PATRICK VINCENT

QUANTIFICATION PAR PCR QUANTITATIF COMPÉTITIF ET DÉTECTION PAR HYBRIDATION *IN SITU* DU ChfuGV CHEZ LES LARVES DE *CHORISTONEURA FUMIFERANA* (LEPIDOPTERA:TORTRICIDAE)

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

Jury d'évaluation

Claude Dupont, Ph.D. Président de jury
Simon Garzon, Ph.D. Évaluateur externe
Claude Guertin, Ph.D. Directeur de recherche

Février 2000
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec

Table des matières

Table des matières iii
Liste des figures vi
Liste des abréviations viii
Sommaire x
1. Introduction 1
2. Revue bibliographique 3
2.1 La tordeuse des bourgeons de l'épinette 4
2.1.1 Distribution des populations et importances économiques 4
2.1.2 Cycle évolutif de l'insecte 5
2.1.3 Dynamique des populations 6
2.2 Les granulovirus 7
2.2.1 Historique des granulovirus 8
2.2.2 Ultrastructure des granulovirus 8
2.2.3 Organisation du génome viral chez les granulovirus 11
2.2.4 Protéines associées au corps d'inclusion chez les GV 12
2.2.5 Protéines associées à l'enveloppe et la nucléocapside 13
2.2.6 Cycle de réplication des granulovirus 14
2.2.6.1 Voie d'entrée et premières cellules infectées 14
2.2.6.2 Infection primaire 15
2.2.6.3 Infection secondaire 17
2.2.7 Réplication des granulovirus *in vitro* 18
2.2.8 Pathologie associée aux granulovirus 19
2.3 Utilisation des granulovirus comme agents de lutte biologique 20
2.4 Anatomie générale d'une larve d'insecte de lépidoptère 21
2.4.1 Système digestif 21
2.4.2 Tissu adipeux 24
2.4.3 Tégument 25
2.4.4 Système respiratoire 25
2.5 Méthode de détection des gènes d'intérêts 25
2.5.1 PCR quantitatif 26
2.5.1.1 Stratégie d'amplification 26
2.5.1.2 Concept 28
2.5.2 Hybridation *in situ* 29
3. Matériel et méthode 30
3.1 Production du virus inclus dans un granule 31
3.1.1 Élevage des larves 31
3.1.2 Production virale 31
3.1.3 Purification virale 31

3.1.3.1 Purification partielle des virus inclus et non-inclus dans un granule 32
3.1.3.2 Purification des virus inclus dans un granule par gradient de glycérol 32
3.2 Quantification et vérification de la pureté du virus 33
3.3 Cinétique d'infection virale 34
3.4 Quantification du génome viral par réaction de polymérase en chaîne (PCR) quantitatif 34
3.4.1 Extraction de l'ADN viral et de l'insecte 34
3.4.2 Synthèse des amorces 36
3.4.3 Fabrication de l'étalon interne 36
3.4.3.1 Clonage de l'étalon interne 37
3.4.3.2 Transformation bactérienne 37
3.4.3.3 Criblage des colonies recombinantes 38
3.4.3.4 Purification du plasmide contenant l'étalon interne 38
3.4.4 PCR compétitif 39
3.4.5 Analyse des données du PCR quantitatif 40
3.5 Cinétique d'apparition de la granuline 42
3.5.1 Dosage protéique des broyats larvaires 42
3.5.2 Électrophorèse des protéines totales 43
3.6 Révélation de la granuline par un transfert de type Western 43
3.6.1 Migration et transfert électrophorétique 43
3.6.2 Production d'anticorps dirigés contre le ChfuGV 44
3.6.3 Immunobuvardage de type Western 45
3.7 Détection du ChfuGV par hybridation *in situ* 46
3.7.1 Fabrication de la sonde 46
3.7.1.1 Purification de l'ADN 46
3.7.1.2 Marquage de la sonde par PCR 46
3.7.2 Évaluation de la quantité de sonde marquée 47
3.7.3 Coupes histologiques des larves 48
3.7.3.1 Fixation et déshydratation 48
3.7.3.2 Coupe 49
3.7.4 Hybridation 49
3.8. Visualisation par histologie des dommages causés par le ChfuGV 51
3.8.1 Coloration des coupes histologiques 51

4. Résultats 52

4.1 Production et purification virale 53
4.2 Quantification du génome viral par PCR quantitatif 53
4.2.1 Criblage des colonies recombinantes 53
4.2.2 Variation du poids moléculaire entre l'étalon interne et le gène ciblé 54
4.2.3 Mesure du nombre de copies du génome des virions inclus et non-inclus chez les insectes infectés 54
4.3 Progression de l'infection virale 61
4.4 Cinétique d'apparition de la granuline 68
4.5 Identification de la granuline par un transfert de type Western 68
4.6 Détection du génome du ChfuGV par hybridation *in situ* 68
4.6.1 Évaluation de la concentration de la sonde 73

4.6.2 Hybridation du génome du ChfuGV avec la sonde marquée 73
4.7 Visualisation sommaire des dommages causés suite à l'infection des larves *de C. fumiferana* par le ChfuGV 73
4.7.1 Changements observés au niveau du tissu adipeux chez les larves infectées ... 80
4.7.2 Changements observés au niveau de l'hypoderme chez les larves infectées..... 80
4.7.3 Absence de changements observés au niveau de l'intestin moyen chez les larves infectées 80

5. Discussion 88

6. Conclusion 99

Remerciements 102

Bibliographie 104

Annexes 114

Annexe I Solutions utilisées pour l'électrophorèse d'un gel de polyacrylamide
Annexe II Éléments entrant dans la composition de la nourriture artificielle McMorran
Annexe III Méthodes utilisées pour le calcul de la concentration virale dans les suspension d'innoculation et lors des analyses par PCR quantitatif
Annexe IV Communication

LISTE DES FIGURES

Page

FIGURE 1: Micrographie électronique du ChfuGV visualisé par la technique de coloration négative au PTA. 120000X. 9

FIGURE 2: Anatomie générale d'une larve d'insecte de lépidoptère 22

FIGURE 3: Criblage des colonies possédant le fragment correspondant à l'étalon interne cloné dans le plasmide pCR 2.1 55

FIGURE 4: Variation du poids moléculaire entre le gène ciblé et le standard interne 57

FIGURE 5: PCR quantitatif effectué sur l'ADN extrait de larves de *C. fumiferana,* récoltées au huitième jour suivant l'infection, en utilisant des concentrations logarithmiques d'étalon interne 59

FIGURE 6: PCR quantitatif effectué sur l'ADN extrait de larves de *C. fumiferana,* récoltées au huitième jour suivant l'infection du ChfuGV, en utilisant des concentrations semi-logarithmiques d'étalon interne 62

FIGURE 7: Analyse densitométrique des résultats obtenus suite au deuxième PCR quantitatif effectué sur l'ADN extrait de larves de *C. fumiferana* récoltées au 8e jour suivant l'infection 64

FIGURE 8: Progression du nombre de copies de génomes des virions inclus et non-inclus dans un granule présent chez les larves de *C. fumiferana* récoltées du premier au dixième jour suivant l'infection en fonction du temps d'infection 66

FIGURE 9: Cinétique d'apparition de la granuline chez les larves de *C. fumiferana* soumises au ChfuGV et récoltées entre le premier et le dixième jour suivant l'infection 69

FIGURE 10: Immunobuvardage effectué sur des broyats de larves de *C. fumiferana* récoltées du sixième au dixième jour suivant l'infection par le ChfuGV 71

FIGURE 11: Évaluation de la quantité de sonde marquée 74

FIGURE 12: Résultats de l'hybridation *in situ* du génome du ChfuGV au niveau de l'intestin chez les larves de *C. fumiferana* soumises à ce dernier 76

FIGURE 13: Résultats de l'hybridation *in situ* du génome ChfuGV au niveau des cellules adipeuses et de l'hypoderme chez les larves de *C. fumiferana* soumises à ce dernier 78

FIGURE 14: Comparaison chez *C. fumiferana* des cellules adipeuses provenant de larves saines et infectées par le ChfuGV 81

FIGURE 15: Comparaison chez *C. fumiferana* de l'hypoderme provenant de larves saines et infectées par le ChfuGV 83

FIGURE 16: Comparaison chez *C. fumiferana* de l'intestin provenant de larves saines et de larves infectées par le ChfuGV 85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AaGV: granulovirus retrouvé chez *Archips argyrospila*

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ATP: adénosine triphosphate

BSA: albumine de sérum bovin

cm^2: centimètre carré

ChfuGV: granulovirus retrouvé chez *Choristoneura fumiferana*

CpGV: granulovirus retrouvé chez *Cydia pomonella*

CPV: cypovirus

Da: dalton

dAMP: désoxy adénosine monophosphate

dCMP: désoxy cytosine monophosphate

dGMP: désoxy guanidine monophosphate

D.O.: densité optique

dTMP: désoxy thymidine monophosphate

DTT: dithiotréitol

EaGV: granulovirus retrouvé chez *Euxoas auxiliaris*

EPV: entomopoxvirus

g: force gravitationnelle

g/L: gramme par litre

GV: granulovirus

HPV: virus du papillome humain (human papilloma virus)

HzGV: granulovirus retrouvé chez *Heliothis zea*

kDa: kilodalton

µg: microgramme

µg/µL: microgramme par microlitre

µL: microlitre

µM: micromolaire

M: molaire

mg/mL: milligramme par millilitre

mm: millimètre

mM: millimolaire

mL: millilitre

min: minute

mm^2: millimètre carré

ng: nanogramme

ng/µL: nanogramme par microlitre

nm: nanomètre

NPV: nucléopolyédrovirus

pb: paire de base

PBS: phosphate buffer saline

PCR: réaction de polymérase en chaîne (Polymerase chain reaction)

PiGV: granulovirus retrouvé chez *Plodia interpunctella*

pMole: picomole

PsGV: granulovirus retrouvé chez *Plathypena scabra*

PTA: acide phosphotungstique

PuGV: granulovirus retrouvé chez *Pseudaletia unipuncta*

rpm: rotation par minute

SDS: sodium dodécyl sulfate

sec: seconde

TEA: triéthanolamine

TnGV granulovirus retrouvé chez *Trichoplusia ni*

U.V.: ultraviolet

VEF: viral enhancing factor

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

°C: degré Celcius

%: pourcent

SOMMAIRE

Patrick Vincent
Sommaire

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) est le plus grand défoliateur des forêts boréales du Québec. Cet insecte, qui est caractérisé par des invasions importantes des populations, engendre des pertes économiques considérables dans le domaine de la foresterie. Le granulovirus retrouvé chez la tordeuse (ChfuGV) semble être un agent de lutte biologique intéressant puisqu'il provoque, au laboratoire, la mort de l'insecte sur une période d'environ dix jours. Afin de définir les caractéristiques contribuant à l'efficacité du granulovirus comme agent de lutte biologique, la détermination de la charge virale chez les insectes infectés et l'identification des tissus cibles pour la réplication du ChfuGV ont fait l'objet de cette étude. Par l'entremise de PCR quantitatif compétitif et de gels de polyacrylamide, la quantité de copies du génome du ChfuGV et la quantité de granuline ont pu respectivement être déterminés chez les larves infectées par le virus. Des hybridations moléculaires effectuées sur des coupes minces d'insectes infectés ont permis d'identifier les tissus ciblés par le ChfuGV lors de sa réplication. Les analyses quantitatives par PCR compétitif ont permis de mettre en évidence une augmentation constante du ChfuGV jusqu'au septième jour suivant l'infection. Par la suite, la quantité de copies du génome viral semble diminuer. D'autre part, une augmentation constante de la granuline, protéine majeure du virus, a été observée suite à l'analyse par gel de polyacrylamide. Les hybridations ont démontré la présence du génome viral dans les cellules intestinales, adipeuses et hypodermales des insectes infectés par le virus. La méthode d'hybridation *in situ* a permis de caractériser le ChfuGV comme étant un granulovirus provoquant un syndrome de type II chez son hôte. Ce syndrome se caractérise par la réplication du ChfuGV dans le noyau des cellules intestinales, des cellules adipeuses et des cellules hypodermiques chez *C. fumiferana*. La mise au point d'une méthode de quantification virale par PCR est un outil intéressant qui pourra éventuellement être utilisé lors de la production du ChfuGV à grande échelle. Elle permet de déterminer la durée d'incubation des insectes infectés avant de récolter le virus.

1. INTRODUCTION

Au Canada, les pertes dans le domaine de la foresterie sont largement causées par les maladies ou par les insectes ravageurs. La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera : Tortricidae), est considérée comme étant le plus important ravageur des peuplements de sapins et d'épinettes au Québec (Blais, 1985a ; BNDF, 1997 ; Harvey, 1985). La caractéristique principale associée à cet insecte est certes la possibilité des populations d'atteindre des niveaux épidémiques sur de larges étendues (Harvey, 1985). Au cours des 20 dernières années, une importante invasion a été observée au Canada. Durant cette période, on estime à environ 160 milliards d'hectares la superficie de forêt défoliée par la tordeuse (Blais, 1985a).

Le manque de spécificité des insecticides chimiques ainsi que leurs toxicités sur certains animaux et insectes non-ciblés (Pierce, 1975) fait en sorte que l'utilisation de virus devient une alternative intéressante en lutte biologique compte tenu de leur spécificité à l'espèce. Suite à l'infection des larves de *C. fumiferana* par un granulovirus (ChfuGV) une liquéfaction des tissus et une augmentation de la fragilité de l'hypoderme des insectes sont observés. Ces symptômes découlant de l'infection virale sont directement reliés à la pathogénèse associée au virus. Parmi les granulovirus la pathogénèse n'est pas identique chez toutes les espèces. On peut la regrouper de façon générale en trois types de syndromes : syndrome de type I caractérisé par l'infection de l'intestin moyen et des cellules adipeuses; syndrome de type II où l'intestin moyen, le tissu adipeux et au moins un autre organe sont infectés; et le syndrome de type III où seulement l'intestin moyen est infecté (Tanada et Hess, 1984; Tanada et Hess, 1991; Federici et Stern, 1990 et Federici, 1993).

Suite à cette observation, deux objectifs ont guidé la réalisation de cette recherche. Le premier est de quantifier la charge virale présente chez les larves de *C. fumiferana* infectées par le ChfuGV tandis que le second est de d'identifier les tissus ciblés par le virus lors de sa réplication chez cet insecte. En regard de ces deux objectifs, on cherche également à déterminer le type de syndrome associé à l'infection par le ChfuGV des larves de *C. fumiferana*. Ils permettront également de définir quelles sont les caractéristiques contribuant à l'efficacité du ChfuGV comme agent potentiel de lutte biologique.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 La tordeuse des bourgeons de l'épinette

2.1.1 Distribution des populations et importances économiques

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae) fut décrite pour la première fois à partir de spécimens récoltés en Virginie. Ce lépidoptère est toutefois associé à la forêt boréale mais également à la région des grands lacs et du St-Laurent où sont retrouvés ses deux hôtes principaux : le sapin baumier, *Abies balsamea* (L.) Mill., et l'épinette blanche, *Picea glauca* (Moench) (Harvey, 1985). La tordeuse est également retrouvée sur d'autres conifères comme l'épinette rouge, *Picea rubens* Sarg., l'épinette noire *Picea mariana* (Mill) B.S.P., et le pin blanc, *Pinus stobus* (L.) (Mattson *et al*, 1988). Sa distribution géographique est vaste puisqu'elle s'étend des provinces atlantiques canadiennes jusqu'au pied des montagnes Rocheuses en Alberta et, du sud au nord, des états frontaliers américains jusqu'au Yukon en passant par la vallée de la rivière Mackenzie (Mattson *et al*, 1988; Harvey, 1985).

La tordeuse est de loin l'insecte forestier causant le plus de dommages aux forêts résineuses du Québec. Depuis le début du siècle, trois invasions générales de tordeuse ont sévi dans la province. La dernière a débutée en 1967 et s'est terminée au début des années 1990 (Blais, 1985b; Lachance, 1995). Les défoliations importantes associées à ces invasions ont entraîné des pertes économiques considérables surtout pour les secteurs des pâtes et papiers et du bois de sciage (Mattson *et al*, 1988). Ces pertes, concentrées principalement dans les peuplements de sapins, ont atteint parfois 80 à 90% de la biomasse (Blais, 1985a). Lors d'infestations sévères, tout le nouveau feuillage peut être consommé par les larves de la tordeuse. Si ces dommages sont récurants, ils peuvent induire la dégradation et la mort de l'arbre sur une période de cinq ans (Drouin, 1997).

2.1.2 Cycle évolutif de l'insecte

Les étapes impliquées dans le cycle évolutif de *C fumiferana* ont été décrites par Comptois, (1988), Mattson *et al*, (1988) et Talerico, (1984). La tordeuse est un lépidoptère univoltine qui par définition ne possède qu'une seule génération par année. Les papillons émergent des chrysalides (pupes) de juin jusqu'à la fin de juillet. Les papillons vivent environ deux semaines, période durant laquelle ils ne se nourrissent pas. L'accouplement se fait dans un délai d'environ dix jours suivant l'émergence de la chrysalide. Les femelles gravides déposent en moyenne 170 œufs sur la surface inférieure des aiguilles durant une période d'une à deux semaines. Ces œufs qui sont normalement regroupés par 20, sont pondus sur les aiguilles des pousses périphériques exposées au soleil, principalement dans le tiers supérieur de la cime. Dès l'éclosion des œufs, les larves de premier stade, attirées par le soleil, se dirigent vers l'extrémité des branches. Ce déplacement peut être interrompu par la température élevée et des vents violents. C'est à cette période que survient une première dispersion des larves. Certaines se laissent pendre au bout d'un fil de soie et sont entraînées par le vent. Les jeunes larves ne s'alimentent pas, après s'être tissées un abri de soie appelé hibernaculum, elles muent et les deuxièmes stades larvaires passent l'hiver en diapause. Les hibernacula se retrouvent principalement dans les fissures de l'écorce, les fleurs étaminées et les lichens des arbres hôtes.

De la fin avril à la mi-mai de l'année suivante, les larves du deuxième stade émergent de l'hiberculum. Toujours attirées par la lumière, elles se dirigent vers l'extrémité des branches où la dispersion par le vent peut causer une deuxième redistribution majeure pouvant atteindre plusieurs kilomètres au travers la forêt. Suite à leur établissement, les tordeuses minent les vieilles aiguilles ou se nourrissent de fleurs étaminées. Lorsque les bourgeons éclosent et les jeunes pousses s'allongent, les chenilles commencent à se nourrir sur le jeune feuillage. Durant la période d'alimentation plusieurs mues sont observées, les larves passant successivement du deuxième au sixième stade. Durant cette période, les insectes se construisent un abri avec quelques aiguilles qu'elles attachent ensemble avec de la soie. La consommation de nourriture se poursuit à l'intérieur de cet abri. Les larves préfèrent se nourrir du feuillage tendre de l'année mais

peuvent être forcées à consommer le vieux feuillage lorsque la population est élevée. Les larves du sixième stade mesurent entre 20 et 30mm de long et sont de couleur brun foncé. Les chenilles se transforment en chrysalide de la mi-juin au début juillet. Après 10 à 14 jours, le papillon adulte émerge de la chrysalide.

2.1.3 Dynamique des populations

Les invasions des populations de tordeuse sur de vastes territoires sont des phénomènes naturels résultant de la coévolution d'un système plante-insecte. La condition la plus importante pour l'apparition d'une invasion et pour la survie des jeunes larves semble être la présence d'une grande étendue de sapin baumier mature possédant une grande quantité de fleurs étaminées (Mattson *et al*, 1988; Blais, 1985a). Drouin (1997) a conclu qu'un été prématuré et sec augmente indirectement le taux de survie des jeunes larves. La chaleur et le faible taux d'humidité favorisent la production accrue des fleurs et du même coup augmentent directement la survie des larves. Des données recueillies sur une période de 300 ans indiquent que les infestations de tordeuse ont été plus fréquentes durant le 20^{e} siècle que durant les années antérieures. Les intervalles entre deux infestations varient actuellement entre 19 et 37 ans alors qu'avant le 20^{e} siècle, ces intervalles étaient d'environ de 60 à 100 ans (Blais, 1985b). Ce même auteur mentionne également que les infestations antérieures étaient restreintes à des régions spécifiques alors que maintenant elles ont augmenté en taille. Les raisons de cette augmentation de la fréquence et de l'étendue des infestations sont majoritairement attribuables aux changements causés par les activités humaines dans l'écosystème forestier. Le déboisement, la protection des incendies de forêt et l'utilisation de pesticides contre la tordeuse ont favorisé la présence des sapins baumiers, l'hôte préféré de l'insecte (Blais, 1985b).

Tel que mentionné auparavant, en période d'infestation sévère, les populations de tordeuse sont très élevées. Ainsi, durant cette période, on a déjà observé jusqu'à 60 millions d'hectares de forêt sévèrement défoliés par année. À l'opposé, en période endémique, les populations de tordeuse restent à de très bas niveau. Ce faible niveau de

population est associé à différents facteurs que l'on pourrait classer en deux catégories: les facteurs abiotiques et les facteurs biotiques. La température, l'humidité et les vents sont des exemples de facteurs abiotiques alors que les prédateurs (oiseaux, araignées), les parasitoïdes et les microorganismes (bactéries, virus) font parti des facteurs biotiques (U.S.D.A., 1985).

2.2 Les granulovirus

Les granulovirus (GV) sont des membres de la famille des Baculoviridae, taxonomiquement caractérisée par un génome d'acide désoxyribonucléique (ADN) circulaire, double brin possédant au moins 100 000 paires de base. Cet ADN est contenu à l'intérieur d'une capside enveloppée en forme de bâtonnet. Le nom baculovirus dérive du mot latin *baculum* signifiant bâtonnet ou barre à cause de la forme allongée de la particule virale. Les baculovirus sont des virus causant des maladies chez les arthropodes, notamment les insectes. Les particules virales possèdent une enveloppe entourant la nucléocapside qui contient un complexe déoxyribonucléoprotéique. Dans le cas des nucléopolyédrovirus (NPV) ou des GV les particules virales sont incluses dans une large capsule protéique nommée corps d'inclusion. Les NPV contiennent plusieurs particules virales par capsule alors que les GV n'en possèdent qu'une seule par corps d'inclusion (Kelly, 1987).

Les granulovirus se répliquent dans le noyau des cellules. Ils possèdent un cycle de réplication morphologiquement complexe résultant en deux formes de particules virales, l'une qui acquiert son enveloppe *de novo* dans le noyau destinée à être incorporée dans un granule et l'autre qui acquiert son enveloppe à la membrane plasmique. Les deux formes virales sont différentes biochimiquement et sérologiquement. La forme virale occlue dans un granule et assemblée dans le noyau est destinée à infecter un autre insecte alors que la forme virale, relarguée à la membrane plasmique, va infecter d'autres cellules chez le même organisme (Kelly, 1987). La nomenclature de chaque virus est établie selon l'insecte chez lequel le virus a été identifié (Tanada et Hess, 1991). Par exemple, le

granulovirus infectant la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) sera nommé ChfuGV.

2.2.1 Historique des granulovirus

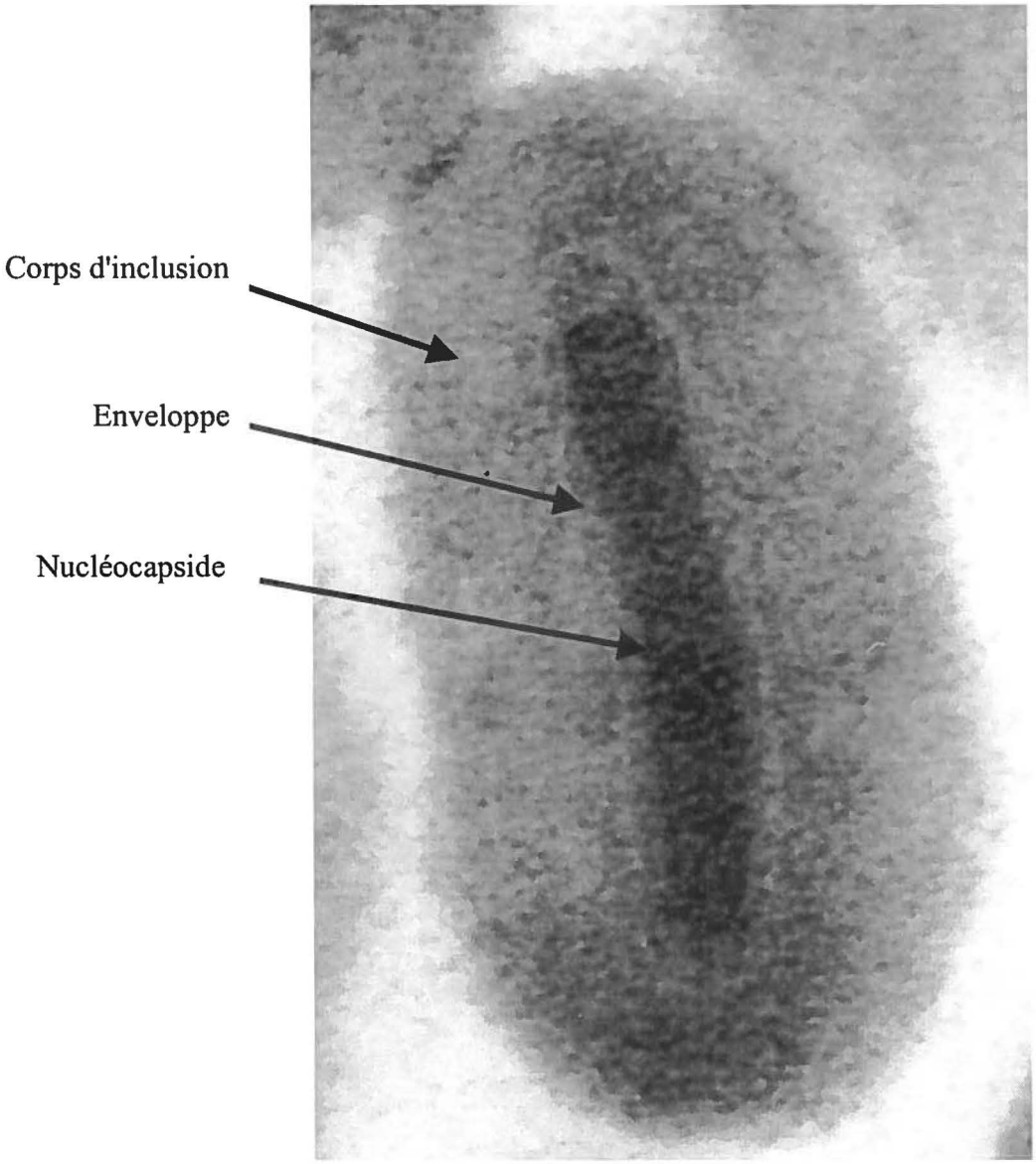
Une infection par un granulovirus fut observée la première fois par Paillot en 1926 chez la larve de *Pieris brassicae*. Quelques années plus tard, il décrit trois autres maladies similaires chez des larves de *Agrotis segetum*. À partir des différentes pathologies observées, Paillot a déterminé trois types de maladies causées par différents agents infectieux et les a nommés pseudo-grasserie 1, 2 et 3 (Huger, 1963). En 1947, une autre maladie du même type fut décrite par Steinhaus chez *Peridroma margaritosa*. La maladie provoquée par ces virus fut alors appelée granulose à cause de la présence de petites granules dans l'hémocèle (équivalent du sang chez l'insecte) des larves infectées lorsqu'elles étaient observées en microscopie optique (Tanada et Hess, 1991). En 1948, Bergold, à l'aide du microscope électronique a confirmé la nature suspecte du virus causant la granulose en isolant un virus en forme de bâtonnets lors de ses recherches sur *Choristoneura murinana* (Huger, 1963).

2.2.2 Ultrastructure des granulovirus

Les granulovirus sont composés de trois principales structures: le corps d'inclusion, l'enveloppe et la nucléocapside qui contient l'ADN (Figure 1). Le corps d'inclusion du GV, aussi appelé capsule ou granule, est généralement de forme ovocylindrique et mesure de 120 à 135 nm par 300 à 500 nm. À l'occasion, il peut être de forme ovoïdale ou ellipsoïdale et de grosseur variée (Tanada et Hess, 1991). Il est généralement admit que le corps d'inclusion ne contient qu'une particule infectieuse virale contrairement au NPV qui peut en contenir plusieurs.

Sous le corps d'inclusion on retrouve l'enveloppe qui mesure de 40 à 100 nm par 250 à 360 nm. Il existe deux mécanismes par lesquels le virion acquiert cette enveloppe.

Figure 1 : Micrographie électronique du ChfuGV, visualisé par la technique de coloration négative au PTA. Grossissement 120 000 X


Corps d'inclusion
Enveloppe
Nucléocapside

Le premier mécanisme est l'acquisition de la membrane lorsque la nucléocapside passe à travers la membrane plasmique du côté basolatéral de la cellule pour former un virion entouré d'une membrane bipolaire (Tanada et Hess, 1984). Le deuxième mécanisme, démontré par Summers et Arnott (1969) est la synthèse *de novo* de l'enveloppe à l'intérieur du cytoplasme. Selon Summers (1971), la membrane virale peut également dériver d'une prolifération de la membrane nucléaire autour de la nucléocapside lorsque cette dernière migre vers le cytoplasme.

Sous l'enveloppe on retrouve la nucléocapside qui est de forme cylindrique et qui est composée d'un noyau fait d'ADN et de protéines. Sa taille varie de 30 à 60 nm par 260 à 360 nm. Burley *et al* (1982), tel que rapporté par Tanada et Hess (1991), mentionnent que la capside est composée d'une série d'anneaux de 12 sous-unités empilées les unes sur les autres et alignées de façon perpendiculaire à l'axe longitudinal. Elle est également composée de deux polypeptides majeurs: une protéine de structure de haut poids moléculaire présente en plus grande quantité et une protéine de faible poids moléculaire riche en arginine et extrêmement basique. Selon les mêmes auteurs, lors de sa formation, la nucléocapside est nue et acquiert sa membrane lors de sa sortie du noyau cellulaire ou du cytoplasme. Chaque extrémités de la nucléocapside diffèrent l'une de l'autre. Une extrémité peut posséder la forme conique ou hémisphérique alors que l'autre extrémité est droite (Hess et Falcon, 1987). La nucléocapside semble posséder une polarité où l'extrémité conique entre en contact avec la membrane plasmique lors du processus de bourgeonnement cellulaire (Tanada et Hess, 1991).

2.2.3 Organisation du génome viral chez les granulovirus

Le génome des granulovirus est sous forme d'un ADN bicaténaire superenroulé et possède plus de 100 000 paires de bases (Summers et Anderson, 1972; Tweeten *et al*, 1977). Tweeten et collaborateurs (1977) ont démontré que l'ADN de *Plodia interpuntella* contient 25% de molécules circulaires superenroulées et 75% de molécules circulaires relaxées. La dimension du génome laisse croire qu'il pourrait coder pour environ 80 gènes dont 30 gènes seraient associés aux composantes structurales du virus (Kelly,

1982). La caractérisation du génome de plusieurs granulovirus a été réalisée notamment chez les GV affectant *Pierris brassicae* (Dwyer et Granados, 1987; Crook, 1981), *Choristoneura* Spp. (Arif *et al*, 1986), *Chilo* Spp. (Easwaramoorthy et Cory, 1990) *Plodia interpuntella* (Tweeten *et al*, 1977). L'ADN de chaque granulovirus possède une carte de restriction enzymatique unique permettant leur identification. Cette approche est particulièrement utile dans les processus de discrimination des différents GV et dans l'étude des relations phylogénétiques.

2.2.4 Protéines associées au corps d'inclusion chez les GV

La matrice formant le corps d'inclusion des granulovirus est constituée d'un réseau de protéines paracrystallines. Summers et Egawa (1973), mentionnent que cette matrice est reconnue pour être extrêmement stable contre la solubilisation par plusieurs solvants ayant un pH neutre et très résistante contre l'action des enzymes protéolytiques. La principale protéine associée à la matrice est la granuline. Cette dernière possède une masse moléculaire variant de 28 000 à 30 000 Dalton (Da) selon le type viral (Tanada et Hess, 1991). La granuline contient des sites de phosphorylation et de glycosylation. Ces modifications, suivant la synthèse protéique, peuvent jouer des rôles importants dans le cycle de réplication du virus. Un de ces rôles pourrait être l'attachement du virion à la surface cellulaire (Russell et Consigli, 1986). La granuline semble être une protéine très conservée parmi les différents types de granulovirus répertoriée jusqu'à maintenant (Jehle et Backhaus, 1994; Crook *et al*, 1997; Bah *et al*, 1997). La matrice protéique est composée de plusieurs sous-unités de granuline assemblées pour former un treillis protéique similaire à la polyhédrine chez le NPV (Tanada et Hess, 1991).

Une protéase est également associée au corps d'inclusion. En condition alcaline, elle faciliterait la dissolution de la matrice protéique lors du processus de libération de la nucléocapside enveloppée. La protéase dégraderait la granuline en produits de clivage de masse moléculaire plus faible et absent de la structure crystallique (Summers et Gale, 1975). La provenance de cette protéine demeure toutefois controversée. Nagata et Tanada (1983) prétendent qu'elle n'est pas codée par le génome viral mais proviendrait plutôt

d'une contamination cellulaire de l'insecte. Elle serait une composante du liquide intestinal dont le virus se servirait afin d'accélérer son cycle de réplication. Par opposition, Tweeten et collaborateurs (1978) suggèrent que cette protéase n'est pas une contamination mais fait bien partie de la matrice protéique virale. Des expériences d'inhibition de protéase ont permis de localiser cette dernière à la surface de la matrice protéique seulement, ce qui démontre qu'elle n'est pas le résultat d'une contamination exogène mais qu'elle est codée par le génome viral (Tweeten *et al*, 1978).

Au cours des dernières années, une autre protéine associée au corps d'inclusion a été décrite. Cette protéine appelée VEF (Viral Enhancing Factor) augmenterait l'infectivité virale en dégradant la membrane péritrophique ce qui faciliterait le passage du virus au niveau des cellules de l'intestin (Wang *et al*, 1994). La membrane péritrophique est une barrière physique longeant l'intestin moyen des insectes dont l'une des fonctions est d'empêcher les agents pathogènes microbiens de pénétrer dans les cellules intestinales (Derksen et Granados, 1988).

2.2.5 Protéines associées à l'enveloppe et à la nucléocapside

Peu de recherches ont été effectuées sur les protéines associées à l'enveloppe des GV. Cependant, plusieurs protéines de structure y ont été identifiées. Pour le PbGV isolé chez *Pieris brassicae*, douze polypeptides ont été identifiés (Brown *et al*, 1977) et chez PiGV retrouvé chez *Plodia interpunctella*, 15 protéines structurales y ont été répertoriées (Tweeten *et al*, 1980). Les travaux de Consigli *et al* (1986) montrent une grande variation dans la composition protéique des enveloppes avec des poids moléculaires allant de 12 à 160 kilodaltons (kDa) selon les types de granulovirus.

Par opposition aux protéines de l'enveloppe, plusieurs laboratoires de recherche se sont penchés sur l'étude des protéines de la nucléocapside du GV. Chez les granulovirus isolés chez *Pieris brassicae, Plodia interpunctella* et *Pseudaletia unipuncta* trois à huit polypeptides ont été identifiés avec des masses moléculaires variant de 12 à 73 kDa. De ces protéines, une en particulier semble jouer un rôle très important, il s'agit

de la p39. C'est une protéine extrêmement basique riche en arginine tout comme les protamines qui sont une classe de protéine impliquées dans la condensation de l'ADN (Rohrmann, 1992). Le génome du baculovirus n'étant pas associé à des histones, il a été suggéré que cette protéine riche en arginine et capable de se lier à l'ADN serait responsable de la condensation de l'ADN lors de l'assemblage des particules virales (Wilson et Consigli, 1985). Récemment, un nouveau gène du GV infectant *Trichoplusia ni* (TnGV) a été cloné et séquencé. Ce gène semble coder pour une protéine de la famille des hélicases jouant un rôle lors de la réplication du génome viral. Le rôle des hélicases est de séparer les deux brins d'ADN lors de la réplication de ce dernier (Bideshi *et al*, 1998).

2.2.6 Cycle de réplication des granulovirus

L'infection des granulovirus est caractérisée par deux phases distinctes soit l'infection primaire qui se déroule dans les cellules de l'intestin moyen et l'infection secondaire qui se déroule dans les cellules ciblées par le virus.

2.2.6.1 Voie d'entrée et premières cellules infectées

De façon générale, le virus pénètre dans l'insecte par voie orale suite à son ingestion (Granados, 1980). Selon ce même auteur, la région de l'intestin est la principale voie d'entrée du virion au niveau systémique. Seul l'intestin moyen semble jouer un rôle en procurant au virus le site primaire pour l'attachement et l'entrée dans la cellule. De plus, il indique que parmi les deux types majeurs de cellules retrouvées au niveau de l'intestin moyen chez les lépidoptères, seules les cellules épithéliales columnaires seraient impliquées dans l'infection. Également, Granados (1980) indique clairement que les cellules caliciformes, deuxième type cellulaire majeur de l'intestin moyen, sont apparemment résistantes à l'infection par les granulovirus

2.2.6.2 Infection primaire

Le mécanisme d'infection du GV énoncé ici est celui du TnGV (le granulovirus infectant *Trichoplusia ni*) décrit également par Summer et Arnott, (1969); Summers, (1971) et Tanada et Leutenegger, (1970). Suite à l'ingestion des virus par l'insecte, les particules virales enveloppées sont relarguées du corps d'inclusion. Ce phénomène résulte de la dissolution de la matrice protéique sous l'effet du pH alcalin de l'intestin moyen de l'insecte. Les enveloppes contenant les nucléocapsides fusionnent avec des microvillis des cellules épithéliales columnaires. Suite à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire du microvillus intestinal, la nucléocapside pénètre à l'intérieur de la cellule. Diverses observations ont permis de démontrer que seule la nucléocapside non enveloppée se retrouvent dans la cellule infectée. L'enveloppe virale ne pénètre pas dans la cellule mais demeure à sa surface. Tanada et Leutenegger (1970) suggèrent deux autres mécanismes d'entrée pour le TnGV à partir d'observations en microscopie électronique. Suite à l'ingestion des corps d'inclusions et à la dissolution de la matrice protéique, les enveloppes contenant la nuclécapside sont relâchées dans la lumière intestinale. Dans un premier mécanisme, ils proposent que les virions pénètrent entre la jonction de deux cellules columnaires, se déplacent dans l'espace intercellulaire jusqu'à la membrane basale où ils sont relâchés dans l'hémocèle. Cependant, aucune observation n'a pu expliquer comment les virions ont pu passer au travers de la jonction étroite retrouvée entre deux membranes intercellulaires. Dans le second mécanisme, il a été suggéré que les virions entrent dans la cellule par phagocytose (également appelé viropexie) et se multiplient subséquemment dans le noyau des cellules de l'intestin moyen. Les données disponibles jusqu'à maintenant suggèrent que la fusion membranaire, d'où résulte l'entrée cellulaire de la nucléocapside non enveloppée, est la principale voie d'entrée du virion dans les cellules.

Suite à l'entrée de la nucléocapside dans le cytoplasme, cette dernière peut être associée de façon spécifique ou non avec l'enveloppe nucléaire. Lors de l'association spécifique, l'alignement précis de la nucléocapside avec le pore nucléaire peut découler de la polarité distincte des deux extrémités de la nucléocapside. Des structures

ressemblant à des capsides vides ou partiellement remplies étaient également associées de façon similaire avec les pores nucléaires suggérant que le contenu d'ADN était injecté dans le noyau. Suite à ces observations, il a donc été conclu que la décapsidation du génome de TnGV prenait place aux pores nucléaires (Tanada et Hess, 1991).

Une fois dans le noyau, l'ADN viral passe à la phase écliptique c'est-à-dire qu'il survient dans cet organelle un processus important de multiplication de l'ADN. Après une période de 24 heures suivant l'infection, il est possible de détecter des virions non enveloppés. À ce stade d'infection, les cellules sont hypertrophiées et contiennent un stroma virogénique où sont assemblées les nucléocapsides. La nucléocapside peut acquérir son enveloppe par synthèse *de novo* dans le noyau ou le cytoplasme ou par bourgeonnement à travers la membrane cellulaire. Suite à une activité intense dans le noyau, l'enveloppe nucléaire perd son intégrité structurale à un moment précoce de l'infection et les composantes nucléaires et cytoplasmiques s'entremêlent. Par conséquent, l'infection débute dans le noyau et peut se poursuivre également dans le cytoplasme et les composantes cytoplasmiques. Des observations ont démontré que les nouveaux virions non enveloppés sont inclus dans des vésicules de sécrétion et que c'est par ce mécanisme qu'ils sont transportés jusqu'à la membrane basale. Cependant, le mécanisme par lequel ces vésicules contenant les virions passent au travers la membrane basale jusque dans l'hémocèle n'est pas encore déterminé. Il a donc été suggéré que l'autre façon pour le virion de sortir de la cellule serait par le bourgeonnement de la nucléocapside au travers la membrane basale. Ce type de bourgeonnement cellulaire a été observé chez quelques NPV qui est également membre des Baculoviridae (Adams *et al*, 1977; Hess et Falcon, 1977)

Tanada et Leutenegger (1970) proposent que suite à leur réplication dans les cellules de l'intestin moyen, les particules virales qui pénètrent dans l'hémocèle possèdent majoritairement une nucléocapside entourée d'une enveloppe. Il semble qu'un minimum de 24 heures soit nécessaires pour que la progéniture virale traverse la membrane basale et infecte les tissus cibles adjacents. Les virions issus de l'infection

primaire ne sont pas inclus dans une matrice protéique mais sont à l'état de nucléocapside enveloppée.

2.2.6.3 Infection secondaire.

La seconde phase de l'infection débute lorsque les nucléocapsides enveloppées non-incluses dans un granule sont relarguées des cellules de l'épithélium de l'intestin moyen. Les tissus de la matrice trachéale adjacents à l'intestin moyen sont souvent infectés par la progéniture virale (Beegle, 1978; Tanada *et al*, 1984) et parfois, quelques hémocytes peuvent également être infectés par ces virions (Tanada et Leutenegger, 1970). Toutefois, Begon et collaborateurs (1993) ainsi que Hess et Falcon (1987) ont démontré que les virions présents dans les hémocytes ne provenaient pas d'une infection virale mais plutôt de leur phagocytose par les hémocytes lors de la réaction de défense de l'insecte face au virus. Lors de l'infection secondaire, le site majeur de la réplication du virus est différent selon le type de syndrome provoqué par l'infection virale. Pour le syndrome de type II, le tissu adipeux est le site majeur de la réplication virale (Stairs *et al*, 1966). L'infection et la réplication virale dans cet organe diffèrent de celles qui surviennent dans les cellules de l'épithélium de l'intestin moyen à plusieurs niveaux. Les virions produits dans ces cellules sont inclus dans la matrice protéique virale. De plus, un augmentation du nombre de cellules infectées est observé lors de l'infection secondaire, la production de virions par cellules est plus élevée et la progéniture est relarguée par lyse cellulaire (Consigli *et al*, 1986). Les événements impliqués dans l'adsorption des GV à la cellule adipeuse ne sont pas bien définis. Il a été proposé que la particule virale s'attache à la cellule par les péplomères de l'enveloppe et que la pénétration survient par phagocytose (Adams *et al*, 1977). Ce mode d'entrée cellulaire lors de l'infection secondaire est celui retrouvé chez le NPV (Tanada et Kaya, 1993).

Un des premiers signes de l'infection des cellules adipeuses est l'augmentation importante de la taille du noyau. La chromatine de la cellule hôte est redistribuée vers la membrane nucléaire et un réseau de matériel dense semblant être de la chromatine agrégée se rassemble dans le noyau. Ce matériel dense, appelé stroma virogénique, est le

site de la synthèse de l'ADN viral et de l'assemblage de la nucléocapside. La formation du corps d'inclusion, qui est le dépôt de la granuline sur la surface de l'enveloppe virale, débute à une extrémité de la nucléocapside enveloppée et fait ensuite le tour du virion (Pinnock et Hess, 1978). Yamamoto et collaborateurs (1981) ont par la suite démontré que la matrice protéique possédait une affinité particulière pour l'enveloppe de la nucléocapside ce qui permettait l'assemblage du corps d'inclusion autour de la nucléocapside enveloppée. Une grande quantité de cellules deviennent remplies de virus inclus dans un granule et la membrane cellulaire se brise, libérant les virus inclus dans l'hémocèle et éventuellement causant la mort de l'insecte. Les virions inclus alors libérés deviennent disponibles pour l'infection d'un autre insecte suite à leur libération dans l'environnement externe (Huger, 1963).

2.2.7 Réplication des granulovirus *in vitro*

Présentement, seulement quelques chercheurs ont réussi à démontrer une réplication complète du GV *in vitro*. La difficulté de répliquer de façon *in vitro* ce virus explique le peu de recherches portant sur le granulovirus dans les domaines de la biochimie, de la biologie moléculaire et du génie génétique comparativement aux études sur le NPV, un virus capable de se répliquer *in vitro*. La difficulté de cultiver le GV *in vitro* vient de sa très grande spécificité cellulaire et donc de l'absence de culture cellulaire sensible à la réplication virale. Miltenburger et collaborateurs (1984) ont été les premiers à rapporter une réplication *in vitro* complète du granulovirus de *Cydia pomonella* sur des cellules dérivées d'oeufs de cet insecte. Cependant, au cours des dix dernières années qui ont suivi, aucun laboratoire n'a pu reproduire ces résultats (Tanada et Hess, 1991). Plus récemment, Granados et collaborateurs ont démontré que le TnGV pouvait se répliquer dans une lignée cellulaire primaire dérivée d'oeufs de *Trichoplusia ni*. Cependant, le pourcentage d'infection cellulaire varie de 1 à 60% (Granados *et al*, 1986). Également, Wistansley et Crook (1993) ont démontré que le granulovirus retrouvé chez *Cydia pomonella* (CpGV) pouvait se répliquer sur des cultures primaires d'oeufs d'insectes mais que ces cellules perdaient de leur susceptibilité et éventuellement ne pouvaient plus être infectées par le CpGV. Dernièrement, Lery *et al* (1997a,b) ont réussi à mettre au point

une lignée cellulaire permettant la réplication totale du granulovirus retrouvé chez *Spodoptera littoralis* (SpliGV). Ces succès récents permettront d'augmenter les recherches au niveau de la biologie moléculaire du granulovirus et les connaissances sur la réplication de ce dernier pourront être approfondies.

2.2.8 Pathologie associée aux granulovirus

Lorsqu'elles sont observées en microscopie optique, les cellules et les tissus des insectes infectés démontrent des changements marqués pouvant être caractérisés de la façon suivante. Martignoni (1957) et Witting (1959), tel que rapporté par Huger (1963) ont démontré que l'une des premières réactions visibles suite à l'infection est la prolifération mitotique des cellules adipeuses. Cette division cellulaire mène à une augmentation du volume des lobes des adipocytes. Du même coup, la taille du noyau s'accroît et la chromatine se condense. À ce stade de dégénérescence, souvent la chromatine va s'adhérer en une fine couche sous la membrane interne du noyau. Le noyau grossit jusqu'à ce qu'il remplisse une grande partie de la cellule entière. La cellule elle-même prend de l'expansion au cours de ce processus. Le noyau hypertrophié prend une apparence granulaire correspondant aux granules viraux. Ces granules peuvent également être observées dans le cytoplasme (Huger, 1963). Suivant le cours de l'infection, le noyau éclate permettant aux constituants cellulaires et cytoplasmiques de se confondrent. La cellule entière est alors remplie de granules viraux et de globules adipeux. Lorsque le processus pathologique est terminé, la membrane cellulaire éclate et les virions sont libérés dans l'hémocèle de l'insecte. Il arrive fréquemment que les cellules adipeuses infectées ne présentent aucun signe pathologique distinct des cellules normales.

Un phénomène similaire est observé lors de l'infection des cellules de l'épiderme et/ou de la matrice trachéale. Ce processus pathologique possède toutefois un délai plus ou moins long. Lors de l'infection des cellules épidermales, une hypertrophie des cellules atteignant jusqu'à dix fois l'épaisseur normale est parfois observée (Huger, 1963). Paillot (1935), Martignoni (1957) et Witting (1959), tel que rapporté par Huger (1963) ont

observé des invaginations dans la cavité abdominale des insectes infectés provoquées par l'hypertrophie des cellules épidermales.

2.3 Utilisation des virus comme agents de lutte biologique

Plusieurs virus appartenant aux familles Baculoviridae, Poxviridae, Réoviridae, Iridoviridae et Parvoviridae sont reconnus comme étant pathogènes pour les insectes. Certains de ces virus provoquent des épizooties naturelles chez des populations d'insectes. Actuellement, certains de ces virus sont produits commercialement comme biopesticide. La famille des Baculoviridae a certes reçu le plus d'attention comme agent pesticide viral pour plusieurs raisons: (i) les virus appartenant à cette famille sont reconnus pour causer des infections létales seulement chez les invertébrés, ils possèdent un spectre d'hôte restreint et sont plus sécuritaires que les autres virus d'insectes plus apparentés au virus de plante ou de vertébré; (ii) les baculovirus sont très pathogéniques et peuvent facilement être intégrés dans des processus de une production de masse; (iii) les particules virales du NPV et du GV sont entourées d'une couche de protéines crystalliques leur permettant d'être plus stables dans l'environnement et du même coup pouvant être compatibles avec d'autres formulations pesticides (Miller *et al*, 1983).

Dans un processus de commercialisation des granulovirus, diverses évaluations sur le terrain sont effectuées afin de vérifier leurs potentiels insecticides. Ces évaluations comparent le potentiel insecticide des granulovirus et celui de divers agents chimiques et biologiques déjà utilisés afin de contrôler les populations d'insectes ravageurs. Les granulovirus infectant *Pieris rapae* (Tatchell et Payne, 1984), *Laspeyresia pomonella* (Huber et Dickler, 1977), *Cydia pomonella* (Jaques *et al*, 1994; Glen et Payne, 1984), *Agrotis segetum* (Caballero *et al*, 1991), *Plodia interpuntella* (McGaughey, 1975) et *Sesamia cretica* (Fédière *et al*, 1997) ont fait l'objet de telles évaluations pour leur potentiel insecticide. Suite à ces évaluations, les conclusions générales à tirer sont i) l'efficacité comparable entre le granulovirus et les insecticides chimiques en ce qui a trait à la protection obtenue sur les récoltes suite à leur application; ii) le granulovirus est une alternative intéressante aux pesticides chimiques pour la protection de certaines récoltes;

iii) le granulovirus est plus sécuritaire pour les applicateurs et les consommateurs et ne cause pas d'effets indirects sur les arthropodes non ciblés.

2.4 Anatomie générale d'une larve d'insecte de lépidoptère

Afin de mieux comprendre et situer la présente recherche, une description sommaire de l'anatomie des insectes est nécessaire. Les larves d'insectes de lépidoptères possèdent généralement une forme plus ou moins allongée et cylindrique avec une symétrie bilatérale où les côtés gauche et droit de l'insecte sont essentiellement similaires (Figure 2). Le corps la larve est segmenté en trois régions distinctes qui sont la tête, le thorax et l'abdomen. La tête possède les yeux, les antennes et les parties buccales; le thorax possède les pattes et portera les ailes lorsque la larve deviendra mature alors que l'abdomen ne possède habituellement aucun appendice locomoteur (Borror *et al*, 1981).

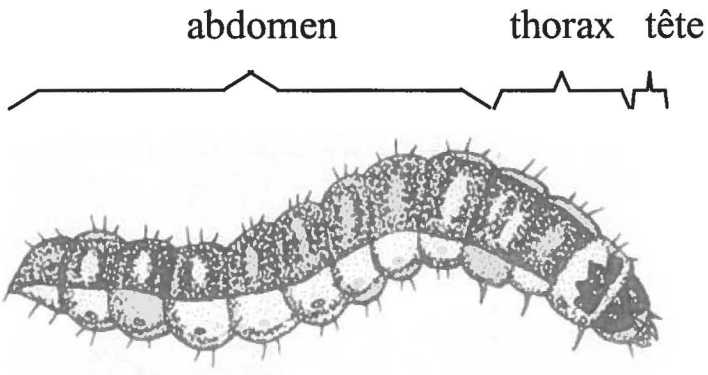
2.4.1 Système digestif

On peut diviser l'intestin en trois parties : l'intestin antérieur, l'intestin moyen et l'intestin postérieur.

L'intestin antérieur est avant tout une section servant à la digestion mécanique des aliments. Il débute avec la bouche, ensuite vient le pharynx qui agit comme une pompe permettant aux aliments partiellement mastiqués de passer au travers un tube pouvant être comparé à l'oesophage jusqu'au jabot. Ce dernier étant large, il permet d'entreposer les particules de nourriture. À l'extrémité du jabot et de l'intestin moyen, on retrouve le gésier agissant comme proventricule. Cet organe musclé et acéré complète le processus de digestion mécanique (Bell, 1997; Borror *et al*, 1981).

L'intestin moyen contient les caeca gastriques. Ces estomacs, avec leur grande surface de contact, produisent des enzymes permettant la digestion chimique des aliments. Les cellules sont typiquement columnaires et possèdent des microvillosités possédant des repliements cellulaires au niveau basal. L'augmentation de surface de

Figure 2: Anatomie générale d'une larve d'insecte de lépidoptère


abdomen
thorax
tête

contact dans cette région intestinale facilite le passage des nutriments au travers l'épithélium. Les cellules à gobelet semblent impliquées dans le transport des ions potassium de l'hémolymphe vers la lumière intestinale. La nourriture retrouvée dans l'intestin moyen est délimitée par la membrane péritrophique qui est sécrétée par les cellules de cet épithélium (McFarlane, 1985). Cette membrane composée principalement de chitine et de protéines possède plusieurs fonctions dont la protection de l'épithélium de l'intestin moyen contre l'abrasion causée par les aliments. Elle pourrait également agir de barrière face au microorganismes pathogènes incluant les virus (Derksen et Granados, 1988).

Finalement, l'intestin postérieur est impliqué dans la fabrication et l'excrétion des déchets alimentaires. Les tubules de Malpighi, jouant le rôle des reins, récupèrent les pertes en nitrate et en sels alors que l'intestin absorbe tous les résidus alimentaires et le surplus d'eau. Le rectum entrepose les déchets sous forme d'amas pour être éventuellement éliminer par l'anus (Bell, 1997).

2.4.2 Tissu adipeux

Chez les larves d'insecte, le tissu adipeux est le principal organe impliqué dans la synthèse de macromolécules et dans le métabolisme des nutriments et autres composés traversant la paroi de l'épithélium de l'intestin moyen. Il représente 40 à 60 % du poids total corporel de l'insecte et il est l'équivalent du foie chez les mammifères. Les cellules adipeuses sont responsables de la synthèse, de l'entreposage et du relargage des métabolites importants tout en possédant les principaux enzymes nécessaires à la détoxication. L'organisation du tissu adipeux varie parmi différents insectes et selon le stade de développement mais peut être décrite comme une agglomération de deux ou trois types cellulaires. Le principal type de cellule est le trophocyte qui est spécialisé dans les activités importantes mentionnées précédemment. L'urocyte est impliqué dans l'entreposage de l'acide urique et finalement le mycetocyte, retrouvé chez certains insectes, dont le rôle est plus ou moins bien connu (Friedman, 1985).

2.4.3 Tégument

Le tégument des insectes est l'interface entre l'animal vivant et son environnement. C'est un organe sensoriellement riche, capable de percevoir des stimuli sous forme chimique, électrique, mécanique, lumineux et thermique. Le tégument comprend la cuticule et l'épiderme. Ces deux tissus doivent agir en collaboration afin de fonctionner comme un organe. La cuticule, qui est l'exosquelette de l'insecte, est composée d'une série de couches protéiques constituées principalement de chitine dont le rôle est d'assurer le soutient et de garder la forme de l'insecte tout en assurant sa protection contre l'environnement externe. L'hypoderme est généralement composé d'une seule couche de cellules dans laquelle sont intrégrées plusieurs cellules à fonction glandulaires (glandes dermales et glandes de mue). Bien qu'il soit un tissu spécialisé, il possède plusieurs fonctions communes avec les autres types de cellules dont l'absorption de composés chimiques pour la synthèse et la sécrétion des déchets, le métabolisme cellulaire ainsi que la production de la cuticule (Hepburn, 1985; Borror *et al*, 1981).

2.4.4 Système respiratoire

Plusieurs variations peuvent survenir dans la disposition des organes du système respiratoire chez les insectes mais celui-ci est principalement composé d'un réseau de tubes trachéaux amenant l'air externe aux cellules de l'insecte. Les spiracles qui sont des ouvertures situées de chaque côté de l'abdomen de l'insecte sont ramifiées aux trachées et trachéoles. L'air externe entre par les spiracles et passe dans les trachées et trachéoles pour oxygéner l'hémolymphe de l'insecte d'où cet oxygène sera distribué à toutes les cellules de l'insecte (Nation, 1985)

2.5 Méthode de détection des gènes d'intérêts

L'étude des gènes et de leur produits par des méthodes biochimiques et moléculaires requiert souvent des échantillons de tissus contenant une grande quantité de molécules cibles. Plusieurs de ces gènes d'intérêts sont exprimés seulement dans

quelques cellules cibles ou sont parfois exprimés pour une brève période de temps. C'est pourquoi leur détection devient difficile. Les méthodes du PCR quantitatif et de l'hybridation *in situ* offrent l'avantage de détecter des gènes d'intérêts même s'ils ne sont présents qu'en faible quantité dans les tissus.

2.5.1 PCR quantitatif

2.5.1.1 Stratégie d'amplification

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) procure une très grande sensibilité en détectant une infime quantité d'ADN. Cette grande sensibilité permet son utilisation pour effectuer des applications diagnostiques. Cependant, la quantification de l'ADN est difficile car la réaction d'amplification procure des variations inter-échantillons et intra-échantillons. La variation inter-échantillon est créée par la qualité et la propreté de chaque échantillon. Ces impuretés retrouvées dans l'ADN sont suffisantes pour inhiber la réaction enzymatique. L'impossibilité d'éliminer complètement les inhibiteurs de PCR par des pré-traitements peut mener à une sous-estimation de la quantité de produits finaux. La variation intra-échantillon est créée suite à une diminution de l'efficacité enzymatique sous l'effet de la haute température nécessaire à la dénaturation de l'ADN. Afin de résoudre les problèmes associés au PCR quantitatif, deux approches ont été utilisées. La première approche exploite la phase logarithmique d'amplification où l'efficacité de la réaction n'est pas encore affectée par le nombre de cycles et ceci présumant qu'il n'y a pas de variation entre la qualité de chaque échantillon. Cette approche permet la comparaison des produits finaux de deux échantillons tout en s'assurant qu'il n'y a aucune variation inter ou intra-échantillon (Arrigo *et al*, 1989; Schnittman *et al*, 1989; Bagnarelli *et al*, 1991). Toutefois, pour plusieurs types d'échantillons, il est difficile de préparer de façon reproductible de l'ADN sans inhibiteurs. Cette approche est donc insatisfaisante pour la quantification d'échantillon clinique (Jalava *et al*, 1993). Tout dépendant de l'abondance de l'ADN cible, associée avec la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon, la quantité de produit obtenu ne peut être assumée comme étant un reflet précis de la quantité d'ADN initiale (Piatak *et al*, 1993).

La deuxième approche permettant d'éliminer les variations intra et inter-échantillons est l'utilisation d'un étalon interne lors d'un PCR compétitif. Avec ce type de PCR, il n'est pas nécessaire de réduire le nombre de cycles et la sensibilité de la réaction en est augmentée. L'étalon interne et l'ADN cible sont co-amplifiés dans un même tube et avec les mêmes amorces. La présence d'inhibiteurs devrait donc diminuer l'efficacité de la réaction de façon égale pour les deux types et ce par un même facteur.

Ces deux approches sont utilisées en comparant la quantité finale de produits amplifiés de l'ADN cible avec l'étalon interne pour lequel la quantité initiale utilisée lors de la réaction d'amplification est connue. Comme la séquence des amorces et de l'ADN cible contribue à l'efficacité de la réaction d'amplification, l'étalon interne devrait idéalement être identique à l'ADN cible alors que son produit d'amplification devrait être distinct du produit d'amplification de l'ADN cible. Ceci est possible en altérant un ou quelques nucléotides de l'ADN cible, créant et/ou abolissant un site de restriction enzymatique. Cette approche de construction de l'étalon interne possède quelques désavantages. Premièrement, la création ou la délétion d'un site de restriction enzymatique est un processus relativement complexe. Deuxièmement, comme l'ADN cible et l'étalon interne sont de longueur très similaire, la digestion avec une enzyme de restriction est une étape additionnelle obligatoire pour distinguer les deux espèces d'ADN (Sakar et Bolander, 1994).

Afin d'éviter cette étape supplémentaire, diverses stratégies pour synthétiser un étalon interne ont été élaborées. Une méthode utilisée par Sakar et Bolander (1994) consiste à utiliser, lors d'une première réaction d'amplification (PCR), une amorce spécifique à l'ADN cible mais possédant en plus une insertion de 26 nucléotides formée d'adénine et de thymidine. Lors de l'hybridation de cette amorce à l'ADN cible, l'insertion formée d'adénine et de thymidine ne peut s'hybrider provoquant la formation d'une boucle. Cette approche permet, lors des cycles suivant, de générer un étalon interne possédant 26 nucléotides de plus que l'ADN cible qui pouvait donc être distinct. Une autre méthode, celle-ci employée par Celi *et al* (1993), permet par opposition à la

précédente de synthétiser un étalon interne plus court que l'ADN cible. L'étalon interne est synthétisé en utilisant une amorce composée de deux parties. La première partie (à l'extrémité 5' de l'amorce) contient une séquence identique à celle de l'amorce sens utilisée pour l'amplification de l'ADN cible. La deuxième partie (à l'extrémité 3' de l'amorce) est identique à la séquence complémentaire à l'ADN cible mais situé 39 paires de bases plus loin que le site d'appariement de l'amorce sens, utilisée pour amplifier l'ADN cible. Lors des cycles suivant, un étalon interne possédant 39 nucléotides de moins que l'ADN cible sera amplifié et synthétisé.

2.5.1.2 Concept

Le but du PCR quantitatif est de déduire, à partir d'une quantité finale d'un produit d'amplification par PCR, le nombre initial de molécules ou le niveau de départ relatif de l'ADN cible parmi différents échantillons. Une des méthodes utilisées afin de quantifier les produits de PCR est l'amplification de l'ADN cible en utilisant une molécule d'ADN exogène agissant comme étalon interne. Cette méthode se nomme le PCR compétitif. L'amplification s'effectue réellement de façon compétitive car l'étalon interne et l'ADN cible compétitionnent pour les mêmes amorces afin d'être amplifiés. Une série de dilution de l'ADN cible ou de l'étalon interne est effectuée et une quantité constante de l'une ou l'autre molécule est ajoutée pour chaque réaction. La quantification des produits, suite à l'amplification, est effectuée en distinguant les deux produits d'amplification du PCR par leur taille. Un avantage important du PCR compétitif est qu'il n'est pas nécessaire d'obtenir les résultats avant que la réaction d'amplification n'atteigne la phase plateau car le ratio de l'ADN cible et de l'étalon interne reste constant durant l'amplification (Clontech laboratories, 1997).

La première étape, impliquée dans ce processus, est la mesure de la quantité des produits d'amplification de PCR obtenus. Plusieurs méthodes sont communément utilisées pour quantifier les produits d'amplification. L'approche la plus directe est la mesure du taux d'incorporation de nucléotides marqués. Cependant, l'utilisation de nucléotides marqués peut être problématique à cause du haut niveau de nucléotides non

incorporés dans l'amplicon. Une autre stratégie consiste à quantifier les produits d'amplification du PCR à l'aide d'hybridation par Southern blot. Il existe également plusieurs autres méthodes permettant la quantification des produits d'amplification. Elles incluent la mesure de la luminescence du bromure d'éthidium émanant du produit d'amplification révélé par un gel d'électrophorèse, l'utilisation de chromatographie liquide ou la transcription *in vitro* avec des nucléotides radiomarqués (Clontech laboratories, 1997)

La deuxième étape est celle de la quantification des produits d'amplification formés. Suite à l'amplification par PCR, les produits sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. Les quantités d'ADN de l'échantillon cible et de l'étalon interne sont évaluées pour chaque dilution. À partir de ces valeurs, la quantité de départ de l'ADN cible est estimée lorsque le ratio molaire du produit d'amplification de l'ADN cible et de l'étalon interne est égal à 1 (Clontech laboratories, 1997)

2.5.2 Hybridation *in situ*

La technique d'hybridation *in situ* à un acide ribonucléique (ARN) ou un ADN cellulaire est utilisée afin de déterminer la localisation précise d'un acide nucléique à l'intérieur d'une cellule grâce à une sonde complémentaire marquée. Cette technique est également utilisée pour augmenter le signal d'un gène en particulier permettant également de le localisé. L'ARN ou l'ADN contenu dans les cellules sont hybridés à une sonde spécifique marquée à la radioactivité ou par des produits chimiques. Cette sonde est ensuite détectée par autoradiographie lorsqu'elle est marquée de façon radioactive. Lorsqu'elle est marquée par des molécules chimiques, elle est détectée suite à l'ajout d'un anticorps couplé à une enzyme et à l'ajout du substrat enzymatique (Ausubel, 1989).

3. MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Production du virus inclus dans un granule

3.1.1 Élevage des larves

Les larves de tordeuse (*C. fumiferana*) utilisées pour l'élevage et la production du virus provenaient du FPMI (Forest Pest Management Institute) situé à Sault-Ste-Marie, Ontario. Ces larves de deuxième stade étaient livrées sur des rouleaux de gaze de coton et conservées à 4 degrés Celcius (^{o}C). Des morceaux de gaze de coton d'environ deux centimètres carrés (cm^2) sur lesquels se retrouvent une vingtaine de larves ont été déposés dans des godets (Solo cup) contenant de la nourriture artificielle (McMorran, 1965) (Annexe I). Ces godets ont été placés dans des chambres environnementales (Growth cabinet, Sanyo) à une température de 25 ^{o}C, avec une photopériode de 14 heures de lumière et 10 heures de noirceur durant sept jours et une humidité relative de 60% jusqu'à ce que les larves atteignent le quatrième stade.

3.1.2 Production virale

La production du ChfuGV en grande quantité s'effectue par une réplication du virus inclus et non-inclus dans un granule chez son hôte naturel. L'infection des larves est effectuée suite à l'ingestion de nourriture contaminée par le virus inclus. Plus précisément. Un volume de 50 microlitres (µL) d'une suspension virale contenant une concentration de 4 X 10^8 granules/millilitre diluée dans du saccharose 25 millimolaire (mM) (BDH) a été étalé à la surface de la nourriture artificielle contenue dans les godets. Par la suite, entre 10 à 20 larves du quatrième stade provenant de l'élevage ont été déposées dans chaque godet. Au total, environ 4000 larves du quatrième stade ont ainsi été infectées. Ces dernières furent placées en chambres environnementales dans les conditions décrites précédemment.

3.1.3 Purification virale

Les techniques utilisées pour la purification du virus inclus dans un granule sont basées sur celles décrites par Thompkins (1991). La purification du virus inclus est

effectuée en deux étapes. Premièrement, la purification partielle par centrifugation différentielle qui permet de récupérer les virus inclus et non inclus. Deuxièmement, la purification par gradient de glycérol permet de séparer les deux formes virales ainsi que les débris cellulaires selon leur masse moléculaire. Le produit final récolté permet de récupérer seulement les virus inclus dans un granule.

3.1.3.1 Purification partielle des virus inclus et non inclus dans un granule

Les larves de tordeuse infectées par le virus inclus ont été récoltées et homogénéisées dans une solution de sodium dodecyl sulfate (SDS) 1% (v/v) (Gibco BRL) avec un homogénéisateur Serval (Sorval) jusqu'à l'obtention d'un broyat liquide. L'utilisation du SDS permet de détruire les membranes lipidiques des cellules et facilite l'extraction des deux formes virales (incluse et non-incluse dans un granule). L'homogénat obtenu a été filtré à travers trois épaisseurs de gaze en coton et le filtrat récolté a été incubé à la température de la pièce pendant 30 minutes (min) afin de permettre la rupture totale des cellules infectées. Une centrifugation du filtrat à 1500 X g pendant 5 min à 4°C dans une centrifugeuse RC-5C (Sorval instruments) a permis de sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant a par la suite été récolté et centrifugé à 10000 X g pendant 25 min à 4°C dans un rotor de type GSA permettant aux virus inclus et non inclus de sédimenter au fond du tube. Le culot a été resuspendu dans une solution de NaCl 0,5 molaire (M) suivi d'une incubation de 30 min à la température de la pièce. Afin de co ıcentrer les virions, une deuxième centrifugation de 25 min à 10000 X g à 4°C dans un rotor de type GSA a été effectuée. Le culot récupéré fut ensuite lavé trois fois avec de l'eau distillée à l'aide de trois centrifugations à 10000 X g à 4°C dans un rotor de type SS34. Le culot final a été resuspendu dans un volume de 25 millilitres (mL) d'eau distillée.

3.1.3.2 Purification des virus inclus dans un granule par gradient de glycérol

Des gradients de glycérol (Sigma) de 60 à 100 % (v/v) ont premièrement été préparés dans des tubes Ultraclear 25 X 89 mm (Beckman). Des volumes de 6,5 mL de

chaque pourcentage de glycérol ont été déposés dans les tubes pour former un gradient discontinu. Par la suite, 8 mL du virus semi-purifié provenant des centrifugations différentielles (section 3.1.3.1) a été déposé sur le dessus des gradients de glycérol. Suite à l'équilibrage des tubes, une centrifugation des gradients à 80000 X g pendant 45 min à 4°C dans une ultracentrifugeuse Beckman L5-50 a permis de séparer le virus selon sa densité. Les virions inclus, caractérisé par une bande blanchâtre, se retrouve dans les fractions 80% et 90% du gradient de glycérol. Ces dernières ont été récoltées avec une pipette et lavées avec de l'eau distillée à l'aide de deux centrifugations de 10000 X g pendant 15 min à 4°C dans un rotor SS34. Le culot obtenu contenant les virions inclus a été resuspendu dans un volume de 6 mL d'eau distillée. La resuspension virale a été répartie dans trois microtubes à centrifuger de 2 mL qui ont été centrifugés dans une centrifugeuse de table à 12000 X g pendant 15 min à température de la pièce. Les culots ont été resuspendus dans 500 µL d'eau distillée et rassemblés dans un seul microtube à centrifuger. Une dernière centrifugation à 12000 X g de 15 min à température de la pièce a été effectuée sur le tube contenant le virus inclus et le culot fut resuspendu dans un volume final de 500 µL d'eau distillée.

3.2 Quantification et vérification de la pureté du virus.

La technique de coloration négative a été utilisée pour mettre en évidence le ChfuGV ce qui a permis de quantifier et de vérifier sa pureté. La suspension virale provenant de la section 3.1.3.2 a été diluée 1/100 dans un volume total de 100 µL dans des tubes Beckman 5 X 20 millimètres (mm) contenant une grille de cuivre recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone. Un volume de 100 µL contenant 3,51 X 10^8 de billes de latex (Marivac Limited) a été rajouté à la suspension virale diluée. Les tubes ont ensuite été centrifugés dans une centrifugeuse airfuge (Beckman) à une pression de 137 kiloPascal pendant 5 min à température de la pièce. La grille de cuivre a été colorée durant 1 minute dans l'acide phosphotungstique (PTA) 3% (v/v) (TAAB Laboratories Equipment Limited) et nettoyée 1 minute dans l'eau distillée. La grille de cuivre contenant l'échantillon viral, ainsi traitée, a pu être observée à l'aide d'un microscope

électronique Phillips 300 (Alain *et al*, 1989). La quantification du ChfuGV a été effectuée suite au dénombrement des virus inclus et des billes de latex (Annexe II).

3.3 Cinétique d'infection virale

Une cinétique de l'infection virale a été effectuée afin de suivre la quantité de copie du génome des virions non-inclus et inclus et de la granuline en fonction du nombre de jours suivant l'infection. Pour ce faire, des larves du quatrième stade provenant d'un élevage ont préalablement été recueillies et mises au jeûne pendant la nuit. Des morceaux de nourriture artificielle d'environ 2 millimètres carrés (mm^2) furent déposés dans des microtubes a centrifuger de 1,9 mL et imbibés avec une dose virale de 1 X 10^9 granules ou avec de l'eau pour les larves témoins. Les larves de *C. fumiferana* ont été déposées dans les microtubes à centrifuger à raison d'une larve par tube. Une période de 24 heures a été allouée aux larves afin qu'elles ingèrent totalement le morceau de nourriture artificielle contenant le virus. Après cette période, seules les larves ayant consommées la totalité de la nourriture ont été conservées et placées sur de la nourriture artificielle ne contenant pas de virus. Par la suite, les larves infectées et témoins ont été récoltées aléatoirement sur une base quotidienne jusqu'au dixième jour suivant l'infection. De celles-ci, quelques-unes ont été placées dans du formaldéhyde 10% tamponné (Fisher) ce qui inhibe les réactions enzymatiques post-mortem et permet de préserver la structure des cellules et des tissus. Ces insectes ont été employés pour la réalisation des coupes minces pour les hybridations *in situ* et l'histologie. Les autres larves ont été conservées à –20 °C pour utilisation ultérieure, en particulier pour l'extraction de l'ADN viral et cellulaire.

3.4 Quantification du génome viral par réaction de polymérase en chaîne (PCR) quantitatif

3.4.1 Extraction de l'ADN viral et de l'insecte

L'ADN du ChfuGV et celui de l'hôte furent extrait à l'aide du DNAzol™ *Reagent* (Gibco BRL) selon les directives du manufacturier. Cette méthode d'extraction de l'ADN

permet d'extraire l'ADN des virus non inclus mais également celui des virions inclus dans un granule. Cette technique permet donc d'extraire l'ADN des formes virales incluses et non incluses donc l'ADN viral total présent chez l'hôte infecté. Cette méthode d'extraction d'ADN va également extraire le génome de l'insecte infecté. Brièvement, des larves infectées par le ChfuGV et récoltées entre le premier et le dixième jour suivant l'infection ont été homogénéisées avec 1 mL de DNAzol™ *Reagent* dans un microtube à centrifuger de 1,5 mL au moyen d'un homogénéisateur. L'homogénat centrifugé pendant 10 min à 10000 X g. à température de la pièce et le surnageant visqueux fut transféré dans un nouveau tube propre. L'ADN a été précipité en ajoutant au surnageant un volume de 0,5 mL d'éthanol 100% par mL de DNAzol™ reagent utilisé. Une fois mélangé par inversion, le tube a été incubé pendant 3 min à température de la pièce. Afin de sédimenter l'ADN, une centrifugation de 2 min à 4000 X g fut effectuée à température de la pièce. Le culot a ensuite été lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol 95% (v/v) à l'aide de centrifugation de 15 min à 12000 X g également à température de la pièce. Suite au lavage, le culot d'ADN a été séché à l'air libre pendant 15 min avant d'être resuspendu dans de l'eau stérile et quantifié par spectrométrie. Afin de s'assurer que l'ADN des virus non-inclus et inclus dans un granule a été totalement extrait, un échantillon d'ADN ainsi que les surnageants furent visualisés au microscope électronique et aucune particule virale incluse ou non-incluse fut observé ce qui démontre que tous les granules viraux furent détruits et leurs ADN extrait.

L'ADN extrait a été dilué dans l'eau distillée dans un rapport 1:200. La densité optique de l'ADN dilué a par la suite été mesuré à une longueur d'onde de 260 nanomètres (nm) à l'aide d'un spectrophotomètre (Genequant; Pharmacia Biotech). Une unité de densité optique à 260 nm (DO_{260}) équivaut à 50 microgrammes (µg) d'ADN par mL. À partir d'une dilution d'ADN plasmidique de 1:200, la quantité d'ADN en microgramme par microlitre (µg/µL)= DO_{260} X 50 X 200 /1000

3.4.2 Synthèse des amorces

La séquence choisie pour amplifier le gène ciblé se situe au milieu du gène de la granuline du ChfuGV correspondant à 376 nucléotides. Les séquences des amorces sont, pour l'amorce sens 5'GCGGAAAGGAATTCCTTCGCG3' (GRAFO) et pour l'amorce antisens 5'GGCGGAAGTGGTTCCCACATATAC3' (GRARE).

3.4.3 Fabrication de l'étalon interne

L'étalon interne qui a été généré est identique à une portion du gène de la granuline du ChfuGV mais avec une délétion de 33 paires de base. La méthode utilisée pour fabriquer l'étalon interne a été celle utilisée par Celi *et al* (1993) qui permet de générer par PCR un étalon interne de poids moléculaire plus faible que celui du gène ciblé. Les séquences des amorces utilisées sont pour l'amorce sens 5'GCGGAAAGGAATTCCTTCGCGCCCATCACTACTGACCAAG3' et pour l'amorce antisens, la même amorce utilisée que pour amplifier le gène ciblé. Lors de l'amplification par PCR, l'étalon interne généré est de 33 nucléotides plus court que le gène ciblé. Les conditions d'amplification de l'étalon interne sont les suivantes: dans un microtube de 250 µL (Quality Scientific Plastic), on ajoute 38,25 µL d'eau distillée stérile, 1 µL (50 picomoles (pMole)) de chaque amorce sens et antisens, 5 µL de tampon PCR 10 X (200 millimolaires (mM) Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl) (Gibco BRL) 1,5 µL de $MgCl_2$ 50 mM (Gibco BRL), 1 µl de désoxynucléotides (5 µM de chaque nucléotide), 0,25 µL (1 unité) de Taq DNA polymerase (Gibco BRL), 1 µL (10 nanogrammes (ng)) d'ADN de ChfuGV et de l'insecte (section 3.4.1). Le mélange a été dénaturé 45 secondes (sec) à 94°C, la température d'appariement des amorces s'est effectuée à 55 °C pendant 45 sec et le temps d'élongation fut de 45 sec à 72 °C. Ce cycle a été répété 35 fois suivi d'une période d'élongation finale de 10 min à 72 °C. Toutes ces étapes ont été effectuées dans un thermocycleur Perkins Elmer 9600. Le produit de PCR a été cloné dans le vecteur PCR 2.1, transfecté dans des bactéries compétentes à l'aide de la trousse *TA Cloning Kit* (pCR 2.1) de In vitrogen et une mini-préparation a été effectuée sur les bactéries compétentes avec la trousse *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Boehringher.

3.4.3.1 Clonage de l'étalon interne

Avec la trousse TA *Cloning Kit* aucune digestion enzymatique n'est nécessaire pour générer des extrémités compatibles entre le fragment et le vecteur car la Taq polymérase insert une adénosine à l'extrémité 3' du produit de PCR et le vecteur contient une thymidine libre à ses extrémités 5' ce qui permet de cloner facilement l'insert. Afin d'effectuer le clonage, des volumes de 5 µL d'eau distillée stérile, 1 µL de tampon de ligation 10X (60 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl; 1 mg/mL de bovine serum albumin (BSA); 70 mM ß-mercaptoéthanol; 1 mM d'adénosine triphosphate (ATP); 20 mM dithiothréitol (DDT) et 10 mM de spermidine), 2 µL de vecteur pCR 2.1, 1 µL de produit de PCR correspondant à l'étalon interne (section 3.4.3) et 1 µL de T4 DNA ligase ont été ajoutés dans un microtube propre. Le mélange réactionnel fut incubé à 14°C toute la nuit.

3.4.3.2 Transformation bactérienne

La transformation bactérienne à été réalisée comme suit. Un volume de 2 µL de β–mercaptoéthanol 0.5M a été ajouté aux cellules inv α de souche *E. coli* provenant de la trousse TA *Cloning Kit*. Un volume de 2 µL de la réaction de ligation a été ajouté aux cellules compétentes et une agitation délicate a été effectuée. Suite à une incubation de 30 min dans la glace, le tube a été soumis à un choc thermique de 30 sec à 42°C. Un volume de 250 µL du milieu de culture SOC (2% (p/p) tryptone (Difco), 0,5% (p/p) extrait de levure (Difco), 10 mM NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de $MgCl_2 . 6H_2O$ (BDH), 20 mM de glucose (BDH) pH 7,0) a été ajouté au mélange suivi d'une incubation à 37 °C sous agitation constante de 225 rotations par minute (rpm) durant 1 heure. Les cellules ont ensuite été étalées sur une gélose nutritive 2xYT (1,6% (p/v) de tryptone, 1% d'extrait de levure, 0,5% (p/v) de NaCl, pH 7,0) supplémenté de 1,5% (p/v) d'agar noble (Difco) additionné de 50 µg/mL d'ampicilline (Boehringer). La gélose a été incubée 18 heures à 37 °C jusqu'à ce que les colonies bactériennes soit visibles.

3.4.3.3 Criblage des colonies recombinantes

Les colonies recombinantes ont été criblées individuellement par isolement des plasmides transfectés. Les bactéries provenant de la transformation bactérienne ont été repiquées et mises en culture dans 2.0 mL d'un milieu 2xYT additionné d'ampicilline. Après 18 heures d'incubation à 37°C sous agitation constante à 250 rpm, l'isolement des plasmides a été effectué avec la méthode du *Boiling Miniprep*. Brièvement, une quantité de 1,5 mL de suspension bactérienne a été centrifugée à 10000 X g pendant 2 à 3 min à température de la pièce. Le culot a par la suite été resuspendu dans 0,2 mL d'une solution de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 8% (v/v) saccharose, 0,5% (v/v) triton X-100 et 0,5mg/mL de lysosyme). La solution fut incubée 2 min dans l'eau bouillante permettant de précipiter l'ADN cellulaire. Suite à une centrifugation à 10000 X g pendant 15 min à température de la pièce, le surnageant fut récupéré et 300 µL d'isopropanol y fut ajouté. L'ADN plasmidique a été précipité suite à une centrifugation à 10000 X g pendant 15 min à température de la pièce et resuspendu dans 50 µL d'eau distillée. Il a par la suite été digéré avec une enzyme de restriction afin de vérifier s'il contenait le fragment de 343 paire de bases (pb) correspondant à l'étalon interne amplifié par PCR. Pour cette digestion, 2 µL de plasmide extrait a été ajouté à 1 µL (10 unités) d'enzyme de restriction *Eco*RI, 1 µL de tampon de réaction 10X (0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M $MgCl_2$; 1 M NaCl) (Gibco BRL) et 6 µL d'eau distillée. La réaction enzymatique fut d'une durée d'une heure à 37 °C. La présence du fragment dans le plasmide a été vérifié par une électrophorèse d'un gel d'agarose 0,8 % (p/v).

3.4.3.4 Purification du plasmide contenant l'étalon interne

La trousse *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Boehringer) a été utilisée pour isoler le plasmide contenant le gène de la granuline. Une des colonies contenant l'étalon interne a été mise en culture pendant 18 heures sous agitation constante de 250 rpm à 37 °C. Suite à une centrifugation de 2 mL de la suspension bactérienne à 10000 X g durant deux à trois min à température de la pièce, 250 µL de la solution de resuspension (50 mM Tris-

HCl, 10 mM EDTA pH 8.0 et RNase 0,1 milligramme par millilitre (mg/mL)) fut ajouté au culot. À ce mélange, un volume de 250 µL d'une solution de lyse (0,2 M NaOH et 1% SDS) suivi d'une incubation de 5 min à la température de la pièce. Les débris cellulaires ont été culottés par une centrifugation de 10 min à 10000 X g. Le surnageant a alors été transféré dans un tube filtré auquel le tube collecteur fut combiné. Deux centrifugation de 60 sec à 10000 X g à température de la pièce ont suivi, permettant à l'ADN plasmidique d'être retenu par le filtre. Une quantité de 700 µL de solution de lavage (20 mM NaCl et 2 mM Tris-HCl pH 7,5) fut ajoutée dans le tube filtré suivi d'une centrifugation de 60 sec à 10000 X g. Le tube collecteur fut remplacé par un microtube propre et 75 µL de la solution d'élution fut ajouté à l'ADN plasmidique. Ce denier fut récolté suite à une dernière centrifugation de 30 sec à 10000 X g. Le plasmide contenant l'étalon interne a par la suite été quantifié par spectrophotométrie comme à la section 3.4.1.

3.4.4 PCR compétitif

Les PCR compétitifs sont effectués en utilisant une concentration fixe d'ADN viral mais avec différentes dilutions de l'étalon interne. Lors des premières expériences, des concentrations logarithmiques de 0,489, 4,89, 48,9, 489 et 4890 attomoles/µL (Annexe II) de l'étalon interne ont été utilisées afin de déterminer la quantité approximative d'ADN de ChfuGV contenu chez les larves récoltées entre le premier et le dixième jour suivant l'infection. Lors d'un deuxième PCR compétitif, des concentrations semi-logarithmiques de l'étalon interne ont été utilisées. À titre d'exemple, les concentrations 382, 764, 1528, 3057, 6115 et 12 230 attomoles/µL ont été choisies en fonction des résultats obtenus suite au premier PCR compétitif. Ces concentrations permettent de mieux cibler la quantité d'ADN du ChfuGV présent dans l'échantillon à analyser.

Les différents produits du mélange réactionnel furent ajouté dans un microtube de 250 µL (Quality Scientific Plastic) dans l'ordre suivant : 38,25 µL d'eau distillée stérile, 1 µL (50 pMole) de chaque amorce GRAFO et GRARE, 5 µL de tampon PCR 10 X (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl) (Gibgo BRL) 1,5 µL de $MgCl_2$ 50 mM(Gibco BRL),

0,25 µL (1 unité) de Taq DNA polymerase (Gibco BRL), 1 µL (10 ng) d'ADN de ChfuGV et de l'insecte (voir la section 3.4.1) et 1 µL d'une des concentrations de l'étalon interne. Après avoir bien mélangé les produits, les tubes ont été soumis à 35 cycles d'amplification. Chaque cycle comprenait une phase de dénaturation d'une durée de 45 sec à 94°C, une phase d'appariement des amorces de 45 sec à 55 °C et une phase d'élongation de 45 sec à 72 °C. Une phase d'élongation additionnelle de 10 min à 72 °C était ajouté aux 35 premier cycles permettant de terminer complètement l'amplification des brins d'ADN. Pour chaque échantillon d'ADN viral, un premier PCR compétitif a été effectué avec toute les concentrations d'étalon interne suivantes: 0,489, 4,89, 48,9, 489 et 4890 attomoles/µL.

Suite à l'amplification, 1 µg de marqueur de masse moléculaire 100 paires de base (Gibco BRL) ainsi que 5 µL de chaque produit de PCR ont été déposés dans un puits d'un gel d'agarose de 2,5% (p/v). Les conditions de migration ont été de 90 volts pendant 90 min. Les produits d'amplification ont été révélés suite à l'immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium concentrée à 0,5 µg/mL pendant 30 min. Suite aux résultats obtenus, un deuxième PCR compétitif a été effectué avec la même concentration d'ADN viral et de l'insecte (10 ng/µL) mais en changeant les concentrations de l'étalon interne en fonction de ceux-ci. Suite à la deuxième amplification, une même quantité de produit d'amplification a également été déposé dans un gel d'agarose de 2,5% (p/v) et soumis aux même conditions de migration et de coloration. Après la coloration, la photo du gel fut digitalisée et une analyse densimétrique a été effectuée. Chaque échantillon d'ADN provenant de larves infectées entre le premier et le dixième jour suivant l'infection a été quantifié par PCR compétitif.

3.4.5 Analyse des données du PCR quantitatif

Le calcul de la quantité d'ADN de ChfuGV retrouvée dans chaque échantillon a été effectué à l'aide du logiciel Multi-Analyst 1.0 (Bio-Rad laboratories). L'intensité des bandes correspondant au gène ciblé et à l'étalon interne a été déterminée à l'aide du logiciel. L'intensité lumineuse des bandes est le reflet de la quantité de produits

d'amplification car le gène ciblé et le standard interne possèdent approximativement le même poids moléculaire ce qui permet une incorporation égale du bromure d'éthidium dans les deux produits d'amplification. Les quantités relatives du produit d'amplification du gène ciblé et de l'étalon interne sont ensuite comparées. Les quantités initiales du gène ciblé et de l'étalon interne sont considérées comme équivalentes lorsque le ratio molaire du produit du gène ciblé et celui de l'étalon interne sont jugés comme étant égaux (Clontech laboratories, 1997).

La détermination du nombre de copie du génome des virions inclus et non-inclus à partir des résultats de PCR compétitif est une mesure semi-quantitative, une mesure quantitative plus précise a été effectuée par une analyse densimétrique des résultats obtenus. Suite à la détermination des D.O. des produits d'amplification du gène ciblé et de l'étalon interne avec le logiciel Multi-analyst 1.0 (Bio-Rad), un graphique du logarithme des ratios de la D.O. du produit d'amplification du gène cible sur celle de l'étalon interne en fonction du logarithme des concentrations de l'étalon interne utilisées a été produit. Par la suite le calcul de même que la représentation de la droite de régression, accompagnée de son équation ont été effectués. Le nombre de copies du ChfuGV présent chez l'insecte infecté a été calculé en isolant la variable x lorsque y = 1 (l'intensité du produit de PCR du gène ciblé est égale à l'intensité du produit de l'étalon interne) dans l'équation suivante $y = mx + b$ où y = LOG 1 (équivalent à 0), m = pente de la droite, b = ordonnée à l'origine et x (nombre de copie du génome viral) = $10^{(-b/m)}$

Suite à la détermination de la quantité de génome des virions inclus et non-inclus présent chez les larves entre le premier et le dixième jour suivant l'infection, l'expérience du PCR quantitatif a été répétée trois fois. À partir des points obtenus, une droite de régression entre les quantités d'ADN viral et le temps d'infection a été calculée et représentée. Une analyse de corrélation entre ces deux variables a été effectuée à l'aide du logiciel SysStat 8.0.

3.5 Cinétique d'apparition de la granuline

La granuline est la principale protéine associée au corps d'inclusion du virus inclus. La concentration de cette protéine donne un reflet de la présence des particules virales incluses et elle peut être facilement détectable sur un gel de polyacrylamide ce qui lui permet d'être un bon marqueur de la quantité de virus inclus présent chez l'hôte. Plus la quantité de granuline est élevée, plus la quantité des virions inclus est élevée. Une quantité fixe de protéines pour tous les échantillons a été chargée sur un gel de polyacrylamide de 12 % permettant une bonne résolution des protéines contenues dans le broyat larvaire. Les bandes correspondantes à la granuline ont été analysées afin de permettre d'estimer la charge virale chez les insectes.

3.5.1 Dosage protéique des broyats larvaires

Dix larves de *C. fumiferana* de quatrième stade, récoltées entre le premier et le dixième jour d'infection ainsi que dix larves saines du même stade ont été broyées séparément dans du PBS 1X (Gibco) avec un homogénéisateur miniature. Les broyats furent diluées 1/50, 1/100 et 1/200 dans du PBS 1X et 100 µL de chaque dilution a été déposée dans une plaque multipuits (Nunc) avec un réplicat pour chaque dilution. Deuxièmement, une courbe étalon de BSA (Boehringer manheim) a été préparée suite à une dilution de celui-ci dans du PBS 1X (Gibco) afin d'obtenir des concentrations de 5, 10, 20, 30, 40 et 50 µg /100 µL . Un volume de 100 µL de chaque dilution est déposé dans la plaque multipuits en réplicat. Le blanc est composé seulement de PBS 1X. À chaque puits a été ajouté un volume de 100 µL de *Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad laboratories) dilué au préalable à 40 % (v/v) dans du PBS 1X suivi d'une incubation de 10 min à température de la pièce. La quantité de protéines totales a été déterminée suite à la lecture de la plaque multipuits avec un lecteur de plaque multipuits (Benchmark microplate reader, Bio-Rad laboratories) à une longueur d'onde de 592 nm. À partir du graphique de la courbe standard de BSA, la quantité de protéines totales présentes chez les insectes infectés et chez les larves non infectées a pu être obtenue.

3.5.2 Électrophorèse des protéines totales

Suite au dosage protéique, deux gels de polyacrylamide de 12 % ont dans un premier temps été préparés (Annexe III). Dans un microtube, une quantité de 40 µg d'extrait larvaire provenant de larves infectées et saines a été ajoutés à 10 µL de tampon protéine (Annexe III). Les échantillons présents dans les microtubes furent incubés à 100 °C pendant 5 min ce qui permet la dénaturation complète des protéines et ils ont été chargés sur les gels de polyacrylamide. Cette étape a été effectuée pour tous les extraits larvaires provenant des larves infectées entre le premier et le dixième jour suivant l'infection ainsi qu'avec 40 µg d'un broyat provenant de larves saines. Une dose de $1X10^9$ granules viraux purifiées agissant comme contrôle positif ainsi que 2 µL du marqueur protéique *Rainbow Ladder* (Amersham) ont également été chargés sur les gels de polyacrylamide. Les conditions d'électrophorèse ont été de 2 heures de migration à 100 volts dans un tampon d'électrophorèse à base de glycine (5 grammes par litre (g/L) Tris-base, 14,4 g/L glycine, 1 g/L SDS). Le gel a ensuite été coloré pendant 20 min au bleu de Coomassie (Annexe III) et décoloré 5 heures à l'aide d'une solution décolorante et ce, en la changeant une fois après 1 heure (Annexe III).

3.6 Révélation de la granuline par un transfert de type Western

Afin de s'assurer que les bandes observées sur le gel de polyacrylamide correspondaient bien à la granuline, un immunobuvardage a été effectué.

3.6.1 Migration et transfert électrophorétique

Une migration électrophorétique des broyats de larves récoltées du premier au dixième jour suivant l'infection, d'un broyat provenant de larves saines et de $1X10^9$ granules viraux purifiées a été effectuée sur un gel de polyacrylamide 12 % tel que mentionné à la section 3.5.2. Le gel fut ensuite transféré et équilibré dans un tampon de transfert (20% (v/v) méthanol, 0,192 M de glycine, 0,025M Tris-HCl pH 8,3) pendant 30 min à 4°C. Le transfert électrophorétique des protéines sur une membrane a été réalisé à

l'aide du système *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfert Cell* (Bio-Rad laboratories). Le gel a également été équilibré en le baignant dans la solution de transfert pendant 15 min. Cette étape permet aux charges ioniques présentes sur le gel de s'annuler. Ce dernier fut étalé sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore) préalablement activée avec du méthanol 100% et équilibrée de la même façon que le gel dans le tampon de transfert. La membrane et le gel ont par la suite été insérés entre deux papiers filtres no3 (Whatmann) saturés de tampon de transfert et immobilisés par deux coussinets de fibre. L'ensemble fut inséré dans un support rigide et fixé dans une cellule d'électrophorèse contenant du tampon de transfert. L'ensemble fut fixé de sorte que le gel se retrouve du côté de la cathode et la membrane du côté de l'anode. Le transfert a été réalisé sous un voltage de 100 volts durant 2 heures à 4°C.

3.6.2 Production d'anticorps dirigés contre le ChfuGV

Afin d'obtenir des anticorps dirigés contre le ChfuGV, des granules viraux complets ont été injecté dans un lapin "New-Zealand white". Cette immunisation permet la production d'un sérum contenant des anticorps polyclonaux contre toutes les protéines structurales du virus. Au jour 0 de la production d'anticorps, une prise de sang pré-immun fut effectuée. Cet échantillon sanguin ne contient aucun anticorps contre le virus. Suite à cette prise de sang pré-immun, une inoculation primaire sous-cutanée contenant 0.5 mL d'adjuvant complet de Freund aidant à initier la réponse immunitaire et 0.5 mL d'une suspension virale purifiée de 2 X 10^{11} granules/mL fut injectée au lapin. Au jour 14, une seconde prise de sang fut effectué. Cet échantillon contenait des anticorps dirigés contre le ChfuGV. Au jour 21 et 42, des rappels intraveineux de 0,5 mL d'une suspension virale purifiée contant 2 X 10^{11} granules/mL furent administrés au lapin et des prise de sang furent effectuées au jour 28 et 49 suivant l'immunisation. Finalement le lapin fut saigné à blanc au jour 52 suivant la première injection de la suspension virale. Le sérum contenant les anticorps a été isolé du reste des composants sanguin à l'aide d'une centrifugation à 450 X g durant 15 min. les érythrocytes se retrouvent alors sédimentés et le sérum fut recueilli et conservé à –20°C jusqu'à son utilisation.

3.6.3 Immunobuvardage de type Western

Suite au transfert du gel de polyacrylamide (section 3.6.1), la membrane fut incubée durant 18 heures sous agitation constante dans une solution de blocage (2% BSA (p/v), 0.2% Tween-20 (v/v), 50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5). Une fois la membrane saturée, cette dernière a été incubée pendant une heure dans une solution contenant un anticorps polyclonal dirigé contre le ChfuGV produit chez le lapin. Ce dernier fut dilué 1:1000 dans le tampon de dilution (1% BSA (p/v), 0,1% Tween-20 (v/v), 50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5). Suite à l'incubation de la membrane dans le sérum cette dernière fut soumise à trois lavages de 15 min à la température de la pièce et sous agitation constante dans un tampon de lavage (0,05% Tween-20 (v/v), 50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5). La membrane a par la suite subit deux autres lavages de 10 min à la température de la pièce sous agitation constante dans un second tampon de lavage (50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5) permettant d'éliminer le Tween-20. Une incubation de la membrane a été effectuée à la température de la pièce pendant 1 heure dans une solution contenant un anticorps dirigé contre les IgG de lapin et couplé à l'enzyme HRPO (KPL) dilué 1:5000 dans le tampon de dilution (1% BSA (p/v), 0,1% Tween-20 (v/v), 50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5). Après l'incubation, la membrane a été lavée trois fois à la température de la pièce pendant 15 min sous agitation constante en utilisant le premier tampon de lavage (0,05% Tween-20 (v/v), 50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5) et deux fois pendant 10 min sous agitation constante dans le deuxième tampon de lavage (50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5). La membrane a été transférée dans une solution de révélation contenant un substrat enzymatique. Cette solution de révélation contenait 0,06% de 4-chloro-1-naphtol (p/v) (4CN; Bio-Rad), 0,015% (v/v) de peroxyde d'hydrogène (Sigma), 20% méthanol (v/v) et 80% (v/v) de tampon contenant 50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5. La membrane fut incubée jusqu'à l'apparition des bandes et la réaction fut arrêtée en transférant la membrane dans l'eau distillée pendant 15 min à la température de la pièce.

3.7 Détection du ChfuGV par hybridation *in situ*

La technique d'hybridation *in situ* permet de révéler la présence du génome viral dans les cellules des insectes infectés. À partir de coupes minces d'insectes, l'hybridation d'une sonde marquée avec le génome viral était révélée suite à l'ajout d'un anticorps couplé à une enzyme et à l'ajout du substrat enzymatique. La méthode décrite est basée sur les publications de Poulos *et al* (1994), Rolighead et Lindeberg (1996) et Braissaint et Wahli (1998).

3.7.1 Fabrication de la sonde

3.7.1.1 Purification de l'ADN

Un volume de 20 µL de bactéries transformées avec le gène de la granuline du ChfuGV clonée dans le vecteur Puc 19 (Bah *et al*, 1997) a été ensemencé dans 2 mL de milieu de culture 2xYT (1,6% (p/v) de tryptone, 1% d'extrait de levure, 0,5% (p/v) de NaCl, pH 7,0) auquel a été ajouté 1,5% (p/v) d'agar noble (Difco). Le milieu de culture contenant les bactéries a ensuite été incubé pendant 18 heures sous agitation constante de 250 rpm à 37 °C afin d'obtenir la phase exponentielle de croissance des bactéries. La trousse *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Boehringer) a été utilisée pour purifier le plasmide Puc19 contenant le gène de la granuline du ChfuGV cloné. Les étapes de purification de l'ADN utilisées dans cette section sont les mêmes que celles de la section 3.4.3.4.

3.7.1.2 Marquage de la sonde par PCR

La sonde a été fabriquée et marquée à l'aide de la trousse PCR DIG *Probe Synthesis Kit* (Boehringer). Cette méthode consiste à marquer avec des molécules de digoxigénine un produit amplifié par PCR. La sonde qui a été fabriquée et marquée est identique au gène de la granuline. Les réactifs utilisés ainsi que leurs concentrations finales sont les suivants: 50 pMole de chaque amorce sens et antisens spécifiques au gène de la granuline (Bah *et al*, 1997), 200 µM de nucléotides mélangés à la digoxigénine, 5

µL de tampon PCR 10 X (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl) (Gibgo BRL), 1,5 µL de $MgCl_2$ (mM) (Gibco BRL), 2,6 unités de mélange d'enzymes *Expand™ High Fidelity* ainsi que 1 µL de la minipréparation de plasmide purifiée contenant le gène de la granuline (section 3.7.1.1). Le mélange a été dénaturé 45 sec à 94°C, la température d'appariement des amorces s'est effectuée à 55 °C pendant 45 sec et le temps d'élongation fut de 45 sec à 72 °C. Ce cycle a été répété 35 fois suivi d'une période d'élongation finale de 10 min à 72 °C. Toutes ces étapes ont été effectuées dans un thermocycleur Perkins Elmer 9600.

3.7.2 Évaluation de la quantité de sonde marquée

Afin de déterminer la quantité de digoxigénine incorporée dans le produit de PCR, une quantification à l'aide d'un témoin dont la concentration est connue a été réalisée. Cette méthode est exécutée avec la trousse DIG DNA *Labeling Kit* de Boehringer. Premièrement, des dilutions du produit de PCR (section 3.7.1.2) et du témoin marqué variant de 1/50 à 1/500000 ont été effectuées. Par la suite, 1 µL de ces dilutions ont été imbibées sur une membrane de nylon d'une porosité de 45 microns (Biotrans nylon membrane; ICN). La membrane a été ensuite placée sur un filtre humidifié avec du SSC 2X (NaCl 0,3 M et 0,03 M citrate de sodium) et l'ADN a été fixé en plaçant la membrane sous les rayons ultraviolets (U.V.) pendant 4 min. Par la suite, la membrane a été incubée pendant 5 min dans un tampon de 0.1M Tris-HCl pH 7,5, 0,15M NaCl (tampon # 1) et transférée dans une solution de blocage 1% (tampon # 2 ; blocking reagent; Boehringer) diluée dans une solution de 0,1M d'acide maléique, NaCl 0,15M; pH 7,5 pendant 30 min. Une deuxième incubation de la membrane dans une solution contenant un anticorps dirigé contre la digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (Anti-Digoxigénine-AP; Boehringer) diluée 1/10000 dans la solution de blocage 1% a été effectuée pendant 30 min. Deux lavages successifs de la membrane dans le tampon # 1 pendant 15 min furent effectués suivi d'une incubation dans un tampon de 0,1M Tris-HCl pH 9,5, 0,1M NaCl (tampon # 3) durant 5 min. La membrane a par la suite été incubée dans le substrat CDP STAR (Tropix) dilué 1/100 dans le tampon # 3 pendant 10 min suivi d'une exposition à la noirceur d'une minute sur un film X-omat (Kodak). Le film

est ensuite développé dans un développeur automatique (Kodak X-omat M20 processor). L'évaluation approximative de la quantité de sonde marquée par PCR a été effectuée en comparant la sonde marquée avec le témoin dont la concentration était connue.

3.7.3 Coupes histologiques des larves

Afin de permettre l'hybridation de la sonde marquée avec le génome viral présent dans les tissus des insectes, des coupes minces de tissus enrobés dans la paraffine ont été effectuées sur des larves sélectionnées de façon aléatoire entre le premier et le dixième jour suivant l'infection.

3.7.3.1 Fixation et déshydratation

Les étapes menant à la fixation et à la déshydratation des insectes sont accomplies dans un processeur électronique (Tissus Tek vacuum infiltration processor; Miles Scientific). Premièrement, les insectes sont déposés dans des cassettes à tissus (Unicassette ;Tissu-Tek) qui sont ensuite placées dans l'appareil électronique dont le rôle est d'immerger les insectes dans différents bains successifs de produits chimiques. Au total, les larves ont été immergées dans 14 bains contenant les différents produits menant à la fixation et à la déshydratation de l'insecte. Sommairement, les insectes furent plongés dans du formaldéhyde tamponné 10% (Tissus fix, Fisher) pendant 2 heures suivi de bains dans l'éthanol 70% (v/v), 95% (v/v) et 100% pendant 30 min chacun et de trois bains successifs dans l'éthanol 100% durant 45 min. Afin d'éliminer le surplus d'alcool, trois bains de toluène ont été effectués pour une durée respective de 20, 30 et 45 min chacun. Finalement, les insectes sont soumis à quatre bains de paraffine liquide (Paraplast) à 65 ^{o}C. Ces dernières étapes se nomment imprégnation et sont d'une durée de 20 et 30 min pour les deux premiers bains et de 45 min pour les deux derniers.

3.7.3.2 Coupe

Les larves déshydratées et imprégnées de paraffine sont enrobées dans un bloc de paraffine. Plus précisément, les insectes sont placés dans un moule rigide où de la paraffine liquide est coulée à l'aide d'un distributeur de paraffine liquide (Tissus Tek dispending console). Les moules sont refroidis sur une plaque réfrigérante (Tissus Tek cryoconsole) maintenue à une température de 4°C. Les larves incluses dans les blocs de paraffine sont démoulées et coupées au microtome (Jung biocut 2035; Leica). Des coupes histologiques d'une épaisseur de 5 microns ont été réalisées. Ces coupes ont été déposées sur des lames histologiques (Fisher) et incubées à 37°C dans une étuve pendant au moins 48 heures.

3.7.4 Hybridation

Des coupes de tissus provenant de larves saines ou infectées ont été déparaffinées à l'aide de trois incubations de 15 min dans le xylène (Fisher). Les tissus ont ensuite été hydratés en plongeant les lames deux fois pendant 10 min dans l'éthanol 100% et une fois dans l'éthanol 90% (v/v), 80% (v/v), 50% (v/v) et dans l'eau distillée durant 5 min. Un volume de 50 µL de protéinase K (Sigma) d'une concentration de 10 ng/mL fut ajouté sur les tissus qui ont ensuite été recouvert d'une lamelle de verre (Fisher). Les lames ont été incubées pendant 10 min dans une chambre humide à 37° C permettant à l'enzyme d'agir. Suite à l'incubation, les tissus ont été fixés à l'aide d'une solution de formaldéhyde 4% (v/v) à 4 °C pendant 10 min ce qui permet de stabiliser l'ADN sur la coupe de tissu. Trois lavages dans le PBS 1X (Gibco BRL) pendant 5 min et un lavage dans l'eau distillée pendant une minute ont suivi le temps de fixation. Les tissus ont été traités au triéthanolamine (TEA) (Sigma) 0,1M en ajoutant 100 µL de TEA sur les tissus qui ont ensuite été recouverts d'une lamelle de verre avant d'être incubés 5 min à température de la pièce. Cette étape permet d'éliminer les charges négatives présentes sur le tissu ce qui permettra d'optimiser la liaison de la sonde avec l'ADN cible. Les lames ont été lavées 5 min dans le SSC 2X (NaCl 0,3 M et 0,03 M citrate de sodium) et les tissus ont été déshydratés en immergeant les lames dans l'éthanol 50% (v/v), 80% (v/v) et 90% (v/v)

pendant 30 sec et dans l'éthanol 100% durant 1 min. Les tissus et la sonde ont été dénaturés à 95 °C pendant 5 min. La dénaturation des tissus a été réalisé dans un thermocycleur Perkin Elmer 9600 en déposant les lames sur la plaque chauffante recouverte d'un papier d'aluminium permettant de distribuer la chaleur de façon uniforme. La dénaturation de la sonde s'est effectuée dans un bain d'eau bouillante pendant 5 min. Suite à la dénaturation, les lames et la sonde ont été déposés sur la glace pendant cinq min. Un volume de 50 µL de la sonde, concentrée à 1 nanogramme par microlitre (ng/µL), a été déposé sur les tissus qui ont ensuite été recouverts d'une lamelle de verre. Les lames ont été incubées dans une chambre contenant 50% (v/v) de formamide pendant trois heures à 42 ° C. Par la suite, les tissus ont été dans un bain de SSC deux fois durant 10 min, une fois dans le SSC 1X (NaCl 0,15 M et 0,015 M citrate de sodium) une fois durant 10 min, dans le SSC 0.5X (NaCl 0,075 M et 0,0015 M citrate de sodium) une fois pendant 10 min, dans le SSC 0.5X une fois à 42 ° C durant 60 min et une dernière fois dans le SSC 0.5X à température de la pièce pendant 5 min. Tous les lavages ont été effectués à vitesse constante sur une plaque agitatrice (Rocker platform, Bellco). Les lames ont ensuite été rincées dans le tampon SSC 1X pendant 5 min. Un volume de 100 µL d'une solution de blocage 1% (Boehringer) a été déposé sur les tissus qui ont été par la suite recouverts d'une lamelle de verre. Ces derniers ont été incubés dans le tampon # 1 pendant une heure à 37 °C suivi d'un lavage de 5 min. Un volume de 50 µL d'anticorps anti-digoxigénine (Boehringer) dilué 1/500 dans la solution de blocage 1% a été déposé sur les tissus qui ont été recouverts d'une lamelle de verre et incubés toute la nuit dans une chambre humide à 4 ° C. Les lames ont été lavées dans le tampon SSC 1X deux fois pendant 10 min et rincées dans le tampon SSC 0.5X durant 5 min. Pour révéler l'hybridation, 100 µL d'une solution chromogène (4,5 µL NBT (Boehringer Manneim); 3,5 µL de BCIP (Boeringer Manneim) et 992 µL d'eau distillée) a été déposé sur les tissus qui ont été recouverts d'une lamelle de verre. Les lames ont par la suite été incubées toute la nuit à la température de la pièce et à la noirceur. Le lendemain, les lames étaient observées au microscope optique afin de vérifier le signal provoqué par l'hybridation.

3.8. Visualisation par histologie des dommages causés par le ChfuGV

3.8.1 Coloration des coupes histologiques

Les coupes histologiques (section 3.8.3) fixées sur les lames ont été plongées dans trois bains successifs de toluène pendant 5 min permettant d'éliminer la paraffine. Les lames furent par la suite immergées dans trois bains d'éthanol 100% durant 5 min chacun et une hydratation complète des tissus a été obtenue en plongeant, pendant 10 min, les lames dans de l'eau distillée. La coloration du cytoplasme des cellules a été effectuée par l'immersion des lames dans l'éosine (Fisher) pendant 8 min suivi d'un lavage pendant 10 min dans un bain d'eau distillée en changeant l'eau trois fois. Les lames ont été trempées dans l'éthanol dilué à 70 % (v/v) avec du HCl concentré une dizaine de coups, suivi d'un autre bain de 10 min dans l'eau distillée. L'immersion de ces dernières dans l'hématoxyline (Fisher) pendant 6 min a permis de colorer la chromatine permettant ainsi de visualiser les noyaux cellulaires. Les tissus furent ensuite trempés successivement dans l'eau distillée, l'éthanol 70% (v/v), 85% (v/v) et deux fois dans l'éthanol 100% une dizaine de coups chacun avant d'être baignés dans la safranine (Fisher) pendant 4 min ce qui permet de colorer le tissu adipeux. Suite à cette coloration, les lames ont été trempées dans trois bains successifs d'éthanol 100% ainsi que dans quatre bains de toluène une dizaine de coups. L'étape finale consiste à placer une lamelle de verre sur les tissus avec une goutte de Permount (Fisher) afin de les protéger de l'environnement externe.

4. RÉSULTATS

4.1 Production et purification virale

Lors du processus de production virale, environ 4000 larves de tordeuse des bourgeons de l'épinette ont été infectées avec une concentration de 4 X 10^8 granules viraux/mL durant une période de 12 jours. Un volume de 250 mL de broyat larvaire contenant le virus inclus dans un granule a pu être recueilli suite à la récolte et à l'homogénéisation des insectes infectés. La purification partielle des virus non-inlus et inclus a permis de récolter environ 50 mL de ces virus semi-purifiés qui ont été passé au travers des gradients de glycérol. Le virus purifié a été observé en microscopie électronique et aucune contamination bactérienne ou virale n'était présente dans l'échantillon. La visualisation de l'échantillon en microscopie électronique a démontré un tapis de granules de forme ovoïdale. Ces granules correspondent aux granulovirus inclus dans un granule qui est caractérisés par la forme ovocylindrique. Une quantification de la suspension virale par comptage en présence de billes de latex calibrées a été réalisée et la concentration fut estimée à de 1 X 10^{13} granules viraux/mL. Un volume final de 500 µl d'une suspension virale concentrée à 1 X 10^{13} granules/mL a été obtenue suite à l'accomplissement des différentes étapes de purification.

4.2 Quantification du génome viral par PCR quantitatif

Le premier objectif de cette étude était de détecter la présence du ChfuGV à l'aide d'une méthode basée sur la quantification du génome viral des virus inclus et non inclus (donc les virions totaux) présent chez les insectes infectés par PCR quantitatif. Pour ce faire, un étalon interne correspondant à une partie du gène de la granuline a été généré par PCR et cloné dans un vecteur afin de pouvoir comparer les produit d'amplification de l'étalon interne et du gène ciblé.

4.2.1 Criblage des colonies recombinantes

Suite au clonage du fragment correspondant à l'étalon interne dans le vecteur pCR 2.1, de la transformation des bactéries compétentes et de l'extraction des plasmides

bactériens, une digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction *Eco*R I a été effectuée afin de cribler les colonies qui possédaient l'insert. Le poids moléculaire de l'étalon interne et du plasmide pCR 2.1 étant respectivement de 0,343 et 3,0 Kb, tous les puits contenant une bande à ces poids moléculaires correspondent aux colonies possédant le fragment bien cloné dans le vecteur. La figure 3 démontre que les colonies 1,2,3,5,6,9,10 et 11 possèdent le fragment correspondant à l'étalon interne bien cloné dans le vecteur. La colonie #1 a donc servi à générer l'étalon interne par PCR.

4.2.2 Variation du poids moléculaire entre l'étalon interne et le gène ciblé

Afin de s'assurer de bien discriminer les produits d'amplification de l'étalon interne et du gène ciblé, plusieurs gels d'agarose à différentes concentrations ont été effectués. Après plusieurs tentatives, c'est à une concentration d'agarose de 2,5% (p/v) que la séparation des deux produits d'amplification était la meilleure. En effet, on peut observer la différence de masse moléculaire entre l'étalon interne (343 paires de base) et le gène ciblé (376 paires de base) sur un gel d'agarose à cette concentration (Figure 4).

4.2.3 Mesure du nombre de copies du génome des virions inclus et non inclus chez les insectes infectés

Suivant la synthèse de l'étalon interne, la quantité approximative de copies du ChfuGV présent chez les insectes infectés a été déterminée à partir de l'amplification d'une quantité de 10 ng/µl d'ADN viral et de l'insecte (section 3.4.1) et de différentes concentrations logarithmiques de l'étalon interne lors d'un premier PCR. La quantification du nombre de copies du génome des virions inclus et non-inclus par PCR a été effectuée durant toute la cinétique de l'infection. Les résultats présentés sont ceux correspondant aux larves récoltées au huitième jour suivant l'infection par le ChfuGV. Il est possible d'observer les résultats du premier PCR quantitatif obtenus avec des dilutions logarithmiques de l'étalon interne variant de 0,495 à 4953 attomoles. La compétition entre l'étalon interne et le gène ciblé s'effectue entre 495,3 et 4953,3 attomoles (Figure 5).

Figure 3: Criblage des colonies possédant le fragment correspondant à l'étalon interne cloné dans le plasmide pCR 2.1

Suite à la purification de l'ADN plasmidique de colonies repiquées, une digestion enzymatique avec l'enzyme *Eco*RI a été effectuée pour extraire le fragment du plasmide. La flèche blanche (◄——) indique le fragment correspondant à l'étalon interne.

puits #1: marqueur de poids moléculaire 1 Kb ladder
puits #2: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 1
puits #3: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 2
puits #4: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 3
puits #5: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 4
puits #6: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 5
puits #7: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 6
puits #8: étalon interne amplifié par PCR
puits #9: marqueur de poids moléculaire 1 Kb ladder
puits #10: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 7
puits #11: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 8
puits #12: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 9
puits #13: plasmide digéré avec *Eco*R I provenant de la colonie 10
puits #14: plasmide digéré avec *EcoR* I provenant de la colonie 11
puits #15: plasmide digéré avec *EcoR I* provenant de la colonie 12
puits #16: étalon interne amplifié par PCR

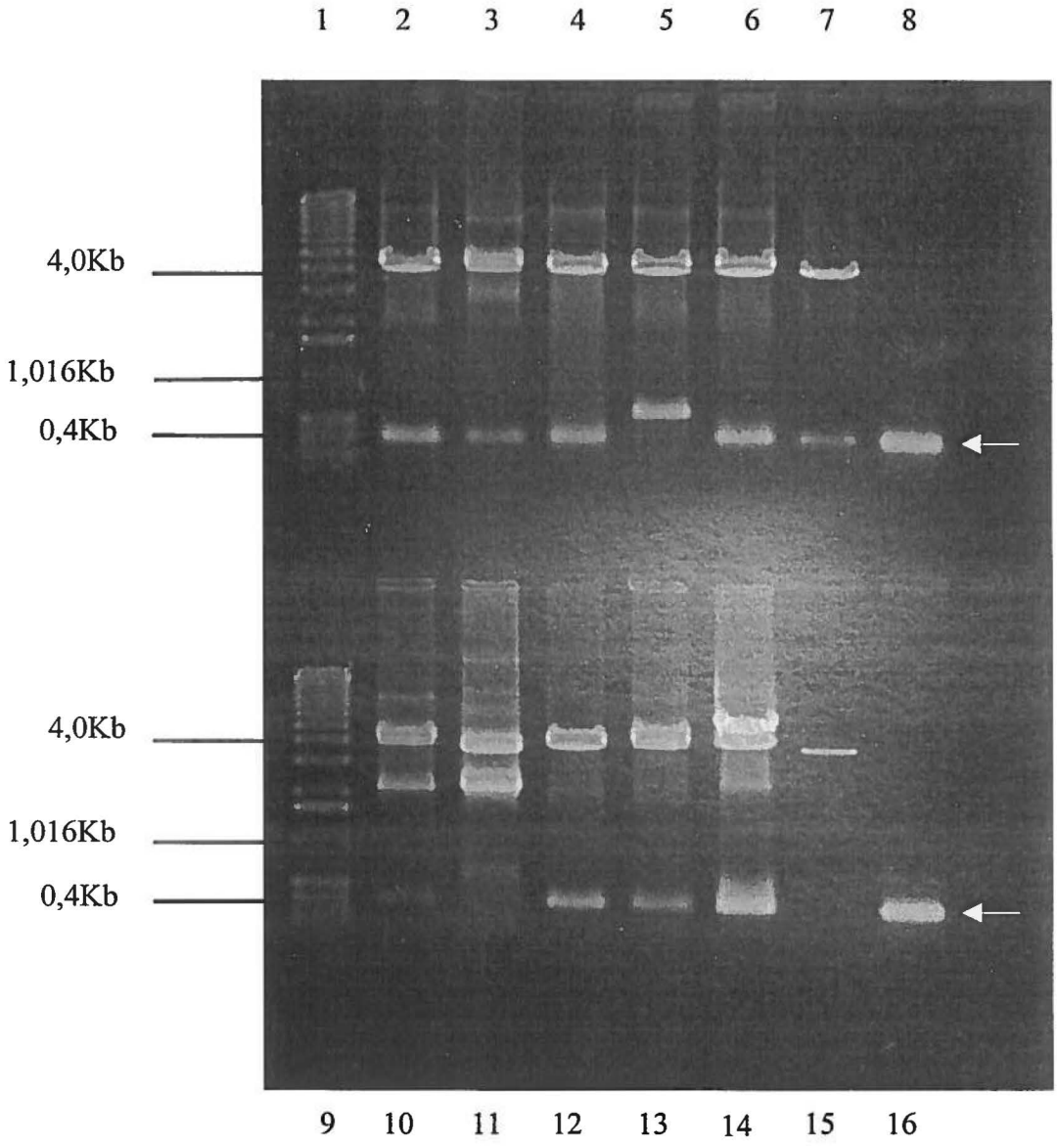

1
2
3
4
5
6
7
8
4,0Kb
1,016Kb
0,4Kb
4,0Kb
1,016Kb
0,4Kb
9
10
11
12
13
14
15
16

Figure 4: Variation du poids moléculaire entre le gène ciblé et le standard interne

puits #1: marqueur de poids moléculaire 1Kb ladder

puits #2: 5 µL du PCR effectué sur le plasmide contenant le fragment correspondant à l'étalon interne obtenu suite à la purification avec la trousse High pure plasmid isolation kit

puits #3: 5 µL du PCR effectué sur l'ADN extrait de larves récoltées au 4e jour suivant l'infection par le ChfuGV par la méthode DNaZol.

puits #4: 5 µL du PCR effectué sur l'ADN extrait d'un broyat de larves saines par la méthode DNaZol

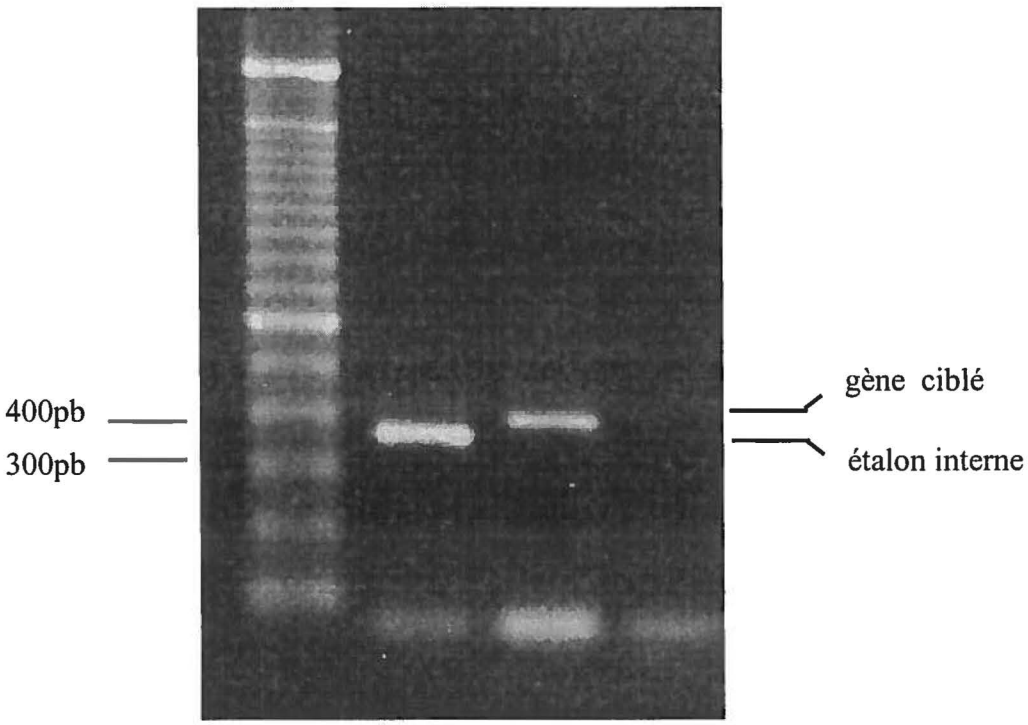

400pb
300pb
gène ciblé
étalon interne

Figure 5 : PCR quantitatif effectué sur l'ADN extrait de larves de *C. fumiferana,* récoltées au huitième jour suivant l'infection, en utilisant des concentrations logarithmiques d'étalon interne

puits #1: 2 µl du marqueur de poids moléculaire 100 paires de base

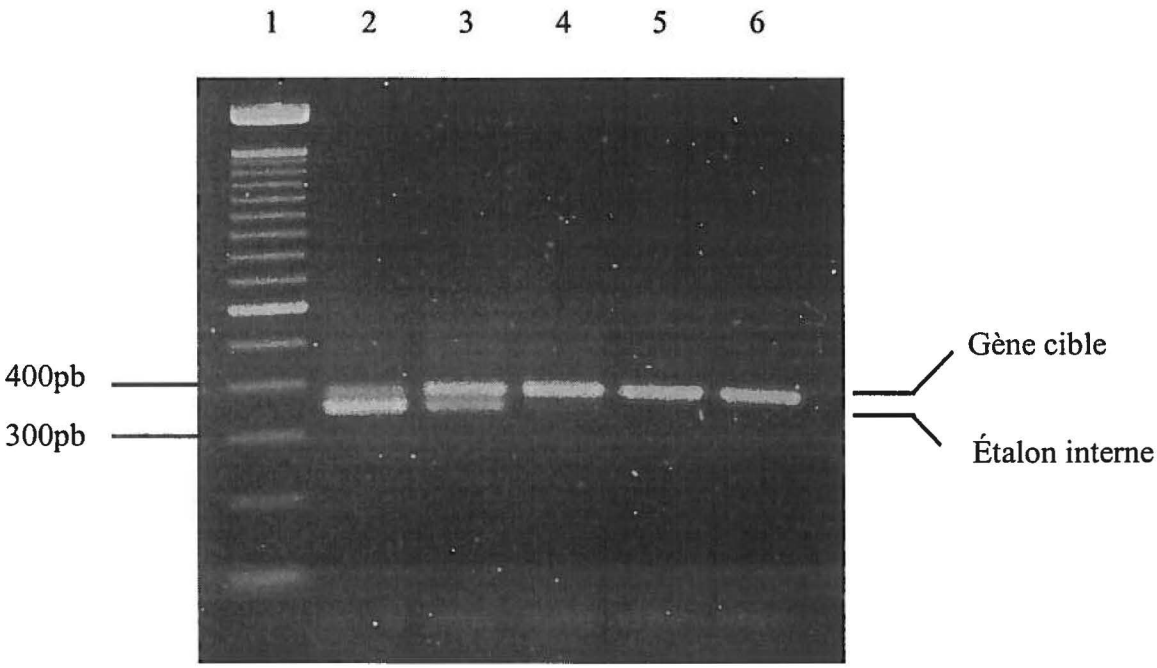
puits #2: 5µl du PCR effectué avec10ng d'ADN extrait de larves au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 4953 attomoles d'étalon interne

puits #3: 5µl du PCR effectué avec10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 495,3 attomoles d'étalon interne

puits #4: 5 µl du PCR effectué avec10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 49,53 attomoles d'étalon interne

puits #5: 5 µl du PCR effectué avec10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 4,95 attomoles d'étalon interne

puits #6: 5 µl du PCR effectué avec10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 0,495 attomole d'étalon interne


1
2
3
4
5
6
400pb
300pb
Gène cible
Étalon interne

Lors d'un deuxième PCR compétitif, une quantification plus précise du nombre de copie de génome des virions non-inclus et inclus dans un granule a pu être déterminée. La quantité d'ADN viral et génomique de l'insecte utilisée est demeurée constante (10 ng/µl) mais les concentrations d'étalon interne utilisées étaient semi-logarithmiques et variaient de 377 attomoles à 12 064 attomoles. Ces concentrations ont été choisies en fonction des résultats obtenus au premier PCR. L'apparition du gène ciblé en fonction des concentrations décroissantes de l'étalon interne peut être observée sur la figure 6. La compétition entre le gène ciblé et l'étalon interne s'effectue à environ 1508 attomoles d'étalon interne.

4.3 Progression de l'infection virale

La détermination du nombre de copie du génome viral à partir des résultats bruts du PCR compétitif est une mesure semi-quantitative. Une évaluation plus précise de la quantité de génome des virions inclus et non-inclus a été accomplie à l'aide d'une analyse densimétrique effectuée sur les résultats obtenus et cela, avec le logiciel Multi-analyst 1.0 (Bio-Rad). Suite à l'analyse, un graphique a été produit. En ordonnée on retrouve le logarithme du ratio de la D.O. du produit d'amplification du gène ciblé sur celle de l'étalon interne. En abscisse, on retrouve le logarithme de la concentration d'étalon interne utilisé. Par la suite, une droite de régression ainsi que son équation ont été calculées (Figure 7).

Suite à la détermination du nombre de copies du génome viral présent chez les insectes récoltée entre le premier et le dixième jour suivant l'infection, les résultats obtenus ont été cartographiés en fonction du nombre de jours suivant l'infection (Figure 8). Les analyses par PCR quantitatif ont été réalisées en triplicata et une droite de régression a été calculée et superposée au graphique. Cette régression est le résultat d'une analyse de corrélation entre la quantité de génome viral et le temps suivant l'infection. La corrélation en est une positive (r^2 = 0,193) et significative (p = 0,017). Dans ce sens, plus le temps d'infection augmente, plus le nombre de copies du génome des virion inclus et non-inclus augmente également.

Figure 6: PCR quantitatif effectué sur l'ADN extrait de larves de *C. fumiferana,* récoltées au huitième jour suivant l'infection du ChfuGV, en utilisant des concentrations semi-logarithmiques d'étalon interne

puits #1: 2 µL du marqueur de poids moléculaire 100 paires de base

puits #2: 5µL du PCR effectué avec 10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 12064 attomoles d'étalon interne

puits #3: 5µL du PCR effectué avec10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 6032 attomoles d'étalon interne

puits #4: 5 µL du PCR effectué avec10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 3016 attomoles d'étalon interne

puits #5: 5 µL du PCR effectué avec10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 1508 attomoles d'étalon interne

puits #6: 5 µL du PCR effectué avec10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 754 attomoles d'étalon interne

puits #7: 5 µL du PCR effectué avec 10ng d'ADN extrait de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection par le ChfuGV et 377 attomoles d'étalon interne

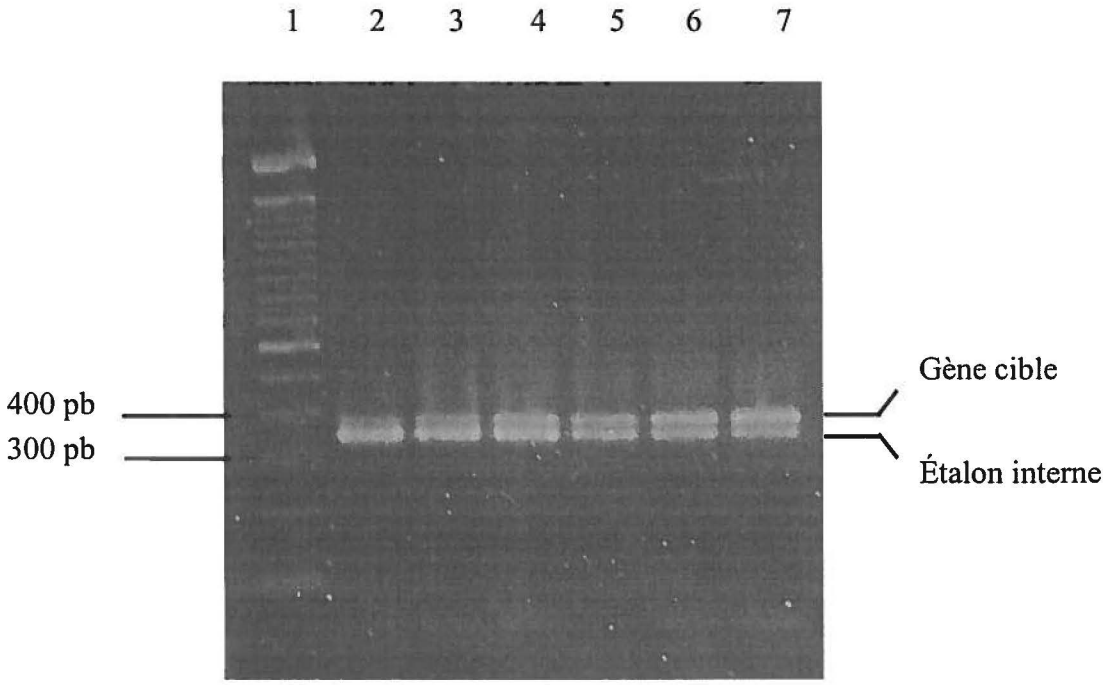

1
2
3
4
5
6
7
400 pb
300 pb
Gène cible
Étalon interne

Figure 7: Analyse densitométrique des résultats obtenus suite au deuxième PCR quantitatif effectué sur l'ADN extrait de larves de *C. fumiferana* récoltées au 8e jour suivant l'infection.

Les D.O. des produits d'amplification du gène ciblé et de l'étalon interne ont été obtenues à l'aide du logiciel Multi-analyst 1.0. Ces D.O. ont par la suite été converties et cartographiées. Une droite de régression et son équation ont également été calculées et représentées. Afin d'obtenir le nombre de copies du génome viral présent chez l'insecte infecté, la variable X qui correspond au logarithme des concentrations d'étalon interne utilisées a été isolée lorsque la variable y équivaut à 0. Lorsque y = 0, la quantité entre l'étalon interne et le gène ciblé est équivalent. Dans ce cas-ci, lorsque y = 0, x = 949 attomoles ce qui signifie qu'il y a 949 attomoles de copies du génome viral présent chez la larve récoltée au 8e jour post-infection.

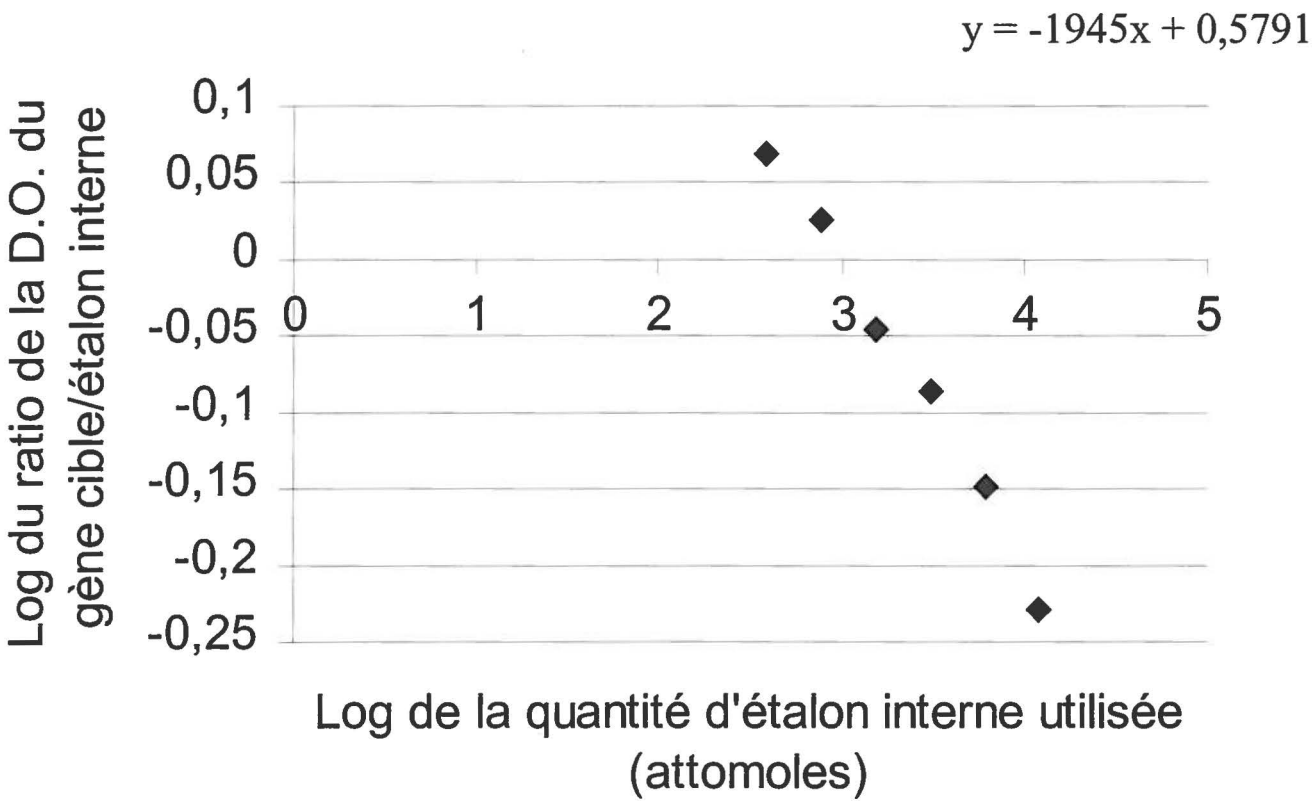
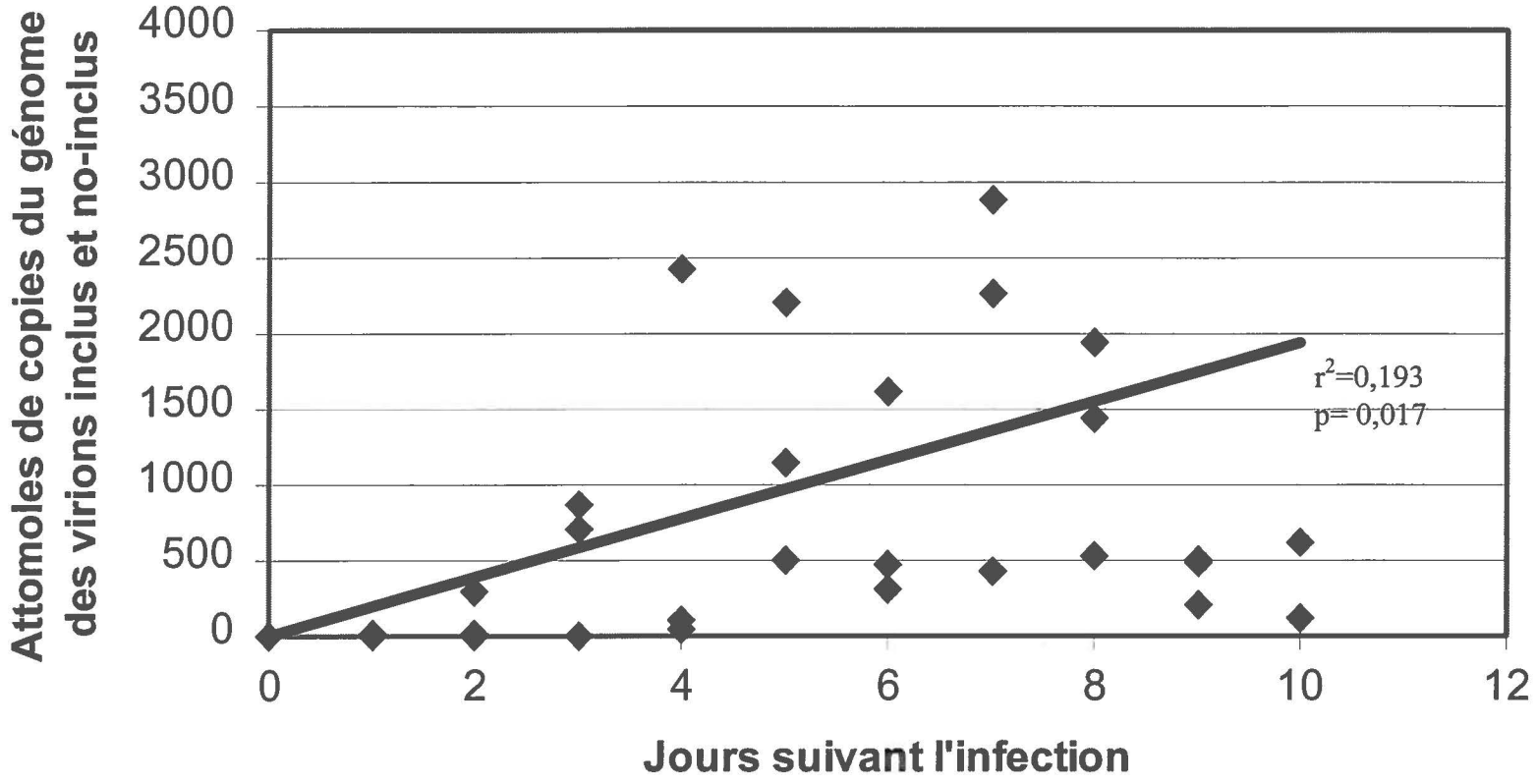

y = -1945x + 0,5791
Log du ratio de la D.O. du gène cible/étalon interne
0,1
0,05
0
-0,05
-0,1
-0,15
-0,2
-0,25
0
1
2
3
4
5
Log de la quantité d'étalon interne utilisée (attomoles)

Figure 8: Progression du nombre de copies de génomes des virions inclus et non-inclus dans un granule présent chez les larves de *C. fumiferana* récoltées du premier au dixième jour suivant l'infection en fonction du temps d'infection

Suite à la quantification du nombre de copies de génomes viraux chez les insectes par analyses densitométrique, une corrélation entre ce nombre de copies génomiques et le temps d'infection a été effectuée.


Attomoles de copies du génome des virions inclus et no-inclus
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
Jours suivant l'infection
r²=0,193
p= 0,017

4.4 Cinétique d'apparition de la granuline

En plus d'évaluer le nombre de copies du génome viral chez les larves infectées, l'apparition de la principale protéine associée au corps d'inclusion a également été étudiée. La quantité de granuline permet d'évaluer la quantité de virions inclus chez les insectes infectés. À partir de broyats larvaires d'insectes récoltés entre le premier et le dixième jour suivant l'infection, 40 µg de protéines ont été déposées dans les puits de deux gels de polyacrylamide de 12% en condition dénaturante de SDS. Aucune production de la granuline (~28 kDa) n'est observée durant les quatre premiers jours de l'infection. Après cette période, la granuline est révélée par la présence d'une bande à ~28 KDa. Il semble y avoir une augmentation constante de la granuline du cinquième au dixième jour malgré la légère diminution observée au septième jours d'infection (Figure 9).

4.5 Identification de la granuline par un transfert de type Western

Afin de s'assurer que la bande de 28 kDa observée sur la figure 9 est la granuline, un immunobuvardage de type Western a été effectué en utilisant un sérum polyclonal de lapin dirigé contre le virus. Les échantillons analysés provenaient de larves récoltées entre le sixième et le dixième jour suivant l'infection (Figure 10). Malgré la présence de plusieurs bandes sur la membrane, une de celles-ci apparaît à environ 28 kDa correspondant à la granuline ce qui permet de vérifier qu'il s'agit vraiment de cette dernière. Une bande majeure apparaissant à environ 35 kDa est également observée chez les broyats des larves récoltées du sixième au dixième jour suivant l'infection.

4.6 Détection du génome du ChfuGV par hybridation *in situ.*

Le deuxième objectif était de déterminer quels étaient les tissus infectés suite à l'infection des larves de *C. fumiferana* par le ChfuGV. Une méthode très sensible permettant de détecter la présence du virus non-inclus et inclus chez les insectes est l'hybridation *in situ*. Cette technique a été développée et appliquée sur des coupes minces

Figure 9: Cinétique d'appartion de la granuline chez les larves de *C. fumiferana* soumises au ChfuGV et récoltées entre le premier et le dixième jour suivant l'infection

40µg de broyat de larves saines, de larves récoltées du premier au dixième jour suivant l'infection, 1 X 10^9 granules virales et 3µL du marqueur de masse moléculaire "Rainbow ladder" ont été déposé dans les puits de deux gels de polyacrylamide de 12% en condition dénaturante.

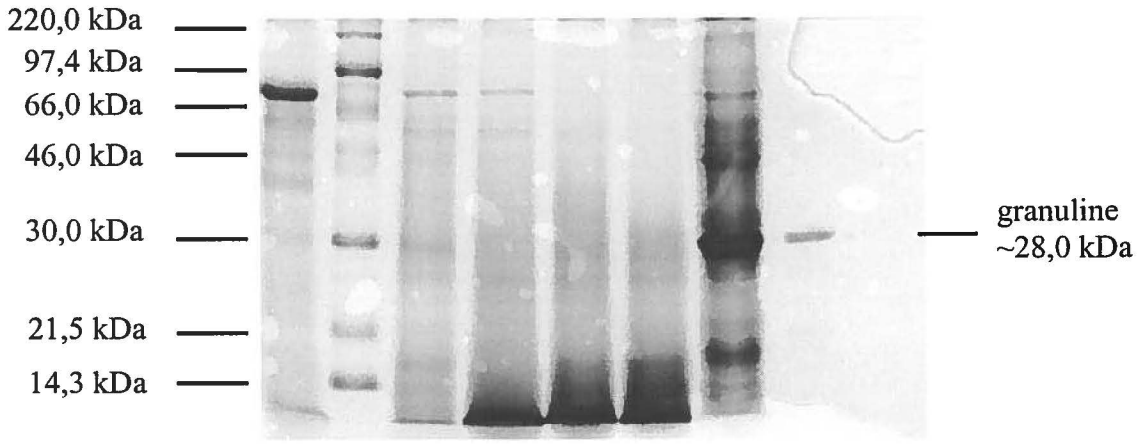
A

puits #1:40µg de broyat de larves saines
puits #2: 3µL du marqueur de masse moléculaire "Rainbow Ladder"
puits #3: 40µg d'un broyat de larves récoltées 1 jour suivant l'infection
puits #4: 40µg d'un broyat de larves récoltées 2 jours suivant l'infection
puits #5: 40µg d'un broyat de larves récoltées 3 jours suivant l'infection
puits #6: 40µg d'un broyat de larves récoltées 4 jours suivant l'infection
puits #7: 40µg d'un broyat de larves récoltées 5 jours suivant l'infection
puits #8: 1 X 10^9 granules virales

B

puits #1: 40µg de broyat de larves saines
puits #2: 3µL du marqueur de masse moléculaire "Rainbow Ladder"
puits #3: 40µg d'un broyat de larves récoltées 6 jours suivant l'infection
puits #4: 40µg d'un broyat de larves récoltées 7 jours suivant l'infection
puits #5: 40µg d'un broyat de larves récoltées 8 jours suivant l'infection
puits #6: 40µg d'un broyat de larves récoltées 9 jours suivant l'infection
puits #7: 40µg d'un broyat de larves récoltées 10 jours suivant l'infection
puits #8: 1 X 10^9 granules virales

A


220,0 kDa
97,4 kDa
66,0 kDa
46,0 kDa
30,0 kDa
21,5 kDa
14,3 kDa
granuline
~28,0 kDa

B

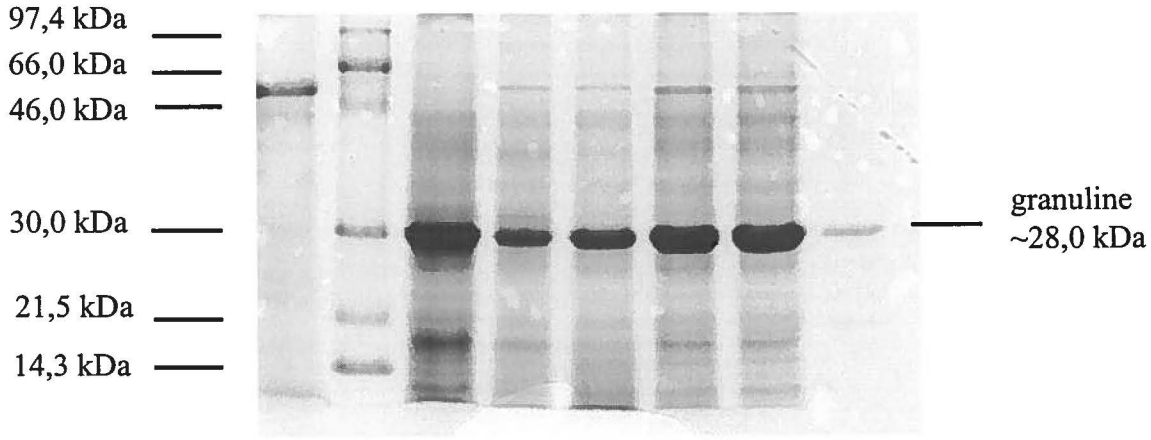
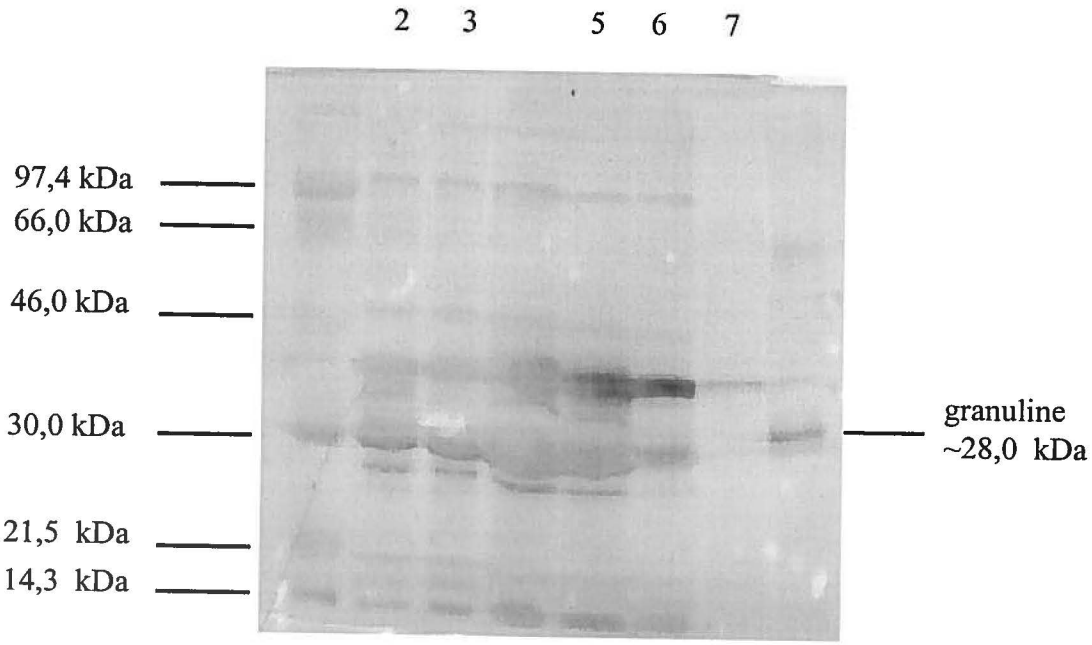

97,4 kDa
66,0 kDa
46,0 kDa
30,0 kDa
21,5 kDa
14,3 kDa
granuline
~28,0 kDa

Figure 10: Immunobuvardage effectué sur des broyat de larves de *C. fumiferana* récoltées du sixième au dixième jour suivant l'infection par le ChfuGV

L'immunobuvardage a été effectuée en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre le ChfuGV suivi d'un anti-anticorps couplé à la HRPO. La révélation à été accomplie suite à l'ajout du substrat 4CN.

puits #1: marqueur de masse moléculaire Rainbow Ladder
puits #2: 40 µg d'un broyat de larves récoltées au 6e jour suivant l'infection
puits #3: 40 µg d'un broyat de larves récoltées au 7e jour suivant l'infection
puits #4: 40 µg d'un broyat de larves récoltées au 8e jour suivant l'infection
puits #5: 40 µg d'un broyat de larves récoltées au 9e jour suivant l'infection
puits #6: 40 µg d'un broyat de larves récoltées au 10e jour suivant l'infection
puits #7: 40µg d'un broyat de larves saines
puits #8: 1X 10^9 granules virales


2
3
5
6
7
97,4 kDa
66,0 kDa
46,0 kDa
30,0 kDa
21,5 kDa
14,3 kDa
granuline
~28,0 kDa

non colorées et déparaffinées provenant de tissus de larves récoltées entre le premier et le dixième jour suivant l'infection.

4.6.1 Évaluation de la concentration de la sonde marquée

La comparaison entre un témoin marqué dont la concentration est connue et la sonde générée a permis d'évaluer la concentration de la sonde. Plus précisément, elle est évaluée en divisant l'inverse de la dilution la plus élevée où la sonde est révélée par l'inverse de la dilution la plus élevée où le témoin marqué est révélé, multiplié par la concentration du témoin qui est de 5 ng/µl. La figure 11 démontre que le témoin marqué est révélé à une dilution de 1/50000 et que les sondes #1 et #2 sont révélées à une dilution de 1/500000. On peut donc en déduire que les concentrations des sonde #1 et #2 sont approximativement 50 ng/µl.

4.6.2 Hybridation du génome du ChfuGV avec la sonde marquée

L'hybridation du génome viral avec la sonde marquée est révélée par la présence de points pourpres sur les cellules infectées. Les hybridations ont été effectuées sur des coupes minces provenant de larves saines et infectées. La présence de points pourpres sur ces coupes démontre qu'il y a une hybridation de la sonde au niveau des cellules intestinales (Figure 12), des cellules adipeuses et des cellules hypodermales (Figure 13) des insectes infectés. Mis à part ces trois types de cellules, aucun autre tissu présente une hybridation de la sonde avec le génome viral. Au niveau des larves saines, aucun point pourpre n'est observé dans les tissus de ces insectes ce qui signifie l'absence d'hybridation de la sonde.

4.7 Visualisation sommaire des dommages causés suite à l'infection des larves *de C. fumiferana* par le ChfuGV

La visualisation sommaire des dommages cellulaires et tissulaires suivant l'infection des larves par le ChfuGV a été effectuée à l'aide d'observations de coupes

Figure 11 : Évaluation de la quantité de sonde marquée

a: le témoin et les deux sondes dilués 1/50
b: le témoin et les deux sondes dilués 1/500
c: le témoin et les deux sondes dilués 1/5000
d: le témoin et les deux sondes dilués 1/50000
e: le témoin et les deux sondes dilués 1/500000
Les sondes 1 et 2 sont identiques

La concentration de la sonde est évaluée en divisant l'inverse de la dernière dilution où la sonde est révélée (†) par l'inverse de la dernière dilution où le témoin est révélé (*), multiplié par la concentration du témoin: pour les sondes 1 et 2 les concentrations sont identiques:

La concentration des sondes 1 et 2 = 500000 / 50000 X 5µg/µl = 50µg/µl

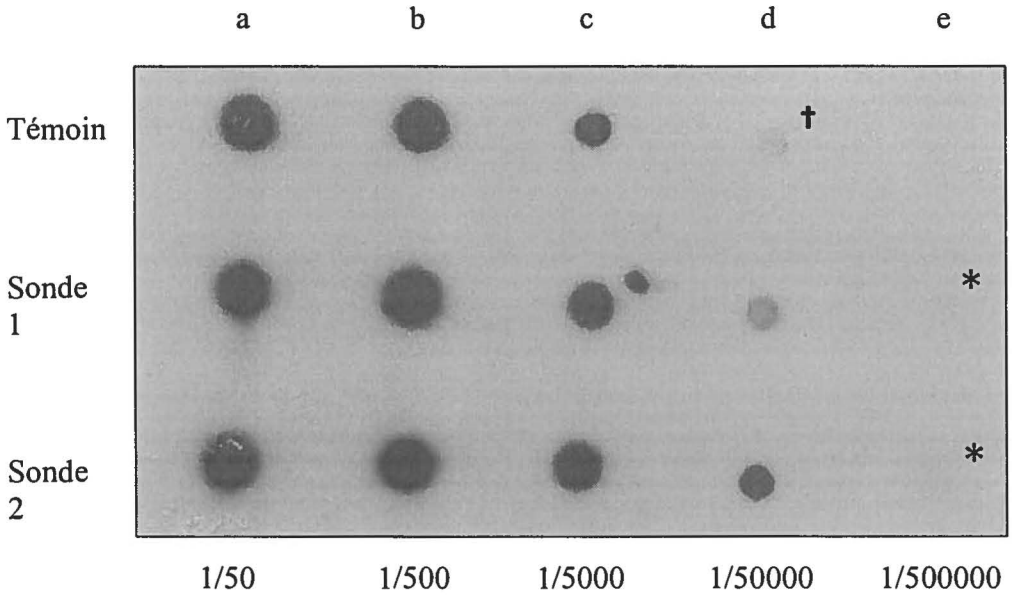

a
b
c
d
e
Témoin
Sonde 1
Sonde 2
†
*
*
1/50
1/500
1/5000
1/50000
1/500000

Figure 12: Résultats de l'hybridation *in situ* du génome du ChfuGV au niveau de l'intestin chez les larves de *C. fumiferana* soumises à ce dernier.

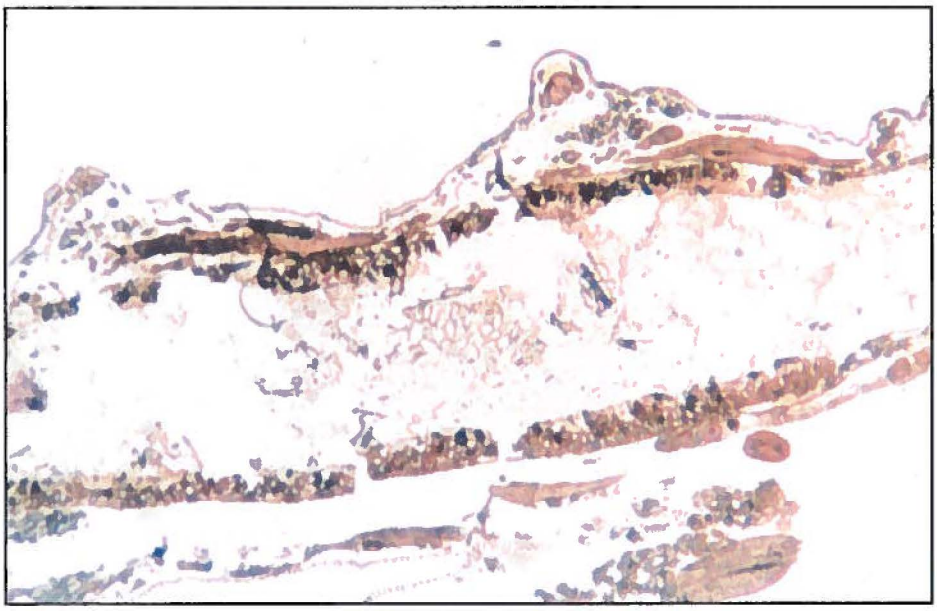
Une sonde d'ADN correspondant au gène de la granuline du génome viral marquée à la digoxigénine a été déposée sur des coupes minces d'insectes sains et infectés par le ChfuGV. Suite à l'ajout d'un anticorps, dirigé contre la digoxigénine et couplé à une enzyme, et du substrat, l'hybridation entre la sonde et le génome est révélée par la présence de points pourpres sur le tissu infecté.

1: Hybridation effectuée sur des larves saines

2: Hybridation effectuée sur des larves infectées par le ChfuGV

——►: hybridation de la sonde avec l'ADN viral.

1



2

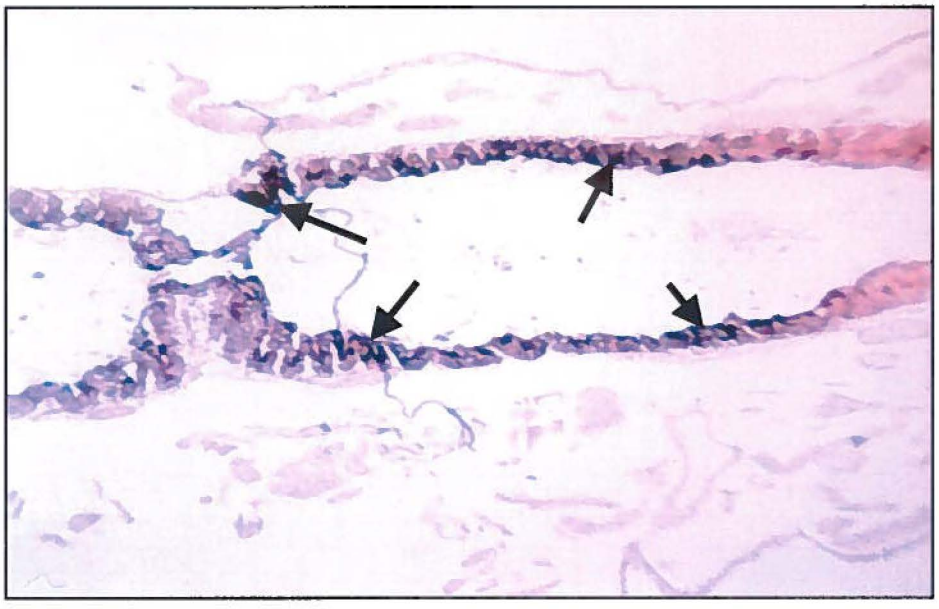


Figure 13: Résultats de l'hybridation *in situ* du génome du ChfuGV au niveau des cellules adipeuses et de l'hypoderme chez les larves de *C. fumiferana* soumises à ce dernier.

Une sonde d'ADN correspondant au gène de la granuline du génome viral marquée à la digoxigénine a été déposée sur des coupes minces d'insectes sains et infectés par le ChfuGV. Suite à l'ajout d'un anticorps, dirigé contre la digoxigénine et couplé à une enzyme, et du substrat, l'hybridation entre la sonde et le génome est révélée par la présence de points pourpres sur le tissu infecté.

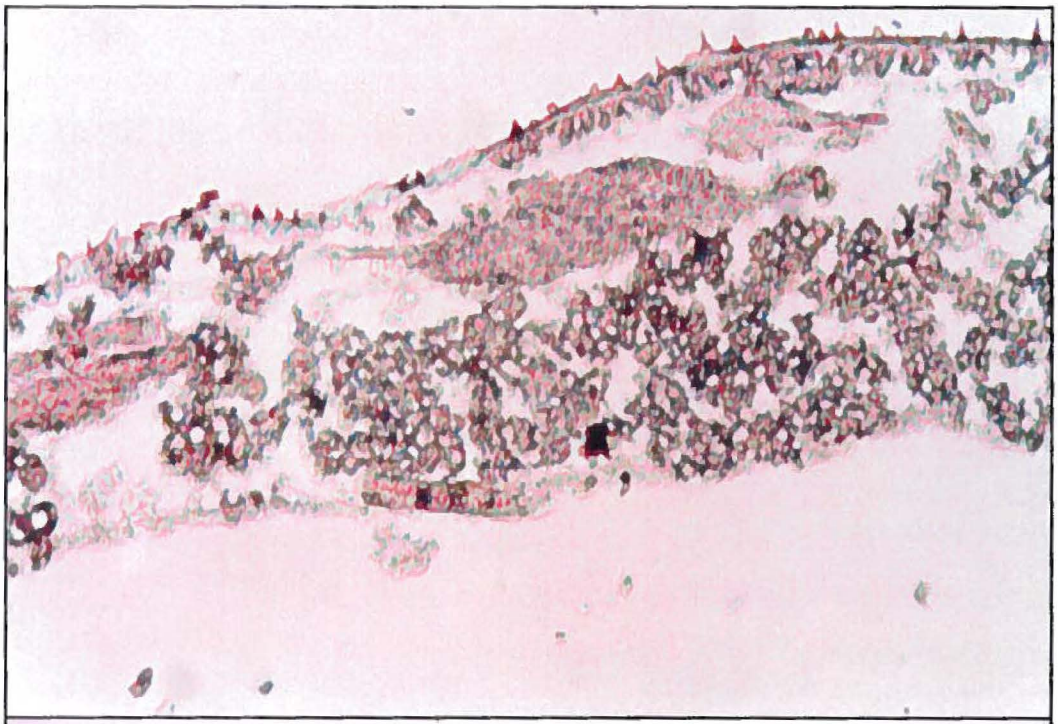
1: Hybridation effectuée sur des larves saines

2: Hybridation effectuée sur des larves soumises au ChfuGV

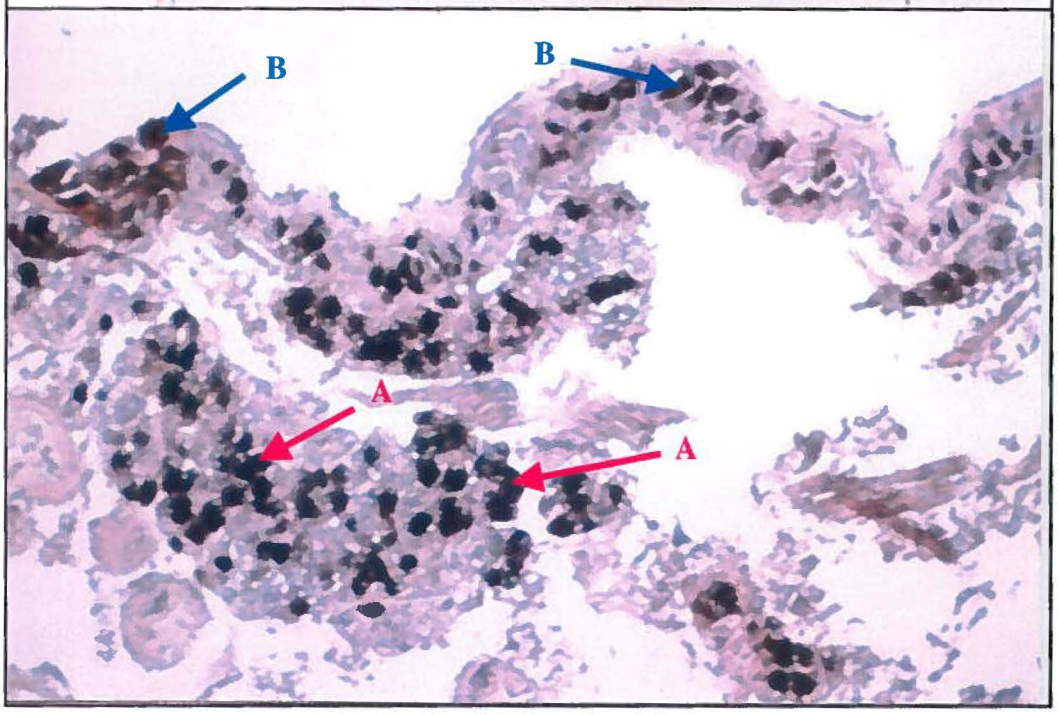
Les flèches A (→) indiquent les points pourpres associés à l'hybridation de la sonde avec l'ADN viral au niveau des cellules adipeuses

Les flèches B (→) indiquent les points pourpres associés à l'hybridation de la sonde avec l'ADN viral au niveau de l'hypoderme

1



2



histologiques. Ces dernières ont été produites à partir d'insectes récoltés à différents temps suivant l'inoculation du virus. L'observation des larves témoins et des larves infectées a permis de démontrer des variations morphologiques notamment du tissu adipeux et de l'hypoderme des larves de *C. fumiferana* soumises au virus. Cette méthode histologique a été utilisée afin de faire un parallèle avec les résultats obtenus par hybridation *in situ*.

4.7.1 Changements observés au niveau du tissu adipeux chez les larves infectées

La comparaison entre le tissu adipeux d'une larve saine et celui provenant d'une larve infectée permet d'observer deux différences marquées entre ces derniers (Figure 14). Elles se retrouvent au niveau des noyaux et des lobules adipeux des larves infectées. Les résultats démontrent que les noyaux des cellules des insectes soumis au virus sont hypertrophiés et occupent la totalité de l'espace cellulaire. Les lobules lipidiques de ces mêmes insectes sont atrophiés ou inexistant ce qui n'est pas le cas chez les larves saines.

4.7.2 Changements observés au niveau de l'hypoderme chez les larves infectées

L'hypoderme est une couche monocellulaire retrouvée sous la cuticule de l'insecte; cette dernière étant l'exosquelette de l'insecte. L'hypoderme d'un insecte sain démontre une rangée de cellules organisées en une fine rangée sous la cuticule (Figure 15). Cependant, chez les larves infectées, ces cellules sont hypertrophiées ce qui provoque leur allongement. De plus, cette hypertrophie des cellules entraîne une augmentation de l'épaisseur de l'hypoderme et peut favoriser l'invagination de ce dernier dans la cavité abdominale de l'insecte.

4.7.3 Absence de changements observés au niveau de l'intestin moyen chez les larves infectées

Lorsque l'on compare l'intestin provenant de larves saines et de larves infectées, aucune variation morphologique n'est observée entre ces deux tissus (Figure 16). Les

Figure 14: Comparaison chez *C. fumiferana* des cellules adipeuses provenant de larves saines et infectées par le ChfuGV

Des coupes minces de 5 microns ont été colorées avec la safranine, l'éosine et l'hématoxyline

Photo 1: Cellules adipeuses provenant de larves saines. 500X

A: noyau normal

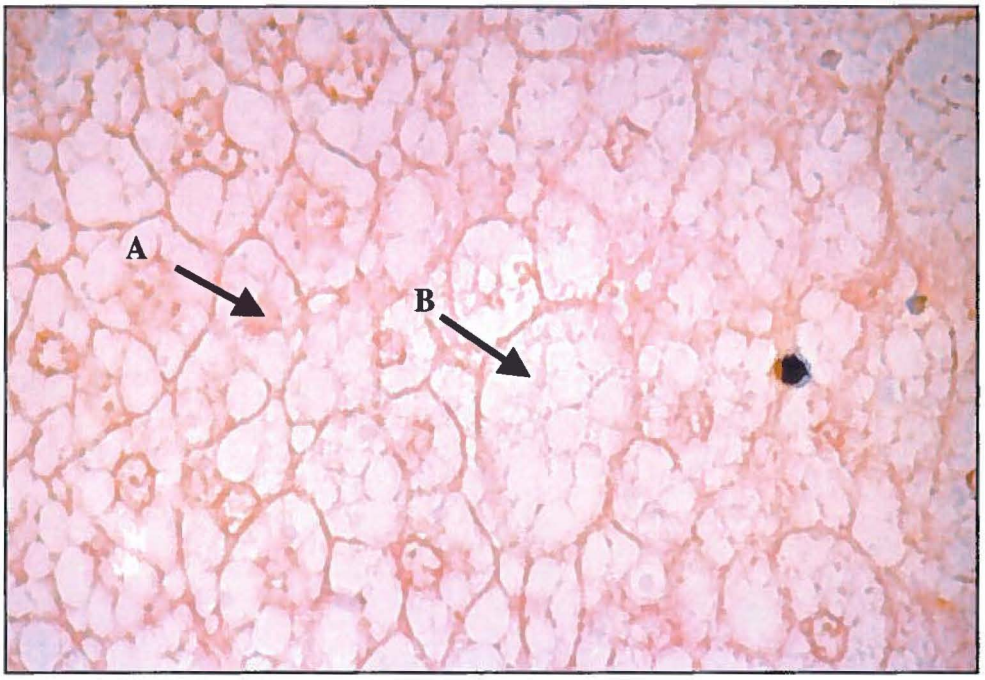
B: lobule lipidique normal

Photo 2 : Cellules adipeuses provenant de larves infectées. 500X

A': noyau hypertrophié

B': lobule lipidique atrophié

1



2

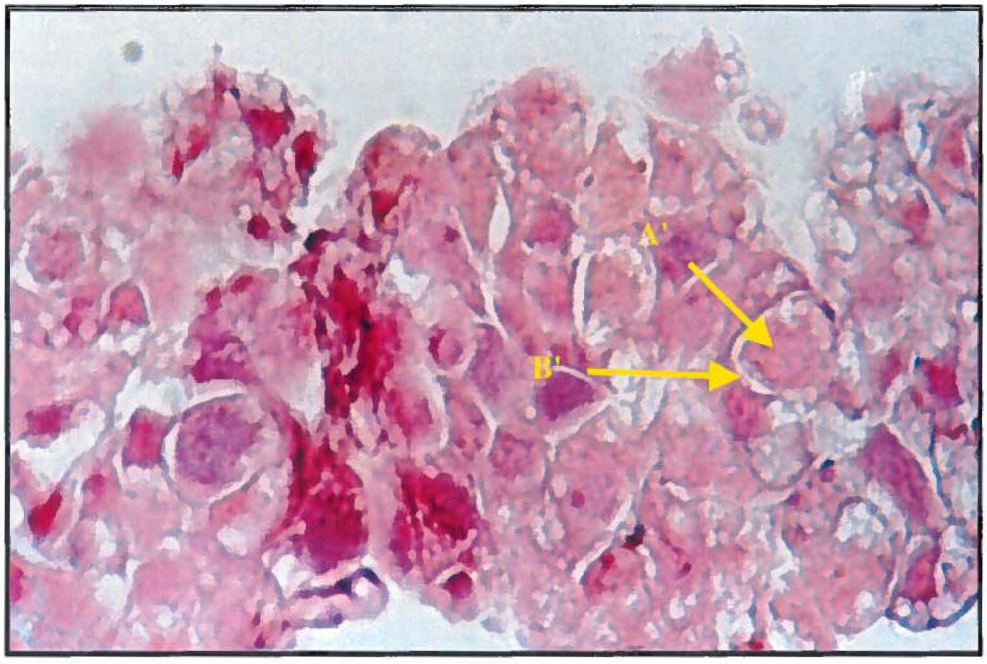


Figure 15: Comparaison chez *C. fumiferana* de l'hypoderme provenant de larves saines et infectées par le ChfuGV

Des coupes minces de 5 microns ont été colorées avec la safranine, l'éosine et l'hématoxyline

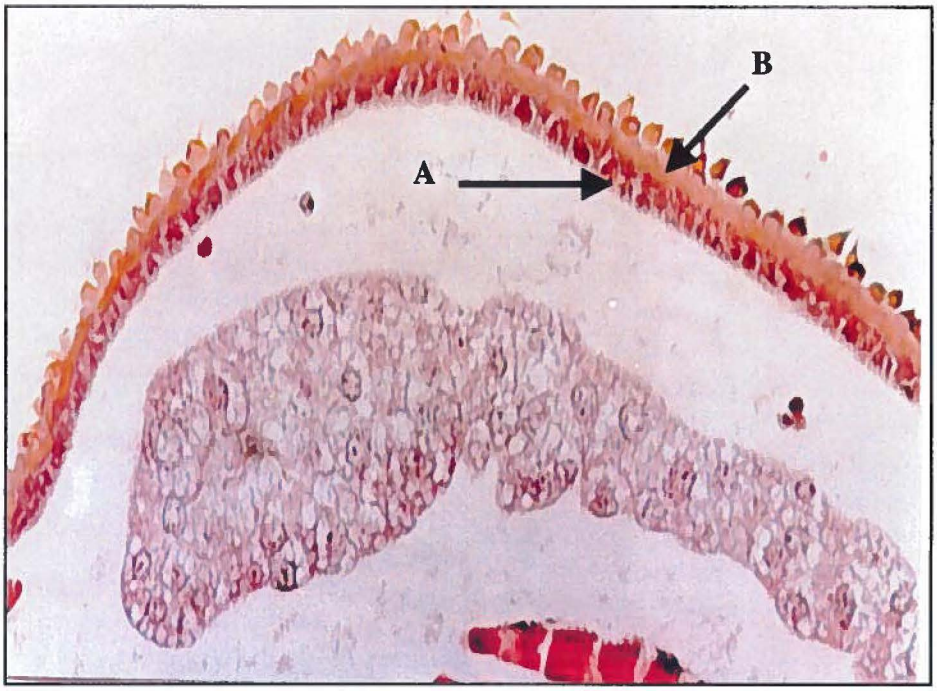
1: Hypoderme provenant de larves saines. 250X

A: Cellules de l'épiderme organisée en une fine rangée
B: Cuticule de l'insecte

2: Hypoderme provenant d'insectes infectés par le ChfuGV. 250X

A': Cellules hypertrophiées de l'hypoderme
B': Cuticule de l'insecte

1



2

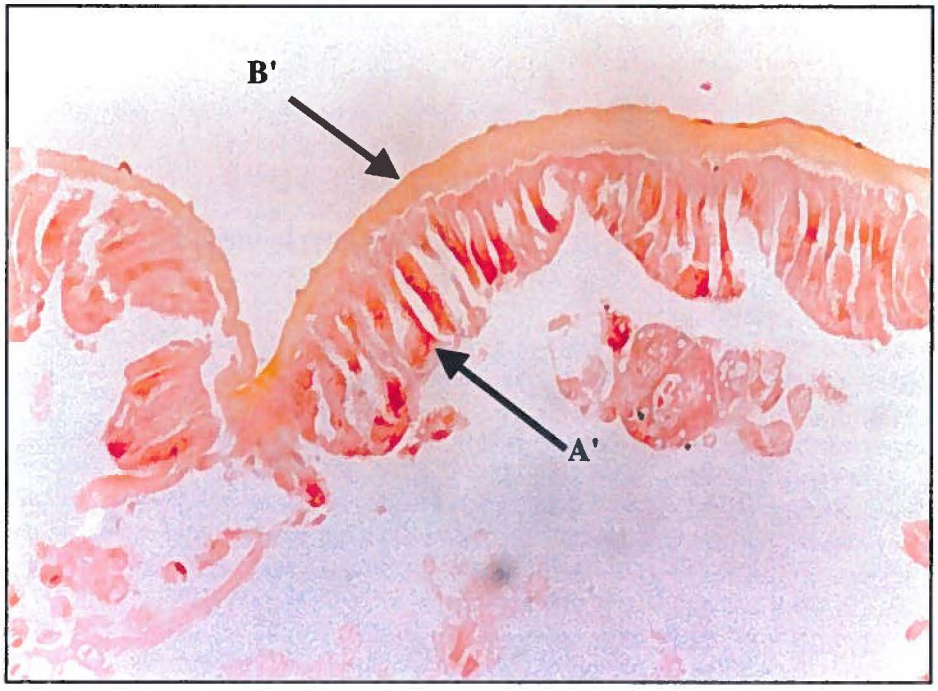


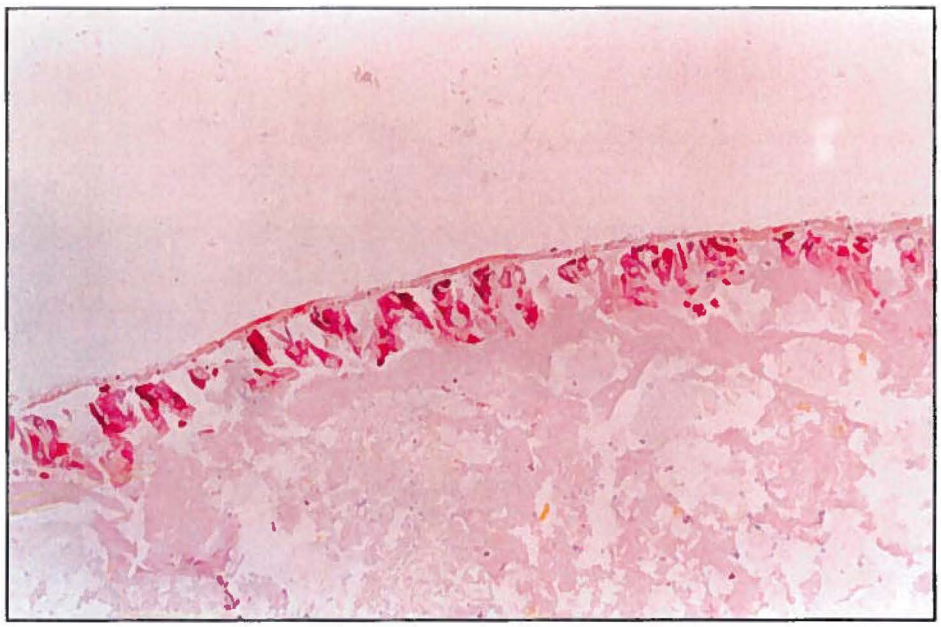
Figure 16: Comparaison chez *C. fumiferana* de l'intestin provenant de larves saines et de larves infectées par le ChfuGV

Des coupes minces de 5 microns ont été colorées avec la safranine, l'éosine et l'hématoxyline

1: intestin provenant d'une larve saine. 250X

2: intestin provenant d'une larve infectée par le ChfuGV. 250X

1



2

cellules provenant des insectes sains et infectés possèdent la même structure c'est-à-dire qu'on observe aucune hypertrophie nucléaire et cellulaire chez ces cellules.

5. DISCUSSION

La première étape effectuée lors de cette étude a été la production et la purification du granulovirus. La suspension virale purifiée a été observée en microscopie électronique afin de déterminer sa concentration et de vérifier son degré de pureté. Une concentration de 1 X 10^{13} granules/mL a été calculée et la suspension virale ne contenait aucune contamination bactérienne ou virale. Il était très important de s'assurer que seul le ChfuGV était présent dans la suspension virale car c'est cette dernière qui servait d'innoculum afin d'infecter les larves de tordeuse. Le ChfuGV n'est pas le seul agent pathogène infectieux pour les larves *C. fumiferana*. Le NPV, l'entomopoxvirus (EPV), et le Cypovirus (CPV) sont des virus également retrouvés chez cet insecte. La présence unique du ChfuGV dans la suspension virale permet de s'assurer que l'ADN quantifié par PCR et ainsi que le signal observé lors de l'hybridation *in situ* sont réellement associés au génome viral du ChfuGV.

Un des objectifs de cette étude a été de déterminer la charge virale présente chez les larves infectées. Cet objectif a été réalisé à l'aide d'une technique de PCR quantitatif et de gel de polyacrylamide qui ont permis respectivement de définir le nombre de copies du génome des virions non-inclus et inclus dans un granule ainsi que la quantité de granuline présente chez les insectes infectés. Il est important de rementionner que lors de l'extraction de l'ADN, les génomes des virions non-inclus ainsi que celui des virions inclus dans un granule furent recueillis. Donc les résultats obtenus suite aux diverses expériences permettent de quantifier le génome des virions totaux (virion non-inclu et inclus dans un granule) chez l'hôte infecté. Le terme virions totaux référera donc aux deux types de virions retrouvés chez les larves d'insectes infectées. L'analyse par PCR quantitatif compétitif a permis de démontrer une corrélation positive et significative entre le nombre de copies du génome des virions inclus et non-inclus présent chez les insectes infectés du premier au dixième jour suivant l'infection et le temps suivant l'infection (Figure 8). Une valeur significative ($p=0,017$) est observée pour les variations inter-échantillons. Cette valeur indique qu'il y a une augmentation significative de la quantité de copie du génome des virions non-inclus et inclus entre chaque jour suivant l'infection. Dans ce contexte, il est possible d'affirmer que plus le temps d'infection se prolonge, plus la quantité de virus chez les insectes augmente. Il faut cependant noter que l'analyse

statistique effectuée comporte certaines limites. En effet, le coefficient de corrélation possède une valeur de 0,193 ce qui indique une variabilité intra-échantillons assez élevée. Cette variabilité peut être attribuable au nombre de réplicats utilisés pour chaque jour suivant l'infection. Un plus grand nombre d'essais aurait permis de diminuer cette variation intra-échantillon et d'obtenir une valeur moyenne plus représentative des résultats obtenus. La réalisation de ce type d'analyse requiert cependant beaucoup de temps. C'est pourquoi le nombre de réplicats n'a pu être plus élevé. Bien que l'analyse statistique établisse une corrélation significative, l'observation visuelle de la figure 8 semble démontrer une diminution du nombre de copies du génome des virions non-inclus et inclus à partir du huitième jour suivant l'infection. En tenant compte des limites de l'analyse statistique, il est possible de prétendre qu'une phase plateau fut atteinte au septième jour suivant l'infection. La phase plateau peut être décrite comme étant le moment où le nombre de copies du génome des virions non-inclus et inclus est à son maximum. À partir du premier jusqu'au sixième jour d'infection, il y a une augmentation constante du nombre de copies virales chez les insectes jusqu'au septième jour suivant l'infection. À partir du huitième jour d'infection, on observe une décroissance du nombre de copies des virions inclus non-inclus et inclus chez l'hôte.

L'augmentation constante du nombre de copies des virions non-inclus et inclus jusqu'au septième jour d'infection n'est pas un phénomène surprenant. Le ChfuGV doit se répliquer de façon maximale afin de pouvoir infecter d'autres insectes. Durant les premiers jours de l'infection, le virus non-inclus se réplique dans les cellules intestinales lors du processus d'infection primaire. Suite à cette première étape de réplication, les virions non-inclus se dirigent vers les cellules cibles où se produit l'infection secondaire. Suite à cette dernière, il y a production de la granuline et formation de virions inclus dans un granule et sortie de ces virions par lyse cellulaire. Le laps de temps écoulé entre l'infection primaire et la lyse cellulaire permet une accumulation constante du nombre de copies du génome des virions non-inclus et inclus dans un granule tel qu'il est observé à la figure 8. La diminution du nombre de copies virales après le huitième jour d'infection peut s'expliquer par la lyse des cellules cibles. Après cette période, une majorité des ces cellules cibles auront été lysées. Les virions non-inclus issus tardivement de l'infection

primaire ne pourront plus se répliquer de façon aussi intensive car il y aura moins de cellules disponibles pour leur réplication. Également, suite à l'infection secondaire, les virions possèdent un corps d'inclusion et ne peuvent réinfecter d'autre cellules, ces virus inclus seront excrétés par l'insecte dans le milieu externe. L'effet cumulatif de ces deux situations fait en sorte que le nombre de copie du génome du ChfuGV diminue après la phase plateau.

Cette approche de quantification par PCR compétitif est utilisée de plus en plus fréquemment lors d'applications cliniques. Par exemple, la détermination de la charge virale du virus de l'immunodéficience humain (VIH) chez les patients infectés permet de déterminer l'efficacité des différentes thérapies antirétrovirales (Lillo *et al*, 1999; Fischer *et al*, 1999). Également, la quantification du virus de l'hépatite C permet de corréler l'histologie des poumons observée chez des patients malades et la charge virale retrouvée chez ces derniers (Ahmed *et al*, 1999). Cette méthode de quantification par PCR est très précise et efficace ce qui la rend très populaire. Dans une optique de production du ChfuGV à grande échelle, la méthode du PCR quantitatif pourrait être d'une grande utilité. La production virale est effectuée de façon *in vivo* chez l'hôte naturel. Les larves de tordeuse infectées sont incubées une dizaine de jours afin que le ChfuGV puisse se reproduire de façon maximale. L'atteinte de la phase plateau permettrait de déterminer la durée d'incubation des insectes avec le virus et ainsi diminuer les pertes encourues due à une incubation trop longue. Dans cette présente étude, le seuil maximal du nombre de copies du génome des virions non-inclus et inclus pourrait être établi à sept jours suivant l'infection en tenant compte des limites de l'analyse statistique. Dans un processus de production virale, il deviendrait moins utile d'incuber les insectes infectés plus longtemps que sept jours car après cette date, le ChfuGV ne se réplique plus de façon optimale.

La cinétique d'apparition de la granuline est un autre outil permettant d'estimer la charge virale chez les insectes infectés. La cinétique démontre une production de la granuline seulement à partir du cinquième jour suivant l'infection (Figure 9). Un immunobuvardage de type Western réalisé avec un sérum polyclonal dirigé contre le ChfuGV a permis de s'assurer que la protéine observée était réellement la granuline

(Figure 10). Il est possible de remarquer que le puits contenant un broyat de larves saines possède un bruit de fond. Également, la hauteur des bandes correspondant à la granuline pour les jours six à dix suivant l'infection ne correspondent pas exactement avec celle retrouvée dans le puits de la granuline témoin. Une explication pour ces artefacts pourrait être une trop grande quantité de protéine transférée sur la membrane. Une dilution du broyat aurait probablement éliminé les réactions non spécifiques dans le puits témoin de broyat de larves saines. Une dilution aurait également diminué l'intensité des bandes correspondant à la granuline dans les échantillons contenant les broyats des jours six à huit suivant l'infection permettant ainsi de faire correspondre la hauteur de ces bandes avec celle retrouvée dans le puits témoin contenant seulement l'extrait viral. Un autre exemple du bruit de fond élevé est la présence de la bande d'environ 35 kDa dans tous les puits contenant les échantillons à analysés. Cette bande ne correspond pas à une protéine virale car elle n'apparaît pas dans le témoin contenant seulement l'échantillon viral. Elle est cependant présente chez le témoin négatif contenant le broyat de larves saines. On peut conclure que cette bande correspond à une protéine de l'insecte probablement présente dans l'innoculum viral injecté au lapin lors de l'immunisation.

L'absence de production de la granuline durant les premiers jours de l'infection est un phénomène normal puisque cette période correspond à l'étape de l'infection primaire du ChfuGV au cours de laquelle les virions produits ne sont pas inclus dans une matrice protéique. Ceci explique l'absence de détection de la granuline sur un gel de polyacrylamide (Figure 9). L'apparition de cette dernière à partir du cinquième jour suivant l'infection n'implique toutefois pas que l'infection primaire est d'une durée de 5 jours. Une hypothèse expliquant l'apparition de la granuline seulement au cinquième jour suivant l'infection est la suivante. Le virus, suite à son ingestion par l'insecte, pénètre dans les cellules de l'intestin où il y a une première réplication du génome. Suite à l'infection primaire, d'une durée d'environ 48 heures (Hess et Falcon, 1987), les virions non-inclus se dirigent via l'hémocèle vers les cellules cibles où débute l'infection secondaire avec une production de la granuline. À partir du cinquième jour, la quantité de granuline produite chez l'insecte est assez élevée pour être détectable sur un gel de polyacrylamide. Lors dune étude semblable, Bradford *et al* (1990) ont effectué une

cinétique d'apparition de la polyédrine du NPV chez *Autographa californica* lorsque ce dernier est appliqué sur des cellules en culture. Ces chercheurs ont démontré que la polyédrine est produite à partir du deuxième jour suivant l'application du virus sur les cellules. La variation observée entre la production de la polyédrine et de la granuline lors de cette présente étude peut dépendre de la nature du virus. Malgré que le GV et le NPV soit membre de la même famille, leur génome n'est pas identique. Il est connu que le promoteur du gène de la polyédrine est très puissant car des vecteurs d'expression eucaryotique sont produits à partir de ce promoteur. La différence de force du promoteur de la granuline et de la polyédrine peut expliquer l'apparition précoce de cette dernière comparativement à la granuline. De plus, les études effectuées *in vitro* ne sont pas un reflet précis de la réalité *in vivo*. En effet, lors d'études *in vivo*, différentes étapes comme l'infection primaire, le passage de différentes barrières physiologiques, l'infection des premières cellules cibles et la propagation de l'infection virale à travers les tissus doivent inévitablement se produirent. Toutes ces étapes n'ont rien de comparable à l'accessibilité immédiate du virus aux cellules lors des études *in vitro*.

Dans un autre ordre d'idée, les résultats obtenus lors de la cinétique d'apparition de la granuline semblent démontrer une augmentation constante de la granuline du cinquième jour jusqu'au dixième jour suivant l'infection à l'exception du septième jour d'infection. À cette date, la quantité de granuline est moins élevée comparativement aux autres jours. Cette faible diminution de la granuline observée chez les insectes récoltés après sept jours pourrait s'expliquer par une plus grande résistance des larves face au ChfuGV. Bien que les invertébrés ne possèdent pas un système immunitaire très élaboré, ils possèdent néanmoins certains mécanismes leur permettant de se défendre face à des microorganismes infectieux (Beck et Habicht, 1996). Les larves récoltées au septième jour suivant l'infection étaient peut-être plus résistantes au virus. Ceci a permis une moins grande réplication du ChfuGV chez ces insectes résultant en une production moins élevée de la granuline. Il serait logique de croire que plus le temps d'infection s'accroît, plus la quantité de granuline devrait augmenter chez les larves infectées. L'approche par PCR quantitatif a permis de démontrer l'augmentation de la quantité du génome des virions non-inclus et inclus lorsque le temps d'infection s'accroît c'est pourquoi la diminution

subite de la granuline observée chez les insectes récoltés au septième jour suivant l'infection est sûrement ponctuelle.

Par opposition au nombre de copies du génome des virions totaux qui atteint une phase plateau au septième jour d'infection, la production de la granuline semble augmenter de façon constante sans atteindre de maximum après dix jours d'infection. Le rôle de la granuline dans la structure du virus pourrait expliquer cette observation. La granuline est l'une des principales protéines associées au corps d'inclusion du virus inclus et sa fonction est d'assurer une bonne protection de la nucléocapside enveloppée contre les conditions environnementales externes. Pour que le ChfuGV possède une protection adéquate, il doit y avoir une production élevée de cette protéine chez l'hôte et c'est ce que démontre la cinétique d'apparition de la granuline (Figure 9). Malgré une diminution du nombre de copies du génome des virions totaux au huitième jour d'infection, la granuline est toujours produite afin de s'assembler avec les virions non-inclus produits lors des jours précédents la phase plateau du génome des virions totaux. Une infection des larves de tordeuse au-delà de dix jours d'infection permettrait probablement d'atteindre un maximum de la production de granuline.

Le deuxième objectif avait pour but de déterminer les tissus ciblés par le ChfuGV lors de sa réplication chez les larves de *C. fumiferana*. Cet objectif a pu être réalisé à l'aide d'une méthode d'hybridation *in situ*. Les résultats ont démontré une coloration pourpre au niveau des cellules de l'intestin, des cellules adipeuses et de l'hypoderme des larves soumises au virus. Cette coloration est le résultat de la réaction enzymatique entre l'enzyme couplée à la sonde virale et son substrat. Elle démontre donc une hybridation de la sonde avec le génome du ChfuGV. Suite à l'application la méthode d'hybridation *in situ*, il est possible de démontrer que le génome du ChfuGV se retrouve au niveau des cellules de l'intestin, des cellules adipeuses et hypodermales. La présence du génome viral dans ces cellules implique qu'elles sont celles ciblées par le ChfuGV lors de sa réplication. L'hybridation de la sonde au niveau de ces cellules se fait probablement avec le génome des virions non-inclus seulement. Comme il a été mentionné, la matrice protéique formant le corps d'inclusion est extrêmement stable et très résistante aux

enzymes protéolytiques (Summers et Egawa, 1973). Au niveau de l'intestin, où se déroule l'infection primaire, les particules virales ne sont pas incluses dans la matrice protéique. La sonde a pu facilement s'hybrider avec le génome des virions non-inclus. Cependant, au niveau des cellules adipeuses et hypodermales, les virions produits suite à l'infection de ces cellules sont inclus dans un granule. La présence d'hybridation dans ces tissus provient vraisemblablement de l'hybridation de la sonde avec le génome des virions avant que ces derniers soient inclus dans la matrice protéique. Le ciblage des cellules utilisées par le ChfuGV lors de sa réplication aurait également pu se faire par une méthode immunohistochimique. Les anticorps produits contre le ChfuGV auraient pu être couplés à un fluorochrome et déposés sur des coupes minces de tissus d'insectes infectés par le ChfuGV. La présence du fluorescence dans certaines cellules signifierait que le virus est présent dans ces cellules. Cependant, cette méthode d'immunohistochimie permettrait seulement de détecter les virions issus de l'infection secondaire car lors de l'infection primaire il n'y a aucune production de la matrice protéique. Les virions non-inclus passeraient donc inaperçus.

Tel que déjà mentionné, l'infection des insectes par un granulovirus peut se caractériser par trois types de syndromes. Le syndrome de type 1 est associé à une infection de l'intestin moyen et des tissus adipeux. Le syndrome de type 2 est caractérisé par une infection de l'intestin moyen, des tissus adipeux et d'au moins un autre organe. Le syndrome de type 3 est associé au infection où seul l'intestin moyen est infecté. L'analyse des résultats suggère que l'infection des larves de *C. fumiferana* par le ChfuGV se caractérise par un syndrome de type 2. En effet, l'approche par hybridation *in situ* montre clairement que l'intestin moyen, les tissus adipeux et l'hypoderme sont des cibles de réplication du ChfuGV. À partir de ces résultats, on peut émettre une hypothèse sur le phénomène de liquéfaction des tissus et l'augmentation de la fragilité de l'hypoderme des insectes exposés au ChfuGV. Les cellules adipeuses forment la plus grande masse tissulaire chez l'insecte. Elles sont également responsables de la majorité des activités métaboliques cellulaires des larves d'insectes en pleine croissance (Friedman, 1985). L'infection de ces cellules par le virus peut provoquer un déséquilibre cellulaire qui sera reflété par une désorganisation au niveau des tissus adipeux allant jusqu'à la liquéfaction

des tissus. Dans ce même sens, l'infection des cellules de l'hypoderme par le virus serait la cause de l'augmentation de la fragilité de cet organe. Les adipocytes sont responsables de la synthèse de la cuticule de l'insecte. Leur infection par le ChfuGV diminue probablement la synthèse de la cuticule ce qui rend l'hypoderme de l'insecte très fragile.

Dans la littérature, il a été démontré que d'autres types d'infections reliées aux granulovirus se caractérisent par un syndrome de type 2. En plus d'une infection au niveau de l'intestin et des tissu adipeux, certains granulovirus infectent également la matrice trachéale comme le PsGV chez *Plathypena scabra* (Beegle, 1978), l'AaGV chez *Archips argyrospila* (Pinnock et Hess, 1978) et le PuGV chez *Pseudaletia unipuncta* (Tanada et Hess, 1984). Également, le HzGV chez *Heliothis zea* (Adams *et al*, 1977), le PiGV chez *Plodia interpunctella* (Begon *et al*, 1993) sont retrouvés dans les tubes de Malpighi chez ces insectes. Begon et collaborateurs (1993) ont toutefois mentionné que les virus retrouvés au niveau des tubes de Malpighi n'étaient pas reliés à une infection virale mais résulteraient tout simplement d'une excrétion naturelle par l'insecte.

La mise au point de la méthode d'hybridation *in situ* a permis de développer un outil de plus pour le diagnostic de la présence du ChfuGV chez les larve de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Cette approche a été utilisée pour l'étude de l'infection d'un NPV chez *Penaeus monodon* (Poulos *et al*, 1994). Ces chercheurs ont observé l'hybridation de leurs sondes avec le génome viral présent dans le tubule hépatopancréatique et dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen. Cette méthode s'est avérée très efficace pour le diagnostic de virus chez d'autres organismes. Par exemple, elle a été utilisée pour la détection du virus du papillome humain (HPV) dans des biopsies prélevées dans le col de l'utérus (Heino *et al*, 1989; Rolighead et Lindeberg, 1996), de même que pour la détection d'un virus murin causant l'immunodéficience acquise chez les souris au niveau des tissus du système nerveux central (Simard *et al*, 1997). Le rétrovirus murin Cas-Br-E a également été détecté dans les cellules neurologiques de la souris (Gravel *et al*, 1993). Dans cette présente étude, la sensibilité de la technique d'hybridation *in situ* aurait pu être accrue en utilisant un cocktail de sondes au lieu d'une seule. Poulos et collaborateurs (1994) ont utilisé, afin de détecter le

génome du baculovirus dans les crevettes, quatre sondes dérivées du génome viral. Ce cocktail de sondes était capable de s'apparier à environ 10 % du génome viral total. Lors cette présente étude, la sonde utilisée ne pouvait s'apparier qu'à seulement 0,6 % du génome viral total (750 paires de base pour la sonde sur 120 000 paires de base du génome viral). L'augmentation de la sensibilité suite à l'utilisation d'un cocktail d'hybridation contenant plusieurs sondes aurait peut-être permis d'observer une hybridation au niveau de d'autres tissus chez les larves de *C. fumiferana* soumises au ChfuGV. Cependant, lors de la réalisation de la présente étude, seul le gène de la granuline du ChfuGV était connu et séquencé ce qui a éliminer la possibilité de faire un cocktail de sondes à partir de plusieurs gènes.

Lors de cette étude, des coupes histologiques d'insectes sains et infectés par le ChfuGV ont été produites afin de faire un parallèle entre les résultats obtenus par hybridation *in situ* et les dommages cellulaires observés par histologie. L'observation des coupes minces effectuées sur des tissus intestinaux, adipeux et hypodermiques démontrent des variations morphologiques entre des tissus sains et infectés seulement au niveau des cellules adipeuses (Figure 15) et hypodermiques (Figure 16). Aucune variation n'a pu être observée au niveau des cellules de l'intestin (Figure 14) et des autres tissus. L'absence de variation morphologique au niveau de l'intestin des insectes infectés pourrait s'expliquer par le faible taux de réplication des virions non-inclus dans cet organe. Tanada et Hess (1991) suggèrent que lors de l'infection primaire (l'infection des cellules intestinales) il se produit une faible réplication du génome des virions non-inclus. Cette première étape de réplication permet aux virions non-inclus d'aller infecter les cellules cibles via l'hémocèle. Il n'est donc pas nécessaire pour les granulovirus de se répliquer de façon intensive dans les cellules intestinales car ce ne sont pas les cellules cibles où se produit une réplication intense. L'hypertrophie des noyaux observés chez les cellules adipeuses et hypodermiques des insectes soumis au ChfuGV est l'un des phénotypes associés à une infection par les granulovirus. Les études histologiques effectuées chez *Plathypena scabra* (Beegle, 1978), *Spodoptera frugiperda* (Hamm, 1968), *Trichoplusia ni* (Hamm et Paschke, 1963) et *Carpocapsa pomonella* (Tanada et Leutenegger, 1970) supportent les observations faites dans cette présente étude.

L'hypertrophie des noyaux résulterait du processus de la réplication du virus non-inclus au sein des noyaux. Durant cette étape, il se produit une accumulation de l'ADN viral ainsi que de toute la machinerie enzymatique cellulaire nécessaire à la réplication de celui-ci. Ce site de synthèse de l'ADN viral et d'assemblage de la nucléocapside virale est nommé "stroma virogénique" (Consigli *et al*, 1986). L'histologie des cellules adipeuses des insectes infectés démontre également une atrophie des lobules lipidiques. Elle est causée par l'augmentation de la taille du noyau qui prend de l'expansion dans la cellule infectée. L'atrophie des lobules lipidiques a également été décrite par Hamm et Paschke (1963) chez *Trichoplusia ni* lors d'une infection par le TnGV.

Suite à l'étude sommaire par histologie des tissus d'insectes sains et infectés, il est possible d'observer que les méthodes de PCR quantitatif et d'hybridation *in situ* sont deux approches beaucoup plus sensibles et efficaces pour diagnostiquer une infection par le ChfuGV comparativement à la technique histologique utilisée au cours de cette étude. En effet, les deux méthodes basées sur la révélation d'acides nucléiques (PCR quantitatif et hybridation *in situ*) permettent la détection du virus de façon très précoce et à faible concentration comparativement à une méthode basée sur l'observation de variations morphologiques entre un insecte sain et infecté. Lors de cette étude, la coloration par l'hématoxyline et l'éosine fut utilisée afin de faire un parallèle avec les résultats présentés dans la littérature scientifique qui utilisent également cette coloration. Suite à l'utilisation de cette approche, des variations morphologiques ont été observées dans les cellules adipeuses et hypodermales. Ces dernières correspondent aux cellules ciblées lors de l'infection secondaire du ChfuGV. Par PCR quantitatif et par hybridation, il est possible de détecter le génome des virions non-inclus dès les premiers jours de l'infection ce qui équivaut à l'infection primaire du virus. Il existe cependant d'autres méthodes histologiques que celle utilisée dans cette étude pour diagnostiquer de façon directe la présence du génome viral dans les cellules. Une de ces méthodes est la coloration des coupes histologiques par l'orange acridine. Ce colorant permet de détecter directement le génome viral dans les cellules et permet de faire un diagnostique rapide en ce qui concerne la présence du virus dans les tissus infectés.

6. CONCLUSION

La tordeuse des bourgeons de l'épinette est le plus grand défoliateur des forêts boréales du Québec. Elle engendre des pertes économiques considérables dans le domaine de la foresterie. Le granulovirus retrouvé chez la tordeuse (ChfuGV) peut être un bon candidat comme agent de lutte biologique car il provoque en laboratoire la mort de l'insecte sur une période moyenne de 10 jours. Suite à l'infection des larves *C. fumiferana* par le virus, il est possible d'observer une liquéfaction des organes ainsi qu'une augmentation de la fragilité de l'hypoderme de l'insecte. Afin de déterminer les caractéristiques contribuant à l'efficacité du granulovirus virus comme insecticide biologique, des études au niveau du développement du virus chez son hôte ont été effectuées.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de démontrer que les méthodes du PCR quantitatif et de l'hybridation *in situ* permettent la détection du ChfuGV chez son hôte dès les premières étapes de l'infection virale. Ces deux techniques permettent de détecter le virus (ADN des virions inclus et non-inclus et granuline) tant au niveau quantitatif qu'au niveau de la distribution cellulaire chez les insectes. Il a également été démontré, par PCR quantitatif, que le nombre de copies du génome des virions totaux progresse de façon constante chez les larves jusqu'au septième jour suivant l'infection. À partir de cette date, le ChfuGV semble atteindre un maximum de copies de son génome suivi d'une diminution de ce dernier. L'atteinte d'un plateau de la production du génome des virions totaux est vraisemblablement associée au mode de réplication du virus. Suite à l'infection secondaire, les virions produits ne réinfectent plus d'autres cellules avoisinantes car ils possèdent un corps d'inclusion. L'incapacité des virions à réinfecter ces cellules ne permet plus l'augmentation du nombre de copies génomiques. Dans un autre ordre d'idée, la cinétique d'apparition de la granuline par gel de polyacrylamide a permis de démontrer l'augmentation constante de cette protéine chez les larves récoltées du cinquième au dixième jour suivant l'infection. La méthode d'hybridation *in situ* a permis de déterminer les cellules ciblées par le ChfuGV lors de l'infection chez *C. fumiferana*. Le génome de ce dernier a été détecté dans les cellules de l'intestin moyen, les cellules adipeuses et les cellules hypodermales des insectes. L'infection de ces organes par le ChfuGV se caractérise par un syndrome de type 2.

Dans le but d'utiliser un virus comme agent de lutte biologique, il est primordial de connaître l'interaction qui existe entre le virus et son hôte. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de mieux comprendre comment le ChfuGV peut occasionner la liquéfaction et la mort des larves de *C. fumiferana* soumises à ce virus. Les connaissances obtenues suite à cette étude pourront être utiles lors d'une production massive du virus requise pour son utilisation sur le terrain comme pesticide biologique. Afin d'obtenir un rendement maximal au niveau de la production de masse du ChfuGV, les approches de quantification du virus par PCR quantitatif et par gels de polyacrylamide seront très utiles. La durée de l'infection des larves par le virus pourra être établie entre le nombre de jours où la phase plateau du nombre de copies virales fut atteinte et le nombre de jours où la granuline est à son maximum. Dans cette présente étude, le maximum de production de granuline n'a pas été atteint mais la durée d'infection des insectes par le virus pourrait se situer entre sept et dix jours. La différence entre sept ou dix jours d'exposition au virus semble peu importante mais au niveau de la production de masse, elle permet d'économiser beaucoup de temps, d'argent et d'efforts.

D'un point de vue plus fondamental, cette étude a permis de démontrer quels sont les tissus de l'insecte ciblés par le ChfuGV lors de sa réplication. Il est toujours intéressant de connaître les mécanismes par lesquels un virus infecte sa cellule cible et se réplique dans celle-ci lors du cycle infectieux chez son hôte. Toujours du point de vue fondamental, une étude permettant de déterminer le récepteur viral auquel le virus s'attache pour débuter son cycle infectieux pourrait être documentée. L'identification du récepteur viral permettrait d'approfondir les connaissances reliées aux granulovirus. Malheureusement, à cause de l'absence d'une lignée cellulaire bien établie permettant la réplication des granulovirus, la compréhension des ces derniers restera toujours obscure.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Claude Guertin pour m'avoir accueilli dans son laboratoire afin que je puisse effectuer ma maîtrise ainsi que pour son support moral et financier. Je tiens également à remercier Nicole Mayeu, technicienne du laboratoire, pour ses nombreux conseils, Diane Rouleau et Normand Rocheleau pour leurs aides précieuses lors de mon apprentissage des techniques histologiques. J'aimerais également exprimer ma gratitude à la fondation Armand-Frappier pour son soutien financier.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, J.R., Goodwin, R.H. et Wilcox, T.A. 1977. Electron microscopic investigation on invasion and replication of insects baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. Biology Cellulaire **28**:261-268.

Ahmed, M.M., Mutimer, D.J., Martin, B., Elias, E. et Wilde, J.T. 1999. Hepatitis C viral load, genotype and histological severity in patient with bleeding disorders. Haemophilia **5**:49-55.

Alain, R., Berthiaume, L, et Trudel, M. 1989. Microscopie électronique. dans Payment, P. et Trudel, M (Eds) Manuel de techniques virologiques. Centre de recherche en virologie. IAF. Université du Québec. Presses de l'Université du Québec. p.107-117.

Arif, B.M., Guangyu, Z. et Jamieson, P. 1986. A comparison of three granulosis viruses isolated from *Choristoneura* Spp. Journal of Invertebrate Pathology **48**:180-186.

Arrigo, S.J., Weitsman, S., Rosenblatt, J .D. et Chen, I.S., 1989. Analysis of rev gene function on human immunodeficiency virus type 1 replication in lymphoid cells by using a quantitative polymerase chain reaction method. Journal of Virology. **63** :4875-4881.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. et Strulie, K. 1989. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons inc. New-York. pp.1354

Bagnarelli, P., Menzo, S., Manzin, A, Varaldo, P.E., Montroni, M., Giacca, M. et Clementi, M. 1991. Detection of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods **32** :31-39.

Bah, A., Bergeron, J., Arella, M., Lucarotti, C.J. et Guertin, C. 1997. Identification and sequence analysis of the granulin gene of *Choristoneura fumiferana* granulosis virus. Archives of Virology **142** :1577-1584.

Beck, G. et Habicht, G.S. 1996. Immunity and invertebrates. Scientific American. Novembrer. pp.60-66.

Beegle, C.C. 1978. Histopathology and bioassay of *Plathypena scabra* granulosis virus. Journal of Invertebrate Pathology **32**:325-331.

Begon, M., Haji Daud, K.B., Yougn, P. et Howells, R.E. 1993. The invasion and replication of a granulovirus in the indian meal moth, *Plodia interpunctella*: an electron microscope study. Journal of Invertebrate Pathology **61**:281-295.

Bell, P.D. 1997. Insect anatomy : internal http://gaia.flemingc.on.ca/~pbell/inter.htm

Bergold, G. 1948. Uber die Kapselvirus-Krankheit. Z. Naturforsch. **3b**:338-342.

Bideshi, D.K., Hice, R.H., Ge, B. et Federici, B.A. 1998. Molecular characterization and expression of the *Trichoplusia ni* granulovirus helicase gene. Journal of General Virology **79**:1309-1319.

Blais, J.R. 1985a. The ecology of the eastern spruce budworm: A review and discussion. dans Sanders, C.J., Stark,R.W., Mullins E.J. et Murphy, J. (Eds), Recents Advances in Spruce Budworm Research. Proceedings of the CANUSA spruce budworm. Research symposium. Minister of supply and services Canada. Ottawa. p.49-59.

Blais, J.R. 1985b. The spruce budworm and the forest. dans Sanders, C.J., Stark,R.W., Mullins E.J. et Murphy, J. (Eds), Recents advances in Spruce budworm research. Proceedings of the CANUSA spruce budworm. Research symposium. Minister of supply and services Canada. Ottawa. p135-137.

BNDF. 1997. Base nationale de données sur les forêts. Abrégé de statistiques forestières canadiennes. Conseil canadien des ministres des forêts. Ottawa.

Borror, D.J., DeLong, D.M. et Triplehorn, C.A. 1981. An introduction to the study of insects. 5e édition. Saunders College Publishing. Montréal. pp.827.

Bradford, M.B., Blissard, G.W. et Rohrman, G.F. 1990. Characterization of the infection cycle of the *Orgya pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus in *Lymantria dispar* cells. Journal of general virology **71**:2841-2846.

Braissaint, O. et Wahli, W. 1998. A simplified *in situ* hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. Biochemica **1**:10-16.

Brown, D.A., Bud, H.M. et Kelly, D.C. 1977. Biophysical properties of the structural components of a granulosis virus isolated from the cabbage white butterfly *Pieris brassicae*) Virology **81**:317-327.

Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. et Heckelman, P.E. 1989. The Merk Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11e édition. Merck and CO., inc. U.S.A.

Burley, S.K., Miller, A., Harrap, K.Aet Kelly, D.C. 1982. Structure of the baculovirus nucleocapsid. Virology **120**:433-439.

Cabalerro, P., Vargas-Osuna, E. et Santiago-Alvarez, C. 1991. Efficacy of a Spanish strain of *Agrotis segetum* granulosis virus (Baculoviridae) against *Agrotis segetum* Schiff. (Lep., Noctuidae) on corn. Journal of Applied Entomology **112**:59-64.

Celi, F.S., Zenilman, M.E. et Shuldiner, A.R. 1993. A rapid and versatile method to synthetize internal standars for competive PCR. Nucleic Acids Research **21** :1047.

Clontech laboratories. 1997. Quantitative RT-PCR. Methods and application. Book 3.

Comptois, B. 1988. Notions d'entomologie forestière. Modulo éditeur. Québec. p.123-128.

Consigli, R.A., Russel, D.L. et Wilson, M.E. 1986. The biochemistry and molecular biology of the granulosis virus that infects *Plodia interpunctella*. Current Topics in Microbiology and Immunology **131**:69-101.

Crook, N.E. 1981. A comparison of the granulosis viruses from *Pieris brassicae* and *Pieris rapae*. Virology **115**:173-181.

Crook, N.E., James, J.D., Smith, I.R.L. et Winstanley, D. 1997. Comprehensive physical map of the *Cydia pomonella* granulovirus genome and sequence anlysis of the granulin gene region. Journal of General Virology **78**:965-974.

Derksen, A.C.G. et Granados, R.R. 1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. Virology **167**:242-250.

Drouin, J.A. 1997. Spruce budworm. http://www.ag.usask.ca/cofa/departments/hort/hortinfo/pests/budworm.html

Dwyer, K.G. et Granados, R.R. 1987. A physical map of the *Pieris rapae* granulosis virus genome. Journal of General Virology. **68**:1471-1476.

Easwaramoorthy, S et Cory, S.J. 1990. Characterization of the DNA of granulosis viruses isolated from two closely related moths, *Chillo infuscatellus* et *C. saccariphagus indicus*. Archives of Virology **110**:113-119.

Federici, B.A. 1993. Viral pathobiology in relation to insect control. dans Beckage, N.E., Thompson, S.N. et Federici, B.A. (Eds) Parasites and pathogens of insects Vol. 2 :Pathogens chapitre 4. Academic Press, inc. p.81-101.

Federici, B.A. et Stern, V.M. 1990. Replication and occlusion of a granulosis virus in larval and adult midgut epithelium of the grapeleaf skeletonizer, *Harrisina brillians*. Journal of Invertebrate Pathology. **56**:401-414.

Fédière, G., El-Sheikh, M.A.K., Semeada, A.M., El-Hefny, A. et El-Sherif, S. 1997. Production and field evaluation of a granulosis virus for control of *Sesamis critica* Led. (Lep., Noctuidae) in maize fields in Egypt. Journal of Applied Entomology **121** :293-296.

Fischer, M., Huber, W., Kallivroussis, A., Ott, P., Opravil, M., Luthy, R., Weber, R. et Cone, R.W. 1999. Highly sensitive methods for quantitation of human immunodeficiency virus thpe 1 RNA from plasma, cells, and tissues. Journal of Clinical Microbiology **37**:1260-1264.

Friedman, S. 1985. Intermediary metabolism. dans Blum, M.S. (Ed), Fundamental of insect physiology. Chapitre 12. John Wiley & Sons, inc. New-York. pp.467-505.

Glen, D.M. et Payne C.C. 1984. Production and field evaluation of codling moth granulosis virus for control of *Cydia pomonella* in the United Kingdom. Annual Applied Biology **104**:87-98.

Granados, R.R. 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses Biotechnology and Bioengineering **22**:1377-1405.

Granados, R.R., Derksen, A.C.G., et Dwyer, K.G. 1986. Replication of the *Trichoplusia ni* granulosis and nuclear polyhedrosis viruses in cell cultures. Virology **152**:472-476.

Gravel, C., Kay, D. et Jolicoeur, P. 1993. Identification of the infected target cell type in spongiform myeloencephalopathy induced by the neurotropic Cas-Br-E murine leukemia virus. Journal of Virology **67**:6648-6658

Hamm, J.J. 1968. Comparative histopathology of a granulosis and a nuclear polyhedrosis of *Spodoptera frugiperda*. Journal of Invertebrate Pathology **10**:320-326.

Hamm J.J. et Paschke, J.D. 1963. On the pathology of a granulosis of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner). Journal of Insect Pathology **5**:187-197.

Harvey, G.T. 1985. The taxonomy of the coniferophagous *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae): A Review. Dans Sanders, C.J., Stark,R.W., Mullins E.J. et Murphy, J. (Eds), Recents Advances in Spruce Budworm Research. Proceedings of the CANUSA Spruce Budworm. Research symposium. Minister of Supply and Services Canada. Ottawa. p.16-48.

Heino, P, Hukkanen, V. et Arstila, P. 1989. Detection of human papilloma virus (HPV) DNA in genital biopsy specimens by *in situ* hybridization with digoxigenin-labeled probes. Journal of Virological Methods **26**:331-338.

Hepburn, H.R. 1985. The integument. Dans Blum, M.S. (Ed), Fundamental of Insect Physiology. Chapitre 4. John Wiley & Sons, inc. New-York. pp.139-183.

Hess, R.T. et Falcon, L.A. 1977. Observation on the interaction of baculoviruses with the plasma membrane. Journal of General Virology **36**:525-530.

Hess, R.T. et Falcon, L.A. 1987. Temporal events in the invasion of the codling moth, *Cydia pomonella*, by a granulosis virus: an electron microscope study. Journal of Inverbrate Pathology **50**:85-105.

Huber, J. et Dickler, E. 1977. Codling moth granulosis virus: Its efficiency in the field in comparison with organophosphorus insecticides. Journal of Economic Entomology **70**:557-561.

Huger, A. 1963. Granuloses of insects. Dans Insect pathology, an advanced treatise. Vol.1 Academic press. New-York. p.531-575.

Jaques, R.P., Hardman, J.M., Laing, J.E., Smith, R.F. et Bent, E. 1994. Orchard trials in Canada on control of *Cydia pomonella* (Lep : tortricidae) by granulovirus. Entomophaga **39**:281-292.

Javala, T., Lehtovaara, P., Kallio, A., Ranki, M. et Söderlund, H . 1993. Quantification of hepatitis B virus DNA by competitive amplification and hybridization on microplates. Biotechniques **15** :134-139.

Jehle, J.A. et Backhaus, H. 1994. The granulin gene region of *Cryptophlebia leucotreta* granulosis virus: sequence analysis and phylogenetic considerations. Journal of General Virology **75**:3667-3671.

Kelly, D.C. Baculovirus replication. 1982. Review article. Journal of General Virology **63**:1-13.

Kelly, D.C. 1987. Baculoviridae. Dans Nermut, M.V. et Steven, A.C. (Eds), Animal Virus Structure. Chapitre 21. Elsevier Science Publishers. New-York. p.349-350.

Lachance, D. 1995. Insectes forestiers ravageurs dans la région du Québec. Dans Armstrong, J.A. et Ives, W.G.H. (Eds), Insectes forestiers ravageur au Canada. Chapitre 3. Ressources naturelles Canada. Services canadien des forêts. Ottawa. p.27-39.

Lery, X., Giannotti, J., Taha, A., Ravalec, M. et Abol-Ela, S. 1997a. Mutiplication of a granulosis virus isolated from the potato tuber moth in a new established cell line of *Phthorimaea operculella*. In Vitro Cellular Development and Biological Animation. **33**:640-646.

Lery, X., Khamiss, O., Nour-el-din, A., Giannotti, J. et Abol-Ela, S. 1997b. Multiplication of *Spodoptera littoralis* granulovirus in a cell line established form *Phthorimaea operculella*. Acta Virologica. **41**:169-174.

Lillo, F.B., Ciuffreda, D., Beglia, F., Capiluppi, B., Mastrorilli, E., Bergani, B., Tambussi, G. et Lazzarin, A. 1999. Viral load and burden modification following early antiretroviral therapy of primary HIV-1 infection. AIDS **13**:791-796.

Martignoni, M.E. 1957. Contributo alla conoscenza di una granulosi di *Eucosma griseane* (Hübner) (Tortricidae, Lepidoptera) quale fattore limitante il pullulamento de l'insettonella engadina alta. Mitt. Schweiz. Anstalt. Forstl. Versuchswesen **32**:371-418.

Mattson, W.J., Simmons, G.A. et Witter, J.A. 1988. The spruce budworm in eastern north america. Dans Berryman, A.A. (Ed), Dynamics of Forest Insect Populations Plenum Publishing Corporation. p.309-330.

McFarlane, J.E. 1985. Nutrition and digestives organs. Dans Blum, M.S. (Ed), Fundamental of Insect Physiology. Chapitre 2. John Wiley & Sons, inc. New-York. pp.60-89.

McGaughey, W.H. 1975. A granulosis virus for indian meal moth control in stored wheat and corn. Journal of Economic Entomology **68**:346-348.

McMorran, A. 1965. A synthetic diet for the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). The Canadian Entomologist **97**:58-62.

Miller, L.K. Ling, A.J. et Bulla, Jr., L.A. 1983. Bacterial, viral, and fungal insecticides. Science **219**:715-721.

Miltenburger, H.G., Harvey, J.P., Huber, J. et Huger, A.M. 1984. The cellular substrate: a very important requirement for baculovirus *in vitro* replication. Z. Naturforsch. **39**:993.

Nagata, M et Tanada, Y. 1983. Origin of an alkaline protease associated with the capsule of a granulosis virus of the Armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth). Archives of Virology **76**:245-256.

Nation, J.L. 1985. Respiratory systems. dans Blum, M.S. (Ed), Fundamental of Insect Physiology. Chapitre 5. John Wiley & Sons, inc. New-York. pp.185-224.

Paillot, A. 1926. Sur une nouvelle maladie du noyau ou grasserie des chenilles de *P. brassicae* et un nouveau groupe de microorganisme parasites. Centre de recherche de l'académie des sciences de Paris **182**:180-182.

Paillot, A. 1935. Nouvel ultravirus parasite d'*Agrotis segetum* provoquant une prolifération des tissus infectés. Centre de recherche de l'académie des sciences de Paris **201**:1062-1064.

Piatak, M., Ka-Cheung L. jr., Williams, B. et Lifson, J.D. 1993. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. Biotechniques **14** :70-81.

Pierce, P.A. 1975. Effects on birds. dans Aerial Control of Forest Insects in Canada. Ed. Prebble, M.L. Department of the environment. Ottawa. pp. 306-309.

Pinnock, D.E. et Hess, R.T. 1978. Morphological variations in the cytopathology associated with granulosis virus in the fruit-tree leaf roller, *Archips argyrospila*. Journal of Ultrastructure Research **63**:252-260.

Poulos, B.T., Mari, J., Bonami, J-R., Redman, R. et Lightner, D.V. 1994. Use of non-radioactively labeled probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization on fixed tissue. Journal of Virological Methods **49**:187-194.

Rohrmann, G.F. 1992. Baculovirus structural proteins. Journal of General Virology **73**:749-761.

Rolighead, J. et Lindeberg, H. 1996. Detection of HPV 11 DNA in paraffin-embedded laryngeal tissue with a DIG-Labeled DNA probe. Dans Non radioactive *in situ* application manual. Procedures for *in situ* Hybridization to Chromosomes, Cells, and Tissue Sections Chapitre 5. Boehringer Mannheim.

Russell, D.L. et Consigli, R.A. 1986. Two-dimensional polyacrylamide gel analysis of *Plodia* interpunctella granulosis virus. Journal of Virology **60**:82-89.

Sakar, G. et Bolander, M.E. 1994. The "looped oligo" method for generating reference molecules for quantitative PCR. Biotechniques **17** :864-866.

Schnittman, S.M., Psallidopoulos, M.C., Lane, H.C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C.H., Salzman, N.P. et Fauci, A.S. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. Sciences **245** :305-308.

Simard, C., Klein, S.J., Mak, T. et Jolicoeur, P. 1997. Studies of the susceptibility to nude, CD4 knockout, and SCID mutant mice to the disease induced by the murine AIDS defective virus. Journal of Virology **71**:3013-3022.

Stairs, G.R., Parrish, W.B., Briggs, J.D. et Allietta, M. 1966. Fine structure of a granulosis virus of the Codling moth. Science **30**:582-583

Steinhaus, E.A. 1947. A new disease of the variegated cutworm, *Peridroma margaritosa* (Haw.). Science **106**:323

Summers, M.D. et Arnott, J.H. 1969. Ultrastructural studies on inclusion formation and virus occlusion in nuclear polyhedrosis and granulosis virus-infected cells of *Trichoplusia ni* (Hübner). Journal of Ultrastructure Research **28**:462-480.

Summers, M.D. 1971. Electron microscopic observation on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. Journal of Ultrastructure Research **35**:606-625.

Summers, M.D. et Anderson, D.L. 1972. Granulosis virus deoxyribonucleic acid: a closed, double-stranded molecule. Journal of Virology. **9**:710-713.

Summers, M.D. et Egawa, K. 1973. Physical and chemical properties of *Trichoplusia ni* granulosis virus granulin. Journal of Virology **12**:1092-1103.

Summers, M.D. et Gale, S.E. 1975. *Trichoplusia ni* granulosis virus granulin: a phenol-soluble, phosphorylated protein. Journal of Virology **16**:1108-1116.

Talerico, R.L. 1984. General biology of the spruce budworm and its hosts. Dans Schmitt, D.M., Grimble, D.G.et Searcy, J.L. (eds.), Managing the Spruce Budworm in Eastern North America. Chapitre 1. United States Department of Agriculture. Forest service. Washington. p.1-10.

Tanada, Y. et Leutenegger, R. 1970. Multiplication of a granulosis virus in larval midgut cells of *Trichoplusia ni* and possible pathways of invasion into the hemocoel. Journal of Ultrastructure Research **30**:589-600.

Tanada, Y. et Hess, R.T. 1984. The cytopathology of baculovirus infections in insects. dans King, R.C. et Akai, H (Eds), Insect Ultrastructure. Vol. 2. Plenum. New-York. p.517-555.

Tanada, Y. et Hess, R.T. 1991. Baculoviridae. Granulosis viruses. Dans Adams, J.R. et Bonami, J.R. (Eds), Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press. Boston. p.227-257.

Tanada, Y. et Kaya, H.K. 1993. DNA-viral infections : Baculoviridae. Dans Insect Pathology. Chapitre 6. Academic Press. New-York. pp.171-216.

Tatchell, G.M. et Payne, C.C. 1984. Field evaluation of a granulosis virus for the control of *Pieris rapae* [Lep. : Pieridae] in the United Kingdom. Entomophaga **29**:133-144.

Thompkins, G.J. 1991. Purification of invertebrate viruses. Dans Adams, J.R. et Bonami, J.R. (Eds) Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press. Library of Congress. Boston. p.31-38.

Tweeten, K.A., Bulla jr, L.A. et Consigli, R.A. 1977. Supercoiled circular DNA of an insect granulosis virus. Proceeding of the National Academy of Sciences of USA **74**:3574-3578.

Tweeten, K.A., Bulla jr, L.A. et Consigli, R.A. 1978. Characterization of an alkaline protease associated with a granulosis virus of *Plodia interpunctella*. Journal of Virology **26**:702-711.

Tweeten, K.A., Bulla jr, L.A. et Consigli, R.A. 1980. Structural polypeptides of the granulosis virus of *Plodia interpunctella*. Journal of Virology **33**:877-886.

U.S.D.A. 1985. Insect of eastern forests. Miscellanneous publication. U.S. Department of Agriculture, Forest Service. Library of Congress. Washington, D.C. p.5-19.

Wang, P., Hammer, D.A. et Granados, R.R. 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidoteran insects. Journal of General Virology **75**:1961-1967.

Wilson, M.E. et Consigli, R.A. 1985. Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. Virology **143**:526-535.

Wistansley, D. et Crook, N.E. 1993. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. Journal of General Virology **74**:1599-1609.

Witting, G. 1959. Untersuchungen über den verlauf der granulose bei raupen von *choristoneura fumifera* (Hb) (Lepidopt., Tortricidae). Arch. Ges. Virusforsch **9**:365-395.

Yamamoto, T., Hess, R.T. et Tanada, Y. 1981. Assembly of occlusion-body proteins around the enveloped virion of an insects baculovirus. Journal of Ultrastructure Research **75**:127-130

ANNEXES

ANNEXE I

Éléments entrant dans la composition de la nourriture artificielle McMorran

Ingrédients secs

Ingrédients	Compagnie	Quantité
Caséine	Bioserv	183,6 g
Cellulose	Bioserv	24,6 g
Mélange de sels	Bioserv	52,8 g
Sucre		183,6 g
Germe de blé		160,0 g
Acide ascorbique	Sigma	39,6 g
Chlorure de choline	Sigma	5,4 g
p-hydroxybenzoate de méthyl	Sigma	8,0 g
Acide sorbique	Sigma	15,0 g

Ingrédients liquides

KOH	Sigma	26,4 ml
Solution de vitamine		53,0 ml
Eau distillée		1180 ml

Agar

Agar		88,0 g
Eau distillée		3200 ml

(McMorran, 1965)

ANNEXE II

Méthodes utilisées pour le calcul de la concentration virale dans les suspensions d'innoculation et lors des analyses par PCR quantitatif

3.1 Calcul de la concentration de la suspension virale:

$\frac{Vc}{Bc} \times C \times D^{-1}$ où Vc = Nombre de virus compté

Bc = nombre de bille de latex comptée

C = concentration des billes de latex

D^{-1} = inverse de la dilution de la suspension virale

$$\frac{715 \text{ virus}}{251 \text{ billes de latex}} \times 3{,}51 \times 10^{8} \text{ billes /ml} \times 10000 = 1{,}0 \times 10^{13} \text{ virus /ml}$$

3.2 Conversion d'une concentration d'ADN en attomoles:

L'étalon interne contient 92 adénines, 65 guanosines, 93 cytosines et 93 thymines sur un brin donc au total il y a 185 adénines, 158 guanines, 158 cytosines et 185 thymines compris dans l'étalon interne.

dAMP : 331.23 g / mole

dGMP : 347.23 g / mole

dCMP :307.19 g / mole

dTMP) :322.13 g / mole (Budavari *et al*, 1989)

Le poids moléculaire de l'étalon interne =

(185 X 331.23 g / mole +158 X 347.23 g / mole +158 X 307.19 g / mole +

185 X 322.13 g /mole)= 2.24×10^{5} g / mole

Pour chaques liaison entre deux nucléotides il y a une perte d'une molécule d'eau, on doit donc retrancher 18 g / mole pour chaque liaison pour chaque brin d'ADN donc:

2.24×10^{5} g / mole – (342 liaisons X 18 g /mole X 2 brins d'ADN) = $2{,}12 \times 10^{5}$ g / mole

La concentration de l'étalon interne = 0,21 µg / µl

$$\frac{0{,}21\ \mu g}{1\ \mu l} \times \frac{1\ g}{1 \times 10^{6}\ \mu g} \times \frac{1\ mole}{2{,}12 \times 10^{5}\ g} \times \frac{10^{6}\ \mu mole}{1\ mole} \times \frac{10^{12}\ amole}{1\ \mu mole} = 9.91 \times 10^{5}\ attomoles / \mu l$$

ANNEXE III:

Solutions utilisées pour l'électrophorèse d'un gel de polyacrylamide

1.1 Préparation d'un gel de polyacrylamide de 12 %:

Gel de séparation

Eau distillée:	3,35 ml
Tris-HCl 1,5M pH 8,8:	2,5 ml
SDS 10 %:	100 µl
Acrylamide 30 %:	4,0 ml
Persulfate d'ammonium 10 %:	50 µl
TEMED:	5 µl

Gel d'entassement

Eau distillée:	6,1 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
SDS 10 %:	100 µl
Acrylamide 30 %:	1,3 ml
Persulfate d'ammonium 10 %	50 µl
TEMED:	10 µl

1.2 Tampon protéine:

Eau distillée:	4,0 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8:	1,0 ml
Glycérol:	0,8 ml
SDS 10 %:	1,6 ml
2-ß-mercaptoéthanol:	0,4 ml
Bleu de bromophénol:	0,2 ml

1.3 Solution colorante de bleu de Coomassie:

Bleu de Coomassie R-250:	10 g
Méthanol:	400 ml
Acide acétique glaciale:	100 ml
Eau distillée:	500 ml

1.4 Solution décolorante:

Méthanol:	400 ml
Acide acétique glaciale:	100 ml
Eau distillée:	500 ml

ANNEXE IV

Communication

Vincent, P et Guertin, C. 1998. Cytopathology of ChfuGV in spruce budworm *(Choristoneura fumiferana).* Proceeding of the Annual Meeting of The Canadian Society of Entomologyof Quebec. Présentation sous forme d'affiche d'une partie des résultats lors de la réunion conjointe de la société d'entomologie du Canada et de la société d'entomologie du Québec tenue à Québec.