

FERNANDO ECHEVERRY-ALZATE

**CONTRIBUTION À LA CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU
CYPOVIRUS DE LA TORDEUSE DES BOURGEONS DE L'ÉPINETTE,
Choristoneura fumiferana, CfCPV**

**THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE**

JURY D'ÉVALUATION

Dr Peter Tijssen, président
Dr Guy Lemay, externe
Dr Jacques Galipeau, externe
Dr Maximilien Arella, directeur
Dr Claude Guertin, co-directeur

**AVRIL 1999
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

TABLE DES MATIÈRES

	page
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTES DES FIGURES	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
SOMMAIRE	xi
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1- INTRODUCTION	6
1.2- CYPOVIRUS	7
1.2.1- Classification	7
1.2.2- Structure virale et propriétés physico-chimiques	7
1.2.3- Génome viral	8
1.2.4- Protéines virales	9
1.2.5- Polyèdre	10
1.3- MULTIPLICATION VIRALE	12
1.3.1- Pénétration du virus	12
1.3.2- Transcription et réplication du génome viral	13
1.3.3- Synthèse des protéines virales	14
1.4- PATHOGENÈSE DES CYPOVIRUS	15
1.4.1- Cypovirus comme agents de contrôle biologique	15
1.5- TORDEUSE DES BOURGEONS DE L'ÉPINETTE	16
1.5.1- Cycle vital de la tordeuse des bourgeons de l'épinette	17
1.5.2- Contrôle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette	21
1.6- CONCLUSION	21
MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
1- VIRUS	24
1.1- Souche virale	24
1.2- Larves	24
1.3- Production virale	24
1.4- Purification des polyèdres et du virus	25

1.5-	Purification des ARN bicaténaires génomiques	25
1.6-	Purification individuelle des segments génomiques	26
2-	CLONAGES DES DIFFÉRENTS SEGMENTS DU CfCPV	27
2.1-	Synthèse des ADNc	27
2.2-	Vecteurs et souches bactériennes	28
2.3-	Clonage des ADNc par production d'extrémités franches	29
2.4-	Clonage des fragments d'ADN amplifiés par PCR	32
2.5-	Transformation des cellules bactériennes	32
2.6-	Purification de l'ADN plasmidique	33
2.7-	Transfert des colonies sur filtre	33
2.8-	Préparation des sondes moléculaires	34
3-	IDENTIFICATION DES CLONES	35
3.1-	Selection des clones positifs par hybridation des colonies	35
3.2	Identification de clones par Hybridation ARN:ADN	35
3.2.1-	Électrophorèse des ARN et transfert de type Northern	35
4-	SÉQUENÇAGE	36
4.1-	Séquençage de l'extrémité amino-terminal de la polyédrine	36
5-	EXPRESSION DU GÈNE CODANT POUR LA POLYÉDRINE	37
5.1-	Expression dans le Vecteur pMAL TM -c2	37
5.2-	Expression dans le Vecteur pAL-781	39
6-	IMMUNISATION	40
7-	ÉLECTROPHORÈSES ET IMMUNOEMPREINTES	40
7.1-	Électrophorèses de protéines	40
7.2-	Immunoempreintes	41
8-	TRADUCTION <i>IN VITRO</i>	42
9-	QUANTIFICATION DES ARN PAR RT-PCR-QC	42
9.1-	Préparation du standard interne pour le gène 10	42
9.2-	Préparation du standard interne pour le gène 8	43
9.3-	Transcription <i>in vitro</i>	43
9.4-	RT-PCR quantitatif-compétitif	44
	RÉSULTATS	46
1-	PRODUCTION ET PURIFICATION VIRALE	47
2-	CLASSIFICATION DU CfCPV	60

3-	CLONAGE DU GÉNOME DU CfCPV	63
3.1-	Synthèse, clonage et séquençage des ADNc	63
3.1.1-	Séquençage du segment 10 du CfCPV	68
3.1.2-	Séquençage du segment 9 du CfCPV	80
3.1.3-	Séquençage du segment 8 du CfCPV	85
3.1.4-	Séquençage du segment 5 du CfCPV	92
4-	EXPRESSION DU GÈNE CODANT POUR LA POLYÉDRINE DU CfCPV	100
5-	TRADUCTION <i>IN VITRO</i>	110
6-	QUANTIFICATION DES ARNm DU CfCPV	118
DISCUSSION		126
1-	PRODUCTION VIRALE	127
2-	CLASSIFICATION DU CfCPV	127
3-	CLONAGE DU GÉNOME VIRAL	128
3.1-	SÉQUENÇAGE	128
4-	EXPRESSION DU GÈNE CODANT POUR LA POLYÉDRINE	132
5-	CARTE GÉNOMIQUE DU CfCPV	133
6-	QUANTIFICATION DES ARNm DU CfCPV (GÈNES 10 ET 8)	135
CONCLUSION		137
REMERCIEMENTS		140
RÉFÉRENCES		142
ANNEXE A: LISTE DES COMMUNICATIONS		158
ANNEXE B: COPIE DE L'ARTICLE PUBLIÉ		160

LISTE DES TABLEAUX

	page
TABLEAU 1 Superficie, en hectares (ha), affectée par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 1993.	18
TABLEAU 2 Surfaces (ha) traitées contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette entre 1970 et 1988 au Canada.	19
TABLEAU 3 Liste des souches bactériennes utilisées au cours de ce travail.	31
TABLEAU 4 Comparaison entre la position, le caractère hydrophatique et la structure secondaire des sept régions de similarité commune à la portion amino-terminale de la polyédrine du CfCPV, du EsCPV et du BmCPV.	79
TABLEAU 5 Recherche d'homologie pour la protéine codée par le segment 9 du CfCPV	84
TABLEAU 6 Recherche d'homologie pour la protéine codée par le segment 8 du CfCPV	91
TABLEAU 7 Recherche d'homologie pour la protéine codée par le segment 5 du CfCPV	99

LISTE DES FIGURES

	page	
FIGURE 1	Cycle vital de la Tordeuse des bourgeons de l'épinette	20
FIGURE 2	Microphotographie électronique d'une coupe de l'intestin d'une larve infectée par le virus CfCPV	49
FIGURE 3	Microphotographie électronique d'une coupe ultramince de polyèdres dans une cellule intestinale d'une larve infectée par le CfCPV.	51
FIGURE 4	Purification des polyèdres sur gradient discontinu de saccharose de 50-90%.	53
FIGURE 5	Microphotographie électronique des polyèdres purifiés en coupes ultraminces.	55
FIGURE 6	Microphotographie électronique montrant un premier plan des coupes ultraminces des polyèdres purifiés.	57
FIGURE 7	Microphotographie électronique de particules du CfCPV purifiées sur gradient de saccharose.	59
FIGURE 8	Détermination de la masse moléculaire des segments d'ARN génomique de quatre cypovirus séparés sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Laemmli <i>et al.</i> , 1970).	62
FIGURE 9	Purification des segments génomiques du CfCPV.	65
FIGURE 10	Stratégies utilisées pour le clonage du génome du CfCPV.	67
FIGURE 11	Transfert de type Northern et identification des clones positifs par hybridation ARN:ADN.	70
FIGURE 12	Stratégies utilisées pour le séquençage et pour l'obtention d'un clone contenant la séquence complète du segment 10 du CfCPV.	72
FIGURE 13	Séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au brin positif du segment 10 du CfCPV.	74
FIGURE 14	Profils d'hydrophilicité calculés pour les cypovirus: CfCPV, EsCPV et BmCPV.	78

FIGURE 15	Séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au brin positif du segment 9 du CfCPV.	82
FIGURE 16	Stratégie utilisée pour le séquençage et pour l'obtention d'un clone contenant la séquence complète du segment 8 du CfCPV.	87
FIGURE 17	Séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au brin positif du segment 8 du CfCPV.	89
FIGURE 18	Stratégie utilisée pour le séquençage du segment 5 du CfCPV.	94
FIGURE 19	Séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au brin positif du segment 5 du CfCPV.	96
FIGURE 20	Expression de la polyédrine du CfCPV dans <i>E. coli</i> comme protéine de fusion avec la protéine "maltose binding protein" (MBP) du vecteur pMAL-c2.	102
FIGURE 21	Expression de la polyédrine du CfCPV dans des bactéries <i>E. coli</i> GI724 transformées avec le plasmide recombinant pAL-CfCPVg10.	104
FIGURE 22	Immunoempreinte de la polyédrine du CfCPV et des polyédrines recombinantes détectées avec l'antisérum anti-MBP-polyédrine.	107
FIGURE 23	Microphotographie électronique des polyèdres du CfCPV et des corps d'inclusion d' <i>E. coli</i> recombinants.	109
FIGURE 24	Traduction <i>in vitro</i> des différents segments d'ARN génomiques du CfCPV.	112
FIGURE 25	Immunoprécipitation des protéines synthétisées dans des réticulocytes de lapin après l'addition du segment 8 du CfCPV dénaturé.	114
FIGURE 26	Carte génomique partielle du cypovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i> (CfCPV).	117
FIGURE 27	Construction des standards internes d'ARN des segments 10 et 8 du CfCPV.	120
FIGURE 28	Analyse de l'expression du segment 10 du CfCPV par RT-PCR Quantitatif-Compétitif.	123

FIGURE 29 Analyse de l'expression du segment 8 du CfCPV par RT-PCR Quantitatif-Compétitif.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNbc	ARN bicaténaire
ARNc	ARN standard interne
BSA	Albumine de sérum bovin
BmCPV	Cypovirus de <i>Bombyx mori</i>
CfCPV	Cypovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
cpm	Comptes par minute
CPV	Cypovirus
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphate
D.O.	Densité optique
DOC	Déoxycholate de sodium
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EsCPV	Cypovirus de <i>Euxoa scandens</i>
HaCPV	Cypovirus de <i>Heliothis armigera</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
IRRF	Institut pour la répression de ravageurs forestiers du Canada
NpCPV	Cypovirus de <i>Noctua pronuba</i>
OpCPV	Cypovirus de <i>Orgyia pseudotsugata</i>
ORF	Cadre de lecture ouvert

PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PVDF	Difluorure de polyvinylidène
RACE	"Rapid amplification cDNA ends"
RNase	Ribonucléase
RSTV	"Rice ragged stunt virus"
RT	Transcriptase inverse
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium
U.V.	Ultraviolet
X-Gal	5-bromo-4 chloro-3 indolyl- β -D-galactoside

SOMMAIRE

Les insectes ravageurs constituent un des problèmes majeurs de l'industrie forestière en Amérique du Nord. Parmi ceux-ci la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) est considérée comme le plus important ravageur forestier au Canada. Dans la lutte contre cet insecte les cypovirus sont apparus comme des candidats intéressants principalement à cause des changements physiologiques importants qu'ils induisent chez les larves infectées. Ces virus pourraient ainsi être impliqués dans le déclin des populations infectées. Leur utilisation efficace dans des programmes de lutte biologique requiert toutefois une connaissance plus approfondie des particules virales. C'est dans cette optique que nous avons entrepris la caractérisation moléculaire du cypovirus de *Choristoneura fumiferana*.

Premièrement dans le but de déterminer à quel électrophorétype fait partie le cypovirus de *C. fumiferana* (CfCPV) la mobilité relative de ses 10 segments génomiques a été déterminée. Les résultats obtenus suggèrent que la souche CfCPV serait reliée à l'électrophorétype 7 de la classification actuelle.

Nous avons ensuite séquencé entièrement les segments génomiques 10, 9, 8 et 5. Outre le gène codant pour la polyédrine (segment 10), les séquences déterminées pour les segments 9, 8 et 5 ont permis les premières comparaisons entre un virus appartenant au genre cypovirus et d'autres membres de la famille des *Reoviridae*. L'analyse comparative des séquences génomiques obtenues avec celles publiées n'a cependant pas permis de relier le CfCPV à d'autres séquences connues. Néanmoins, malgré l'absence d'homologie au niveau de la séquence nucléotidique, certaines similarités précises ont été trouvées avec la séquence en acides aminés d'autres protéines connues. De plus, les profils d'hydrophilicité déterminés pour la polyédrine de trois cypovirus différents partagent certaines caractéristiques communes dans leur portion N-terminale (116 premiers acides aminés). Il est possible que ce domaine de la polyédrine soit essentiel pour la formation des corps d'inclusion.

L'expression de la polyédrine du CfCPV chez *Escherichia coli* a permis pour la première fois d'observer une structure cristalline lorsque cette protéine est exprimée dans un vecteur procaryotique. Ceci nous amène à conclure que le gène de la polyédrine possède toute l'information nécessaire pour réaliser le processus de cristallisation.

En ce qui concerne les autres gènes, la traduction *in vitro* des différents segments génomiques a permis d'établir une carte génomique partielle du virus CfCPV. Ainsi, 7 polypeptides dont la masse moléculaire est de 135 kDa, 130 kDa, 110 kDa, 98 kDa, 75 kDa, 39 kDa et 30.5 kDa ont été assignés à des segments génomiques.

Finalement les résultats obtenus en utilisant le système de quantification RT-PCR ont démontré qu'une régulation de l'expression du gène codant pour la polyédrine doit avoir lieu. L'expression en plus grande quantité de la polyédrine par rapport aux autres polypeptides viraux serait due à des facteurs liés à la traduction plutôt qu'à la transcription du gène.

INTRODUCTION

Les cypovirus constituent un groupe de virus à ARN bicaténaire segmenté classé dans la famille *Reoviridae* et retrouvé principalement chez les insectes. Ils sont caractérisés par la production de corps d'inclusion intracytoplasmiques appelés polyèdres dans lesquels se retrouvent un grand nombre de virus. Ces polyèdres jouent un rôle très important dans la protection des particules virales, dans la transmission du virus d'un insecte à l'autre et dans l'infection ciblée des cellules de l'intestin où les polyèdres sont dissouts par le milieu alcalin, libérant ainsi les particules virales infectieuses qu'ils contiennent (Belloncik, 1989).

Les principales raisons qui ont motivé les recherches sur les cypovirus sont premièrement les pertes économiques importantes encourues par l'industrie de la sériciculture due à l'infection du ver à soie (*Bombyx mori*) par un CPV et deuxièmement la présence de ces virus pathogènes chez plusieurs espèces d'insectes ravageurs, ce qui en fait des agents potentiels de lutte biologique. Du côté de la recherche fondamentale, le CPV de *Bombyx mori* (BmCPV) a servi de modèle d'étude en biologie moléculaire. En effet, la présence de plusieurs activités enzymatiques associées à la particule virale, telle que l'ARN polymérase (Lewandowski et al., 1969) a permis de démontrer pour la première fois le mécanisme de formation de la coiffe des ARNm synthétisés *in vitro* (Furuichi et Miura, 1975).

Une des problèmes majeurs affectant l'industrie forestière en Amérique du Nord est la présence d'insectes ravageurs tel que la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) qui est considérée comme le plus important ravageur forestier au Canada. Les pertes engendrées par cet insecte, au cours de sa dernière épidémies, sont estimées à plus de 235 millions de mètres cubes de bois. Le développement de nouveaux bio-insecticides efficaces et sécuritaires pour l'environnement apparaît donc essentiel pour le contrôle de l'insecte.

Les virus pathogènes de la tordeuse des bourgeons de l'épinette sont apparus comme des candidats intéressants pour la lutte biologique. Les recherches ont porté

principalement sur trois groupes de virus possédant des corps d'inclusion, soient les baculovirus (polyedrovirus et granulovirus), les entomopoxvirus (EPV) et les cypovirus (Cunningham et Kaupp, 1995).

Dans le cas des cypovirus, l'infection virale dont ils sont la cause est caractérisée par la présence d'une maladie chronique plutôt que létale où des changements physiologiques importants sont observés chez l'insecte. Ceux-ci pourraient être impliqués dans le déclin des populations infectées. Les cypovirus sont donc considérés comme des agents de lutte biologique potentiels ayant un effet à long terme. Toutefois, l'utilisation efficace des virus dans la lutte biologique requiert une connaissance plus approfondie des particules virales et des interrelations entre la population du ravageur à contrôler, le virus et l'environnement.

La recherche appliquée sur les cypovirus est importante, mais elle est indissociable de la partie fondamentale. En effet, plusieurs éléments ne sont pas encore bien connus, notamment en ce qui concerne la biologie moléculaire du virus, le mécanisme de la réplication virale et le processus de cristallisation de la polyédrine. Ces connaissances peuvent apporter des informations importantes sur les relations phylogénétiques entre les isolats viraux et ainsi aider à clarifier le processus évolutif à l'intérieur du groupe des cypovirus et même dans l'ensemble de la famille *Reoviridae*.

Le but principal de ce travail, est la caractérisation moléculaire du cypovirus de *Choristoneura fumiferana* (CfCPV) afin d'en arriver à une meilleure compréhension de la nature du virus, ce qui permettrait son utilisation éventuelle dans un programme de lutte biologique et l'établissement de relations génétiques avec les autres membres de la famille *Reoviridae*. D'une façon plus spécifique, les objectifs poursuivis étaient de: 1) cloner et séquencer certains segments d'ARN génomique afin de rechercher des homologies entre le génome du CfCPV et celui des autres cypovirus et réovirus; 2) établir une carte génomique du CfCPV à partir des produits obtenus par la traduction *in vitro* des segments génomiques dénaturés; 3) vérifier l'expression du gène codant pour la polyédrine dans un

vecteur procaryotique afin de mieux comprendre le mécanisme de cristallisation; 4) mettre au point un système de quantification des ARNm par RT-PCR afin d'aider à déterminer les mécanismes impliqués dans la synthèse accrue de la polyédrique par rapport aux autres gènes viraux pendant la réplication virale

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1- INTRODUCTION

La première infection par un cypovirus a été décrite en 1934 chez les larves du ver à soie, *Bombyx mori* (Ishimori, 1934). Les pertes économiques engendrées par ce virus dans l'industrie de la sériciculture ont poussé les chercheurs à se pencher sur ce pathogène. Par la suite, les cypovirus ont été isolés chez plusieurs espèces d'insectes nuisibles, d'où le fait qu'ils soient maintenant considérés comme des agents potentiels de lutte biologique, bien qu'ils n'aient pas reçu autant d'attention que les baculovirus. Les limitations des cypovirus proviennent du fait qu'ils provoquent chez l'insecte une maladie chronique plutôt qu'une infection létale et qu'ils partagent certaines caractéristiques structurales et biochimiques avec certains membres de la famille des *Reoviridae*, qui sont reconnus comme des pathogènes de vertébrés et de plantes d'importance économique.

Les cypovirus ont été isolés de plus de 230 espèces d'insectes (Murphy *et al.*, 1995). Une très grande hétérogénéité génétique à l'intérieur de ce groupe de virus a été démontrée par l'analyse des segments d'ARN génomique (Payne et Rivers, 1976; Mertens, 1998). Toutefois, la plupart des études visant la caractérisation biochimique et morphologique des cypovirus ont été réalisées avec le cypovirus de *Bombyx mori* (espèce type). Plusieurs revues ont d'ailleurs été publiées sur le sujet (Aruga, 1971; Payne et Mertens, 1983; Belloncik, 1989). Les travaux portant sur la caractérisation des protéines structurales et non-structurales de même que sur l'organisation génomique des cypovirus ont été retardés par la difficulté de répliquer les CPV en culture cellulaire. Comparativement, des progrès très importants ont été réalisés ces dernières années sur la biologie moléculaire et les mécanismes d'assemblage des segments génomiques des autres types de réovirus (revue par Joklik et Roner, 1996).

Cette revue bibliographique présente les quelques progrès réalisés malgré tout avec les cypovirus et permet de situer ces travaux de doctorat dans un contexte de recherche fondamentale, en y incluant des perspectives d'utilisation à long terme des cypovirus comme agents de lutte biologique. Une description exhaustive des connaissances actuelles sur la

composition biochimique, la morphologie et la réplication virale est présentée dans la première section. Par la suite, la pathogenèse induite chez la larve par les cypovirus sera abordée, alors que la dernière section porte sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette, sa distribution, son cycle vital et son importance du point de vue économique comme ravageur des forêts. Les moyens de lutte biologique contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette seront également abordés.

1.2- CYPOVIRUS

1.2.1- Classification

Les cypovirus (CPV) sont classés dans la famille des *Reoviridae* (Matthews, 1982) et constituent le genre *Cypovirus*, (Francki *et al.*, 1991). En plus des cypovirus on retrouve huit autres genres de réovirus: *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Fijivirus*, *Phytoreovirus* et *Oryzavirus*. Les Cypovirus ont été isolés principalement chez les Lépidoptères, les Diptères et les Hyménoptères. Ils ont également été retrouvés chez certains crustacés (Federici et Hazard, 1975). Les CPVs se divisent en 12 types sur la base du profil électrophorétique de leurs segments d'ARN génomiques (Payne et Rivers, 1976; Payne *et al.*, 1977; Murphy *et al.*, 1995) et récemment deux autres types de CPV ont été proposés (Fouillaud et Morel 1994; Belloncik *et al.*, 1996; Mertens, 1998). Les CPVs tirent leur nom de l'insecte hôte duquel ils ont été isolés et du type auquel ils appartiennent, lorsqu'il est connu, par exemple: *Bombyx mori* cypovirus 1 (BmCPV-1), *Euxoa scandens* cypovirus 5 (EsCPV-5), *Noctua promuba* cypovirus 7 (NpCPV-7).

1.2.2- Structure virale et propriétés physico-chimiques

Les cypovirus possèdent les caractéristiques biochimiques communes à tous les membres de la famille des *Reoviridae*. Par contre, ils se distinguent des autres genres par leur morphologie, leur spécificité d'hôte, qui se limite exclusivement aux arthropodes, et par

l'inclusion de leurs particules virales dans une matrice protéique cristalline appelée polyèdre. De plus, contrairement aux autres membres de la famille des *Reoviridae*, les cypovirus ne possèdent pas une double capsid (Payne et Mertens, 1983), mais ils possèdent tout de même une structure équivalente à celle du nucléoïde ("core") des réovirus.

Les particules virales se caractérisent par une forme icosaédrique avec un contour hexagonal ou circulaire et leur diamètre varie de 55-69 nm. Chacun des 12 sommets de l'icosaèdre porte une spicule d'une longueur de 20 nm et d'une largeur de 15-23 nm (Hills et Smith, 1959; Hosaka et Aizawa, 1964). Ces spicules sont creuses et se trouvent insérées au niveau du nucléoïde (Joklik, 1974).

La densité de flottation des particules virales entières en gradient de CsCl est évaluée à 1,44 g/ml, tandis que celle des particules vides est de 1,30 g/ml (Lewandowski et Traynor, 1972; Rubinstein, 1979). Le coefficient de sédimentation est égal à 420S et la masse moléculaire des virions est d'environ 54×10^6 Da (Kalmakoff et al., 1969). Le génome viral représente 23 à 30% de la masse totale des particules (Kalmakoff *et al.*, 1969; Nishimura et Hosaka, 1969; Rubinstein, 1979)

1.2.3- Génome viral

Le génome des cypovirus, comme celui de la plupart des membres de la famille des *Reoviridae*, est composé de 10 segments d'ARN bicaténaire, qui sont présents en quantités équimolaires dans chaque particule. Le contenu en GC du cypovirus de BmCPV-1, a été évalué à 42-43% (Miura *et al.*, 1968) et la masse moléculaire de chacun des 10 segments varie de 0,35 à $2,55 \times 10^6$ Da (Fujii-Kawata *et al.*, 1970). Payne et Rivers (1976) ont déterminé la masse moléculaire des segments génomiques de différents cypovirus et ont observé des variations d'un type viral à l'autre. Ces différences constituent aujourd'hui la base de la classification des cypovirus.

Les ARN génomiques sont caractérisés par la présence d'une coiffe à l'extrémité 5' du brin positif (Miura, 1981) et l'absence d'une queue poly-A à l'extrémité 3' (Kuchino *et al.*, 1982). La présence des séquences conservées aux extrémités 5' et 3' des différents segments génomiques du BmCPV a aussi été rapportée (Kuchino *et al.*, 1982).

Le plus petit des segments génomiques, le segment 10, de cinq cypovirus différents a été entièrement séquencé. Ils s'agit des cypovirus *Bombyx mori* CPV-1 (Arella *et al.*, 1988), *Euxoa scandens* CPV-5 (Fossiez *et al.*, 1989), *Orgyia pseudotsugata* CPV-5 (OpCPV-5) et *Heliothis armigera* CPV-5 (HaCPV-5) (Galinski *et al.*, 1994) et *Choristoneura fumiferana* CPV (Echeverry *et al.*, 1997).

L'analyse des séquences publiées a révélé une variation dans la taille du segment d'ARN: 942 pb pour BmCPV, 881 pb pour EsCPV, 883 pb pour OpCPV et HaCPV et 1171 pb pour CfCPV. Aucune homologie significative n'a été détectée au niveau du gène codant pour la polyédrine entre des virus appartenant à différents types. Par contre, en comparant la séquence des trois cypovirus du type 5 (EsCPV, OpCPV, HaCPV) seuls 17 nucléotides différaient d'un virus à l'autre (Galinski *et al.*, 1994).

1.2.4- Protéines virales

Peu d'études ont été réalisées sur les protéines structurales des cypovirus comparativement aux autres réovirus, et la plupart de travaux ont portés sur le BmCPV. Chez ce dernier, cinq polypeptides ont régulièrement été observés (Lewandowski et Traynor, 1972; Payne et rivers, 1976). La composition protéique des cypovirus en général ressemble à celle du "core" des réovirus, c'est-à-dire, trois protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 100 000, une protéine à 80 000, une protéine à 38 000 et une protéine mineure à 70 000 (Joklik, 1980). Ceci peut toutefois varier d'un type de cypovirus à l'autre. Le poids moléculaire des protéines observées sur gel de polyacrylamide concorde avec la taille estimée pour le produit primaire de certains segments génomiques viraux (Lewandowski et Traynor 1972; Galinski *et al.*, 1982).

Suite aux expériences de McCrae et Joklik (1978), démontrant que le brin positif de l'ARN génomique bicaténaire des réovirus pouvait être traduit *in vitro*, il devenait plus facile d'assigner des protéines spécifiques à chacun des segments génomiques. Ce fut le cas notamment avec le réovirus de type 3 (McCrae et Joklik, 1978), le rotavirus simien SA11 (Mason *et al.*, 1983) et le réovirus aviaire souche S1133 (Varela et Benavente, 1994). Dans le cas des cypovirus, seule une carte génomique provisoire a été établie pour le cypovirus de *Bombyx mori* type 1 (Payne et Mertens, 1983).

Plusieurs des enzymes nécessaires à la réplication des cypovirus ont été retrouvées associées aux particules virales. C'est le cas de l'ARN polymérase qui a pour rôle de synthétiser une copie du brin positif de l'ARN génomique par un mécanisme asymétrique (seul le brin positif de l'ARN génomique est synthétisé) et conservatif (Furuichi, 1974, Joklik, 1981). L'activité enzymatique de cette polymérase est similaire à celle des autres membres de la famille *Reoviridae*, bien qu'une modification de la particule virale ne soit pas nécessaire à l'activation de l'enzyme. On retrouve également dans les particules virales des enzymes impliquées dans la formation de la coiffe des ARNm, soit une phosphohydrolase nucléotidique (Storer *et al.*, 1974 a,b), une guanylyltransférase (Furuichi et Miura, 1975) et une transméthylase ("ARN méthyltransférase) (Miura *et al.*, 1974, Furuichi et Miura, 1975). Une description détaillée du rôle de ces enzymes a été faite par Payne et Mertens (1983).

1.2.5- Polyèdres

Chez les cypovirus, de une à plusieurs milliers de particules virales peuvent être incluses aléatoirement dans des corps d'inclusion cytoplasmiques appelés polyèdres. Ces corps d'inclusion servent de véhicule pour la transmission entre insectes et de protecteur contre l'inactivation des particules virales par des agents naturels tels que les rayons U.V. et la chaleur. En laboratoire, les polyèdres sont apparus résistants à des agents chimiques tels que les détergents nonioniques et ioniques (Payne et Mertens, 1983). Toutefois, ils

peuvent être dissouts dans un milieu à pH alcalin, ce qui permet d'ailleurs la libération des particules virales dans la lumière intestinale des larves qui ingèrent les polyèdres.

Lors de la réplication virale, la forme des corps d'inclusion peut varier (icosaédrique, hexahédrique, triangulaire), tout comme leur taille (0,2 à 10 μm). Ces variations s'observent non seulement entre les différents groupes ou sous-groupes viraux, mais également à l'intérieur de chaque groupe et même entre les cristaux provenant d'un même insecte (Iwashita, 1971; Belloncik, 1989).

Les polyèdres des CPV sont constitués d'un seul type de polypeptide majeur appelé polyédrine dont le poids moléculaire varie de 25 000 à 31 000 selon les virus (Lewandowski et Traynor, 1972; Payne et Rivers, 1976). Ce polypeptide est codé par le segment génomique viral le plus petit, soit le segment 10.

Ces corps d'inclusion (polyèdres) sont formés par l'assemblage et la cristallisation de la polyédrine. Ce processus a soulevé beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique mais demeure jusqu'à présent mal connu. Afin d'expliquer le mécanisme d'initiation de la cristallisation, plusieurs hypothèses ont été proposées. Payne et Mertens (1984) ont suggéré une reconnaissance spécifique entre les virus et la polyédrine, mais cette hypothèse ne permet pas d'expliquer la présence de polyèdres sans virus inclus qui avaient été observés auparavant par Kobayashi (1971). D'autres hypothèses suggèrent plutôt l'influence de facteurs cellulaires (Hukuhara, 1971) ou encore des modifications antigéniques ou l'accumulation d'une quantité déterminée de polyédrine (Belloncik, 1989). L'interaction avec les autres protéines virales n'a pas été exclue non plus. Lavallée et collaborateurs (1993) ont exprimé le gène codant pour la polyédrine du cypovirus de *Bombyx mori* chez *Escherichia coli*, et ont constaté l'accumulation de la polyédrine en forme de corps d'inclusion mais sans aucune structure cristalline. Mori et collaborateurs (1993), suggèrent un mécanisme d'auto-assemblage étant donné la formation de corps d'inclusion pendant l'expression du gène codant pour la polyédrine de BmCPV à l'aide du vecteur baculovirus. Dans le cas des polyèdres de baculovirus, Jarvis et collaborateurs

(1991) ont déterminé les conditions requises pour l'assemblage supramoléculaire de la polyédrine. Chez ces virus le domaine constitué par les acides aminés 19 à 110 de la polyédrine sont apparus indispensables pour la formation des corps d'inclusion. La présence d'un tel domaine n'a pas encore été démontrée dans la polyédrine des cypovirus.

1.3- MULTIPLICATION VIRALE

La réplication des cypovirus chez la larve a été décrite par Kobayashi (1971) et révisée par Payne et Mertens (1983). Des travaux portant sur le développement de lignées cellulaires permissives à la réplication virale ont permis d'élucider certains aspects de la morphogenèse virale (Belloncik, 1989).

1.3.1- Pénétration du virus

L'infection des larves survient généralement lors de l'ingestion de nourriture contaminée par des polyèdres. Ces derniers, sont alors dissouts par les sucs alcalins de l'intestin et libèrent ainsi les particules virales qu'ils contiennent (Vago et al., 1959). Les cellules épithéliales cylindriques de l'intestin semblent être la cible principale des cypovirus, bien que les cellules en gobelet puissent aussi être infectées (Martignoni et al., 1969; Iwashita, 1971).

Le mécanisme d'entrée du virus dans les cellules susceptibles n'est pas encore bien connu. Les virus s'attachent à la membrane cellulaire, une fois libérés du polyèdre, par l'interaction de la membrane cellulaire avec une protéine virale appelée hémagglutinine (Miyajima et Kawase, 1969). Ils pénètrent par la suite dans la cellule selon un procédé semblable à la phagocytose (Payne et Mertens, 1983; Belloncik, 1989). L'intégrité de la particule virale pendant la pénétration est très importante étant donné que la transcriptase virale n'est active que dans les particules complètes (Lewandowski *et al.*, 1969; Furuichi, 1974) contrairement au réovirus où cette activation ne se fait qu'après clivages par des protéase générant des particules sous-virales actives (Silverstein, 1972, Dryden *et al.*,

1993). Plus tard, au cours de l'infection, le virus se retrouve dans des vacuoles ou des lysosomes (Quiot et Belloncik, 1977; Belloncik, 1989), puis on assiste à la formation de stroma virogène. Andreadis (1981) a suggéré que l'assemblage des virus débute où la présence de stroma virogène est faible et où l'on peut observer des capsides et de particules incomplètes. Les particules complètes n'ont été observées que dans les endroits où on retrouve un stroma virogène dense. Par conséquent, le stroma virogène semble être l'endroit où se produit la maturation des virus et leur inclusion dans les polyèdres (Andreadis, 1981; Belloncik, 1989). La formation des polyèdres débute à différents endroits avec la cristallisation de la polyédrine autour de particules virales matures (Kobayashi, 1971; Quiot et Belloncik, 1977). Finalement, la lyse des cellules survient, libérant les polyèdres qui sont dissous de nouveau par les sucs digestifs ou excrétés dans les fèces (Belloncik, 1989).

1.3.2- Transcription et réplication du génome viral

La synthèse des ARNm des cypovirus est réalisée par l'ARN polymérase ARN dépendante virale (transcriptase). Yazaki et Miura (1980) ont suggéré que l'ARN génomique bicaténaire soit transcrit lors de son passage à travers la base de la spicule virale, où les enzymes impliquées dans la synthèse et la modification des ARNm sont localisées. De plus, il a été démontré *in vitro* que chacun des 10 segments génomiques est transcrit indépendamment en quantité molaire inversement proportionnelle à son poids moléculaire (Smith et Furuichi, 1981).

Les ARNm et génomiques des cypovirus sont coiffés et le processus de formation de la coiffe est directement relié au processus de transcription en plus de jouer un rôle important dans la stabilité et dans la traduction des ARNm (Banerjee, 1980). Chez le cypovirus de *Bombyx mori*, il a été observé que l'initiation de la transcription est stimulée par la S-adénosyl-méthionine (AdoMet), ce qui n'est pas le cas chez les réovirus (Furuichi, 1974). Cette stimulation serait probablement dû à un effet allostérique de l'AdoMet sur la

polymérase virale, plus au niveau de l'initiation qu'au niveau de la méthylation elle-même (Furuichi, 1974; 1981; Wertheimer *et al.*, 1980).

La présence des séquences terminales communes aux 10 segments génomiques est bien connue chez les *Reoviridae*. Il a été suggéré, chez les cypovirus, que ces séquences pourraient jouer un rôle très importante comme signal de reconnaissance pour la polymérase virale (Kuchino *et al.*, 1982).

La réplication du génome viral quant à elle, est moins bien connue que sa transcription. L'ARN génomique nouvellement synthétisé a été détecté pendant l'infection (Kawase et Kawamori, 1968), mais le mécanisme précis de sa synthèse n'est pas connu. Il pourrait toutefois être similaire à celui décrit chez les réovirus, où le brin positif d'ARN synthétisé par la polymérase sert de matrice pour la production du brin négatif à l'intérieur d'un complexe réplicatif composé de protéines structurales et non structurales. Les brins négatifs nouvellement synthétisés resteraient associés à leur matrice positive pour ainsi former les ARN génomiques bicaténaires de la progéniture (Joklik, 1980; Antczak et Joklik, 1992; Joklik et Roner, 1996).

1.3.3- Synthèse des protéines virales

L'absence de lignée cellulaire adéquate pour la réplication des cypovirus *in vitro* rend l'étude des produits de la traduction virale plus difficile, spécialement en ce qui concerne l'identification des protéines non-structurales et de leur propriétés biochimiques.

Les protéines virales ont été détectées entre 4 et 8 heures post-infection dans l'intestin de larves de *Bombyx mori* (Kawase et Miyajima, 1969), alors qu'une autre étude portant sur la cinétique d'apparition de polypeptide d'EsCPV dans des cellules de *lymantria dispar* infectées a permis de détecter sept polypeptides viraux 24 heures post-infection (Arella *et al.*, 1984). Il a aussi été démontré dans cette étude que la polyédrine est synthétisée plus tard que les autres protéines avec une augmentation constante du taux

de synthèse entre 8 et 96 heures suivant le début de l'infection. Les auteurs ont suggéré la présence d'un mécanisme de régulation de la traduction ou de la transcription des ARNm de ce polypeptide. Finalement, pour ce qui est de la synthèse des protéines cellulaires, il semblerait qu'elle ne soit pas affectée par la réplication virale contrairement à ce qu'on observe chez les réovirus (Arella, *et al* 1984).

1.4- PATHOGENÈSE DES CYPOVIRUS

La plupart des infections causées par les cypovirus produisent une maladie de type chronique plutôt qu'épidémique (Payne et Mertens, 1983). La pathologie est caractérisée par une inanition dû à des changements physiologiques et structuraux au niveau des cellules de l'intestin suite à l'infection. Les larves perdent l'appétit et arrêtent très tôt de se nourrir après l'infection (Arnott *et al.*, 1968). Leur taille et leur poids sont réduits et l'infection s'accompagne d'une diarrhée pendant laquelle une très grande quantité de polyèdres est excrétée (Payne, 1981). À cause de la très grande capacité de régénération des cellules de l'intestin, l'insecte ne succombe pas nécessairement à l'infection mais on observe une prolongation de la durée du stade larvaire (Ignoffo et Adams, 1966; Bellemare et Belloncik, 1981). De plus, dû à la réduction de la taille des larves, les pupes sont plus petites (Neilson, 1965; Ignoffo et Adams, 1966; Bellemare et Belloncik, 1981). La conséquence directe de ce phénomène est une diminution des réserves lipidiques et protéiques de l'insecte (Bell, 1977; Sikorowski et Thompson, 1979; Thompson et Sikorowski, 1980). La plupart des individus qui parviennent au stade adult sont malformés, ce qui affecte principalement leur fécondité et leur longévité (Neilson, 1965; Simmons et Sikorowski, 1973).

1.4.1- Les Cypovirus comme agents de lutte biologique

Les cypovirus sont fréquemment isolés des populations d'insectes dans la nature et dans l'élevage de laboratoire. Les larves des premiers stades sont généralement plus susceptibles à l'infection par les cypovirus, qui peuvent être létales (Bellemare et Belloncik,

1981; Quevillon, 1984). Toutefois, tel que mentionné précédemment, l'infection par les cypovirus cause habituellement une maladie chronique plutôt que létale. Malgré ce fait, les caractéristiques de l'infection cypovirale, son mécanisme de transmission et sa persistance dans l'environnement peuvent entraîner plusieurs changements physiologiques qui pourraient jouer un rôle important dans le déclin d'une population d'insectes déterminée (Payne, 1982). Les CPVs sont donc considérés comme des agents de lutte biologique potentiels ayant un effet à long terme, et particulièrement utiles dans un écosystème stable qui ne peut pas tolérer de modifications majeures (Payne et Mertens, 1983).

Plusieurs études portant sur l'utilisation des cypovirus comme bio-insecticide ont été rapportées dans la littérature. Le premier cypovirus utilisé comme insecticide est celui de la chenille processionnaire du pin (*Thaumetopoea pityocampa*). Après traitement, seulement de 3 à 4% de la population de larves a survécu jusqu'à stade de chrysalide (Bibliotti *et al.*, 1959). D'autres essais impliquant des cypovirus ont été effectués sur le terrain contre des ravageurs forestiers tels que *Dendrolimus spectabilis* (Katagiri, 1981), *Dendrolimus punctatus* (Ying, 1970; Hsiao, 1981), *Lymantria fumida* et *Lymantria dispar* (Katagiri, 1969, 1981).

1.5- LA TORDEUSE DES BOURGEONS DE L'ÉPINETTE

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*, Clemens) est considérée comme l'insecte ravageur le plus important d'Amérique du Nord, du point de vue économique (Cunnigham, 1982). Cet insecte indigène des forêts de l'est de l'Amérique du Nord s'attaque à plusieurs espèces des conifères, notamment le sapin baumier et l'épinette blanche (Greenbank, 1963). Au Québec, selon les estimations fournies par le Ministère de l'énergie et des ressources du Québec, 235 millions de m³ de bois ont été détruits au cours de la dernière invasion de tordeuse des bourgeons de l'épinette qui s'est terminée au début des années 1990.

Les épidémies de tordeuse des bourgeons de l'épinette sont un phénomène naturel et cyclique (Blais, 1985). La dernière épidémie a débuté vers 1967 avec une phase de déclin importante entre les années 1984 et 1992. Depuis on observe une augmentation des populations de tordeuse dans l'ouest de la province qui indique peut-être le début d'une nouvelle épidémie. Le Tableau 1 indique la superficie des forêts, en hectares (ha), affectées par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 1995 et 1996 (Anonyme 1996).

Les épidémies de tordeuse des bourgeons de l'épinette ont amené l'utilisation d'insecticides chimiques principalement jusqu'aux années 80. Par la suite, les bio-insecticides sont devenus plus populaires. Le Tableau 2 montre l'étendu des régions traitées contre la tordeuse entre 1970 et 1988 au Canada. Malgré ces traitements les pertes de sapins et d'épinettes ont atteint plus de 5 millions d'hectares au Québec.

1.5.1- Cycle vital de la tordeuse des bourgeons de l'épinette

Le cycle vital de la tordeuse des bourgeons de l'épinette est relativement simple, n'ayant qu'une cohorte par année (Figure 1). Dans l'est du Canada, les papillons émergent en juillet et peuvent être observés jusqu'au début de septembre. Les femelles pondent leurs oeufs sur les aiguilles des branches périphériques de la cime des arbres. Les oeufs éclosent huit à douze jours plus tard et l'émergence des larves du premier stade est complétée vers la mi-août. En préparation pour l'hiver, les jeunes larves vont rechercher un endroit approprié où elles vont pouvoir muer une première fois puis hiverner sous la forme de 2^e stade. Les larves sortent de leur abri au début du mois de mai de l'année suivante et se mettent à la recherche de nourriture afin de poursuivre leur développement vers le stade adulte. Les dommages les plus importants sont causés par les larves du 6^e stade. La mort des arbres survient normalement après cinq à six années de sévères défoliations. Vers la fin de juin ou le début de juillet, les larves se transforment en pupes et de nouveaux papillons émergent approximativement 10 jours plus tard, ce qui complète leur cycle annuel (Mattson et al., 1988).

TABLEAU 1

**Superficies en hectares affectées par la tordeuse des
bourgeons de l'épinette au Québec en 1996 (Anonyme
1996)**

Région administrative		Niveaux de défoliation			
Outaouais	Unités de gestion	Léger	Modéré	Grave	Total
	71	288 (154)*	126 (269)	612 (424)	1 026 (847)
	72	350 (155)	658 (384)	3 166 (3 233)	4 174 (3 772)
	Total	638 (309)	784 (653)	3 778 (3 657)	5 200 (4 619)
Mauricie-bois- francs	41	25 (11)	9 (29)	0 (44)	34 (84)
Grand total		663 (320)	793 (682)	3 778 (3 701)	5 234 (4 703)

*() = Superficies affectées en 1995

TABLEAU 2

Superficies traitées contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette durant la dernière épidémie, entre 1970 et 1988, au Canada (Anonyme, 1995)

Province	Surface traitée (ha)
Alberta	1 000
Manitoba	12 092
Nouveau Brunswick	24 410 000
Terre Neuve	864 453
Nouvelle Écosse	259 775
Ontario	383 730
Québec	23 100 000
TOTAL	49 031 050

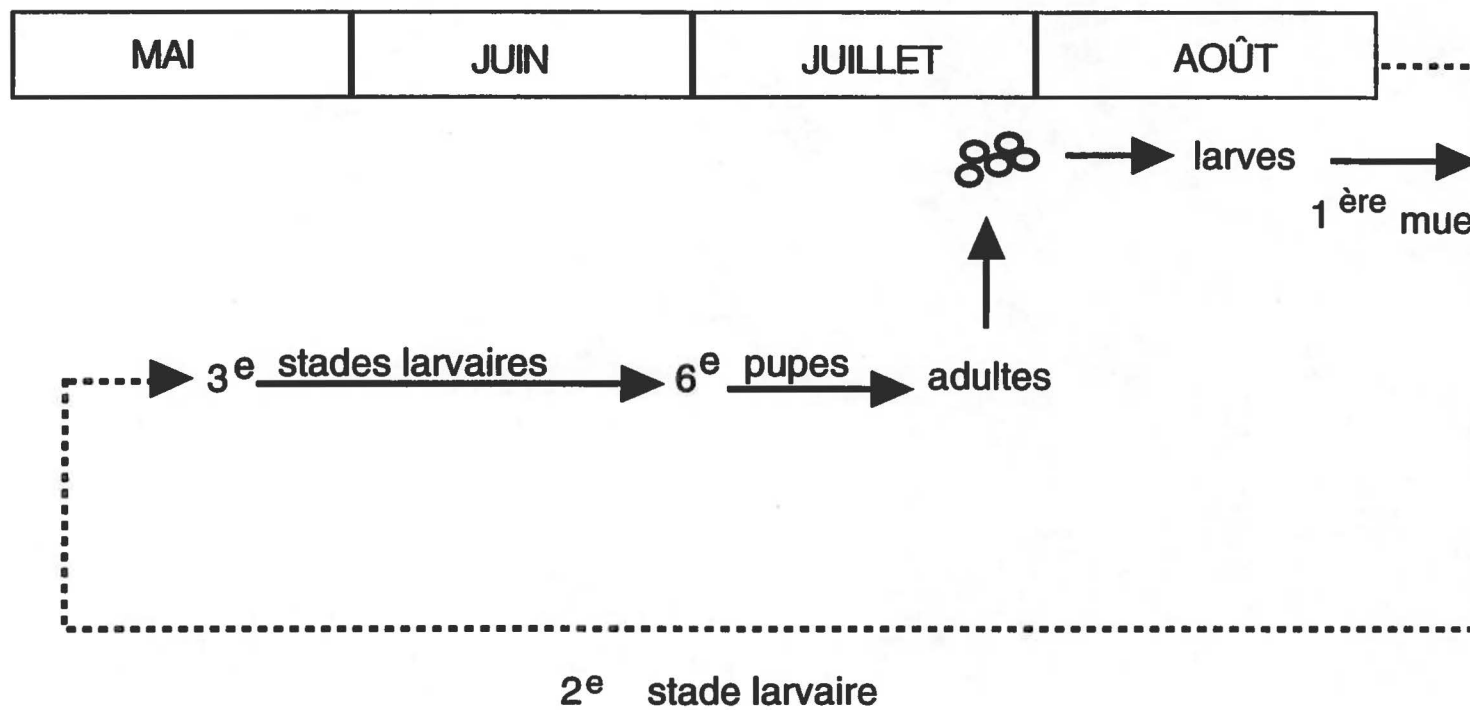


FIGURE 1. Cycle vital de la tordeuse des bourgeons de l'épinette

1.5.2- Lutte contre les populations de tordeuse des bourgeons de l'épinette

Des programmes de protection des forêts contre les différents stades larvaires de tordeuse, réalisés au Nouveau-Brunswick en utilisant une variété d'insecticides chimiques, ont débuté en 1952 (Irving et Webb, 1981, Ecobichon, 1990). La présence d'insectes résistants aux insecticides chimiques et les problèmes de contamination environnementale causés par ces derniers ont orienté les programmes de lutte vers l'utilisation d'insecticides biologiques. Actuellement le seul agent biologique permis par les agences gouvernementales est le *Bacillus thuringiensis*, dont l'utilisation est bien documentée dans la littérature (Fast, 1981; Brousseau et Masson, 1988; Höfte *et al.*, 1988).

La tordeuse des bourgeons de l'épinette est affectée pour une grande variété de microorganismes, prédateurs et parasitoïdes (Neilson, 1963). Au Canada, seuls les virus produisant des corps d'inclusion ont été étudiés en vue de leur utilisation contre les insectes ravageurs. C'est le cas des baculovirus (NPV et GV), des cypovirus (CPV) et des entomopoxvirus (EPV). Des essais sur le terrain en utilisant ces virus ont été réalisés entre 1971 et 1973 (Cameron, 1975). Le NPV est alors apparu beaucoup plus efficace que l'EPV et les CPV. Pour cette raison les recherches se sont tournées principalement vers le NPV (Cunningham et Howse, 1984; Cunningham, 1985; Kaupp et Ebling 1990). Les virus entomopathogènes constituent une solution de rechange au *Bacillus thuringiensis* et aux insecticides chimiques (Cunningham et Kaupp, 1995). À cause de leur plus grande spécificité, ils risquent moins de nuire à d'autres espèces d'insectes non-nuisibles.

1.6- CONCLUSION

Malgré les progrès importants au niveau des connaissances fondamentales sur les cypovirus, il reste de nombreux points à éclaircir avant de comprendre parfaitement toutes les étapes de la multiplication virale. Le développement éventuel de lignées cellulaires adéquates pour la multiplication virale, permettrait de mieux comprendre les mécanismes de régulation impliqués dans la transcription et traduction *in vivo*, de même que

l'identification des protéines structurales et des mécanismes impliqués dans la réplication du génome et l'assemblage de la particule virale.

Le séquençage du génome de différents cypovirus devrait permettre d'établir une classification des souches virales plus précise et plus représentative des relations phylogénétiques entre les isolats viraux.

Du point de vue de la recherche appliquée, les efforts devront se tourner vers le développement de bio-insecticides améliorés par le génie génétique, en mettant l'emphase surtout sur les gènes impliqués dans la spécificité d'hôte et la virulence. Bien que les cypovirus ne semblent pas être des candidats idéaux à prime abord, à cause du fait qu'ils provoquent une maladie chronique plutôt que létale, ils possèdent tout de même certaines caractéristiques intéressantes pour leur utilisation dans des programmes de lutte biologique. Pour cette raison, la recherche sur les CPVs, tant fondamentale qu'appliquée, doit se poursuivre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- VIRUS

1.1- Souche virale

Un isolat du cypovirus de *Choristoneura fumiferana* (CfCPV), a été gracieusement fourni par le Docteur William Kaupp de l'Institut pour la répression de ravageurs forestiers du Canada (IRRF, Sault-Ste-Marie, Ontario).

1.2- Larves

Les larves saines de la tordeuse des bourgeons de l'épinette utilisées dans notre laboratoire, ont été obtenues de l'IRRF au 2^e stade de leur croissance. Les larves sont livrées sur des rouleaux de gaze et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. Des morceaux de gaze, sur lesquels se retrouvent de 15 à 30 larves, sont déposés dans des godets contenant 10 ml d'une nourriture artificielle (McMorrant, 1965) afin de poursuivre leur développement. Les godets ont été incubés à 25°C avec une photopériode contrôlée (14 heures jour et 10 heures nuit) et 50% d'humidité relative.

1.3- Production virale

Le CfCPV a été amplifié en laboratoire sur des larves de tordeuse des bourgeons de l'épinette de 4^e stade. Dix à quinze larves ont été placées dans des godets contenant 10 ml de nourriture artificielle sur laquelle 50 µl d'une suspension de 10⁵ polyèdres/ml ont été déposés. Douze jours suivant l'infection, les larves ont été placées à -20°C. Ensuite, les larves infectées ont été broyées dans 2 volumes d'eau à l'aide d'un mélangeur électrique. Le broyat a ensuite été filtré à travers trois épaisseurs de gaze de coton et les débris cellulaires restant ont été éliminés grâce à deux cycles de centrifugation avec de l'eau durant 10 min à 4000 x g. Le surnageant obtenu a été conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

1.4- Purification des polyèdres et du virus

Les polyèdres ont été purifiés à partir de broyats de larves infectées, d'après la méthode décrite par Hayashi et Bird (1970). Brièvement, les polyèdres présents dans le broyat ont été sédimentés par centrifugation à 10 000 x g pendant 10 min. Ensuite le culot contenant les polyèdres a été resuspendu dans le tampon TK (0,03 M Tris-HCl à pH 7,5, 0,025 M KCl), recentrifugé dans les mêmes conditions puis resuspendu de nouveau dans une solution de déoxycholate de sodium (DOC) à 0,5% avant d'être incubé pendant 15 min à température de la pièce. Le détergent a ensuite été éliminé par trois centrifugations de 10 min à 10 000 x g, en ayant soin de bien resuspendre le culot dans du tampon TK. À la fin du dernier lavage, le culot a été resuspendu dans le tampon TK et la suspension déposée sur un gradient discontinu de saccharose de 50-90% (p/v), puis centrifugé pendant 1 h à 20 000 x g. Les fractions ont été récoltées et analysées par SDS-PAGE. Des échantillons ont aussi été observées en microscopie électronique en utilisant la coloration négative à l'acide phosphotungstique 5% et un microscope électronique Hitachi H-7100. Les fractions ne contenant que des polyèdres ont été mélangées ensemble. Afin d'éliminer le saccharose, le volume des fractions a été augmenté à 50 ml avec de l'eau et ensuite centrifugé à 10 000 x g pendant 15 min.

Les particules virales ont été purifiées à partir des polyèdres. Les polyèdres purifiés ont été resuspendus dans l'eau et dissous avec un volume égal d'une solution de carbonate de sodium 0,2 M à pH 10,8. Le mélange a été incubé pendant 20 min à température de la pièce et ensuite déposé sur un gradient de saccharose de 50 à 90% avant centrifugation pendant 90 min à 28 000 x g. Les fractions obtenues ont été analysées en microscopie électronique tel que décrit précédemment.

1.5- Purification des ARN bicaténaires génomiques

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la purification du génome viral complet. La première méthode de purification consistait en une extraction à chaud par le

phénol, un volume de 200 μ l de broyat larvaire a été mélangé avec un volume égal de phénol et suite à une incubation à 56°C pendant 1 h, le mélange a été centrifugé à 12 000 x g pendant 3 min. Après une extraction au phénol:chloroforme et une seconde au chloroforme, les ARN étaient récupérés de la phase aqueuse par une précipitation à l'éthanol. La seconde méthode de purification du génome viral consistait en une extraction par le Trizol (GibcoBRL), selon les instructions du manufacturier. Encore une fois, un volume de 200 μ l de broyat des larves a été utilisé au départ auquel 1 ml du Trizol a été ajouté. Les culots d'ARN obtenus selon les deux méthodes ont été séchés sous la hotte chimique et resuspendus dans 50 μ l d'eau. Ces ARN génomiques ainsi obtenus ont ensuite été traités avec les enzymes DNase I (30 μ g/ml, pendant 1h); puis RNase T1 (10 U/100 μ l, pendant 30 min) et finalement protéinase K (10 mg/ml, pendant 1h) à 37°C. Après deux extractions au phénol, une extraction au phénol:chloroforme (1:1) et une extraction au chloroforme, l'ARN a été précipité avec de l'éthanol et resuspendu dans 50 μ l d'eau. Toutes les solutions utilisées pour l'extraction ont été préparées avec de l'eau traitée au DEPC tel que décrit par Sambrook *et al.* (1989). Les ARN génomiques ainsi purifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

1.6- Purification individuelle des segments génomiques

La purification des différents segments génomiques a été faite à l'aide de la trousse commerciale "RNAide" (Bio101, Vista, CA, É.U.). Brièvement, les segments d'ARN génomiques ont été séparés par électrophorèses sur gel d'agarose 0,8% préparé dans le tampon TAE 1X (40 mM Tris-acétate pH 7,8, 20 mM NaOAc et 2 mM EDTA). Après immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium, les différents segments d'ARN ont été visualisés par U.V. Les morceaux d'agarose contenant les segments d'ARN ont été découpés individuellement, sauf pour les segments 1,2,3 et 6,7 que ont été découpés en groupe. Les ARN ont ensuite été élués des morceaux d'agarose en suivant le protocole du manufacturier.

2- CLONAGES DES DIFFÉRENTS SEGMENTS DU CfCPV

2.1- Synthèse des ADNc

Les ADNc du CfCPV ont été synthétisés à partir des ARNbc génomiques totaux ou des segments purifiés individuellement en se basant sur la méthode mise au point pour les réovirus (Cashdollar *et al.*, 1982) et rotavirus (Imai *et al.*, 1983). La première étape a consisté à ajouter une queue de poly(A) aux extrémités 3' des ARN, absente chez les membres de la famille *Reoviridae*, à l'aide de la poly(A) polymérase. La réaction a été effectuée dans un volume total de 50 μ l contenant de 5 à 20 μ g d'ARN génomique purifié, Tris-HCl 50 mM à pH 7,9, MgCl₂ 10 mM, NaCl 250 mM, MnCl₂ 2,5 mM, ATP 0,25 mM, BSA (albumine sérique bovine) 0,5 mg/ml et 6 unités (U) d'ARN poly(A) polymérase (GibcoBRL). Le mélange réactionnel a ensuite été incubé à 37°C pendant 12 min, puis 1 μ l d'EDTA 0,5 M et 149 μ l d'eau traitée au DEPC ont été ajoutés avant de procéder à une première extraction au phénol:chloroforme suivi d'une deuxième extraction avec chloroforme seulement. Les ARN ainsi polyadénylés ont été récupérés de la phase aqueuse par précipitation à l'aide d'acétate d'ammonium 3 M (1 volume) et d'éthanol (2,5 volume). Les culots obtenus ont finalement été resuspendus dans 4,5 μ l de tampon TE (Tris-HCl 10 mM à pH 7,8, EDTA 0,1 mM).

La synthèse des ADNc à partir des ARN polyadénylés a été effectuée par la transcriptase inverse (RT superscript, GibcoBRL). Afin d'obtenir une transcription des ARN, ces derniers ont été dénaturés à 37°C pendant 10 min en présence de méthylmercure à une concentration finale de 10 mM. Le méthylmercure a ensuite été inactivé par l'ajout de 1 μ l de β -mercaptoéthanol à une concentration de 500 mM et 5 μ l d'eau. Les ARN dénaturés ont par la suite été ajoutés de 10 μ l d'un mélange réactionnel contenant 50 pmoles d'une amorce oligonucléotidique, un tampon commercial pour RT (GibcoBRL), 1mM de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), 30 unités de RNAGuard ("RNase inhibitor", Pharmacia), 200 unités de RT Superscript (GibcoBRL). La réaction de transcription inverse a été effectuée à 37°C pendant 1 h. Deux types d'amorces ont été utilisés pour la synthèse des ADNc, soit un oligo(dT)(12-18) (GibcoBRL) ou une amorce

Rtag contenant une queue de poly(T) du côté 3' suivie d'une séquence contenant des sites de restriction [GGGTCTAGAGC-TCGAG(T)₁₇]. Le produit de la réaction de RT (hybrides ADNc/ARN) obtenus en utilisant l'oligo(dT) comme amorce, a été soumis à une extraction au phénol:chloroforme suivi d'une extraction au chloroforme. L'ARN des hybrides a été dénaturé en ajoutant du NaOH 3N, puis le mélange réactionnel a été neutralisé avec du HCl 3N. Les ADNc monocaténares ainsi produits ont été récupérés par une précipitation à l'éthanol, puis ils ont été resuspendus dans 100 µl de tampon contenant du Tris-HCl 200 mM à pH 6,8, du NaCl 600 mM et du EDTA 5 mM. Le mélange a été chauffé à 65°C pendant 1 h, puis refroidi graduellement jusqu'à 25°C afin de permettre l'appariement des brins complémentaires. Les extrémités ont été réparées avec le fragment Klenow de la polymérase I (GibcoBRL, "Large fragment of DNA polymerase I") pour la production d'extrémités franches. Les ADNc obtenus avec l'amorce Rtag ont été amplifiés par PCR en utilisant l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (ADN polymérase, Taq Biocan). Pour ce faire, la réaction contenant les ADNc (20 µl) a été chauffée à 98°C pendant 5 min afin de dénaturer l'enzyme RT, puis le volume a été complété à 100 µl avec une mélange réactionnel contenant 50 pmoles d'amorces Adapt [amorce identique à Rtag mais dépourvu de la queue de poly(T)], 8 µl de tampon commercial 10X pour la Taq et 2,5 U d'ADN polymérase Taq. Afin d'éviter l'évaporation, le mélange réactionnel a été recouvert de 50 µl d'huile minérale légère. Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un appareil spécialisé pour la PCR (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus Corp., É.U.) dans les conditions suivantes: 1 min de dénaturation à 95°C, 2 min pour l'appariement à 46°C, 1,5 min de polymérisation à 72°C (35 cycles), le tout terminé par un cycle d'extension de 10 min à 72°C. L'huile minérale, a ensuite été éliminée par extraction avec du chloroforme. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose selon la méthode décrite par Sambrook *et al.*, 1989.

2.2- Vecteurs et souches bactériennes

Deux types de plasmide ont été utilisés pour les expériences de clonage: pIBI-31 (CLONAR II, pIBI Vector Cloning System) et pCRTMII (Invitrogen). Les vecteurs utilisés pour les expériences d'expression des protéines sont: pMALTM-c2 (New England BioLabs

Inc.), pAL-781 (ThioFusion™ Expression System, Invitrogen) et pcDNA₃ (pcDNA₃ mammalian expression vector, Invitrogen).

Les souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) qui ont été utilisées figurent dans le Tableau 3. Les milieux de culture employés pour leur croissance sont les suivants: milieu LB (bacto-tryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 1%), milieu 2x YT (bacto-tryptone 1,6%, extrait de levure 1%, NaCl 0,5%) sauf pour la souche G1724, qui requiert les milieux suivants: RM ("M9 salts" 1X, hydrolysate de caséine acide 0,2%, glycérol 1%, et MgCl₂ 1mM), milieu d'induction ("M9 salts" 1X, hydrolysate de caséine acide 0,2%, glucose 0,5%, MgCl₂ 1mM), milieu SOB (tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM), milieu SOC (milieu SOB plus glucose 20 mM). Les transformants bactériens ont été sélectionnés dans du milieu LB ou RM contenant 50-100 µg/ml d'ampicilline. La croissance des bactéries sur milieu solide s'est effectuée dans des pétris contenant du milieu LB ou RM additionné de 1,5% de bacto-agar avec l'antibiotique requis.

2.3- Clonage des ADNc par production d'extrémités franches

Le plasmide pIBI-31 a été utilisé pour cette partie du travail. Environ 5 µg d'ADN plasmidique ont été linéarisés en utilisant 10 unités de l'endonucléase *Sma* I selon les conditions recommandées par le manufacturier (GibcoBRL). Après une incubation de 2 heures à 37°C, la solution a été déposée sur gel d'agarose à 0,8%. La bande contenant le plasmide linéarisé a été éluée du gel en utilisant la trousse GeneClean™ (BIO 101, vista, CA. É.U.) selon les instructions du fabricant. Le phosphate aux extrémités 5' du vecteur a été éliminé afin de réduire le bruit de fond dû à la recircularisation possible du plasmide. Ceci a été réalisé dans un volume de 30 µl, contenant 3 µg du plasmide linéarisé et 2 unités de phosphatase intestinale de veau (CIP, GibcoBRL). Ce mélange a été incubé à 37°C durant 45 min. L'enzyme a ensuite été inactivé par l'addition de 0,2 µl d'EDTA 0,5 M suivie d'une incubation à 65°C pour une période de 30 min. Par la suite, le volume réactionnel a été complété à 100 µl avec de l'eau et le plasmide linéarisé et déphosphorylé

a été purifié à l'aide de la trousse "Magic DNA Clean-up" (Promega) selon les recommandations du manufacturier.

Les ADNc ont été insérés dans le plasmide pBI-31 linéarisé. Le volume total de la réaction était de 10 μ l, incluant le vecteur, l'insert (rapport molaire de 1:3), du Tris-HCl 50 mM à pH 8,0, du MgCl₂ 7 mM, dithiothréitol 1 mM, ATP 2 mM et 1 U de ligase du phage T4 (GibcoBRL). Le mélange a été incubé toute la nuit à 16°C.

TABLEAU 3
Liste des souches bactériennes utilisées au cours de ce travail

Souches	Génotype
XL1-Blue	<i>recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac⁻, F'[proAB⁺, lacI^q, ΔlacZDM15, Tn10(tet^r)]. Utilisée pour la plupart des clonages.</i>
INV αF'	<i>recA1, endA1, hsdR17(ΓK⁻, mK⁺), supE44, gyrA96, thi-1, relA1, φ80, ΔlacZDM15, Δ(lacZYA-argF), U169λ⁻, F'. Utilisée pour le clonage des ADN dans le vecteur pCRTMII.</i>
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 ΔlacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
TB1	<i>ara Δ(lac proAB), rpsL (φ80 ΔlacZDM15), hsdR. Utilisée pour l'expression avec le vecteur pMAL-c2.</i>
GI724	<i>F⁻, λ⁻, lacI^q, lacPL8, ampC::P_{trp}cl. Utilisée pour l'expression avec le vecteur pAL-781</i>

2.4- Clonage des fragments d'ADN amplifiés par PCR

Les ADNc amplifiés par PCR ont été clonés directement dans le vecteur pCRTMII en utilisant la trousse "TA cloning Kit" (Invitrogen, San Diego, CA, É.U.). La méthodologie employée est celle fournie par le fabricant. Le clonage des produits de PCR dans le vecteur pCRTMII tire avantage du fait que la polymérase Taq possède une activité de synthèse non dépendante du gabarit d'ADN, ajoutant un désoxyriboadénosine à l'extrémité 3' du produit amplifié. Le vecteur fourni dans la trousse possède un résidu T à chaque extrémité 3', ce qui le rend compatible avec le produit amplifié.

2.5- Transformation des cellules bactériennes

Les souches d'*E. coli* XL-1 Blue et TB1 ont été traitées avec du CaCl₂ afin de rendre les cellules compétentes pour la transformation par l'ADN des différents vecteurs (Hanahan, 1983; Sambrook *et al.*, 1989). La souche d'*E. coli* GI724 a été traitée selon le protocole suggéré par le fabricant Invitrogen (ThioFusionTM Expression System).

Pour la transformation, 5 µl de la réaction de ligation ont été ajoutés à 100 µl de bactéries compétentes puis le mélange a été incubé sur glace pendant 30 min. Après un choc thermique de 45 sec à 42°C, 900 µl de milieu LB ont été ajoutés et incubé sous agitation pendant 1 h à 37°C. Les bactéries ainsi transformées ont alors été étalées sur le milieu solide de sélection [15 g de bacto-agar par litre de milieu LB, 50 µg/ml d'ampicilline, 10 µl de 100 mM d'isopropylthio-β-galactoside (IPTG; Boehringer Mannheim) et 50 µl d'une solution de 5-bromo-4 chloro-3 indolyl-β-D-galactoside (X-Gal; Boehringer Mannheim) à 2% préparée dans du diméthylformamide]. Les géloses ont été incubées à 37°C en position inversée pendant la nuit. À cause de la présence du gène de résistance à l'ampicilline dans le vecteur, seules les bactéries transformées peuvent croître sur les géloses. L'addition du X-Gal (substrat chromogénique de la β-galactosidase) et de l'IPTG (inducteur de l'opéron lac) avaient pour but de faciliter la sélection phénotypique des recombinants β-gal⁻. En effet, l'insertion d'un fragment d'ADN dans un site approprié de l'ADN plasmidique interfère avec la production de β-galactosidase dans les bactéries

transformées produisant des colonies blanches. Les colonies blanches ont été sélectionnées et ensemencées dans du bouillon LB pour être analysées par la technique de mini-préparation de l'ADN plasmidique recombinant ou repiquées sur du milieu LB solide pour fins d'analyse par la méthode d'hybridation des colonies.

2.6- Purification de l'ADN plasmidique

Pour la purification rapide des recombinants, l'ADN plasmidique a été extrait de mini-préparations en utilisant la méthode de lyse alcaline décrite par Birnboim et Doly (1979). Les ADN utilisés pour fin de séquençage ont été purifiés à l'aide d'une trousse de purification en suivant le protocole recommandé par le manufacturier (Wizard™ Minipreps, Promega). Les ADN ont été dosés par spectrophotométrie. Pour la purification de quantités d'ADN plus importantes, lorsque requise, la méthode de lyse alcaline décrite par Sambrook *et al* (1989) ou la trousse de purification Maxipreps de la compagnie Quiagen (Santa Clarita, CA. É.U.) ont été utilisés.

2.7- Transfert des colonies sur filtre

Cette méthode a été développée par Grunstein et Hogness (1975). Le protocole décrit par Sambrook *et al.* (1989) a été employé avec quelques modifications. Brièvement, les bactéries ont été ensemencées directement sur une gélose. Après une incubation de 16 heures à 37°C, les colonies ont été transférées sur un filtre de type Whatman 541 en déposant ce dernier sur la gelose. Les bactéries ainsi transférées ont été lysées en recouvrant le filtre d'une solution de NaOH 0,5 N. Ensuite, le NaOH a été neutralisé avec une solution de Tris-HCl 1 M à pH 7,4. La fixation de l'ADN sur le filtre a été réalisée en utilisant une solution composée de Tris-HCl 0,5 M à pH 7,0 et NaCl 3 M. Chacune de ces étapes comportait des temps d'incubation de 10 min et ont été répétées deux fois. Les filtres ont été séchés dans un four à vide chauffé à 80°C durant 60 min.

2.8- Préparation des sondes moléculaires

Dans ce projet, 2 types de sondes radiomarquées ont été utilisées. Une sonde moléculaire d'ADNc a été préparée à partir du génome viral complet en utilisant des amorces aléatoires et la transcriptase inverse (GibcoBRL). Dans un volume réactionnel de 50 μ l, 1 μ g d'ARN, de l'eau et 1 μ l d'amorces aléatoires (3 μ g/ μ l, GibcoBRL) ont été incubés à 98°C durant 5 min. Le mélange a ensuite été rapidement transféré sur glace, avant d'y ajouter 1 μ l de chaque dNTP (dATP, dTTP, dGTP) à 10 mM chacun, 10 μ l de tampon 10 X pour RT (GibcoBRL), 5 μ l [α -³²P] dCTP (ICN; 3 000 Ci/mmole), 5 μ l de DTT à 0,1 Mm, 30 unités de RNAGuard (Pharmacia) et 200 unités de RT. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 60 min. La réaction a été arrêtée avec 5 μ l d'EDTA 0,5 M. Pour mesurer le taux d'incorporation, une aliquote de 1 μ l de sonde a été précipitée dans environ 2 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 5%, puis passée à travers un filtre de laine de verre (Whatman). Une fois sec, le filtre a été submergé dans un vial contenant 5 ml de liquide à scintillation (CytoScint; ICN). Le taux de radioactivité incorporé par la sonde a été déterminé à l'aide d'un compteur à scintillation ("Liquid Scintillation Analyzer 2200 CA, PACKARD Canberra Company).

Les plasmides recombinants utilisés comme sondes ont été marqués au [α -³²P] dCTP (ICN; 3 000 Ci/mmole) à l'aide de la trousse "Random primers DNA labelling kit" (GibcoBRL) en suivant les recommandations du manufacturier. Environ 200 ng d'ADN à marquer ont préalablement été dénaturés puis mélangés avec 3 μ l de la solution "Random primers mix", 2 μ l de chaque dNTP (dATP, dGTP, dTTP), 5 μ l [α -³²P] dCTP et 1 μ l (200 unités) du fragment Klenow de l'ADN polymérase de *E. coli*. L'incorporation de la radioactivité a été mesurée tel que décrit pour la sonde d'ADNc obtenue avec le génome viral complet.

3- IDENTIFICATION DES CLONES

3.1- Sélection des clones positifs par hybridation des colonies

Les filtres contenant les colonies bactériennes ont été insérés dans un sac à hybridation (BRL). Pour chaque centimètre carré de filtre, environ 100 µl de solution d'hybridation [50% de formamide déionisée, 5% de sulfate de dextran, solution de Denhardt 5X (1,0 g/L de ficoll 400, 1,0 g/L de polyvinyl-pyrrolidone, 1,0 g/L de BSA), 100 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé et 0,1% de SDS] ont été versés dans le sac qui a été scellé par la suite. Après une préhybridation à 42°C pendant au moins 3 heures, la sonde d'ADNc dénaturée, produite à partir des ARN génomiques totaux, a été ajoutée (environ 10⁶ cpm/ml de solution d'hybridation). L'incubation s'est poursuivie à 42°C pendant 18 heures. Les filtres ont ensuite été lavés trois fois dans du SSC 2X contenant 0,1% de SDS à 45°C, trois fois dans du SSC 1X contenant 0,1% SDS à 45°C et trois fois dans du SSC 0,1X contenant 0,1% de SDS à température ambiante. Chaque lavage a été réalisé sous agitation constante pendant 10 min. Les filtres ont finalement été séchés à l'air et exposés sur un film Kodak X-Omat en présence d'un écran amplificateur pendant 18 heures.

3.2- Identification de clones par hybridation ARN:ADN

3.2.1- Électrophorèse des ARN et transfert de type Northern

Des ARN génomiques totaux (5 à 10 µg) purifiés à partir de broyats des larves infectées, ont été dénaturés à température de la pièce pendant 10 min dans un volume égal d'un tampon contenant 50% de formamide, 16% de formaldéhyde (solution à 37%), du tampon TAE 1X, et 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Les échantillons ont ensuite été déposés directement sur un gel d'agarose 1% préparé dans du tampon TAE 1X. Afin d'éviter la dégradation des ARN, toutes les solutions avaient été préparées avec de l'eau préalablement traitée avec DEPC, et les appareils, lavés avec une solution de RNase Away™ (Molecular Bio-Products, inc. San Diego, CA). Les ARN séparés par

électrophorèse ont par la suite été transférés sur une membrane de nylon de 0,45 µm (ICN BIOTRANSTTM Nylon Membranes, East Hills, N.Y.) en utilisant le système "Vacuum blotting system" (VACUGENETM XL, Pharmacia LKB Biotechnology). Le tampon SSC 10X (3 M NaCl, 300 mM de citrate de sodium à pH 7,2) a été utilisé comme solution de transfert. Les membranes ont été séchées à l'air et irradiées aux UV pendant 5 min. Elles ont ensuite été découpées en languettes contenant tous les segments génomiques du CfCPV et hybridées individuellement avec une sonde produite à partir du génome complet (contrôle du transfert) ou avec des sondes spécifiques obtenues à partir de clones déterminés positifs par hybridation de colonies. La méthode d'hybridation utilisée est celle décrite à la section 3.1.

4- SÉQUENÇAGE

La totalité des séquences obtenues ont été déterminées par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier. Les inserts plasmidiques ont été séquencés par la méthode enzymatique de Sanger *et al.*, (1977). Les réactions ont été chargées sur un séquenceur automatique ("Automated Laser Fluorescent ALF DNA sequencer", Pharmacia) et l'analyse des séquences a été effectuée à l'aide des logiciels MacVector version 4.5.0 (Eastman Kodak) et GeneWorks version 2.4 (Intelligenetics Inc.).

4.1- Séquençage de l'extrémité amino-terminale de la polyédrine

La séquence N-terminale de la polyédrine purifiée du CfCPV a été obtenue par la méthode de dégradation d'Edman, en utilisant un séquenceur automatique "Gas-Phase Sequencer" model 470A et en suivant le protocole décrit par Hewick *et al.* (1981). La polyédrine a été séparée des autres protéines virales par la méthode de SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Après l'électrophorèse, le gel a été imbibé dans le tampon de transfert (10 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid, et 10% méthanol) pendant 5 min et transféré électrophorétiquement sur une membrane PVDF (Difluorure de polyvinylidène, BioRad Trans-blot Transfer Medium). Ensuite, la membrane a été lavée dans l'eau pendant 5 min et colorée avec du bleu de Coomassie R-250 durant 5 min. Après décoloration avec

une solution contenant 50% de méthanol et 10% d'acide acétique, la membrane a été séchée à l'air et conservée à -20°C (Matsudaira, 1987). Approximativement 50 pmoles de la protéine ont été chargées sur le séquenceur. Le programme O3RPTH de la compagnie Applied Biosystem inc. a été utilisé pour le séquençage. Les acides aminés phénylthiohydantoin dérivés ont été déterminés par comparaison avec des standards (PTH analyser standards, ABI). Le séquençage a été réalisé par le service de séquençage de l'Institut de Recherche en Biotechnologie.

5- EXPRESSION DU GÈNE CODANT POUR LA POLYÉDRINE

5.1- Expression dans le vecteur pMAL™-c2

Le cadre ouvert de lecture (ORF) qui contient le gène complet de la polyédrine du CfCPV a été amplifié par PCR à partir du clone CfCPVg10. Les amorces utilisées sont les suivantes: l'amorce sens 5' GGCTCTAGAATGCCTTACGAGAGAGATTG 3' (homologue aux nucléotides 34 à 53, la région soulignée correspond au site de restriction *Xba* I) et l'amorce non sens 5' GGCGCTGCAGTTAGTAATATCTGCTCGGG 3' (complémentaire aux nucléotides 792 à 810, la région soulignée correspond au site de restriction *Pst* I). Le produit amplifié par PCR a donné un fragment de 796 paires de bases. La réaction d'amplification a été effectuée dans un volume final de 100 µl contenant 50 ng d'ADN plasmidique recombinant, 10 µl de tampon 10X pour la polymérase Taq, 2 mM de chacun des quatre dNTP, 50 pmoles de chaque amorce et 2,5 U de polymérase ADN Taq (BIO/CAN, Mississauga, Ontario). Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un appareil pour PCR (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus Corp., É.U.) selon les conditions suivantes: 30 cycles d'une min à 95°C, 2 mins à 55°C, et 2 min à 72°C, suivis d'une incubation de 10 min à 72°C. Les gènes ainsi amplifiés ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% et purifiés en utilisant la trousse "Magic PCR prep (Promega) selon les indications du fabricant. Ensuite, l'ADN amplifié de même que le vecteur p-MAL™-c2 ont été digérés séparément par les endonucléases *Xba* I et *Pst* I (GibcoBRL). Après une incubation de 2 heures à 37°C, les produits de digestion ont été déposés sur gel d'agarose. Les bandes d'ADN correspondant à la taille de l'insert et du

vecteur digérés ont été découpés et élués du gel à l'aide de la trousse "GeneClean™ (BIO 101) en suivant les instructions du manufacturier. Finalement, l'ADN amplifié a été inséré dans le vecteur p-MAL™-c2 (ratio molaire 4:1), dans un volume réactionnel de 10 µl contenant le tampon de ligation 5X (GibcoBRL) et 1 unité de ligase du phage T4 (GibcoBRL). Le mélange a été incubé toute la nuit à 14°C. Les bactéries compétentes DH5α ont été transformées avec 2 µl du mélange de ligation. L'ADN des bactéries recombinantes a été isolé par la technique de mini-prep et analysé par une double digestion *Xba* I et *Pst* I. Suite à l'analyse, deux clones, pMal-P42 et pMal-P70, ont été sélectionnés pour les expériences d'expression.

Les ADN plasmidiques des clones pMAL-P42 et pMAL-P70 ont été transférés dans des bactéries *E. coli* TB1 compétentes. Pour vérifier l'expression, 5 colonies de chaque clone ont été ensemencées individuellement dans un milieu de croissance (10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl, 2 g de glucose par litre, et 100 µg/ml d'ampicilline). Les cultures ont été incubées sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique (D.O.) de 0,5 à une longueur d'onde de 600 nm (approximativement 3 heures). Afin d'induire l'expression de la polyédrique, 0,3 mM d'IPTG a été ajouté. Ce dernier agit sur le promoteur qui contrôle l'expression de l'ARN polymérase ADN dépendante du phage T7, codée dans le chromosome de la bactérie. Après deux heures 1 ml de bouillon de culture a été récolté, centrifugé et le culot resuspendu dans 100 µl de tampon d'échantillons pour électrophorèse 2X. Les échantillons ont été clarifiés par centrifugation et analysés par SDS-PAGE afin de vérifier l'expression de la protéine de fusion.

Pour la production à grande échelle, le clone p-MAL-p70.1 a été choisi. Le milieu de croissance RM (500 ml; section 2.2) a été inoculé avec 5 ml d'une pré-culture. Après induction de 2 heures avec l'IPTG, les bactéries ont été centrifugées à 4 000 x g pendant 20 min, et le culot resuspendu dans 25 ml d'un tampon contenant 10 mM de Tris-HCl, 200 mM de NaCl et 1 mM d'EDTA (tampon pour la purification sur colonne). Les bactéries ont été congelées à -20°C (pendant 18 heures) puis décongelées avant d'être soumises à trois cycles de sonification de 30 secondes chacun. Les lysats obtenus ont été clarifiés par

une centrifugation à 9 000 x g durant 30 min et resuspendus dans 100 ml de tampon pour la purification sur colonne. La protéine de fusion MBP-Polyédrine a finalement été purifiée sur une colonne d'amylose en suivant le protocole suggéré par le fabricant (New England BioLabs Inc.). La protéine de fusion MBP-Polyédrine ainsi purifiée a été utilisée pour l'immunisation des animaux décrite à la section 6.

5.2- Expression dans le vecteur pAL-781

Le cadre de lecture ouvert correspondant au gène de la polyédrine a été amplifié par PCR en utilisant une nouvelle amorce sens (5' TTACATATGCCTTA-CGAGAGAGATT 3', le site *Nde* I est souligné dans la séquence) et l'amorce inverse utilisée pour le clonage dans le vecteur pMAL™-c2 (section 5.1). Les produits amplifiés et le vecteur pAL-781 ont été digérés par les endonucléases *Nde* I et *Pst* I. Après migration sur gel d'agarose à 0,8%, les produits de digestion ont été purifiés à l'aide de la trousse "GeneClean BIO 101". Après ligation pendant 16 heures à 16°C, des cellules *E. coli* GI724 compétentes ont été transformées. Les bactéries ont étéensemencées sur des géloses contenant du milieu RM et 1,5% de bacto-agar (section 2.2) puis incubées à 30°C durant 18 heures. L'ADN plasmidique des bactéries recombinantes a été analysé par PCR afin de confirmer la présence de l'insert. Cinq clones ont été sélectionnés pour faire l'induction et vérifier l'expression de la polyédrine recombinante. Chaque clone a étéensemencé dans du milieu d'induction (section 2.2) et incubé à 30°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0,5 à une longueur d'onde de 600 nm (approximativement 3 heures). Les bactéries ont été induites avec 100 mg/ml de tryptophane et réincubées à 37°C durant 2 heures. L'expression du polypeptide recombinant a été analysée par SDS-PAGE. Le clone pAL-p12 a été choisi pour la production à grande échelle. La formation de corps d'inclusion et la présence de cristaux ont été observées par microscopie électronique en utilisant la technique de coupes minces (Bendayan, 1984).

6- IMMUNISATION

Des lapins New Zealand (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) ont été immunisés à trois reprises, à intervalles de 2 semaines, par voie intrapéritonéale avec 500 µg (deux fois) et 200 µg (une fois) de la protéine de fusion MBP-polyédrique purifiée ou avec une suspension de 4×10^5 polyèdres, préalablement traitée avec une solution 0,2 M de carbonate de sodium à pH 10,8. L'adjuvant complet de Freund a été utilisé lors de la première injection et l'adjuvant incomplet pour les deux suivantes. Les antisérum obtenus ont été analysés par la méthode d'ELISA. Afin d'éliminer les réactions non spécifiques, l'antisérum obtenu avec la protéine de fusion a été adsorbé avec une suspension de protéines de *E. coli*, préparée par précipitation à l'acétone selon la méthode décrite par Harlow et Lane (1988).

7- ÉLECTROPHORÈSES ET IMMUNOEMPREINTES

7.1- Électrophorèses de protéines

Les électrophorèses ont été réalisées sur des gels de 1 mm d'épaisseur en présence de SDS, selon la méthode de Laemmli (1970). La concentration des gels de regroupement était généralement 3,5% d'acrylamide et celle des gels de séparation de 3% à 12%, selon la technique de Hames (1981). Les échantillons dénaturés dans un tampon constitué de 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% (p/v) de SDS, 1% (v/v) de β -mercaptoéthanol, 10% de glycérol et 0,003% (p/v) de bleu de bromophénol, ont été chauffés 5 min à 95°C avant leur application sur le gel. L'électrophorèse a été exécutée sous un voltage constant de 200 V jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint le bas du gel. Ensuite une solution de 50% (v/v) de méthanol et 7,5% (v/v) d'acide acétique glacial a servi pour la fixation des gels, qui ont par la suite été colorés avec une solution de 0,2% (p/v) de bleu de Coomassie R-250 (Hames, 1981). Les marqueurs de masse moléculaire utilisés étaient constitués des protéines standards colorées (Rainbow™ High Range Coloured protein molecular weight markers, Amersham Life Science).

Pour l'analyse des échantillons marqués à la méthionine [^{35}S], les gels ont d'abord été fixés pendant 1 heure dans une solution de 40% (v/v) de méthanol et 10% (v/v) d'acide acétique. Ensuite, les gels ont été traités durant 30 min avec la solution de fluorographie (EN³HANCE, autoradiography EnHancer, NEN Research products) puis séchés sous vide à 80°C à l'aide d'une plaque chauffante de type SAVANT (Slab Gel Dryer, SGD4050, SAVANT) et mis en contact avec des films radiographiques X-Omat AR-5 (Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.) pendant 3 à 15 jours à -70°C.

7.2- Immunoempreintes

Après séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les protéines ont été transférées électrophorétiquement sur une membrane de PVDF (0,2 μm Bio-Rad Trans-Blot Transfer Medium, PVDF) à l'aide d'un appareil Bio-Rad, à 100 V pendant 2 heures à 4°C. Le tampon de transfert était constitué de 25 mM de Tris-HCl à pH 8,3, 192 mM de glycine et 20% de méthanol. Après le transfert, les sites résiduels de la membrane ont été bloqués pendant toute la nuit à 4°C avec du tampon TBS (50mM Tris base à pH 7,5, 150 mM NaCl) auquel a été ajouté 1% (p/v) de solution de blocage (Boehringer Mannheim). La membrane a ensuite été incubée pendant 1 heure à température de la pièce en présence de l'antisérum anti-MBP-polyédrine ou anti-CfCPV. Suite à deux lavages successifs de 10 min dans du tampon de lavage TBST (tampon TBS plus 0,2% de Tween 20) et deux lavages dans du tampon de blocage 0,5%, l'anticorps conjugués à la peroxydase (Boehringer Mannheim) un anti-IgG de lapin (1:80 000) a été rajouté pendant 30 min à température de la pièce. Après quatre lavages de 15 min chacun dans le tampon TBST, la révélation était faite par chimioluminescence à l'aide de la trousse "Chemiluminescence Western blotting kit" (Boehringer Mannheim). La membrane a ensuite été mise en contact avec des films radiographiques Kodak X-Omat AR-5 dans de cassettes rigides (Wolf X-ray Corp., Picker Canada Ltée, St Laurent, Qc.) pendant 15 à 60 secondes. Les marqueurs de masse moléculaire étaient constitués de protéines standards colorées

8- TRADUCTION *IN VITRO*

Chacun des segments de l'ARN génomique du CfCPV a été traduit *in vitro* en utilisant un lysat de réticulocyte de lapin (GibcoBRL) en présence de ^{35}S -méthionine. Pour chaque segment génomique, 2 μg d'ARN purifié selon la méthode décrite dans les sections 1.4 et 1.5, ont été précipités avec de l'éthanol puis séchés. Ensuite le culot contenant les ARN a été resuspendu dans 4,5 μl d'une solution contenant du Tris-HCl 10 mM à pH 7,8, et de l'EDTA 0,1 mM puis dénaturés en ajoutant 0,5 μl d'une solution de 10 mM CH_3HgOH et incubé à 55°C pendant 10 min. Ce dernier a ensuite été inactivé avec du β -mercaptoéthanol à une concentration finale de 50 mM. Les ARN génomiques ainsi dénaturés ont été ajoutés au mélange réactionnel pour la traduction qui contenait 3 μl du mélange de traduction 10X sans méthionine, 80 mM d'acétate de potassium, 1 mM d'acétate de magnésium, 2 μl de ^{35}S -méthionine (>800 Ci/ml, 10-15 mCi/ml, ICN) et 10 μl de lysat de réticulocytes de lapin. Le mélange réactionnel (30 μl) a été incubé à 30°C pendant 1 heure. Afin d'éliminer les aminoacyl-tRNAs radioactifs, les réactions ont été traitées avec 3 μl d'une solution à 1 mg/ml de RNase A pancréatique pendant 15 min à 30°C. Finalement, les produits de traduction ont été analysés par SDS-PAGE selon la méthode décrite à la section 7.1.

9- QUANTIFICATION DES ARN PAR RT-PCR-QC

9.1- Préparation du standard interne pour le gène 10

Le clone recombinant CfCPVg10 contenant la séquence complète du segment 10 (gène codant pour la polyédriane) a été utilisé pour la préparation du standard interne nécessaire à la technique de quantification utilisée. Dans la séquence du gène 10 la présence de deux sites *Alu* I aux positions 745 et 760 a permis d'effectuer une délétion de 15 nucléotides dans ce site. Après digestion avec l'endonucléase *Alu* I, le mélange réactionnel a été mis sur gel d'agarose à 0,8% et la bande contenant le plasmide linéarisé a été extraite à l'aide de la trousse "GeneClean Kit" (BIO 101). Les plasmides ainsi modifiés ont été recircularisés en présence de la ligase du phage T4. Après transformation, les

colonies recombinantes ont été analysées (section 2.6). Le clone CfCPVsg10 qui possédait la délétion de 15 pb a été choisi pour la préparation du standard interne par transcription *in vitro* avec l'ARN polymérase dépendante d'ADN du phage T7.

9.2- Préparation du standard interne pour le gène 8

Le standard interne pour le gène 8 a été préparé à partir du clone CfCPVg8 qui contient la séquence complète du segment 8 du CfCPV. Ce dernier a été digéré avec l'endonucléase *Sau3A* au site de reconnaissance à la position 544. Le plasmide linéarisé a été traité avec l'enzyme exonucléase III de *E. coli* (exo III, GibcoBRL) afin de créer une série de délétions à l'intérieur de la séquence (Sambrook *et al.* 1989). Brièvement, à 20 µl d'ADN linéarisé (5 µg), ont été ajoutés 6 µl du tampon 10X pour exo III, 0,6 µl d'exo III (660 unités/ml) et 33,4 µl d'eau. Le mélange a été incubé à 37°C pendant une minute avant de prélever des aliquotes de 2,5 µl à des intervalles de 15 secondes. Après prélèvement, chaque aliquote a été déposée dans un tube contenant 7,5 µl du mélange réactionnel pour la nucléase S1 (GibcoBRL) (1X tampon pour S1 et 60 unités de S1). Après une incubation de 30 min à 30°C, la réaction a été arrêtée par l'addition de 3 µl d'une solution contenant 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 125 mM d'EDTA et suivie d'une incubation de 10 min à 70°C. Finalement, les extrémités ont été réparées (production d'extrémités franches) avec l'ADN polymérase I (Klenow, GibcoBRL) et les plasmides recircularisés en présence de la ligase du phage T4 (GibcoBRL). Après ligation, chaque échantillon a été utilisé pour transformer des cellules compétentes XL-1 blue. Le clone CfCPVsg8 possédant une délétion de 50 nucléotides a été choisi pour la préparation du standard interne du segment 8 en utilisant l'ARN polymérase dépendante d'ADN du phage T7.

9.3- Transcription *in vitro*

Les clones CfCPVsg10 et CfCPVsg8 ont été coupés dans le site de clonage multiple par l'endonucléase *Hind* III. Suite à la digestion enzymatique, les plasmides ont été séparés sur gel d'agarose et purifiés à partir du gel à l'aide de la trousse GeneClean (BIO 101) avant de procéder à la transcription *in vitro*. De par l'orientation des inserts clonés dans le

vecteur et la présence du promoteur T7, situé en aval de l'ATG dans le vecteur pCRTMII, la transcription *in vitro* des ARNc (standard interne) a été réalisée avec l'ARN polymérase dépendante d'ADN du phage T7 (GibcoBRL). La réaction a été réalisée dans un volume final de 10 µl contenant 1 µg d'ADN plasmidique, 2 µl tampon de transcription 5X (GibcoBRL), 0,5 µl de DTT, 0,4 mM de NTP et 50 unités de l'ARN polymérase du phage T7. Après une incubation à 37°C pendant 15 min, les ARNc ont été purifiés par la méthode du Trizol LS (GibcoBRL). Ensuite, les ARNc ont été traités avec la DNase ("Amplification grade DNase, GibcoBRL) afin d'éliminer l'ADN qui a servi de matrice pour la transcription *in vitro*. Finalement, les ARNc ont été resuspendus dans l'eau traitée au DEPC et quantifiés par spectrophotométrie à 260 nm.

9.4- RT-PCR-Quantitatif-Competitif

L'ARN total de larves de tordeuse infectées individuellement avec le CfCPV (2 jours, 4 jours et 8 jours post-infection) a été extrait et purifié par la méthode du Trizol (GibcoBRL) en suivant les recommandations du fabricant. Pour chaque échantillon, 200 ng d'ARN total ont été ajoutés dans des tubes contenant une série de dilutions du standard interne (ARNc). Ensuite, les ARN ont été transcrits dans un volume final de 20 µl contenant 2 µl de dNTP (10 mM de chaque dNTP), 2 µl MgCl₂ (20 mM), 2 µl tampon cetus (Sambrook *et al.*, 1989), 10 unités d'inhibiteur de RNase (RNAguard, Pharmacia), 200 unités de transcriptase inverse (superscript, GibcoBRL) et 50 pmoles de l'amorce reverse correspondante. Suite à une incubation pendant 45 min à 37°C, la transcriptase inverse a été inactivée à 98°C pendant 5 min. Le volume du mélange réactionnel contenant les ADNc a été complété à 100 µl avec un mélange pour PCR contenant du tampon 1X pour la polymérase Taq avec MgCl₂ (BIO/CAN Scientific Inc., Mississauga, Ont., Canada), 2,5 unités d'ADN polymérase Taq (BIO/CAN Scientific Inc., Mississauga, Ont., Canada) et 50 pmoles de l'amorce sens correspondant. Afin d'éviter l'évaporation, le mélange réactionnel a été recouvert de 50 µl d'huile minérale légère. Les réactions d'amplification ont été réalisées grâce à 40 cycles d'incubation dans un appareil à PCR (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus Corp., É.U.) selon les conditions suivantes: dénaturation de 1 min à 95°C, appariement de 1 min à 50°C (55°C pour le gène 8),

polymérisation de 1 min à 72°C. À la fin du dernier cycle d'amplification, une étape d'extension de 10 min a été ajoutée. Les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'agarose à 2,5% contenant du bromure d'étidium. Le gel a été photographié sous illumination ultraviolette (UV Fotodyne, New Berlin, WI, É.U). Les photos ont ensuite été analysées par densitométrie en utilisant le programme "ID Image Analysis Software" (Kodak Digital Science™) où les valeurs d'absorbance pour les produits de PCR ont été déterminés. La quantité présente du gène cible dans l'échantillon a été déterminée selon la méthode décrite par Gilliland *et al.*, 1990. Une courbe du log du ratio entre intensité de la cible et l'intensité du standard interne en rapport avec le log du nombre de molécules du standard interne a été tracée. La quantité d'ARN cible dans l'échantillon a été calculée en déterminant le point d'interception sur la courbe où le ratio entre l'intensité de la cible et l'intensité du standard interne est égal à 1, c'est-à-dire quand les fragments amplifiés pour la cible et le standard interne sont présents en quantités égales. Mentionnons que pour déterminer la quantité appropriée du standard interne à utiliser dans la compétition, une expérience préliminaire a été réalisée, dans laquelle l'ARN total a été transcrit en présence d'une série de dilutions en base 10 du standard interne. Sur la base de ces résultats, la dilution précédente avec laquelle les produits de PCR pour le standard interne et le gène cible avaient une intensité égale a été choisie pour faire une série de dilutions du standard interne en base 2, en vue de l'utilisation dans la compétition.

RÉSULTATS

1- PRODUCTION ET PURIFICATION VIRALE

Au cours de la réalisation de cette recherche plusieurs essais ont été réalisés en vue d'obtenir une lignée cellulaire pouvant supporter la multiplication virale. Cependant, les cellules utilisées, IPRI-CF-1 et IPRI-CF-124T, gracieusement fournies par le Dr Sardar Sohi du Service Canadienne des forêts, n'ont pu soutenir la multiplication virale. Pour cette raison, le cytovirus de *C. fumiferana*, a été amplifié en laboratoire sur des larves de TBE du 4^e stade larvaire, en utilisant une diète artificielle. À 12 jours post-infection (pi), des titres viraux de 10^8 à 10^9 polyèdres par ml ont été obtenus. L'examen au microscope électronique de l'intestin provenant de larves infectées par le CfCPV montre que la plupart des cellules contiennent un grand nombre des virus souvent groupés dans de zones cytoplasmiques denses aux électrons (Figure 2). Les polyèdres matures sont en très grande majorité de forme hexagonale, pendant que les polyèdres en formation présentent une forme plutôt arrondie où un grand nombre de particules virales en voie d'inclusion peuvent être observées (Figure 3). Les polyèdres provenant de broyats de larves infectées ont été purifiés sur un gradient discontinu de saccharose. Les bandes obtenues ont été récoltées puis analysées par SDS-PAGE (Figure 4a). La plupart des polyèdres ont été récupérés dans la 4^e bande (Figure 4a, puits 5). En utilisant la technique de coloration négative au PTA, l'analyse du contenu de cette bande en microscopie électronique a confirmé la présence de polyèdres, montrant parfois des variations au niveau de leur taille (Figure 4b). Celle-ci pouvait varier de 0,5 μm à plus de 5 μm dans certains cas, bien que la moyenne se situait à 3 μm (Figure 5).

L'analyse des coupes ultraminces de polyèdres au microscope électronique, a permis d'observer la présence de virus inclus aléatoirement dans la matrice cristalline (Figures 6). Les virus libérés par dissolution de polyèdres apparaissent sous forme d'icosaèdre et mesurent approximativement 70 nm (Figure 7). En effet, certains particules virales arborant des spicules aux sommets de l'icosaèdre ont été observés.

FIGURE 2: Microphotographie électronique d'une coupe de l'intestin d'une larve infectée par le virus CfCPV.

PV: plage virogène; P: polyèdre mature; V: virions; N: noyau.
Coloration Double X 9350.

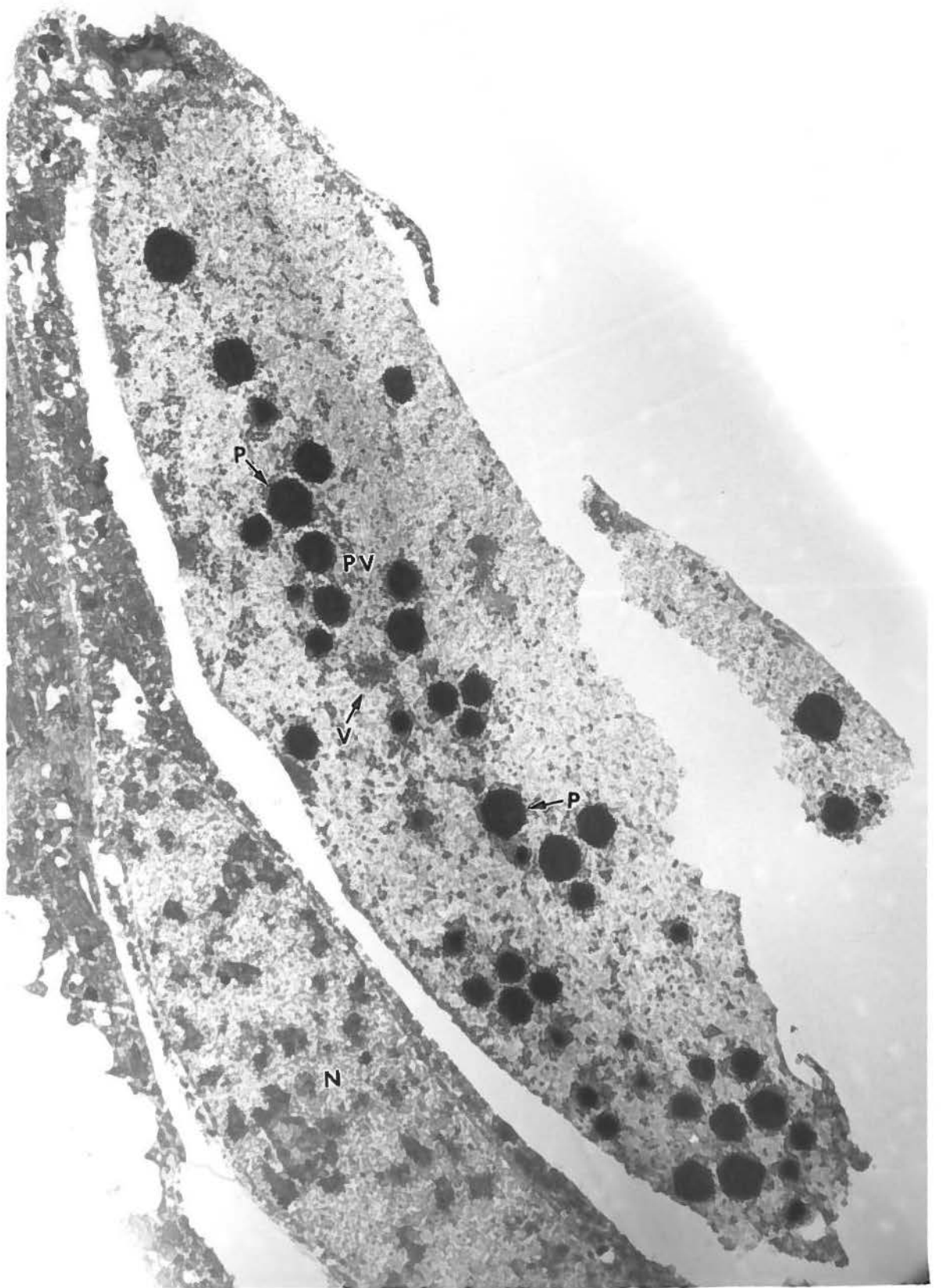


FIGURE 3: Microphotographie électronique d'une coupe ultramince de polyèdres dans une cellule intestinale d'une larve infectée par le CfCPV.

P: polyèdre mature; PF: polyèdre en formation avec des particules virales près du polyèdre et en voie d'inclusion (flèche). Coloration double X 51 000.

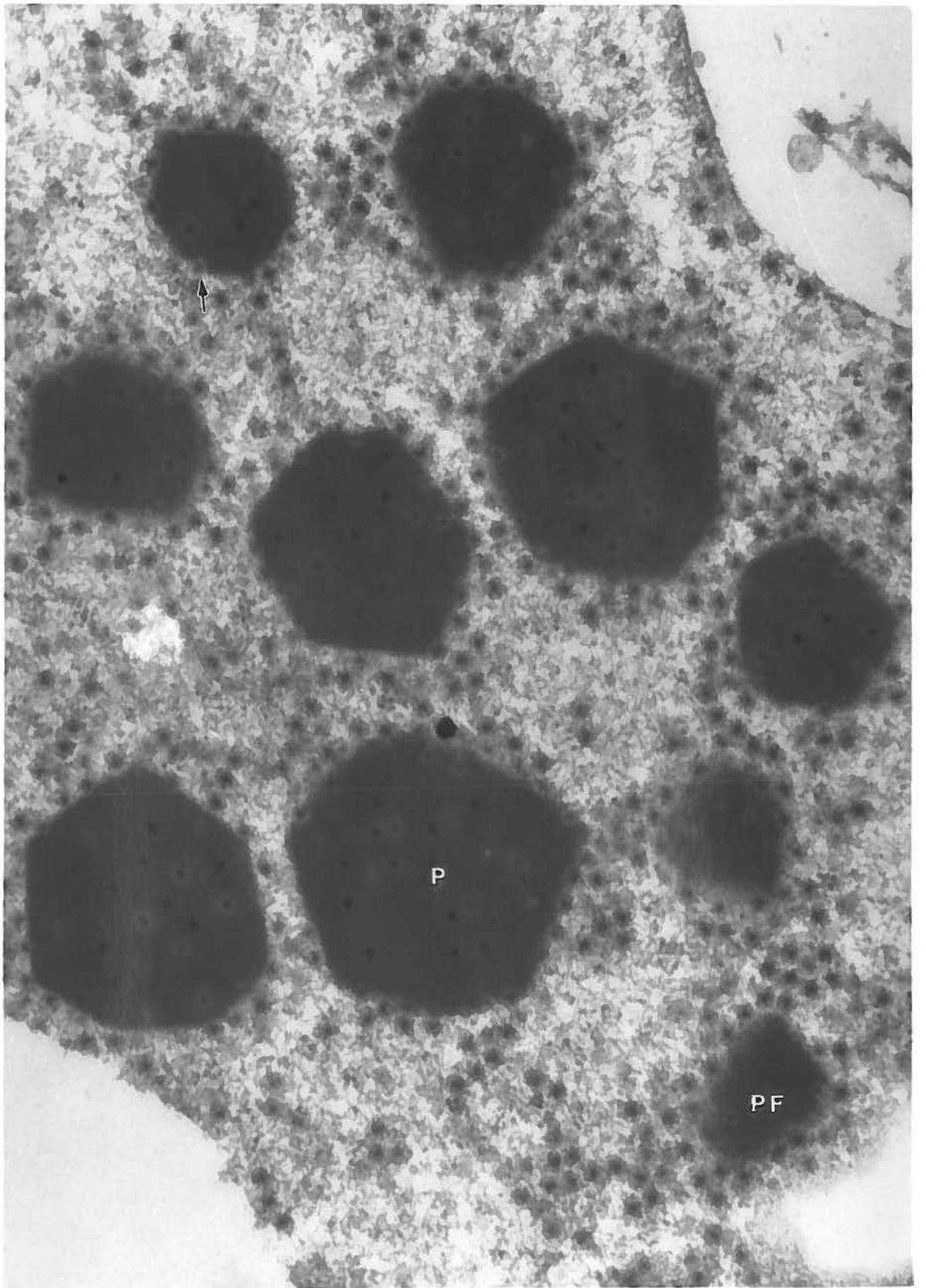
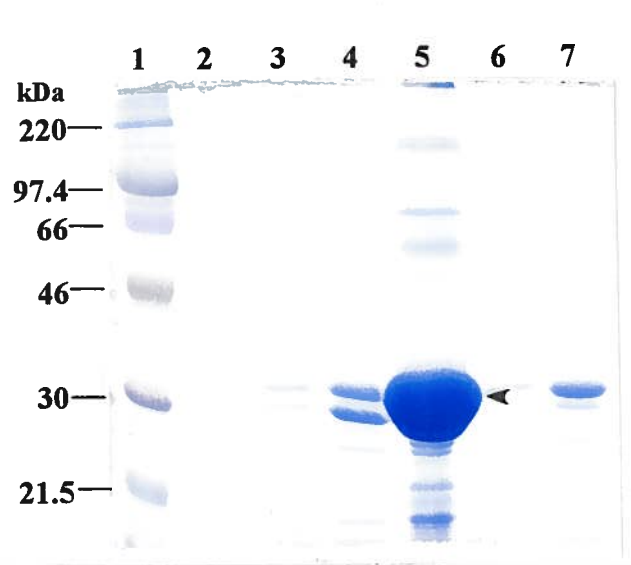


FIGURE 4: Purification des polyèdres sur gradient discontinu de saccharose de 50-90%.

(a) Analyse par SDS-PAGE des bandes récoltées du gradient. Les Puits 2 à 6 correspondent aux bandes 1, 2, 3, 4, et 5 respectivement; le puits 7 quant à lui correspond au culot. La plupart des polyèdres se retrouvent concentrés dans la 4^e bande. Les marqueurs de masse moléculaire (kDa) sont indiqués à gauche.

(b) Analyse par microscopie électronique de la bande numéro 4. Les polyèdres ont été colorés à l'acide phosphotungstique 5%. Grossissement X 21 000.

(a)



(b)

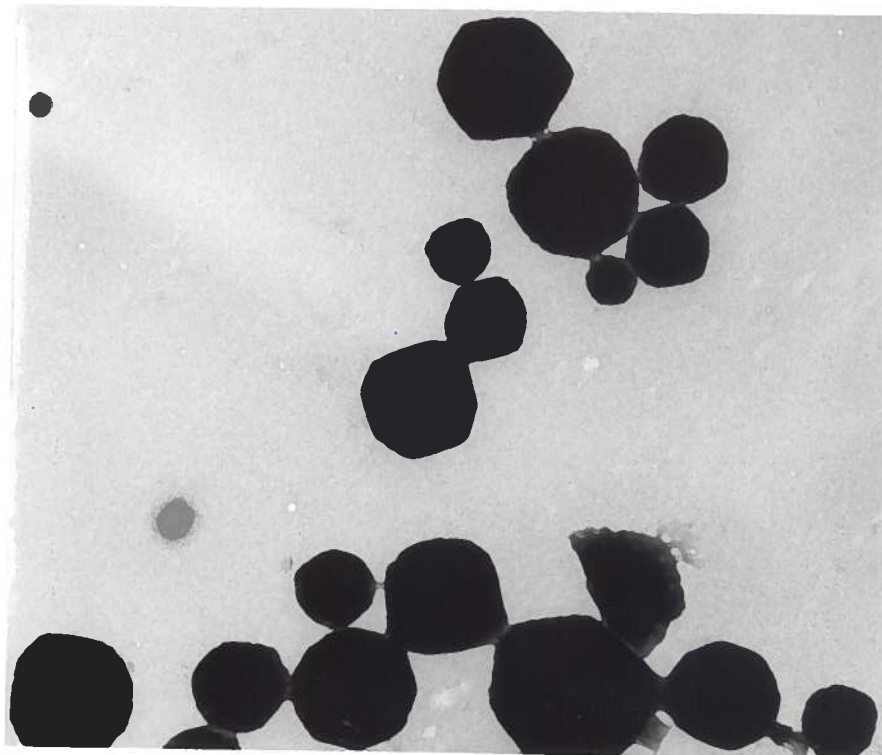


FIGURE 5: Microphotographie électronique des polyèdres purifiées en coupes ultraminesces.

Les polyèdres ont été fixées avec la glutaraldéhyde et colorés avec une solution de 5% d'acétate d'uranyl dans du méthanol suivi d'une coloration au citrate de plomb. La présence des polyèdres de forme et taille variables peut être observée. (a) Hexagonal, (b) Polygonal, (c) Rectangulaire, (d) Sphéroïde

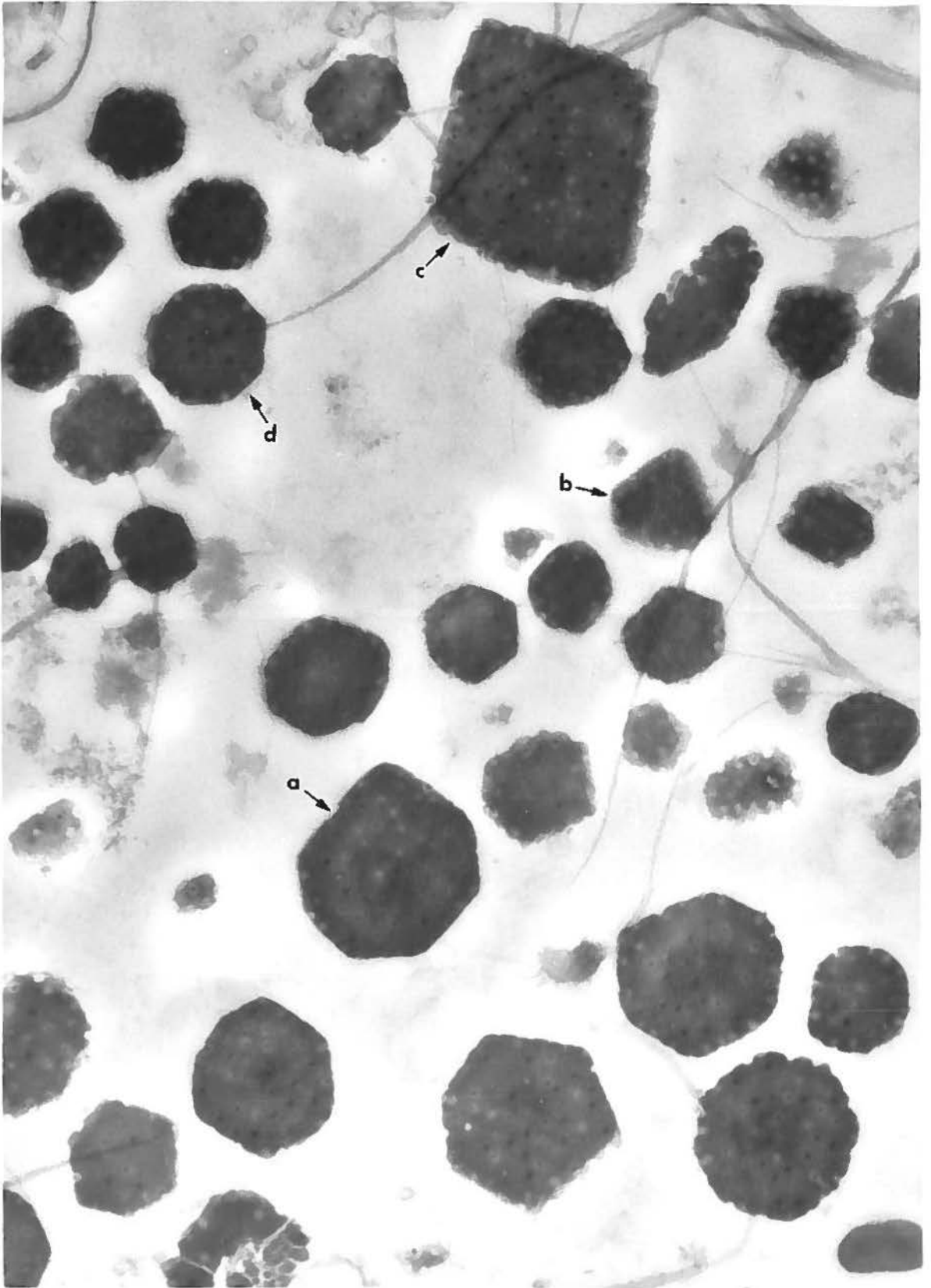


FIGURE 6: Microphotographie électronique montrant un premier plan des coupes ultraminesces des polyèdres purifiés.

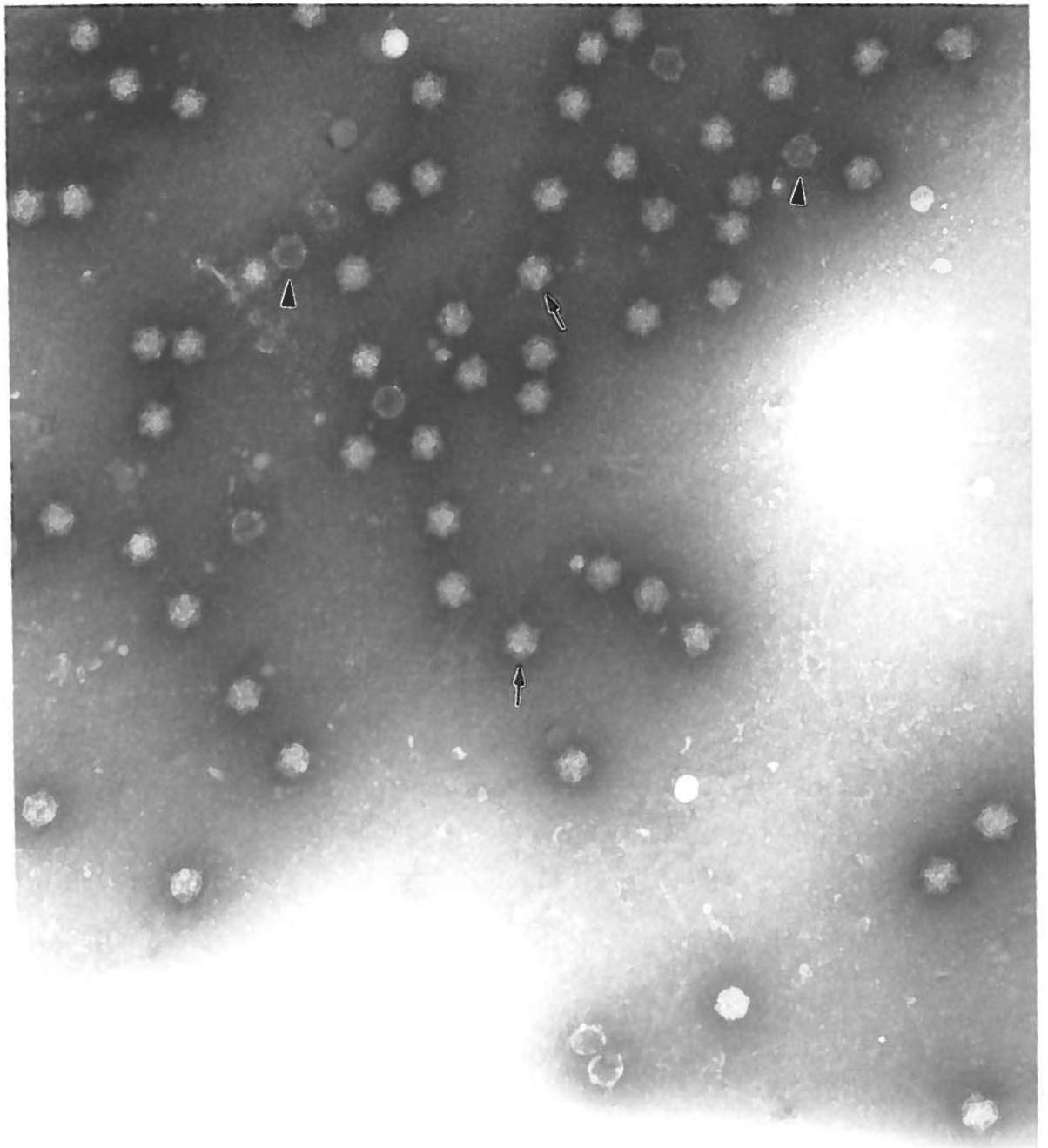
On peut observer l'inclusion d'un nombre aléatoire de particules virales dans la matrice cristalline. P = polyèdre, V = virus inclus, T = structure en treillis (Matrice cristalline).

Grossissement X 90 000.



FIGURE 7: Microphotographie électronique de particules du CfCPV purifiées sur gradient de saccharose.

Les particules virales ont été libérées des polyèdres par traitement alcalin puis colorées négativement avec l'acide phosphotungstique. Les flèches montrent des particules virales où on peut observer les spicules émergeant des virus. Les têtes de flèche montrent des particules virales vides. Grossissement X 66 600.



2- CLASSIFICATION DU CfCPV

Les cypovirus ont été classés provisoirement sur la base de la mobilité relative de leurs différents segments génomiques (électrophorétype). Dans le but de déterminer à quel électrophorétype fait partie le cypovirus de *Choristoneura fumiferana*, la mobilité relative de ses 10 segments génomiques a été déterminée. Les masses moléculaires déterminées pour BmCVP (Fujii-kawata *et al.*, 1970) ont été utilisées comme référence. Les ARN génomiques purifiés ont été séparés sur gel de polyacrylamide à 10% (Figure 8a) et à 3% (Figure 8b) puis colorés avec du bromure d'éthidium. Les gels ont été photographiés avec une caméra de type polaroid, afin d'être analysés à l'aide du programme "ID Image Analysis Software" (Kodak Digital Science™). La comparaison du profil électrophorétique du CfCPV avec ceux proposés par Payne et Rivers (1976) pour d'autres cypovirus, révèle une très grande similitude avec l'électrophorétype 7. Malheureusement, la souche type de l'électrophorétype 7 n'était pas disponible dans notre laboratoire. La masse moléculaire des différents segments du cypovirus de *Noctua promuba* (NpCPV) (une des souches de l'électrophorétype 7) a donc été déterminée à partir des résultats publiés par Payne et Martens (1983) et analysée avec le programme "ID Image Analysis Software" (Kodak Digital Science™). L'étude des résultats présentés à la Figure 8d montre qu'un seul segment génomique diffère entre le CfCPV et le NpCPV. Selon ces résultats la souche CfCPV pourrait être classée dans l'électrophorétype 7 de l'actuelle classification, mais la comigration du CfCPV et du NpCPV dans le même gel serait indispensable pour confirmer ces observations.

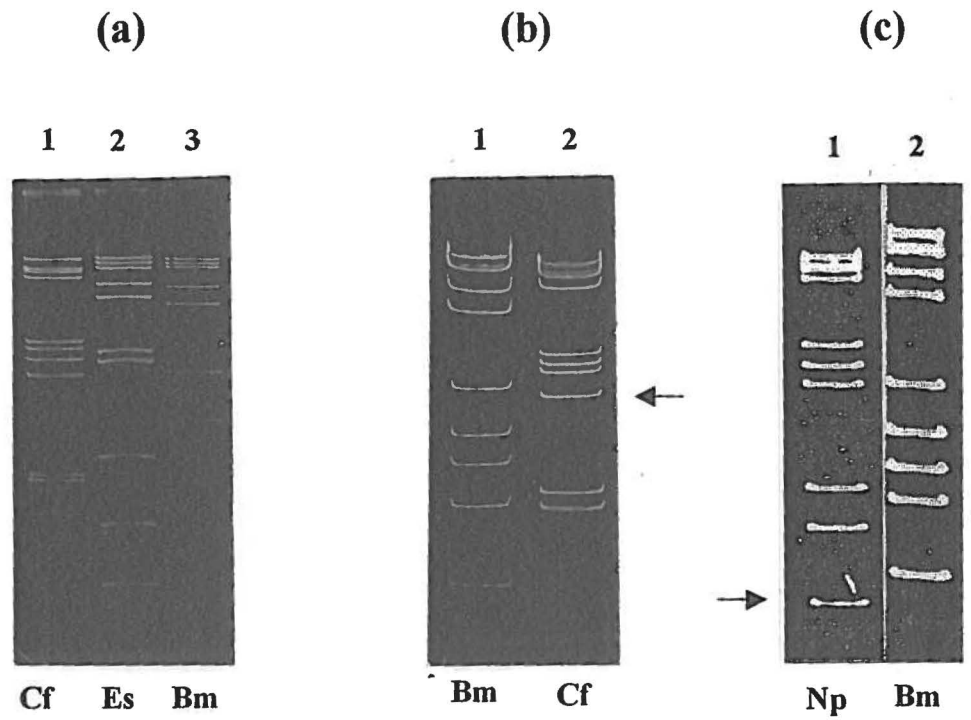
FIGURE 8: Détermination de la masse moléculaire des segments d'ARN génomique de 4 cypovirus séparés sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Laemmli *et al.*, 1970).

(a) Séparation sur gel de 10% d'acrylamide et coloration au bromure d'éthidium de trois Cypovirus. Puits 1, CfCPV; puits 2, EsCPV; puits 3, BmCPV.

(b) Séparation sur gel de 3% d'acrylamide et coloration au bromure d'éthidium du BmCPV (puits 1) et CfCPV (puits 2).

(c) Séparation par SDS-PAGE en gel de 3% d'acrylamide et coloration au bromure d'éthidium de la souche NpCPV (électrophorétype 7) (puits 1) et BmCPV (puits 2) (modifié de Payne et Mertens, 1983). Les flèches montrent les segments ayant une mobilité relative différente entre CfCPV et NpCPV.

(d) Masse moléculaire des ARN génomiques des Cypovirus de type 1, 5, et 7. Les masses moléculaires indiquées pour CfCPV représentent la moyenne des valeurs calculées à des concentrations de 10% et 3% d'acrylamide. (1) Masses moléculaires calculées pour BmCPV selon Fujii-Kawata *et al.*, 1970 et utilisées comme standards. (2) Masses moléculaires calculées à l'aide du programme Kodak "ID Image Analysis Software"



(d)

Segment	BmCPV ¹	EsCPV ²	CfCPV ²	NpCPV ²
	x 10 ⁶ dalton			
1	2.55	2.50	2.44	2.42
2	2.42	2.41	2.34	2.31
3	2.32	2.32	2.26	2.26
4	2.03	2.10	2.15	2.14
5	1.82	1.92	1.42	1.43
6	1.12	1.34	1.30	1.30
7	0.84	1.24	1.25	1.13
8	0.62	0.65	1.13	0.61
9	0.56	0.41	0.60	0.50
10	0.35	0.27	0.55	0.31

3- CLONAGE DU GÉNOME DU CfCPV

Au début de ce travail, aucune information sur la biologie moléculaire du cypovirus de *Choristoneura fumiferana* n'était disponible. Cependant, la séquence en nucléotides du gène codant pour la polyédrine de quatre autres cypovirus avait été déterminée. L'analyse de ces dernières a démontré l'absence d'homologie entre les virus classés dans différents électrophorétypes. Dans le but de caractériser le génome du CfCPV et afin de mieux situer ce virus par rapport aux autres cypovirus et autres virus membres de la famille des *Reoviridae*, nous avons étudié plus en détails le gène codant pour la polyédrine (segment 10) de même que les gènes codés par les segments génomiques 9, 8 et 5. Cette étude nous a permis par la suite de développer des outils moléculaires permettant de suivre l'infection virale naturelle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

3.1- Synthèse, clonage et séquençage des ADNc

Le clonage du génome viral du CfCPV a débuté avec la purification des segments génomiques à partir de polyèdres purifiés ou directement à partir des broyats des larves infectées (Figure 9). Les segments 4, 5, 8, 9 et 10 ont été purifiés individuellement, tandis que les segments 1, 2 et 3, de même que les segments 6 et 7, ont été purifiés ensemble étant donné l'impossibilité de les séparer adéquatement sur gel d'agarose. Le génome complet ou les segments purifiés ont été utilisés pour la synthèse des ADNc selon l'une des deux stratégies illustrées à la Figure 10. Les ADNc obtenus ont ensuite été clonés dans un vecteur procaryotique (pIBI31 ou pCRTMII), puis identifiés par hybridation ARN:ADN. Des membranes de nylon contenant les génome viral complet ont été hybridées avec différents clones préalablement marqués au ³²P.

FIGURE 9: Purification des segments génomiques du CfCPV.

Électrophorèse sur gel d'agarose des segments génomiques du CfCPV purifiés individuellement. Après séparation sur gel d'agarose 0,8%, les différentes bandes ont été découpées du gel et les ARN génomiques bicaténaires ont été purifiés par la méthode du Trizol. Ensuite, les segments purifiés ont été analysés séparément dans les mêmes conditions électro-phorétiques. Génome complet, puits 2; segments 1, 2, et 3 (purifiés ensemble) puits 3; segment 4, puits 4; segment 5, puits 5; segments 6 et 7 (purifiés ensemble) puits 6; segment 8, puits 7; segment 9, puits 8; segment 10, puits 9. Le marqueur de taille moléculaire 1 kb est montré à gauche (puits 1).

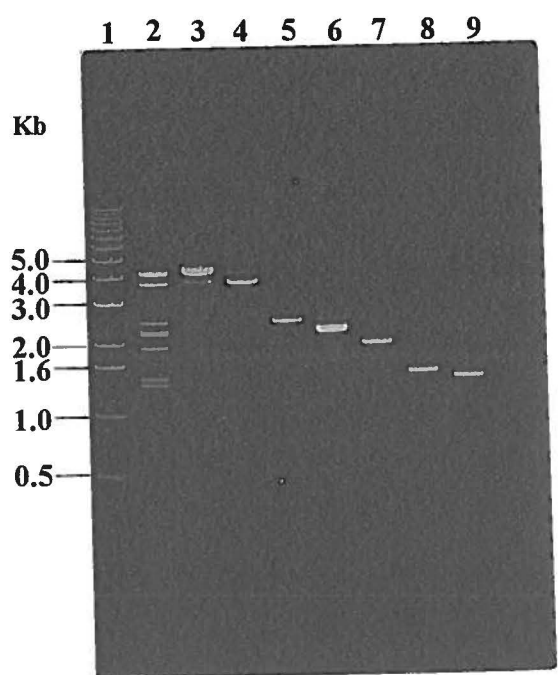
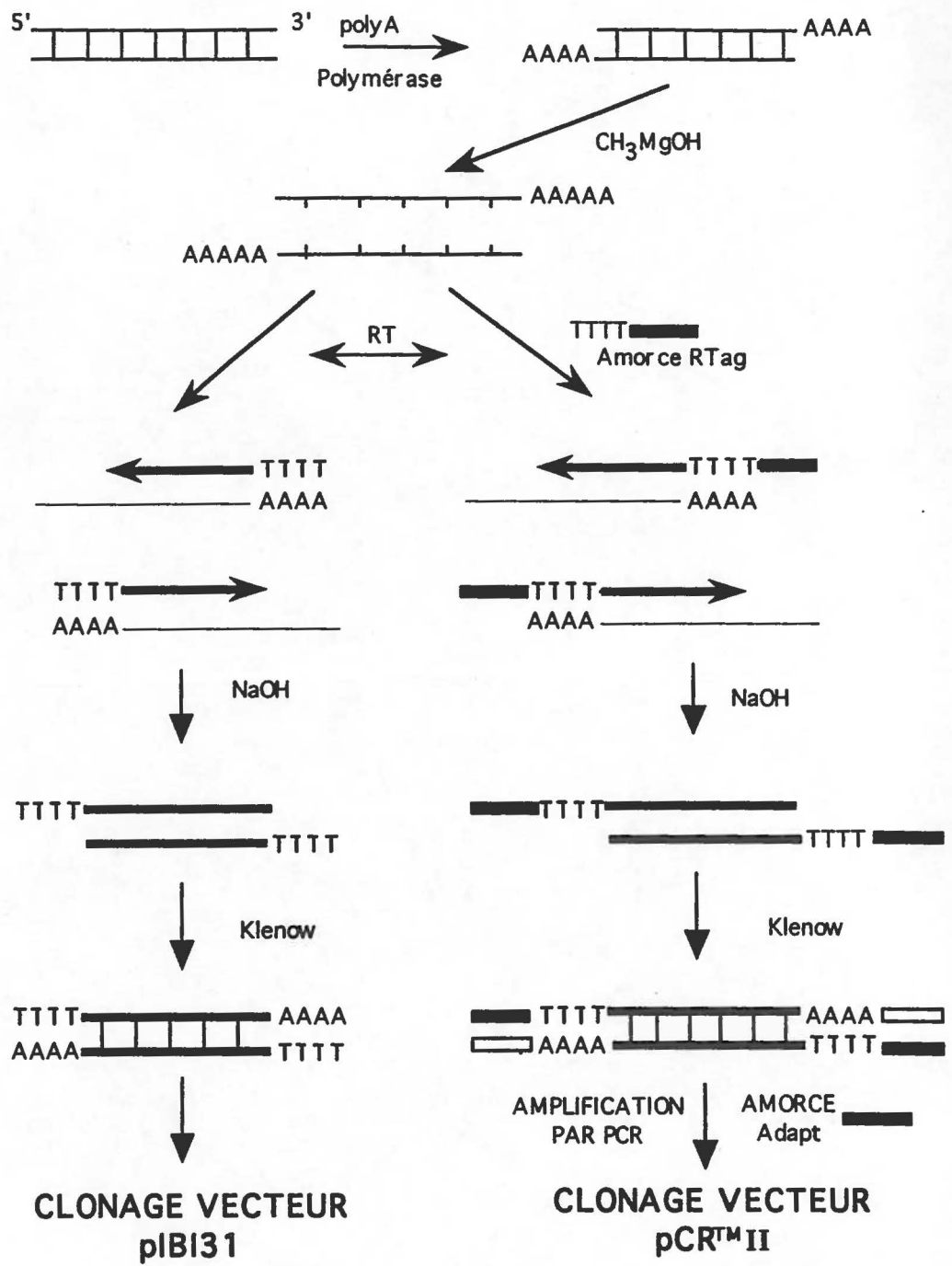


FIGURE 10: Stratégies utilisées pour le clonage du génome du CfCPV.

L'ARN génomique est représenté schématiquement. L'amorce "Rtag" [GGGTCTAGAGCTCGAG(T)₁₇] a été utilisée pour la synthèse des ADNc et l'amorce "Adapt" (GGGTCTAGAGCTCGAGT) a été utilisée pour l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette méthodologie a été suggérée et supervisée par le Dr Jean Bergeron du laboratoire du professeur Peter Tijssen.



La Figure 11 montre certains des clones spécifiques aux différents segments génomiques obtenus. Des clones contenant les extrémités 3' ont été obtenus en utilisant la méthode d'amplification "RACE". Nous avons amplifié ces régions à partir du génome viral en utilisant une amorce "Rtag" pour la synthèse du premier brin d'ADN, qui a ensuite été amplifié par PCR en utilisant comme amorces un oligonucléotide contenant la séquence directe du brin (+) ainsi que l'amorce Adapt.

La séquence complète des segments 10, 9, 8 et 5 a été déterminée. Des séquences partielles pour les segments 4 et 6 ou 7 (les segments 6 et 7 n'ont pas été séparés individuellement et un seul clone a été identifié par hybridation) ont aussi été obtenues.

3.1.1- Séquençage du segment 10

Deux clones bactériens contenant des séquences du segment 10, ont été identifiés par hybridation de type Northern. La séquence complète de ces deux clones a été déterminée dans les deux directions. D'abord les séquences obtenues en utilisant l'amorce universelle et l'amorce inverse de séquençage ont été utilisées pour la synthèse des oligonucléotides qui ont permis l'obtention de la séquence complète de ces clones. L'utilisation du protocole RACE a permis d'obtenir des clones contenant la séquence 3' complète du segment 10. La Figure 12a représente la stratégie de séquençage utilisée. Un clone contenant la séquence complète du segment 10 (CfCPVg10) a été reconstitué par ligation d'un fragment contenant la portion 5' terminale (530pb) et d'un autre correspondant à la portion 3' terminale (641pb) tel que représenté à la Figure 12b. La séquence nucléotidique complète du clone CfCPVg10 est de 1171 nucléotides. La Figure 13 présente la séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au brin positif du segment 10 du CfCPV. Un seul cadre de lecture ouvert (ORF) a été trouvé, débutant avec le codon d'initiation ATG à la position 34-36 et terminant avec le codon de terminaison TAA à la position 808-810. Cet ORF peut coder pour une protéine ayant une taille estimée à 29 795 daltons, ce qui est en accord avec la taille de 30,5 kDa observée par SDS-PAGE pour la polyédrine du CfCPV.

FIGURE 11: Transfert de type Northern et identification des clones positifs par hybridation ARN:ADN.

Après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose, les ARN génomiques dénaturés ont été transférés sur membrane de nylon et hybridés avec des sondes spécifiques obtenues à partir des clones marqués au ^{32}P . L'ARN génomique a été hybridé avec une sonde d'ADNc obtenue par transcription inverse du génome viral complet en utilisant des amorces aléatoires, puits 1 (contrôle positif pour le transfert de l'ARN génomique). Clones spécifiques obtenus pour les segments 1 à 10, puits 2 à 10 respectivement. Un seul clone spécifique au segment 6 ou 7 a été identifié (puits 7).

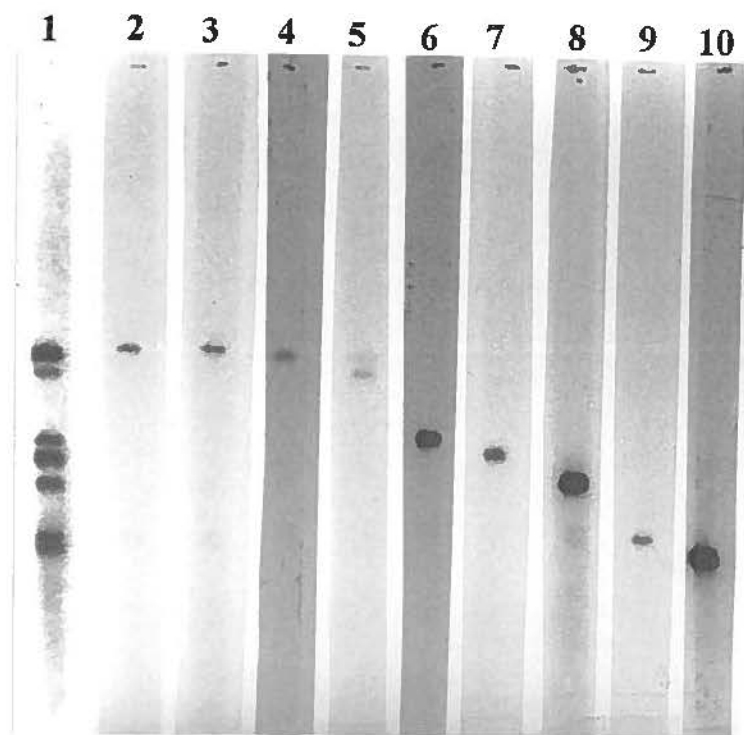
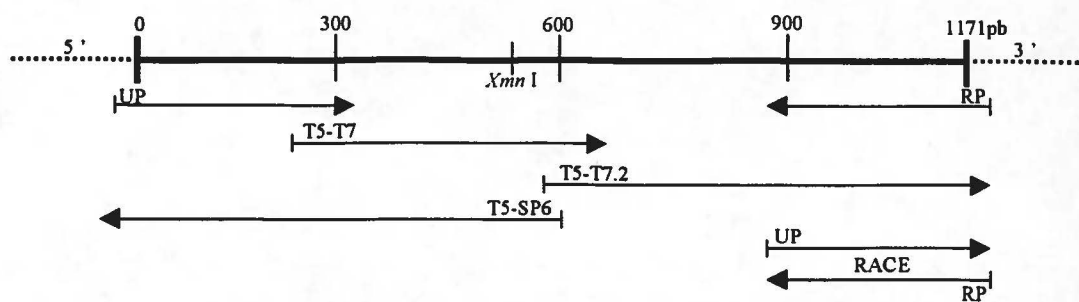


FIGURE 12: Stratégies utilisées pour le séquençage et l'obtention d'un clone contenant la séquence complète du segment 10 du CfCPV.

(a) Les fragments séquencés en utilisant des amorces spécifiques sont illustrés par des flèches indiquant la distance et la direction du séquençage.

(b) Le fragment *Xba* I-*Xmn* I du clone pCRTMII-T5 contenant les 530 nucléotides de l'extrémité 5' du segment 10, le fragment *Xmn* I-*Hind* III du clone pCRTMII-R2 contenant les 641 nucléotides de l'extrémité 3' du segment 10 et le vecteur pCRTMII coupé avec les endonucléases *Xba* I et *Hind* III ont été ligués ensemble pour donner le clone CfCPVg10 contenant la séquence complète du segment 10 du CfCPV.

(a)



(b)

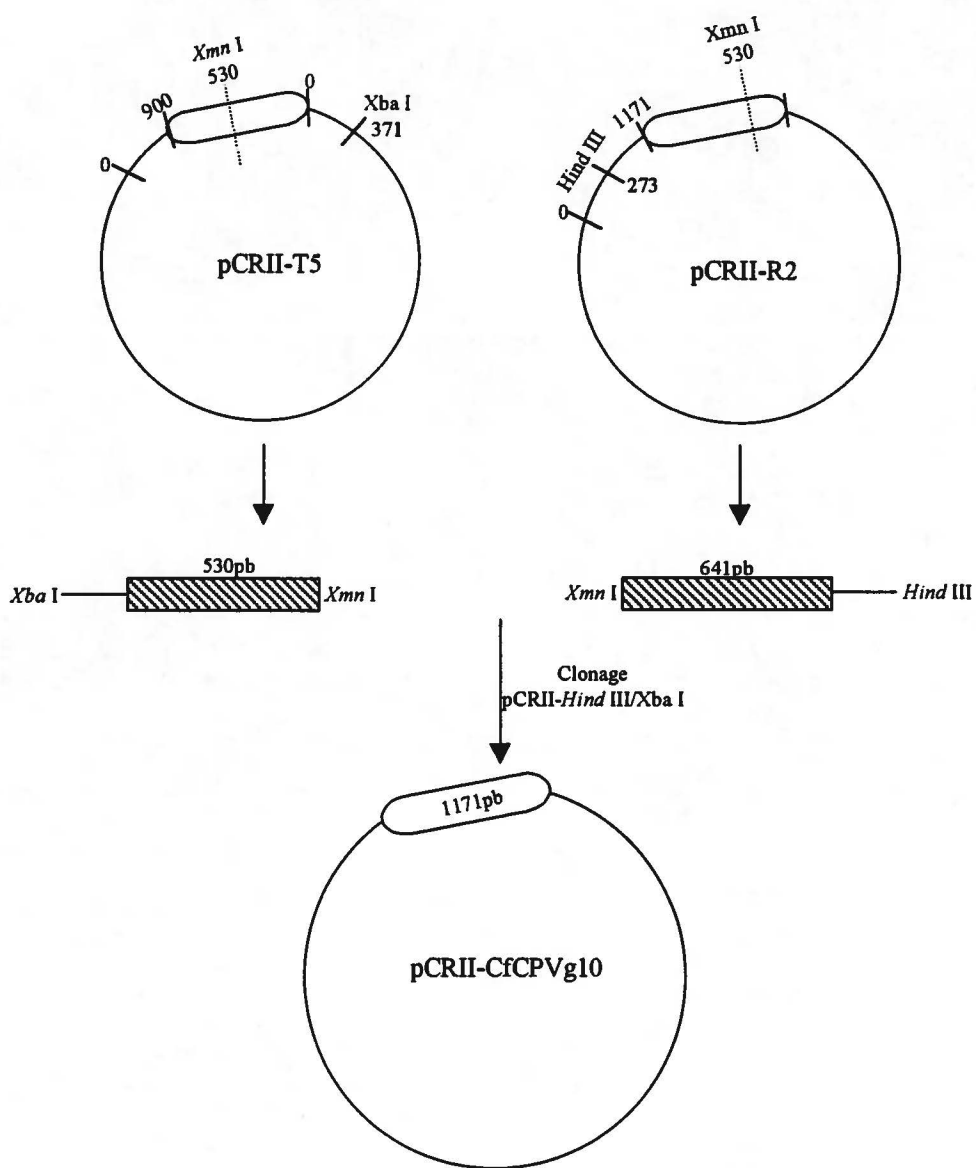


FIGURE 13: Séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au brin positif du segment 10 du CfCPV.

La séquence prédite en acides aminés est représentée en dessous de la séquence nucléotidique. Les codons d'initiation et de terminaison sont soulignés par des traits simples et les sites potentiels de N-glycosylation sont doublement soulignés. La séquence des deux brins a été déterminée à l'aide d'un séquenceur d'ADN automatique (A.L.F. Pharmacia). L'analyse de la séquence obtenue a été réalisée à l'aide des logiciels Geneworks version 2.4 (IntelliGenetics) et MacVector version 4.5.0 (Eastman Kodak). Cette séquence a été déposée dans le "GenBank nucleotide sequence database" et son numéro d'accèsion est le U95954.

AGTTTTTTTTTCGCTTACGACAGTACGCTTGATAATGCCTTACGAGAGAGA 50
M P Y E R D

TTGCTTAGACAATGATGTGCGCCTACGCGCACAGAATTTACGAACTCATG 100
C L D N D V R L R A Q N L R T H E

AAATTAACCTTGCACCTTATGTACCAGGCGCAACTCTGCGCGCTGACATA 150
I N L A P Y V P G A T L R A D I

ATTGCTAAATACCCCGACGGACGTTATAAAGTGTTTGATTTTACCGCTCC 200
I A K Y P D G R Y K V F D F T A P

TAACTTTATTAAGGGAGTGATTAGTTATAAGGAATTCGCGTGGCATTATG 250
N F I K G V I S Y K E F A W H Y G

GCCATACGTATGATAATGATGATCAACTTGATGATCATAATGCTAACACT 300
H T Y D N D D Q L D D H N A N T

TTCAATAATGTTACACTTGCTAACTCTGGAAGCACTAACCCACCTCGTGA 350
F N N V T L A N S G S T N P P R D

TATTACCTATCCTGAAACCGTTATGATCGTGCTAAACGGAAATTTCAATA 400
I T Y P E T V M I V L N G N F N I

TTGCCAGTGTGCGTGCCTTCCCGGTCAATCAGTATGGGCTAACCCATAAG 450
A Q C R A F P V N Q Y G L T H K

GATTGGCGTCTGTACGCAATAACTCACCTGACCCTATCCACAATTGCCA 500
D W R L S R N N S P D P I H N C Q

ATGGACGCCGATTGGATGCTATTTCGAACTTCTTCGTTATGAAGTTTAACC 550
W T P I G C Y S N F F V M K F N Q

AGCGCGAGGGATTGCGCTTCATTCTGCCTGCATGTTCTGACTCTGCCTAC 600
R E G L R F I L P A C S D S A Y

AATCAATATAATAGTGGTACACTAGCCGAAATCATTTGGGAGACGGTTAA 650
N Q Y N S G T L A E I I W E T V K

ACACAAGACTGTTAAATGGTTTACTGGTGAGCGTCAGGCTATTAAGTGGT 700
H K T V K W F T G E R Q A I N W F

TCACTCAAAGAATCTTGCGTATCCCGATTCTGCTAATTTTATAGCTTCA 750
T Q K N L A Y P D S A N F I A S

CGCGCTGAAGCTAATTATATTGGTAATGGTAATTTCTCTGACCCGAGCAG 800
R A E A N Y I G N G N F S D P S R

ATATTACTAAACAAATTGAAATGGCTGACGATCTATGATTTATGAATGA 850
Y Y

GTGAGTTCGCCATCACTATATTCATAAATCAACAGCGACACATCTACCTC 900

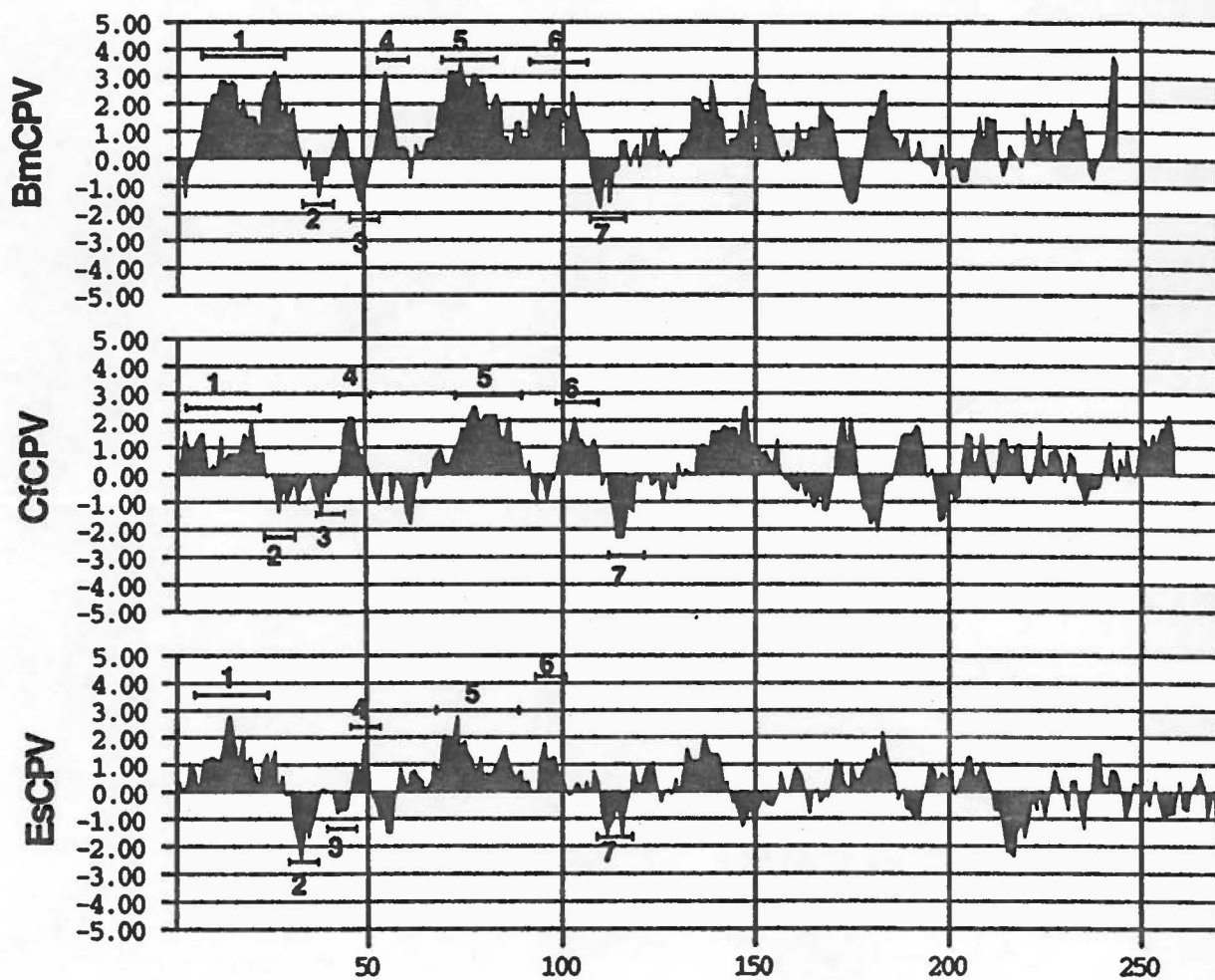
FIGURE 13 (suite)

*ACACAT**TGAAT**GCGATATAAACATGTTTATATCATGTTTT**GATGTTAACT* 950
*ATAATTAGT**GCGAGT**CAGTATCTATCATATTAACACGAATATTGTGTATC* 1000
*TACATATTTATGCTTATATGTCATTTTCCTAT**TAGATA**AAGGTTATTAATG* 1050
ATTCGTAATTCTGCGCCTTACGGGACGCCTCTATCTCTTAAGGTCCTTCA 1100
*TGGTGACCCT**TGAACA**AAGTCTAGTACTGCCTACCGAAATGGGCGGGAAG* 1150
AATAAGCGAAATTATTTGTGC 1171

Deux sites potentiels de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) ont été identifiés dans la séquence: le premier à la position 92-94 et le second à 250-252. La protéine est relativement abondante en résidus tyrosine (8,8%), aromatiques phénylalanine (7,4%) et tryptophane (3,8%) de même qu'en acides aminés basiques arginine (8,4%) et lysine (4,3%). Aucune homologie n'a été retrouvée entre la séquence en nucléotides et en acides aminés du gène codant pour la polyédrine du CfCPV et celle d'autres cypovirus. En effet, lorsque la séquence en nucléotides de la polyédrine du CfCPV a été comparée avec celle de la polyédrine de BmCPV et EsCPV seul un très faible pourcentage de similitude a été observé (23% et 20% respectivement). Malgré le peu d'homologie au niveau de la séquence nucléotidique des 3 cypovirus, des similitudes ont été observées au niveau des profils d'hydrophilicité. La portion N-terminale des polypeptides (acides aminés 1 à 116) montre des régions ayant des profils d'hydrophilicité et d'hydrophobicité similaires où sept régions précises ont été identifiées (Figure 14). Ces régions sont localisées approximativement à la même position pour chaque virus et leur structure secondaire présente beaucoup de similitude (Tableau 4). L'analyse de la structure secondaire de la polyédrine des trois cypovirus (CfCPV, BmCPV et EsCPV) par les méthodes de Chou-Fasman et de Robson-Garnier en utilisant le logiciel Mac Vector, suggère que les trois protéines sont riches en structures de type feuillets β et en tours β (Tableau 4).

FIGURE 14: Profils d'hydrophilicité calculés pour les Cypovirus CfCPV, EsCPV et BmCPV.

La séquence complète de la polyédrine des trois cypovirus est représentée sur cette figure. Les valeurs indiquées en ordonnée représentent l'hydrophilicité relative des acides aminés selon l'échelle de Kyte et Doolittle (1982). Le signe des valeurs a toutefois été inversé par rapport à la méthode de calcul original de façon à obtenir les pics d'hydrophilicité vers le haut. Les traits indiquent les régions hydrophiles et hydrophobes communes aux 3 virus dans la portion N-terminale de la protéine. Les séquences de BmCPV et EsCPV ont été obtenues d'Arella *et al.* (1988) et Fossiez *et al.* (1989) respectivement



Acides aminés de la polyédrine

TABLEAU 4

Comparaison entre la position, le caractère hydrophatique et la structure secondaire des sept régions de similarité communes à la portion aminoterminale de la polyédrine du CfCPV, du EsCPV et du BmCPV

Région dans la polyédrine ^a				
EsCPV ^b	BmCPV ^b	CfCPV	Caractère hydrophatique ^c	Structure secondaire prédite
9-26	8-31	3-32	hydrophile	tours ^d
31-37	36-41	26-33	hydrophobe	feuille- β ^e
42-45	47-51	35-41	hydrophobe	feuille- β
46-51	52-58	43-49	hydrophile	tours ^f
67-99	69-85	71-89	hydrophile	tours+hélice α
94-100	93-105	98-109	hydrophile	tours
110-116	109-116	111-116	hydrophobe	feuille- β

^aPosition de l'acide aminé dans la portion N-terminale de la polyédrine.

^bSéquence obtenue de Fossiez *et al.* (1989) à l'exception de la région numéro 4.

^cProfils d'hydrophilicité calculés selon l'échelle de Kyte et Doolittle (1982).

^dLa polyédrine de EsCPV et BmCPV présente aussi une faible probabilité de structure en hélice α .

^eLa polyédrine du CfCPV présente aussi une faible probabilité de structure en hélice α et en tours.

^fLa polyédrine d'EsCPV présente aussi une probabilité de structure en feuille- β .

3.1.2- Séquençage du segment 9 du CfCPV

Le clone g9-29 contenant la séquence du segment 9 a été identifié par hybridation de type Northern. La séquence complète de ce clone a été déterminée dans les deux directions. D'abord les séquences obtenues en utilisant les amorces universelle et inverse de séquençage ont été utilisées pour la synthèses des oligonucléotides qui ont permis l'obtention de la séquence complète du segment 9.

La séquence complète du segment 9 est de 1386 nucléotides (Figure 15). Un seul cadre de lecture ouvert (ORF) a été identifié débutant par le codon d'initiation ATG à la position 24-26 et terminant par le codon de terminaison TAG à la position 1026-1028. Cet ORF peut coder pour une protéine ayant une taille estimée à 38 305 daltons. Un seul site potentiel de N-glycosylation a été trouvé dans la séquence à la position 214-216. Sept résidues de cystéine ont été trouvés dans la région COOH-terminale entre les positions 206 et 333. Les résultats obtenus avec la recherche d'homologie de la protéine codée par le segment 9 du CfCPV sont présentés au Tableau 5. Des homologies localisées avec l'ARN polymérase dépendant d'ARN du virus "Rice ragged stunt virus" et l'ARN polymérase (ORF 1A) du coronavirus humain ont été observées.

FIGURE 15: Séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au brin positif du segment 9 du CfCPV.

La séquence prédite en acides aminés est représentée sous la séquence nucléotidique. Les codons d'initiation et de terminaison apparaissent en caractères gras et soulignés, alors que les régions 5' et 3' non codantes sont indiquées en caractères italiques

AGTTTTTAATTCAAAGTCAGGTAATGAAACCCATCTCAGCTGCAGAATTA 50
M K P I S A A E L

AATAGCCTTGAGAAACAAGTAAACGAACGCTTAATAGACCGAAAGGTTTT 100
N S L E K Q V N E R L I D R K V L

ATTCAATTTTATCAAGAACGGTGCCTCGCCCGTTATTGCAAAGAAATATA 150
F N F I K N G A S P V I A K K Y T

CGTTAACAGAATTACGCAATCAAATATTTAGAGGTGATACACGATTTGGG 200
L T E L R N Q I F R G D T R F G

CAGTATGAGACTAGTTTCTATATACCCAATGAAGTTATCACCCACCAAA 250
Q Y E T S F Y I P N E V I T P P K

ATTTGACTGGAATCTTTACGCTCTTAACCCTAACAAGACTGATTTTCAGC 300
F D W N L Y A L N P N K T D F Q Q

AACCTGTTCAAGTATAGTTATATGCCACATTTAATCTTAAAACATTCAGC 350
P V Q Y S Y M P T F N L K T F T

GATCAAGAATCAAGTGCCCCACTACCACAATTATATACTAGGTAAAGGAA 400
D Q E S S A P L P Q L Y T R L R K

ATTCTTCTTTCAGGACCAGATTCAAACACGCGGTGGTGACATTTGGAGGA 450
F F F Q D Q I Q T R G G D I W R N

ATCTGGCCGGTGTGTTGCACGCGTGTGATCTGCACAGTGGTACAGAAGAC 500
L A G V L H A C D L H S G T E D

TACCCATTAAGGATACTGATACGCGCACTATTACACGATTTTGATTCATT 550
Y P L R I L I R A L L H D F D S F

TCCGTTTTATCGTTCGGGTGAACAGTTCAAGTTTGACAACGAAGACACCT 600
P F Y R S G E Q F K F D N E D T L

TGTC AATATTTCCACTTATCATATATATGATATCAAGTTGCCTTGGTGAC 650
S I F P L I I Y M I S S C L G D

GTGTGTATAGGTAACGCATCACATATCGAGTCGATCGTTACAATATCGAC 700
V C I G N A S H I E S I V T I S T

GTATTTATCCTTCTGTACAGGATCACTACTGGACGCTCAACTTAAAAATC 750
Y L S F C T G S L L D A Q L K N Q

AAAAGAAATTCTTATCATCATTTC AATACGACGTTCTACGTCTTGGCCAG 800
K K F L S S F Q Y D V L R L G Q

GTTAAGTGCCCCATATTCGGTATAAACGGGTTATTC ACTGGTGTGAGATT 850
V K C P I F G I N G L F T G V R L

FIGURE 15 (suite)

GAGATCATCAAGTGAACCCAGTCACCGATTTACTCGAGCCCAATATCTA	900
R S S S E P Q S P I Y S S P I S I	
TAAGGATACACCCTGTCCAACACTACTGTTGCCTTCATTGATTTTCGCTAGAG	950
R I H P V Q L L L P S L I S L E	
CGCGATCAAAAACACTATTGAGGATCTACTTTATTTGCAGTCATTATGTCGA	1000
R D Q K L L R I Y F I C S H Y V D	
CAATTCGGGAATACAAGGTTGTATTTAGTCTCAATCCCGGAGCTCAGCAG	1050
N S G I Q G C I	
GGTAAAGGGATCACAAACRCGCATAGAACAATTACAAGTCCAACCTCCTA	1100
TCCAATCGCAAAAACATCAGACAATCAACCATACAAATTCGAAGTCCCG	1150
ATAACGTCAACTCTAGCACCAACCTCAAAGTATCTCTCGCTCTTCGAGAG	1200
TACTATCTCAAACGATTTTRCGAGATCTACACTTCAACAGCGAACTGATAT	1250
TCCATTATACCACTAGATCAGGAGGTCGTAAAGTAGGCTCGGATATTGCA	1300
ATTCCATCATCTAATCCTCTCTTCACACGCGTGCAACACACCAAGCCGAA	1350
TTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTGTGC	1386

TABLEAU 5
Recherche d'homologie pour la protéine codée par le segment 9 du CfCPV

Comparaison		Séquence*	aa Identique (%)	Similarité (%)
CfCPV S9 vs RNA polymérase dépendant d'ARN du "Rice ragged stunt virus"	32	KVLFNFIKNGASPV 46 ++LF++I + A P+	36	79
	44	ELLFSYITD-AEPL 58		
	51	QIFRGDTRFGQYET-SFYIPNEVITPPKFD 88 ++F G G T +F +P+ V PP +D	33	53
	71	EVFVGPDICGNCITHTFRVPDYVAKPPPYD 100		
	159	HSGTEDYPLRILIR 172 ++ T+ L L++	21	57
	170	NNSTQSPNLNNLVK 183		
	195	FKFDNEDTL-SIFPLIIYMISSCLGDVCIGN 225 F ++ E + +I PL++Y I + + C G	29	55
	207	FVWEEEVSCPTILPLLLYSIQNLVTFQFCAGV 237		
	244	DAQLKNQKKFLSSFYQDVLRGQVKCPIFGINGLFT 279 D +L+ QK + + + + ++ P + ++G+ +	16	53
	259	DEKLRLQKLIRNWLREGLAKFSKIAMPNWTVSGVIS 294		
CfCPV S9 vs l'ARN polymérase (ORF1A) du coronavirus humain	42	PVIAKKYTLTELNRNQIFRGDTRFGQYETSFYIPN 75 PV + + + + IFRG G Y+T+ Y N	32	50
	1181	PVNPVSFVVKPVCSSIFRGAVSCGHYQTNIYSQN 1214		
	97	DFQQPVQYSYMPFNLKTFDQES 120 D+ V+ S P N T +E	29	42
	1242	DYNAKVEISVTPIKNTVDTPKEE 1265		
	127	LYTRLRKFFFQDQIQTRGGDIW 148 + +L F D + GD+	23	41
	1268	VKEKLN AFLVHDNVAFYQGDVD 1289		

* Dans chaque groupe des séquences, la ligne supérieur correspond à la séquence déterminée pour la protéine codée par le segment 9 du CfCPV et celle inférieur à la séquence de la protéine servant de comparaison

(+) Acide aminé similaire

3.1.3- Séquençage du segment 8 du CfCPV

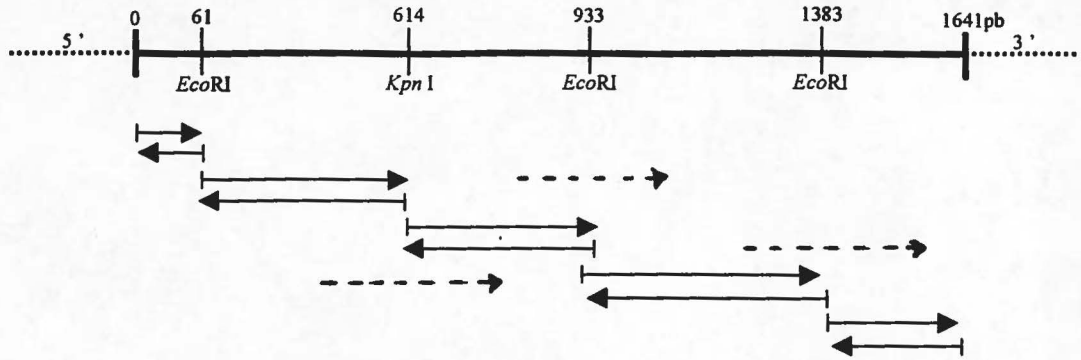
La séquence complète du segment 8 du CfCPV a été obtenue à partir de sous-clonage du clone g8.3 en utilisant des endonucléases de restriction. La Figure 16a illustre la stratégie utilisée pour le séquençage. Le clone a été traité avec les endonucléase *EcoR* I et *Kpn* I, et les fragments obtenus ont été reclés. Leur séquence a ensuite été déterminée dans les deux orientations en utilisant les amorces universelle et inverse de séquençage. La séquence au niveau des jonctions entre les fragments a été vérifiée par séquençage à l'aide d'amorces spécifiques synthétisées à partir des séquences obtenues lors de la première étape et situées à proximité de la région à vérifier. L'extrémité 3' a été complétée en utilisant la méthode RACE. La Figure 16b illustre la stratégie employée pour l'obtention d'un clone contenant la séquence complète du segment 8 du CfCPV qui est de 1641 nucléotides (Figure 17). Un seul cadre ouvert de lecture (ORF) a été retrouvé, débutant par le codon d'initiation ATG à la position 20-22 et terminant par le codon de terminaison TAA à la position 1601-1603. Cet ORF peut coder pour une protéine ayant une masse estimée à 58 744 daltons. Deux sites potentiels de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) ont été identifiés dans la séquence: le premier à la position 46-48 et le second à 478-480. La protéine est relativement abondante en résidus proline (8,0%), lysine (8,7%) et isoleucine (8,5%). La recherche d'homologie de la protéine codée par le segment 8 avec la banque de données GenBank a montrée des homologies localisées avec la protéine E2A de l'adenovirus humain ("DNA binding protein") et avec la protéine riche en proline de *Caenorhabditis elegans* (Tableau 6).

FIGURE 16: Stratégie utilisée pour le séquençage et l'obtention d'un clone contenant la séquence complète du segment 8 du CfCPV.

(a) Le segment 8 est représenté par un trait où sont indiqués les sites de restriction utilisés pour le sous-clonage. Les flèches représentent la distance et la direction du séquençage. Les flèches en pointillé représentent les régions séquencées avec des amorces spécifiques.

(b) Stratégie utilisée pour l'obtention du clone pCRII-CfCPVg8 contenant la séquence complète du segment 8.

(a)



(b)

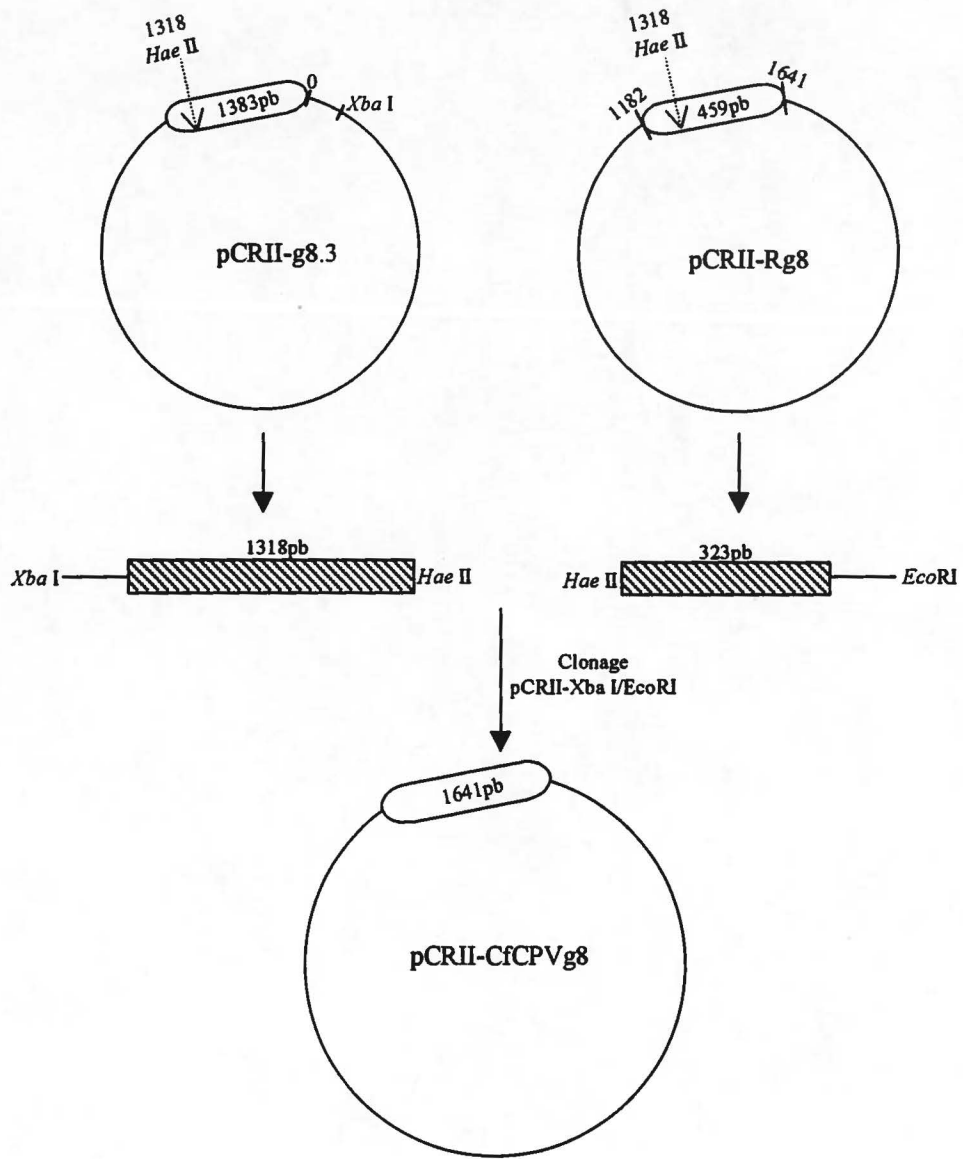


FIGURE 17: Séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au brin positif du segment 8 du CfCPV.

La séquence prédite en acides aminés est représentée sous la séquence nucléotidique. Les codons d'initiation et de terminaison apparaissent en caractères gras et soulignés, alors que les régions 5' et 3' non-codantes sont indiquées en caractères italiques.

AGTTTTTAAAGCTATAAAAAATGTTCCGTCTTAAGTGTTCGAAGACCCCTT 50
M F R L K C S K T P S

CGTCTAATGTCGTCTATATGATGACGCATGACTTTTATAACAAACATATC 100
S N V V Y M M T H D F Y N K H I

AAACCAATTGGTGCGCAAGCTCATATCACACAAACCAAACTAAAGGATAT 150
K P I G A Q A H I T Q T K L K D I

CGATAACAAATCCATACCTGTTATCAGCGACGTTTCGCAATTAGGATTTA 200
D N K S I P V I S D V S Q L G F I

TCAAGCCCTTGATCGCCGCTCATCGTGACACATATGGAACAATCAGCTAC 250
K P L I A A H R D T Y G T I S Y

AATGGCAAAGAGTATTCCAAGATGATTCTCTGTACGAGCAGCATTACTAA 300
N G K E Y S K M I L C T S S I T K

ACAAGAGAACTTAAAAATTCAATTTATCAAGCGAACGTAATACTGTTGC 350
Q E K L K N S I Y Q A N V I L L L

TGAATACAAAAGTGAAAGTATCGCCAATGGATATAGAGCATTGTGTTCCA 400
N T K V K V S P M D I E H L F P

TCGTTTATACTAACATCCGAATCATTATTATCTGAAAAAGAAGAAGCTGA 450
S F I L T S E S L L S E K E E A E

ATTCATCGCTGCTGTGCATGCCAGTATACGAGATGAGCATCAACAACCCA 500
F I A A V H A S I R D E H Q Q P T

CACTCGTAACCTCTCCTCCTTCCAATGGAGTTGAGATACTTCCTCAGGAA 550
L V T S P P S N G V E I L P Q E

ACACCATCCAATGATCAAACCTCCGAATGTCGAAGAGCAAGCAGTTGATCC 600
T P S N D Q T P N V E E Q A V D P

AAGTCTAACTGATGCTCTTAACTCACTATCAGTTACAATGGAACCTGATA 650
S L T D A L N S L S V T M E P D N

ACATAAGGACGCAGCCTCATGATGATCATCCAGTTTCGGTAGAGCATATA 700
I R T Q P H D D H P V S V E H I

CATGATGCCGATAGTTTCGCCTTTAAACGTGATCTCAGAATCGCGTCAAAT 750
H D A D S S P L N V I S E S R Q I

CCAAGTGCATGAGATGGCTCAGCCGTCGTGTACCGATACAGCAACCGAAG 800
Q V H E M A Q P S C T D T A T E A

CACCACATCTTGAGGATCCATTGAGCGATGATGAGCAGAGCGATGGTTCA 850
P H L E D P L S D D E Q S D G S

GCTCAGGTACCACCCATCGTTCCTCAAGCTACTCAGCAACGTCCATCGCA 900
A Q V P P I V P Q A T Q Q R P S H

FIGURE 17 (suite)

TCCCCACCGAAAGCTCCAAAGGTGAGAAGTGATTTTCAGACGCTTACCAC 950
 P P P K A P K V R S D F R R L P P
 CTATCAACATCCTACTTCCAAAGTATACTCAAGCACCCATCGCCACGGAT 1000
 I N I L L P K Y T Q A P I A T D
 ATAGAGATCATATTTCCAACGGAATACGATGCTTTGCATTCTGAGTCCTT 1050
 I E I I F P T E Y D A L H S E S L
 AAAATCGATTATTAAGCATCTGATCAATGACCCCACTCTTCTATTTCAGTG 1100
 K S I I K H L I N D P T L L F S E
 AATTTACCATTGAATATCGACGTGAGGAGATGGGAGAGTTGTTGTACCAC 1150
 F T I E Y R R E E M G E L L Y H
 CTGTGCGAGAATGGAATCATGTACAGTGAGGTTACTCCCACCGCAGAAGA 1200
 L C E N G I M Y S E V T P T A E D
 TAATGTGATGCTCATTACATGTAGGTTTGATCCGCTCTCAGCGTGTTCTA 1250
 N V M L I T C R F D P L S A C S T
 CCTCTGTTATGCAATTATCGCATAAGTACCTAACCGCGAAACGCTCCGAT 1300
 S V M Q L S H K Y L T A K R S D
 TATCCATTGATCGGCGCTGCTGTGAGTAATACGAAGAGATTGAGACAGGA 1350
 Y P L I G A A V S N T K R L R Q D
 TTTAGAGAGAATAAACACCTATCTTGCCGCTCATTTCGACAGTCATTCAGC 1400
 L E R I N T Y L A A H S T V I Q Q
 AAGTTGAGTTTACAGTGAGTGATGACATACCCATCATCAAATTCAGTAC 1450
 V E F T V S D D I P I I K F T D
 AATGCATCCATCACAACCCCACTCCCTTGTGTACTGGCTACATCTAAGAT 1500
 N A S I T T P L P C V L A T S K I
 ATTCTGCACATTCTTGGCGCGAGCGGTACGTGCGCACAGTACTATCGCAC 1550
 F C T F L A R A V R A H S T I A P
 CAATGTTGGCCGAGCCACTTAATACACGAAATGTACTAGCCATTCAGACA 1600
 M L A E P L N T R N V L A I Q T
TAATAACATGATATGTCAGCACATCTTTAAGTCGACACACC 1641

TABLEAU 6
Recherche d'homologie pour la protéine codée par le segment 8 du CfCPV

Comparaison		Séquence*	aa Identique (%)	Similarité (%)
CfCPV S8 vs la protéine E2A de l'adénovirus humain("DNA binding protein "	272	EQSDGSAQVPPIVPQATQQRPSHPPPKAPKVRSDFRRL 309	39	47
		E+ G+A+ PP + + PS PPP+AP + RRL		
	14	ERGRGAARRPPTMEDVSSPSPSPPPPRAPPKRLRRRL 51		
CfCPV S8 vs la protéine riche en proline du <i>C. elegans</i>	215	QPHDDHPVSVEHIH 228	42	57
		QP HP ++H H		
	80	QPPPAHPHHLQHPH 93		
	292	PSHPPPKAPK 331	50	70
		P PPP+ P+		
	139	PPPPPPRVPR 148		
297	PKAPKVRSDFRRLPPI 312	43	56	
	P+ P RS R PP+			
147	PRTPPRSPPRRPPM 162			

(*) Dans chaque groupe des séquences la ligne supérieur correspond à la séquence déterminée pour la protéine codée par le segment 8 du CfCPV et celle inférieur à la séquence de la protéine servant de comparaison.

(+) Acide aminé similaire.

3.1.4-Séquençage du segment 5 du CfCPV

La séquence complète du segment 5 a été obtenue à partir de sous-clonage du clone p74 identifié par hybridation de type Northern. Le clone p74 a été soumis à une digestion par l'exonucléase III après avoir été traité par les endonucléases *Xba* I et *Pst* I. Cette double digestion a produit une extrémité cohésive avec une saillie 5' du côté de l'insert et une extrémité cohésive avec une saillie 3' du côté du vecteur. Des clones contenant des délétions à l'intérieur de l'insert d'environ 250 pb ont été obtenus. Ces clones nous ont permis de séquencer les 1 200 premières paires de bases à l'extrémité 5' et la portion 3' terminale du clone p74, tel que représenté à la Figure 18a. Pour obtenir la séquence complète du segment 5, le clone p74 a été digéré avec les endonucléases *Sph* I et *Sau* 3A tel que illustré à la Figure 18b. Les fragments obtenus ont été re-clonés et séquencés. Les amorces universelles et inverse de séquençage ont été utilisées. Cette approche nous a permis de séquencer le clone p74 dans les deux orientations.

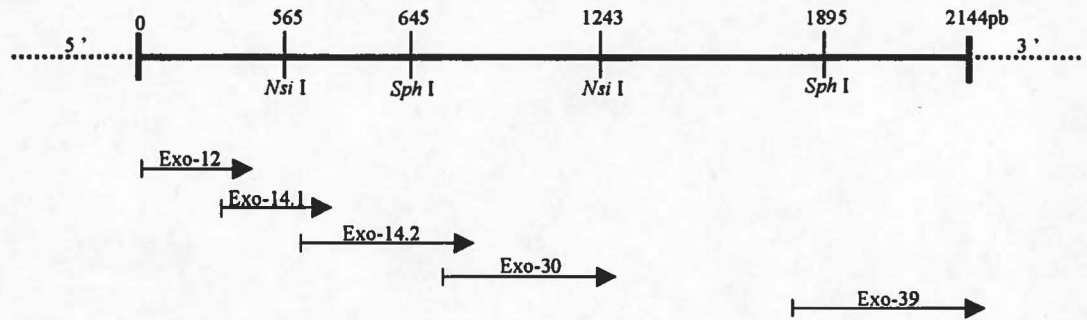
La séquence complète du segment 5 est de 2144 nucléotides (Figure 19). Comme pour le segment précédent, un seul cadre de lecture ouvert (ORF) a été retrouvé. Ce dernier débute avec le codon d'initiation ATG à la position 146-149 et se termine avec le codon de terminaison TAA à la position 2102-2104. Cet ORF peut coder pour une protéine ayant une taille estimée à 74 110 daltons. Trois sites potentiels de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) ont été identifiés dans la séquence: le premier à la position 285-287, le deuxième à la position 364-366 et un troisième à la position 437-439. Les résultats obtenus avec la recherche d'homologie de la protéine codée par le segment 5 sont présentés au Tableau 7. Une similarité de séquences a été trouvée avec la protéine codée par le segment 5 du virus "Rice ragged stunt virus"

FIGURE 18: Stratégie utilisée pour le séquençage du segment 5 du CfCPV.

(a) Le segment 5 est représenté par un trait où sont identifiés les sites de restriction utilisés pour le séquençage. Les flèches montrent les régions séquencées en utilisant des clones générés avec l'exonucléase III

(b) Le clone p-74 a été digéré avec l'endonucléase *Sph* I et les fragments obtenus ont été reclés puis séquencés dans les deux orientations. Pour confirmer la séquence dans la portion centrale, le fragment correspondant à cette région a été digéré avec l'endonucléase *Sau*3A tel que représenté dans la figure. Les flèches représentent la direction du séquençage.

(a) Digestion Exonucléase III



(b) Digestion endonucléase *Sph* I

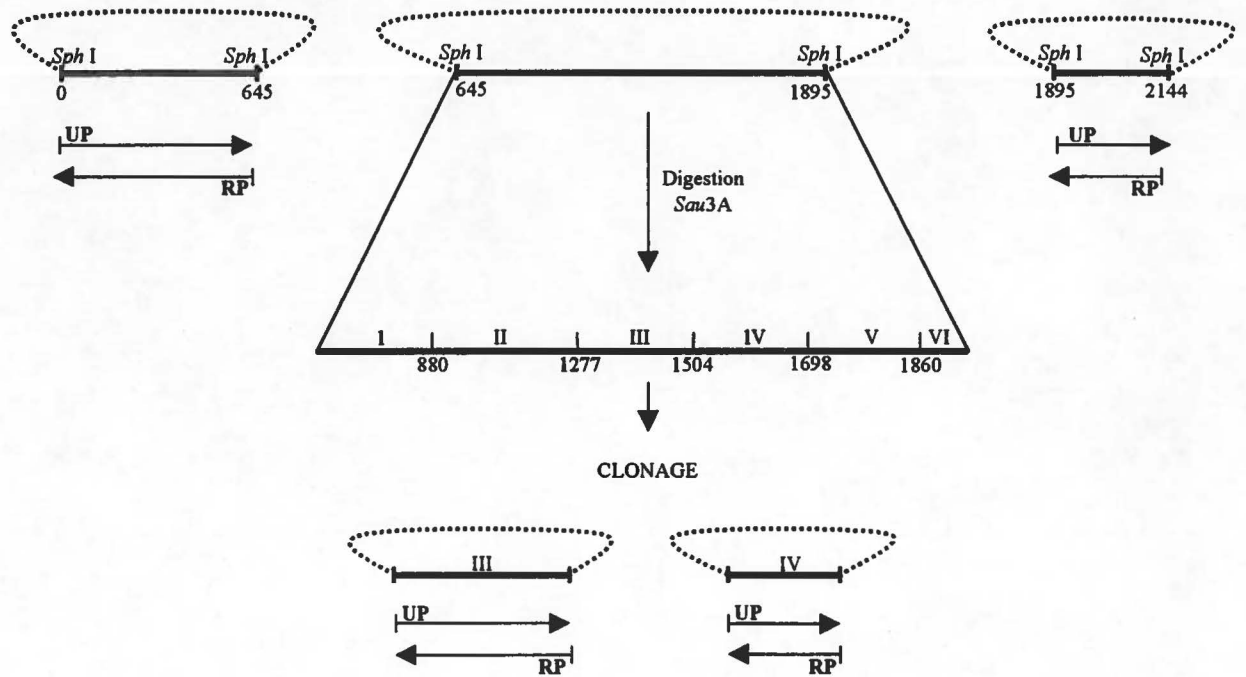


FIGURE 19: Séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au brin positif du segment 5 du CfCPV.

La séquence prédite en acides aminés est représentée sous la séquence nucléotidique. Les codons d'initiation et de terminaison apparaissent en caractères gras et soulignés, tandis que les régions 5' et 3' non-codantes sont indiquées en italiques

AGTTTAAATTGTGCTATAACATGTTCAATATTGATCAATCTGGAGACGAT 50
ATATTATCCTTCAATACCGAAACTAATGAGTGGTCCTATGTAGGAACCAC 100
TCGCTTCGAACCAATATTAATTAAGCTTGAGAAAATCTTTCTTTCATGTA 150
M Y
CATCATGGATATCGATGAAGTTAACGCTCCCATCAACTATAATCCTGCTG 200
I M D I D E V N A P I N Y N P A E
AAACCGGTCCTAGTACCAGTGGATTACAAAACGCTGCTCCAATTATACCT 250
T G P S T S G L Q N A A P I I P
GATGAATTGTATAGACAAGAAAGAGCAATTGAGTCTGTTCTCACCGCGCT 300
D E L Y R Q E R A I E S V L T A L
CACAGAGTACCTTAAACCACTCAATATACATGCTAAACATACACAACGCG 350
T E Y L K P L N I H A K H T Q R E
AATACCGAGACTATTGCCGTCAAGTTAGCGGAAGTTCAGCGACGTTGTCG 400
Y R D Y C R Q V S G S S A T L S
CTCCATACTATGGTGAGGGCGCCGTATTTACGGTACCTAGAAAGGCTTT 450
L P Y Y G E G A V F T V P R K A F
CCACAGATACAGATTTTGCGGTTTCGTATGATGGACATGAATTTATTCAAT 500
H R Y R F C G S Y D G H E F I Q C
GCCTTATTAGCAAAGGACACGTCATGGTGCCGATAGTTCAGTTGAGTCA 550
L I S K G H V M V P I V P V E S
CCTCATATATGCATATTTGGTCGGAAATGTATTGTAGCATTGAGCCAAAT 600
P H I C I F G R K C I V A F S Q M
GTGCAACATACCTACCGAGCGCTGCGAATACTTTGATGGCGCATGCACTG 650
C N I P T E R C E Y F D G A C T E
AGTACTCTGATGAGAATTTAGTGTATCTTGCTTCATTCATAGAGAGTAAC 700
Y S D E N L V Y L A S F I E S N
ATAATTGTATTTAGCGAATGCAATAATGAGATAATCAGCGTTAAACTTA 750
I I V F S E C N N E I I S V K T Y
TAATGACCCCAATACTTTATGCTTTATCACGTCGGGTGATGGCCATCCAC 800
N D P N T L C F I T S G D G H P L
TAAATCTAGTAAGAGTCAAGTCTGAACTCATTGGATTAATGTTTGAGGGA 850
N L V R V K S E L I G L M F E G
TATGGAATGATATCCTCTGATACACCCGCCGATCTACCATCAGAAGCGAA 900
Y G M I S S D T P A D L P S E A N
CAATATATTGATAACTCATATTAATTTGCGTTCACGAATGGTGTCCAAA 950
N I L I T H I N L R S R M V S K M

FIGURE 19 (Suite)

TGTTATATGATAATAGACCTTCACGTCCACGGCGTATCGATATATCGAAT L Y D N R P S R P R R I D I S N	1000
ACGTCGTCAAAGCACTTCACCCCTCATAATCAGCCCGGATTATATGG T S S K A L H P P H N Q P G L Y G	1050
ACATAAATATGATGAGGTATGGGCGACTAGGATGGTTAAACATCTCATGC H K Y D E V W A T R M V K H L M R	1100
GTCTCACATCTCAATTGTATGGAGTCACTTGTACCACAACACTTGGACAA L T S Q L Y G V T C T T T L G Q	1150
GTAAACATGCCTGGTGCGAAGTTTACTTCTCCTAATCCTTTCGAAGTCAT V N M P G A K F T S P N P F E V I	1200
AACCACAGCCGATATATCGGAATATGGTGTGAGAATGCATCGTATGAAC T T A D I S E Y G V E N A S Y E Q	1250
AACCATATCGAGTTATTAACGCTGAAGATCATTTTCGATATAGAATATCTT P Y R V I N A E D H F D I E Y L	1300
GGATATTTATCCAGAATATCAAGACCAACACATTTTCGCATATCATTGGCT G Y L S R I S R P T H F A Y H W L	1350
ACGCGACTCTGATGTGGTCACCGAGAAATTATGTCTTGCTATCCCACACG R D S D V V T E K L C L A I P H V	1400
TTTATGAGAGCAAATGCGCGCATATCATTTCATTTCGCGTCTACTCTGTG Y E S K M R A Y H F I R V Y S V	1450
CATAATGGCACAGTGCAGTTCCCATTAACATAACAATTACTGTATTGTTAC H N G T V Q F P L T Y N Y C I V T	1500
TTTTGGATCCAGTTGTCCACAGCCAAATTATTTATTACCATATTTTCGTGA F G S S C P Q P N Y L L P Y F V M	1550
TGCCCCTAGCTGGCGGTCTGCAAGTGTTCGATTCAATATGGGATATTGAC P L A G G L Q V F D S I W D I D	1600
GATGGACTAATAGGCGGAACGAGGTTTGAGCGCAGAGGTATTCTGCACCC D G L I G G T R F E R R G I L H P	1650
AGACTCAGCCATTCTGGAAGCAATACATGAAAATTTTCAATTCATTAATG D S A I L E A I H E N F Q F I N D	1700
ATCCTGACAGTATTCATAGTAAGAGTGGACGCATCATTAATAAATAAC P D S I P I V R V D A S L I N N	1750
GTTGCGTTTCGTTTCTCTCTATATGCACGACATGCTCTTCTGCCACGTAT V A F R F S L Y A R H A L L P R I	1800

FIGURE 19 (suite)

CCTGATTAAACGTAAACAATATCGTTATGTTCCGAAATATCAGGTCCTAC L I K R K Q Y R Y V P K Y Q V L H	1850
ACGCAAGGCATGATCCAAAATATATTATGAAGCCAAAATTGCATGCTCA A R H D P K Y I M K P K I A C S	1900
GCATCAATACGCACTCTTACTATCTTTGGAGATATAACCCAGTACCCGTG A S I R T L T I F G D I T Q Y P C	1950
CGGGGATATGACTAGCTCCAACAATCCGAGAATGAATAAACATGCTTGCT G D M T S S N N P R M N K H A C L	2000
TGACAAGCCTGTTTAGATACGCGTCTATGCTATCATTACCGCGATGCTCA T S L F R Y A S M L S L P R C S	2050
TTATGTGGTAAAAAGTTTCCTAGCGAGGGATTAAGTTATTTATGCTGCCA L C G K K F P S E G L S Y L C C Q	2100
<u>GTAA</u> ATCAATGAATATGTTTCGAGTTCACACGCGTGGGATCGTGC	2144

TABLEAU 7
Recherche d'homologie pour la protéine codée par le segment 5 du
CfCPV

Comparaison	Séquence*	aa Identique (%)	Similarité (%)
CfCPV S5 vs la protéine S5 du "Rice ragged stunt virus" (protéine structurale)	601 PCGDMTSSNNPRMNKHA CL 619	36	47
	PCG + + KH CL		
	734 PCGMLEHCRATSLTKHRCL 752		
	631 LPRCSLCGKKFPSEGLSYLCCQ 652	40	63
+P C CG+ +P + L+ LC Q			
	770 MPACLGCGRLYQQILAKLCAQ 791		

(*) Dans chaque groupe des séquences, la ligne supérieur correspond à la séquence déterminée pour la protéine codée par le segment 5 du CfCPV et celle inférieur à la séquence de la protéine servant de comparaison.

(+) Acide aminé similaire.

4- EXPRESSION DU GÈNE CODANT POUR LA POLYÉDRINE DU CfCPV

Le gène codant pour la polyédrique du CfCPV a été exprimé sous forme de protéine de fusion en utilisant le vecteur d'expression pMAL-c2. L'analyse par SDS-PAGE des lysats bactériens a permis de sélectionner plusieurs clones exprimant la protéine de fusion (Figure 20a). Une protéine de 72 kDa, correspondant à la taille estimée pour la protéine de fusion a été révélée par coloration au bleu de Coomassie. Le clone pMAL-p70.1 a été sélectionné pour la production à grande échelle de la protéine de fusion (MBP-Polyédrique). Cette dernière a été purifiée sur une colonne d'amylose. Les fractions récoltées de la colonne (Figure 20b) ont été mises ensemble et passées une seconde fois par la colonne afin d'augmenter la pureté de la protéine désirée (Figure 20c). Après purification, des tentatives ont été faites pour éliminer la portion MBP de la protéine de fusion avec le facteur de clivage Xa, mais une dégradation du polypeptide a été observée. La protéine de fusion MBP-polyédrique a donc été utilisée dans le protocole d'immunisation. Les cellules *E. coli* exprimant la protéine de fusion ont aussi été observées en microscopie électronique afin de détecter la présence d'éventuels corps d'inclusion. Malheureusement, la plupart des corps d'inclusion observés se sont avérés des agrégats de protéines pauvrement définis et la présence d'une structure cristalline n'a pu être détectée. Conséquemment, le gène codant pour la polyédrique a été transféré dans le vecteur pAL-781 pour la production d'une polyédrique recombinante non-fusionnée. L'expression de la polyédrique recombinante dans des bactéries *E. coli* transformées avec le plasmide pAL-CfCPVg10 a été vérifiée par SDS-PAGE. Après coloration au bleu de Coomassie, une protéine d'approximativement 30,5 kDa a été observée dans le lysat bactérien (Figure 21, puits 5).

FIGURE 20: Expression de la polyédrique du CfCPV dans *E. coli* sous forme de polypeptide de fusion avec la protéine "maltose binding protein (MBP) du vecteur pMAL-c2.

(a) Puits 2 et 3: cellules *E. coli* TB1 contenant le vecteur pMAL-c2 sans insert avant (2) et après (3) induction avec IPTG; puits 4 à 13: cellules TB1 contenant le plasmide recombinant CfCPVg10-pMAL avant (4, 6, 8, 10, 12) et après induction (5, 7, 9, 11, 13). Les têtes de flèche indiquent la position de la protéine de fusion. Les marqueurs de masse moléculaire apparaissent dans les puits 1 et 14.

(b) Le clone pMAL-70.1 (avant et après induction, puits 2 et 3 respectivement) a été choisi pour la production en grande échelle de la protéine de fusion, qui a été purifiée sur une colonne d'amylose. Puits 4 à 9, fractions contenant la protéine de fusion après purification sur colonne d'amylose. La tête de flèche indique la protéine de fusion. Les marqueurs de masse moléculaires apparaissent dans les puits 1 et 10.

(c) Les fractions ont été mises ensemble et repassées par la colonne d'amylose afin d'obtenir une protéine plus pure (puits 2). La tête de flèche indique la protéine de fusion purifiée. Les marqueurs de masse moléculaires apparaissent dans les puits 3.

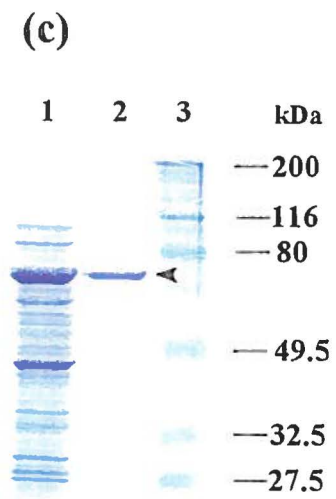
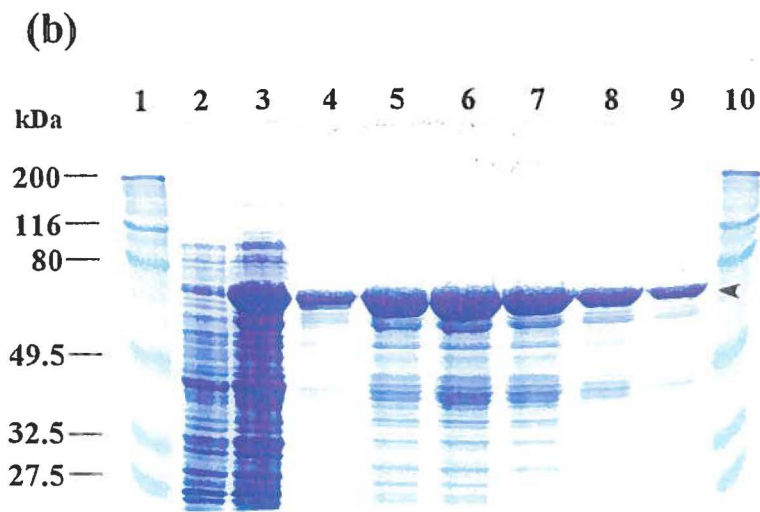
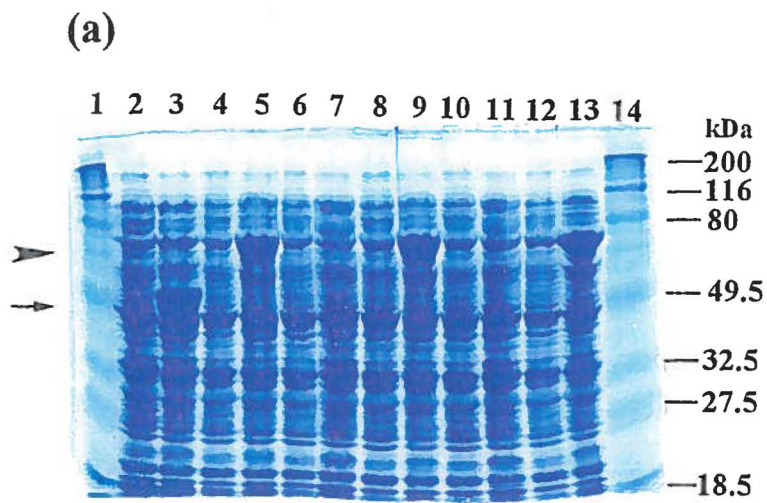
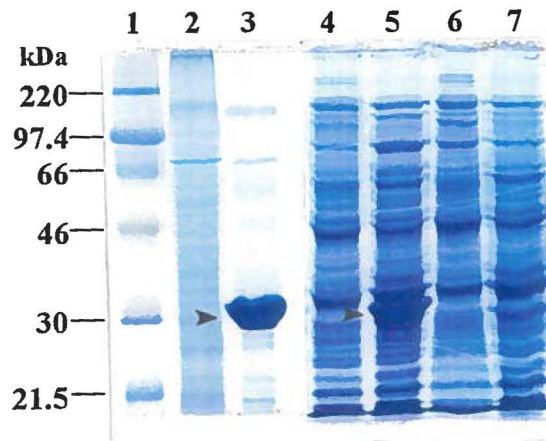


FIGURE 21: Expression de la polyédrine du CfCPV dans des bactéries *E. coli* GI724 transformées avec le plasmide recombinant pAL-CfCPVg10.

Lysats des bactéries transformées avec le vecteur pAL-CfCPVg10 avant (puits 4) et après (puits 5) induction avec du tryptophane. Puits 6 et 7: lysats des bactéries transformées avec le vecteur pAL-781 sauvage avant (6) et après (7) induction. Puits 2 et 3: broyats de larves non infectées (2) et infectées avec le CfCPV (3). Les têtes de flèches indiquent la position de la polyédrine provenant de larves infectées et de la polyédrine recombinante. Les marqueurs de masse moléculaires apparaissent dans le puits 1.



L'identification spécifique de la protéine recombinante pAL-polyédrine a été réalisée par immunoempreinte avec l'antisérum anti-MBP-polyédrine. La Figure 22 montre que l'antisérum a révélé indifféremment la polyédrine provenant des broyats des larves infectées (puits 2), la protéine recombinante MBP-polyédrine (puits 3) ou la protéine recombinante pAL-polyédrine (puits 6). Aucune protéine n'a été reconnue dans le broyat de larves non infectées (puits 1) ou dans le lysat de bactéries transformées avec le vecteur pAL-781 sauvage (puits 5). Il faut mentionner aussi que l'antisérum a réagit avec deux autres polypeptides d'environ 24 kDa présents dans le broyat des larves infectées et dans les lysat des bactéries transformées avec le plasmide pAL-CfCPVg10.

La présence de granules en position polaire ont été observées au microscope optique dans les bactéries *E. coli* GI724 transformées avec le vecteur pAL-CfCPVg10. L'analyse des coupes ultra-minces de ces bactéries a montré qu'environ 50% des bactéries possèdent des corps d'inclusion (Figure 23a). Ces corps d'inclusion sont généralement plus petits (0,1-0,5 μm) que les polyèdres présents dans les cellules d'insectes infectées (1,0-3,0 μm). Cependant, la présence d'une structure cristalline semblable à celle observée sur les coupes ultraminces des polyèdres a été observée dans les corps d'inclusion retrouvés chez les bactéries recombinantes (Figure 23b et d). De plus, quand des coupes ultraminces ont été mis en contact avec l'antisérum anti-MBP-polyédrine puis avec un anti-IgG de lapin marqué à l'or, les particules d'or se retrouvaient spécifiquement à l'intérieur et autour du corps d'inclusion (Figure 23c).

FIGURE 22: Immunoempreinte de la polyédrine du CfCPV et des polyédrines recombinantes détectées avec l'antisérum anti-MBP-polyédrine. Les protéines provenant des larves non infectées (puits 1), de larves infectées avec le CfCPV (puits 2), de lysat des bactéries induites exprimant la protéine de fusion MBP-polyédrine (puits 3), de lysats de bactéries induites exprimant la protéine p17-MBP (puits 4, protéine p17 du virus VNPI utilisée comme contrôle positive pour la protéine MBP), de lysats de bactéries transformées avec le vecteur pAL-781 sauvage (puits 5) et de lysats de bactéries transformées avec le vecteur recombinant pAL-CfCPVg10. Les têtes de flèche indiquent la position de la polyédrine naturelle et des polyédrines recombinantes. Les flèches montrent la position des produits de dégradation possible de la polyédrine ou des produits de l'arrêt précoce de la traduction du gène de la polyédrine. Les masses moléculaires sont indiquées à gauche.

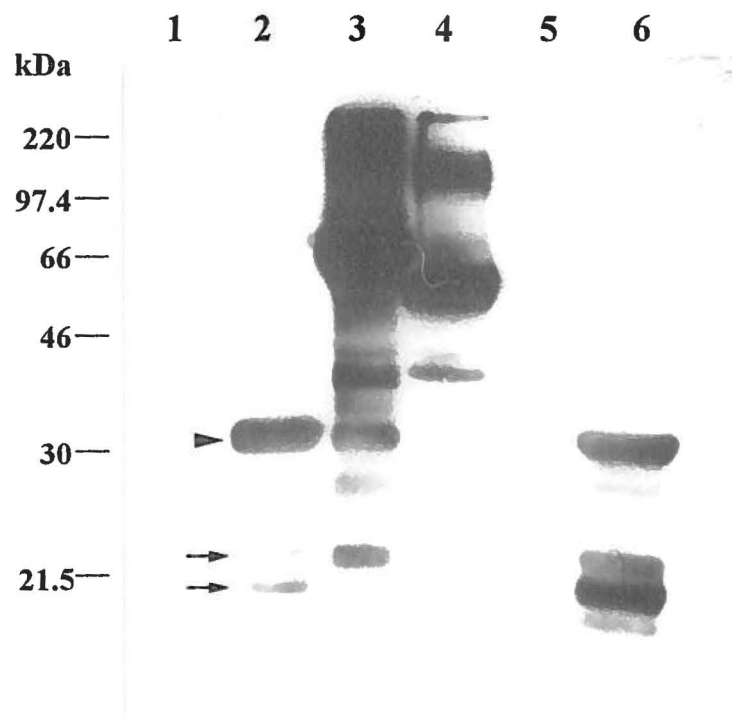
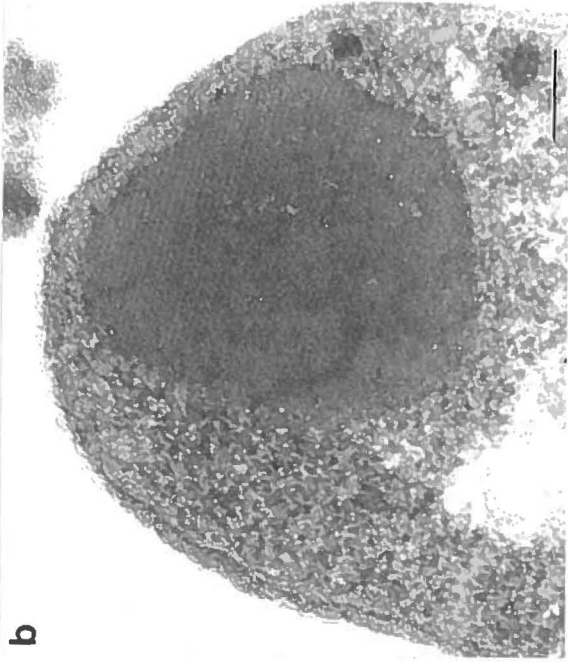
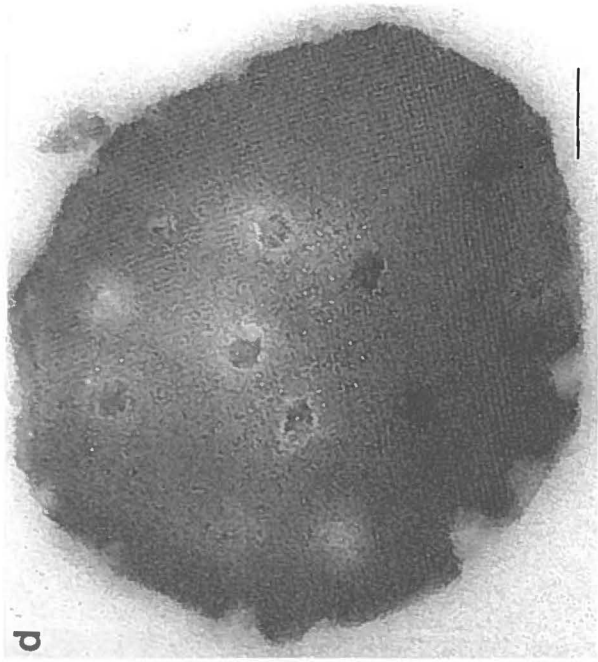


FIGURE 23: Microphotographie électronique des polyèdres du CfCPV et des corps d'inclusion d'*E. coli* recombinants.

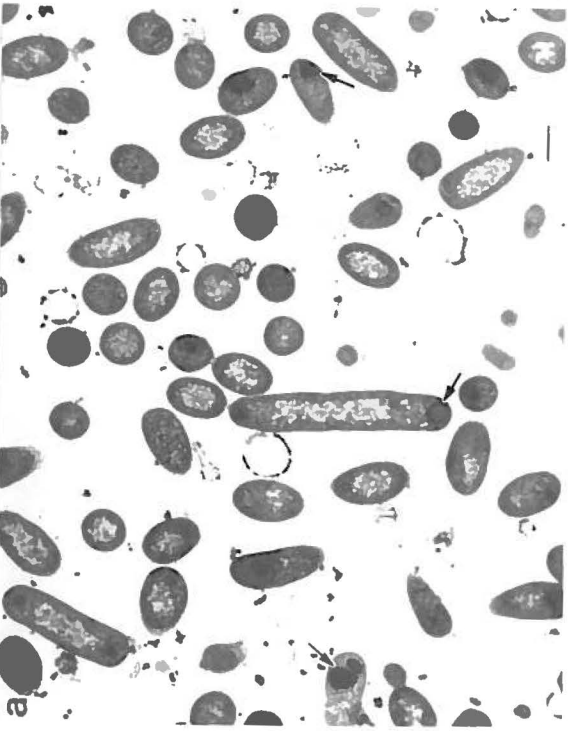
Section en coupes ultraminesces de: (a) *E. coli* contenant des corps d'inclusion; (b) corps d'inclusion de la protéine recombinante avec arrangement cristallin; (c) corps d'inclusion recombinant où la polyédrine recombinante a été immuno-révélee avec l'antisérum anti-MBP-polyédrine et un anti-IgG de lapin marquée à l'or. Les particules d'or sont localisées principalement à l'intérieur et autour du corps d'inclusion (flèches); (d) polyèdre purifié à partir de larves infectées avec le CfCPV. La barre représente 1000 nm (a) et 100 nm (b,c,d).



b



d



a



c

5- TRADUCTION *IN VITRO*

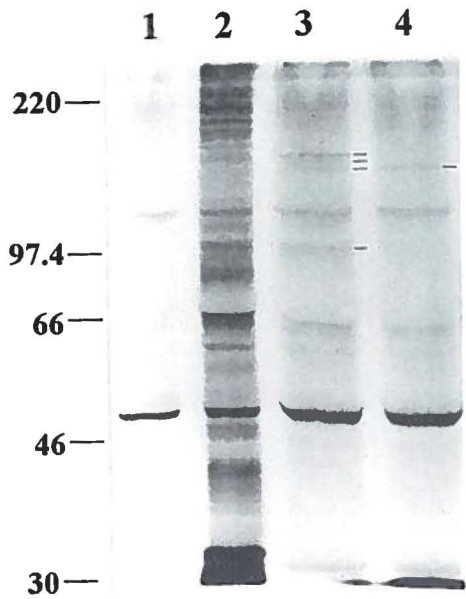
Les segments génomiques du CfCPV ont été purifiés individuellement, dénaturés et utilisés pour la synthèse *in vitro* des protéines avec un lysat de réticulocytes de lapin. Les produits ainsi synthétisés ont été analysés sur gel de polyacrylamide (Figure 24a et b) et leur migration a été comparée avec celle des polypeptides viraux identifiés par immunoempreinte (Figure 24c). L'analyse électrophorétique a permis d'attribuer des polypeptides à certains segments du CfCPV. La traduction *in vitro* des segments 1,2 et 3 (qui n'ont pu être séparés individuellement avant l'addition du lysat de réticulocytes) a produit quatre polypeptides qui ont comigré avec les polypeptide viraux de 135 kDa (probablement 2 polypeptides dû à l'intensité de la bande), 110 kDa (qui pourrait être une contamination des ARN génomiques 1,2,3 avec le segment 4) et 98 kDa. Le produit du segment 4 a comigré avec le polypeptide viral de 110 kDa. Le produit du segment 5 quant à lui a comigré avec le polypeptide de 75 kDa, et aucun produit n'a été détecté suite à la traduction *in vitro* des segments 6 et 7. Pour ce qui est du produit de la traduction du segment 8 (73 kDa), sa taille ne correspond pas avec celle de 59 kDa prédite à partir de la séquence déterminée pour ce segment. Nous n'avons pu trouver d'explication logique au retardement observé dans la migration de ce polypeptide. Afin de vérifier que le produit de la traduction correspond bien au segment 8 et que la bande observée ne soit pas un autre polypeptide, les produits de traduction obtenus avec le segment 8 ont été immunoprécipités avec un antisérum obtenu par immunisation génétique chez la souris avec le segment 8 cloné dans le vecteur pcDNA3 et avec un antisérum anti-CfCPV. La Figure 25 nous montre que le polypeptide de 73 kDa a été immunoprécipité par l'antisérum anti-g8 (souris 1 et 2) (puits 2 et 3 respectivement) et par l'antisérum anti-CfCPV (puits 4). Cette protéine n'a pas été révélée avec l'antisérum provenant des souris immunisées avec le vecteur pcDNA3 sauvage (puits 5). Pour cette raison le segment 8 devrait coder pour la protéine de 75 kDa révélée avec l'antisérum anti-CfCPV à partir de polyèdres purifiés (Figure 24cII).

FIGURE 24: Traduction *in vitro* des différents segments d'ARN génomiques du CfCPV.

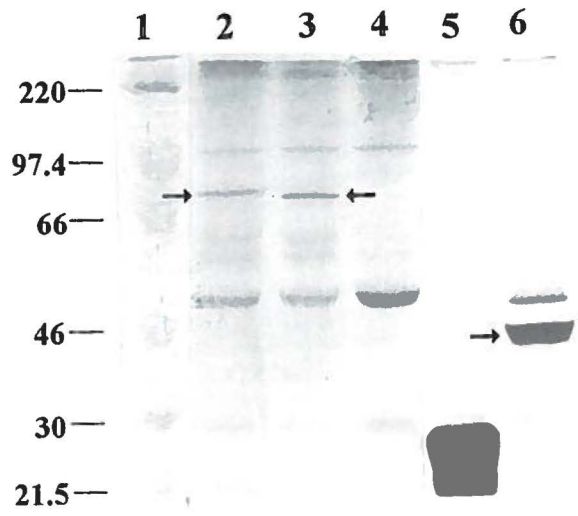
(a) Autoradiographie du gel de polyacrylamide à 10% contenant le produit de traduction *in vitro* des segments 1 à 4. Protéines synthétisées après l'addition des segments génomiques 1, 2, et 3 (puits 3). Protéine synthétisée après addition du segment 4 dénaturé (puits 4). Produits endogènes du lysat de réticulocytes (puits 1). Contrôle positif de la traduction après addition de l'ARNm du gène CAT (puits 2). Les traits indiquent la position des différents produits obtenus. Les marqueurs de masse moléculaires sont indiqués à gauche.

(b) Autoradiographie du gel de polyacrylamide à 12% contenant les protéines synthétisées après addition des segments génomiques dénaturés 5, 8 et 9 (puits 2, 3 et 6 respectivement). Les produits endogènes du lysat de réticulocytes et le contrôle positif de la traduction après addition de l'ARNm du gène CAT apparaissent dans les puits 4 et 5 respectivement. Les flèches indiquent la position des différents produits obtenus. Les marqueurs de masse moléculaires sont indiqués dans le puits 1.

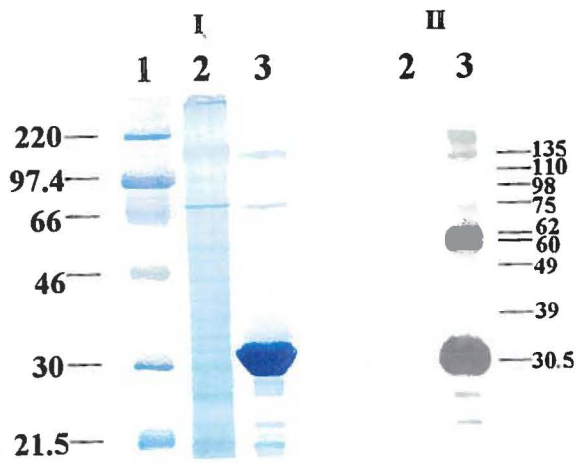
(c) Gel de polyacrylamide à 12% des protéines virales. Gel coloré au bleu de Coomassie (I). Broyat de larves non infectées (puits 2). Séparation des protéines obtenues après dissolution des polyèdres purifiés par traitement alcalin (puits 3). Immunoempreinte montrant les protéines virales révélées avec l'antisérum anti-CfCPV (II). La masse estimée pour les différentes protéines est indiquée à droite.



(a)



(b)



(c)

FIGURE 25: Immunoprécipitation des protéines synthétisées dans des lysats de réticulocytes de lapin après l'addition du segment 8 du CfCPV dénaturé.

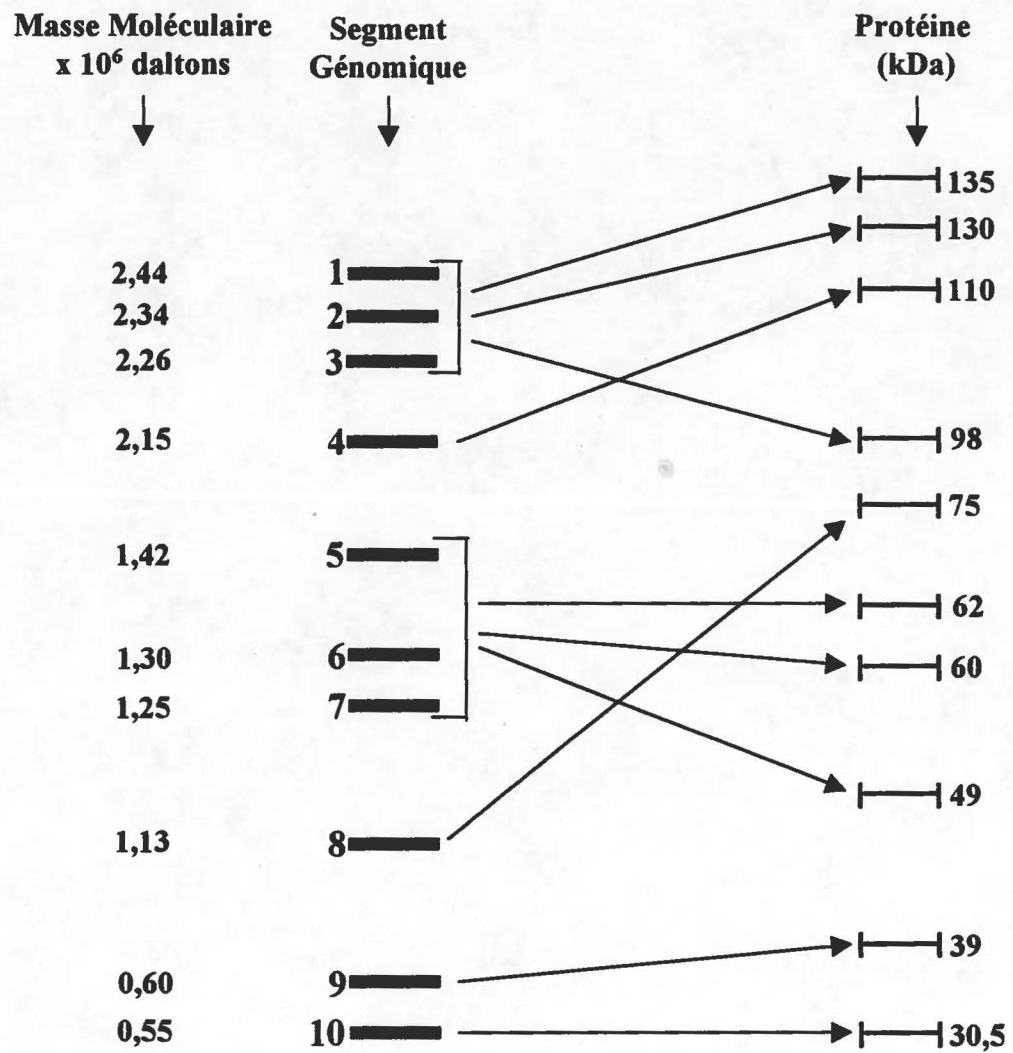
Les produits de traduction *in vitro* du segment 8 ont été immunoprécipités avec: puits 1 et 2, les antisérums obtenus par immunisation génétique, souris 1 et souris 2 respectivement; antisérum anti-CfCPV, puits 3, et antisérum de souris immunisées avec le vecteur sauvage pcDNA3, puits 4. La flèche indique la position du polypeptide de 75 kDa immunoprécipité. Les marqueurs de masse moléculaire apparaissent indiqués à gauche.

Finalem^{ent}, le produit de traduction du segment 9 a comigré avec le polypeptide viral de 39 kDa.

L'analyse électrophorétique des produits synthétisés a permis de construire une carte génomique partielle du CfCPV qui est représentée par le schéma de la Figure 26.

FIGURE 26: Carte génomique partielle du cypovirus de *Choristoneura fumiferana* (CfCPV).

Assignment provisoire des produits protéiques aux différents segments d'ARN génomiques du CfCPV. Les segments génomiques, numérotés de 1 à 10 et avec leurs masse moléculaire, sont représentés à gauche tandis que les protéines assignées avec leurs masse moléculaire en kDa sont indiquées dans la colonne de droite.



6- QUANTIFICATION DES ARNm DU CfCPV

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression du gène de la polyédrine, une analyse quantitative de la transcription des segments génomiques 10 et 8 a été réalisée en utilisant la méthode de RT-PCR-QC.

Les ARNm des gènes codés par les segments 10 et 8 du CfCPV ont été quantifiés à partir des ARN totaux extraits de larves infectées par le CfCPV et sacrifiées à 2, 4 et 8 jours post-infection. Nous avons synthétisé des standards internes d'ARN (ARNc) *in vitro* afin de les utiliser comme matrice compétitive dans le protocole de RT-PCR. Pour ce faire, les clones contenant les séquences des segments 10 et 8 ont d'abord été modifiés tel que représenté à la Figure 27a. Après l'obtention des plasmides CfCPVsg10 (contenant une délétion de 15 nucléotides) et CfCPVsg8 (contenant une délétion de 50 nucléotides), des amorces spécifiques aux régions situées directement en aval ou en amont du site éliminé ont été synthétisées. La Figure 27b montre les produits attendus suite à l'amplification par PCR du gène 10 cible (280 pb) et de son standard interne (265 pb) (puits 2 et 3 respectivement), de même que pour le gène 8 cible (870) et son standard interne (820 pb) (puits 4 et 5 respectivement)

Les standards internes contenant les délétions ont été transcrits en ARN à partir du promoteur T7 (situé en aval de l'insert dans le vecteur pCRTMII) à l'aide de l'ARN polymérase ADN dépendante du phage T7. Les ARNc ainsi synthétisés ont été traités avec la DNase afin d'éliminer l'ADN qui a servi de matrice pour la transcription. Avant d'utiliser les ARNc dans le test de compétition une amplification par PCR a été réalisée afin de s'assurer qu'aucun produit d'amplification provenant de l'ADN plasmidique ne soit présent après traitement avec la DNase. La Figure 27c montre clairement qu'aucun produit d'amplification n'a été détecté sur gel d'agarose lorsque les standards internes du segment 8 (puits 2) et du standard interne du segment 10 (puit 5) ont été testés par PCR.

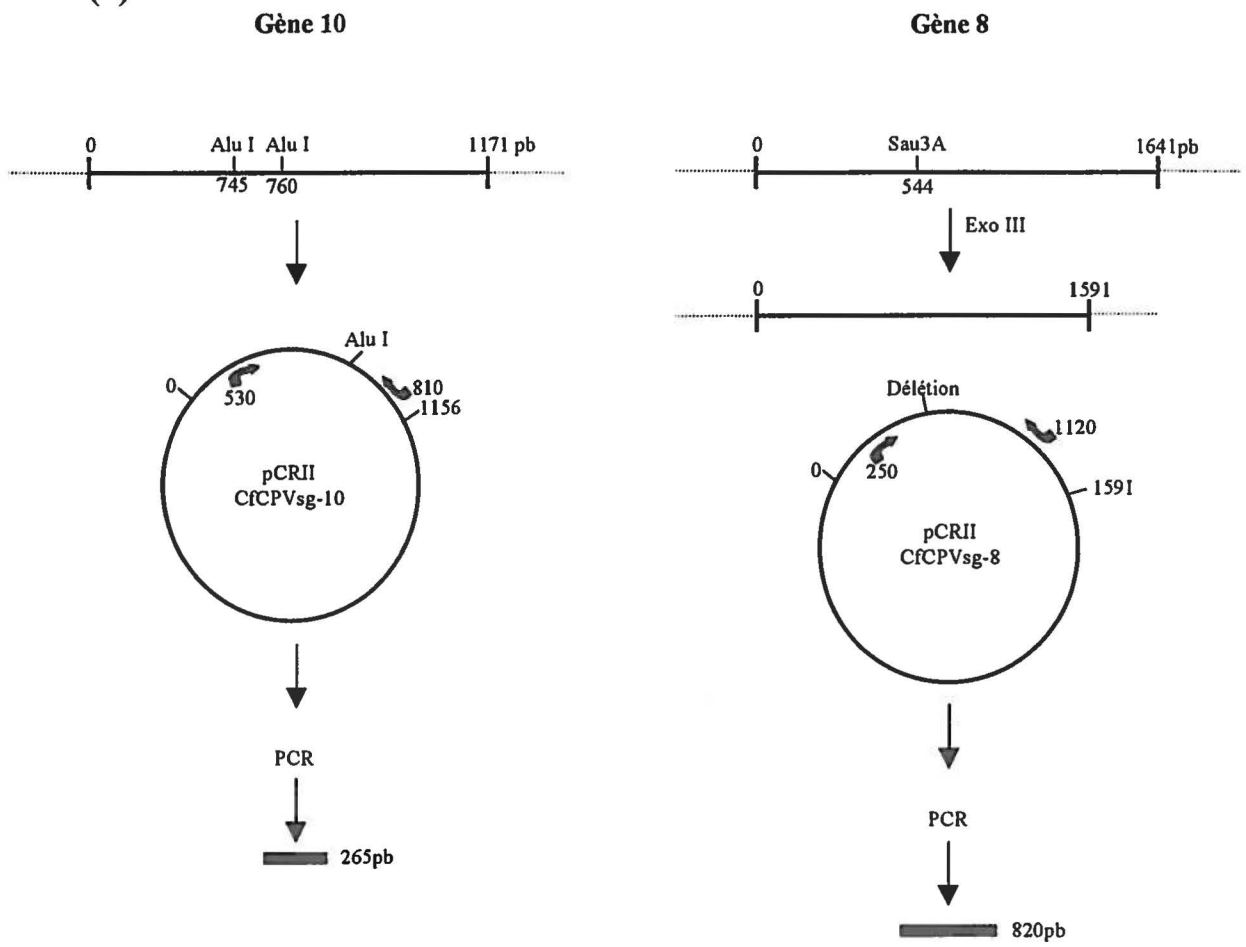
FIGURE 27: Construction des standards internes d'ARN des segments 10 et 8 du CfCPV.

(a) Stratégie utilisée pour l'obtention des standards internes pour les gènes 10 et 8 du CfCPV. Les séquences complètes des segments 10 et 8 sont représentés par des traits. Les flèches pleines représentent les amorces synthétisées pour l'amplification par PCR et leur position dans la séquence avant la délétion.

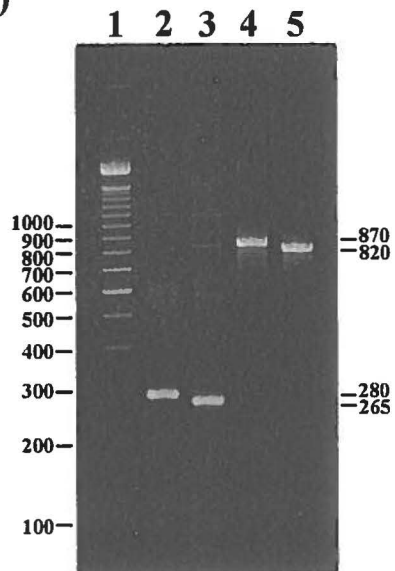
(b) Produits d'amplification obtenus par PCR avec les plasmides recombinants avant et après délétion au niveau des segments 8 et 10 en utilisant la même paire d'amorces pour chaque segment. La taille des produits d'amplification est indiquée à droite. Les marqueurs de taille sont indiqués à gauche.

(c) Vérification de l'absence d'ADN plasmidique recombinant dans les produits de transcription *in vitro* après traitement avec la DNase. Puits 2 et 5 contrôles négatives du PCR pour le standard 8 et 10 respectivement; puits 3 et 6 PCR à partir des produits obtenus par transcription *in vitro* après traitement à la DNase pour le standard 8 et 10 respectivement (aucun produit d'amplification n'a été observé); puits 4 et 7 RT-PCR pour les standards 8 et 10 respectivement.

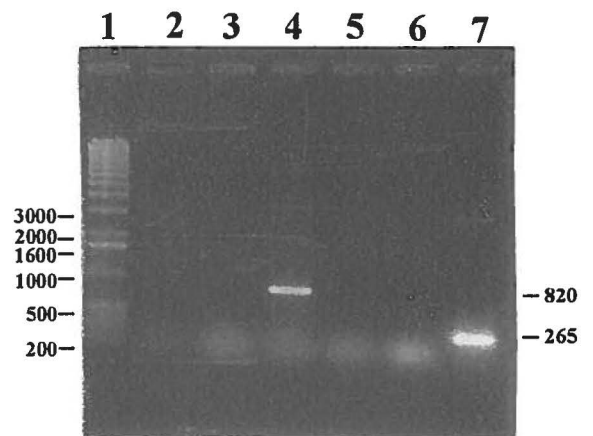
(a)



(b)



(c)



Les Figures 28a et 29a représentent les résultats obtenus suite à la compétition dans le système RT-PCR pour les segments 10 et 8 du CfCPV respectivement. L'addition d'une série de dilutions en base 2 du standard interne à chacune des réactions contenant la même concentration d'ARN cible, est responsable de la diminution progressive de l'intensité de la bande correspondant au standard interne (265 pb et 820 pb pour les segments 10 et 8 respectivement) et de l'augmentation de l'intensité de la bande associée au produit de l'ARN cible (280 pb et 870 pb pour le segment 10 et 8 respectivement). L'utilisation de dilutions plus élevées du standard 10 lors de la compétition avec l'ARNm du gène 10, est dû à sa faible quantité dans les premiers jours suivant l'infection.

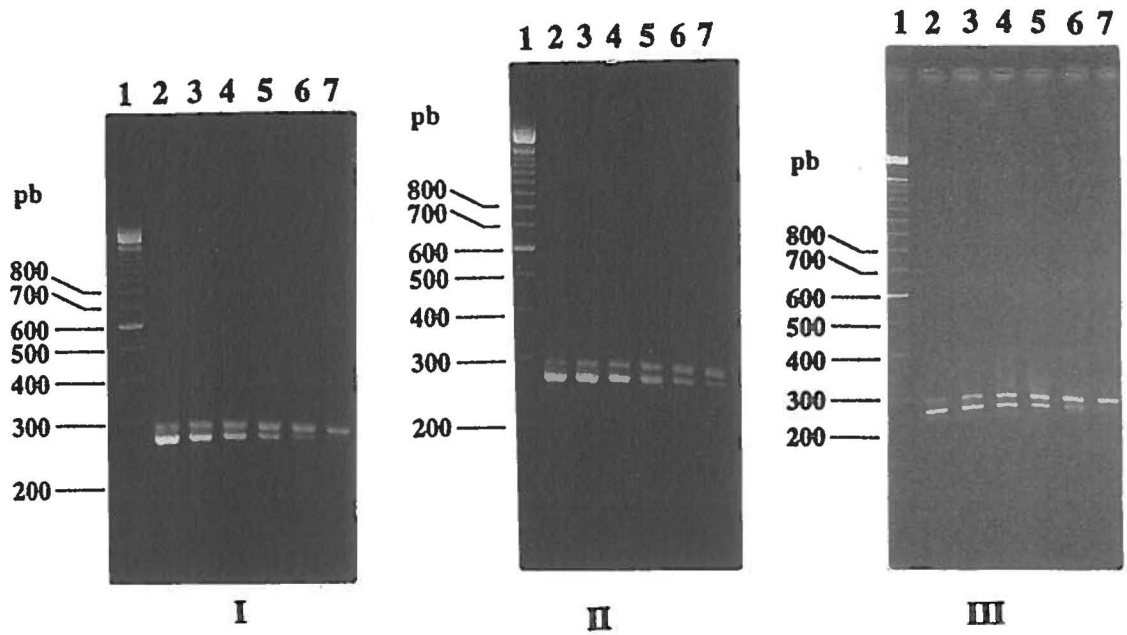
Les valeurs correspondant à l'intensité de chacune des bandes sont représentés dans la courbe de la Figure 28b et 29b. Le point d'intersection sur l'abscisse lorsque le ratio des deux produits est égal à 1 indique la quantité d'ARN cible présente dans l'échantillon. C'est ainsi que des valeurs de 5,9, 10,4 et 459 amol ont été déterminées pour le gène 10 à 2, 4 et 8 jours pi. On observe donc une augmentation de près de 100% entre le jour 2 et le jour 4 et d'environ 45 fois entre le jour 4 et le jour 8 pi. Par comparaison, les quantités déterminées pour le segment 8 ont été de 1713, 990 et 695 amol à 2, 4 et 8 jours pi respectivement, c'est-à-dire une diminution d'environ 2,5 fois entre les jour 1 et le jour 8.

FIGURE 28: Analyse de l'expression du segment 10 du CfCPV par RT-PCR Quantitatif-Compétitif

(a) Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) et coloration au bromure d'éthidium des produits obtenus par RT-PCR-QC. Une quantité constante d'ARN (200 ng) extrait des larves infectées par le CfCPV à 2 jours (I), 4 jours (II) et 8 jours post-infection (III) a été transcrite par la transcriptase inverse en présence du standard interne (compétiteur) à différentes dilutions(en base 2). Gel I de 25 amol (puits 1) à 0,781 amol (puits 7), gel II de 100 amol (puits 1) à 3,125 amol, gel III de 2000 amol (puits 1) à 62,5 amol (puits 7). Dans chaque gel la bande supérieure représente l'ARN viral cible (280 pb) et la bande inférieure le standard interne (265 pb) amplifié par PCR. Les marqueurs de taille d'ADN apparaissent dans le puits 1.

(b) Analyse quantitative des produits obtenus par PCR apparaissant en (a). La photo du gel a été digitalisée grâce au programme Kodak "ID image Analysis Software" et l'intensité de chaque bande a été déterminée. Une courbe représentant le ratio du logarithme de l'intensité de la cible divisé par l'intensité du standard interne en fonction du logarithme du nombre de molécules du standard interne a été tracée. Les points d'équivalence dans la compétition (par exemple quand le ratio intensité cible/standard interne = 1), déterminés par interpolation, étaient de 5,9, 10,4 et 459 attomoles pour les ARN extraits à 2 jours, 4 jours et 8 jours respectivement

(a)



(b)

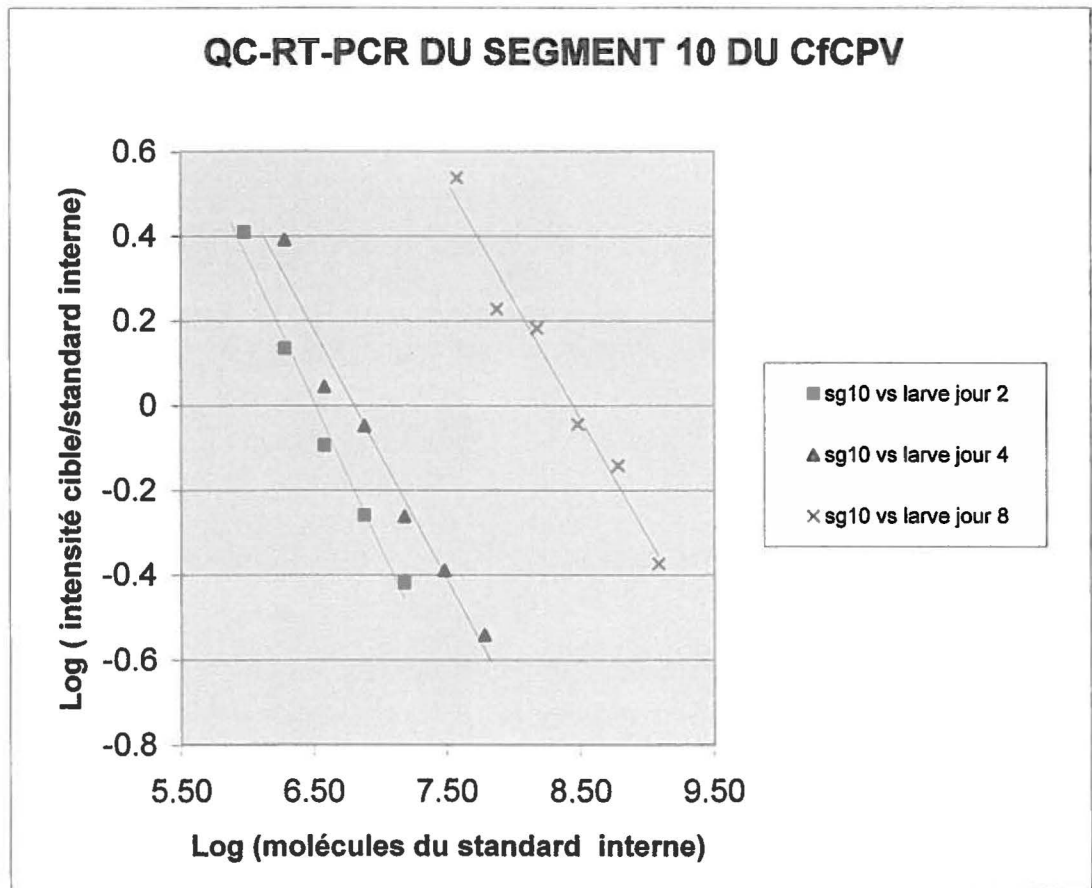
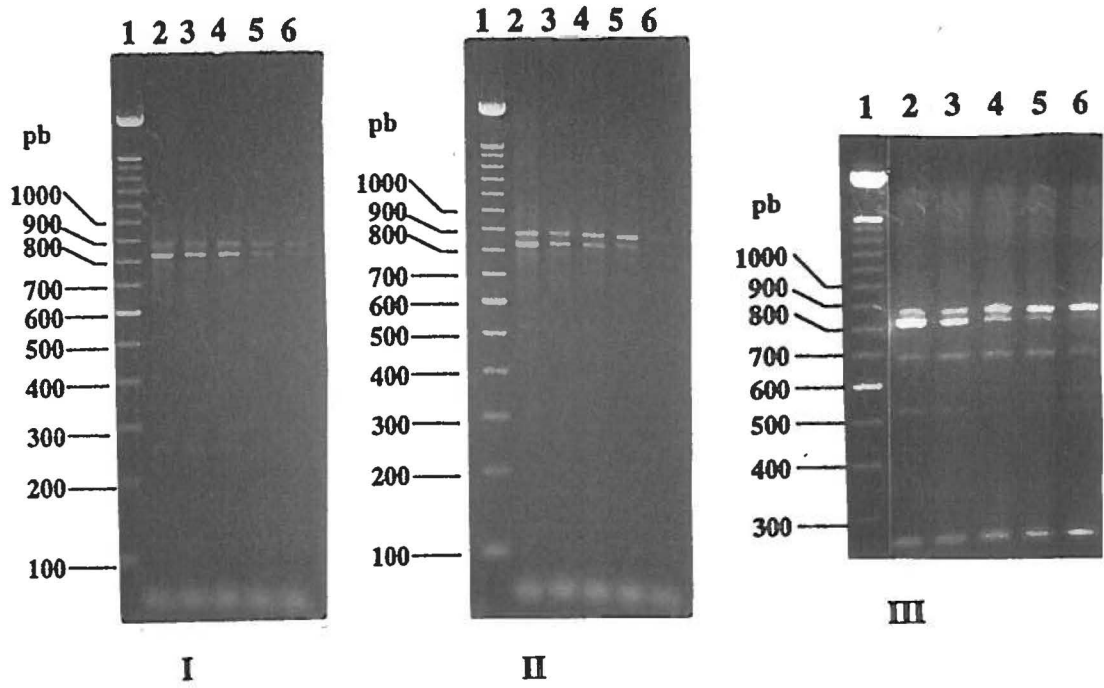


FIGURE 29: Analyse de l'expression du segment 8 du CfCPV par RT-PCR Quantitatif-Compétitif.

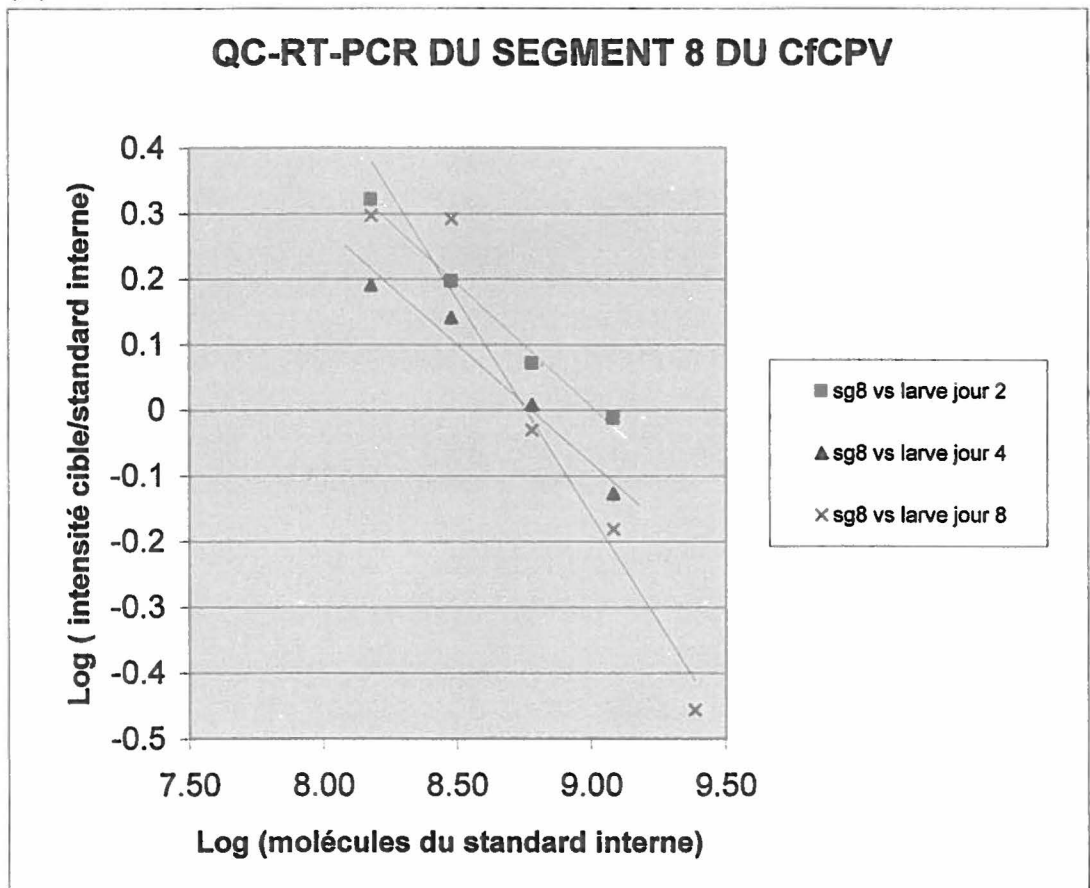
(a) Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) et coloration au bromure d'éthidium des produits obtenus par RT-PCR-QC. Une quantité constante d'ARN (200 ng) extrait des larves infectées par le CfCPV à 2 jours (I), 4 jours (II) et 8 jours post-infection (III) a été transcrite par la transcriptase inverse en présence du standard interne (compétiteur) à différentes dilutions (en base 2), s'étalant de 2000 amol (puits 1) à 125 amol (puits 6) dans chaque gel. La bande supérieure représente l'ARN cible (870 pb) et la bande inférieure le standard interne (820 pb) amplifiée par PCR. Les marqueurs de taille d'ADN apparaissent dans les puits 1.

(b) Analyse quantitative des produits obtenus par PCR apparaissant en (a). La photo du gel a été digitalisée grâce au programme Kodak "ID image Analysis Software" et l'intensité de chaque bande a été déterminée. Une courbe représentant le ratio du logarithme de l'intensité de la cible divisé par l'intensité du standard interne en fonction du logarithme du nombre de molécules du standard interne a été tracée. Les points d'équivalence dans la compétition (par exemple quand le ratio intensité cible/standard interne = 1) déterminés par interpolation, étaient de 1713, 990 et 695 attomoles pour les ARN récoltés à 2 jours, 4 jours et 8 jours respectivement.

(a)



(b)



DISCUSSION

1- PRODUCTION VIRALE

Une des étapes préliminaires à la réalisation de mon projet de doctorat était d'assurer la croissance et l'identification du cypovirus de *Choristoneura fumiferana* (CfCPV). À cause des avantages que pourrait procurer la disponibilité d'une lignée cellulaire pour la caractérisation du virus, plusieurs essais ont été réalisés en vue d'obtenir des cellules pouvant supporter la multiplication virale *in vitro*. Malheureusement, aucune des lignées utilisées n'a pu soutenir la réplication virale. Pour cette raison, l'amplification du CfCPV a été réalisée au laboratoire sur des larves de tordeuse, en utilisant une nourriture artificielle. L'infectivité de l'isolat du CfCPV utilisé dans le présent travail a été démontrée par l'examen au microscope électronique d'intestins provenant de larves infectées par le virus (Figure 1). La multiplication du virus chez la larve a permis d'obtenir des quantités suffisantes de particules virales pour permettre leur étude.

Les polyèdres matures observés suite à l'infection par le CfCPV sont apparus sous forme hexagonale avec de particules virales incluses aléatoirement dans la matrice cristalline. Des formes pentagonale et rhombique ont aussi été observées. Les polyèdres en cours de formation prennent toutefois une forme plutôt arrondie et sont associés à un très grand nombre de virions dont certains peuvent être en voie d'inclusion (Figure 2). Des variations dans la forme des polyèdres provenant d'une même infection ont été rapportées (Iwashita, 1971; Belloncik, 1989).

2- CLASSIFICATION DU CfCPV

Les cypovirus ont été classés provisoirement sur la base de la mobilité relative de leurs différents segments génomiques (Payne et Rivers, 1976). La comparaison du profil électrophorétique du CfCPV avec ceux proposés par Payne et Rivers (1976) pour d'autres cypovirus, révèle une très grande similitude avec les virus classés dans l'électrophorétype 7. Malheureusement, aucune souche appartenant à cet électrophorétype n'était disponible dans notre laboratoire. Pour cette raison la masse moléculaire de différents segments

génomiques du CfCPV a été déterminée et celle des segments du NpCPV (électrophorétype 7) recalculée à partir des résultats publiés par Payne et Martens (1983), en utilisant comme référence les masses moléculaires déterminées pour BmCPV (Fujii-Kawata *et al.*, 1970) et analysées à l'aide du programme "ID Image Analysis Software" (Kodak Digital Science™). Les masses moléculaires recalculées pour le virus NpCPV concordent avec celles publiées par Payne et Mertens (1983). Le CfCPV et le NpCPV ne diffèrent ainsi qu'au niveau de la mobilité d'un seul de leurs segments (Figure 7). Conséquemment, le CfCPV utilisé dans la présente étude appartiendrait à l'électrophorétype 7 de l'actuelle classification. La comigration du CfCPV et du NpCPV dans le même gel pourrait permettre de confirmer ces observations.

3- CLONAGE DU GÉNOME VIRAL

La méthode utilisée pour le clonage du génome du CfCPV a permis d'obtenir une banque de clones spécifiques aux différents segments génomiques tel que montré à la Figure 10. La disponibilité des clones contenant les gènes du CfCPV rend possible la détermination de leur séquence. Bien qu'initialement les segments génomiques complets devaient être clonés, comme ce fut le cas pour les réovirus (Cashdollar *et al.*, 1984), aucune molécule de plus de 1 200 pb n'a été synthétisée. Ce problème provient probablement de l'appariement de l'ARN génomique à l'ADNc synthétisé et/ou de la présence de structures secondaires provoquant un arrêt de la transcriptase inverse. Afin de contourner ce problème, la technique RACE a été utilisée. Cette méthodologie nous a permis d'obtenir des fragments d'ADNc contenant les séquences terminales pour couvrir le segment génomique au complet.

3.1- SÉQUENÇAGE

À partir des clones obtenus, les séquences nucléotidiques entières des segments génomiques 5, 8, 9 et 10 ont été déterminées. L'analyse de ces séquences a révélé que les quatre segments possèdent la même séquence terminale 5'AGUUU---GUGC3'. Des séquences terminales conservées ont également été observées chez d'autres membres de la

famille des *Reoviridae* tels que les *Orthoreovirus* (Antczak *et al.*, 1982), les *Orbivirus* (Mertens et Sangar, 1985) et les *Phytoreovirus* (Kudo *et al.*, 1991), bien que celles-ci varient entre les membres du même genre. En effet, des séquences terminales différentes ont été rapportées parmi les membres des genre *Orbivirus* (Moss *et al.*, 1990) et *Fijivirus* (Noda *et al.*, 1994). Dans le cas des cypovirus, les séquences terminales déterminées dans le présent travail pour le CfCPV sont différentes de celles rapportées pour BmCPV (5'AGUAA---GUUAGCC3') et EsCPV (5'AGUUU---UUGC) par Kuchino et collaborateurs (1982) et Fossiez et collaborateurs (1989) respectivement.

Outre le gène codant pour la polyédrine, les séquences nucléotidiques et protéiques déterminées pour les gènes 9, 8 et 5 du CfCPV permettent les premières comparaisons du genre cypovirus avec d'autres membres de la famille *Reoviridae*. Celles-ci n'ont toutefois révélé aucune homologie significative avec les autres réovirus suite à un alignement direct des séquences en nucléotides. De plus, la comparaison des séquences nucléotidiques des quatre gènes du CfCPV avec la banque de donné "GenBank database" n'a pas permis de relier ce virus à d'autre séquences connues. Ces observations corroborent celles de Martinson et Lewandowski (1974), qui ont utilisé un système d'hybridation ARN:ARN, et celles de Galinski et collaborateurs (1983), qui ont fait appel à des sondes d'ADNc synthétisées à partir du génome complet et à des essais de protection avec la nucléase S1. Ces derniers n'ont relevé aucune homologie significative entre le BmCPV et le réovirus de type 1. Néanmoins, malgré l'absence d'homologie au niveau de la séquence nucléotidique certaines similarités localisées ont été trouvées avec la séquence en acide aminés d'autres protéines. Il est intéressant d'observer que la protéine codée par le segment 9 du CfCPV a cinq régions homologues avec l'ARN polymérase ARN dépendant de l'oryzavirus "Rice ragged stunt virus"(RRSV), laquelle est codée par le segment S4 (Upadhyaya *et al.*, 1998), principalement entre les résidus 32 à 46 où on peut observer 79% de similarité. Une similitude a été aussi observée avec l'ARN polymérase du coronavirus humain (Tableau 5). Tout récemment, Hagiwara et collaborateurs (1998) ont déterminé la séquence nucléotidique du segment 9 du BmCPV. Ces derniers ont rapporté que la protéine codée par ce segment possède certaines régions similaires avec l'ARN polymérase dépendant d'ARN du virus polio humain. Ces observations suggèrent que la

protéine codée par le segment 9 du CfCPV pourrait avoir les mêmes fonctions biologiques que celles suggérées pour la protéine NS5 du BmCPV. Concernant la protéine codée par le segment 5 du CfCPV, deux régions similaires dans la portion COOH-terminale ont été trouvées avec la protéine structurale du virus "Rice ragged stunt virus", laquelle est aussi codée par le segment 5 (Li *et al.*, 1996). Le fait que les particules virales du RRSV comme celles des cypovirus ne possèdent pas une double capsid (Milne, 1980), contrairement au rest. des membres de la famille *Reoviridae*, et que les particules virales du RRSV ressemblent plus au cypovirus qu'aux autres réovirus de plantes (Shaw, 1996) pourrait indiquer une possible relation au niveau de leurs protéines structurales. Ainsi, ces observations peuvent suggérer que les protéines codés par ces gènes ont des fonctions biologiques similaires. Des études comparatives entre ces deux virus devront se poursuivre pour confirmer ces observations. Pour ce qui est du produit protéique du segment 8, une similarité localisée a été trouvée avec la protéine E2A ("DNA binding protein") de l'adénovirus humain. Des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de démontrer la capacité de la protéine codée par le segment 8 du CfCPV de lier l'ARN génomique viral. Il est intéressant de noter que cette protéine possède un haut pourcentage en résidus prolines. Des analyses comparatives avec la protéine NS53 des Rotavirus ont démontré la présence de 11 résidus proline conservés parmi les virus du groupe A. Ces observations ont suggéré que malgré la divergence de séquences ces résidus proline pourraient jouer un rôle dans le maintien de la structure de la protéine (Hua *et al.* 1993).

Malgré l'absence d'homologie au niveau de la séquence primaire, il existe une certaine similitude du point de vue de l'organisation génomique chez les cypovirus. En effet, le séquençage direct de la portion N-terminale de la polyédrine du CfCPV purifiée, a permis de confirmer que cette protéine est bien codée par le segment génomique viral le plus petit, comme c'est le cas chez les autres cypovirus connus. Toutefois, à la différence de la polyédrine des baculovirus, qui est conservée parmi un grand nombre de virus différents (Rohrmann *et al.*, 1981), la comparaison des séquences en nucléotides et en acides aminés du gène codant pour la polyédrine du CfCPV avec celle des quatre autres cypovirus disponibles (BmCPV, EsCPV, HaCPV, OpCPV), n'a pas révélé d'homologie

particulière. Par exemple, il n'y a que 23% et 20% d'identité entre la séquence nucléotidique du CfCPV et celle de BmCPV et EsCPV, respectivement. La comparaison au niveau des autres gènes n'est pas possible puisque les séquences n'ont pas été déterminées chez tous les autres cypovirus mentionnés. Néanmoins les résultats obtenus avec la polyédrine et la séquence du segment 9 démontrent la présence d'une différence génétique entre les virus de différents types (cypovirus de type 1 et 5). On peut donc conclure que les différences observées dans le profil de migration des ARN génomiques se reflètent par des différences dans le degré d'homologie de leurs séquences nucléotidiques ou/et en acides aminés. En plus, ces résultats sont en accord avec ceux de Galinski et collaborateurs (1983), qui ont démontré l'absence d'homologie entre les cypovirus BmCPV-1, OpCPV-5, MsCPV-8, trois cypovirus classés dans des électrophorotypes différents. Par contre, ces auteurs ont également observé une homologie significative entre les cypovirus de type 5 OpCPV, ESCPV et HaCPV. Cette ressemblance a été confirmée par la suite en comparant la séquence du segment 10 de ces trois cypovirus de type 5. Seuls 17 nucléotides différaient alors d'un virus à l'autre (Galinski *et al.*, 1994). Le séquençage des segments génomiques autres que celui codant pour la polyédrine devrait apporté des informations supplémentaires sur les relations phylogénétiques entre les cypovirus.

Malgré l'absence d'homologie de séquence au niveau du gène codant pour la polyédrine, les profils d'hydrophilicité déterminés pour ce polypeptide chez trois cypovirus, partagent certaines caractéristiques communes dans leur portion N-terminale. En effet, 7 régions ont été identifiées parmi les 116 premiers acides aminés (Tableau 4). Ces régions possèdent des pics d'hydrophilicité et hydrophobicité similaires localisés approximativement à la même position et ayant des structures secondaires semblables (Fossiez *et al.*, 1989; Echeverry *et al.*, 1997). Il est possible que ce domaine de la polyédrine soit essentiel pour la formation des corps d'inclusion. Il serait impliqué dans des interactions non-covalentes entre les molécules de polyédrine adjacentes pour la formation de la matrice cristalline. Des interactions hydrophobiques et ioniques ont été proposés pour expliquer la stabilité de la matrice cristalline chez le baculovirus (Egawa et Summers, 1972; Whitt et Manning, 1987, 1988). Cette hypothèse est supportée par les

travaux de Jarvis et collaborateurs (1991), qui ont démontré qu'une région dans la portion N-terminale comprise entre les acides aminés 19 à 110 de la polyédrine du virus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* (AcNPV) est essentielle pour la formation de corps d'inclusion.

En analysant la structure secondaire des polyédrines, dont celle du CfCPV, on peut observer un très grand nombre de structures en feuillet α et en tours. Ces structures secondaires sont attendues puisque le polypeptide doit s'associer pour la formation des corps d'inclusion.

L'analyse de la séquence prédite en acides aminés pour la polyédrine du CfCPV montre que celle-ci est riche en résidus tyrosine (8,8%) tout comme celle du BmCPV (Arella *et al.*, 1988). Les résidus de tyrosine pourraient jouer un rôle important dans la sensibilité au milieu alcalin de la polyédrine, comme c'est le cas pour le virus de la polyédrose nucléaire d'*O. pseudotsugata* NPV (Rohrmann *et al.*, 1979). La présence de quantités relativement abondantes en résidus aromatiques (phénylalanine 7,4%, triptophane 3,8%) et en résidus basiques (lysine 4,3%, arginine 8,4%) dans la polyédrine du CfCPV pourrait renforcer ses propriétés de dissolution alcaline, tel que suggéré par Galinski et collaborateurs, 1994).

4- EXPRESSION DU GÈNE CODANT POUR LA POLYÉDRINE

Le processus de cristallisation de la polyédrine a suscité beaucoup d'intérêt dans le milieu scientifique, mais jusqu'à présent les mécanismes impliqués restent inconnus. Nous avons voulu déterminer si la polyédrine possède elle-même toute l'information nécessaire pour la formation du cristal polyédrique. L'expression du gène codant pour la polyédrine du CfCPV sous forme de protéine de fusion avec la protéine MBP ("Maltose binding protéine") du vecteur pMAL-c2, n'a pas permis la production de corps inclusion avec une matrice cristalline. Ceux-ci sont plutôt apparus comme des masses amorphes de protéine. Il est possible que la modification de la portion N-terminale de la protéine suite à l'ajout de la protéine MBP empêche l'association adéquate des protéines entre-elles.

Les expériences réalisées avec le vecteur d'expression pAL-781, se sont avérées plus fructueuses. En effet, elles ont permis d'obtenir une protéine de la même taille que celle de la polyédrine virale purifiée et la formation de corps d'inclusion ayant une structure cristalline semblable à celle présente dans les polyèdres provenant des larves infectées (Figure 20). De plus, les polyédrines récombinantes et natives (provenant de larves infectées) ont été reconnues par l'antisérum préparé chez le lapin avec la protéine de fusion MBP-Polyédrine (Figure 19). C'est la première fois qu'une structure cristalline est observée lorsque la polyédrine d'un cypovirus est exprimée dans un vecteur procaryotique. Auparavant Lavallée et collaborateurs (1993) ont pu exprimer le gène codant pour la polyédrine du BmCPV, mais malgré la formation de corps d'inclusion, aucune structure cristalline n'a été observée. Les résultats rapportés dans cette thèse permettent de conclure qu'effectivement, la polyédrine (CfCPV) possède toute l'information nécessaire pour réaliser le processus de cristallisation et qu'aucun apport provenant d'autres protéines virales ou de facteurs cellulaires n'est requis.

5- CARTE GÉNOMIQUE DU CfCPV

L'analyse électrophorétique des polypeptides viraux identifiés par immunoempreinte ou obtenus par la traduction *in vitro* des ARN bicaténaires génomiques dénaturés a permis d'attribuer des protéines à certains segments du CfCPV (Figure 26). Sept polypeptides correspondant à sept segments génomiques différents ont été identifiés. La traduction *in vitro* des segments 1,2 et 3 (ajoutés ensemble dans la réaction de traduction) a résulté en la production de 4 polypeptides ayant une masse de 135 kDa, 130 kDa, 110 kDa et 98 kDa). La présence du polypeptide de 110 kDa pourrait toutefois être dû à une contamination des segments 1, 2 et 3 par le segment 4 puis qu'une seule protéine de 110 kDa a été obtenue avec la traduction du segment 4. Ces quatre polypeptides ont été aussi traduits en très faibles quantités comparativement à ceux obtenus par la traduction des segments de taille inférieure comme les segments 5, 8 et 9. La faible traduction *in vitro* des segments de grande taille a déjà été rapportée pour d'autres réovirus (McCrae et Joklik, 1978). Une explication possible de ce phénomène serait la terminaison prématurée de leur synthèse.

La traduction des segments 5, 8 et 9 a produit des polypeptides de 75, 73 et 39 kDa respectivement. Par contre, aucun polypeptide n'a été détecté suite à la traduction *in vitro* des segments 6 et 7. Ceci pourrait toutefois être dû à un artefact causé par leur faible contenu en résidus méthionines, ce qui rend difficile leur détection par cette méthode.

La taille des polypeptides obtenus par traduction *in vitro* correspond dans tous les cas avec la masse moléculaire déterminée pour chaque segments génomiques (Figure 8), sauf pour le produit obtenu avec le segment 8. La taille calculée pour ce segment est de $1,13 \times 10^6$. Il pourrait donc coder pour un protéine d'environ 63 kDa alors que la protéine synthétisée *in vitro* a une taille de 73 kDa. De plus, si on considère la taille estimée à partir de l'ORF déterminée pour le segment 8, la protéine devrait avoir une masse de 59 kDa. Cette divergence pourrait être causé par la migration anormale de la protéine en SDS-PAGE due à l'abondance de résidus prolines (8%) retrouvés dans cette protéine. En effet, la structure particulière de cet acide aminé ralentirait la migration des protéines en gel de polyacrylamide (Ferguson *et al.* 1984). L'immunoprécipitation du produit de 73 kDa provenant de la traduction *in vitro* du segment 8 avec un antisérum anti-CfCPV et un anti-g8 (obtenu par immunisation génétique chez la souris) a permis de confirmer que cette protéine correspond bien au segment 8 (Figure 25). Récemment, Hagiwara et collaborateurs (1998) ont rapporté que la protéine codée par le segment 8 du BmCPV (P44) présente aussi une migration anormale en SDS-PAGE. La P44 du BmCPV possède une masse moléculaire prédite de 44 kDa, ce qui diffère significativement de la masse apparente observée en gel de polyacrylamide (55 kDa).

L'analyse électrophorétique des produits synthétisés a permis de construire une carte génomique partielle du CfCPV (Figure 26). Des données supplémentaires devront toutefois être obtenues afin de confirmer l'identité de chacun des produits de la traduction *in vitro*. Néanmoins, des études comparatives avec d'autres virus à ARNbc ont indiqués que la comigration des polypeptides est un bon indicateur pour l'association des protéines virales aux différents segments génomiques (McCrae et Joklik, 1978; Mertens et Dobos, 1982; Arias *et al.*, 1981).

6- QUANTIFICATION DES ARNm DU CfCPV (SEGMENTS 10 ET 8)

Les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du gène codant pour la polyédrine chez les cypovirus restent encore mal connus. Une augmentation constante du taux de synthèse de la polyédrine entre 36 et 96 heures pi a été observée *in vitro* avec le cypovirus EsCPV (Arella *et al.*, 1984). Ces auteurs ont suggéré la présence d'un mécanisme de régulation de la transcription ou de la traduction de l'ARNm codant pour ce polypeptide.

Dans le présent travail nous avons voulu vérifier si un taux de transcription plus élevé du gène codant pour la polyédrine, par rapport au gène codé par le segment 8, pourrait être en partie responsable de l'expression accrue de cette protéine pendant la réplication virale. Pour ce faire, nous avons d'abord mis au point un système RT-PCR-QC qui a permis d'analyser l'expression des ARNm codant pour ces deux gènes à partir de larves infectées au laboratoire par le CfCPV. L'ajout d'un standard interne d'ARN à l'échantillon d'ARN larvaire total avant la transcription inverse a permis de réduire la variabilité associée à la synthèse des ADNc provenant par exemple de l'appariement des amorces, ou de l'efficacité de la transcriptase inverse, puisque le standard interne était soumis aux mêmes conditions que l'échantillon.

Dans cette étude, nous avons pu démontré qu'une régulation de l'expression du gène 10 doit avoir lieu puisque ce gène est présent en faible quantité lors des premiers jours suivant l'infection, alors qu'une augmentation de son expression d'environ 45 fois a été observée à 8 jours pi. L'expression du gène 8 au contraire, diminue sensiblement au cours de l'infection. À partir de ces résultats on pourrait expliquer la modulation tardive du taux d'expression de la polyédrine observée chez EsCPV, mais la présence d'une quantité plus élevée du gène 8 suggère que des facteurs liés à la traduction, plutôt qu'à la transcription, seraient responsables de l'efficacité de l'expression de ce polypeptide. La modulation possible de l'initiation de la transcription chez les cypovirus est rapportée ici pour la première fois. Des travaux réalisés *in vitro* en utilisant la polymérase virale ont montré que le taux de transcription est similaire pour tous les segments génomiques et que leur

rapport molaire est inversement proportionnel à la taille du segment (Smith et Furuichi, 1980).

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis de mieux comprendre certains aspects de la biologie moléculaire du CfCPV. D'abord, l'analyse du profil électrophorétique et la détermination de la masse moléculaire des différents segments génomiques ont permis de faire un rapprochement entre le CfCPV et les membres de l'électrophorétype 7 de la classification actuelle. En plus du gène 10 codant pour la polyédrine, les séquences déterminées pour les segments 5, 8 et 9 du CfCPV ont aussi permis les premières comparaisons du genre cypovirus avec d'autres membres de la famille des *Reoviridae*. Aucune homologie significative n'a été relevée avec les autres réovirus, mais ceci apparaît toutefois comme un atout pour l'utilisation du CfCPV dans un programme de lutte biologique contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

La comparaison des séquences en nucléotides et acides aminés du gène codant pour la polyédrine du CfCPV avec celles d'autres cypovirus disponibles, n'a pas non plus révélé d'homologie particulière. Malgré tout, certaines caractéristiques communes des protéines dans leur portion N-terminale ont été observées. En effet, 7 régions ont été identifiées parmi les 116 premiers acides aminés. Il est possible que ce domaine de la polyédrine soit essentiel à la formation des corps d'inclusion, mais des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Lorsque la polyédrine du cypovirus du CfCPV a été exprimée dans un vecteur procaryotique, une structure cristalline a été observée. Ceci permet de conclure que la polyédrine possède toute l'information nécessaire pour réaliser le processus de cristallisation et qu'aucun apport provenant d'autres protéines virales ou de facteurs cellulaires n'est requis. De plus, le système d'expression développé dans cette thèse, pourrait être utilisé pour l'encapsidation éventuelle d'autres agents pathogènes.

Le système RT-PCR-QC que nous avons mis au point a permis d'analyser de façon quantitative l'expression des ARNm codant pour la polyédrine à partir de larves infectées en laboratoire par le CfCPV. Les résultats obtenus démontrent que la modulation de l'initiation de la transcription est probable et suggèrent que des facteurs liés à la traduction,

plutôt qu'à la transcription, seraient responsables de l'efficacité de l'expression de la polyédrique.

La recherche fondamentale sur les cypovirus a beaucoup progressée, mais il reste de nombreux points à éclaircir, notamment en ce qui concerne les étapes de la multiplication virale, les mécanismes impliqués dans la réplication du génome et l'assemblage de la particule virale. L'analyse génomique a contribué à la clarification du processus évolutif des virus (Van Regenmortel, 1990). Pour cette raison, l'analyse des séquences d'autres cypovirus pourrait apporter des informations sur l'évolution à l'intérieur de ce groupe de virus, de même que sur l'ensemble de la famille des *Reoviridae*. De plus, le séquençage du génome de différents cypovirus devrait permettre d'établir une classification des souches virales plus précise et plus représentative des relations phylogénétiques entre les isolats viraux.

Du point de vue de la recherche appliquée, l'obtention des outils moléculaires et sérologiques spécifiques au CfCPV développés au cours de ce travail vont permettre de suivre la présence du virus dans des populations de tordeuse, de déterminer la stabilité du virus et son impact écologique dans un éventuel programme de lutte biologique contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Bien que les cypovirus provoquent une maladie chronique plutôt que létale, ils possèdent certaines caractéristiques intéressantes pour leur utilisation dans des programmes de lutte biologiques. Le développement de bio-insecticides améliorés par le génie génétique, en mettant l'accent sur les gènes impliqués dans la spécificité d'hôte et la virulence sera donc nécessaire.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le docteur Maximilien Arella, pour avoir supervisé mes travaux de doctorat, ainsi que mon codirecteur, le docteur Claude Guertin, pour son encadrement et ses conseils.

Je voudrais souligner l'excellent travail effectué par mesdames Lise Forget et Joanne Roger du service de séquençage dirigé par le docteur Peter Tijssen, et également à monsieur Robert Alain du service de microscopie électronique, pour ses conseils et son expertise.

Je veux remercier d'une façon particulière mon collègue et ami Joël Heppell pour son aide précieuse lors de la rédaction de cette thèse, ainsi que Jean Bergeron et Micheline Letarte, pour leur collaboration technique, leur soutien constant et leur amitié. De même j'adresse toute ma gratitude à ceux et celles qui ont collaboré de près ou de loin à mes travaux de doctorat et qui ont rendu mon séjour à l'INRS-Institut Armand-Frappier dès plus agréable.

Finalement je veux exprimer ma reconnaissance envers l'Institut Armand-Frappier et l'Institut pour la répression de ravageurs forestiers du Canada particulièrement au docteur William Kaupp pour leur support financier.

RÉFÉRENCES

- ANDREADIS, T.G. (1981). A new cytoplasmic polyhedrosis virus from the saltmarsh mosquito, *Aedes cantator* (Diptera: Culicidae). *J. Invertbr. Pathol.* 37: 160-167.
- ANONYME. (1995). Abrégé de statistique forastières Canadiennes 1995. Conseil Canadien des ministres des forêts. Ottawa, 1996.
- ANONYME. (1996). Insectes et maladies des arbres au Québec 1996. Ministère des ressources naturelles. Direction de la conservation des forêts.
- ANTCZAK, J.B. et W.K. JOKLIK. (1992). Reovirus genome segment assortment into progeny genomes studied by the use of monoclonal antibodies directed against reovirus proteins. *Virology* 187: 760-776.
- ANTCZAK, J.B., R. CHMELO, D.J. PICKUP, et W.K. JOKLIK. (1982). Sequences at both termini of the 10 genes of reovirus serotype 3 (strain dearing). *Virology* 121: 307-319.
- ARELLA, M., S. BELLONCIK et G. DEVAUCHELLE. (1984) Protein synthesis in a *Lymantria dispar* cell line infected by cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Virol.* 52: 1024-1027.
- ARELLA, M., C. LAVALLEE, S. BELLONCIK. et Y. FURUICHI. (1988). Molecular cloning and characterization of CPV polyhedrin and its viable deletion mutant gene. *J. Virol.* 62: 211-217.
- ARIAS, C.F., S. LOPEZ et R.T. ESPEJO. (1981). Gene protein products of SA11 Simian Rotavirus genome. *J. virol.* 41: 42-50.
- ARNOTT, H.J., K.M. SMITH et S.L. FULLILOVE. (1968). Ultrastructure of a cytoplasmic polyhedrosis virus affecting the monarch butterfly *Danaus plexippus*. *J. Ultrastruct. Res.* 24: 479.
- ARIF, B.M. (1995). Recent advances in the molecular biology of entomopoxviruses. *J. Gen. Virol.* 76: 1-13.

- BANERJEE, A.K. (1980). 5' terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 44: 175-205.
- BANVILLE, M., F. DUMAS, S. TRIFIRO, B. ARIF et C. RICHARDSON. (1992). The predicted amino acid sequence of the spheroidin protein from *Amsacta moorei* entomopoxvirus: lack of homology between major occlusion body proteins of different poxviruses. *J. Gen. Virol.* 73: 559-566.
- BELL, M.R. (1977). Pink bollworm: Effects of infection by a cytoplasmic polyhedrosis virus on diapausing larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70:675.
- BELLEMARE, N. et S. BELLONCIK. (1981). Études au laboratoire des effets d'une polyédrosis cytoplasmique sur le ver gris blanc *Euxoa scandens* (Lépidoptère: Noctuidae Agrotinae). *Ann. Soc. Entomol. Que.* 26: 28.
- BELLONCIK, S. (1989). Cytoplasmic polyhedrosis viruses-Reoviridae. *Adv. Virus Res.* 37: 173-209.
- BELLONCIK, S., J. LIU, D. SU et M. ARELLA. (1996). Identification and characterization of a new cypovirus, type 14, isolated from *Heliothis armigera*. *J. Invertebr. Pathol.* 67: 41-47.
- BENDAYAN, M. (1984). Protein A-gold electron microscopic immuno-cytochemistry: methods, applications, and limitations. *J. Electron Microscopy Technique* 1: 243-270.
- BIRD, F.T. (1969). Infection and mortality of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* and forest caterpillar, *Malacosoma disstria*, caused by Nuclear and Cytoplasmic polyhedrosis viruses. *Canadian Entomology* 101: 1269-1285.
- BIRD, F.T. (1966). The development of a Cytoplasmic Polyhedrosis virus in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clemens). *Canadian J. Microbiol.* 12: 337-339.
- BIRNBOIM, H.C. et J. DOLY. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523.

- BLAIS, J.R. (1985). The ecology of the eastern spruce budworm: A review and discussion. In: Recent advances in spruce budworm research (C.J. Sanders, R.W. Stark, E.J. Mullins et J. Murphy, eds.). Pags. 49-59. Canadian Forestry Service. Ottawa.
- BROUSSEAU, R. et L. MASSON. (1988). *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins: gene structure and mode of action. *Biotechnol. Adv.* 6: 697-724.
- CAMERON, J.M. (1975). Essais en forêt des virus de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, 1971-1973. Dans: Traitements aériens pour combattre les insectes forestiers au Canada. Prebble, M.L. (dir.). Pêches et Environ. Can., Ottawa (Ont.) XII. Pages 149-152.
- CASHDOLLAR, L.M., J. ESPARZA, G.R. HUDSON, R. CHMELO, P.N.K. LEE et W.K. JOKLIK. (1982). Cloning the double stranded RNA genes of reovirus: Sequence of cloned S2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 7644-7648.
- CUNNINGHAM, J.C. (1985). Status of virus as biocontrol agents for spruce budworms. Dans: Proc. Symp. Microbial Control of Spruce Budworms and Gypsy Moths. Windsor Lock, Conn. 1984. USDA For Serv. Rep. GTR-NE-100. Pages 61-67.
- CUNNINGHAM, J.C. (1982). Fields trials with baculoviruses: control of forest insect pests. Pags. 335-386 in E. Kursstaki (ed), *Microbial and Viral Pesticides*. Dekker, New York.
- CUNNINGHAM, J.C. et G.M. HOWSE. (1984). *Choristoneura fumiferana* (Clemens), spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). Dans: *Biological control programmes against insects and weeds in Canada 1969-1980*. Kelleher, J.S. et Hulme, M.A. eds. Commonw. Agric. Bureaux, Slough, Eng. Pages 277-279.
- CUNNINGHAM, J.C. et W.J. KAUPP. (1995). Les virus entomopathogènes. Dans: *Insectes forestiers ravageurs au Canada*. Armstrong, J.A. et Ives, W.G.H. Ressources naturelles Canada, Service canadien des forêts. Ottawa, 1995. Pages 327-340.

- DRYDEN, K.A., WANG, G., YEAGER, M., NIBERT, M.L., COOMBS, K.M., FURLONG, D.B., FIELDS, B.N. et T.S. BAKER. (1993). Early steps in Reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: Analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction.
- ECHEVERRY, F., J. BERGERON, W. KAUPP, C. GUERTIN et M. ARELLA. (1997). Sequence analysis and expression of the polyhedrin gene of *Choristoneura fumiferana* cytoplasmic polyhedrosis virus (CfCPV). *Gene* 198: 399-406.
- ECOBICHON, D.J. (1990). Chemical management of forest pest epidemic: A case study. *Biomed. environ. sci.* 3: 217-239.
- EGAWA, K. et M.D. SUMMERS. (1972). Solubilization of *Trichoplusia ni* granulosis virus proteinic crystal. *J. Invert. Pathol.* 19: 395-404.
- FEDERICI, B.A. et E.I. HAZARD. (1975). Iridovirus and cytoplasmic polyhedrosis viruses in the freshwater daphnid *Simocephalus expinosus*. *Nature*, 254: 327-328.
- FERGUSON, B.N., N. JONES, J. RICHTER et M. ROSENBOURG. (1984). Adenovirus E1a gene product expressed at high levels in *Escherichia coli* is functional. *Science*, 224: 1343-1346.
- FOSSIEZ, F., S. BELLONCIK et M. ARELLA. (1989). Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Euxoa scandens* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (EsCPV). *Virology* 169: 462-465.
- FOUILLAUD, M., et G. MOREL. (1994). Characterization of cytoplasmic and nuclear polyhedrosis viruses recovered from the nest of *Polistes hebraeus* F. (Hymenoptera; Vespidae). *J. Invertebr. Pathol.* 64(2): 89-95.
- FRANCKI, R.I.B., C.M. FAUQUET, D.L. KNUDSON, et F. BROWN. (1991). "Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on taxonomy of viruses". *Archives of Virology. Suppl.* 2. Springer-Verlag, Wien.

- FROHMAN, M.A., M.K. DUSH et G.R. MARTIN. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002.
- FUJII-KAWATA, I., K. MIURA et M. FUKU. (1970). Segments of genome of viruses containing double-stranded RNA. *J. Mol. Biol.* 51: 247-253.
- FURUICHI, Y. (1981). Allosteric stimulatory effect of S-Adenosyl-methionine on the RNA polymerase in cytoplasmic polyhedrosis virus. A model for the positive control of eukaryotic transcription. *J. Biol. Chem.* 256: 483-493.
- FURUICHI, Y. (1974). Methylation coupled transcription by virus associated transcriptase of cytoplasmic polyhedrosis virus containing double stranded RNA. *Nucleic Acids Res.* 1: 809-822.
- FURUICHI, Y. et K. MIURA. (1975). A blocked structure at the 5' terminus of the mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature* 253: 374-375.
- GALINSKI, M.S., K.C. CHOW, G.F. ROHRMANN, G.D. PEARSON, et G.S. BEAUDREAU. (1982). Size determination of *Orgyia pseudotsugata* cytoplasmic polyhedrosis virus genomic RNA. *Virology* 123: 328-335.
- GALINSKI, M.S., V.H. STANICK, G.F. ROHRMANN et G.S. BEAUDREAU. (1983). Comparison of sequence diversity in several cytoplasmic polyhedrosis viruses. *Virology* 130: 372-380.
- GALINSKI, M.S., Y. YU, B.R. HEMINWAY et G.S. BEAUDREAU. (1994). Analysis of the C-polyhedrin genes from different geographical isolates of a type 5 cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol* 75: 1969-1974.
- GILLILAND, G., S. PERRIN, K. BLANCHARD et H.F. BUNN. (1990). Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2725-2729.

- GREENBANK, D.O. (1963). Host species an the spruce budworm, in: The dynamics of epidemic spruce budworm populations (Morris, R.F., ed.), pag. 219-223. Mem. Entomol. Soc. Can. 31.
- HAGIWARA, K., M. TOMITA, K. NAKAI, J. KOBAYASHI, S. MIYAJIMA et T. YOSHIMURA. (1998). Determination of the nucleotide sequence of *Bombix mori* cytoplasmic polyhedrosis virus segment 9 and its expression in BmN4 cells. J. Virol. 72: 5762-5768.
- HAMES, B.D. (1981). "An introduction to polyacrylamide gel electro-phoresis", dans Hames, B.D. et Rickwood, D. (ed.): Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. IRL Press.Oxford. pag. 1-91.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on transfomation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- HARLOW, E. et D. LANE. (1988). Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- HAYASHI, Y. et F.T. BIRD. (1970). The isolation of Cytoplasmic Polyhedrosis Virus from the white-marked tussock moth, *Orgyia leucostigma* (Smith). Can. J. Microbiol. 16: 695-701.
- HEWICK, R.M., M.W. HUNKAPILLER, L.E. HOOD et W.S. DREYER. (1981). A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. J. Biol Chem. 256: 7990-7997.
- HILLS, G.J. et K.M. SMITH. (1959). Further studies on the isolation and crystallization of insect cytoplasmic viruses. J. insect Pathol. 1: 121.
- HÖFTE, H. et H.R. WHITELEY. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
- HOSAKA, Y. et K. AIZAWA. (1964). The fine structure of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus). J. Insect Pathol. 6: 53.

- HUA, J., E.A. MANSELL et J.T. PATTON. (1993). Comparative analysis of the Rotavirus NS53 gene: conservation of basic and cysteine-rich regions in the protein and possible stem-loop structure in the RNA. *Virology* 196: 372-378.
- HUKUHARA, T. (1971). Variation in cytoplasmic polyhedrosis virus. Dans: The cytoplasmic polyhedrosis viruses of silkworm. Aruga, H. et Tanada, Y. eds. University of Tokyo Press, pages 61-78.
- HUKUHARA T. et J.R. BONAMI. (1991). REOVIRIDAE Dans "Atlas of invertebrate viruses". Adams, J.R. and Bonami, J.R. eds. Boca Raton: CRC press, Inc. USA
- IGNOFFO, C.M. et J.R. ADAMS. (1966). A cytoplasmic polyhedrosis virus, *Smithiavirus pectinophorae* sp. n. of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders). *J. Invertebr. Pathol.* 8: 59.
- IMAI, M., M.A. RICHARDSON, N. IKEGAMI, A.J. SHATKIN et Y. FURUICHI. (1983). Molecular cloning of double-stranded RNA viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 373-377.
- IRVING, H.J. et F.E. WEBB. (1981). Forest protection against spruce budworm in New Brunswick. *Pulp Pap. Can.* (January), 3-8.
- ISHIMORI, N. (1934). Contribution à l'étude de la Grasserie du ver à soie. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* 116:1169.
- IWASHITA, Y. (1971). Histopathology of cytoplasmic polyhedrosis. Dans: The cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm. Aruga, H. et Tanada, Y. eds. University of Tokyo Press, pages 79-101.
- JARVIS, D.L., D.A. BOHLMAYERS et A. GARCIA. (1991). Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of baculovirus polyhedrin protein. *Virology* 185: 795-810.
- JOKLIK, W.H. (1981). Structure and function of the reovirus genome. *Microbiol. Rev.* 45: 483-501.

- JOKLIK, W.K. (1980). The structure and function of the reovirus genome. Dans: Genetic variation of viruses. Palese, P. et Roizman, B. eds. Ann. N.Y. Acad. Sci. 354:107.
- JOKLIK, W.H. (1974). Reproduction of Reoviridae. Dans Comprehensive Virology, vol. 2 (Fraenkel-Conrat, H. et Wagner, R. eds.). Plenum Press, New York, pages 231-334.
- JOKLIK, W.H. et M.R. RONER. (1996). Molecular recognition in the assembly of the segmented reovirus genome. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 53: 249-281.
- KALMAKOFF, J., L.J. LEWANDOWSKI et D.R. BLACK. (1969). Comparison of the ribonucleic acid subunits of reovirus, cytoplasmic polyhedrosis virus, and wound tumor virus. J. Virol. 4: 851-856.
- KAUPP, W.J. et P.M. EBLING. (1990). Response of third, fourth, fifth and sixth instar spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), larvae to nuclear polyhedrosis virus. Can. Entomol. 122: 1037-1038.
- KAWASE, S. et I. KAWAMORI. (1968). Chromatographic studies on RNA synthesis on the midguts of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with a cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Invertbr. Pathol. 12: 395.
- KAWASE, S. et S. MIYAJIMA. (1969). Immunofluorescences studies of the multiplication of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol. 13: 330.
- KOBAYASHI, M. (1971). Replication cycles of cytoplasmic polyhedrosis virus as observed with the electron microscope. Dans: The cytoplasmic polyhedrosis viruses of silkworm. Aruga, H. et Tanada, Y. eds. University of Tokyo Press, pages 103-128.
- KUCHINO, Y., S. NISHIMURA, R.E. SMITH et Y. FURUICHI. (1982). Homologous terminal sequences in the double-stranded RNA genome segments of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm *Bombyx mori*. J. Virol. 44: 538-543.
- KUDO, H., I. UYEDA et E. SHIKATA. (1991). Viruses in the phytoreovirus genus of the Reoviridae family have the same conserved terminal sequences. J. Gen. Virol. 72: 2857-2866.

- KYTE, J. et R.F. DOOLITTLE. (1982). A simple method for displaying the hydrophathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- LAVALLÉE, C., M. ARELLA, S. BELLONCIK et Y. FURUICHI. (1993). Expression in *Escherichia coli* of the cloned polyhedrin gene of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus. *Protein Expression and Purification* 4: 570-579.
- LEWANDOWSKI, L.J. et B.L. TRAYNOR. (1972). Comparison of the sstructure and polypeptides composition of three double-stranded ribonucleic acid containing viruses (Diplornaviruses): cytoplasmic polyhedrosis virus, wound tumor virus, and reovirus. *J. Virol.* 10: 1053-1070.
- LEWANDOWSKI, L.J., J. KALMAKOFF et Y. TANADA. (1969). Characterization of a ribonucleic acid polymerase activity associated with purified cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Virol.* 4: 857-865.
- LI, Z., N.M. UPADHYAYA, W. KOSITRATANA, A.J. GIBBS et M. WATERHOUSE. (1996). Genome segment 5 of rice ragged stunt virus encodes a virion protein. *J. Gen. Virol.* 77: 3155-3160.
- MARTINSON, H.G. ET L.J. LEWANDOWSKI. (1974). Sequence homology studies between the double-stranded RNA genome of Cytoplasmic polyhedrosis virus, wound tumor virus and reovirus strains 1, 2 and 3. *Intervirolgy* 4: 91-98.
- MASON, B.B., D.Y. GRAHAM et M.K. ESTES. (1983). Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.* 46: 413-423.
- MATTHEWS, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. *Intervirolgy* 17: 1-190.
- MATTSON, W.J., G.A. SIMMONS et J.A. WITTER. (1988). The spruce budworm in eastern North America. Dans: *Dynamics of forest insect populations*. Berryman, A.A. ed. Plenum publishing corporation, pages 309-330.

- MATSUDAIRA, P.J. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038.
- McCRAE, M.A. et W.K. JOKLIK. (1978). The nature of the polypeptide encoded by each of the 10 double-stranded RNA segments of Reovirus type 3.
- McMORRAN, A.R. (1965). A synthetic diet for the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 97: 68-72.
- MERTENS, P.P.C. (1998). The *Reoviridae*. Draft Taxonomy report from the *Reoviridae* study group for ICTV 1/9/98.
- MERTENS, P.P.C. et P. DOBOS. (1982). The messenger RNA of infectious pancreatic necrosis virus is polycistronic. *Nature* 297: 243-246.
- MERTENS, P.P.C. et D.V. SANGAR. (1985). Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses. *Virology* 140: 55-67.
- MERTENS, P.P.C., N.E. CROOK, R. RUBINSTEIN, S. PEDLEY et C.C. PAYNE. (1989). Cytoplasmic polyhedrosis virus classification by electropherotype: validation by serological analyses and agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Virol.* 70: 173-185.
- MIURA, K.I. (1981). The cap structure of eukaryotic messenger RNA as a mark of a strand carrying protein information. *Adv. Biophys* 14: 205-238.
- MIURA, K., I. FUJII, T. SAKAKI, M. FUKU et S. KAWASE. (1968). Double stranded-ribonucleic acid from cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Virol.* 2: 1211-1222.
- MIYAJIMA, S. et S. KAWASE. (1969). Hemagglutination with cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *Virology* 39: 347-348.

- MORI, H., R. ITO, H. NAKAZAWA, M. SUMIDA, F. MATSUBARA et Y. MINOBE. (1993). Expression of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin in insect cells by using a baculovirus expression vector, and its assembly into polyhedra. *J. Gen. Virol.* 74: 99-102.
- MOSS, S.R., A. FUKUSHO et P.A. NUTTALL. (1990). RNA segment 5 of Broadhaven virus, a tick-borne orbivirus, shows sequence homology with segment 5 of bluetongue virus. *Virology* 179: 482-484.
- MURPHY, F.A., C.M. FAUQUET, D.H.L. BISHOP, S.A. GHABRIAL, A.W. JARVIS, G.P. MARTELLI, M.A. MAYO et M.D. SUMMERS. (1995). *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses.* Arch. Virol. Suppl. 10, Springer-verlag, Wien.
- NEILSON, M.M. (1965). Effect of a cytoplasmic polyhedrosis on adult Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 7: 306.
- NEILSON, M.M. (1963). Disease and the spruce budworm. Dans: *The dynamic of epidemic spruce budworm populations.* Morris, R.F ed. *Mem. Entomol. Soc. Can.* 31. Pages 272-287.
- NISHIMURA, A. et Y. HOSAKA. (1969). Electron microscopic study on RNA of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm. *Virology* 38: 550-557.
- NODA, H., N. NAKASHIMA et T. OMURA. (1994). Cloning of the *Nilaparvata lugens* reovirus genome: conserved terminal nucleotide sequences and nucleotide sequence of genome segment S10.
- PAYNE, C.C. (1982). Insects viruses as control agents. Dans: *Parasites as biological control agents.* Anderson, R.M. et Canning, E.U. eds. *Parasitology.*
- PAYNE, C.C. (1981). Cytoplasmic polyhedrosis virus. Dans: *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases.* Davidson, E.W. ed. Allanheld, Osmun, Totowa, New Jersey. Pages 61-100.

- PAYNE, C.C. et P.P. MERTENS. (1983.). Cytoplasmic polyhedrosis viruses. Dans *The Reoviridae* , pp. 425-505. Edited by W.K. Joklik. New York: Academic Press.
- PAYNE, C.C. et C.F. RIVERS. (1976). A provisional classification of cytoplasmic polyhedrosis viruses based on the sizes of the RNA genome segments. *J. Gen. Virol.* 33: 71-81.
- PAYNE, C.C. et T.W. TINSLEY. (1974). The structural proteins and RNA components of a Cytoplasmic Polyhedrosis Virus from *Nymphalis io* (Lepidoptera: Nymphalidae). *J. Gen. Virol.* 25: 291-302.
- PAYNE, C.C., P.P.C. MERTENS et K.A. KATAGIRI. (1978). comparative study of three closely related cytoplasmic polyhedrosis viruses. *J. Invert. Pathol* 32: 310-318.
- PAYNE, C.C., M. PIASECKA-SERAFIN et B. PILLEY. (1977). The properties of two recent isolates of cytoplasmic polyhedrosis viruses. *Intervirol* 8: 155-163.
- QUIOT, J.M. et S. BELLONCIK. (1977). Caractérisation d'une polyédrose cytoplasmique chez le lépidoptère *Euxoa scandens* Riley (Noctuidae: Agrotinae): Études *in vivo* et *in vitro*. *Arch. Virol.* 55: 145-153.
- ROHRMANN, G.F. (1992). Baculovirus structural proteins. Review article. *J. Gen. Virol.* 73: 749-761.
- ROHRMANN, G.F. (1986). Polyhedrin structure. *J. Gen. Virol.* 67: 1499-1513.
- ROHRMANN, G.F., T.J. BAILEY, B. BRIMHALL, R.R. BECKER et G.S. BEAUDREAU. (1979). Tryptic peptide analysis and NH₂-terminal amino acid sequences of polyhedrin of two baculoviruses from *Orgyia pseudotsugata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4976-4980.
- ROHRMANN, G.F., M.N. PEARSON, T.J. BAILEY, R.R. BECKER et G.S. BEAUDREAU. (1981). N-terminal polyhedrin sequences and occluded baculovirus evolution. *J. Mol. Evol.* 17: 329-333.

- RUBINSTEIN, R. (1979). Some physical characteristics of a cytoplasmic polyhedrosis virus of *Heliothis armigera*. *Intervirology* 12: 340-344.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSH et T. MANIATIS. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SHAW, J.G. (1996). Dans: *Fundamental Virology, Third Edition* edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, *et al.* Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, PA, pages 367-400.
- SIKOROWSKI, P.P. et A.C. THOMPSON. (1979). Effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on diapausing *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* 33: 66.
- SILVERSTEIN, S.C., C. ASTELL, D.H. LEVIN, M. SCHONBERG et G. ACS. (1972). The mechanisms of reovirus uncoating and gene activation *in vivo*. *Virology* 47: 797-806
- SIMMONS, C.L. et P.P. SIKOROWSKI. (1973). A laboratory study of the effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 22: 369.
- SMITH, R.E. et Y. FURUICHI. (1981). The double stranded RNA genome segments of cytoplasmic polyhedrosis virus are independently transcribed. *J. Virol.* 41: 326-329.
- SMITH, R.E. et Y. FURUICHI. (1980). Gene mapping of cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm by the full-length mRNA prepared under optimized conditions of transcription *in vitro*. *Virology* 103: 279-290.
- STORER, G.B., M.G. SHEPHERD et J. KALMAKOFF. (1974a). Enzyme activities associated with cytoplasmic polyhedrosis virus from *Bombyx mori*. I. Nucleotide phosphohydrolase and nuclease activities. *Intervirology* 2: 87-94.

- STORER, G.B., M.G. SHEPHERD et J. KALMAKOFF. (1974b). Enzyme activities associated with cytoplasmic polyhedrosis virus from *Bombyx mori*. II. Nucleotide phosphohydrolase and nuclease activities. *Intervirology* 2: 193.
- THOMPSON, A.C. et P.P. SIKOROWSKI. (1980). Fatty acid and glycogen requirement of *Heliothis virescens* infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. *Comp. Biochem. Physiol. B* 66: 93.
- UPADHYAYA, N.M., K. RAMM, J.A. GELLATLY, Z. LI, W. KOSITRATANA et P.M. WATERHOUSE. (1998). brief report: Rice ragged stunt oryzavirus genome segment S4 could encode an RNA dependent RNA polymerase and a second protein of unknown function. *Arch. Virol.* 143: 1815-1822.
- VAGO, C., O. CROISSANT et P. LEPINE. (1959). Processus de l'infection à virus à partir de corps d'inclusion de "polyédrie cytoplasmique" ingérés par le Lépidoptère sensible. *Mikroskopie* 14: 36.
- VARELA, R. et J. BENAVENTE. (1994). Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *J. Virol.* 68: 6775-6777.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1990). Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirology* 31: 241-254.
- WERTHEIMER, A.M., S.Y. CHEN, R.T. BORCHARDT et Y. FURUICHI. (1980). S-Adenosylmethionine and its analogs. Structural features correlated with synthesis and methylation of mRNAs of cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Biol. Chem.* 255: 5924-5930.
- WHITT, M.A. et J.S. MANNING. (1988). Stabilization of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus occlusion body matrix by zinc chloride. *J. Invert. Pathol.* 51: 278-280.
- WHITT, M.A. et J.S. MANNING. (1987). Role of chelating agents, monovalent anion and cation in the dissociation of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus occlusion body. *J. Invert. Pathol.* 49: 61-69

YAZAKI, K. et K.I. MIURA. (1980). Relation of the structure of cytoplasmic polyhedrosis virus and the synthesis of its messenger RNA. *Virology* 105: 467-479.

ANNEXE A

Liste de communications

BELKOSKY, D., W. KAUPP, F. ECHEVERRY et C. GUERTIN. (1995). A chemiluminescent probing technique for the detection of CPV in the spruce budworm (Lepidoptera: *Tortricidae*). ESA Annual Meeting. Las Vegas, NV.

ECHEVERRY, F., J. BERGERON, W. KAUPP et M. ARELLA. (1994). Développement de sondes moléculaires pour la détection du virus de la polyédrose cytoplasmique de *Choristoneura fumiferana* (CfCPV). 121^e Réunion Annuelle de la Société d'entomologie du Québec, Trois-Rivières, Québec.

ECHEVERRY, F., J. BERGERON, W. KAUPP, C. LUCAROTTI et M. ARELLA . (1993). Cloning and sequencing of the polyhedrin gene of *Choristoneura fumiferana* cytoplasmic polyhedrosis virus (CfCPV). American Society for Virology, 12th annual meeting, Davis (Californie).

ECHEVERRY, F., J. BERGERON, W. KAUPP, C. GUERTIN, C. LUCAROTTI et M. ARELLA. (1993). Sequence of the polyhedrin gene of *Choristoneura fumiferana* cytoplasmic polyhedrosis virus (CfCPV). XXVIth Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology. Asheville, NC.

ANNEXE B

Copie de l'article publié