Le gène *pk-1* du AcMNPV est exprimé entre 12 h.p.i et 48 h.p.i. (h.p.i. définit comme le temps suivi l'entrée du virus dans la cellule). Il est considéré comme étant un gène à la fois tardif et très tardif. L'analyse transcriptionnelle du gène *pk-1* du AcMNPV indique que la transcription de l'ARNm débute à l'intérieur du motif consensus de promoteur tardif (A/G)TAAG. Les transcrits sont multiples et de tailles variables.

La séquence déduite d'acides aminés contient tous les sous-domaines catalytiques consensus I à XI décrits par Hanks, Quinn et Hunter (1988). Le gène *pk-1* du AcMNPV code pour une des plus petites protéines kinases de type Ser/Thr identifiées, car elle ne contient que le domaine catalytique N-terminal.

La protéine PK-1 du gène *pk-1* du AcMNPV a été exprimée dans le système de lysats de réticulocytes (RRL) et isolée. La protéine exprime une activité enzymatique de kinase, vérifiée par un essai kinase. Elle est capable de phosphoryler *in vitro* le substrat d'histone H1 exogène, connu comme étant phosphorylé habituellement par les protéines kinases cdc2+/CDC28 du cycle

cellulaire (Langan *et al.*, 1989). Si la protéine PK-1 est associée au cycle cellulaire, elle aurait probablement comme fonction de phosphoryler et de défaire la lamina tardivement dans l'infection permettant de relâcher les particules virales incluses de la cellule.

En utilisant le système à double hybride de levure, il a été démontré que la protéine PK-1 interagit avec une autre protéine codée par AcMNPV, appelée protéine PKIP pour *Protein Kinase Interacting Protein*. La protéine PKIP contient un motif signal putatif permettant la localisation nucléaire à l'extrémité N-terminale, suggérant qu'elle correspond à une protéine nucléaire. Au moment de l'expression du gène *pkip* indique qu'il est aussi un gène tardif, tout comme le gène *pk-1*. Une expérience, *in vitro*, a démontré que la protéine PKIP stimule l'activité de la protéine PK-1. La protéine PKIP est essentielle pour l'expression tardive et très tardive (Fan, Thirunavukkarasu et Weaver, 1996). Bien que le rôle de la protéine PKIP ne soit pas clairement établi, elle servirait possiblement à transporter la protéine PK-1 ou à stimuler l'activité *in vivo* de la protéine PK-1 (Fan, McLachlin et Weaver, 1998). Des mutations des gènes *pk-1* et/ou *pkip* empêchent la terminaison du cycle d'infection, ce qui indique que ces protéines possèdent des rôles importants. Un autre gène baculoviral codant pour une kinase a été caractérisé chez le nucléopolyédrovirus de *Lymantria dispar* (LdMNPV) (Bischoff et Slavicek, 1994). Ce gène s'exprime au début et à la fin du cycle viral. La séquence d'acides aminés possède tous les sous-domaines catalytiques de protéines kinases. La protéine kinase est capable de phosphoryler le substrat d'histone H2A.

1.6. Phosphorylation baculovirale

La caractérisation de la protéine PK-1 du AcMNPV et du LdMNPV a révélé que la phosphorylation est un phénomène présent lors de l'infection des baculovirus. En effet, il existe plusieurs phosphoprotéines baculovirales dont la source de leur phosphorylation est inconnue, telles les protéines pp31 (Guarino et Smith, 1990), gp64 (Maruniak et Summers, 1981), pp34 (Whitt et Manning, 1988), p78/83 (Vialard et Richardson, 1993), IE-1 (Choi et Guarino, 1995) et p6.9 (Kelly et Lescott, 1984). La phosphorylation est observée sur les formes incluse et non-incluse du AcMNPV (Miller, Adang et Browne, 1983) et sur les nucléocapsides du PiGV (Wilson et Consigli, 1985). La nature variable des protéines baculovirales phosphorylées indique

l'importance du processus de phosphorylation dans la régulation d'une variété de fonctions cellulaires (Hunter, 2000; Graves et Krebs, 1999).

Dans le but de mieux comprendre le mode d'action du ChfuGV, la caractérisation du gène homologue *pk-1* nous est apparu un choix judicieux, puisqu'il pourrait coder pour une protéine kinase qui aurait un rôle dans l'infection virale. En effet, par analogie, le génome du AcMNPV code pour diverses phosphoprotéines, kinases et phosphatases, suggérant que la phosphorylation est un mécanisme de contrôle dans l'infection baculovirale (Reilly et Guarino, 1994). De plus, le fait que tous les baculovirus contiennent le gène *pk-1* codant pour une protéine kinase homologue (tel que révélé par Hayakawa, Rohrmann et Hashimoto, 1999) suggère l'importance potentielle de cette protéine dans le cycle d'infection. L'étude du gène *pk-1* du ChfuGV, le premier gène *pk-1* caractérisé chez les granulovirus, permettra une fois de plus de comprendre la stratégie d'expression baculovirale et l'évolution phylogénétique de cette protéine baculovirale.

À long terme, la caractérisation de plusieurs autres gènes du ChfuGV et baculoviraux en général permettra entre autres une compréhension des mécanismes impliqués dans la réplication virale et dans l'interaction virus-cellule hôte. Il sera donc possible d'identifier les gènes essentiels régulant la pathogénèse virale et le spectre d'hôte.

La caractérisation préliminaire des différents gènes baculoviraux à fonctions inconnues nécessitera l'utilisation d'outils bioinformatiques pour définir un rôle potentiel. En effet, la séquence déduite en acides aminés d'un gène à fonction inconnue est comparée à celles de protéines à fonctions connues dans le but de détecter s'il y a partage d'homologie. Un certain degré de similarité partagé entre les séquences suggère, par inférence évolutionnaire, qu'il y aurait une homologie au niveau de la fonction (Thornton, 2001). Cette première étape d'analyse devient de plus en plus fiable par le nombre croissant de séquences disponibles dans les banques de données. Pour cette première étape, il s'agit d'une fonction hypothétique associée à la protéine déduite. Cependant, il est nécessaire d'analyser en profondeur les différentes caractéristiques des séquences du gène et de la protéine codée à l'aide de logiciels bioinformatiques afin de pouvoir renforcer théoriquement cette fonction.

1.7. Hypothèse et objectifs

L'hypothèse dans ce projet est que le gène *pk-1* possède des caractéristiques similaires au gène homologue fonctionnel *pk-1* du AcMNPV, le prototype des baculovirus. Pour vérifier l'hypothèse, les objectifs étaient d'abord de faire la caractérisation moléculaire de la séquence du gène *pk-1* et de caractériser la transcription du gène *pk-1*.

Pour atteindre le premier objectif, il fallait étudier la séquence du gène *pk-1* du ChfuGV en comparaison avec les séquences homologues baculovirales. Aussi, l'étude de la région 5'NT du gène *pk-1* du ChfuGV pour l'identification de tous les éléments *cis* et de la région 3'NT a été réalisée. Ensuite, en utilisant divers outils de bioinformatique, la séquence d'acides aminés déduite de PK-1 du ChfuGV a été caractérisée. De plus, les outils bioinformatiques ont permis aussi de faire l'analyse phylogénétique de la séquence d'acides aminés déduite PK-1 du gène *pk-1* du ChfuGV par rapport aux séquences homologues chez les baculovirus et de d'autres protéines kinases.

Finalement, pour répondre au deuxième objectif, il s'agissait de caractériser la transcription temporelle du gène *pk-1* du ChfuGV par RT-PCR et la nature des transcrits par buvardage de type Northern.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1. Production virale

2.1.1. Production *in vivo* du ChfuGV et quantification virale

L'absence de lignée cellulaire a nécessité une production virale *in vivo* du ChfuGV, selon la technique décrite par Forté, Guertin et Cabana (1999). Des larves de 2^{ième} stade de *C. fumiferana* (Forest and Pest Management Institute, Sault-Sainte-Marie, Ontario) ont été placées à la surface de la diète artificielle contenue dans les godets (Grisdale-Wilson, 1988) pour leur développement jusqu'au 4^{ième} stade. Les larves ont été placées dans une chambre environnementale (Growth Cabinet, Sanyo, Bensenville, USA) à une température de 25°C, une humidité relative de 50% et une photo période de 14 heures jour/ 10 heures nuit. Par la suite, les larves ont été infectées en les transférant sur une nouvelle diète sur laquelle avait été étalée une suspension virale initiale de 1×10^9 granules de ChfuGV par cm² de surface de diète. Les larves ont été incubées dans les mêmes conditions environnementales durant une période de 12 jours permettant une réplication virale suffisante. Les larves infectées ont ensuite été recueillies et conservées à -20°C jusqu'à la purification virale.

La technique de purification virale utilisée était basée sur celle décrite par Tompkins (1991), avec quelques modifications. Les larves infectées ont été homogénéisées à l'aide d'un broyeur (RC5C Sorvall® Instruments, DuPont, Wilmington, USA) dans un volume égal de 1% SDS et l'homogénat a été filtré à travers trois épaisseurs de coton fromage. Le filtrat a été incubé à la température de la pièce durant 30 minutes et a été centrifugé à 300 x g durant 5 minutes afin d'éliminer les débris larvaires et cellulaires en suspension. Une seconde centrifugation du surnageant à 10 000 x g durant 25 minutes a permis d'obtenir le virus sous forme de culot. Le culot a été resuspendu dans un volume minimal de 0,5 M NaCl et a été incubé durant 30 minutes à la température ambiante avant d'ajouter de l'eau distillée stérile et d'effectuer une centrifugation à 10 000 x g pendant 10 minutes. Trois cycles de lavages ont été réalisés sur le culot avec de l'eau distillée stérile et une centrifugation à 10 000 x g durant 10 minutes. Le culot contenant le virus a été resuspendu dans de l'eau distillée et placé sur un gradient de glycérol discontinu (de 50 % à 100 % v/v), dont les gradients ont été filtrés à 0,22 µm (Millex®-GP, Millipore, Mississauga, Ont.,

Canada). Une centrifugation à 80 000 x g (ultracentrifugeuse Sorvall, rotor Beckman SW41) durant 45 minutes a permis de récupérer le virus dans la fraction de glycérol 80 %. Cette fraction a été recueillie, lavée à l'eau distillée stérile avant une centrifugation à 10 000 x g pendant 25 minutes. La fraction purifiée a été resuspendue dans de l'eau distillée stérile et préservée à 4°C jusqu'à usage ultérieur.

La préparation virale a été quantifiée par visualisation en microscopie électronique selon la méthode suggérée par Alain, Berthiaume et Trudel (1989). La suspension virale a été diluée 1/100 avec de l'eau distillée. De ce mélange, 100 µL a été ajouté avec un volume égal d'une solution de $3,51 \times 10^8$ billes de latex en polystyrène (S130-3 polystyrène latex, Agar Scientific, Stansted, Royaume-Uni). Ce mélange a été déposé sur une grille de support cuivrique recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone par la technique Airfuge (Alain, Berthiaume et Trudel, 1989). Après trois lavages avec de l'eau distillée, la grille a été séchée sur papier buvard et contrastées négativement pendant 30 secondes à l'aide du colorant PTA (acide phosphotungstique 3%, pH 6,0) avant l'observation au microscope électronique (Phillips 300, Eindhoven, Pays-Bas). La concentration des granules de ChfuvGV a été déduite à partir de la concentration connue des billes de latex.

2.1.2. Purification des nucléocapsides enveloppées

Un volume de 5 mL de suspension virale a été centrifugé à 6 000 x g pendant 5 minutes. Le culot obtenu a été resuspendu dans 500 µL de 0,5 M Na_2CO_3 pH 10,5 pour une incubation de 30 minutes à 4°C. Une centrifugation à 3 500 x g durant 10 minutes a été effectuée pour obtenir le surnageant. Le culot a subi le même traitement une seconde fois et les surnageants ont été combinés. Le surnageant a été déposé sur gradient de sucrose discontinu (de 10 % à 90 % p/v), dont les couches ont été filtrées préalablement au seuil de 0,22 µm (Millex®-GP, Millipore, Mississauga, Ont., Canada) et a été centrifugé à 25 000 x g (Beckman SW-41) durant 60 minutes. Les nucléocapsides enveloppées ont été recueillies entre les couches de glycérol 20 % et 30 % et ont été lavées avec de l'eau distillée avant une centrifugation à 100 000 g durant 60 minutes. Le culot obtenu a été resuspendu dans un volume minimal (~70 µL) de tampon T.E., pH 7,4 (10 mM-

Tris-HCl, 1 mM-EDTA, pH 7,4) et a été conservé à -20°C. Cette étape permettra une meilleure extraction d'ADN.

2.1.3. Extraction des acides nucléiques

2.1.3.1. Extraction de l'ADN viral

L'extraction de l'ADN viral a été effectuée selon la technique décrite par Sambrook, Fritsch et Maniatis (1989). La suspension de nucléocapsides ($\sim 70 \mu\text{L}$) a été ajustée à $250 \mu\text{g/mL}$ de protéinase K en présence de 0,5 % SDS et incubée pendant 2 heures à 37°C. La couche protéique de la nucléocapside a été digérée durant cette incubation. La couche protéique a été éliminée 2 fois avec un volume égal de phénol saturé au T.E., pH 7,4, suivi d'une centrifugation à $10\,000 \times g$, à 4°C durant 5 minutes. La phase aqueuse contenant l'ADN a été traitée deux fois avec un volume de phénol-chloroforme (1:1). Une centrifugation subséquente à $10\,000 \times g$, à 4°C durant 5 minutes a éliminé la couche organique. La phase aqueuse a été traitée deux fois avec un volume égal du mélange de chloroforme-isoamyl alcool (24:1), suivi d'une centrifugation à $10\,000 \times g$, à 4°C durant 5 minutes. L'ADN retrouvé dans la phase aqueuse a été précipité à -20°C pendant 60 minutes dans 2,5 volumes d'éthanol 100 % froid en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,2. Le culot d'ADN a été obtenu par centrifugation à $16\,000 \times g$, à 4°C pendant 20 minutes dans une microcentrifugeuse. Le culot d'ADN a été séché, resuspendu dans 20 à $100 \mu\text{L}$ de tampon T.E., pH 7,4 et a été conservé à -20°C. La pureté et la quantité de l'ADN ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 % (p/v). L'ADN dilué 1/20 avec de l'eau distillée, a aussi été quantifié par spectrophotométrie (Pharmacia Biotech Gene Quant RNA/DNA calculator, Hellma® Quarzglass, n°105.202.008-QS, Labfirms, Uppsala, Suède) à une longueur d'onde de 260 nm. La concentration de l'ADN a été calculée par la formule $A_{260} \times \text{facteur de dilution} \times 50 \mu\text{g/mL}$.

2.1.3.2. Extraction de l'ARN total

Les larves de 4^{ème} stade de *C. fumiferana* ont été infectées en les submergeant dans une suspension virale de 1×10^9 granules/mL pour 10 minutes. Les larves ont ensuite été transférées sur diète artificielle et incubées à 25°C. Pour chaque heure post-infection (h.p.i.), soit à 0, 2, 6, 12, 24, 48 et 72 (h.p.i.), deux larves ont été récoltées et congelées à -70°C pour empêcher la dégradation de l'ARN. Une série de larves non-infectées a servi de témoins négatifs. Ces larves de

contrôle ont été incubées sur une diète artificielle et ont été récupérées et congelées simultanément avec les échantillons infectés.

L'ARN total a été extrait pour chaque heure post-infection, en se basant sur la procédure de Chomczynski et Sacchi (1987). Le réactif utilisé pour l'extraction de l'ARN a été le TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ont., Canada), lequel est à base de phénol en plus de contenir des détergeants et de l'isothiocyanate de guanidine. Tout le matériel utilisé a été préalablement traité avec une solution de 0,1% (v/v) diéthyl purocarbonate (DEPC) pour dénaturer le site actif des ARNases contaminantes. Sous une hotte chimique, les larves ont été coupées avec une lame chirurgicale (Fisher Scientific, Whitby, Ont., Canada) et placées dans des Eppendorfs contenant 100 µL de TRIzol®. Les tissus ont été incubés pendant 5 minutes avant d'être homogénéisés (broyeur Dremel Minimite™, modèle 750, Dremel, Norway, USA). À ce mélange a été ajouté 900 µL de TRIzol® et 2 µL de solution d'ARNt (10 µg/mL ou 0,02 µg) pour faire précipiter l'ARN. Une centrifugation à 13 000 rpm à 4°C durant 5 minutes a été réalisée dans une microcentrifugeuse. Le surnageant aqueux contenant l'ARN a été transféré dans un tube Eppendorf et 200 µL de chloroforme ont été ajoutés pour stabiliser l'interphase organique/aqueuse. Les échantillons ont été inversés délicatement pour 30 secondes et laissés reposés pour 5 minutes avant d'être centrifugés à 12000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Sans perturber l'interphase contenant l'ADN et la phase inférieure organique contenant les protéines, l'ARN total dans la phase aqueuse supérieure a été récupérée et placée dans un Eppendorf propre. L'ajout d'un volume d'isopropanol a été accompagné d'une inversion de 30 secondes. Les échantillons ont été laissés reposés pendant 15 minutes à la température de la pièce pour faire précipiter l'ARN. Une centrifugation à 13 000 rpm à 4°C durant 10 minutes a été réalisée pour récupérer le culot d'ARN. Le culot a été lavé avec 1 mL d'éthanol 70% froid. Après une centrifugation à 10 000 rpm à 4°C durant 10 minutes, l'éthanol a été enlevé et le culot laissé séché pendant 20-30 minutes. Le culot a été dissout en ajoutant 25 à 50 µL d'eau traitée au DEPC. Le volume final d'ARN total a été séparé en fractions de 5 µL lesquelles ont été préservées à -70°C.

La quantité et l'intégrité de l'ARN total ont été évaluées par migration sur gel d'agarose 0,8% (p/v) et par spectrophotométrie (Pharmacia Biotech Gene Quant RNA/DNA calculator, Hellma®

Quarzglass, n°105.202.008-QS, Labfirms, Uppsala, Suède). Les échantillons ont été dilués 1/200 et 1/400 dans de l'eau traitée au DEPC et l'absorbance a été mesurée à 260 nm. La concentration en ARN total a été calculée par la formule $[A_{260} \times \text{facteur de dilution} \times 40 \mu\text{g/mL}]$. La pureté de l'ARN a été déterminée par le ratio A_{260}/A_{280} . La présence d'ADN contaminant a été vérifiée par une réaction de PCR, en utilisant des amorces spécifiques au gène *granuline*, selon les conditions décrites par Bah *et al.* (1997), lesquelles ont permis d'obtenir un amplicon de 880 p.b.

2.2. Amplification, clonage et séquençage du gène *pk-1* du ChfuGV

2.2.1. Localisation du gène *pk-1* dans un fragment de la banque génomique *BamH I* du ChfuGV

Tel que décrit par Rashidan *et al.* (2002a), brièvement le fragment de 11 kb de la banque génomique *BamH I* (GibcoBRL® Life technologies, Burlington, Ont., Canada) du ChfuGV a été cloné selon les protocoles standards définis par Sambrook, Fritsch et Maniatis (1989) dans pSK-Bluescript (Stratagene, La Jolla, USA) et séquençé. Cette expérience de clonage a été réalisée *a priori* pour l'analyse du gène *odvp-6e/odv-E56*. Le séquençage du fragment a permis de localiser plusieurs gènes, incluant le gène *pk-1*. La séquence du gène *pk-1* (correspondant à l'ORF 3) codant potentiellement pour une protéine kinase a été déposée dans la banque de données Gen Bank sous le numéro d'accès AF406760.1.

2.2.2. Amplification du gène *pk-1* du ChfuGV

Les amorces dessinées pour amplifier spécifiquement le gène *pk-1* (631 p.b.) à l'intérieur du fragment *BamH I* de 11 kb ont été Pkfw1 (sens; 5'-CCA TTG GAG TTC AGC GTT GC-3') et Pkrv1 (antisens; 5'-CAT CAT AAC TGC TGA GGC-3'). La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume de 50 μL contenant 25 ng d'ADN plasmidique, 150-172 pmoles d'amorces sens et antisens, 1 U *Taq*^{2000™} polymérase (Stratagene, La Jolla, USA), 5 μL de tampon 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 1,5 mM MgCl_2), et 1 μL de 0,2 mM de dNTP. Les témoins négatifs et positifs étaient représentés par une absence d'ADN et la présence d'amorces spécifiques au gène de la granuline, respectivement. La même réaction de PCR a été répétée en utilisant 50 ng d'ADN génomique. Les conditions expérimentales pour le PCR de 35 cycles ont été les suivantes : dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30 sec, appariement des amorces à 50°C

pendant 30 sec et élongation de l'ADN à 72°C pendant 45 sec. La réaction de PCR a été précédée par 1 cycle de départ à chaud à 94°C durant 10 minutes et a été suivie par 1 cycle d'extension à 72°C pendant 10 minutes. L'amplification a été menée dans l'appareil GeneAmp®PCR System 9700 (Applied BioSystems, Foster City, USA). Les produits de PCR ont été migrés sous un voltage de 120 V sur un gel d'agarose 1,5% (p/v)(BIO-RAD Life Sciences, Mississauga, Ont., Canada) contenant du bromure d'éthidium (EtBr) 0,50 µg/mL et visualisés sous l'UV. La taille de l'amplicon migré a été comparée à l'échelle de poids moléculaire de 1 kb composé de fragments variant de 500 bp à 12 kb (GibcoBRL® Life technologies, Mississauga, Ont., Canada).

2.2.3. Clonage et séquençage du gène *pk-1* du ChfuGV

Pour s'assurer de l'identité de l'amplicon du gène *pk-1*, le fragment amplifié a été cloné et séquencé. L'amplicon doté d'extrémités (3'A) désoxyadénosine libres a été dans le vecteur de clonage pCR®2.1 de la trousse TA Cloning® (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ont., Canada), lequel contient des bases désoxythymidines (5'T) libres (Figure 5).

Le produit de PCR a subi une réaction de ligation dans un volume de 10 µL consistant de : 5 µL d'eau stérile, 1 µL de tampon de ligation 10X (60 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mg/mL de BSA (sérum d'albumine bovin); 70 mM β-mercaptoéthanol; 1 mM d'adénosine triphosphate (ATP); 20 mM DDT (dithiotréitol) et 10 mM de spermidine), 2 µL de vecteur pCR®2.1 (25 ng/µL), 1 µL d'ADN ligase T4 (4,0 unités Weiss/µL) et 1 µL de produit de PCR (~10 ng). Le mélange a été incubé à 14°C durant au moins 12 heures et entreposé à -20°C jusqu'à usage ultérieur.

Le produit de ligation a été utilisé pour transformer des cellules compétentes d'*E.coli* One Shot®INVaF' (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ont., Canada). Les cellules bactériennes ont été dégelées sur glace. Un volume de 2 µL de 0,5 M β-mercaptoéthanol ainsi que 1-2 µL de produit de ligation ont été ajoutés aux cellules. Le mélange a été laissé sur glace durant 30 minutes avant d'être soumis à un choc thermique à 42°C pendant 30 sec. Le mélange a été gardé sur glace

pendant 2 minutes avant d'ajouter 250 μ L de milieu SOC (2% tryptone; 0,5% d'extrait de levure; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $MgSO_4$ et 20 mM glucose). Le mélange contenant les cellules transformées a été incubé à 37°C sous agitation constante (225 rpm) pendant 1 heure et ensuite gardé sur glace. Les cellules transformées ont été étalées sur les plats de pétri contenant du milieu nutritif 2xYT (1,6% p/v de tryptone (Difco Laboratories, Detroit, USA), 1% d'extrait de levure (Difco Laboratories, Detroit, USA), 0,5% p/v de NaCl pH 7,0, 1,5% agar (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont., Canada)) contenant 50 μ g/mL de kanamycine (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA) et 40 mg/mL de substrat chromogène bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal; Fisher Scientific, Whitby, Ont., Canada). Les pétris ont été incubés à 37°C pendant au moins 18 heures. Les pétris ont été placés à 4°C pendant 2 à 3 heures pour développer la couleur des colonies. Les colonies blanches, contenant le vecteur recombinant, incapable de produire la β -galactosidase, ont été sélectionnées et placées dans un milieu nutritif 2xYT (1,6% p/v de tryptone (Difco Laboratories, Detroit, USA), 1% d'extrait de levure (Difco Laboratories, Detroit, USA), 0,5% p/v de NaCl pH 7,0) contenant 50 μ g/mL de kanamycine (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA). Les colonies ont été incubées à 37°C sous agitation constante (225 rpm) pendant 18 heures.

Les plasmides recombinants ont été extraits (mini-prep) du milieu de culture d'*E.coli* par la technique de lyse alcaline en utilisant la trousse QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen Inc., Mississauga, Ont., Canada). Environ 2 mL de suspension bactérienne a été centrifugé à 13 200 rpm pendant 1 minute à la température de la pièce. Le culot de cellules bactériennes a été resuspendu dans 250 μ L de tampon contenant des ARNases et 250 μ L de tampon contenant NaOH/SDS favorisant la lyse cellulaire. La solution a été mélangée légèrement avant d'ajouter 350 μ L de tampon salin causant la précipitation entre autres de l'ADN chromosomique dénaturé, des protéines et autres débris cellulaires. Une centrifugation à 13 200 rpm pendant 10 minutes a permis de libérer l'ADN plasmidique dans le surnageant. Le surnageant a été pipeté dans la colonne de récupération QIAprep munie d'une membrane de gel de silice et centrifugé à 13 200 rpm pendant 1 minute pour lier l'ADN plasmidique. L'ADN plasmidique a été lavé dans 750 μ L de tampon contenant de l'éthanol en centrifugeant à 13 200 rpm pendant 1 minute. L'ADN plasmidique a été élué après l'ajout d'eau distillée stérile en centrifugeant à 13 200 rpm pendant 1 minute. Les plasmides recombinants ont été digérés par l'enzyme de restriction *EcoR* I

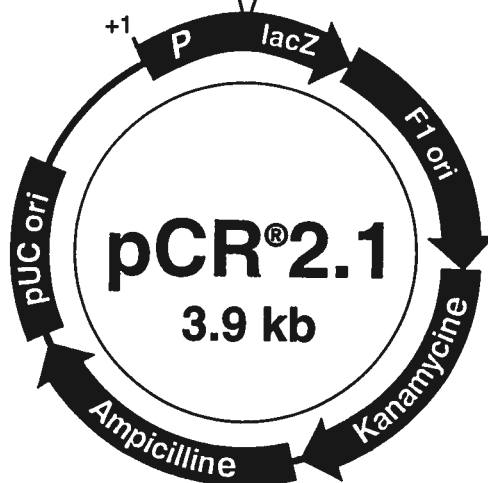
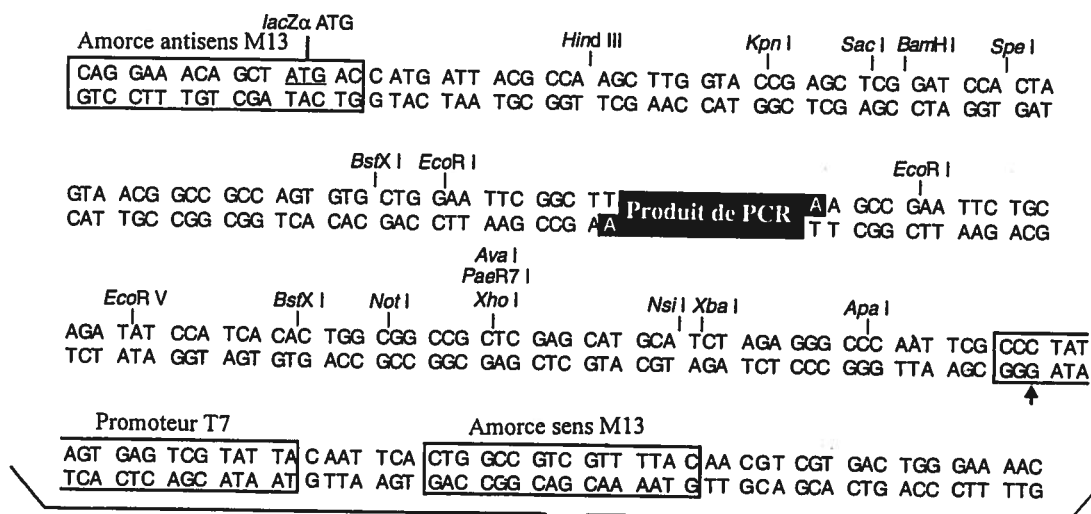
(GibcoBRL® Life technologies, Burlington, Ont., Canada). Dans la réaction de digestion, une quantité de 2 µL (~2 µg) d'ADN plasmidique a été digéré par 0,5 µL (5 unités) d'enzyme *EcoR* I dans un milieu de digestion contenant 1 µL de tampon de réaction 10X (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; GibcoBRL® Life technologies, Burlington, Ont., Canada) et 6,5 µL d'eau distillée. La réaction de digestion s'est déroulée à 37°C durant 60 à 75 minutes. Les plasmides recombinants ont été séquencés en utilisant un séquenceur automatique « ALF » (Automated Laser Fluorescent DNA sequencer; Amersham Biosciences, Inc., Baie d'Urfé, QC, Canada). La méthode de terminaison de chaîne de Sanger, Nicklen et Coulsen (1977) fait usage des didésoxynucléotides dépourvu de groupement 3'-hydroxyle et de l'enzyme T7 pour le séquençage de l'ADN fluorescent pour sa processivité et son faible taux d'erreur. Les amorces utilisées pour le séquençage ont été l'amorce universelle sens ainsi que l'amorce anti-sens M13 (voir Figure 5).

2.3. Étude de l'expression transcriptionnelle du gène *pk-1* du ChfuGV

2.3.1. Transcription inverse et polymerization en chaîne (RT-PCR)

La réaction de RT-PCR a été réalisée en une seule étape en utilisant la trousse SuperScript™ One-Step RT-PCR avec Platinum® *Taq* (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ont., Canada). La réaction contenait les éléments suivants: 1) 1X du tampon *Reaction mix* (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ont., Canada), lequel est composé de 0,2 mM de dNTP et 1,2 mM MgSO₄, 2) 150-172 pmoles d'amorces, Pkfw1 et Pkrv1, 3) 1 µL de mélange enzymatique RT(MMLV)/Plat *Taq*, 4) 1 µg d'ARN total et 5) eau traitée au DEPC pour remplir jusqu'à un volume réactionnel final de 50 µL. L'ARN a été inversement transcrit en ADNc par l'enzyme RT (MMLV, Moloney Leukemia virus) pendant 30 minutes à 50°C. L'enzyme RT a ensuite été dénaturée à 94°C pendant 2 minutes. L'ADNc a été amplifié à l'intérieur de 35 cycles de PCR, selon les mêmes conditions décrites à la section 2.2.1. La réaction de RT-PCR a été accompagnée des contrôles négatifs suivants : 1) absence d'ARN, 2) ajout de *Taq* polymérase seulement et 3) ARN de larves *C. fumiferana* non-infectées. Les amplicons du RT-PCR ont été analysés sur gel d'agarose 0,8%.

Figure 5 Vecteur de clonage pCR2.1 Le vecteur pCR[®]2.1 de 3,9 kb possède d'autres propriétés telles que les gènes de résistance aux antibiotiques ampicilline et kanamycine servant pour la sélection des bactéries recombinantes. Il y a aussi une origine ColEI permettant la réplication et une production d'un nombre élevé de copies de plasmides dans les bactéries *E. coli* et une origine fl de transcription. La séquence de ce vecteur possède les séquences du fragment lacZ α et du promoteur Plac, permettant le criblage des colonies bleues/blanches par la α -complémentation. Le vecteur est doté de sites pour l'appariement d'amorces spécifiques de séquençage, comme les amorces sens et antisens M13, l'amorce universelle et l'amorce antisens sur le promoteur T7.



2.3.2. Buvardage de type Northern

Un gel d'agarose à base de formaldéhyde de 1,5% (p/v) a été préparé en portant à ébullition une solution composée de 1,6 g d'agarose dans 116 mL d'eau stérile. Lorsque refroidi à 60°C, 28,8 mL de formaldéhyde 37% (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont., Canada) et 16 mL de 10X tampon d'acide 4-morpholinopropanesulfonique (MOPS) (pH 7,0) (0,2 M MOPS, 80 mM acétate de sodium et 10 mM EDTA, pH 8,0) ont été ajoutés. Les échantillons ont été préparés en ajoutant 10 µL (4µg/µL) d'ARN total, 10 µL de formamide (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA), 3,5 µL de formaldéhyde 37%, 2 µL de 10X MOPS et 1 µL de bromure d'éthidium (1µg/µL). Les échantillons ont été dénaturés en chauffant à 70°C pendant 10 min et gardés sur la glace durant 2 minutes. Le même traitement a été appliqué pour l'échelle de poids moléculaire d'ARN de 1 µg/µL (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ont., Canada) contenant les fragments variant de 0,155 à 1,770 kb. Les échantillons d'ARN ont été déposés dans le gel submergé dans 1X tampon de migration MOPS et ont été fractionnés par électrophorèse pendant 150 min à 60V.

Le transfert de l'ARN total sur membrane de nylon chargée positivement (Hybond™, Amersham Biosciences Inc., Baie d'Urfé, QC, Canada) a été effectué par la technique de capillarité dans le tampon 20X citrate salin standard (SSC), pH 7,0 (3M NaCl; 300 mM citrate de sodium dihydrate, C₆H₅Na₃O₇·2H₂O). Le montage du transfert a été préparé selon les méthodes standards suggérées par Sambrook, Fritsch et Maniatis (1989). Le transfert s'est déroulé pendant environ 12 heures. À la fin du transfert, l'ARN a été fixé sur la membrane de nylon par une cuisson durant 2 heures dans un four (Fisher Isotemp® oven senior model, Fisher Scientific, Freiburg, Allemagne) à 80°C et une exposition aux UV (50 mJoule) (UV crosslinker UVC 500 Hoefer, Pharmacia Biotech, Freiburg, Allemagne).

La membrane a été préhybridée dans 5 mL de tampon de préhybridation (5X SSC, 5X Denhardt, 0,5% SDS et 50 µg/mL d'ADN de sperme de saumon). La pré-hybridation a été réalisée à une température de 65°C pendant 60 minutes dans un four rotatif à hybridation (SHELLAB Model 1012 Hyb oven, Sheldon Manufacturing, Cornelius, USA). L'amplicon du gène *pk-1* a été purifié par extraction du gel d'agarose à l'aide du kit QIAEX II (QIAGEN Inc., Mississauga, Ont.,

Canada). La procédure suivie a été celle recommandée par le fournisseur. Brièvement, la bande de l'amplicon du gène *pk-1* a été excisée du gel d'agarose et mélangée avec du tampon QX1 afin de dissoudre l'agarose et de dissocier les protéines liées à l'ADN. Une suspension de billes de silice a été ajoutée au mélange afin d'absorber l'ADN et une centrifugation de 30 secondes à 13 200 rpm a permis de récupérer le culot. Ce dernier a été lavé avec 500 µL du tampon QX1 pour éliminer les traces d'agarose. Deux autres lavages successifs avec 500 µL de tampon PE ont été faits pour éliminer les sels résiduels. Le culot a été laissé séché pendant 20 minutes et dissout dans 20 µL d'eau distillée stérile. Une centrifugation de 30 secondes à 10 000 rpm a permis de récupérer le surnageant contenant l'ADN purifié. Ce produit de PCR a été dénaturé à 95°C pendant 10 minutes et mis sur glace avant d'être utilisé pour la fabrication de la sonde. La sonde utilisée pour l'hybridation a été marquée à la radioactivité avec du [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) par la méthode de « random priming » à l'aide de la trousse Ready-To-Go™ (Amersham Biosciences Inc., Baie d'Urfé, QC, Canada). Le mélange a été préparé selon les directives du fabricant. Brièvement, le culot *Rx-mix* contenant le tampon avec les précurseurs dATP, dGTP, dTTP, le fragment Klenow FPLCpure® (Amersham Biosciences Inc., Baie d'Urfé, QC, Canada) et plusieurs oligodésoxynucléotides aléatoires (principalement des nonamères, selon le fabricant) ont été dissouts dans 20 µL d'eau stérile. À ce mélange, 25-50 ng d'ADN dénaturé et 7 µL de [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) ont été ajoutés. La solution a été complétée jusqu'à 50 µL avec de l'eau stérile avant d'être incubée à 37°C durant 2 heures. La sonde a été purifiée des précurseurs non-incorporés à l'aide de la colonne ProbeQuant™G-50 Micro (Amersham Biosciences Inc., Baie d'Urfé, QC, Canada). La sonde radioactive a été dénaturée à 95°C pendant 10 minutes et placée sur la glace pendant 2 minutes avant d'être ajoutée à la solution de pré-hybridation. L'hybridation s'est déroulée pendant 18 heures à 65°C.

La membrane de nylon a été soumise à deux lavages de 10 minutes à la température de la pièce dans un tampon de 2X SSC, 0,1% SDS. Afin d'éliminer toute trace d'hybridation non-spécifique, la membrane a été lavée durant 10 minutes à 65°C, répété deux fois, à l'aide d'une solution de 1X SSC, 0,1% SDS. Dans la chambre noire, la membrane a été exposée sur un film diagnostique (X-OMAT™ Blue XB-1, Kodak Scientific Imaging, Rochester, USA) pendant 24 heures à -80°C. Les signaux ont été visualisés suite au développement du film à l'aide de l'appareil Automatic X-Ray

Film Processor 10 Plus (Eastman Kodak Company, Rochester, USA). La membrane de nylon a été récupérée en la lavant dans 0,5% SDS bouillant pour enlever la sonde hybridée. Une exposition a permis de vérifier l'absence de signal. Les mêmes procédures ont été utilisées pour pré-hybridiser, hybrider et exposer afin de visualiser les transcrits du gène *granuline*.

2.4. Analyses bioinformatiques

La composition en acides aminés et le point isoélectrique ont été calculés en utilisant les outils Peptide Statistic (<http://web.umassmed.edu/cgi-bin/biobin/pepstats>) et ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). La recherche des modifications post-traductionnelles a été réalisée en se servant du programme ProSite (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00100>) (Bairoch, Bucher et Hofmann, 1997). Les profils d'hydrophobicité ont été obtenus en utilisant les valeurs d'hydropathies (-4,5 à 4,5) de Kyte et Doolittle (1982) via le logiciel de l'Institut Weizmann en sciences génomiques et bioinformatiques (http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/cmp_hydph.html). La prédiction des sites d'épissage potentiels a été menée à l'aide du programme Neural Network version 1998 (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (Reese, 1997). La séquence d'acides aminés déduite a été comparée aux homologues dans les banques de données GenBank (Non-redondante GenBank CDS, traduction + PDB + SwissProt + PIR + PRF) en utilisant les paramètres par défaut de l'algorithme BLAST-protéine (Basic Local Alignment Search Tool)(Altshul *et al.*, 1990), du NCBI. L'alignement multiple en couleur a été réalisé en utilisant le logiciel MultiAlin-INRA version 5.4.1 (Corpet, 1998) (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

La matrice de substitution (pour désigner la fréquence des mutations dans les séquences) employée par défaut par les programmes BLAST (NCBI) et MultiAlin-INRA est Blosom 62 (Henikoff et Henikoff, 1992) (voir Annexe 1). Blosom 62 est formulé à partir de la comparaison d'un groupe de séquences identiques à 62%. L'usage de Blosom 62 est généralement efficace pour des séquences divergentes et rapprochées. Les valeurs dans cette matrice représente la fréquence des substitutions d'acides aminés déjà observées. Les valeurs sont positives (+) lorsque la substitution est plus fréquente que le hasard, négatives (-) pour désigner une substitution moins

fréquente que le hasard ou zéro (0) pour une fréquence de substitution égale au hasard. Le score zéro peut généralement représenter une substitution entre deux acides aminés qui partagent des propriétés structurales ou fonctionnelles. Ainsi le repêchage des séquences par BLAST se fait par l'homologie au niveau de certains blocs de résidus dans les séquences, d'où l'acronyme de Blocks Substitution Matrix de Blosum 62. De plus, lors de l'échaffaudage de l'alignement par MultiAlin, l'alignement optimal final correspond à celui qui accorde un score de substitution le plus élevé pour chaque résidu et donc un score final maximal. La construction de l'arbre phylogénétique a été réalisée en utilisant le programme TreeView version 1.6.6. (Page, 1996), basé sur le principe de l'évolution minimale de la distance entre les séquences, c'est-à-dire, la distance entre toutes les paires formées parmi les espèces analysées. L'évolution minimale considère que le temps d'évolution est constant et l'arbre obtenu demande le moins de changements possibles. Ce principe vise aussi à former l'arbre qui regroupe les espèces qui partagent le plus grand nombre de caractères et avec les plus courtes longueurs des branches. L'emploi de l'algorithme « neighbor-joining » (Saitou et Nei, 1987) du programme TreeView est efficace (« heuristique ») pour des données abondantes. L'évaluation des branches de l'arbre est obtenue par un rééchantillonnage statistique (appelé « bootstrap ») des données de l'alignement permettant d'assigner à chaque regroupement de branches une certaine valeur donnant une idée de sa robustesse (confiance de distribution). Plus cette valeur est proche de 1000, plus le regroupement est jugé fiable.

Chapitre 3 : Résultats

3.1. Caractérisation moléculaire du gène *pk-1* du ChfuGV

3.1.1 Amplification, clonage et séquençage du gène *pk-1* du ChfuGV

Le gène *pk-1* du ChfuGV a déjà été identifié par Rashidan *et al.* (2002a). La séquence nucléotidique du gène *pk-1* comprend un cadre de lecture de 831 bases codant potentiellement pour une protéine de 277 acides aminés et d'un poids moléculaire prédit de 32,2 kDa. À l'aide des amorces Pkfw1 et Pkrev1, l'amplification du gène *pk-1* a été réalisée en utilisant de l'ADN du clone plasmidique pSK-Bluescript et de l'ADN génomique extrait, dont la concentration était d'environ 200 ng/μL (Figure 6). Ce fragment amplifié a été cloné dans le vecteur pCR2.1 et séquencé à l'aide des amorces universelles sens M13 et antisens M13 afin de s'assurer qu'il correspondait à l'amplicon du gène *pk-1*.

3.1.2 Carte physique de la région du gène *pk-1* du ChfuGV et de certains baculovirus

L'ensemble des séquences des gènes *pk-1* utilisées pour la comparaison a été tiré de la banque de données GenBank. Le gène *pk-1* du ChfuGV et des autres GV a été localisé en aval du gène *granuline* et entre deux cadres de lecture ouverts, l'ORF 2 et l'ORF4. Cette carte physique s'applique aussi à l'ensemble des NPV étudiés, puisque la position et l'orientation sont conservées par rapport au gène *polyédrine*. L'analyse a permis de localiser, chez le ChfuGV, les gènes *egt* et *me53* qui se situent en amont du gène *granuline* ainsi que le gène *ie-1* localisé à trois ORF en aval du gène *pk-1*. Cette organisation du gène *pk-1* est plus ou moins conservée, puisque chaque GV possède le gène *me53* directement en amont du gène *granuline* à l'exception de PxGV, mais pas les gènes *egt* ou *ie-1* (Figure 7).

3.1.3. Analyse de la séquence du promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV

La séquence des régions codante et 5'- et 3'-NT du gène *pk-1* du ChfuGV et la séquence déduite en acides aminés sont présentées sur la figure 8. Parmi les signaux putatifs identifiés dans la séquence nucléotidique, il y a : le codon initiateur ATG putatif de la traduction, le codon de

terminaison TAA, le motif de promoteur précoce CAGT à -128 nt en amont du codon d'initiation de la traduction et deux motifs de promoteur tardif TAAG situés à -63 nt et -295 nt en amont du codon d'initiation de la traduction. Il y a les signaux de polyadénylation canonique ATTAAA et non-canonique AATAAA ainsi que celui ayant une variation d'un nucléotide de la séquence polyadénylique (positions +322 nt et +805 nt en aval du codon d'initiation et dans la région 3'NT à +139 nt et à environ +500 nt en aval du codon de terminaison). Il y a également le site cap (CAGT) localisé à la position -89 nt en amont du codon ATG et les différents éléments régulateurs de la transcription, tels que les régions riches en nucléotides AT (positions -7, -55, -73, -167, -282, -304, -321 et -367), le motif GATA (position -951 nt), les motifs de la boîte E (positions -387 nt, -551 nt, -830 nt) et de la boîte inversée ATTGG (position -255 nt), le motif GAAC (position -26 nt), les régions riches en nucléotides GC (positions -247 nt, -365 nt, -450 nt, -482 nt, -493 nt, -543 nt, -864 nt, -904 nt, -923 nt et -1050 nt), le motif CAGA (positions -721 nt et -854 nt) et l'élément AACGTT (position -105 nt). Le promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV possède plusieurs éléments qui pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'expression transcriptionnelle.

La présence et la position des motifs des promoteurs des gènes *pk-1* diffèrent chez différents baculovirus (Tableau 1). L'analyse de la région du promoteur, à environ 180 pb en amont du codon d'initiation, permet d'identifier trois catégories de promoteurs pour les gènes *pk-1* régulant l'expression temporelle. Par exemple, le promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV possède à la fois des motifs de promoteurs précoce et tardif. Il en va de même pour les baculovirus PoGV, AoGV, PxGV, XcGV, AfNPV, BmNPV, AcMNPV, OpMNPV, LdMNPV et EppoNPV. Les baculovirus CpGV, HzSNPV, HaNPV, SINPV et McNPV possèdent uniquement des motifs de promoteur précoce pour leurs gènes *pk-1*. Les promoteurs des gènes *pk-1* des baculovirus SeNPV et AgNPV détiennent seulement un motif de promoteur tardif. Avec peu d'exceptions, les positions des motifs de promoteur tardif sont conservés, localisés à environ -30 nt ou -60 nt en amont du codon d'initiation de la traduction. Il y a une plus grande variabilité dans la position des motifs de promoteur précoce. Tous les promoteurs des gènes *pk-1* semblent être dépourvus de boîte TATA. Toutefois, à l'exception du CpGV et du PxGV, tous les GV, incluant ChfuGV, possèdent un élément ressemblant à la boîte TATA, sans respecter la séquence consensus, situé à une

Figure 6 Amplification du gène *pk-1* du ChfuGV

Amplicon du gène *pk-1* du ChfuGV

- Puit 1 : Témoin négatif, absence d'ADN
- Puit 2 : Témoin positif, amorces spécifiques au gène *granuline*, 880 p.b.
- Puit 3 : Échelle de poids moléculaire 1 kb
- Puit 4 : Amplicon du gène *pk-1* à partir d'ADN plasmidique, 631 p.b.
- Puit 5 : Amplicon du gène *pk-1* à partir d'ADN génomique, 631 p.b.

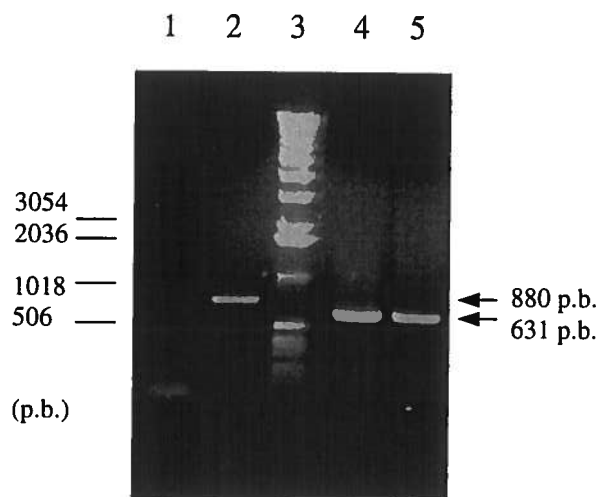
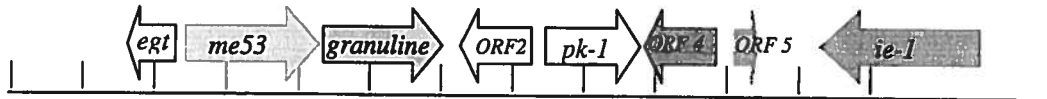


Figure 7 Organisation du gène *pk-1* à l'intérieur des génomes de certains baculovirus, incluant ChfuGV Le sens des flèches indique l'orientation des ORF dans le génome. Les ORF homologues sont alignés. Les flèches pour les ORF uniques sont en noir. Pour les baculovirus OpMNPV et EppoNPV, la région du génome est retrouvée sur le brin complémentaire.

ChfuGV



PoGV



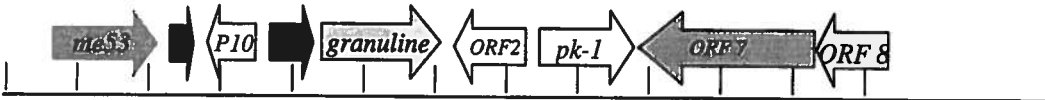
CpGV



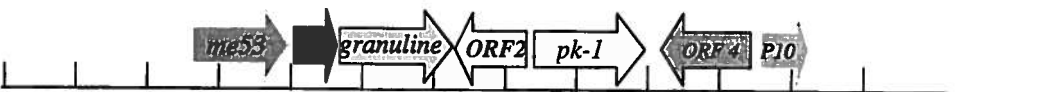
AoGV



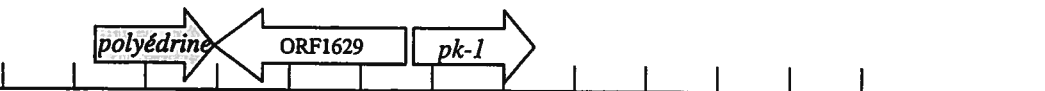
PxGV



XcGV



SeNPV, HzSNPV, HaNPV, SINPV, McNPV, AcMNPV, LdMNPV, AgNPV, AfNPV, BmNPV, OpMNPV^a et EppoNPV^a



^a L'orientation et l'ordre sont respectées sur le brin complémentaire.

Figure 8 Séquence nucléotidique et séquence déduite en acides aminés (PK-1) de la région du promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV

Double soulignés : Codon d'initiation (ATG) de la traduction et codon de terminaison (TAA)

En italiques : Régions 5' et 3' non-traduites

Soulignés en gras: Motifs des promoteurs précoce (CAGT) et tardif (TAAG)

Astérisques : Site cap (CAGT)

Soulignés et en italiques : Sites de polyadénylation (ATTAAA, AATAAA et variant d'un nucléotide)

En gras : Éléments régulateurs de la transcription (i.e. régions riches en AT, motif GATA, motif de la boîte E, boîte inversée ATTGG, motif GAAC, régions riches en GC, motif CAGA et élément AACGTT)

Symbole ↴ : Le début de la séquence du gène *granuline*

1 ACAAAATATGCGCTGAAACAGGTAACTCTATATTTGATTGTAGCATTTGCGGACCCACAA
61 ACCCTAATTATTTTTTAAAGCACAAAATGATGATTCCCTTTTGGCAATCAAATTACTGT
121 TACAACAACTGTATTGGAAGACGCAACCGAAAAGGTTATATGTGTGCCAACATAATG
181 TTATATAACGTGGATACTAGGAGAAACGAAAATGAAACGATTTTATAAGGAATTTTAATT
241 TAAACAAGAACAATGGGATATAACAAAGCATTAAGATACAGTCGTCACGACGGCACCTCA
301 TGCGTTATTGACAACCACCACCTCAAAAGCTTAGGTTCTGTGCTGAATGATGTTGACAC
361 AAAAAAGACCGCATACGTGAGGCTGAATACGAACCCATTCTAGATATTGCCAATCAGTAC
421 ATGGTGACCGAGGATCCTTTTCGTGGACCCGGTAAGAACGTACGAATTACCCCTTTCAAG
481 GAAATTAGGCGCGTTCAACCAGACACCATGAAATTGGTATGCAACTGGAGCGGAAAGGAA
541 TTCCTTCGCGAAACATGGACACGCTTCAATTTCTGAAGAGTTTCCCATCACTACTGACCAA
601 GAAATCATGGATTTGTGGTTTGAAATTCAACTCAGACCAATGCAACCCAATCGCTGTTAC
661 AAATTTACGATGCAATACGCGCTTGGTGCTAACCCGAATACGTTGCACATGATGTAATC
721 CGTCAACAGGATCCTTACTACGTTGGTCTTAACAACATGGAACGCATCAACTTGTTCAAG
781 AAAGGATTCGCATTCCCGCTCAGTGTCTTCAATCCGTCTACAATGACAACTTTGAGAGA
841 TTCTTCGACGACATTCTTTGGCCGTATTTCCACCGTCCTTTAGTATATGTGGGAACCACT
901 TCCGCCGAAATCGAAGAAATTATGATCGAGGTGTCGCTATTGTTTAAATTAAGAATTC
961 GCACCAGATGTACCGCTTTTTACTGGTCCCGCATATTAATCCTGTTTTTCAGCGACATTT
granuline 』
1021 TCGTCTAATTTTATTGAGTATCAACAATTTTAGAATTTAAGTCTTCCATTTTATCACAA
1081 ACTATTACGTTGATGTTATTGGACGCCGGCTTCGATTTGGGTAACGAAGAAGTAATTGCA
1141 ACGGAAGAATTTTTTGCAACATCAACCTTATTTGTTGGTGATTGCAAAATTTAATAATC
1201 ATATTATAAAACGCTGTCCAAAACTCAGTCAACTCTTCCACCGTTAACGTTAACCGTTG

1261 TCGTCAGTTTCCGTGTTTAATTTTCTTTTAAGCTATTATTCCATTTTCACTTTATT
1321 GTGTCACGAACGTCAGCATTGTAATTTTACTTTTAATGAATCCTAACAAATCCATATCT
M N P N K S I S
1381 CGAGTGTTATTGGAATTAACAACTGAAATTATAAAAAATCTAGGCGAAAATGACGAA
R V L L E L K N T E I I K N L G E N D E
1441 GACTCTTATGATAACGTATATTTATGCAAAAAAAGGTGACCCAAAAAGATACGTCTGT
D S Y D N V Y L C K K G D P K R Y V C
1501 AAAACCATCAAGAGTCATCATTTAATCCATTGGAGTTCAGCGTTGCAGTAATTATGCGC
K T I K E S S F N P L E F S V A V I M R
1561 AACAACCCCATTTTATCAAAGTACACAATTTATTTACAACTCATCGGTTGATGTGTTA
N N P H F I K V H N F I Y N S S G D V L
1621 ATACTCATGGATTACATTCCGGGTGGAGACTTGTTTGATTGGTTTCATATAAAAAAAGT
I L M D Y I P G G D L F D L V H N K K S
1681 TACGATTTAGACGAACCAACATGCTGTAAATTTATTTTACTTTAATCAACGCTTTGCAC
Y D L D E P T C C K I I F T L I N A L H
1741 GAATTGCACAACAAAAATTTATTCACAATGATGTCAAATTTGGAAAATATTTGTTTCAT
E L H N K K F I H N D V K L E N I L F H
1801 CAAAAAAAAGGAGAGCTTACTTGTGCGATTACGGGTTGGCAAGGTCAATAGGCACCTCT
Q K K R R A Y L C D Y G L A R S I G T P
1861 TCATGTTACGACGGTACAACAGTTTATTATTCGCCGAAAAAATTATCAACAACCATGT
S C Y D G T T V Y Y S P E K I I K Q P C
1921 GATCCATCGTTTATTGTTGGGCGATTGGGAGTGGTGGCTTATGAAATTTATCGTCAAAC
D P S F D W W A L G V V A Y E I L S S N
1981 TATCCATTCGACATTAACGATAATGATAACCAAGAAATGATGGACATAAACCCATCAGAC
Y P F D I N D N D N Q E M M D I N P S D
2041 ATGCTGACTTTATATTTCGACGCAATTGGAACGCATCGAAAATGTTTCTCAAAAAGCTATG
M L T L Y S Q P L E R I E N V S Q K A M
2101 GATTTTGTAAATAAGATTATTGACACTTGATAAAAAACACGCCTCAGCAGTTATGATGAA

D F V I R L L T L D K N K R L S S Y D E
 2161 ATAATAAAACATCCATTTTAAATTTTAAATCATTATTTTTTATTTCCAAAAATCACAA
 I I K H P F L K F *
 2221 TTACAATTTTTGTCAATACCAGGTTAATTATACATAATAATTAATTCATTATACAACAT
 2281 TTTAAAAATAATCAATATTACTCTGAATTTCTAAATCTAGATTAAACTACCGTCTAACAA
 2341 ACTCGTAAAAGATGCAACAAGTCATCTCCGCTTTAATAGACAATCCTTTATTAGTTAA
 2401 CATAAATTTGTTGAATTTTTCCAAATCAACTGTACTCAAACCTCGGATAACCAATTAGT
 2461 TATTTGTTTAAATCGCAAAACATATAGGATTATGTGTTTTATGGGATCGCTGCATTTGCTC
 2521 TATTACACTGTTAATTCCTTTTTCTGATCATCTTCATTGGGTTTGTAAATCATTTTCTTC
 2581 AAACCTCTTTGAATTCACAAATACTCCTTTACGTCATTTTGGTGGCAAATGGAAAAAT
 2641 TTTTTTTACCCACAGTAAGTGATTCATCATACCAATATGTGTATTAATAACCACTAAACG
 2701 AATCAACTGCGTATATTGTTTGGTAAACCATCTGCGTTTTTTATGTTCTCTTCAATTTCT
 2761 CGAAGAATCTGTGCTGGTTTTGCGTTTATTATTAGAACTGTTGCCAGATAAAAAATCACAA
 2821 TTGCCCTCTCGGAAGTCATGTTGTTTGGCGTACAAATGTTGAAAATAATTTAAAAATATTC
 2881 CTACCATTACGCGTTATATATACTGCAACATCAGATTACTAGCTAGATCAAAATGAGCGAT
 2941 AAGACTGATTTAACAACACTACGCAATCATTGGGGAATGCTCTATATAGTTTTGCTTTCGTTA
 3001 ACAACTCGTTTAAATGTCGGCCCAATTTTTTCAACACAAGGCTTATTGGCCAAAATATATT
 3061 GCTCTAATATTTTAAAAATACAAATCAAAAGAAGCGCCAACACGAGCTTGCAGACGTATTA
 3121 TATATTTCTTTAACCACCTCATGATTCGGATTCAACACCACCCTTAATGTACATTCGACCA
 3181 ATAAATTTTCTAAATTTTCTTTATCACCAAACCTGATTACCTTCTATCAATTCATCACAC
 3241 CCTCAAAAGAAATATAGCATTCATCGTAGTTAATTAATCTATTATTATACTAATACCAT
 3301 CGGTACAATAAACTTGCTCATTTGCAGATATAATTTTAAACATTCAACACTTAACATTT
 3361 TTTTGTGGCTTTTTCTAAATTATACTTCAACACCAACTGAACAACCTCGTCAAAGTTAT 3420

Tableau 1 Présence et positions des motifs de promoteurs situés en amont des codons d'initiation ATG des gènes *pk-1* de certains baculovirus

	(A/T/G) TAAG ^a	(C/T)AGT ^b	TATA(A/T)A(A/T) ^c
ChfuGV	-63	-24, -89, -99, -46	-157
PoGV	-63	-116	-156
AoGV	-72	-184	-160
XcGV	-16	-39, -111	-150
PxGV	-61	-88, -181, -152	—
CpGV	—	-24, -46, -114, -144	—
HzSNPV	—	-58, -89, -121, -171	—
HaNPV	—	-23, -122, -172	—
SINPV	—	-112, -172	—
McNPV	—	-11	—
SeNPV	-138	—	—
AgNPV	-29	—	—
AfNPV	-30	-82, -92	—
BmNPV	-30	-92	—
AcMNPV	-29	-58	—
OpMNPV ^d	-30	-121, -176	—
LdMNPV	-40	-23, -144, -177	—
EppoNPV ^d	-33	-111	—

NB Les séquences des gènes *pk-1* de baculovirus proviennent de la banque de données GenBank sous les numéros d'accès suivants : ChfuGV (AF406760), PoGV (NP_663168), AoGV (AF337646_6), XcGV (NP_059151.1), PxGV (NP_068225.1), CpGV (NP_148787.1), HzSNPV (NP_542626.1), HaNPV (NP_203561.1), SINPV (CAA68048.1), McNPV (NP_689178.1), SeNPV (NP_037763.1), AgNPV (CAC03568.1), AfNPV (AAB53359.1), BmNPV (NP_047416.1), AcMNPV (NP_054039.1), OpMNPV (NP_046157.1), LdMNPV (NP_047639.1), EppoNPV (NP_203304.1).

^a Motif de promoteur tardif

^b Motif de promoteur précoce; peut être présent sans boîte TATA; peut parfois varier à ACGT ou TCATT

^c Boîte TATA; peut généralement être suivie à 25-35 nt en aval par les motifs initiateurs CA(C/G)T ou CATT

^d Brin anti-sens

distance approximative de -160 nt en amont du site d'initiation. La nature des promoteurs des gènes *pk-1* semble diviser les baculovirus en plus d'un groupe.

3.1.4. Caractérisation de la séquence déduite en acides aminés (PK-1) du gène *pk-1* du ChfuGV

Les protéines déduites PK-1 de baculovirus ont été caractérisées en déterminant leurs propriétés physico-chimiques. La nature des résidus présents et leurs pourcentages de distribution, ainsi que les points isoélectriques et les poids moléculaires ont été déterminés. La composition en acides aminés de la séquence PK-1 du ChfuGV indique qu'il y a un pourcentage un peu plus élevé de résidus basiques (15,1%) par rapport aux résidus acides (13,7%) (Tableau 2). De plus, il semble avoir autant de résidus non-polaires (50,6%) que de résidus polaires (49,4%). Les mêmes observations s'appliquent pour les autres séquences PK-1 de baculovirus. Avec peu d'exceptions, toutes les séquences PK-1 baculovirales sont riches en leucine et en lysine avec des valeurs respectives de 10,1% et de 9,0% pour la protéine PK-1 du ChfuGV. Une grande partie des séquences PK-1 sont aussi riches en résidus acide aspartique, isoleucine et asparagine. Le point isoélectrique (pI) de la protéine déduite PK-1 du ChfuGV est de 6,08. Pour l'ensemble des baculovirus, les pI semblent diviser les protéines kinases en deux catégories, pour lesquelles les valeurs sont soit autour de 6 ou de 8-9. Le poids moléculaire de la protéine déduite PK-1 du ChfuGV est de 32,2 kDa. Quant aux protéines PK-1, les valeurs de poids moléculaires sont situées entre 31,5 et 32,4 kDa, sauf pour les virus du SeNPV et XcGV. Les protéines déduites PK-1 partagent donc des propriétés physico-chimiques similaires entre elles à l'exception des pI qui démontrent de plus grandes variabilités.

Les modifications post-traductionnelles potentielles (Figure 9) dans la séquence déduite en acides aminés PK-1 du gène *pk-1* du ChfuGV ont été prédites à partir de la banque de données Prosite (Bairoch, Bucher et Hofmann, 1997). Par exemple, la modification de N-glycosylation se fait sur le résidu Asparagine du site consensus N-X-S/T-X où X correspond à n'importe lequel acide aminé (Marshall, 1972). La sulfatation de tyrosine a lieu sur un résidu tyrosine Y entouré d'au moins trois résidus acides D ou E (Nicholas Jr., Chan et Rosenquist, 1999). La

phosphorylation de caséine kinase II se fait les résidus Ser ou Thr, à proximité de résidus acides de la séquence consensus S/T-X-X-D/E (Pinna, 1990). Le site de phosphorylation de protéine kinase C sur Ser/Thr se retrouve près des résidus basiques R ou K (site consensus S/T-X-R/K) (Woodget, Gould et Hunter, 1986). La phosphorylation par une protéine kinase dépendante à l'AMPc ou au GMPc se fait sur Ser/Thr de la séquence consensus K-R-X-S/T composée de deux résidus basiques consécutifs (Glass, el-Maghrabi et Pilkis, 1986). La phosphorylation de tyrosine est réalisée sur la séquence consensus R/K-X₃-D/E-X₃-Y (Cooper *et al.*, 1984). Finalement, la N-myristoylation est la modification qui ajoute un groupement myristate sur le résidu G de la séquence consensus G-(E/D/R/K/H/P/F/Y/W)-X₂-(S/T/A/G/C/N)-X (sauf proline). La première parenthèse et la deuxième parenthèses correspondent à des résidus non-chargés et petits et chargés, respectivement (Grand, 1989).

Les profils d'hydrophobicité des protéines déduites PK-1 des baculovirus ont été déterminés en utilisant les valeurs de Kyte et Doolittle (1982) selon les paramètres par défaut (intervalle de -4,5 à 4,5) (Figure 10). Les régions avec des valeurs au-dessus de zéro sont caractérisées comme étant hydrophobes. La longueur de la fenêtre utilisée était de 7 afin de déterminer les régions potentiellement exposées à la surface de la protéine. Les profils des séquences déduites PK-1 baculovirales (en bleu) ressemblent beaucoup à celui de la protéine PK-1 du ChfuGV (en rouge). Il y a les profils des protéines PK-1 des GV qui ressemblent davantage au ChfuGV, sauf pour quelques régions situées entre 80 et 110 ainsi que les régions 190 et 260. Les profils des protéines PK-1 des NPV diffèrent par rapport au ChfuGV notamment dans les régions 20 à 60, 150, 190 et 260.

3.1.5. Analyse phylogénétique de la protéine kinase PK-1 du ChfuGV

La recherche comparative de séquences homologues à la protéine PK-1 du ChfuGV a été réalisée en se servant de l'algorithme BLAST-protéine (Altschul *et al.*, 1990) de NCBI en se servant des données de séquences de protéines (*blast-p*) dans la banque GenBank. La liste des protéines, leur origine et les pourcentages d'identité et de similarité en relation à la protéine déduite PK-1 du

Tableau 2 Comparaison de la composition en résidus (%), des points isoélectriques et des poids moléculaires des protéines déduites PK-1 du Chfuv et des PK-1 de certains baculovirus

Protéines PK-1 baculovirales	Résidus (%)										Résidus (%)																	P.M. (kDa)												
	Non Polaires										Polaires										Basiques										Acides									
																					</																			

Figure 9 Prédiction des sites potentiels des modifications post-traductionnelles dans la séquence déduite de la protéine PK-1 du ChfuGV

N-glycosylation : 4 - 7 NKSI, 82 - 85 NSSG, 242 - 245 NVSQ

Sulfation de Tyrosine : 24 - 38 gendedsYdnvylck

Phosphorylation de protéine kinase AMPc- ou GMPc-dépendente : 261 - 264 KRIS

Phosphorylation de protéine kinase C : 50 - 52 TiK, 244 - 246 SqK

Phosphorylation de caséine kinase II : 50 - 53 TikE, 83 - 86 SsgD, 169 - 172 ScyD, 264 - 267 SsyD, 265 - 268 SydE

Phosphorylation de tyrosine kinase : 38 - 46 KkkgDpkrY

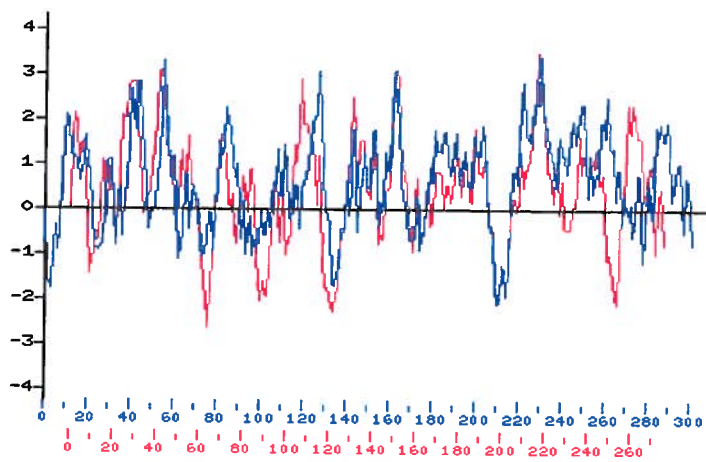
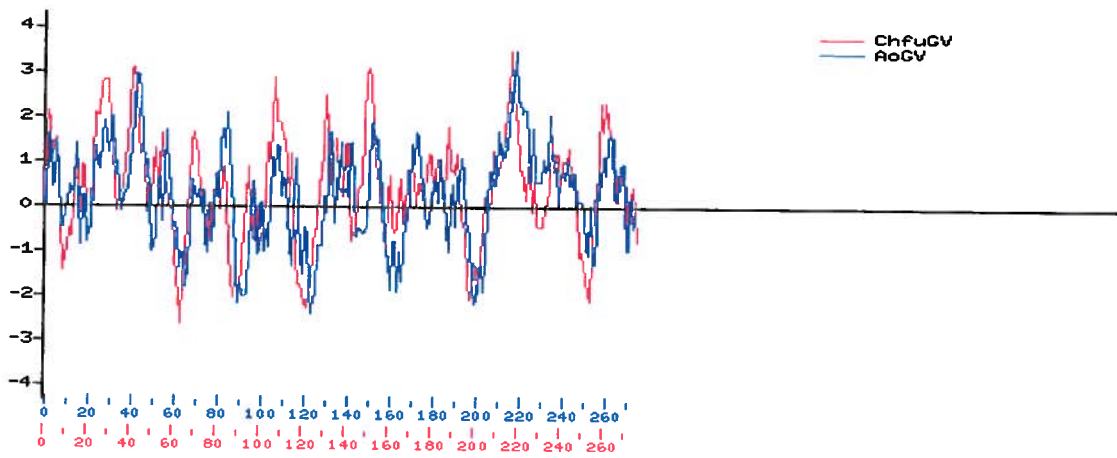
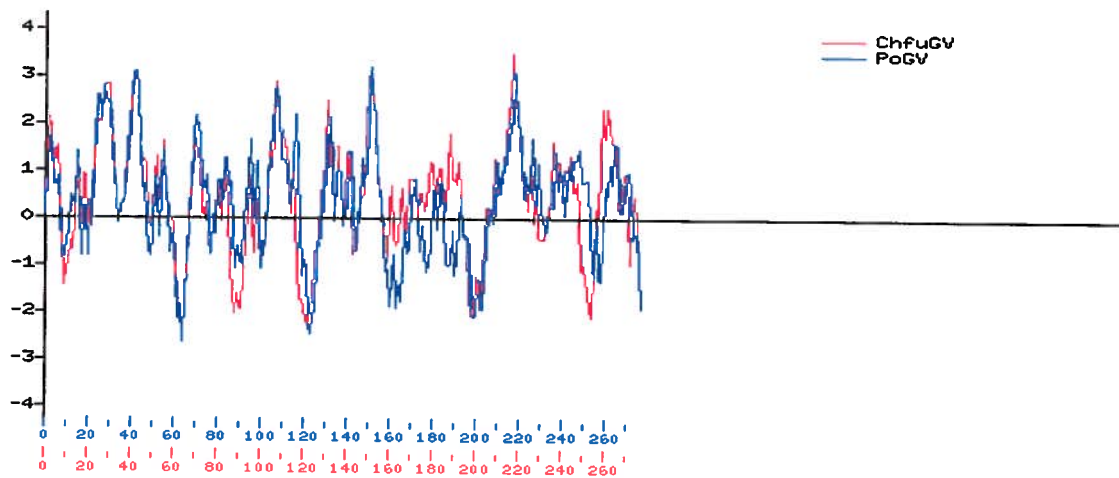
N-myristoylation : 160 - 165 GlarSI, 166 - 171 GTpsCY

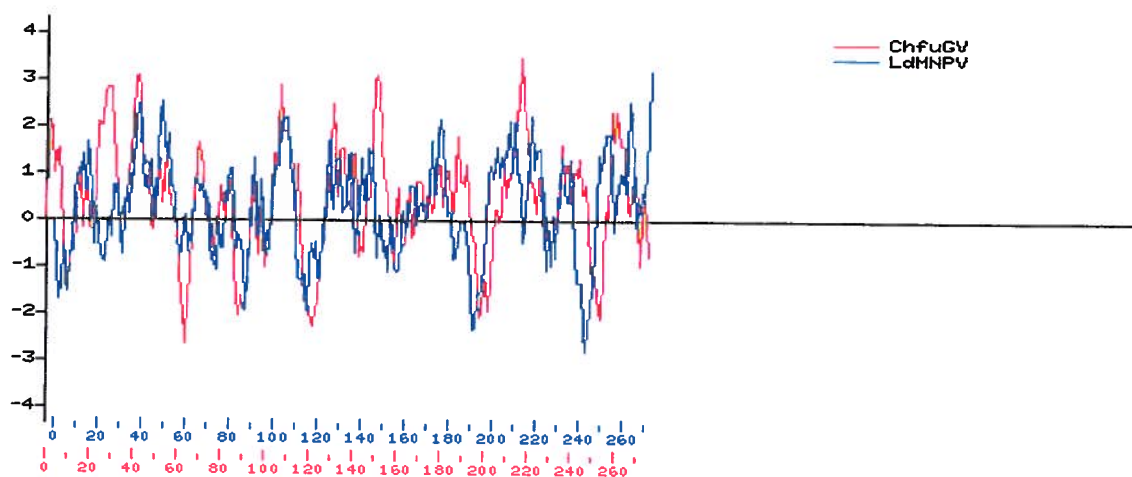
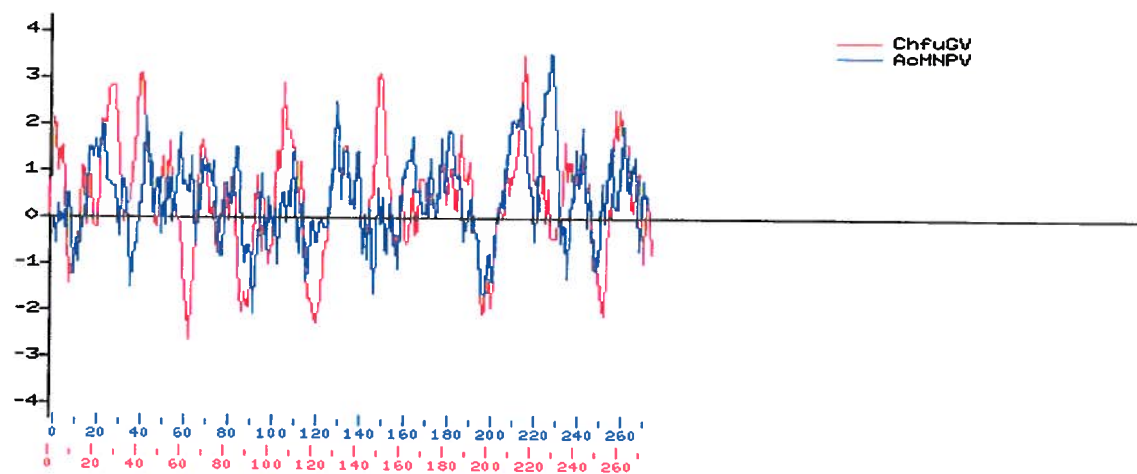
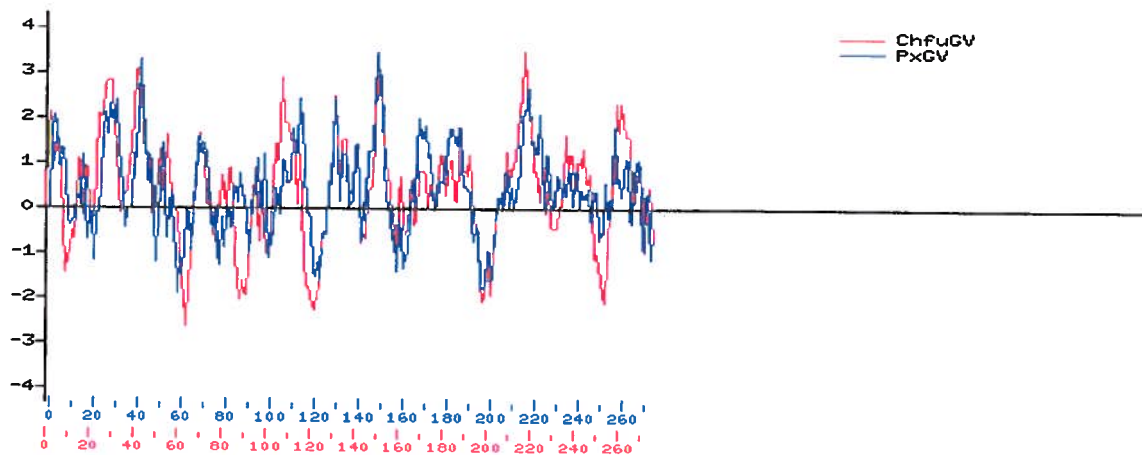
N.B. Certains résidus peuvent être soulignés pour indiquer que les sites des modifications se superposent.

MNP**N****K****S**ISRVLLELKNTEIKNLGENDEDSYDNVYLCCKKKGDPKRYVCKTIK**E**SSFNPL
EESVAVIMRNNPHFIKVHNEIY**N****S****S****G****D**VLILMDYIPGDLFDLVHNKKS^YDLDEPTCKI
IFTLINALHELHNKKFIHNDVKLENILFHQKKRAYLCDYGLARSIGTPSCYDGTVYY
SPEKIIKQPCDPSFDWWALGVVAYEILSSNYPFDINDNDNQEMMDINPSDMLTLYSQPL
ERIE**N****V****S****Q****K**AMDFVIRLLTLDK**N****K****R****L****S****S****Y****D****E****I****I****K****H****P****E****L****K****F**

Figure 10 Comparaison des profils d'hydrophobicité prédits des séquences déduites des protéines PK-1 du ChfuGV et de certains baculovirus

Les profils d'hydrophobicité ont été calculés à l'aide du logiciel bioinformatique de l'Institut Weizmann. Les valeurs indiquées en ordonnée représentent l'hydrophobicité relative (variant entre -4,5 et 4,5) des acides aminés selon l'échelle Kyte et Doolittle (1982). La valeur de la fenêtre utilisée est de 7. Les valeurs en abscisse représentent la position des acides aminés dans la séquence. Les des séquences des protéines déduites PK-1 utilisées sont celles des baculovirus suivants : ChfuGV, AoGV, XcGV, PxGV, AcMNPV et LdMNPV. Le profil d'hydrophobicité de la protéine déduite PK-1 du ChfuGV (en rouge) est comparé à ceux des autres protéines PK-1 (en bleu).





ChfuGV sont données dans le tableau 3. La protéine PK-1 du ChfuGV partage des similarités avec celles d'autres granulovirus, notamment PoGV, AoGV et CpGV, avec une similarité moyenne de 77% et une identité moyenne d'environ 57%. La plus grande similarité est observée avec la protéine PK-1 du PoGV avec 80% de similarité et 60% d'identité. Les granulovirus moins rapprochés sont PxGV et XcGV, identiques à 45% et similaires à 64%, en moyenne, soit presque aussi faibles que les valeurs des NPV. Les séquences des protéines PK-1 des nucléopolyédrovirus sont moins homologues à la protéine PK-1 du ChfuGV avec des identités et presque aussi faibles que les valeurs des NPV. Les séquences des protéines PK-1 des nucléopolyédrovirus sont moins homologues à la protéine PK-1 du ChfuGV avec des identités et similarités moyennes d'environ 35% et 55%, respectivement. Enfin, il y a eu une série de protéines kinases associées à l'apoptose, appartenant à la sous-famille appelée DAPk pour «*death-associated protein kinase* » pour lesquelles la similarité et l'identité au niveau des domaines catalytiques sont à environ 51% et 28%, respectivement.

Les pourcentages d'identité et de similarité entre l'ensemble des séquences déduites PK-1 baculovirales sont regroupés dans le tableau 4. La comparaison entre les protéines PK-1 de certains NPV (BmNPV et AfNPV; AfNPV et AcMNPV; HaNPV et HzSNPV; BmNPV et AcMNPV) indique des valeurs très élevées (> 95%) de similarité et d'identité. Ces valeurs sont plus élevées que celles observées entre les GV. À l'inverse, certaines valeurs d'identités entre les NPV sont plus faibles (34-37%) que les valeurs les plus faibles observées entre les GV (41-45%). Ces valeurs indiquent qu'il y a une variabilité d'homologie entre les protéines déduites PK-1 de baculovirus, tant à l'intérieur des GV que des NPV.

L'alignement multiple de la séquence déduite en acides aminés (PK-1) du gène *pk-1* du ChfuGV avec celle de certains baculovirus a été réalisé à l'aide du programme MultiAlin-INRA, basé sur l'algorithme d'«alignement pairé» (Corpet, 1998). Les résidus conservés sont indiqués en différentes couleurs et par les symboles conventionnels du logiciel, situés en-dessous de la dernière ligne de l'alignement (Figure 11). Les sous-domaines catalytiques I à XI des protéines kinases, impliqués dans la catalyse enzymatique, tels que définis par Hanks, Quinn et Hunter, (1988), sont identifiés en chiffres romains (I-XI) au-dessus de l'alignement. Ces sous-domaines

ont été localisés à l'intérieur du domaine catalytique des séquences PK-1 du AcMNPV et du LdMNPV (Reilly et Guarino, 1994; Bischoff et Slavicek, 1994). Ils semblent être également retrouvés dans la séquence PK-1 du ChfuGV, selon l'alignement, ainsi que dans les autres séquences de baculovirus, même si les résidus sont parfois remplacés par des résidus chimiquement similaires.

D'autres résidus hautement conservés (>90%; en rouge) situés à l'extérieur de ces sous-domaines catalytiques sont partagés entre les protéines PK-1 de baculovirus. Par exemple, il y a les résidus situés aux positions 23 à 25, 39, 70, 74, 75, 87, 91, 97, 188, 199, 209, 238, 291, 295 et 299.

L'arbre phylogénétique a été dérivé de l'alignement multiple de la figure 12. Les divisions phylogénétiques entre les protéines déduites PK-1 des baculovirus ont été estimées en utilisant la méthode de « neighbor-joining » du logiciel TreeView sur l'alignement peptidique. L'arbre possède deux branches principales, séparant les genres GV et NPV. Les plus petites subdivisions entre les NPV et les GV sont présentes aussi. Les valeurs sur les branches indiquent les valeurs des scores Bootstrap, en fraction sur 1000 étapes de rééchantillonnages. La plupart des valeurs s'approchent de 1000 sauf pour certaines subdivisions entre les granulovirus AoGV, ChfuGV et PoGV. D'autres valeurs bootstrap un peu faibles se retrouvent sur la branche qui subdivise les nucléopolyédrovirus McNPV et HaNPV, ainsi que sur la branche qui sépare LdMNPV, SeNPV, McNPV et HaNPV du reste des NPV. L'arbre phylogénétique n'a pas de racine. La longueur des branches reflète la divergence entre les séquences selon l'échelle qui indique les unités de distance évolutionnaire de 0,1 substitutions d'acides aminés par position.

3.1.6. Prédiction de la fonction de la protéine kinase PK-1 du ChfuGV

Afin de vérifier l'homologie entre la protéine déduite PK-1 du ChfuGV et des protéines DAPk, obtenues par BLAST, les profils d'hydrophobicité de ces protéines ont d'abord été comparés. Les mêmes paramètres que ceux de la figure 10 ont été utilisés (Figure 13). La comparaison des profils d'hydrophobicités des protéines kinases PK-1 du ChfuGV et DAPk indique qu'ils sont conservés dans l'ensemble des régions à l'exception des régions 40, 60, 120, 150 et entre 180 et 220.

Tableau 3 Liste des séquences similaires à la protéine déduite PK-1 du ChfuGV, obtenues par analyse BLAST-protéine^a

Nom de la protéine kinase (pk)	Organisme	Identité/ Similarité (%)	Nos d'accension
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	ChfuGV	100/100	AF406760
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	PoGV	60/80	NP_663168
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	AoGV	58/77	AF337646_6
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	CpGV	56/73	NP_148787.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	PxGV	45/65	NP_068225.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	XcGV	45/63	NP_059151.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	SeNPV	36/58	NP_037763.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	HzSNPV	36/56	NP_542626.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	HaNPV	36/56	NP_203561.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	AfNPV	35/57	AAB53359.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	SINPV	35/58	CAA68048.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	BmNPV	35/56	NP_047416.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	AcMNPV	35/56	NP_054039.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	OpMNPV	37/58	NP_046157.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	LdMNPV	34/56	NP_047639.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	EppoNPV	35/59	NP_203304.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	McNPV	34/54	NP_689178.1
Sérine/thréonine-protéine kinase-1	AgNPV	35/56	CAC03568.1
KIAA1765 protéine	<i>Homo sapiens</i>	27/51	BAB21856.1
DAPk3; ZIP kinase	<i>Mus musculus</i>	27/51	NP_031854.1
Similaire à DAPk	<i>Rattus norvegicus</i>	27/51	NP_071991.1
DAPk3; ZIP kinase	<i>Homo sapiens</i>	28/51	NP_001339.1
Similaire à doublecortine et CaM kinase-1	<i>Homo sapiens</i>	27/51	XP_047355.1
DAPk	<i>Homo sapiens</i>	27/49	BAB26448.1
Ankyrine et pk	<i>C. elegans</i>	28/52	NP_490840.1
DAPk-1	<i>Homo sapiens</i>	27/49	NP_004929.1
DAPk-1	<i>Mus musculus</i>	27/49	NP_083929.1
Pk dépendante à Ca ²⁺ /calmoduline	<i>C. elegans</i>	30/51	NP_509689.1
Similaire à DAPk-1	<i>Homo sapiens</i>	27/49	AAH03614.1
Kinase de la chaîne légère de myosine	<i>D. discoideum</i>	28/51	A40811
Similaire à Sérine/Thréonine- pk 17b	<i>Mus musculus</i>	27/50	AAH06579.1
DAPk	<i>Homo sapiens</i>	27/48	I37275
Similaire à DAPk-2	<i>Mus musculus</i>	27/49	XP_134847.1
DAPk	<i>Homo sapiens</i>	27/49	CAA53712.1
Similaire à DAPk	<i>Rattus norvegicus</i>	27/51	CAA07360.1
ZIP-kinase	<i>Homo sapiens</i>	28/51	BAA24955.1

N.B. Seulement une fraction des protéines kinases non-baculovirales est indiquée.

^a Banque de séquences peptidiques utilisée : Non-redondante GenBank CDS, traductions + PDB + SwissProt + PIR + PRF

Tableau 4 Pourcentages d'identité et de similarité^a entre les séquences des protéines déduites PK-1 de certains baculovirus

	ChfuGV	PoGV	AoGV	CpGV	PxGV	XcGV	OpMNPV	SeNPV	HxSNPV	HaNPV	AfNPV	SINPV	BmNPV	AcMNPV	AgNPV	McNPV	EppoNPV	LdMNPV
ChfuGV		60	58	56	45	45	37	36	36	36	35	35	35	35	35	35	34	34
PoGV	80		57	55	50	48	35	34	38	38	35	36	35	35	36	35	35	35
AoGV	77	77		51	44	41	40	36	36	36	36	35	36	36	37	34	36	38
CpGV	73	76	66		44	41	33	32	36	34	34	38	33	33	35	35	31	37
PxGV	65	72	65	66		54	33	40	39	39	34	39	34	34	33	35	34	43
XcGV	63	65	59	58	71		33	30	36	36	33	37	34	33	33	31	33	30
OpMNPV ^b	58	55	56	53	55	51		37	39	39	67	41	66	65	71	34	73	40
SeNPV	58	59	55	52	61	52	55		51	52	38	39	38	38	36	50	36	46
HxSNPV	56	60	54	54	62	57	59	69		99	40	46	40	40	37	47	40	42
HaNPV	56	59	54	54	62	56	59	69	100		39	45	39	38	35	44	38	42
AfNPV	57	55	54	54	59	52	81	59	64	62		44	96	97	66	39	69	40
SINPV	58	56	54	56	61	56	61	63	67	64	65		38	38	41	37	40	45
BmNPV	56	55	54	53	58	51	81	58	64	61	98	58		95	69	38	69	41
AcMNPV	56	56	53	54	58	51	79	58	64	61	97	60	96		65	38	67	40
AgNPV	56	56	55	52	61	52	82	57	59	56	79	59	80	77		37	76	37
McNPV	54	57	52	53	57	51	54	69	67	65	61	56	60	60	59		38	44
EppoNPV ^b	59	58	56	56	59	51	84	60	64	61	83	61	83	81	87	62		39
LdMNPV	56	59	58	56	63	52	57	62	63	59	61	68	61	60	56	64	59	

^a Les comparaisons réalisées par BLAST-protéine/ protéine en utilisant la banque de données de séquences peptidiques (GenBank non-redondante CDS, traductions + PDB + SwissProt +PIR + PRF). Les pourcentages d'identités et de similarités sont indiqués en caractères gras et ordinaires, respectivement.

^b Brin anti-sens.

Figure 11 Alignement multiple des séquences déduites des protéines PK-1 du ChfuGV et de certains baculovirus Les tirets indiquent l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement. Les séquences PK-1 baculovirales utilisées pour l'alignement multiple sont celles des baculovirus suivants : ChfuGV, PoGV, AoGV, CpGV, PxGV, XcGV, SeNPV, HzSNPV, HaNPV, AfNPV, SINPV, BmNPV, AcMNPV, OpMNPV, LdMNPV, EppoNPV, McNPV et AgNPV. Les résidus avec une similarité chimique élevée (90%) sont indiqués en rouge. Les résidus avec une similarité chimique faible (50% ou moins) sont en bleu. En vert sont les résidus neutres. Les sous-domaines catalytiques I à XI sont encadrés et nommés. Les tirets indiquent l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement. Les résidus consensus des sous-domaines catalytiques sont les suivants :

Sous-domaine I	V/I/L-G-X-G-X ₂ -G-X-V
Sous-domaine II	A-X-K-X-V/I/L
Sous-domaine III	E
Sous-domaine IV	I/V/L
Sous-domaine V	L-M-X-Y-X ₄ -D, mais souvent variable
Sous-domaine VI	G-X ₂ -Y/F/H-L-X ₆ -H-X-D-V/I/L-X ₃ -N-V/I/L
Sous-domaine VII	V/I/L-X-D-F-G
Sous-domaine VIII	G-T/S/P-X ₂ -Y/W/F-X-A/P/S-P/L-E
Sous-domaine IX	D-X-W/Y/F-A/S-X-G-V/I/L
Sous-domaine X	Variable, débute par D, suivi de Q-X-E-X-L-X ₄ -L
Sous-domaine XI	I/V/L/N/C suivi plus loin de R

Légende

La signification des symboles :

! : I ou V

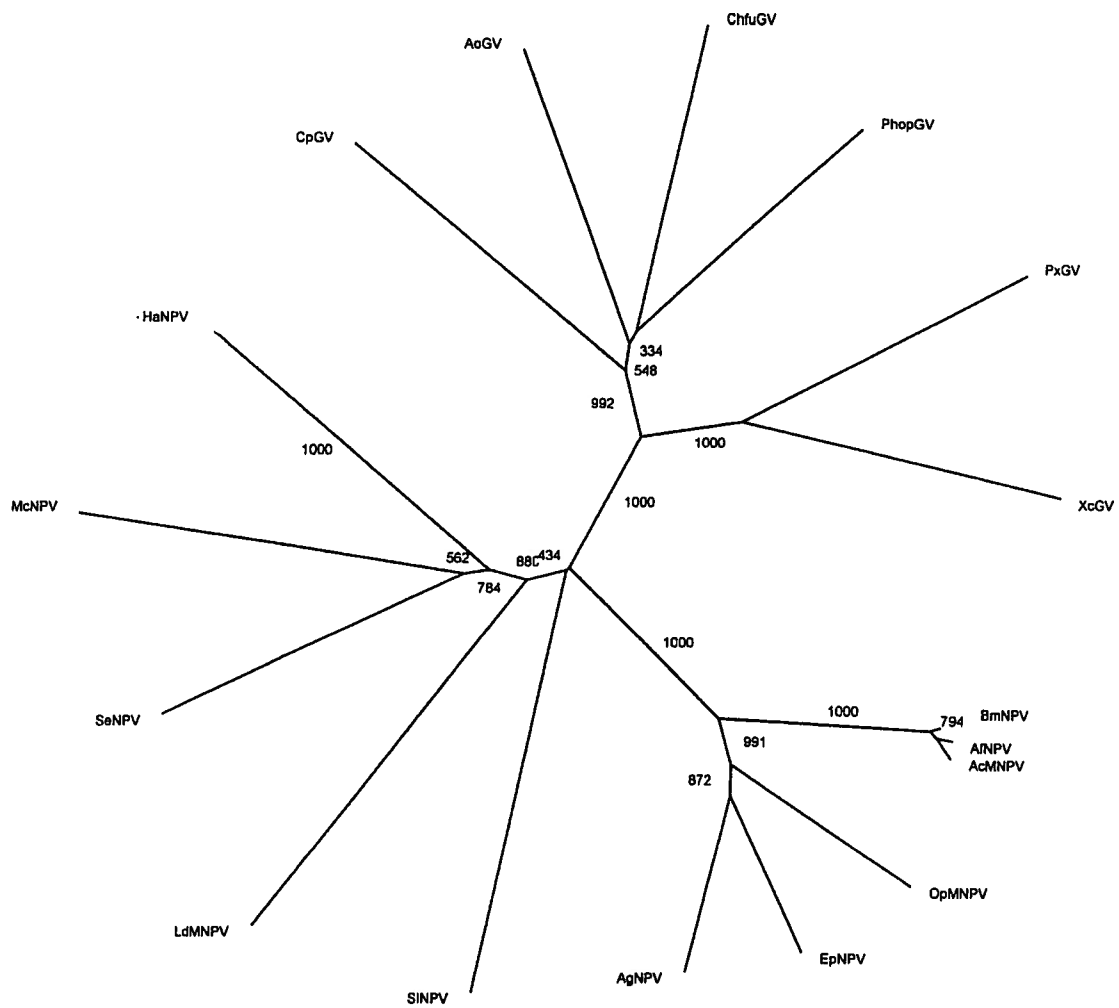
\$: L ou M

% : F ou Y

: Un des résidus suivants : N, D, Q, E, B, Z où B = asparagine/aspartate et où Z = glutamine/glutamate

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 175
 I II III IV V VI
 176 185 195 205 215 225 235 245 255 265 275 285 295 305 315 325
 VII VIII IX X XI XII
 1 f. # e. 2e. v. Kh. pt. kl. v. k. l. fn. v. Kh. l. dn. g. m21. ed. f8. i. e. i. q. l. al. and. h. l. m. d. n. k. n. l. z.

Figure 12 Arbre phylogénétique des séquences déduites des protéines kinases PK-1 de certains baculovirus Arbre dérivé de l'alignement multiple des séquences d'acides aminés déduites des gènes *pk-1* baculoviraux. La position des branches est le résultat de 1000 étapes de rééchantillonnage aléatoire des données (réplicats de bootstrap). Les numéros sur les branches indiquent les valeurs des scores du rééchantillonnage aléatoire, données en fraction sur 1000. Ainsi, une valeur de 850 pour une subdivision indique un degré de confiance de 850 fois sur 1000 étapes de rééchantillonnage. L'échelle indique les unités de distance évolutive de 0,1 substitutions d'acides aminés par position.



0.1

La séquence déduite de la protéine PK-1 du ChfuGV a également été alignée aux séquences de quelques protéines DAPk, indiquées dans la figure 14. Les résidus conservés sont indiqués par différentes couleurs, selon le degré de conservation et par les symboles conventionnels du logiciel. Quelques résidus uniques aux protéines DAPk possédant des fonctions spécifiques selon le modèle structural DAPk sont indiqués par des encadrés en couleur. Par exemple, il y a les résidus E et S (position 30), le segment composé de résidus basiques (positions entre 50 et 75), le résidu M (position 159) et la région située entre les positions 175 et 195. La séquence PK-1 du ChfuGV semblent posséder une grande fraction des résidus conservés chez les DAPk, même s'ils sont remplacés parfois par des résidus chimiquement similaires. Également, les deux régions (positions 50 à 75 et 175 à 195) conservées chez les DAPk sont partiellement présentes dans la séquence de la protéine PK-1 du ChfuGV.

Le tableau 5 indique pour l'alignement optimal de la figure 14, le nombre de résidus partagés entre la protéine PK-1 du ChfuGV et les résidus consensus retrouvés dans les séquences des protéines DAPk. Les résidus identiques sont au nombre de 82 sur un total de 277. Il y a 44 résidus sur 277 qui partagent une similarité chimique, dont les valeurs des probabilités de substitution sont positives, selon la matrice de substitution Blosom 62 (Annexe I); donc observées plus fréquemment que le hasard le permet. Il y a enfin 36 sur 277 résidus qui sont représentés par des probabilités de substitution égales à 0. Le nombre de résidus ayant des scores de substitution négatifs est de 66, mais de ce chiffre, 19 résidus partagent des similarités chimiques (résidus hydrophobes/non-polaires : P, A, F, W, M) ou structurales (résidus externes : D et K), malgré le score négatif. La compilation de ces données monte à 181 résidus sur 277, ce qui démontre que les résidus entre la protéine PK-1 du ChfuGV et les protéines DAPk partagent un certain degré d'homologie.

3.2. Analyse transcriptionnelle du gène *pk-1* du ChfuGV

À l'aide des amorces sens et antisens Pkfw1 et Pkrv1, une réaction de RT-PCR a été menée et un fragment amplifié de 631 pb a été observé entre 2 et 72 h.p.i. (puits 5 à 10), suggérant qu'il y a présence de transcrit(s) du gène *pk-1* (Figure 15). Aucun fragment n'a été amplifié à partir de

Figure 13 Comparaison des profils d'hydrophobicité prédits de la séquence déduite de la protéine PK-1 du ChfuGV et de certaines protéines kinases DAPk Les valeurs indiquées en ordonnée représentent l'hydrophobicité relative (variant entre -4,5 et 4,5) des acides aminés selon l'échelle Kyte et Doolittle (1982). La valeur de la fenêtre utilisée est de 7. Les valeurs en abscisse représentent la position des acides aminés dans la séquence. Les séquences DAPk utilisées ainsi que les numéros d'accèsion sont les suivantes : DAPk-3 (NP_031854.1), DAPk-2 (XP_134847.1) et séquence similaire à DAPk-1 (AAH03614). Le profil d'hydrophobicité de la protéine déduite PK-1 du ChfuGV (en rouge) est comparé à ceux des protéines DAPk (en bleu).

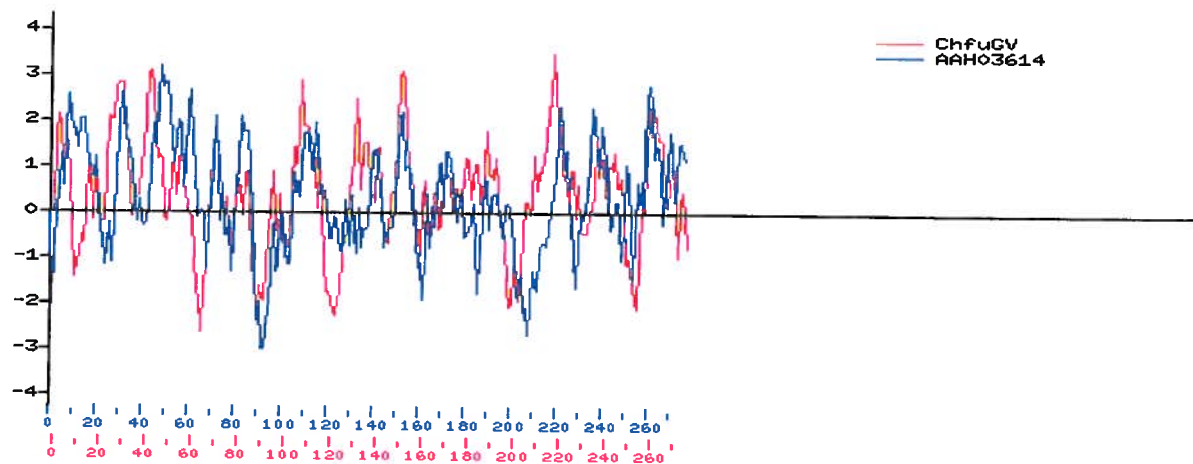
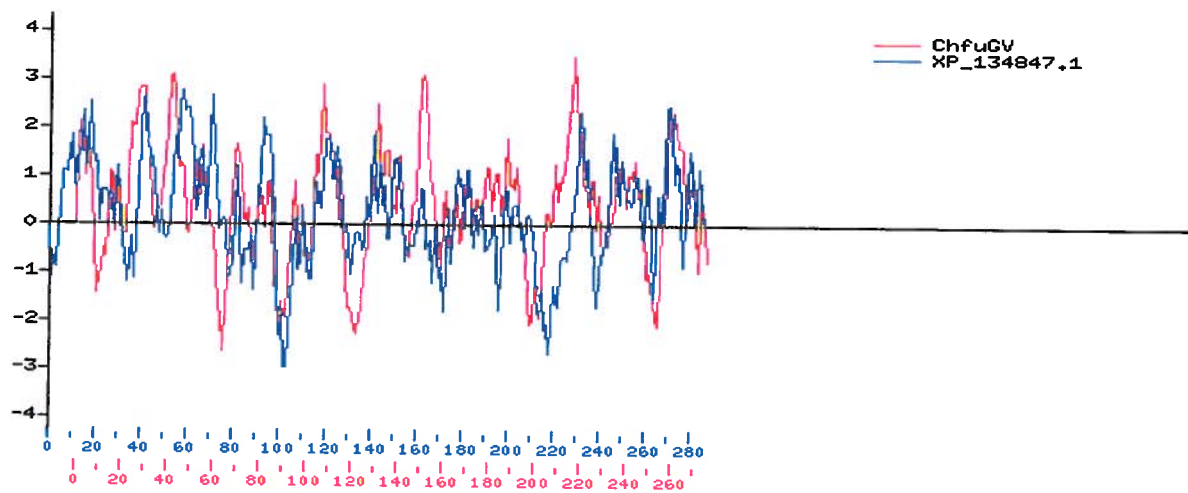
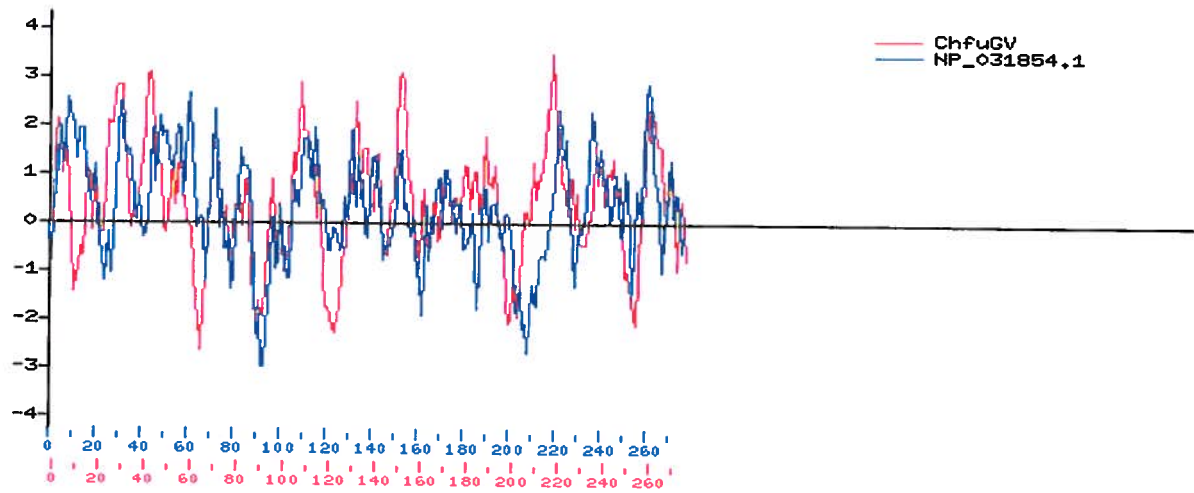


Figure 14 Alignement multiple de la séquence déduite PK-1 du ChfuGV et de certaines protéines kinases DAPk Les tirets indiquent l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement. Les séquences utilisées ainsi que les numéros d'accèsion pour l'alignement multiples sont les suivantes : PK-1 déduite du ChfuGV (AF406760), DAPk-3 (NP_031854.1), séquence similaire à DAPk (NP_071991.1), DAPk-3 (NP_001339.1), séquence similaire à DAPk-2 (XP_134847.1), séquence similaire à DAPk-1 (AAH03614) et DAPk (BAB26448.1). Les résidus avec une similarité chimique élevée (90%) sont indiqués en rouge. Les résidus avec une similarité chimique faible (50% ou moins) sont en bleu. En vert sont les résidus neutres. La boucle basique (Lys-44 à Val-55) ainsi qu'une 2^{ème} région unique aux DAPk, sont encadrées en bleu. Le résidu M, unique aux DAPk est encadré en rouge. Les résidus S et Q conservés sont encadrés en vert.

Légende

La signification des symboles :

! : I ou V

\$: L ou M

% : F ou Y

: Un des résidus suivants : N, D, Q, E, B, Z où B = asparagine/aspartate et où Z = glutamine/glutamate

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150

Chf6V
 HNPKSTSRILLEKATEIKALGEM-FEISDNVYLCKKGGPKRYVKITLCS-----GFNPLEFSVYINR-AMPFTKHAFTWSSGQVLLMDYF6GGLFDL VHHKKSYNLD DP TCKCTETLTHQLHEAHKKTIH
 NP_031854.1 NSTFRQEDVEINTEMGEEL SSQQ HLYKKCKQAGTGMEYHAKF IKKRRL PSSKRGYSKELEIE SL KEIRPAPITLHD-VYEKTDVYLLELYSGGELFDLAEKESL TEDEHT--QFLKQILDGMYLISKRLAH
 NP_071391.1 NSTFRQEDVEINTEMGEEL SSQQ HLYKKCKQAGTGMEYHAKF IKKRRL PSSKRGYSKELEIE SL KEIRPAPITLHD-VYEKTDVYLLELYSGGELFDLAEKESL TEDEHT--QFLKQILDGMYLISKRLAH
 NP_001339.1 NSTFRQEDVEINTEMGEEL SSQQ HLYKKCKQAGTGMEYHAKF IKKRRL PSSKRGYSKELEIE SL KEIRPAPITLHD-VYEKTDVYLLELYSGGELFDLAEKESL TEDEHT--QFLKQILDGMYLISKRLAH
 AHH03614 NSTFRQEDVEINTEMGEEL SSQQ HLYKKCKQAGTGMEYHAKF IKKRRL PSSKRGYSKELEIE SL KEIRPAPITLHD-VYEKTDVYLLELYSGGELFDLAEKESL TEDEHT--QFLKQILDGMYLISKRLAH
 B9826448.1 NSTFRQEDVEINTEMGEEL SSQQ HLYKKCKQAGTGMEYHAKF IKKRRL PSSKRGYSKELEIE SL KEIRPAPITLHD-VYEKTDVYLLELYSGGELFDLAEKESL TEDEHT--QFLKQILDGMYLISKRLAH
 NP_134847.1 MYQSSKSPNMEFTKQKYEIDF DLGEEL SSQQ HLYKKCKEKSIGLE YHAKF IKKRSRSGRGVCEEEIEIE SL KQVLPAPITLHD-VYEKTDVYLLELYSGGELFDLAEKESL SEEEHT--STKQILDGMYLITKKRLAH
 Consensus *****S..n.f.q.nvd.g.GE#1ssga.V.KC...kgg...YakTLKr.....srgvsr+.Jres.L....hP.n.Tlhh.1%n.LDV.Lg#1.L.Gg#FLlahesl.ehaT...flkql.gvhlh.klah

151 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 297

Chf6V
 NDVKLENTLEHOK---KRRHLYVGLRSGTPTSYD---OTTYVSPEKIKQPCSTDAALGVYHVEI.SNYPFDNDNDQDMDIDNSDMLTYSQPLELEWVSKAHDPVIRLLTKKKRLSSYDETIKPKLFT
 NP_031854.1 FOLKPEHMLDKHHSPRKLI FGINHRLEHSEFKNITGTPFVHPEIYHVEPGL EDMSIGVITILLSGNSPT-LGETKETLINSMH---YDFDEYSSISELAKQFIRRLWKQPKRAT-IRQSLHSUKY
 NP_071391.1 FOLKPEHMLDKHHSPRKLI FGINHRLEHSEFKNITGTPFVHPEIYHVEPGL EDMSIGVITILLSGNSPT-LGETKETLINSMH---YDFDEYSSISELAKQFIRRLWKQPKRAT-IRQSLHSUKY
 NP_001339.1 FOLKPEHMLDKHVPKRLKI FGINHKLEHNEFKNITGTPFVHPEIYHVEPGL EDMSIGVITILLSGNSPT-LGETKETLINSMH---YDFDEYSSISELAKQFIRRLWKQPKRAT-IRQSLHSUKY
 AHH03614 FOLKPEHMLDKHVPKRLKI FGLAHKIDFGHETKNITGTPFVHPEIYHVEPGL EDMSIGVITILLSGNSPT-LGETKETLINSMH---YDFDEYSSISELAKQFIRRLWKQPKRAT-IRQSLHSUKY
 B9826448.1 FOLKPEHMLDKHVPKRLKI FGLAHKIDFGHETKNITGTPFVHPEIYHVEPGL EDMSIGVITILLSGNSPT-LGETKETLINSMH---YDFDEYSSISELAKQFIRRLWKQPKRAT-IRQSLHSUKY
 NP_134847.1 FOLKPEHMLDKNIPYKIKI FGLAHETENGVEKNITGTPFVHPEIYHVEPGL EDMSIGVITILLSGNSPT-LGETKETLINSMH---YDFDEYSSISELAKQFIRRLWKQPKRAT-IRQSLHSUKY
 Consensus FOLKPEHSL hk...kpoikih glh.I...geehniGT%waelinghPlgleadhsihi.LYllsgasPF.lguk#h%.hl.av.....Ydf.ef.fsns.huKoFirlluk+.hhh.i.#1.huuh

Tableau 5 Nombre de résidus partagés^a entre la protéine PK-1 du ChfuGV et certaines protéines DAPk

Nombre de résidus identiques	82 / 277
Nombre de résidus substitués avec des scores de substitution positifs	44 / 277
Nombre de résidus substitués avec des scores de substitution de 0 (zéro)	36 / 277
Nombre de résidus substitués avec des scores de substitution négatifs	66 / 277
Nombre de résidus substitués avec des scores de substitution négatifs avec des similarités chimiques ou structurales	19 / 277
Compilation des résidus partagés	181 / 277 ^b

^a Les scores de substitutions sont basés sur la matrice Blosum 62 (Annexe I)

^b La compilation n'inclue pas les espaces vides « gaps » pour maintenir l'alignement multiple

l'ARN isolé de larves non-infectées (puits 2), ni en absence d'ARN (puits 3), ni lors de l'ajout de *Taq* polymérase seule (puits 4). Les divers témoins négatifs montrent l'absence d'ARNm et/ou de contamination.

L'hybridation Northern a révélé que le gène *pk-1* s'exprime à 72 h.p.i. en trois transcrits de tailles variables, soit 2.4 kb, 1.2 kb et 0.4 kb (Figure 16a.; puits 1). Le signal de plus grande intensité correspond au transcrit de 2.4 kb. La sonde spécifique aux transcrits du gène *pk-1* n'a pas hybridé à l'ARN provenant des larves de *C. fumiferana* non-infectées, servant de témoin négatif (Figure 16(a); puits 2). Le même patron transcriptionnel du gène *pk-1* a été observé pour l'ARN total isolé à 10 et 48 h.p.i. (résultats non-montrés).

La même membrane a été réutilisée pour l'hybridation avec la sonde spécifique aux ARNm du gène *granuline* (Figure 16b.). Le même transcrit de 2.4 kb s'est hybridé avec la deuxième sonde. Un second transcrit de taille approximative de 750 pb est aussi observé.

Un schéma représentant la terminaison hypothétique des transcrits du gène *pk-1* du ChfuGV (Figure 17) montre qu'il y aurait usage différentiel de signaux polyadényliques pour arriver aux transcrits de tailles différentes. La prédiction de(s) site(s) d'épissage à l'intérieur des gènes *pk-1* baculoviraux a été évaluée par le logiciel « Splice Site Prediction (Neural Network), (Reese, 1997), selon les paramètres par défaut. La probabilité de la présence d'un site potentiel est indiquée par un chiffre entre 0 (peu probable) et 1 (très probable). Bien que les résultats ne soient pas montrés, ils indiquaient globalement une faible probabilité pour la présence de sites d'épissage dans les gènes *pk-1* de baculovirus, incluant une valeur de 0,62 pour le ChfuGV. Les témoins positifs, déjà vérifiés expérimentalement, correspondaient aux gènes *ie-1* des baculovirus AcMNPV et LdMNPV) et ils possédaient des valeurs élevées, autour de 0,80.

Figure 15 Cinétique de l'expression transcriptionnelle du gène *pk-1* du ChfuGV

Puit 1 : Échelle de poids moléculaire 1 kb

Puit 2 : Témoin négatif, ARN de larves *C.fumiferana* non-infectées

Puit 3 : Témoin négatif, absence d'ARN

Puit 4 : Témoin négatif, ajout de *Taq* polymérase seule

Puit 5 : ARN total isolé à 0 h.p.i.

Puit 6 : ARN total isolé à 2 h.p.i.

Puit 7 : ARN total isolé à 12 h.p.i.

Puit 8 : ARN total isolé à 24 h.p.i.

Puit 9 : ARN total isolé à 48 h.p.i.

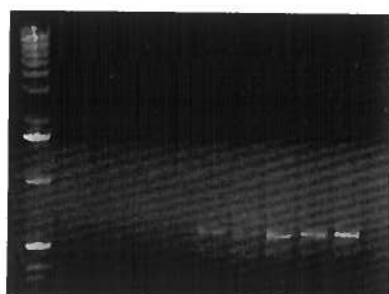
Puit 10 : ARN total isolé à 72 h.p.i.

Témoins Cinétique de la transcription

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (puits)

1018 b.p

506 b.p



← 631 b.p

Figure 16 Hybridation de type Northern en utilisant les sondes spécifiques aux transcrits des gènes *pk-1* et *granuline* du ChfuGV

- a) ARN total isolé à 72 h.p.i. et ARN de larves *C. fumiferana* non-infectées, migration sur gel de formaldéhyde
- b) Hybridation avec sonde spécifique aux transcrits du gène *pk-1*
- c) Hybridation avec sonde spécifique aux transcrits du gène *granuline*

Les fragments de l'échelle de poids moléculaire d'ARN sont indiqués au centre.

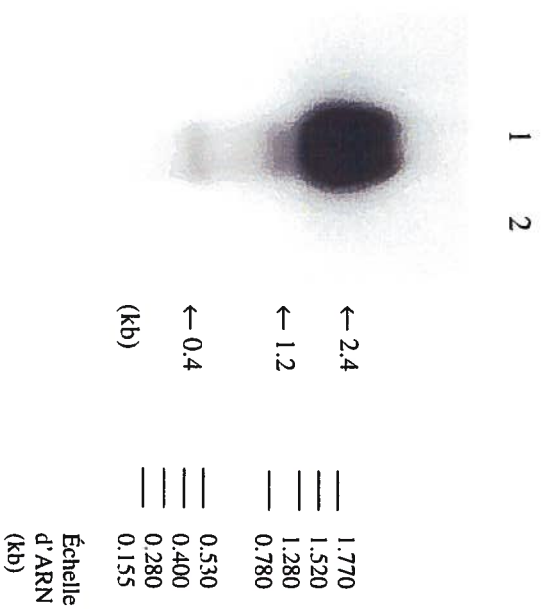
Puit 1 : ARN total

Puit 2 : ARN de larves *C.fumiferana* non-infectées

a) Gel de formaldéhyde



b) Transcrits du gène *pk-1*



c) Transcrits du gène *granuline*

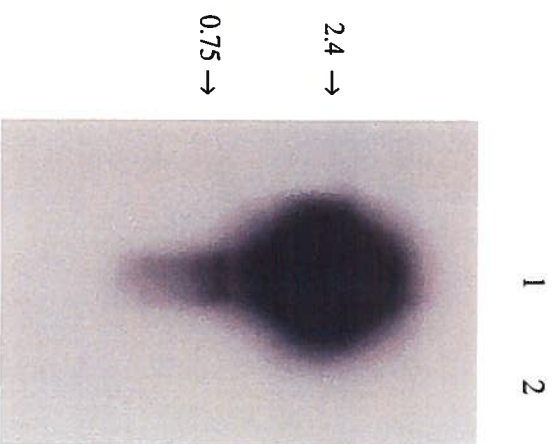
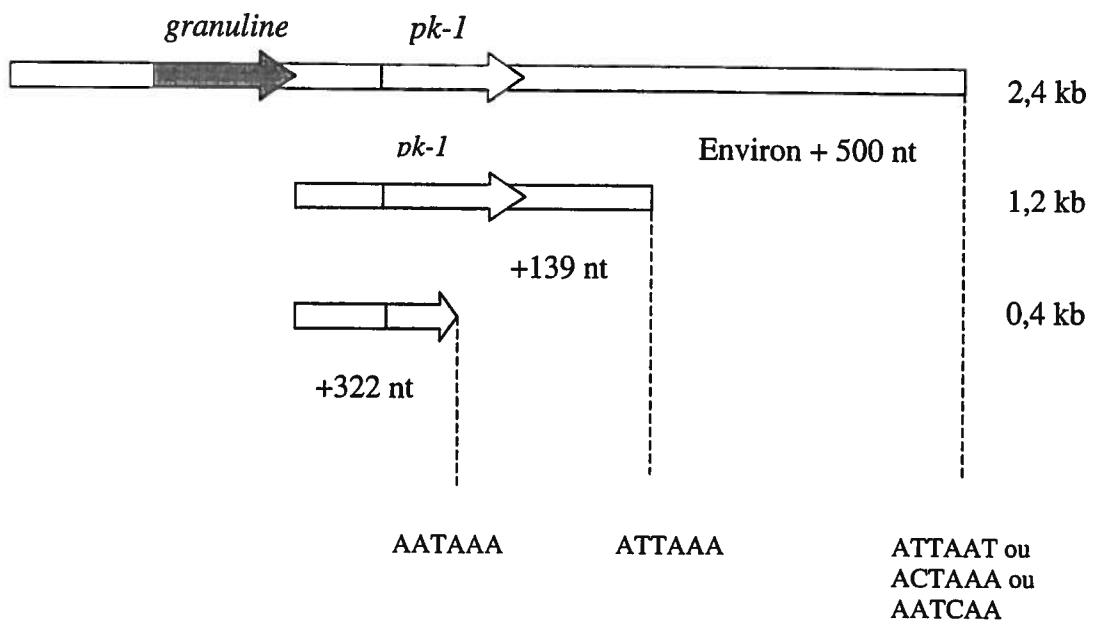


Figure 17 Scénario d'apparition des transcrits du gène *pk-1* du ChfuGV basé sur la position des signaux de polyadénylation La taille (kb) des transcrits est indiquée à droite. La position des signaux de polyadénylation potentiellement reconnus est indiquée en-dessous des transcrits schématisés. Pour les transcrits de 2,4 kb et 1,2 kb, les positions des signaux de polyadénylation indiquées sont en aval du codon de terminaison de la traduction du gène *pk-1*. Pour le transcrit de 0,4 kb, la position se trouve en aval du codon d'initiation de la traduction du gène *pk-1*.



Chapitre 4 : Discussion

4.1. Caractérisation moléculaire du gène *pk-1* du ChfuGV

4.1.1. Analyse de la séquence nucléotidique du gène *pk-1* du ChfuGV

Le gène *pk-1* du ChfuGV a été localisé à l'intérieur du fragment de 11 kb de la banque génomique *BamH* I, à proximité du gène *granuline*, tel que rapporté par Rashidan *et al.*, 2002a. La carte physique révèle que la localisation et l'orientation de certains gènes autour du gène *pk-1* sont relativement conservées pour plusieurs gènes de granulovirus (Wormleaton et Winstanley, 2001). Les GV ont moins divergé au niveau de cette région du génome, par rapport aux NPV (Figure 7), indiquant probablement un confinement à une espèce d'insecte hôte. En effet, la plupart des NPV ne sont pas spécifiques à l'espèce (Ignoffo, 1968; Vail *et al.*, 1971), contrairement au spectre d'hôte de la plupart des GV, à l'exception du XcGV, lequel est capable d'infecter au moins six espèces d'insectes (Goto *et al.*, 1985; Goto, Minobe et Iizuka, 1992). L'ordre des gènes dans la carte physique est respecté en partie chez les NPV, entre autres par AcMNPV (Ayres *et al.*, 1994), BmNPV (Gomi, Kajima et Maeda, 1999), LdMNPV (Kuzio *et al.*, 1999), OpMNPV (Ahrens *et al.*, 1997) et SeNPV (Ijkel *et al.*, 1999), ainsi que les membres SINPV, SeNPV, EppoNPV, AfNPV, HaNPV, HzSNPV et McNPV. Il est déjà connu que les baculovirus peuvent avoir quelques fragments conservés à l'intérieur de leurs génomes, où les gènes sont généralement localisés aléatoirement. Cependant, la signification de cette conservation est peu comprise. Elle serait peut-être le résultat d'un transfert direct de matériel génétique. En effet, un exemple qui illustre ce fait serait le génome du McNPV qui contient quatre ORF homologues retrouvés uniquement chez le XcGV. Le partage de cette région du génome entre ces deux baculovirus très éloignés génétiquement ne pourrait avoir lieu que s'il y a eu transfert latéral de gènes (Li *et al.*, 2002a). Cette possibilité est probable puisque le XcGV et le McNPV co-infectent les hôtes de la même région géographique (Landolt, 2000). Un autre exemple de transfert génétique horizontal serait celui du gène codant pour la protéine baculovirale inhibitrice IAP dont l'origine provient de la cellule hôte (Huang *et al.*, 2000). D'autres pensent que l'organisation précise de certains gènes servirait dans la régulation de la réplication (Luque *et al.*, 2001).

La séquence de la région du promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV (région 5'NT) montre que le site d'initiation de la traduction (TTAATGAA) ne concorde pas aux règles de Kozak dont la séquence consensus est PuNNATGPu (Kozak, 1986; Kozak, 1987). Cependant, pour le gène *gp64* baculoviral, la présence d'un nucléotide à thymine à la position -3 semble favoriser une forte traduction dans la phase tardive de l'infection (Chang et Blissard, 1997). D'autres analyses, basées sur le même gène *gp64*, indiquent que les positions +4 et +5 en aval du codon d'initiation, dans le contexte spécifique 5'-ATGAa/c/gN-3' (Chang, Kuzio et Blissard, 1999), sont significatives pour une initiation efficace de la traduction. Le site d'initiation du gène *pk-1* du ChfuGV est en accord avec ces deux observations.

Le codon initiateur ATG putatif du gène *pk-1* semble être le seul actif; aucun autre codon ATG ne pourrait le remplacer. En effet, tous les autres codons ATG environnants et en phase l'ATG initiateur (en amont ou en aval de ce dernier) ne respectent ni les règles de Kozak, ni la séquence consensus proposée par Chang, Kuzio et Blissard, (1999). Il a toutefois été observé que chez les baculovirus, l'usage d'un autre codon initiateur ATG en amont de l'ATG habituel de l'ORF peut avoir lieu (Lin *et al.*, 2001; Chang et Blissard, 1997). Il en résulte une régulation négative de la traduction du produit car le codon Met initiateur attendu est inefficacement ou pas du tout reconnu pour la traduction.

Le motif de promoteur précoce CAGT, adhère au consensus (T/C)AGT (Ayres *et al.*, 1994) lequel ressemble à l'initiateur transcriptionnel spécifique aux arthropodes TCAGT (consensus (A/C/T)CA(G/T)T) permettant une transcription par l'ARN polymérase de l'hôte, dans la phase précoce d'infection (Cherbas et Cherbas 1993). Le motif CAGT peut être présent avec ou sans une boîte TATA (Kogan, Chen et Blissard, 1995). Alternativement, le motif de promoteur précoce peut varier pour devenir ACGT ou aussi TCATT (Huang et Levin, 2001; Bischoff et Slavicek, 1994). Dans le promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV, il y a le motif ACGT localisé aux positions -24 nt et -99 nt et le motif TCATT localisé à la position -46 nt en amont du codon d'initiation.

Les deux motifs de promoteur tardif adhèrent à la séquence consensus (A/T/G)TAAG (Morris et Miller, 1994). Pour ce qui est des gènes tardifs baculoviraux, le motif TAAG peut agir à la fois comme promoteur et site de départ de la transcription (Hayakawa *et al.*, 1999).

La présence des motifs de promoteurs précoce et tardif suggère que le gène *pk-1* du ChfuGV est à la fois précoce et tardif. Pour l'ensemble des promoteurs des gènes *pk-1* de baculovirus, la variabilité des motifs des promoteurs présents (soit précoces et/ou tardifs) indique que ces gènes coderaient pour des protéines de nature différente, c'est-à-dire nécessaires à des moments différents durant le cycle viral et servant probablement pour des fonctions différentes dans l'infection.

Le site d'initiation à la transcription pour les gènes précoces baculoviraux peut être représenté par le motif CAGT. Cependant, le site d'initiation peut parfois avoir le motif CATT, tel qu'observé pour les gènes *pnk/pnl* du AcMNPV (Durantel *et al.*, 1998), *pk-1* du LdMNPV (Bischoff et Slavicek, 1994) et l'ORF 2L du AoGV (Wormleaton et Winstanley, 2001). Le motif CATT est présent aux positions -17 nt et -51 nt dans le promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV.

Les ARNm cellulaires incluant les ARNm baculoviraux possèdent dans l'extrémité 5' une structure de 7-méthyle guanosine (m7G), communément appelée coiffe (ou cap), permettant une protection contre la dégradation des transcrits et une liaison des ribosomes sur les transcrits pour initier la traduction (Cooke et Alwine, 1996; Beelman et Parker, 1995). Le site cap est habituellement trouvé à une position entre -99 nt et -75 nt, avec le motif CAGT, tel que trouvé dans le promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV, mais il peut varier légèrement pour devenir CACT (Wormleaton et Winstanley, 2001).

La séquence polyadénylique située à environ +500 nt en aval du codon de terminaison est la seule qui varie d'un nucléotide de la séquence canonique. Les autres signaux poly-A respectent les séquences canoniques et non-canoniques. Il semblerait que les signaux poly(A) canoniques et non-canoniques possèdent une incidence aussi faible que 59% (Gautheret *et al.*, 1998). En effet, suite à l'analyse des séquences dans la banque de données GenBank et EST, il a été remarqué que la variation par un nucléotide des séquences poly-A canoniques et non-canoniques est un

phénomène courant (MacDonald et Redondo, 2002). Les régions 3'NT des gènes *pk-1* des baculovirus AcMNPV et LdMNPV possèdent trois et un site poly(A), respectivement.

Aucun élément ressemblant à la boîte TATA (consensus TATA(A/T)A(A/T)), normalement situé entre -45 nt et -20 nt en aval du site d'initiation (Ogbourne et Antalis, 1998; Usheva *et al.*, 1992), ne semble être présent dans le promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV, ni dans ceux des autres GV ou NPV. Toutefois, chez les GV, incluant, ChfuGV, un motif ressemblant à une boîte TATA est localisé à une distance très en amont du site d'initiation (~ -150 p.b.), ce qui est inhabituel pour une boîte TATA. Parfois, mais rarement, une boîte TATA peut être trouvée à environ -100 nt du codon d'initiation, servant de promoteur (Wormleaton et Winstanley, 2001). L'hypothèse de la présence d'une boîte TATA reste toutefois à confirmer. Cependant, il est à noter que les promoteurs dépourvus de boîte TATA constituent près de la moitié des promoteurs d'eucaryotes (e.g., approximativement 50% chez la drosophile [Arkhipova, 1995]). Chez les baculovirus, les exemples de ce fait sont ceux des gènes *bro* (Kang *et al.*, 1999), d'*ADN polymérase* (Ohresser *et al.*, 1994) et *lef-1* (Passarelli et Miller, 1993). En absence de l'élément TATA, il peut avoir des régions riches en nucléotides adénine et thymine (AT) pouvant servir de promoteur précoce pour stimuler l'expression, tel qu'observé chez le LdMNPV (Bischoff et Slavicek, 1994).

En absence de boîte TATA, la transcription peut être régulée par d'autres éléments *cis* pouvant réguler potentiellement l'expression du gène *pk-1*, situés à des distances variables en amont du site d'initiation, où se lient les facteurs de transcription (FT). Parmi ceux identifiés dans la séquence du promoteur du gène *pk-1*, il y a le motif GATA (consensus HGATAR) où se lie le FT-GATA, lequel a déjà été identifié dans les insectes lépidoptères (Skeiky et Iatrou, 1991). Le motif GATA a été trouvé dans les promoteurs des gènes baculoviraux *pe-38* (Krappa *et al.*, 1992), *gp64* (Kogan et Blissard, 1994), *ORF 891* (Bah *et al.*, 1999) et *bro* (Kang *et al.*, 1999). Le motif de la boîte E dont la séquence consensus est CAnnTG (Kadesch, 1993) est requis pour l'activité transcriptionnelle indépendante de TATA pour le promoteur précoce du gène *gp64 esp* du OpMNPV (Kogan, Chen et Blissard, 1995). La boîte CCAAT (consensus GGCCAATCT)

peut servir d' « enhancer » (Ogbourne et Antalis, 1998). Leur fréquence d'apparition est relativement élevée pour les promoteurs dépourvus de TATA, particulièrement dans l'orientation inverse (Mantovani, 1998). L'élément GAAC a été démontré qu'elle pouvait contrôler la vitesse de l'expression du gène *hgl5* ainsi que la vitesse d'initiation de la transcription (Singh et Roger, 1998). La présence de courtes régions riches en GC (boîte d'enhancer GC avec consensus GGGCGG) fait augmenter la force du promoteur. À l'intérieur de la boîte GC, il peut avoir des bases A ou T (Dickson et Friesen, 1991). De multiples répétitions de la boîte GC (effet quantitatif) ont été découvertes dans plusieurs promoteurs d'espèces différentes, incluant AcMNPV (Hapgood, Riedmann et Scherer, 2001; Dickson et Friesen, 1991). Le motif CAGA est reconnu par le facteur de transcription eucaryotique CTC (Tasheva, Conrad et Conrad, 2000). Finalement, l'élément enhancer avec la séquence consensus A(A/T)CGT(G/T) contenant le motif CGT (Ayres *et al.*, 1994) a été identifié en amont de plusieurs gènes précoces du AcMNPV (Dickson et Friesen, 1991). La présence de tous ces éléments suggère que l'expression du gène *pk-1* serait fortement régulée.

Ce n'est pas inhabituel pour plusieurs de ces motifs régulateurs de se retrouver très en amont du codon initiateur ATG, comme c'est le cas du promoteur du gène *pk-1* du ChfuGV. En effet, le promoteur peut être divisé en trois parties : distal, proximal et basal (Werner, 1999). Le promoteur distal peut monter souvent jusqu'à 1 kb de distance en amont du codon d'initiation et peut contenir des éléments « enhancer ». Le promoteur proximal est situé 200-300 nt en amont du codon initiateur et contient les éléments reconnus par les facteurs de transcription. La région basale du promoteur peut se retrouver dans une distance d'environ 100 nt et comprend la boîte TATA, s'il y a lieu et le site d'initiation de la transcription. Le promoteur distal du gène *pk-1* du ChfuGV se superpose avec l'ORF adjacent de *granuline*, situé à 358 nt en amont du codon d'initiation. Cette superposition n'est pas rare puisqu'il a déjà été observé que le gène *lef-11* du AcMNPV pouvait se superposer avec les ORF en amont (*orf38*) et en aval (*pp31*) de ce dernier, mettant en évidence que le promoteur aussi du gène *lef-11* est superposé avec l'ORF en amont (Lin, Slack et Blissard, 2001). De plus, il a été observé qu'une boîte TATA a été localisée dans la région codante de l'ORF en amont du gène *ie-1* du SeMNPV (Van Strien *et al.*, 2000).

4.1.2. Caractérisation de la séquence déduite PK-1 du ChfuGV

En général, la composition en résidus des séquences déduites PK-1 baculovirales semble être conservée (Tableau 2). Ainsi, les protéines PK-1 pourraient partager des similarités morphologiques. Quant aux valeurs des points isoélectriques, elles semblent diviser les baculovirus en deux catégories, peut-être avec des fonctions différentes. Les tailles des protéines PK-1 sont similaires et cohérentes à la longueur habituelle estimée pour les domaines catalytiques des kinases, soit autour de 30 kDa (Hanks et Hunter, 1995). Les protéines PK-1 baculovirales ne possèdent pas de domaine transmembranaire et elles ne seraient surtout pas des kinases de type récepteur. Elles seraient plutôt des protéines solubles, globulaires pouvant se localiser partout dans la cellule. Puisque les protéines kinases du AcMNPV et du LdMNPV ne sont constituées que du domaine catalytique, il a été proposé que le domaine régulateur, lequel est nécessaire pour réguler l'inactivation du domaine catalytique (sinon il reste actif constitutivement), serait codé par un autre gène baculoviral (Bischoff et Slavicek, 1994). Le domaine catalytique peut parfois aussi être auto-inhibiteur (Soderling, 1990).

La séquence déduite en acides aminés du gène *pk-1* a été analysée afin d'identifier les régions où des modifications post-traductionnelles seraient possibles (Figure 9). Par exemple, les différents sites de phosphorylation suggèrent que la protéine PK-1 serait une phosphoprotéine impliquée dans une cascade de signalisation (Taylor *et al.*, 1993). La sulfatation de la tyrosine est une modification qui permet des interactions protéines-protéines (Kehoe et Bertozzi, 2000). La modification de N-glycosylation est importante pour le repliement correct d'une protéine ou pour le ciblage de certains polypeptides (Davey 1989). La modification potentielle de N-myristoylation, considérée comme un point d'ancrage covalent lipidique, est observée dans les protéines virales et d'eucaryotes (Maurer-Stroh, Eisenhaber et Eisenhaber, 2002). Elle servirait pour faciliter une interaction avec les membranes (Boutin, 1997). Peut-être qu'une telle interaction permettrait à la protéine kinase de se mettre en contact avec le substrat ou avec une autre molécule permettant son activation.

Les profils d'hydrophobicité de type Kyte-Doolittle (1982) pour l'ensemble des protéines PK-1 baculovirales ressemblent à celui de la protéine PK-1 du ChfuGV (Figure 10). Les profils des

GV ressemblent davantage par rapport aux NPV. La conformation globale de ces protéines serait probablement conservée suggérant la reconnaissance d'un substrat de même nature.

L'étude phylogénétique de la protéine PK-1 du ChfuGV a débuté par l'analyse BLAST-protéine. Les résultats de BLAST-protéine (NCBI) démontrent que la protéine déduite PK-1 du ChfuGV est homologue aux séquences des protéines PK-1 de baculovirus (Tableau 3). Cette homologie est plus élevée par rapport aux GV que par rapport aux NPV. Il semble logique que la séquence PK-1 du ChfuGV soit plus rapprochée d'abord des séquences des GV et ensuite de celles des NPV, puisque la différence phylogénétique des deux genres est bien établie (Rohrmann, 1999; Winstanley et O'Reilly, 1999). Il est possible aussi que la protéine PK-1 ait une fonction différente chez les GV que chez les NPV.

Les pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences d'acides des protéines kinases baculovirales ont été compilés (Tableau 4). Certains NPV (soit OpMNPV, AfNPV, BmNPV, AcMNPV, AgNPV et EppoNPV) sont beaucoup plus apparentés entre eux que les GV, peut-être parce qu'ils se sont divergés plus récemment. Les protéines PK-1 se différencient en général entre les baculovirus, puisque les valeurs de similarité/identité sont fortement inférieures par rapport à celles observées lors de la comparaison des protéines granulines et polyédrines, lesquelles sont connues d'être génétiquement et sérologiquement rapprochées (Crook, 1991). En effet, les pourcentages d'homologie pour les protéines d'inclusion sont situées autour de 81-95% de similarités et 90-98% d'identités (Bideshi, Bigot et Federici, 2000). De plus, il y a une plus grande homologie entre la protéine polyédrine du AcMNPV et les protéines granulines de divers granulovirus, avec des valeurs d'identité entre 47% et 56% (Bideshi, Bigot et Federici, 2000). Les pourcentages d'identité entre les protéines déduites PK-1 de NPV sont exactement équivalents à ceux des protéines d'ADN polymérases de NPV (Huang et Levin, 2001). Les protéines PK-1 et d'ADN polymérases seraient donc sujettes à des mutations à travers l'évolution (distances évolutives inégales), davantage que les protéines d'inclusion, et ce peut-être dû au hasard ou pour s'adapter continuellement au milieu cellulaire.

L'alignement multiple de toutes les séquences d'acides aminés de protéines kinases baculovirales indique tous les résidus hautement et faiblement conservés (Figure 11). La

présence des sous-domaines catalytiques dans le domaine catalytique de la protéine PK-1 du AcMNPV et du LdMNPV, impliqués dans l'activité enzymatique des kinases, a déjà été signalée (Reilly et Guarino, 1994; Bischoff et Slavicek, 1994). Les mêmes sous-domaines catalytiques I à XI du AcMNPV et du LdMNPV sont présents vis-à-vis ceux des autres séquences PK-1 baculovirales, incluant ChfuGV. Leur présence impliquerait probablement que les autres gènes *pk-1* baculoviraux, incluant celui du ChfuGV coderaient potentiellement pour des protéines kinases actives. Dans la séquence de la protéine PK-1 du ChfuGV, le sous-domaine I, impliqué dans la liaison de l'ATP (Bossemeyer, 1994; Grant et Adams, 1996; Hemmer *et al.*, 1997; Narayana *et al.*, 1997), est partiellement présent. Cette variabilité est observée aussi dans d'autres protéines kinases (Russell et Nurse, 1987; Baylis *et al.*, 1993). Le sous-domaine II interagit avec les α - β -phosphates du Mg^{2+} ATP afin de les positionner (Taylor *et al.*, 1993). Le sous-domaine III stabilise les interactions ioniques entre l'ATP et le sous-domaine II. Le sous-domaine IV est aussi présent, mais son rôle n'est pas défini. Le sous-domaine V représente le site de catalyse. Le sous-domaine VI active l'arrivée du substrat hydroxyle (Johnson, Noble et Owen, 1996; Lowe *et al.*, 1997; Zhou et Adams, 1997) et représente un motif spécifique aux kinases de type Ser/Thr. Le sous-domaine VII positionne le Mg^{2+} de l'ATP (Zheng *et al.*, 1993; Herberg *et al.*, 1999). Le sous-domaine VIII reconnaît le substrat peptidique et est un deuxième indicateur de la spécificité Ser/Thr. Le sous-domaine IX catalytique contribue au positionnement de la boucle catalytique. Les sous-domaines X et XI sont aussi présents. Les résidus conservés dans les séquences des protéines PK-1 déduites, situés à l'extérieur des sous-domaines catalytiques, seraient responsables d'une conformation commune ou seraient impliqués dans la spécificité fonctionnelle.

L'arbre phylogénétique, dérivé de l'alignement multiple précédent, indique clairement la dichotomie des protéines PK-1 des deux genres NPV et GV, tel que prévu (Figure 12). En effet, d'autres arbres phylogénétiques construits à partir des séquences de protéines kinases de baculovirus illustrent ce fait (Taha *et al.*, 2000; Wormleaton et Winstanley, 2001). Selon Taha *et al.*, (2000), le niveau faible d'homologie entre les séquences kinases du prototype AcMNPV et des granulovirus PoGV et SpliGV, indiquerait que les protéines seraient de nature différente et rempliraient des fonctions différentes.

L'arbre phylogénétique ne possède pas de racine. Ceci est important lors de la construction car l'origine exacte d'apparition des baculovirus (ancêtre commun) n'est pas connue. Plusieurs techniques de construction d'arbres peuvent être utilisées. Il faut mentionner qu'aucune méthode pour analyser l'évolution n'est parfaite et donc le résultat d'analyse peut être considéré fiable que si le même est obtenu par plusieurs méthodes (Iwabe *et al.*, 1991; Klenk et Zillig, 1994).

La subdivision à l'intérieur des baculovirus devrait répondre à trois critères : séparer les genres NPV des GV, distinguer les groupes I et II au niveau des NPV et révéler la relation entre les espèces à l'intérieur des NPV du groupe I (Bulach *et al.*, 1999, Zanotto, Kessing et Maruniak, 1993; Herniou *et al.*, 2001). Sur la figure 12, l'arbre répond au premier critère. Quant à la subdivision à l'intérieur des NPV, il y a effectivement les divisions entre les groupes I et II des NPV. Ainsi, le groupe I serait composé des membres OpMNPV, BmNPV, AcMNPV, EppoNPV, AfNPV et AgNPV, tel que prévu. Le groupe I serait composé de membres moins divergents entre eux, aussi révélé par des valeurs bootstrap très élevées (Zanotto, Kessing et Maruniak, 1993). Le groupe II, un peu plus divergent contient les branches attendues des baculovirus HaNPV, SeNPV, SINPV, McNPV et LdMNPV. La majorité de ces regroupements ont également été observés par Taha *et al.* (2000) et par Wormleaton et Winstanley (2001) pour des séquences de protéines kinases. La relation entre les espèces à l'intérieur des NPV du groupe I est aussi respectée. En effet, AcMNPV est le plus homologue à BmNPV et OpMNPV se rapproche le plus à AgNPV.

La subdivision entre les GV a été décrite seulement par Wormleaton et Winstanley (2001). Selon ces auteurs, AoGV et CpGV seraient le plus rapprochés formant un groupe à part des autres GV, soit XcGV, LoGV et PxGV. Ces regroupements sont respectés aussi puisque ChfuGV se rapproche le plus à AoGV, à CpGV, mais surtout à PoGV. La résolution est moins prononcée par les valeurs bootstrap faibles à l'intérieur de ces GV due à un faible nombre de séquences disponibles pour la comparaison. Les autres branches à part regroupent XcGV et PxGV, avec plus de confiance, soit les virus qui attaquent la famille *Noctuidae* des Lépidoptères, tout comme le baculovirus AcMNPV. Tous les autres GV de l'arbre infectent la famille *Tortricidae*. Ces branches distinguent les granulovirus par leur vitesse d'attaque et les tissus ciblés (lente pour

XcGV et rapide pour CpGV). Cette classification, selon Federici (1997), n'est pas absolue, car la vitesse d'attaque du AoGV est lente mais ce dernier se rapproche du CpGV (Wormleaton et Winstanley, 2001).

Il est préférable de réaliser des analyses phylogénétiques basées sur des séquences d'acides aminés plutôt que nucléotidiques à cause du code génétique dégénéré. Le rapport signal/bruit de fond est plus approprié pour analyser les gènes de familles (Agosti, Jacobs et DeSalle, 1996). De plus, il semblerait avoir une variation significative quant à l'usage de codons génétiques pour des gènes homologues chez les NPV, incluant les gènes *pk-1* (Levin et Whittome, 2000).

Les positions des branches de l'arbre peuvent être modifiées à cause des réarrangements génomiques fréquents (duplications, transferts horizontaux, pertes de gènes et autres sources d'hétérogénéité génétique) durant l'évolution dû à la nature fluide des génomes baculoviraux. En effet, les baculovirus subissent des transferts horizontaux avec les cellules qu'ils infectent ou avec d'autres baculovirus lorsqu'il y a co-infection dans une même cellule (Wang, Fraser et Cary, 1989). Ces modifications peuvent être régulées entre autres par le spectre d'hôte, la vitesse d'attaque ou le tropisme tissulaire, tout pour répondre aux besoins biologiques d'expansion et de survie du baculovirus. Pour étudier l'évolution d'un organisme, l'évaluation phylogénétique devrait idéalement considérer un plus grand nombre de marqueurs, car la nature unique et l'évolution indépendante (pression de sélection/rythme d'évolution variable) de chaque gène (ou protéine) prédit une phylogénie variable (Federici et Hice, 1997), d'où la faiblesse de réaliser des analyses comparatives basées sur un seul gène ou une seule protéine (Cao *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1998; Zardoya et Meyer 1996). Confirmé à nouveau par Herniou *et al.*, (2001), l'évaluation la plus valide de la phylogénie baculovirale est basée sur la comparaison des séquences de plusieurs gènes (et les séquences d'acides aminés déduites) en commun à travers les génomes. Dans le cadre de ce projet, l'arbre phylogénétique de la figure 12 représente une phylogénie d'une seule protéine et non pas de génome entier. À l'avenir, les différents gènes (ou protéines) du ChfuGV pourront être regroupés pour une analyse globale de l'organisme afin de permettre une meilleure estimation phylogénétique.

La plupart des analyses phylogénétiques antérieures sur les baculovirus portaient sur les gènes des protéines d'inclusion (granuline/polyédrine). Ce choix était dû au fait du statut unique de ce gène chez les baculovirus (analyse « ingroup ») et parce qu'il correspondait au gène le plus séquencé chez les baculovirus. Il a été suggéré que ce type d'analyse peut être imprécise (Bulach *et al.*, 1999; Cowan *et al.*, 1994; Zanutto, Kessing et Maruniak, 1993; Federici et Hice, 1997). Par conséquent, certains auteurs ont pensé qu'il était préférable d'utiliser la séquence de la protéine d'ADN polymérase (Pellock *et al.*, 1996; Bulach *et al.*, 1999) ou parfois celle de l'EGT (Barrett, Krell et Arif, 1995). Étant donné la nature universelle de l'ADN polymérase (i.e. évolution non-restreinte à celle des baculovirus), l'excès de 3000 nucléotides codants et les sites conservés à l'intérieur de la séquence d'acides aminés, l'analyse serait idéale pour résoudre les branches profondes des liens taxonomiques (Pellock *et al.*, 1996). Parallèlement, la séquence d'acides aminés d'une protéine kinase (i.e. PK-1 du ChfuvGV) est universelle et pourrait aussi offrir une meilleure estimation pour l'alignement correct par la présence des sous-domaines catalytiques (servant de points de repère et non basé sur des artefacts). Toutefois, chez les baculovirus, elle reste une séquence relativement courte (~275 aa), dans le même ordre de grandeur que les protéines d'inclusion (245-50 aa).

La suite de l'analyse phylogénétique de la protéine PK-1 du ChfuvGV a permis de prédire une fonction potentielle dans la cellule. Cette piste est basée sur les résultats BLAST-protéine (Tableau 3) qui ont révélé que la protéine PK-1 du ChfuvGV est homologue aussi à d'autres protéines kinases appartenant à une nouvelle sous-famille de kinases appelée DAPk (« death-associated protein kinase »), associées à l'apoptose. Parmi les protéines DAPk homologues à la protéine PK-1 du ChfuvGV, il y a les membres DAP-kinase (le prototype de cette sous-famille) (Shohat *et al.*, 2002), DRP-1/DAP-kinase2 (« death associated pk related protein1/death associated pk2 ») (Inbal *et al.*, 2002), Dlk/ZIP (« DAP-like kinase/Zipper Interacting Protein kinase ») (Kogel *et al.*, 2003) et DRAK1/DRAK2 (« Dap-kinase-related-apoptosis-inducing pk »)-1, -2 (aussi appelées Ser/Thr kinase-17a et 17b) (Sanjo, Kawai et Akira, 1998). La nouvelle sous-famille est composée de kinases de type Ser/Thr, régulées par Ca^{2+} /calmoduline (Valentza *et al.*, 2001). Les DAPk sont généralement pro-apoptotiques, lorsque surexprimées dans les cellules en culture (Cohen et Kimchi, 2001; Pelled *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2002; Kogel,

Prehn et Scheidtmann, 2001; Yamamoto *et al.*, 2002). Une seule DAPk anti-apoptotique a été rapportée jusqu'à présent (Jin *et al.*, 2001).

Une première comparaison de la protéine PK-1 du ChfuGV par rapport aux protéines DAPk est celle des profils d'hydrophobicité. La comparaison des profils d'hydrophobicité de ces deux types de protéines révèle que leurs domaines catalytiques sont fortement conservés (Figure 13). Il n'y a pas plus de différences majeures que lors de la comparaison avec les GV ou les NPV. Ainsi, les résultats de la figure 13 indiquent que la conformation du domaine catalytique de la protéine PK-1 serait similaire à celle des protéines DAPk. De plus, le domaine catalytique des protéines DAPk est presque identique pour tous les membres suggérant la phosphorylation d'un substrat commun, lequel n'a pas été encore découvert (Valentza, Schumacher et Watterson, 2002).

L'alignement multiple de la protéine PK-1 du ChfuGV avec les différentes séquences DAPk (Figure 14) montre le partage de plusieurs résidus, hautement conservés chez les DAPk (Inbal *et al.*, 2000), soit l'équivalent de 181 résidus sur un total de 277 (Tableau 5). Le fait que les domaines catalytiques des protéines kinases PK-1 et DAPk soient très similaires favorise l'hypothèse que la protéine PK-1 du ChfuGV serait aussi associée à l'apoptose. Pour la plupart des résidus qui ne sont pas identiques, il y a partage d'une similarité chimique. Certains résidus ont déjà été associés à des fonctions spécifiques selon le modèle structural DAPk. Par exemple, les résidus serine et glutamate, remplacés par des résidus hydrophiles/polaires dans la protéine PK-1, sont à proximité du site de phosphorylation du substrat. Une boucle basique unique à la sous-famille DAPk à la surface du domaine N-terminal (partiellement présente dans la séquence PK-1) serait potentiellement importante pour sa fonction. La boucle basique pourrait aussi correspondre à un site d'interaction avec une autre protéine de régulation ou un site d'interaction avec un autre domaine de la protéine DAPk elle-même (Kimchi, 2001). Le résidu méthionine, unique aux DAPk et impliqué dans la liaison de l'ATP, est remplacé par un résidu hydrophobe. Une 2^{ème} région unique aux DAPk (partiellement présente dans la séquence PK-1) serait impliquée dans la reconnaissance de(s) substrat(s). Il est suggéré par des analyses mutationnelles que la fonction de DAPk dépendait du domaine catalytique de kinase (Raveh et Kimchi, 2001;

Cohen, Feinstein et Kimchi, 1997; Cohen *et al.*, 1999; Raveh *et al.*, 2001; Van Eldik, 2002). Bien qu'une meilleure compréhension du domaine catalytique soit nécessaire pour déterminer le mode d'action et de régulation des DAPk, le partage de ces résidus suggère qu'il y a partage de fonction cellulaire.

Exprimées de façon ubiquiste dans divers tissus, les protéines DAPk sont conservées chez les vertébrés et *C. elegans* (Shohat *et al.*, 2001). Aucune protéine DAPk n'a été isolée chez les baculovirus ou chez les insectes en général. Cependant, chez la drosophile, il semblerait avoir une kinase candidate de type DAPk impliquée dans l'apoptose (Piao *et al.*, 2001). De plus, lors de l'analyse de l'expression des cellules d'insectes BmN infectées par le baculovirus BmNPV, Okano *et al.*, (2001) ont découvert, qu'il y avait une augmentation de l'expression d'un gène homologue à *DAP-1*, aussi appartenant à la sous-famille DAPk (Levy-Strumpf et Kimchi, 1998). Si la protéine PK-1 est rapprochée à la sous-famille DAPk, elle pourrait probablement agir au niveau de la mitochondrie. En effet, certains membres DAPk pro-apoptotiques peuvent déclencher la dépolarisation membranaire de la mitochondrie menant à la sortie du cytochrome *c*, une composante de la chaîne de transfert d'électrons (Kogel *et al.*, 2003). Lorsque le cytochrome *c* est relâché de la mitochondrie, il peut avoir arrêt du transfert d'électrons et par conséquent, arrêt du maintien du potentiel de la membrane mitochondriale, arrêt de la synthèse d'ATP et une augmentation des espèces réactives d'oxygène. De plus, il a été suggéré que le cytochrome *c* activerait les caspases dans la cascade de signalisation apoptotique provoquée par le NO (oxide nitrique) (Chung *et al.*, 2001). L'effet contraire est exercé par l'unique DAPk anti-apoptotique, qui a comme effet d'inhiber la sortie du cytochrome *c* de la mitochondrie en plus d'inhiber les activités de certaines caspases. Pour les cellules d'insectes IPLB-LDFB, durant l'apoptose, le cytochrome *c* est relâché de la mitochondrie au cytosol et ceci est mené via des protéines kinases, entre autres par la PKA et d'autres kinases non-identifiées (Ottaviani et Malagoli, 2002). Selon les mêmes auteurs, il y aurait une interaction possible avec les protéines kinases et le cytochrome *c*. Il n'y a toutefois pas de processus apoptotique observé, mais il a été suggéré que ce serait dû à un manque d'ATP (Ottaviani et Malagoli, 2002). Une autre protéine associée à l'apoptose, cette fois-ci la protéine baculovirale P35, exerce l'effet opposé en inhibant la sortie du cytochrome *c* de la mitochondrie des cellules exposées aux oxydants (Sahdev *et al.*, 2003).

L'apoptose a toujours été considérée comme un moyen de protection anti-virale de l'insecte, pour limiter la propagation baculovirale et l'infectivité (Clem et Miller, 1993; Clem et Miller, 1994). Les baculovirus codent pour deux protéines anti-apoptotiques, soit P35 et IAP (O'Brien, 1998), inhibant, directement ou indirectement, les voies apoptotiques des caspases, enzymes-clés effectrices conservées dans la mort cellulaire (Clem, Fecheimer et Miller, 1991; Kamita, Majima et Maeda, 1993; Teodoro et Branton, 1997; Hawkins *et al.*, 1998). En effet, les baculovirus avec des gènes anti-apoptotiques défectueux sont incapables de produire suffisamment de particules virales (Clem, Robson et Miller, 1994). À l'inverse, des protéines anti-apoptotiques des cellules hôtes, telles que BmN, *Trichopusia ni* et *Spodoptera frugiperda* (Seshagiri *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Okano *et al.*, 2001) peuvent aussi inhiber l'apoptose, induite peut-être par le baculovirus.

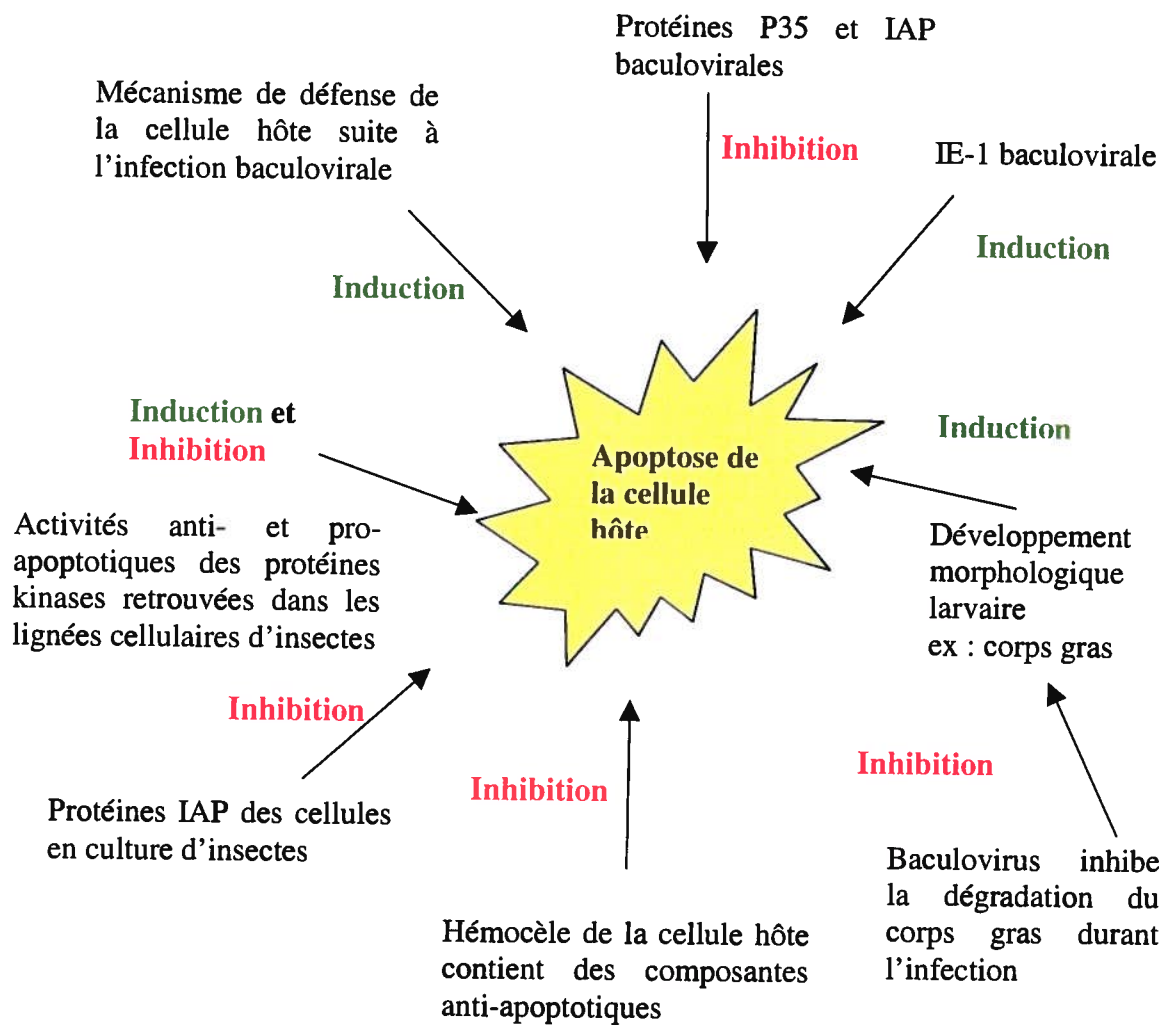
Quant au rôle potentiel pro-apoptotique de la protéine PK-1 du ChfuvGV, il faut faire mention que l'induction de l'apoptose par les baculovirus est un phénomène peu documenté. L'expression transitoire du facteur de transcription baculoviral IE-1 suffit pour induire directement l'apoptose dans les cellules en culture d'insectes SF-21 transfectées (Lu et Miller, 1995; Prikhod'ko et Miller, 1996). Pour la cellule, l'effet morphologique de l'apoptose est classique, c'est-à-dire représenté par une dégradation de l'ADN en oligonucléotides, une condensation de la chromatine dans le noyau, un boursoufflement de la membrane plasmique (*blebbing*), une lyse prématurée de la cellule et la formation de corps apoptotiques (Hale *et al.*, 1996). De plus, les baculovirus sont capables de se répliquer efficacement dans les phases initiales de l'apoptose, lorsque les fonctions cellulaires normales sont abolies (Kamita, Majima et Maeda, 1993). L'induction de l'apoptose suggère un rôle important pour permettre une réplication efficace du virus. L'apoptose est spécifique au tissu et à l'espèce, ce qui peut altérer l'infectivité virale et le spectre d'hôte (Clem et Miller, 1993; Clem, Robson et Miller, 1994). Le mécanisme employé reste énigmatique, mais cette induction peut être inhibée par les protéines P35 et IAP (Prikhod'ko et Miller, 1996) dans les phases tardives de l'infection et lorsqu'en quantité suffisante (Clem, Fecheimer et Miller, 1991; Clem et Miller, 1993; LaCount et Friesen, 1997). Les baculovirus peuvent induire l'apoptose indirectement en dérégulant les processus de transcription et traduction cellulaire de l'hôte dans les phases tardives (Clem et Miller, 1994; Prikhod'ko et Miller, 1996; Miller, 1997). L'apoptose est aussi induite par différents stimuli tel

que par la synthèse de l'ADN viral et par l'expression des gènes tardifs viraux (Du et Thiem, 1997), et possiblement, d'autres facteurs spécifiques à la cellule seraient impliqués dans l'amorce de l'apoptose (Clem, Fecheimer et Miller, 1991; LaCount et Friesen, 1997; Ishikawa *et al.*, 2003).

De plus en plus, il est suggéré que la phosphorylation serait impliquée dans la régulation positive ou négative des voies de l'apoptose (Anderson, 1997) et la somme finale de ces signaux détermine la décision de survie ou de mort. Il n'y a pas d'hypothèse unique quant au rôle de la phosphorylation dans l'apoptose. Cependant, la complexité des voies de régulation et l'abondance des protéines kinases et phosphatases suggèrent que la phosphorylation protéique pourrait jouer de multiples rôles directs ou indirects dans le contrôle de la mort cellulaire (Gjertsen et Doskeland, 1995; Fladmark *et al.*, 1999). Ceci est un phénomène observé même chez la drosophile (Li *et al.*, 2002b).

L'induction ou la répression de l'apoptose est observée tant chez le baculovirus que chez la cellule hôte infectée, indiquant une interaction antagonistique de base. Durant les années de coexistence, le virus a visé de profiter de façon maximale la machinerie répliquative de l'hôte et de manipuler le mécanisme de contrôle immunitaire de l'hôte alors que ce dernier a tenté de minimiser le coût de l'infection. Les diverses voies apoptotiques où pourrait agir la protéine PK-1 sont schématisées sur la figure 18, mais ce n'est qu'un aperçu de ces interactions dynamiques. Par exemple, il a été observé que l'hémolymph de l'insecte hôte (ver à soie) qui contient des composantes anti-apoptotiques qui peuvent inhiber l'apoptose induite par l'infection baculovirale (Rhee et Park, 2000; Rhee, Kim et Park, 2002). L'induction de l'apoptose par les baculovirus pourrait avoir lieu pour éliminer une population spécifique de cellules ou pour faciliter la dissémination virale. Ainsi, les baculovirus pourraient éliminer les composantes cellulaires causant la dégradation du corps gras et empêchant le phénomène naturel de la métamorphose chez les insectes holométaboliques (Iwanaga *et al.*, 2000). Finalement, des protéines kinases identifiées dans la lignée cellulaire IPLB-LdFB de l'insecte *Lymantria dispar*, semblent avoir des effets à la fois pro-(PKA) et anti-apoptose (PKB, PKC) (Malagoli, Conte et

Figure 18 Voies d'inhibition et d'induction de l'apoptose dans la cellule hôte Schéma démontrant les nombreuses voies d'induction et d'inhibition de l'apoptose régulées par les diverses interactions entre la cellule hôte et le baculovirus



Ottaviani, 2002). La protéine PK-1 du ChfuGV pourrait potentiellement agir dans les mêmes voies apoptotiques que ces protéines kinases.

L'induction de l'apoptose par les baculovirus est un sujet peu exploré. Des expériences, particulièrement menées *in vivo*, permettront d'élucider adéquatement les protéines responsables dans les processus d'apoptose. Cependant, il existe toujours la possibilité que la protéine PK-1 du ChfuGV ait toute une autre fonction cellulaire.

4.2. Analyse transcriptionnelle de *pk-1* du ChfuGV

La cinétique de l'infection virale du ChfuGV n'est pas parfaitement connue. Le cycle viral du prototype AcMNPV peut durer jusqu'à 72 heures (Pham et Sivasubramanian, 1992). L'infection par un granulovirus peut s'étendre jusqu'à 7 à 14 jours, avant la mort de la cellule hôte. Cependant, l'attaque des granulovirus peut parfois se rapprocher à celle des NPV. En effet, le granulovirus de *Epivotta aporema* (EpapGV) cause une infection polyorganotrophique à l'hôte appartenant aux *Tortricidae* et produit des virions inclus (OV) à 72 h.p.i., tel que révélé par immunohistochimie (Goldberg *et al.*, 2002). Les transcrits du gène *granuline* seraient présents même plus tôt. Les larves infectées par EpapGV étaient vivantes et continuaient à se nourrir bien que le cycle viral était déjà terminé (Goldberg *et al.*, 2002). Si alors le gène *pk-1* du ChfuGV suit une cinétique semblable, alors la présence de son transcrit entre 2 h.p.i. et 72 h.p.i., démontre qu'il s'exprime du début jusqu'à la fin du cycle, tel que révélé par la réaction de RT-PCR (Figure 15). Le gène peut ainsi être caractérisé comme étant précoce et tardif/très tardif. Ces résultats concordent avec ceux de la figure 8, par la présence des motifs de promoteurs précoce et tardif. D'autres gènes baculoviraux sont exprimés dans plus d'une phase d'expression et possèdent en tandem les deux motifs de promoteurs, tels que *gp64*, *pp31* et *egt* (Blissard et Rohrmann, 1989; Guarino et Smith, 1990; Chen *et al.*, 1997). L'expression du gène *pk-1* du ChfuGV suit une cinétique similaire à celle du LdMNPV, plutôt que celle du AcMNPV, puisque les deux sont exprimés au début et à la fin de l'infection virale.

Le profil transcriptionnel du gène *pk-1*, révélé par hybridation Northern (Figure 16), semble être régulé puisqu'il y a présence de trois transcrits. En effet, la présence de plus d'un transcrit

indiquerait qu'il y a soit l'action d'épissage ou d'usage différentiel de sites de polyadénylation (Edwalds-Gilbert, Veraldi et Milcarek, 1997). D'autres gènes baculoviraux sont exprimés en transcrits multiples, incluant l'*opep-2* (Shippam *et al.*, 1997), l'*ADN polymérase* (Liu et Carstens, 1995), l'*ie-1* (Chisholm et Henner, 1988), l'*egt* (Smith et Goodale, 1998) et *p137* (Bideshi *et al.*, 1998).

D'abord, le transcrit du gène *pk-1* qui contient la copie complémentaire du gène entier serait celui de 1,2 kb. Bien qu'aucun transcrit du gène *pk-1* n'a été cartographié, le transcrit de 1,2 kb débiterait probablement au promoteur tardif (puisque c'est à 72 h.p.i.) situé à -63 nt du promoteur basal en amont du codon d'initiation AUG et terminerait au signal poly(A) localisé à la position +139 nt en aval du codon de terminaison TAA (Figure 17).

Ensuite, le transcrit de 0,4 kb correspond à un isoforme tronqué du gène *pk-1*. Il pourrait commencer au niveau du même promoteur tardif en amont du site d'initiation et se terminer en reconnaissant probablement le site de polyadénylation au milieu de la séquence codante, à +322 nt en aval du codon d'initiation (Figure 17). Ce transcrit se traduirait en une protéine tronquée, probablement inactive car seulement les sous-domaines catalytiques I à V relatifs aux protéines kinases seraient présents, permettant la liaison de l'ATP. Un autre cas de protéine kinase tronquée a été rapporté, capable d'inhiber par régulation négative l'activité de la kinase de taille complète (Abraham *et al.*, 1998). Un autre exemple de gène baculoviral exprimé en transcrit tronqué est le gène *hélicase* (Bideshi *et al.*, 1998), mais aucune explication n'a été donnée expliquant sa présence.

Finalement, le transcrit de 2,4 kb est le plus abondant. Par sa grande taille, il contiendrait au moins le transcrit du gène *pk-1*. La possibilité d'épissage n'a pas été considérée *a priori*, puisque le seul exemple connu d'épissage chez les baculovirus correspond à celui du gène *ie-1* (Chisholm et Henner, 1988; Kovacs, Guarino et Summers, 1991). La grande taille s'expliquerait par l'usage d'un site très en amont de la région codante du gène *pk-1* et l'usage d'un site de polyadénylation situé davantage en aval du site de terminaison, situé à environ 500 pb en aval du codon de terminaison (Figure 17). En effet, la taille inclue à la fois les transcrits des gènes *pk-1* et de *granuline*, tel que prouvé par les hybridations spécifiques aux transcrits des gènes *pk-1* et

granuline réalisées sur la même membrane (Figure 16). Le transcrit de 2,4 kb serait donc bicistronique, contenant un transcrit superposé à l'autre. Dans la phase très tardive, il est probable que seulement le transcrit du gène *granuline* serait actif et traduit en protéine, tandis que le transcrit du gène *pk-1* serait dormant ou traduit faiblement. Le phénomène observé, mieux connu sous le nom de superposition transcriptionnelle, est courant chez les baculovirus dans les phases tardives de l'infection (Friesen et Miller, 1985). Plus précisément, les transcrits superposés sont caractérisés par des extrémités 5' communes débutant davantage en amont du site d'initiation à la transcription et s'étendent en aval dépassant les sites polyA en 3' du plus petit transcrit. Elle servirait comme moyen de régulation de l'expression (Mainprize, Lee et Miller, 1986). Il est spéculé que ces transcrits, possédant des extrémités 3' hétérogènes, exercent indirectement un effet de régulation négative sur l'expression des gènes ou la traduction des transcrits en aval par un mécanisme antisens (Friesen et Miller, 1985; Rankin, Ladin et Weaver, 1986). Les transcrits des gènes *pk-1* du AcMNPV et du LdMNPV subissent aussi une superposition transcriptionnelle (Reilly et Guarino, 1994, Slavicek, 1991). Pour le baculovirus LdMNPV, la superposition transcriptionnelle du gène *pk-1* se fait aussi avec le transcrit du gène *polyédrique*. Cependant, pour AcMNPV, ce n'est pas le cas.

L'analyse du profil transcriptionnel du gène *granuline* a révélé un second transcrit d'environ 750 pb, ce qui est accord avec la taille de 747 pb de l'ORF *granuline*. Ce transcrit débiterait à un motif de promoteur tardif TAAG situé à -28 nt en amont du codon d'initiation ATG de *granuline* (Bah *et al.*, 1997) et se terminerait à une position qui ne correspond pas à une séquence polyadénylique, selon Bah *et al.* (1997).

La présence de plusieurs signaux poly(A) dans la séquence du gène *pk-1* favoriserait le deuxième mécanisme de régulation de la transcription, soit l'usage différentiel de sites de polyadénylation (Figure 17), plutôt que l'épissage (Edwards-Gilbert, Veraldi et Milcarek, 1997). Les mêmes auteurs proposent que ce mécanisme existe puisqu'il y a une variation de la machinerie impliquée dans la polyadénylation, selon l'environnement cellulaire et/ou le stade de développement. Ainsi, en faisant l'extraction de l'ARN total, les transcrits de tous les environnements tissulaires sont inclus dans l'analyse.

Il est intéressant toutefois de confirmer que l'épissage n'existe pas pour le gène *pk-1* du ChfuGV. Le programme informatique Neural Network a permis de confirmer que la probabilité d'une présence d'épissage pour les transcrits du gène *pk-1* du ChfuGV n'est que de 0,62 sur 1, ce qui peut être considéré faible. Les contrôles positifs des gènes *ie-1* des baculovirus AcMNPV et LdMNPV ont été vérifiés expérimentalement (Chisholm et Henner, 1988; Pearson et Rohrmann, 1997). Ces gènes baculoviraux sont les seuls connus qui subissent l'épissage, peut-être parce que leurs produits exercent un effet fortement régulateur sur la réplication de l'ADN viral et l'expression des gènes cellulaires et viraux (Kool *et al.*, 1993; Passarelli et Miller, 1993). Les sites d'épissage prédits pour les gènes *ie-1* avaient des probabilités élevées (environ 0,80), ce qui démontre une certaine validité au logiciel. Les probabilités prédites sont faibles (autour de 0,45) pour les gènes de kinases du AcMNPV et du LdMNPV et les expériences antérieures indiquent qu'il n'y a pas d'épissage pour les transcrits de ces gènes (Reilly et Guarino, 1994; Bischoff et Slavicek, 1994).

Conclusion

Suite à la caractérisation moléculaire et transcriptionnelle du gène *pk-1* du ChfuGV, les résultats de ce projet ne supportent pas l'hypothèse que le gène *pk-1* du ChfuGV possède des caractéristiques similaires au gène homologue du AcMNPV. En effet, le gène *pk-1* du ChfuGV possède un degré de similarité peu élevé par rapport au gène *pk-1* du AcMNPV. Parmi les différences, il y a les motifs de promoteurs, la cinétique d'expression, la différence dans la superposition transcriptionnelle et la variation phylogénétique. Le gène *pk-1* du ChfuGV s'approche davantage à celui du LdMNPV parce qu'il partage certains motifs de promoteurs, une même cinétique d'expression et une superposition transcriptionnelle.

Dans ce projet les informations indiquent que le gène *pk-1* du ChfuGV coderait potentiellement pour une protéine kinase active. De plus, l'analyse globale des résultats suggère qu'il y aurait au moins deux sortes de protéines kinases chez les baculovirus possédant probablement des fonctions différentes. Il faudrait, entre autres, étudier davantage les profils transcriptionnels des gènes *pk-1* et la phylogénie baculovirale pour confirmer ces divisions. De plus, la similarité entre la protéine déduite PK-1 du ChfuGV et les protéines pro-apoptotiques DAPk suggère que la protéine PK-1 serait impliquée dans le phénomène de l'apoptose.

La phosphorylation pourrait jouer un rôle important dans l'infection baculovirale, puisque plusieurs protéines sont phosphorylées suite à l'infection baculovirale. Le fait que tous les baculovirus contiennent le gène *pk-1* codant pour une protéine kinase homologue suggère l'importance potentielle de cette protéine dans le cycle d'infection. Pour vérifier ce dernier point, il faudra exprimer la protéine PK-1 du ChfuGV et l'isoler. La protéine pourra servir à vérifier l'activité enzymatique par un essai kinase et à déterminer la nature du substrat phosphorylé. Elle pourra aussi être utilisée pour fabriquer des anticorps dans le but de mener des expériences d'immunobuvardage de type Western et d'immunolocalisation par microscopie électronique. Il sera ainsi possible de suivre son expression, s'il y a lieu, et sa localisation spécifique dans la cellule à travers l'infection. Finalement, l'absence de lignées cellulaires pour la réplication des GV fait que l'étude des gènes de granulovirus portent typiquement sur l'analyse des séquences

nucléotidiques et déduites en acides aminés à l'aide d'outils bioinformatiques. Malgré l'absence de lignée cellulaire, il sera possible d'insérer le gène *pk-1* du ChfuGV dans un vecteur de transfert NPV déficient du gène *pk-1* de NPV et d'étudier l'effet de son expression dans les cellules en culture spécifiques pour les NPV. Il sera ainsi possible de voir si l'effet de la protéine kinase est pro- ou anti-apoptotique ou neutre, lorsque les cellules sont soumises dans un contexte prône à l'apoptose. L'effet apoptotique, s'il y a lieu, pourrait être visualisé par microscopie (coupes histologiques). De plus, il sera possible de faire des analyses mutationnelles pour déterminer les résidus importants dans l'activité enzymatique. De plus, divers inhibiteurs de protéines kinases seraient utilisés afin de localiser où agirait la protéine PK-1 dans l'apoptose, si elle est impliquée dans ce phénomène.

Liste des références

ABRAHAM, N., M. L. Jaramillo, P. I. Duncan, N. Methot, P. L. Icely, D. F. Stojdl, G. N. Barber et J. C. Bell. 1998. « The murine PKR tumor suppressor gene is rearranged in a lymphocytic leukemia ». Experimental Cell Research, vol. 244, p.394-404.

AGOSTI, D., D. Jacobs et R. DeSalle. 1996. « On combining protein sequences and nucleic acid sequences in phylogenetic analysis: the homeobox protein case ». Cladistics, vol. 12, p.65-82.

AHRENS, C. H. et G. F. Rohrmann. 1995. « Identification of essential trans-acting regions required for DNA replication of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: lef-1 is an essential replication gene ». Virology, vol. 207, p.417-28.

AHRENS, C. H., R. L. Russell, C. J. Funk, J. T. Evans, S. H. Harwood et G. F. Rohrmann. 1997. « The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome ». Virology, vol. 229, p.381-399.

ALAIN, R., L. Berthiaume et M. Trudel. 1989. « Microscopie électronique ». In : P. Payment et M. Trudel (éd.). Manuel de techniques virologiques. Sillery, Québec. : Presses de l'Université du Québec, p.107-119.

ALTSCHUL, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers et D. J. Lipman. 1990. « Basic local alignment search tool ». Journal of Molecular Biology, vol. 215, p. 403-410.

ANDERSON, P. 1997. « Kinase cascades regulating entry into apoptosis ». Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 61, p.33-46.

ARIF, B. M., Z. Guangyu et P. Jamieson. 1986. « A comparison of the three granulosis viruses from *Choristoneura* spp ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 48, p.180-186.

ARKHIPOVA, I. R. 1995. « Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis ». Genetics, vol.139, p.1359-1369.

ARNOSTI, D. N. 2003. « Analysis and function of transcriptional regulatory elements: insights from *Drosophila* ». Annual Review in Entomology, vol. 48, p.579-602.

AYRES, M. D., S. C. Howard, J. Kuzio, M. Lopez-Ferber et R. D. Possee. 1994. « The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Virology, vol. 202, p.586-605.

BAH, A., J. Bergeron, M. Arella, C. J. Lucarotti et C. Guertin. 1997. « Identification and sequence analyses of the granulin gene of *Choristoneura fumiferana* granulovirus ». Archives of Virology, vol. 142, p.1577-1584.

- BAH, A., C. J. Lucarotti, M. Arella et C. Guertin. 1999. « *Choristoneura fumiferana* granulovirus: sequence analysis and 5' characterization of ORF891 ». Archives of Virology, vol. 144, p.737-746.
- BAIROCH, A., P. Bucher et K. Hofmann. 1997. « The PROSITE database, its status in 1997 ». Nucleic Acids Research, vol. 25, p.217-221.
- BARRETT, J. W., P. J. Krell et B. M. Arif. 1995. « Characterization, sequencing and phylogeny of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from two distinct nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Choristoneura fumiferana* ». Journal of General Virology, vol. 76, p.2447-2456.
- BAYLIS, S. A., A. H. Banham, S. Vydelingum, L. K. Dixon et G. L. Smith. 1993. « African swine fever virus encodes a serine protein kinase which is packaged into virions ». Journal of Virology, vol. 67, p.4549-4556.
- BEELMAN, C. A. et R. Parker. 1995. « Degradation of mRNA in eukaryotes ». Cell, vol. 81, p.179-183.
- BIDESHI, D. K., R. H. Hice, B. Ge et B. A. Federici. 1998. « Molecular characterization and expression of the *Trichoplusia ni* granulovirus *helicase* gene ». Journal of General Virology, vol. 79, p.1309-1319.
- BIDESHI, D. K., Y. Bigot et B. A. Federici. 2000. « Molecular characterization and phylogenetic analysis of the *Harrisina brillians* granulovirus *granulin* gene ». Archives of Virology, vol.145, p.1933-1945.
- BISCHOFF, D. S., et J. M. Slavicek. 1994. « Identification and characterization of a protein kinase gene in the *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 68, p.1728-1736.
- BLISSARD, G. W., R. L. Quant-Russell, G. F. Rohrmann et G. S. Beaudreau. 1989. « Nucleotide sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gene encoding p39, a major structural protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata* ». Virology, vol.168, p.354-362.
- BLISSARD, G. W. et G. F. Rohrmann. 1989. « Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the *gp64* envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus ». Virology, vol.170, p.537-55.
- BLISSARD, G. W. et G. F. Rohrmann. 1990. « Baculovirus diversity and molecular biology ». Annual Review in Entomology, vol. 35, p.127-55.
- BLISSARD, G. W., P. H. Kogan, R. Wei et G. F. Rohrmann. 1992. « A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription ». Virology, vol.190, p.783-793.

- BLISSARD, G. W. 1996. « Baculovirus-insect cell interactions ». Cytotechnology, vol. 20, p.73-93.
- BONNEAU, G., C. Bordeleau, B. Boulet, M. Chabot, J. G. Daidson, J. Garneau, D. Moranville, P. Therrien. 1999. « La tordeuse des bourgeons de l'épinette : approche de gestion intégrée des épidémies ». Ministère des ressources naturelles. Québec. RN99-3072.
- BOSSEMEYER, D. 1994. « The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element ». Trends in Biochemical Sciences, vol.19, p.201-205.
- BOURASSA, A. 2000. « Caractérisation des gènes *enhancin* et *egt* du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* ». Mémoire de Maîtrise, INRS-IAF, Université du Québec, 99p.
- BRAUNAGEL, S. C. et M. D. Summers. 1994. « *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles ». Virology, vol. 202, p.315-28.
- BRAUNAGEL, S. C., H. He, P. Ramamurthy et M. D. Summers. 1996a. « Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27 ». Virology, vol. 222, p.100-114.
- BRAUNAGEL, S. C., D. M. Elton, H. Ma et M. D. Summers. 1996b. « Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56 ». Virology, vol. 217, p.97-110.
- BOUTIN, J. A. 1997. « Myristoylation ». Cell Signal, vol. 9, p.15-35.
- BULACH, D. M., C. A. Kumar, A. Zaia, B. Liang et D. E. Tribe. 1999. « Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 73, p.59-73.
- CAO, Y., J. Adachi, A. Janke, S. Paabo et M. Hasegawa. 1994. « Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: instability of a tree based on a single gene ». Journal of Molecular Evolution, vol. 39, p.519-527.
- CAO, Y., A. Janke, P. J. Waddell, M. Westerman, O. Takenaka, S. Murata, N. Okada, S. Paabo et M. Hasegawa. 1998. « Conflict among individual mitochondrial proteins in resolving the phylogeny of eutherian orders ». Journal of Molecular Evolution, vol. 47, p.307-322.
- CHANG, M. J. et G. W. Blissard. 1997. « Baculovirus *gp64* gene expression: negative regulation by a minicistron ». Journal of Virology, vol. 71, p.7448-7460.

- CHANG, M. J., J. Kuzio et G. W. Blissard. 1999. « Modulation of translational efficiency by contextual nucleotides flanking a baculovirus initiator AUG codon ». Virology, vol. 259, p.369-383.
- CHARLTON, C. A. et L. E. Volkman. 1993. « Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation ». Virology, vol. 197, p.245-54.
- CHELEY, S., K. S. Kosik, P. Paskevich, S. Bakalis et H. Bayley. 1992. « Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable microtubule-associated protein associated with process formation in Sf9 cells ». Journal of Cell Science, vol.102, p.739-752.
- CHEN, X., Z. Hu, J. A. Jehle, Y. Zhang et J. M. Vlak. 1997. « Analysis of the *ecdysteroid UDP-glucosyltransferase* gene of *Heliothis armigera* single-nucleocapsid baculovirus ». Virus Genes, vol.15, p.219-25.
- CHEN, C. J. et S. M. Thiern. 1997. « Differential infectivity of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus mutants on three permissive cell lines is the result of *lef-7* deletion ». Virology, vol. 227, p. 88-95.
- CHERBAS, L. et P. Cherbas. 1993. « The arthropod initiator: the capsite consensus plays an important role in transcription ». Insect Biochem Mol Biol., vol. 23, p.81-90.
- CHISHOLM, G. E. et D. J. Henner. 1988. « Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *ie-1* gene ». Journal of Virology, vol.62, p.3193-3200.
- CHOI, J. et L. A. Guarino. 1995. « Expression of the IE1 transactivator of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus during viral infection ». Virology, vol. 209, p.99-107.
- CHOMCZYNSKI, P. et N. Sacchi. 1987. « Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction ». Analytical Biochemistry, vol.162, p.156-159.
- CHUNG, H. T., H. O. Pae, B. M. Choi, T. R. Billiar et Y. M. Kim. 2001. « Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 282, p.1075-1079.
- CLEM, R. J., M. Fechheimer et L. K. Miller. 1991. « Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells ». Science, vol. 254, p.1388-1390.
- CLEM, R. J. et L. K. Miller. 1993. « Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus ». Journal of Virology, vol. 67, p.3730-3738.

- CLEM, R. J. et L. K. Miller. 1994. « Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap* ». Molecular Cell Biology, vol.14, p.5212-5222.
- CLEM, R. J., M. Robson et L. K. Miller. 1994. « Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene *p35* and the adjacent gene *p94* ». Journal of Virology, vol. 68, p.6759-6762.
- COHEN, O., E. Feinstein et A. Kimchi. 1997. « DAP-kinase is a Ca^{2+} /calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity ». EMBO Journal, vol. 16, p.998-1008.
- COHEN, O., B. Inbal, J. L. Kissil, T. Raveh, H. Berissi, T. Spivak-Kroizaman, E. Feinstein et A. Kimchi. 1999. « DAP-kinase participates in TNF- α - and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain ». Journal of Cell Biology, vol. 146, p.141-148.
- COHEN, O. et A. Kimchi. 2001. « DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer ». Cell Death and Differentiation, vol. 8, p.6-15.
- CONSIGLI, R. A., D. L. Russel et M. E. Wilson. 1986. « The biochemistry and molecular biology of the granulositis virus that infects *Plodia interpunctella* ». Current Topics in Microbiology and Immunology, vol.131, p.69-101.
- COOKE, C. et J. C. Alwine. 1996. « The cap and the 3' splice site similarly affect polyadenylation efficiency ». Molecular and Cellular Biology, vol. 16, p.2579-8254.
- COOPER, J. A., F. S. Esch, S. S. Taylor et T. Hunter. 1984. « Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosine protein kinases *in vivo* and *in vitro* ». Journal of Biological Chemistry, vol. 259, p. 7835-7841.
- CORPET, F. 1998. « Multiple sequence alignment with hierarchical clustering ». Nucleic Acids Research, vol.16, p.10881-10890.
- COWAN, P., D. Bulach, K. Goodge, A. Robertson et D. E. Tribe. 1994. « Nucleotide sequence of the polyhedrin gene region of *Helicoverpa zea* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: placement of the virus in lepidopteran nuclear polyhedrosis virus group II ». Journal of General Virology, vol. 75, p.3211-3218.
- CROOK, N. E. 1991. « Baculoviridae: Subgroup B: Comparative aspects of granulositis viruses. » In : Kurstak, E. (éd.). Viruses of Invertebrates. p.73-110. New York : Presses Marcel Dekker.
- CROOK, N. E., J. D. James, I. R. L. Smith et D. Winstanley. 1997. « Comprehensive physical map of *Cydia pomonella* granulovirus genome and sequence analysis of the *granulin* gene region ». Journal of General Virology, vol. 78, p.965-974.

- CUNNINGHAM, J. C. 1985. « Biorationals for control of spruce budworms. » In : Sanders, C. J., R. W. Stark, E. J. Mullins et J. Murphey (éd.). Recent Advances in Spruce Budworms Research, p.320-349. Ottawa : Canusa.
- DAVEY, J. 1989. « Sorting out the secretory pathway ». Bioessays, vol.11, p.185-187.
- DICKSON, J. A. et P. D. Friesen. 1991. « Identification of upstream promoter elements mediating early transcription from the 35,000-molecular-weight protein gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 65, p.4006-4016.
- DOBOS, P. et M. A. Cochran. 1980. « Protein synthesis in cells infected by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) : the effect of cytosine arabinoside ». Virology, vol.103, p.446-464.
- DU, X. et S. M. Thiem. 1997. « Responses of insect cells to baculovirus infection: protein synthesis shutdown and apoptosis ». Journal of Virology, vol. 71, p.7866-7872.
- DURANTEL, D., L. Croizier, M. D. Ayres, G. Croizier, R. D. Possee et M. Lopez-Ferber. 1998. « The *pnk/pnl* gene (ORF 86) of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus is a non-essential, immediate early gene ». Journal of General Virology, vol. 79, p.629-637.
- EDWALDS-GILBERT, G., K. L. Veraldi et C. Milcarek. 1997. « Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? ». Nucleic Acids Research, vol. 25, p.2547-2561.
- EDWARDS, M. J., D. W. Severson et H. H. Hagedorn 1998. « Vitelline envelope genes of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* ». Insect Biochemistry and Molecular Biology, vol. 28, p.915-925.
- ELDRIDGE, R., Y. Li et L. K. Miller. 1992. « Characterization of a baculovirus gene encoding a small conotoxinlike polypeptide ». Journal of Virology, vol. 66, p.6563-6571.
- FAN, X., K. Thirunavukkarasu et R. F. Weaver. 1996. « Temperature-sensitive mutations in the protein kinase-1 (*pk-1*) gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus that block very late gene expression ». Virology, vol. 224, p.1-9.
- FAN, X., J. R. McLachlin et R. F. Weaver. 1998. « Identification and characterization of a protein kinase-interacting protein encoded by the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Virology, vol. 240, p.175-182.
- FAULKNER, P. 1981. « Baculovirus. » In : Davidson E. W. (éd.). Pathogenesis of invertebrate microbial diseases, p.5-38. Totowa, New Jersey : Allanheld, Osmun, et Co.

- FEDERICI, B. A. 1997. « Baculovirus pathogenesis. » In : L. K. Miller (éd.). The Baculoviruses, p.33-59. New York. N.Y. : Plenum Press.
- FEDERICI, B. A. et R. H. Hice. 1997. « Organization and molecular characterization of genes in the polyhedrin region of the *Anagrapha falcifera* multinucleocapsid NPV ». Archives of Virology, vol.142, p.333-348.
- FENG, Q., B. M. Arif, S. R. Palli, S. S. Sohi, et A. Retnakaran. 2001. « Molecular modifications of baculoviruses for the control of forest insect pests ». Advances in Virus Research, vol. 57, p.263-290.
- FLADMARK, K. E., O. T. Brustugun, R. Hovland, R. Boe, B. T. Gjertsen, B. Zhivotovsky et S. O. Doskeland. 1999. « Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors ». Cell Death and Differentiation, vol. 6, p.1099-1108.
- FORTÉ, A. J., C. Guertin et J. Cabana. 1999. « Pathogenicity of a granulovirus towards *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera : Tortricidae) ». The Canadian Entomologist, vol. 131, p. 725-727.
- FRIESEN, P. D. et L. K. Miller. 1985. « Temporal regulation of baculovirus RNA: overlapping early and late transcripts ». Journal of Virology, vol. 54, p. 392-400.
- FRIESEN, P. D. 1997. « Regulation of baculovirus early gene expression. » In : L. K. Miller (éd.). The baculoviruses, p.141-166. New York. N.Y. : Plenum Press.
- GARRITY, D. B., M. J. Chang et G. W. Blissard. 1997. « Late promoter selection in the baculovirus *gp64* envelope fusion protein gene ». Virology, vol. 231, p.167-181.
- GAUTHERET, D., O. Poirot, F. Lopez, S. Audic et J. M. Claverie. 1998. « Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering ». Genome Research, vol. 8, p. 524-530.
- GIJZEN, M., P. Roelvink et R. Granados. 1995. « Characterization of viral enhancing activity from *Trichoplusia ni* granulosis virus ». Journal of Invertebrate pathology, vol. 65, p. 289-294.
- GJERTSEN, B. T. et S. O. Doskeland. 1995. « Protein phosphorylation in apoptosis ». Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1269, p.187-199.
- GLASS, D. B., M. R. el-Maghrabi et S. J. Pilgis. 1986. « Synthetic peptides corresponding to the site phosphorylated in 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as substrates of cyclic nucleotide-dependent protein kinases ». Journal Biological Chemistry, vol. 261, p.2987-2993.

- GOH, D. K. 1993. « Identification and immunocharacterization of a 25K structural protein in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) ». Virus Research, vol. 28, p.141-152.
- GOLDBERG, A. V., V. Romanowski, B. A. Federici et A. Sciocco de Cap. 2002. « Effects of the Epap granulovirus on its host, *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 80, p.148-159.
- GOMI, S., K. Kajima et S. Maeda. 1999. « Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ». Journal of General Virology, vol. 80, p.1323-1337.
- GOTO, C., H. Tsutsui, K. Honma, T. Iizuka et T. Nakashima. 1985. « Studies on nuclear polyhedrosis and granulosis viruses of the spotted cutworm, *Xestia c-nigrum* L. (Lepidoptera : Noctuidae) ». Applied Entomology and Zoology, vol. 29, p.102-106.
- GOTO, C., Y. Minobe et T. Iizuka. 1992. « Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigrum* and five other noctuid species ». Journal of General Virology, vol. 73, p.1491-1497.
- GRANADOS, R. R. 1978. « Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus ». Virology, vol. 90, p.170-174.
- GRANADOS, R. R. et K. A. Lawler. 1981. « *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection ». Virology, vol. 108, p. 297-308.
- GRAND, R. J. 1989. « Acylation of viral and eukaryotic proteins ». Biochemistry Journal, vol. 258, p.625-638.
- GRANT, B. D. et J. A. Adam. 1996. « Pre-steady-state kinetic analysis of cAMP-dependent protein kinase using rapid quench flow techniques ». Biochemistry, vol. 35, p. 2022-2029.
- GRAVES, J. D. et E. G. Krebs. 1999. « Protein phosphorylation and signal transduction ». Pharmacology and Therapeutics, vol. 82, p.111-121.
- GRAY, D., J. Régnière et B. Boulet. 1998. « Prédiction de la défoliation par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec. » Centre de foresterie des Laurentides, vol.7, Ministère des Ressources naturelles du Québec.
- GRISDALE, D. G. et G. G. Wilson. 1988. « Guidelines for rearing spruce budworm received from the Forest Pest Management Institute. » Sault-Sainte-Marie. 10 p.
- GUARINO, L. A., Gonzales, M. A. et Summers, M. D. 1986. « Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 60, p. 224-229.

- GUARINO, L. A. et L. D. Summers. 1986. « Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene ». Journal of Virology, vol. 57, p.563-571.
- GUARINO, L. A. 1990. « Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein ». Proc Natl Acad Sci U S A., vol. 87, p. 409-413.
- GUARINO, L. A. et M. Smith. 1990. « Nucleotide sequence and characterization of the 39K gene region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Virology, vol.179, p.1-8.
- GUARINO, L. A. et M. Smith. 1992. « Regulation of delayed-early gene transcription by dual TATA boxes ». Journal of Virology, vol. 66, p. 3733-3739.
- GUARINO, L. A., B. Xu, J. Jin et W. Dong. 1998. « A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells ». Journal of Virology, vol. 72, p.7985-7991.
- GUERTIN, C. 1995. « Étude du potentiel insecticide de certains virus, du *Bacillus thuringiensis* et de certaines substances phagostimulantes contre les insectes défoliants de la forêt ». Ministère des ressources naturelles du Québec. Rapport sur l'avancement des travaux. Projet 10240S.
- HAJÓS, J. P. 2000. The baculovirus infection cycle. In : « Frequency of baculovirus recombination and baculovirus-mediated gene silencing in insects », p.7. Thèse de doctorat en ligne, Budapest, Hongrie, Université Eötvös Loránd. <<http://people.cornell.edu/pages/jph24/Hajos%20Dissertation.pdf>>. Consulté le 17 février 2003.
- HALE, A. J., C. A. Smith, L. C. Sutherland, V. E. Stoneman, V. L. Longthorne, A. C. Culhane et G. T. Williams. 1996. « Apoptosis: molecular regulation of cell death ». European Journal of Biochemistry, vol. 236, p.1-26.
- HANKS, S. K., A. M. Quinn et T. Hunter. 1988. « The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains ». Science, vol. 241, p. 42-52.
- HANKS, S. K. et T. Hunter. 1995. « Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification ». FASEB Journal, vol. 9, p.576-596.
- HAPGOOD, J. P., J. Riedemann et S. D. Scherer. 2001. « Regulation of gene expression by GC-rich DNA *cis*-elements ». Cell Biology International, vol. 25, p.17-31.
- HARTIG, P. C., M. A. Chapman, G. G. Hatch et C. Y. Kawanishi. 1989. « Insect virus: assays for toxic effects and transformation potential in mammalian cells ». Applied Environmental Microbiology, vol. 55, p. 1916-1920.

- HARTIG, P. C., M. C. Cardon et C. Y. Kawanishi. 1991. « Insect virus: assays for viral replication and persistence in mammalian cells ». Journal of Virological Methods, vol. 31, p.335-344.
- HASNAIN, S. E., A. Jain, S. Habib, S. Ghosh, U. Chatterji, A. Ramachandran, P. Das, B. Venkaiah, S. Pandey, B. Liang, A. Ranjan, K. Natarajan et C. A. Azim. 1997. « Involvement of host factors in transcription from baculovirus very late promoters ». Gene, vol.190, p.113-118.
- HAWKINS, C. J., P. G. Ekert, A. G. Uren, S. P. Holmgreen et D. L. Vaux. 1998. « Anti-apoptotic potential of insect cellular and viral IAPs in mammalian cells ». Cell Death and Differentiation, vol. 5, p.569-576.
- HAWTIN, R. E., K. Arnold, M. D. Ayres, P. M. Zanotto, S. C. Howard, G. W. Gooday, L. H. Chappell, P. A. Kitts, L. A. King et R. D. Possee. 1995. « Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome ». Virology, vol. 212, p. 673-685.
- HAYAKAWA, T., R. Ko, K. Okano, S. I. Seong, C. Goto et S. Maeda. 1999. « Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome ». Virology, vol. 262, p. 277-297.
- HAYAKAWA, T., G. F. Rohrmann et Y. Hashimoto. 1999. « Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses ». Virology, vol. 278, p.1-12.
- HEMMER, W., M. McGlone, I. Tsigelny et S. S. Taylor. 1997. « Role of the glycine triad in the ATP-binding site of cAMP-dependent protein kinase ». Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p.16946-16954.
- HENIKOFF, S. et J. G. Henikoff. 1992. « Amino acid substitution matrices from protein blocks ». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 89, p.10915-10919.
- HERBERG, F. W., M. L. Doyle, S. Cox et S. S. Taylor. 1999. « Dissection of the nucleotide and metal-phosphate binding sites in cAMP-dependent protein kinase ». Biochemistry, vol. 38, p.6352-6360.
- HERNIOU, E. A., T. Luque, X. Chen, J. M. Vlak, D. Winstanley, J. S. Cory et D. R. O'Reilly. 2001. « Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny ». Journal of Virology, vol. 75, p. 8117-8126.
- HONG, T., S. C. Braunagel et M. D. Summers. 1994. « Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Virology, vol. 204, p. 210-222.
- HOSTETTER, D. L. et B. Puttler. 1991. « A new broad host spectrum nuclear polyhedrosis virus isolated from a celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby) (Lepidoptera: Noctuidae) ». Environmental Entomology, vol. 20, p.1480-1488.

- HUANG, Q., Q. L. Deveraux, S. Maeda, G. S. Salvesen, H. R. Stennicke, B. D. Hammock et J. C. Reed. 2000. « Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9 ». Proc Natl Acad Sci U S A., vol. 97, p. 1427-1432.
- HUANG, J. et D. B. Levin. 2001. « Identification, transcription and sequence analysis of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus (SpliNPV) *DNA polymerase* gene ». Archives of Virology, vol.146, p.303-326.
- HUNTER, T. 2000. « Signalling—2000 and beyond ». Cell, vol.100, p.112-127.
- IGNOFFO, C. M. 1968. « Specificity of insect viruses ». Bulletin of the Entomological Society of America, vol.14, p. 265-276.
- IJKEL, W. F., E. A. van Strien, J. G. Heldens, R. Broer, D. Zuidema, R. W. Goldbach et J. M. Vlak. 1999. « Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome ». Journal of General Virology, vol. 80, p.3289-3304.
- INBAL, B., G. Shani, O. Cohen, J. L. Kissil et A. Kimchi. 2000. « Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis ». Molecular and Cellular Biology, vol. 20, p.1044-1054.
- INBAL, B., S. Bialik, I. Sabanay, G. Shani et A. Kimchi. 2002. « DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death ». Journal of Cell Biology, vol.157, p. 455-468.
- ISHIKAWA, H., M. Ikeda, K. Yanagimoto, C. A. Alves, Y. Katou, B. A. Lavina-Caoili et M. Kobayashi. 2003. « Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB-Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses ». Journal of General Virology, vol. 84, p.705-714.
- IWABE, N., K. Kuma, H. Kishino, M. Hasegawa et T. Miyata. 1991. « Evolution of RNA polymerases and branching patterns of the three major groups of Archaeobacteria ». Journal of Molecular Evolution, vol. 32, p. 70-78.
- IWANAGA, M., W. K. Kang, M. Kobayashi et S. Maeda. 2000. « Baculovirus infection blocks the progression of fat body degradation during metamorphosis in *Bombyx mori* ». Archives of Virology, vol. 145, p.1763-1771.
- JANG, C. W., C. H. Chen, C. C. Chen, J. Y. Chen, Y. H. Su et R. H. Chen. 2002. « TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase ». Nature Cell Biology, vol. 4, p. 51-58.
- JARVIS, D. L. et A. Jr. Garcia. 1994. « Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein ». Virology, vol. 205, p. 300-313.

- JIN, Y., E. K. Blue, S. Dixon, L. Hou, R. B. Wysolmerski et P. J. Gallagher. 2001. « Identification of a new form of death-associated protein kinase that promotes cell survival ». Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 39667-39678.
- JOHNSON, L. N., M. E. Noble et D. J. Owen. 1996. « Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation ». Cell, vol. 85, p.149-158.
- KADESCH, T. 1993. « Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins ». Cell Growth Differentiation, vol. 4, p. 49-55.
- KAMITA, S. G., K. Majima et S. Maeda. 1993. « Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis ». Journal of Virology, vol. 67, p. 455-463.
- KANG, W., M. Suzuki, E. Zemskov, K. Okano et S. Maeda. 1999. « Characterization of baculovirus repeated open reading frames (bro) in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ». Journal of Virology, vol. 73, p.10339-10345.
- KEHOE, J. W. et C. R. Bertozzi. 2000. « Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions ». Chemistry and Biology, vol. 7, p.R57-R61.
- KELLY, D. C. et T. Lescott. 1984. « Baculovirus replication : phosphorylation of polypeptides synthesized in *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus-infected cells ». Journal of General Virology, vol. 65, p. 1183-1191.
- KIMCHI, A. 2001. « A cell death-promoting kinase ». Nature Structure Biology, vol. 8, p. 824-826.
- KLENK, H. P. et W. Zillig. 1994. « DNA-dependent RNA polymerase subunit B as a tool for phylogenetic reconstructions: branching topology of the archaeal domain ». Journal of Molecular Evolution, vol. 38, p. 420-432.
- KOGAN, P. H. et G. W. Blissard. 1994. « A baculovirus gp64 early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements ». Journal of Virology, vol. 68, p.813-822.
- KOGAN, P. H., X. Chen et G. W. Blissard. 1995. « Overlapping TATA-dependent and TATA-independent early promoter activities in the baculovirus gp64 envelope fusion protein gene ». Journal of Virology, vol. 69, p.1452-1461.
- KOGEL, D., J. H. Prehn et K. H. Scheidtmann. 2001. « The DAP kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game ». Bioessays, vol. 23, p. 352-358.
- KOGEL, D., C. Reimertz, H. Dussmann, P. Mech, K. H. Scheidtmann et J. H. Prehn. 2003. « The death associated protein (DAP) kinase homologue Dlk/ZIP kinase induces p19ARF- and p53-independent apoptosis ». European Journal of Cancer, vol. 39, p. 249-256.

- KOOL, M., J. T. Voeten, R. W. Goldbach, J. Tramper et J. M. Vlak. 1993. « Identification of seven putative origins of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus DNA replication ». Journal of General Virology, vol. 74, p. 2661-2668.
- KOVACS, G. R., L. A. Guarino et M. D. Summers. 1991. « Novel regulatory properties of the IE1 and IE0 transactivators encoded by the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 65, p.5281-5288.
- KOZAK, M. 1986. « Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes ». Cell, vol. 44, p. 283-292.
- KOZAK, M. 1987. « An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs ». Nucleic Acids Research, vol. 15, p.8125-8148.
- KRAPPA, R., A. Behn-Krapa, F. Jahnel, W. Doerfler et D. Knebel-Morsdorf. 1992. « Differential factor binding at the promoter of early baculovirus gene *pe38* during viral infection: GATA motif is recognized by an insect protein ». Journal of Virology, vol. 66, p.3494-3503.
- KUZIO, J., R. Jaques, P. Faulkner. 1989. « Identification of *p74*, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies ». Virology, vol. 173, p.759-763.
- KUZIO, J., M. N. Pearson, S. H. Harwood, C. J. Funk, J. T. Evans, J. M. Slavicek et G. F. Rohrmann. 1999. « Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar* ». Virology, vol. 253, p.17-34.
- KYTE, J. et R. F. Doolittle. 1982. « A simple method for displaying the hydropathic character of a protein ». Journal of Molecular Biology, vol. 157, p.105-132.
- LaCOUNT, D. J. et P. D. Friesen. 1997. « Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses ». Journal of Virology, vol. 71, p.1530-1537.
- LANDOLT, P. 2000. « New chemical attractants for trapping *Lacanobia subjuncta*, *Mamestra configurata*, and *Xestia c-nigrum* (Lepidoptera : Noctuidae) ». Journal of Economic Entomology, vol. 93, p.101-106.
- LANGAN, T. A., J. Gautier, M. Lohka, R. Hollingsworth, S. Moreno, P. Nurse, J. Maller et R. A. Scalfani. 1989. « Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of *cdc2*+/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells ». Molecular and Cellular Biology, vol. 9, p.3860-3868.
- LEVIN, D. B. et B. Whittome. 2000. « Codon usage in nucleopolyhedroviruses ». Journal of General Virology, vol. 81, p. 2313-2325.

- LEVY-STRUMPF, N. et A. Kimchi. 1998. « Death associated proteins (DAPs): from gene identification to the analysis of their apoptotic and tumor suppressive functions ». Oncogene, vol. 17, p. 3331-3340.
- LI, Q., C. Donly, L. Li, L. G. Willis, D. A. Theilmann et M. Erlandson. 2002a. « Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome ». Virology, vol. 294, p. 106-121.
- LI, X., A. Scuderi, A. Letsou et D. M. Virshup. 2002b. « B56-associated protein phosphatase 2A is required for survival and protects from apoptosis in *Drosophila melanogaster* ». Molecular Cell Biology, vol. 22, p. 3674-3684.
- LIN, G., J. M. Slack et G. W. Blissard. 2001. « Expression and localization of LEF-11 in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected Sf9 cells ». Journal of General Virology, vol. 82, p. 2289-2294.
- LIU, J. J. et E. B. Carstens. 1995. « Identification, localization, transcription, and sequence analysis of the *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase gene ». Virology, vol. 209, p. 538-549.
- LOWE, E. D., M. E. Noble, V. T. Skamniki, N. G. Oikonomakos, D. J. Owen et L. N. Johnson. 1997. « The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition ». EMBO Journal, vol. 16, p. 6646-6658.
- LU, A. et E. B. Carstens. 1992. « Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p80 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a homologue of the *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus capsid-associated gene ». Virology, vol. 190, p. 201-209.
- LU, A. et L. K. Miller. 1995. « The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication ». Journal of Virology, vol. 69, p. 975-982.
- LU, A. et L. K. Miller. 1997. « Regulation of baculoviruses late and very late gene expression. » In : L. K. Miller (éd.). The baculoviruses p.193-216. New York. N.Y. : Plenum Press.
- LUQUE, T., R. Finch, N. Crook, D. R. O'Reilly et D. Winstanley. 2001. « The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome ». Journal of General Virology, vol. 82, p. 2531-2547.
- MacDONALD, C. C. et J. L. Redondo. 2002. « Reexamining the polyadenylation signal: were we wrong about AAUAAA? ». Mol Cell Endocrinol, vol. 190, p. 1-8.

MAEDA, S. 1989. « Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors ». Annual Review in Entomology, vol. 34, p. 351-372.

MAEDA, S., S. G. Kamita et A. Kondo. 1993. « Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV ». Journal of Virology, vol. 67, p.6234-6238.

MAINPRIZE, T. H., K. Lee et L. K. Miller. 1986. « Variation in the temporal expression of overlapping baculovirus transcripts ». Virus Research, vol. 6, p.85-99.

MALAGOLI, D., A. Conte et E. Ottaviani. 2002. « Protein kinases mediate nitric oxide-induced apoptosis in the insect cell line IPLB-LdFB ». Cellular and Molecular Life Sciences, vol.59, p.894-901.

MANTOVANI, R. 1998. « A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes ». Nucleic Acids Research, vol. 26, p.1135-1143.

MARSHALL, R. D. 1972. « Glycoproteins ». Annual Review of Biochemistry, vol. 41, p.673-702.

MARUNIAK, J. E. et M. D. Summers. 1981. « *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus phosphoproteins and synthesis of intracellular proteins after virus infection ». Virology, vol. 109, p. 25-34.

MATTSON, W. J., G. A. Simmons et J. A. Witter. 1988. « The spruce budworm in eastern North America. » In : Berryman, A. A. (éd.). Dynamics of forest insect populations, p. 309-330. New York, N.Y. : Plenum Publishing Corporation.

MAURER-STROH, S., B. Eisenhaber et F. Eisenhaber. 2002. « N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences ». Journal of Molecular Biology, vol. 317, p. 523-540.

MILLER, L. K., M. J. Adang et D. Browne. 1983. « Protein kinase activity associated with the extracellular and occluded forms of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 46, p. 275-278.

MILLER, L. K. 1996. « Insect Viruses. » In : Fields, B. N., Knipe, D. M. et P. M. Howley (éds.). Fundamental Virology, p.401-424. New York, N.Y. : Lipincott-Raven.

MILLER, L. K. 1997. « Baculovirus interaction with host apoptotic pathways ». Journal of Cell Physiology, vol. 173, p.178-182.

MILLER, T. D. 2003. « Research interests ». En ligne. <www.carleton.ca/toxin/budworm.jpg>
Consulté le 2 juin 2002.

- MORRIS, T. D. et L. K. Miller. 1994. « Mutational analysis of a baculovirus major late promoter ». Gene, vol.140, p. 147-153.
- MOSCARDI, F. 1999. « Assessment of the application of baculoviruses for control of *Lepidoptera* ». Annual Review of Entomology, vol. 44, p. 257-290.
- MÜLLER, R., M. N. Pearson, R. L. Russell et G. F. Rohrmann. 1990. « A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*: genetic location, sequence, transcriptional mapping, and immunocytochemical characterization ». Virology, vol. 176, p. 133-144.
- MURPHEY, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo et M. D. Summers (Éds.) 1995. « Virus Taxonomy-The Classification and Nomenclature of Viruses » : Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag. New York. Archives of Virology/Supplément 10, Wien New York : Springer-Verlag. 586p.
- NARAYANA, N., S. Cox, S. Shaltiel, S. S Taylor et N. Xuong. 1997. « A Crystal structure of a polyhistidine-tagged recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with the peptide inhibitor PKI(5-24) and adenosine ». Biochemistry, vol. 36, p. 4438-4448.
- NICHOLAS Jr., H. B., S. S. Chan et G. L. Rosenquist. 1999. « Reevaluation of the determinants of tyrosine sulfation ». Endocrine, vol.11, p.285-292.
- O'BRIEN, V. 1998. « Viruses and apoptosis ». Journal of General Virology, vol. 79, p. 1833-1845.
- OGBOURNE, S. et T. M. Antalis. 1998. « Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes ». Biochemistry Journal, vol. 331, p. 1-14.
- OHRESSER, M., N. Morin, M. Cerutti et C. Delsert. 1994. « Temporal regulation of a complex and unconventional promoter by viral products ». Journal of Virology, vol. 68, p. 2589-2597.
- OKANO, K., T. Shimada, K. Mita et S. Maeda. 2001. « Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in BmNPV-infected BmN cells ». Virology, vol. 282, p. 348-356.
- O'REILLY, D. R. et L. K. Miller. 1989. « A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glycosyl transferase ». Science, vol. 245, p. 1110-1112.

- OTTAVIANI, E. et D. Malagoli. 2002. « BCL-1 does not control programmed cell death in the IPLB-LdFB cell line from the insect *Lymantria dispar* ». Cell Biology International, vol. 26, p.563-566.
- PAGE, R. D. 1996. « TreeView : an application to display phylogenetic trees on personal computers ». Computer Applications in Biosciences, vol. 12, p. 357-358.
- PASSARELLI, A. L. et L. K. Miller. 1993. « Identification and characterization of *lef-1*, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression ». Journal of Virology, vol. 67, p.3481-3488.
- PEARSON M. N. et G. F. Rohrmann. 1997. « Splicing is required for transactivation by the immediate early gene 1 of the *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus ». Virology, vol. 235, p. 153-165.
- PELLED, D., T. Raveh, C. Riebeling, M. Fridkin, H. Berissi, A. H. Futerman et A. Kimchi. 2002. « Death-associated protein (DAP) kinase plays a central role in ceramide-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons ». Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p.1957-1961.
- PELLOCK, B. J., A. Lu, R. B. Meagher, M. J. Weise et L. K. Miller. 1996. « Sequence, function, and phylogenetic analysis of an ascovirus *DNA polymerase* gene ». Virology, vol. 216, p.146-157.
- PHAM, D. Q. et N. Sivasubramanian. 1992. « *In vivo* transcriptional analysis of three baculovirus genes: evidence of homology between viral and host transcripts ». Virology, vol.190, p. 288-297.
- PIAO, Z., K. Ui-Tei, M. Nagano et Y. Miyata. 2001. « Participation of intracellular Ca(2+)/calmodulin and protein kinase(s) in the pathway of apoptosis induced by a *Drosophila* cell death gene, reaper ». Molecular Cell Biology Research Communications, vol. 4, p. 307-312.
- PINNA, L. A. 1990. « Casein kinase 2 : Am 'eminence grise' in cellular regulation? ». Biochimica Biophysica Acta, vol. 1054, p.267-284.
- PRIKHOD'KO, E. A. et L. K. Miller. 1996. « Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1 ». Journal of Virology, vol. 70, p. 7116-7124.
- RANKIN, C., B. F. Ladin et R. F. Weaver. 1986. « Physical mapping of temporally regulated, overlapping transcripts in the region of the 10K protein gene in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 57, p.18-27.
- RASHIDAN, K. K., N. Nassoury, P. N. Giannopoulos et C. Guertin. 2002a. « Identification and characterization of a conserved baculoviral structural protein ODVP-6E/ODV-E56 from *Christoneura fumiferana* granulovirus ». Journal of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 35, p. 595-603.

- RASHIDAN, K. K., N. Nassoury, A. Merzouki et C. Guertin. 2002b. « Identification and Characterization of a Putative Baculoviral Transcriptional Factor IE-1 from *Choristoneura fumiferana* Granulovirus ». Journal of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 35, p. 553-561.
- RAVEH, T., G. Droguett, M. S. Horwitz, R. A. DePinho et A. Kimchi. 2001. « DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation ». Nature Cell Biology, vol. 3, p. 1-7.
- RAVEH, T. et A. Kimchi. 2001. « DAP kinase-a proapoptotic gene that functions as a tumor suppressor ». Experimental Cell Research, vol. 264, p.185-192.
- REESE, M. G. « Improved Splice Site Detection in Genes ». Journal of Computational Biology, vol. 4, p.311-323.
- REILLY, L. M., et L. A. Guarino. 1994. « The *pk-1* gene of *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus encodes a protein kinase ». Journal of General Virology, vol. 75, p. 2999-3006.
- RHEE, W. J. et T. H. Park. 2000. « Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 271, p.186-190.
- RHEE, W. J., E. J. Kim et T. H. Park. 2002. « Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.295, p.779-783.
- ROHRMANN, G. F. 1986. « Polyhedrin structure ». Journal of General Virology, vol. 67, p.1499-1513.
- ROHRMANN, G. F. 1992. « Baculovirus structural proteins ». Journal of General Virology, vol.73, p. 749-761.
- ROHRMANN, G. F. 1999. « Nuclear polyhedrosis viruses. » In : Webster, R.G. et A. Granoff (éds.). Encyclopedia of Virology, p.146-152. Londres, R.-U. : Academic Press Limited.
- RUSSELL, P. et P. Nurse. 1987. « Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog ». Cell, vol. 49, p. 559-567.
- RUSSELL, R. L. et G. F. Rohrmann. 1993. « A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions ». Virology, vol.195, p. 532-540.
- RUSSELL, R. L. et G. F. Rohrmann. 1997. « Characterization of P91, a protein associated with virions of an *Orgyia pseudotsugata* baculovirus ». Virology, vol. 233, p. 210-223.

- SAHDEV, S., T. K. Taneja, M. Mohan, N. K. Sah, A. K. Khar, S. E. Hasnain et M. Athar. 2003. « Baculoviral p35 inhibits oxidant-induced activation of mitochondrial apoptotic pathway ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 307, p.483-490.
- SAITOU, N. et M. Nei. 1987. « The neighbor-joining method : a new method for constructing phylogenetic trees ». Molecular Biology Evolution, vol. 4, p. 406-425.
- SAMBROOK, J., E. F. Fritsch et F. Maniatis. 1989. « Molecular cloning : a laboratory manual. » Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- SANGER, F., S. Nicklen et A. R. Coulson. 1977. « DNA sequencing with chain-terminating inhibitors ». Proc Natl Acad Sci U S A., vol. 74, p. 5463-5467.
- SANJO, H., T. Kawai et S. Akira. 1998. « DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis ». Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 29066-29071.
- SESHAGIRI, S., D. Vucic, J. Lee et V. M. Dixit. 1999. « Baculovirus-based genetic screen for antiapoptotic genes identifies a novel IAP ». Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p.36769-36773.
- SHIPPAM, C., X. Wu, S. Stewart et D. A. Theilmann. 1997. « Characterization of a unique OpMNPV-specific early gene not required for viral infection in tissue culture ». Virology, vol. 227, p. 447-459.
- SHOHAT, G., T. Spivak-Kroizman, O. Cohen, S. Bialik, G. Shani, H. Berrisi, M. Eisenstein et A. Kimchi. 2001. « The pro-apoptotic function of death-associated protein kinase is controlled by a unique inhibitory autophosphorylation-based mechanism ». Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 47460-47467.
- SHOHAT, G., G. Shani, M. Eisenstein et A. Kimchi. 2002. « The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases ». Biochimica et Biophysica Acta, vol.1600, p. 45-50.
- SINGH U. et J. B. Roger. 1998. « The novel core promoter element GAAC in the hgl5 gene of *Entamoeba histolytica* is able to direct a transcription start site independent of TATA or initiator regions ». Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 21663-21668.
- SKEIKY, Y. A. et K. Iatrou. 1991. « Synergistic interactions of silkworm chorion promoter-binding factors ». Molecular and Cellular Biology, vol. 11, p. 1954-1964.
- SLACK, J. M., J. Kuzio et P. Faulkner. 1995. « Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus ». Journal of General Virology, vol. 76, p. 1091-1098.

SLAVICEK, J. M. 1991. « Temporal analysis and spatial mapping of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus transcripts and in vitro translation polypeptides ». Virus Research, vol. 20, p.223-236.

SMITH, I. et C. Goodale. 1998. « Sequence and in vivo transcription of *Lacanobia oleracea* granulovirus *egt* ». Journal of General Virology, vol. 79, p. 405-413.

SODERLING, T. R. 1990. « Protein kinases- regulation by autoinhibitory domains ». Journal of Biological Chemistry, vol. 265, p. 1823-26.

SUMMERS, M. D. 1971. « Electron Microscopic Observations of Granulosis Virus Entry, Uncoating, Replication Processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni* ». Journal of Ultrastructural Research, vol. 35, p. 606-625.

SUMMERS, M. D. et G. E. Smith. 1987. « A manual of methods for baculovirus vectors and cell culture procedures ». Texas Agric Exp Sta Bull, no1555.

TABASHNIK, B. E., N. L. Cushing, N. Finson et M. W. Johnson. 1990. « Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (*Lepidoptera : Plutellidae*) ». Journal of Economic Entomology, vol. 83, p.1671-1676.

TAHA, A., A. Nour-El-Din, L. Croizier, M. L. Ferber et G. Croizier. 2000. « Comparative analysis of the *granulin* regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses ». Virus Genes, vol. 21, p.147-155.

TANADA, Y. et R.T. Hess. 1991. « Baculoviridae. Granulosis viruses. » In : Adams, J. R. et J. R. Bonami (éd.). Atlas of Invertebrate viruses, p.227-257. Boca Raton : CRC Press Inc.

TASHEVA, E. S., A. H. Conrad et G. W. Conrad. 2000. « Identification and characterization of conserved *cis*-regulatory elements in the human *keratocan* gene promoter ». Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1492, p. 452-459.

TAYLOR, S. S., E. Raddzio-Andzelm, D. R. Knighton, L. F. Ten Eyck, J. M. Sowadski, F. W. Herberg, W. Yonemoto et J. Zheng. 1993. « Crystal structures of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal general features of the protein kinase family ». Receptor, vol. 3, p.165-172.

TEODORO, J. G. et P. E. Branton. 1997. « Regulation of apoptosis by viral gene products ». Journal of Virology, vol. 71, p.1739-1746.

THORNTON, J. M. 2001. « From genome to function ». Science, vol. 292, p.2095-2097.

- TOMALSKI, M. D., R. Eldridge, L. K. Miller. 1991. « A baculovirus homolog of a Cu/Zn superoxide dismutase gene ». Virology, vol. 184, p. 149-161.
- TOMPKINS, G. J. 1991. « Purification of invertebrate viruses. » In : Adams, J. R. et J. R. Bonami (éd.). Atlas of invertebrate viruses, p 31-40. Boca Raton : CRC Press Inc.
- USHEVA, A., E. Maldonado, A. Goldring, H. Lu, C. Houbavi, D. Reiberg et Y. Aloni. 1992. « Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein ». Cell, vol. 69, p. 871-881.
- VAIL, P. V., G. Sutler, D. L. Jay et D. Gough. 1971. « Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and the alfalfa looper ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 17, p. 383-88.
- VALENTZA, A. V., A. M. Schumacher, C. Weiss, M. Egli et D. M. Watterson. 2001. « A protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression: structure, activity, and discovery of peptide substrates ». Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 38956-38965.
- VALENTZA, A. V., A. M. Schumacher et D. M. Watterson. 2002. « Structure, activity, regulation, and inhibitor discovery for a protein kinase associated with apoptosis and neuronal death ». Pharmacology and Therapeutics, vol. 93, p. 217-224.
- van ELDIK L. J. 2002. « Structure and enzymology of a death-associated protein kinase ». Trends in Pharmacological Sciences, vol. 23, p. 302-304.
- van STRIEN, E. A., W. F. Ijkel, H. Gerrits, J. M. Vlak et D. Zuidema. 2000. « Characteristics of the transactivator gene *iel* of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus ». Archives of Virology, vol. 145, p. 2115-2133.
- VIALARD, J. E. et C. D. Richardson. 1993. « The 1,629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *polyhedrin* gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein ». Journal of Virology, vol. 67, p. 5859-5866.
- WANG, H. H., M. J. Fraser et L. C. Cary. 1989. « Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of TFP3 lepidopteran transposon insertions at the FP locus of nuclear polyhedrosis viruses ». Gene, vol. 81, p. 97-108.
- WANG, P., D. A. Hammer, et R. R. Granados. 1997. « Binding and fusion of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus to cultured insect cells ». Journal of General Virology, vol. 78, p. 3081-3090.
- WASHBURN, J. O., B. A. Kirkpatrick et L. E. Volkman. 1996. « Insect protection against viruses ». Nature, vol. 383, p. 767.

WERNER, T. 1999. « Models for prediction and recognition of eucaryotic promoters ». Mammalian Genome, vol.10, p. 168-175.

WHITFORD, M. et P. Faulkner. 1992. « A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine ». Journal of Virology, vol. 66, p. 3324-3329.

WHITT, M. A. et J. S. Manning. 1988. « A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body ». Virology, vol. 163, p. 33-42.

WILSON, M. E. et R. A. Consigli. 1985. « Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella* ». Virology, vol. 143, p.526-35.

WILSON M. E. et K. H. Price. 1988. « Association of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) with the nuclear matrix ». Virology, vol. 167, p. 233-241.

WINSTANLEY, D. et N. E. Crook. 1993. « Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures ». Journal of General Virology, vol. 74, p. 1599-609.

WINSTANLEY, D. et D. R. O'Reilly. 1999. « Granuloviruses. » In : Webster, R.G. et A. Granoff (éds.). Encyclopedia of Virology, p.140-146. Londres, R.-U. : Academic Press Limited.

WOODGETT, J. R., K. L. Gould et T. Hunter. 1986. « Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements ». European Journal of Biochemistry, vol. 161, p.177-184.

WORMLEATON, S. L. et D. Winstanley. 2001. « Phylogenetic analysis of conserved genes within the *ecdysteroid UDP-glucosyltransferase* gene region of the slow-killing *Adoxophyes orana* granulovirus ». Journal of General Virology, vol. 82, p. 2295-2305.

YAMAMOTO, M., T. Hioki, T. Ishii, S. Nakajima-Iijima et S. Uchino. 2002. « DAP kinase activity is critical for C(2)-ceramide-induced apoptosis in PC12 cells ». European Journal of Biochemistry, vol. 269, p. 139-147.

ZANOTTO, P. M., B. D. Kessing et J. E. Maruniak. 1993. « Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 62, p. 147-164.

ZARDOYA, R. et A. Meyer. 1996. « Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates ». Molecular Biology and Evolution, vol. 13, p. 933-942.

ZHANG, G. Y., Z. X. Zhang et X. L. Sun. 1996. « Evaluation of the application effectiveness of a new formulation of *Helicoverpa* NPV insecticide-an emulsifiable suspension ». Chinese Journal of Biological Control, vol.12, p. 24-28.

ZHENG, J., D. R. Knighton, L. F. ten Eyck, R. Karlsson, N. Xuong, S. S. Taylor et J. M. Sowadski. 1993. « Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor ». Biochemistry, vol. 32, p. 2154-2161.

ZHOU, J. et J. A. Adams. 1997. « Is there a catalytic base in the active site of cAMP-dependent protein kinase? ». Biochemistry, vol. 36, p. 2977-2984.

Annexe I

Tableau des valeurs de la matrice de substitution BLOSUM62

[illegible]