

Au Dr. François Demers qui a cru en moi plus que moi-même.
Aux étudiant(e)s dont les fruits de leur labeur n'ont pas abouti à un diplôme.

Université du Québec

Mémoire
présenté à
l'Institut Armand-Frappier
comme exigence partielle
de la maîtrise en virologie et immunologie

par
Frédéric Kendirgi

**Dissémination de l'expression du gène de la
polyédrine du virus de la polyédrose cytoplasmique
d'*Euxoa scandens* , dans le ver à soie (*Bombyx mori*),
par deux types de baculovirus recombinants.**

Juillet 1995

Table des matières

| | |
|---|------|
| TABLE DES MATIÈRES..... | I |
| LISTE DES FIGURES..... | V |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | VIII |
| SOMMAIRE..... | X |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| REVUE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 4 |
| 1 Introduction..... | 5 |
| 2 Les Virus des Polyédroses Cytoplasmiques (VPC)..... | 6 |
| 2.1 Généralités..... | 6 |
| 2.1.1 Historique..... | 7 |
| 2.1.2 Morphologie des virions..... | 8 |
| 2.1.3 Caractérisation génomique..... | 9 |
| 2.1.4 Cycle de réplication des VPC..... | 10 |
| 2.1.5 Expression des gènes..... | 12 |
| 2.2 Caractéristiques de l'infection..... | 13 |
| 2.2.1 Cytopathologie..... | 13 |
| 2.2.2 Spécificité de l'infection..... | 14 |
| 2.2.3 Physiopathologie..... | 14 |
| 3 Les Virus des Polyédroses Nucléaires (VPN)..... | 16 |
| 3.1 Généralités..... | 16 |
| 3.2 Caractéristiques du virus et de la virose..... | 16 |
| 3.2.1 Le gène de la polyédrine des VPN..... | 19 |
| 3.2.2 Le gène de la protéine p10..... | 20 |
| 3.3 Les baculovirus comme vecteurs d'expression..... | 24 |
| 4 Les polyédrines cypovirales..... | 24 |
| 4.1 Généralités..... | 24 |
| 4.2 Le processus de cristallisation de la polyédrine..... | 25 |
| 4.3 Cristallisation en fonction de la cellule infectée..... | 26 |

II

| | |
|---|----|
| 4.4 Facteurs influençant la cristallisation. | 28 |
| 4.4.1 Influence de la cellule. | 28 |
| 4.4.2 Influence de l'environnement extracellulaire. | 29 |
| 4.4.3 Influence de la température. | 31 |
| 4.4.4 Influence génétique de la souche virale. | 32 |
| 5 Présence simultanée de deux polyédrides dans une même cellule. | 32 |
| 5.1 Double infection cypovirale. | 33 |
| 5.2 Double infection VPC/VPN. | 33 |
| 5.3 Double infection VPC/Virus de la flacherie et Iridovirus. | 35 |
| Matériel et Méthodes. | 36 |
| 1 Maintien de la lignée NISES BoMo- 15-AIIC. | 37 |
| 2 Élevage de larves de <i>Bombyx mori</i> | 37 |
| 3 Préparation de l'inoculum viral. | 37 |
| 4 Multiplication virale <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> | 38 |
| 4.1 Infection de BoMo-15-AIIC par un VPC et un VPN. | 38 |
| 4.1.1 Infection de culture cellulaire en boîte (F25). | 38 |
| 4.1.2 Infection de culture cellulaire en cupule (Lames Labtek™). | 39 |
| 4.2 Infection de larves. | 39 |
| 4.2.1 Par ingestion de polyèdres viraux (<i>per os</i>) | 39 |
| 4.2.2 Par injection de virus dans l'hémolymphe. | 39 |
| 5 Extraction de l'ARN du VPC d' <i>Euxoa scandens</i> (<i>Es</i>). | 40 |
| 6 Purification du gène de la polyédride d' <i>Es</i> VPC. | 41 |
| 7 Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène cypoviral | 44 |
| 7.1 Choix des amorces. | 44 |
| 7.2 Réaction de transcription inverse. | 44 |
| 7.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR). | 45 |
| 7.4 Purification du produit d'amplification. | 46 |
| 8 Clonage et séquençage de l'ADNc synthétisé. | 46 |
| 8.1 Insertion de l'ADNc dans le plasmide pUC-18. | 46 |
| 8.2 Transformation de bactéries compétentes. | 49 |
| 8.3 Détection de pUC contenant l'insert (pUC-pol) | 49 |
| 8.4 Confirmation de la présence de l'insert. | 54 |
| 8.5 Amplification des clones bactériens positifs. | 54 |

III

| | |
|--|----|
| 9. Séquençage de l'ADNc..... | 59 |
| 10. Construction des vecteurs baculoviraux recombinants..... | 59 |
| 10.1 Choix des vecteurs baculoviraux..... | 59 |
| 10.2 Extraction de l'ADNc du pUC-pol | 60 |
| 10.3 Linéarisation des vecteurs PBNT1 et pBm4. | 60 |
| 10.4 Ligation de l'ADNc dans les vecteurs baculoviraux..... | 65 |
| 10.5 Isolement des clones possédant les vecteurs avec l'insert (PBNT1-pol et pBm4-pol)..... | 70 |
| 11 Obtention des baculovirus recombinants..... | 70 |
| 11.1 Infection de cellules BoMo-15-AIIC..... | 70 |
| 11.1.1 Extraction d'ADN viral à partir de virions inclus dans des polyèdres purifiés..... | 70 |
| 11.1.2 Co-transfection de l'ADN viral sauvage avec PBNT1- Pol ou pBm4 -pol dans les cellules..... | 73 |
| 11.2 Isolement des baculovirus recombinants. | 74 |
| 11.2.1 Isolement de populations virales. | 74 |
| 11.2.2 Détection des populations virales recombinantes par hybridation de type Dot Blot. | 74 |
| 11.3 Amplification des populations virales recombinantes isolées. | 80 |
| 12 Détection du produit d'expression de l'ADNc par immunobuvardage de type Western..... | 83 |
| 13 Détection de l'ADNc dans les virus recombinants..... | 84 |
| 13.1 Extraction de l'ADN viral recombinant. | 84 |
| 13.2 Digestion de l'ADN viral par des endonucléases. | 85 |
| 13.3 Transfert de l'ADN sur membrane. | 85 |
| 13.4 Hybridation de type Southern à la Digoxigénine (Dig.)..... | 90 |
| 14 Détection de la polyédrine par immunoperoxydase..... | 91 |
| 14.1 Immunoperoxydase sur tapis cellulaire infecté..... | 91 |
| 14.2 Immunoperoxydase sur coupes histologiques de larves infectées..... | 92 |
| 15 Détection du produit d'expression de l'ADNc au microscope électronique. | 92 |
| 15.1 Préparation des échantillons..... | 92 |
| 15.2 Marquage à l'or colloïdal. | 93 |

IV

| | |
|---|-----|
| Résultats..... | 95 |
| 1 Séquence de l'ADNc du gène de la polyédrine cypovirale..... | 96 |
| 2 Étude de l'expression de la polyédrine cypovirale <i>in vitro</i> | 96 |
| 2.1 Expression par le <i>Bm</i> VPN de la Polyédrine du VPC (<i>Bm</i> VPN-PC) | 96 |
| 2.2 Expression par le <i>Bm</i> VPN de polyédrines de VPN et de VPC (<i>Bm</i> VPN-PNC)..... | 104 |
| 3 Étude de l'expression de la polyédrine-C <i>in vivo</i> | 111 |
| 3.1 Expression par le <i>Bm</i> VPN-PC..... | 112 |
| 3.2 Expression par le <i>Bm</i> VPN-PNC..... | 117 |
| DISCUSSION..... | 126 |
| CONCLUSION..... | 143 |
| REMERCIEMENTS..... | 146 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 147 |
| ANNEXES..... | 179 |
| Annexe 1..... | I |
| Annexe 2..... | VI |
| Annexe 3..... | VII |

Liste des figures

| | | |
|-------------------|--|-------|
| Figure 1: | Caractéristiques de l'infection au VPN | p. 22 |
| Figure 2: | Profil électrophorétique de l'ARN viral du <i>EsVPC</i> . Extraction du segment #10 et comparaison avec l'ADNc synthétisé. | p. 42 |
| Figure 3: | Gel d'agarose comportant les produits des cinq réactions de RT-PCR effectuées à partir du segment #10 du génome d' <i>EsVPC</i> . | p. 47 |
| Figure 4: | Purification et quantification de deux produits de la réaction de RT-PCR effectuée à partir du segment #10 du génome d' <i>EsVPC</i> . | p. 50 |
| Figure 5a: | Schéma récapitulatif de la construction du vecteur pUC-pol. | p. 52 |
| Figure 5b: | Schéma récapitulatif de la construction de pBm4-pol et PBNT1-pol. | p. 61 |
| Figure 6: | Exemple de migration de plasmide pUC-pol sur gel d'agarose. | p. 55 |
| Figure 7: | Visualisation sur gel d'agarose, de la réaction d'extraction de l'ADNc du plasmide pUC-pol. | p. 57 |
| Figure 8: | Migration sur gel d'agarose des vecteurs pBm4 et PBNT1 linéarisés. | p. 63 |
| Figure 9a: | Migration sur gel d'agarose du vecteur pBm4-pol, isolé à partir de bactéries JM-109 transformées. | p. 66 |

| | | |
|---------------------------|---|--------|
| Figure 9b: | Migration sur gel d'agarose du vecteur PBNT1-pol, isolé à partir de bactéries JM-109 transformées | p. 68 |
| Figure 9c: | Détermination de l'orientation de l'ADNc dans les vecteurs baculoviraux: Profil électrophorétique du PBNT1-pol et pBm4-pol digérés avec EcoR I et Hinc II. | p. 71 |
| Figure 10: | Observation au microscope photonique de plages de populations de VPN recombinants, en milieu semi-solide. | p. 75 |
| Figure 11: | Détection de populations isolées de VPN recombinants par la technique d'hybridation radioactive de type Dot Blot. | p. 78 |
| Figure 12 a et b: | Isolement de populations de VPN recombinants par la technique d'hybridation non-radioactive de type Dot Blot. | p. 81 |
| Figure 13: | Détection de l'expression de l'ADNc par les VPN recombinants, par la technique d'immunobuvardage de type Western. | p. 86 |
| Figure 14: | Détection de l'ADNc incorporé dans le génome des VPN recombinants, par la technique d'hybridation non radioactive de type Southern. | p. 88 |
| Figure 15: | Séquence nucléotidique de l'ADNc du gène de la polyédrique d' <i>EsVPC</i> . | p. 98 |
| Figure 16: | Séquence peptidique de l'ADNc du gène de la polyédrique d' <i>EsVPC</i> . | p. 101 |
| Figure 17 (1 à 6): | Détections <i>in situ</i> de l'expression et de la cristallisation de la polyédrique d' <i>EsVPC</i> lors d'une infection par le <i>BmVPN-PC in vitro</i> . | p. 105 |

VII

- Figure 18 (1 à 6):** Détections *in situ* de l'expression et de la cristallisation de la polyédrine d'*EsVPC* lors d'une infection par le *BmVPN-PNC in vitro*. p. 109
- Figure 19:** Détections de l'expression et la cristallisation de la polyédrine d'*EsVPC* lors de l'infection par le *BmVPN-PC* du tissu adipeux. p. 113
- Figure 20:** Détection de la polyédrine et de polyèdres de VPC *in vivo*, lors d'une infection au *EsVPC* de larves de *Bombyx mori*. p. 115
- Figure 21:** Expression et la cristallisation de la polyédrine d'*EsVPC* lors de l'infection par le *BmVPN-PC* des hémocytes. p. 118
- Figure 22:** Détections de l'expression et la cristallisation de la polyédrine d'*EsVPC* lors de l'infection par le *BmVPN-PNC* du tissu adipeux. p. 121
- Figure 23:** Expression et la cristallisation de la polyédrine d'*EsVPC* lors de l'infection par le *BmVPN-PNC* des hémocytes. p. 124

Liste des Abréviations

| | |
|--------------------|--|
| a.a. | Acide aminé |
| ADNc | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| ADNdb | ADN double brin |
| ADNmc | ADN monocaténaire |
| ARNdb | Acide ribonucléique double brin |
| ARNm | ARN messenger |
| <i>BmVPC</i> | VPC du ver à soie <i>Bombyx mori</i> |
| <i>BmVPN</i> | VPN du ver à soie <i>Bombyx mori</i> |
| BSA | Albumine sérique bovine |
| DEPC | Diéthylpyrocarbonate |
| DICT ₅₀ | Dose infectieuse 50% en culture de tissu |
| DIG | Digoxigénine |
| dNTP | Désoxyribonucléotide-tri-phosphate |
| <i>EsVPC</i> | VPC de la larve d' <i>Euxoa scandens</i> |
| g | Gramme |
| <i>g</i> | Force gravitationnelle |
| h | heure(s) |
| kDa | kilodalton |
| kpb | kilopaires de base |
| MI | Multiplicité d'infection |
| min | minute(s) |
| mL | millilitre |

| | |
|---------|---|
| NISES | National Institute of Sericultural and Entomological Sciences |
| nm | nanomètre |
| pb | paires de base |
| PBS | Tampon Phosphate (Phosphate buffer saline) |
| PCR | Réaction en Chaîne de polymérisation |
| pH | Potentiel Hydrogène |
| pol | Polyédrine |
| rpm | Révolution par minute |
| RT | Transcriptase inverse (Reverse transcriptase) |
| SVF | Sérum de veau foetal |
| TAE | Tampon Tris-Acétate-EDTA |
| TE | Tampon Tris EDTA |
| TPE | Tampon Tris-Phosphate-EDTA |
| U | Unité active |
| VPC | Virus des Polyédroses Cytoplasmiques |
| VPN | Virus des Polyédroses Nucléaires |
| μ L | microlitre |
| μ m | micromètre |
| °C | degré Celsius |

Sommaire

Le signe caractérisant l'infection d'une cellule par un Virus des Polyédroses Cytoplasmiques (VPC) est la formation de corps d'inclusion (polyèdres). La synthèse de ces polyèdres n'a été démontrée que dans les cellules épithéliales intestinales de larves d'insectes infectés. Mais il est difficile de circonscrire l'infection au VPC à cet organe en se basant uniquement sur la présence de polyèdres. En effet, plusieurs études ont prouvé que la réplication du génome viral peut avoir lieu sans l'expression de gène(s) de VPC. Il s'en dégage que dans certaines conditions, l'agencement cristallin de la principale protéine virale (polyédrine) à savoir celle responsable des polyèdres, n'est pas respectée. De ce fait, la cellule infectée ne présente pas de polyèdres bien que le virus s'y réplique. Afin d'étudier le lien entre l'expression et la cristallisation de la polyédrine, nous avons fait exprimer par deux types de baculovirus recombinants le gène de la polyédrine d'un VPC. Grâce au tropisme des baculovirus, nous sommes parvenus à exprimer *in vivo* la polyédrine du VPC d'*Euxoa scandens*. La particularité de ce travail réside dans le fait que des tissus alors dépourvus de polyèdres lors d'infection au VPC, contenaient à présent des corps d'inclusion de VPC.

Dans un premier temps nous avons étudié l'expression simple du gène de la polyédrine du VPC par un baculovirus recombinant. Deuxièmement, nous avons analysé l'expression simultanée du gène de la polyédrine d'un VPC avec la polyédrine du baculovirus recombinant. Nos résultats ont démontré que l'expression du gène de la polyédrine du VPC dans des tissus ne montrant pas de signes d'infection au VPC est possible. Celle-ci résulte en la cristallisation de la protéine à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules infectées par les baculovirus recombinants. De plus, nous avons démontré que la présence de corps d'inclusion de VPC dans une cellule infectée par un Virus de Polyédroses Nucléaires (VPN), n'interfère ni avec la réplication de ce baculovirus et ni avec l'inclusion des baculovirions dans leurs propres corps cristallins. Notre étude a aussi montré la

possibilité de généraliser dans plusieurs tissus de larves, la formation de polyèdres de VPC. Ces derniers se retrouvent à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules infectées par ces deux types de baculovirus recombinants. La présence de corps d'inclusion dans des tissus auparavant dépourvus de polyèdres, devrait déboucher sur l'étude des répercussions physiopathologiques de la co-cristallisation de polyédrines cypovirale et baculovirale.

Dans le cadre d'élaboration de VPN recombinants ayant un potentiel bio-insecticide accru, nos résultats ont montré qu'il est possible d'obtenir un baculovirus avec un gène codant un bio-insecticide ainsi qu'exprimant la polyédrine qui cristallise autour des virions recombinants.

Introduction

Les Virus des Polyédroses Cytoplasmiques (VPC) sont très répandus à la fois dans la nature et dans les élevages d'insectes (Aruga, 1971). Le type d'infection qu'ils engendrent a permis de les considérer comme candidats potentiels dans l'élaboration de biopesticides (Belloncik, 1989). Néanmoins, nos connaissances au niveau fondamental sur la physiopathologie de cette infection doivent être davantage approfondies afin d'exploiter au maximum ces agents viraux dans des programmes de contrôle d'insectes nuisibles.

L'infection par un VPC est diagnostiquée par l'identification uniquement dans les cellules de l'épithélium intestinal, d'une protéine à l'origine de corps d'inclusion cristallins (polyèdres) (Smith, 1967; Iwashita, 1971). En cristallisant, cette protéine (polyédrine) encastre des particules virales infectieuses (Wittig *et al.*, 1960; Arnott *et al.*, 1968; Kobayashi, 1971). Nous soumettons dans ce mémoire que le tropisme cellulaire attribué au VPC *in vivo*, basé sur la présence de polyèdres, pourrait être plus large qu'actuellement estimé. En effet, l'expression du gène de la polyédrine et la cristallisation de son produit sont des processus influençables par différents facteurs cellulaires (Takami *et al.* 1967; Iwashita, 1971; Lavallée *et al.*, 1993), environnementaux (Yamaguchi, 1968; Yamaguchi *et al.*, 1969; Belloncik et Arora, 1979; Belloncik et Arella 1981; Payne et Mertens, 1983; Hukuhara, 1985; Belloncik, 1989; Truong, 1990) et par la présence d'un autre pathogène (Iwashita, 1971; Arella *et al.*, 1983). De plus, nous verrons que plusieurs indices montrent que les VPC peuvent se répliquer sans exprimer le gène de la polyédrine (Payne, 1976; Belloncik, 1989; Truong, 1990). Cela peut être le cas des cellules ne montrant pas de signes classiques d'infections aux VPC *in vivo*, mais supportant la répllication complète des ces virus *in vitro* (Belloncik, 1989).

Afin d'étudier la cristallisation de la polyédrine d'un VPC ailleurs que dans les cellules épithéliales intestinales, nous avons "forcé" l'expression du gène de la polyédrine dans plusieurs tissus larvaires grâce à deux types de Virus des Polyédroses Nucléaires (VPN) recombinants exprimant le gène cypoviral dans les larves de vers à soie, *Bombyx mori*..

Cette étude a été faite au niveau de cellules ne montrant pas de signes d'infection *in vivo*, mais supportant la répllication complète d'un VPC *in vitro* (les hémocytes). Ainsi, en forçant l'expression de la polyédrine par un baculovirus recombinant dans les hémocytes, nous avons regardé si la polyédrine exprimée cristallisait. De plus, en se concentrant sur le tissu adipeux, nous avons analysé la dissémination de l'expression du gène de la polyédrine d'un VPC dans un tissu où il y a absence de polyèdres lors d'infection.

Les doubles infections faisant intervenir un VPC et un VPN sont fréquentes chez une larve (Iwashita et Aruga, 1957; Bird, 1969). Les observations faites au niveau de la double infection d'une même cellule par ces deux virus, sont très diverses (Quiot *et al.*, 1980; Inoue, 1981). Ainsi, les différents rapports publiés faisant compte de la répercussion de l'expression de la polyédrine d'un VPC sur l'inclusion des virions de VPN de même que sur la co-cristallisation de la polyédrine du VPC et du VPN (Quiot *et al.*, 1980; Inoue, 1981) manquent de consensus. L'obtention d'un VPN exprimant à la fois sa propre polyédrine et celle d'un VPC, nous a permis d'étudier dans la cellule deux aspects de cette infection. Le premier concerne l'expression simultanée de deux différentes polyédrines et les répercussions au niveau de leur cristallisation. Le second porte sur l'inclusion des virions baculoviraux dans les polyèdres. Notre travail a ainsi fait pour la première fois abstraction de la composante "répllication du VPC", dans l'étude de doubles infections VPC/VPN.

Notre projet de maîtrise comporte ainsi deux objectifs. Le premier est de disséminer *in vivo* l'expression du gène de la polyédrine d'un VPC dans des cellules ne montrant pas de signe classique d'infection. Le second est de déterminer les répercussions de la co-expression de deux polyédrines cypovirale et baculovirale dans une même cellule. Plus particulièrement, nous avons abordé les questions de co-cristallisation des polyédrines et d'inclusion des virions de VPN dans les polyèdres.

Revue Bibliographique

1 Introduction.

Traditionnellement, le contrôle des insectes nuisibles a fait appel aux insecticides chimiques abordables et à large spectre. L'abolition de l'utilisation du DDT en 1950 due aux impacts environnementaux et médicaux, a justifié l'utilisation de produits plus écologiques dans le contrôle des insectes ravageurs. À ce niveau, nos connaissances sur les virus d'insectes (entomovirus) ont permis d'élaborer une nouvelle approche au problème de la lutte biologique.

Un des groupes d'entomovirus faisant l'objet d'actives recherches, comporte des virus entraînant la formation de corps d'inclusion dans les cellules qu'ils infectent. Ce groupe contient des baculovirus (les Virus des Polyédroses Nucléaires (VPN) et les Virus des Granuloses (VG)), des cypovirus du genre Reoviridae (Virus des Polyédroses Cytoplasmiques ou VPC) et des entomopoxvirus. Les corps d'inclusion de ces virus (polyèdres de VPN, granules, polyèdres de VPC et sphéroïdes, respectivement) sont différents. Ainsi, il n'y a pas d'homologie entre les gènes qui codent pour ces corps d'inclusion. La composition des ces derniers ainsi que leur taille sont aussi différents (Summers et Smith, 1975-76; Rohrmann *et al.*, 1980; Arif et Doerfler, 1984). Les corps d'inclusion participeraient au niveau de la protection des virions contre l'inactivation par des facteurs physico-chimiques (Smith, 1967; Aruga, 1971). De ces quatre entomovirus (VPN, VG, VPC et entomopoxvirus), certains VPC se démarquent par le caractère chronique de l'infection qu'ils engendrent. Les infections aux VG, VPN et entomopoxvirus étant la plupart du temps létales, ces virus seraient plus appropriés pour le contrôle à court terme des populations d'insectes. Quant à certaines infections de type cypoviral (par exemple celle due au VPC d'*Euxoa scandens*), leur caractère chronique permettrait de les impliquer dans la lutte biologique à long terme (Belloncik, 1989).

Mais, l'utilisation des entomovirus ne se limite pas à la lutte biologique. Dans le cadre de recherches médicales et fondamentales, l'expression de diverses protéines par des VPN

recombinants est courante (Summers, 1995). De la protéine G du virus de la rage (Prehaud *et al.*, 1989) en passant par l'interferon humain α (Maeda *et al.*, 1985; Horiuchi *et al.*, 1987) et β (Smith *et al.*, 1983a), les particules poliovirales non infectieuses (Urakawa *et al.*, 1989), l'interleukine-3 murine (Miyajima *et al.*, 1987), certaines protéines du virus VIH-1 (Gheysen *et al.*, 1989), des protéines structurales du virus de la fièvre aphteuse (BTV) (French et Roy, 1990) et les polyédries de VPC (Fossiez, 1990; Mori *et al.*, 1993), les applications médicales, paramédicales et fondamentales de l'utilisation de ces virus d'insectes ne cessent d'augmenter.

Parallèlement, le domaine de l'agriculture pourrait aussi profiter du développement des VPN en tant que vecteurs d'expression (Bishop *et al.*, 1995). En effet, l'obtention de virus recombinants exprimant des gènes à caractère insecticide comme la delta-endotoxine (Merryweather *et al.*, 1990) et de la cytolysine du *Bacillus thuringiensis* (Li *et al.*, 1995), l'hormone diurétique de la larve du tabac *Manduca sexta* (Maeda, 1989), de neurotoxine d'insecte (Maeda *et al.*, 1991) ou de l'estérase de l'hormone juvénile (HLE) (Hammock *et al.*, 1990) ont permis aux chercheurs d'envisager diverses stratégies afin d'accroître le potentiel bio-insecticide de ces baculovirus.

Dans notre étude, nous nous sommes servis du système baculoviral pour étudier la cristallisation d'une protéine virale à travers divers tissus larvaires. Ainsi, nous avons exploité deux caractéristiques des VPN, c'est à dire le caractère systémique de l'infection et la facilité de construire des virus recombinants. Nous verrons dans les parties qui suivent comment nous avons abouti à cette étude des VPC et pourquoi le VPN était l'outil par excellence pour mener à bien notre projet.

2 Les Virus des Polyédries Cytoplasmiques (VPC).

2.1 Généralités.

On retrouve les Virus des Polyédries Cytoplasmiques ou cypovirus chez un bon nombre d'arthropodes. L'infection causée par un VPC est caractérisée par la formation de

corps d'inclusion uniquement dans les cellules épithéliales intestinales (Hukuhara, 1985). Certains types de VPC sont plus virulents que d'autres. Ainsi, le VPC d'*Orgyia pseudotsugata* est extrêmement virulent (Martignoni *et al.*, 1969, Payne et Mertens, 1983). De plus, contrairement à la virose induite par le VPC d'*Euxoa scandens*, un haut taux de mortalité apparaît lors d'infections de *Bombyx mori* par un VPC en élevage (Belloncik, 1989). Par contre, lors de l'isolement du *Es* VPC en laboratoire (Quiot et Belloncik, 1977) un faible taux de mortalité a été observé malgré un haut taux de contamination des larves en élevage. Ainsi, les VPC qui ne tuent pas entraînent chez leur hôte des signes de croissance et de développement anormaux (Bullock *et al.*, 1970; Simmons et Sikorowski, 1973; Bell et Kanavel, 1976; Bell, 1977; Bellemare et Belloncik, 1981). Ces effets seraient dus à un déséquilibre des fonctions de l'intestin infecté, réduisant l'absorption de nutriments (Hukuhara *et al.*, 1981; Hukuhara, 1985). La persistance dans l'environnement des larves infectées permet l'excrétion, par les voies normales de défécation, de polyèdres contenant des particules virales infectieuses. Ce phénomène naturel favorise la transmission horizontale et l'amplification de l'agent infectieux (Saito et Yamaguchi, 1960; Boucias et Nordin, 1978). Quant à la transmission verticale, la contamination de la coquille des œufs ou de l'embryon lui-même a été suggérée lorsque les adultes survivent à une infection (Aruga et Nagashima, 1962; Hukuhara, 1962; Aruga, 1971). Par ailleurs, les larves qui ne succombent pas à l'infection démontrent une susceptibilité accrue aux stress environnementaux (Belloncik, 1989).

2.1.1 Historique

Ishimori (1934) a constaté la présence de corps d'inclusion intracytoplasmiques dans les cellules épithéliales intestinales de vers à soie (*Bombyx mori*). Il fallut attendre l'année 1950 pour que Smith et Wyckoff publient leurs études faites sur des structures cristallines associées à la virose induite par les Virus des Polyédroses Nucléaires (VPN). Ce groupe a

rapporté la présence de cristaux intracytoplasmiques qui, à la différence de ceux retrouvés dans le noyau des cellules infectées aux VPN, ne comportaient pas de baculovirions. Par contre, on y devinait la présence d'empreintes sphériques de 50 à 70 nm de diamètre, disséminées à travers la totalité de la matrice cristalline de ce nouveau type de polyèdre. Plusieurs laboratoires se sont penchés sur l'identification de ces corps cristallins (Hukuhara et Hashimoto, 1966; Smith, 1967; Federici *et al.*, 1973; Kawase *et al.*, 1973; Lipa, 1977) et aujourd'hui, on les associe à l'infection due au VPC avec pour rôle de protéger les virions dans l'environnement (Smith, 1967; Aruga, 1971).

En 1982, Matthews a proposé l'intégration des VPC dans la famille des réoviridés. Celle-ci comporte aujourd'hui un nouveau genre (cypovirus) regroupant tous les VPC avec comme prototype le VPC de *Bombyx mori* (*Bm* VPC) (Holmes, 1991). Environ 249 insectes repartis sur quatre genres (Martignoni et Iwai, 1986, Hukuhara et Bonami, 1992) et un crustacé (Federici et Hazard, 1975), ont déjà été identifiés comme susceptibles à une infection cypovirale. Parallèlement, l'observation de pseudo-virions et de corps d'inclusion chez certains nématodes (Ibrahim *et al.*, 1978) ainsi que dans les oocytes de plasmodium responsable de la malaria des rongeurs (Bird *et al.*, 1972) laisse présumer un spectre d'hôte encore plus large qu'actuellement estimé. Des études faites sur la susceptibilité des cellules aux VPC *in vivo* et *in vitro* ont clairement démontré que l'infection classique par ce virus est limitée aux invertébrés (Ignoffo, 1968; Katagiri, 1981; Granados, 1978; Belloncik *et al.*, 1987).

2.1.2 Morphologie des virions.

L'observation microscopique des particules virales extraites de polyèdres (Hosaka et Aizawa, 1964), révèle la présence de virions possédant une capsid de symétrie icosaédrique dont l'aspect tridimensionnel n'est pas sans rappeler celle des réovirus (Hills et Smith, 1959; Hozaka et Aizawa, 1964; Miura *et al.*, 1969). Les virions d'une dimension d'environ 70 nm de diamètre, possèdent 12 spicules (Miura *et al.*, 1969). Bien qu'ils fassent partie des

Reoviridae, les cypovirus ne possèdent pas une double capsid (Stoltz et Hilsenhoff, 1969; Lewandowski et Traynor, 1972).

2.1.3 Caractérisation génomique.

Le génome des VPC est constitué d'un ARN double brin (ARNdb) (Miura *et al.*, 1968) segmenté d'une masse moléculaire tournant autour de 15×10^6 Da (Payne et Rivers, 1976). Selon le profil électrophorétique de migration des 10 segments d'ARNbc sur gel contenant 3% de polyacrylamide (PAGE), 12 différents types ont été répertoriés (Payne et Rivers, 1976; Payne et Harrap, 1977; Payne et Mertens, 1983). Récemment, un 13^{ème} et 14^{ème} type ont été suggérés (Fouillaud et Morel, 1994; Belloncik *et al.*, 1995). Par contre, l'utilisation de gel de polyacrylamide de 10% permet d'identifier la présence de sous-types (Payne *et al.*, 1983). Ces derniers proviennent du fait que certains segments migrent différemment selon la matrice du gel (Payne et Mertens, 1983). Morphologiquement similaires, les 12 principaux types de VPC sont sérologiquement différents (Mertens *et al.*, 1989) possédant peu ou pas d'homologie de séquences nucléotidiques (Payne *et al.*, 1986). Les rapports montrant l'absence d'homologie de séquence entre le gène de la polyédrine du *BmVPC*, type 1 (Arella *et al.*, 1988) et celui d'un VPC (type 5) de la larve d'*Euxoa scandens* (*Es VPC*) (Fossiez *et al.*, 1989) corroborent ces observations. À l'instar des réovirus pour lesquels la taille théorique des produits primaires d'expression des gènes peut être déduite à partir de celle des divers segments d'ARNdb (Both *et al.*, 1975), le poids moléculaire des protéines structurales des VPC concorde en général avec les valeurs prédites (Lewandowski et Traynor, 1972; Payne et Kalmakoff, 1974; Payne et Tinsley, 1974; Payne et Rivers, 1976). En association avec le génome viral, les particules virales infectieuses possèdent plusieurs enzymes impliquées dans les premières phases de la réplication (Dai *et al.*, 1982). Ainsi, l'initiation du processus de réplication est grandement favorisée; ces

enzymes étant disponibles aussitôt que le génome viral est introduit dans le cytoplasme de la cellule.

2.1.4 Cycle de réplication des VPC.

Trois points importants ressortent des données accumulées sur la réplication cypovirale: Premièrement, les particules virales n'ont pas besoin d'être altérées pour permettre l'initiation de la réplication. Il est bien connu que l'ARNdb des Reoviridae ne peut servir d'ARN messenger (Joklik, 1974) et qu'il n'est donc pas à l'origine de la synthèse de protéines virales. Lewandowski *et al.* ont été les premiers en 1969 à rapporter la présence d'une ARN polymérase ARN dépendante à l'intérieur de la capsid d'un *BmVPC*. À la différence de la transcriptase des réovirus, celle des VPC ne nécessite pas l'altération de la capsid par des enzymes protéolytiques ou par des chocs thermiques pour son activation (Joklik, 1974; Lewandowski et Traynor, 1972; Storer *et al.* 1973 et 1974). Yasaki et Miura (1980) ont émis l'hypothèse que la transcriptase cypovirale est présente dans les spicules des virions. Seuls les produits de transcription de l'ARNdb viral sont injectés dans la cellule à travers les protubérances de la capsid; les VPC imiteraient donc l'infection par les bactériophages. Ils s'adsorbent à la surface de la cellule cible et y introduiraient un transcript de chaque segment de leur ARNdb à travers les spicules (Kobayashi, 1971). En observant la présence de virions dans des phagosomes cellulaires, Belloncik (1989) a proposé la viropexie comme processus précédant l'injection des acides nucléiques dans la cellule. Les groupes de Furuichi (1974) et Shimotohno et Miura (1974) ont démontré que les ARN viraux retrouvés dans la cellule juste avant l'initiation de la réplication du VPC, étaient monocaténares et correspondaient à des transcrits du génome viral. Le fait qu'aucun appariement n'a été décelé à l'intérieur même de ces populations d'ARNdb, démontre que seulement un brin de chaque segment d'ARNdb viral, sert de gabarit lors de la transcription (Lewandowski *et al.*, 1969; Shimotohno et Miura, 1973; Furuichi, 1974).

Deuxièmement, les VPC ne requièrent pas d'enzymes cellulaires pour l'initiation de leur réplication. En effet, les seuls éléments indispensables à leur réplication sont empruntés à leurs hôtes en cours d'infection tels que les nucléotides triphosphates (NTP) ainsi que les donneurs de groupes méthyles. Furuichi (1974, 1981) et Wertheimer *et al.* (1980) ont complété l'étude de la réplication cypovirale. Ces derniers ont démontré que les produits de la transcription (ARNm) augmentaient proportionnellement avec la concentration du donneur de groupe methyl, soit la S-adenosinéméthionine. Ces résultats ont été liés au phénomène de coiffe (Shatkin, 1976) des ARNm intervenant dans le processus de traduction de ces derniers par les unités ribosomales et requérant une nucléotide phosphohydrolase, une guanyl transférase ainsi qu'une méthylase. Storer *et al.* (1974) ainsi que Dai *et al.* (1982) ont confirmé la présence à l'intérieur des cypovirions de ces enzymes et leur association avec le génome viral. La stabilité des 10 segments d'ARNdb viraux dans le cytoplasme a été récemment démontrée dans notre laboratoire (données non publiées). Lors d'expériences, les 10 segments d'ARNdb du *Es* VPC ont été isolés 7 jours après leur transfection dans des cellules permissives d'une lignée cellulaire d'*Euxoa scandens*. Cette stabilité est attribuée à la coiffe de l'extrémité 5' des ARNs des VPC permettant entre autres, d'accroître leur résistance aux ribonucléases présentes dans le cytoplasme de la cellule (Furuichi et Miura, 1975; Shimotohno et Miura, 1977; Furuichi, 1978; Wu *et al.*, 1981).

Troisièmement, l'infection aux VPC n'est pas lytique *in vitro*. On retiendra trois lignées cellulaires d'insectes, *Trichoplusia ni*, *Lymantria dispar* et *Spodoptera frugiperda* qui infectées respectivement avec les VPC de *T. ni* (Granados *et al.*, 1974), d'*Euxoa scandens* (Quiot et Belloncik, 1977) et de *Chrysodeixin eriosoma* (Longworth, 1980) ont montré l'absence (ou presque) de lyse cellulaire. Depuis, plusieurs rapports ont fait état de diverses autres lignées cellulaires d'insectes supportant la réplication complète d'un VPC (Belloncik, 1994). La persistance de l'infection cypovirale *in vitro* a entre autres été démontrée par Belloncik *et al.* (1995). Ce dernier groupe est parvenu à effectuer de 15 à 50 passages de

cellules infectées avec les VPC d'*E. scandens* et d'*Heliotis armigera* respectivement. Le taux d'infection avec le dernier VPC s'est maintenu à 30%(+/- 10%) à partir du 20^{ème} passage. Le fait que la réplication des VPC a lieu sans perturber la synthèse protéique cellulaire a été démontré

par Arella *et al.* (1984). En effet, la synthèse protéique semble se poursuivre en parallèle avec la synthèse de particules virales infectieuses et de polyèdres.

2.1.5 Expression des gènes.

A l'instar des réovirus (Joklik, 1974; McCrae et Joklik, 1978), il est logique de présumer que les 10 segments d'ARNdb détiennent chacun un gène contenant l'information nécessaire pour la synthèse de protéines virales. Selon McCrae et Joklik (1978), un seul brin de chaque segment, celui possédant la coiffe à son extrémité 5', servirait de gabarit pour la synthèse d'ARNdb responsables de la synthèse protéique. Dans le cas des VPC, lorsque l'ARNdb dénaturé est mélangé avec un lysat de réticulocytes de lapins, on observe la synthèse de diverses protéines identifiables sur gel dénaturant de polyacrylamide (Mertens, 1979; McCrae, 1982; McCrae et Mertens, 1983; Pullin et Moore, 1985). Des 12 protéines obtenues lors de la traduction *in vitro*, quatre synthétisées respectivement à partir des segments 1, 2 ou 3, 4 et 6 représentent les protéines structurales isolées de particules virales purifiées. Aux huit autres dont fait partie la polyédrine, des fonctions non-structurales indéfinies sont supposées (Lewandowski et Traynor, 1972; Payne et Kalmakoff, 1974; Payne et Rivers, 1976). La cinétique de synthèse et d'association des protéines virales a été étudiée par Miyajima et Kawase (1968). Ils ont montré que suite à 3 h d'éclipse, il y a une augmentation régulière du nombre de particules virales dans le cytoplasme des cellules, pour atteindre un plateau après 24 h. Tout de suite après cette phase d'éclipse, le seul signe d'infection est la présence de stroma virogéniques, (Xeros, 1956, Sohi *et al.*, 1971) dans le cytoplasme, contenant à la fois de l'ARN viral et des protéines virales. Ces viroplasmes

fusionnent (Kobayashi, 1971) pour former de véritables usines de production de particules virales infectieuses (Arnott *et al.*, 1968). Selon Kobayashi (1971), le "core" du virus origine de la périphérie du stroma virogénique et s'insère à l'intérieur des capsides naissantes dépourvues de spicules. Une fois ces nucléocapsides matures, il y a greffe des spicules au sommet des capsomères. Certains virions restent libres, alors que d'autres sont emprisonnés dans des corps protéiques. Nous verrons plus loin le processus d'inclusion des virions et de cristallisation de la polyédrique entrant en jeu à ce niveau.

2.2 Caractéristiques de l'infection.

2.2.1 Cytopathologie

Les VPC se répliquent dans le cytoplasme des cellules infectées. Les stroma virogéniques ou viroplasmies (Xeros, 1956; Sohi *et al.*, 1971) croissent en dimension au fur et à mesure que l'infection progresse et finissent par fusionner. À ce stade, ils contiennent à la fois des capsides vides et des virions infectieux. En fin de cycle, les particules virales infectieuses migrent vers la périphérie du viroplasmie ainsi atrophié et commencent à s'éparpiller (Hukuhara et Bonami, 1992). La polyédrique, alors présente en grande quantité dans le cytoplasme, diffuse vers les plus gros agrégats de virions et débute sa cristallisation pour former des polyèdres incluant des particules virales (Hukuhara, 1985). Lors d'une infection typique due au VPC, le noyau cellulaire montre quelques changements pathologiques dont des variations au niveau de la distribution de la chromatine (Steinhaus et Dineen, 1959; Stairs *et al.*, 1968, Arnott *et al.*, 1968) ainsi qu'une hypertrophie nucléaire en fin d'infection (Vago et Bergoin, 1963; Harpaz *et al.*, 1965). Par ailleurs, la présence de corps d'inclusion nucléaires pour certaines souches de *BmVPC* (Hukuhara, 1985) donne lieu à des polyèdres dépourvus de virions. Les changements cellulaires incluant le démantèlement du réticulum endoplasmique rugueux (Kobayashi, 1971), la vacuolisation (Grace, 1962; Arnott *et al.*, 1968)

et une hypertrophie du cytoplasme (Xeros, 1966, Arnott *et al.*, 1968; Kobayashi, 1971) ainsi que des mitochondries (Anthony *et al.*, 1973) ont été rapportés.

2.2.2 Spécificité de l'infection.

In vivo, en se basant sur la présence de polyèdres, l'infection due au VPC semble être limitée aux cellules épithéliales intestinales (Smith, 1967; Iwashita, 1971) malgré la présence de virions libres dans l'hémolymphe des larves infectées (Sikorowski *et al.*, 1971; Miyajima, 1975; Belloncik, 1989). Par contre *in vitro*, il y a perte de ce tropisme cellulaire. En effet, plusieurs groupes ont démontré que le VPC peut se répliquer dans des cultures cellulaires primaires ou continues de cellules ovariennes d'insectes (Grace, 1962; Vago et Bergoin, 1963; Kawarabata et Hayashi, 1971; Sohi *et al.*, 1971; Quiot et Belloncik, 1977; Belloncik *et al.*, 1985). Des cellules trachéales (Sohi *et al.*, 1971) ainsi que des hémocytes en cultures primaires (Rocheleau, 1987; Belloncik, 1989) et continues (Granados *et al.*, 1974) ont aussi montré leur susceptibilité au VPC. Toutes ces études démontrent que la susceptibilité des cellules à l'infection cyrovirale change lorsque placées *in vitro*. La réplication du VPC d'*E. Scandens* dans des hémocytes en culture primaire normalement indécélables *in vivo* (Rocheleau, 1987) prouve bien qu'un changement au niveau de la cellule a lieu *in vitro*. Cette expérience a été poussée plus loin par Belloncik (1989) qui a montré que des hémocytes infectés *in vivo*, ne présentent des signes classiques de la virose due au VPC que si placés *in vitro*. La susceptibilité d'une cellule face au VPC est donc étroitement liée à la nature de celle-ci et au milieu dans lequel elle se trouve.

2.2.3 Physiopathologie.

Nous avons déjà vu que la découverte des VPC s'est faite à partir de larves soupçonnées d'être infectées par le VPN (Smith et Wyckoff, 1950). Il fallut attendre l'année 1959 pour que la physiopathologie de la virose soit caractérisée. Cette année, Ishikawa et Asayama (1959) ont montré que les polyèdres apparaissent préférentiellement dans les cel-

lules cylindriques de l'épithélium intestinal au niveau de l'intestin moyen. Le symptôme caractéristique étant alors un organe possédant un aspect turgescent et laiteux (Iwashita *et al.*, 1968, Watanabe, 1971). Par contre, la présence des polyèdres ailleurs que dans ce tissu n'a été rapportée que par Stoltz (1969). Ce dernier les a retrouvés dans les cellules du tissu adipeux. Malheureusement, ces résultats n'ont jamais été reproduits.

Ignoffo et Adams (1966), Martignoni *et al.* (1969), Simmons et Sikorowski (1973), Magnoler (1974) et Bellemare et Belloncik (1981) ont effectué des essais biologiques sur des larves infectées par un VPC. Les résultats obtenus ont permis de noter l'absence de mortalité significative (pour certains types de VPC) chez la majorité des larves d'insectes lorsqu'infectées après le troisième ou le quatrième stade de maturation. Parallèlement, une diminution de l'appétit jumelée à de la diarrhée, est à l'origine d'un taux de croissance larvaire réduit ainsi que de larves chétives et difformes (Bullock *et al.*, 1970; Bell, 1977; Simmons et Sikorowski, 1973; Bell et Kanavel, 1976). Contrairement au taux de mortalité des larves, celui des pupes est très élevé, de sorte que la majorité des larves ne se rend pas au stade papillon. Par contre, pour la faible minorité des chrysalides qui échappe à l'emprise du virus, trois destinées sont possibles. La première est l'émergence de papillons difformes et moribonds n'ayant quasi aucune chance de survie (Neilson, 1965; Vail et Gough, 1970; Bellemare et Belloncik, 1981). La seconde est l'obtention de papillons peu fertiles sinon stériles et donc incapables de procréer (Simmons et Sikorowski, 1973; Vail et Gough, 1980; Bellemare et Belloncik, 1981). La troisième est l'apparition d'adultes transmettant le VPC à leur progéniture (Aruga et Nagashima, 1962; Hukuhara, 1962; Aruga, 1971). De ce fait, les jeunes larves issues des ces géniteurs entrent rapidement en contact avec le VPC souvent suite à la contamination de la coquille de leurs oeufs. La transmission verticale du VPC par contamination de l'embryon à l'intérieur de l'oeuf n'a pas encore été définitivement prouvée. Ainsi, l'infection des jeunes larves suite à la contamination de l'extérieur de la coquille de l'oeuf paraît un important mode de transmission du VPC de génération en génération. Si

certains types de VPC (dont le *Es* VPC) ne tuent pas leur hôte, le fait qu'ils affaiblissent considérablement les larves suppose que ces dernières sont beaucoup plus susceptibles aux conditions environnementales.

3 Les Virus des Polyédroses Nucléaires (VPN).

3.1 Généralités.

Les premières allusions concernant une infection de type VPN ont été faites en 1527 lors de la description de la jaunisse du ver à soie. En 1856, Maestri et Cornelia furent les premiers à établir un lien entre la présence de cristaux dans les cellules et les symptômes de la jaunisse associés par Bergold (1947) à un virus de type baculoviral. Après la deuxième guerre mondiale, les chercheurs ont abouti à la conclusion que ces virus se retrouvaient de façon courante chez différentes populations de lépidoptères nuisibles. Si des essais sur le terrain démontraient l'utilité des VPN comme insecticides biologiques (Ignoffo, 1973), ils ne rivalisaient pas avec les produits chimiques alors sur le marché. Comme les VPC, les baculovirus sont restreints aux arthropodes et 600 différents isolats ont déjà été identifiés à partir d'insectes, de crustacés et d'arachnides (Martignoni et Iwai, 1986; Rohrmann, 1992). À l'intérieur des Baculoviridae, les VPN qui nous intéressent ici, se retrouvent uniquement chez les insectes dits holométaboles (qui se métamorphosent complètement). Plus précisément, on retrouve les VPN à simple capsid (VPNS) chez les lépidoptères, les hyménoptères, les diptères, les coléoptères et les trichoptères. Par contre, certaines infections chez les lépidoptères sont aussi dues aux VPN multi-encapsidés (VPNM) (Rohrmann, 1986). Deux types de VPN ont servi de modèles dans les études de la morphologie et de la réplication des virions. En Amérique du Nord et en Europe, le VPN de la larve d'*Autographa californica* (*Ac*VPN) sert de prototype alors qu'en Asie celui du ver à soie (*Bombyx mori*) est plus couramment pris en référence (*Bm*VPN).

3.2 Caractéristiques du virus et de la virose.

Les Virus des Polyédroses Nucléaires possèdent un génome constitué d'un ADN

double brin circulaire d'environ 130 kpb et contenant jusqu'à 80 gènes (Kelly, 1982; Blissard et Rohrmann, 1990). Aujourd'hui, la totalité du génome du VPN d'*Autographa californica* (AcVPN) a été séquencé. Trois cent trente sept cadres de lecture ouverts (ORFs) ont été identifiés, 154 d'entre eux se chevauchent (Possee *et al.*, 1995). Ces gènes peuvent être classifiés selon l'ordre d'apparition des protéines correspondantes dans la cellule infectée (précoces immédiates, précoces, tardives et très tardives). Les gènes précoces et intermédiaires sont exprimés avant la réplication de l'ADN viral, alors que les deux autres types ne le sont, qu'après l'initiation de la réplication génomique (Kelly, 1982; Blissard et Rohrmann, 1990). Parmi les gènes à expression retardée, sont exprimés de façon abondante ceux de la polyédrine et de la p10 (Figures 1.1 et 1.2). Ces protéines sont impliquées respectivement dans la formation des corps d'inclusion (polyèdres) et de masses fibreuses intranucléaires (Van der Wilk *et al.*, 1987).

Les microscopes photonique et électronique ont permis l'étude *in vivo* de la cytopathologie des infections par les VPN (Adams *et al.*, 1977; Granados et Lawler, 1981; Granados et Williams, 1986; Keddie *et al.*, 1989). Ces études ont montré qu'après la dissolution des polyèdres dans le suc digestif alcalin, les virions libérés traversent la membrane péritrophique puis l'épithélium intestinal, par fusion avec la membrane plasmique au niveau des microvillosités situées sur la partie apicale des cellules cylindriques de l'épithélium intestinal. Les nucléocapsides sont transportées dans le noyau cellulaire où suite à leur dégradation, l'ADN viral se réplique résultant en la formation de nouvelles particules infectieuses (Volkman, 1986). Selon Flipsen *et al.* (1993), certains virions s'incluent dans des polyèdres au niveau des cellules basales de l'intestin alors que les polyèdres présents dans les cellules cylindriques sont petits et dépourvus de particule virale infectieuse dans leur matrice. Les virions libres, principalement situés dans la région basolatérale du noyau, bourgeonnent éventuellement dans l'hémolymphe des larves pour initier une infection dans

la majorité des tissus (Volkman et Goldsmith, 1985; Charlton et Volkman, 1993). Les VPN sont particulièrement intéressants car ils présentent un cycle de réplication biphasique. Il en résulte la production de deux types de virions structurellement différents bien que génétiquement identiques (Volkman, 1986; Blissard et Rohrmann, 1990; Wood et Granados, 1991). Le premier type réfère aux virions bourgeonnants (VB) produits relativement tôt après l'infection de la cellule, lorsque les nucléocapsides viraux migrent du noyau vers la membrane cytoplasmique et bourgeonnent de la surface de la cellule. Ces derniers sont caractérisés par une glycoprotéine virale de 64 kDa (gp64) exprimée lors de la phase précoce de l'infection (Blissard et Rohrmann, 1989; Blissard, 1995). Cette protéine est présente à la surface externe de la membrane cytoplasmique des cellules infectées de laquelle dérive l'enveloppe des VB (Volkman et Goldsmith, 1985; Charlton et Volkman, 1993). Produits plus tard, les virions inclus (VI) dans la matrice protéinique des polyèdres intranucléaires sont visibles. Les VB et VI jouent différents rôles dans le cycle infectieux des VPN (Wood et Granados, 1991). Les VI transmettent l'infection horizontalement par transit de l'intestin dans les fèces et sont responsables de l'infection du système digestif (infection primaire). Quant aux VB, ils disséminent l'infection dans la majorité des tissus d'un individu (Volkman et Goldsmith, 1985; Charlton et Volkman, 1993). Les différents rôles des VI et VB lors de la réplication des VPN sont le reflet des différences rapportées au niveau du pouvoir infectieux de ces deux types de virions dans l'intestin et en culture de tissus respectivement (Volkman et Summers, 1977; Pritchett *et al.*, 1982; Volkman, 1986). À ce niveau les polyèdres sont déterminants. Alors que les VB administrés par voie orale sont rapidement inactivés par les sucs intestinaux, les VI sont protégés contre de longues expositions à ces sucs grâce aux polyèdres. Ainsi, ce n'est qu'une fois que l'environnement de l'intestin est favorable à la dissolution des polyèdres que les VI sont libérés vis à vis de leur cellules cibles.

La dissémination de l'infection dans les divers tissus d'une même larve à partir de l'intestin résulte ultimement en la liquéfaction et la rupture des tissus. Cela entraîne la mort de la larve et la libération des polyèdres dans l'environnement. À la différence des VPC où les polyèdres sont libérés suite à la desquamation de l'épithélium intestinal des larves, les polyèdres sont dispersés dans l'environnement suite à la décomposition des insectes infectés. Tout le processus physiopathologique de l'infection au VPN prend de 5 à 10 jours selon le type de VPN et l'hôte infecté (Blissard et Rohrmann, 1990).

3.2.1 Le gène de la polyédrine des VPN.

Le gène de la polyédrine des VPN en plus d'être hyper-exprimé lors de la virose, est non-essentiel pour la synthèse de particules virales infectieuses. Ce caractère le rend donc candidat idéal pour des manipulations génétiques permettant l'expression de protéines d'intérêts à la place de la polyédrine.

La polyédrine est abondamment exprimée en fin d'infection. Il est estimé que le niveau d'expression atteint 25 % de la quantité totale des protéines de la cellule infectée (Miller, 1988) ou 50% des protéines exprimées pendant l'infection (Luckow et Summers, 1988a). De 1 à 2 millions de cellules infectées, nous pouvons recueillir jusqu'à 1 mg de polyédrine principalement sous la forme de 50 à 100 corps d'inclusion par cellule (Luckow et Summers, 1988a). Les cristaux de polyédrine ont la caractéristique d'inclure des virions (Figures 1.1; 1.2 et 1.4) et sont identifiables au microscope photonique. La nature non-essentielle du gène de la polyédrine au niveau du pouvoir infection des virions, a été démontrée *in vitro* par Smith *et al.*(1983b). Le protocole alors établi pour la construction du VPN possédant un gène altéré de la polyédrine est à la base de ceux utilisés aujourd'hui pour la synthèse de VPN recombinants, c'est à dire exprimant des gènes étrangers (Figure 1.3). En effet, l'introduction de mutation(s) dans le gène de la polyédrine a été effectuée en co-transfectant des lignées d'insectes susceptibles à l'ADN du VPN sauvage, avec un plasmide

contenant le gène muté de la polyédrine. Grâce à la recombinaison homologe entre le génome viral et les séquences conservées encadrant le gène muté, un virus mutant incapable d'exprimer le gène de la polyédrine a été isolé des cellules transfectées.

Une séquence de 12 paires de bases (pb) apparemment contrôle l'expression du gène de la polyédrine. Celle-ci a été identifiée par Rohrmann (1986) comme étant commune à toutes les régions 5' en amont des gènes de toutes les polyédries de VPN séquencées. Cette séquence est contenue à l'intérieur du point d'initiation de la transcription de l'ARN messager (ARNm) de la polyédrine (Possee et Howard, 1987). Plusieurs équipes ont démontré que l'altération ou la délétion de cette séquence diminuait considérablement le niveau d'expression du gène en question (Matsuura *et al.*, 1987; Possee et Howard, 1987; Rankin *et al.*, 1988) alors que des mutations en aval du gène de la polyédrine n'avaient aucune répercussion notable sur son expression (Matsuura *et al.*, 1987; Possee et Howard, 1987). Il en découle donc l'importance de conserver la séquence en amont du gène, dans le cadre d'insertion de séquences étrangères au niveau du gène de la polyédrine.

3.2.2 Le gène de la protéine p10.

Le gène de la p10 fait aussi partie des gènes exprimés en fin d'infection alors qu'il code pour une protéine de 10 kDa (Kuzio *et al.*, 1984). Cette p10 dite non-structurale, n'est pas considérée comme indispensable pour la réplique des VPN *in vitro* (Croizier *et al.*, 1987, Vlak *et al.*, 1988) (Figures 1.1; 1.2 et 1.3), mais semble jouer un rôle dans le phénomène de lyse cellulaire, observé lors d'infections aux VPN (Williams *et al.*, 1989). Les observations au microscope électronique de cellules infectées par un VPN démontrent l'accumulation de cette protéine formant des masses fibreuses intranucléaires (Van der Wilk *et al.*, 1987). Vlak *et al.* (1988) ont proposé le remplacement du gène de la p10 par un gène étranger selon le même protocole que pour la polyédrine afin d'obtenir un virus recombinant s'incluant dans des polyèdres et donc stable hors de l'hôte (Figure 1.4). Les résultats de ces

essais ont montré que le virus obtenu possède des polyèdres dépourvus de membrane et donc plus susceptibles à des stress physiques (Williams *et al.*, 1989). Ceci démontre qu'un virus déficient en p10 aurait des polyèdres moins stables dans l'environnement comparé à la souche sauvage. Si cela est le cas, les virus recombinants polyèdres (+)/p10 (-) seraient des bio-insecticides de choix. En effet ces virus seraient suffisamment stables pour une utilisation commerciale, mais pas assez résistant pour persister trop longtemps dans l'environnement.

À l'instar du gène de la polyédrine, les études de Weyer et Possee (1989) soulignent l'importance de la séquence en tête du gène de la p10 quant à son taux d'expression. Il est important de noter que la p10 est exprimée quelques heures avant la polyédrine (Roelvink *et al.*, 1992). Cette découverte a suscité différents groupes à rechercher l'existence d'interactions entre la transcription et/ou la traduction du gène de la polyédrine et de la p10. Van Oers *et al.* (1992) ont montré que la transcription et/ou la traduction de chacun de ces deux gènes n'interfèrent pas avec l'autre. En effet, ce groupe a construit différents baculovirus ayant le gène bactérien LacZ sous le contrôle du promoteur du gène de la p10 avec diverses mutations au niveau du gène de la polyédrine. Dans aucun des cas, ils ont noté l'augmentation de l'expression du gène rapporteur LacZ. D'un autre côté, Chaabihi *et al.* (1993) ont montré que des délétions au niveau du promoteur p10 entraînent l'augmentation de la transcription du gène de la polyédrine alors que l'inverse est sans conséquence pour le gène de la p10. Les auteurs attribuent ces résultats à la présence d'une compétition naturelle au niveau de la transcription, entre l'expression du gène de la p10 et du gène de la polyédrine.

Dans le cas de manipulations génétiques des baculovirus, il faut retenir de ces deux analyses que la nature des gènes présents sous le contrôle des deux promoteurs, est sans conséquence pour leur expression. Par contre, des altérations au niveau de la séquence du promoteur de la p10 entraînent un déséquilibre au niveau du taux d'expression du gène remplaçant celui de la polyédrine.

Figure 1 **Caractéristiques de l'infection au VPN**

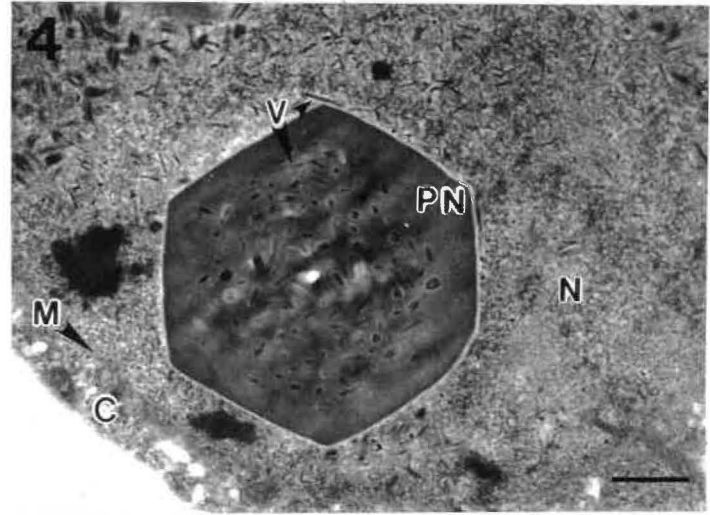
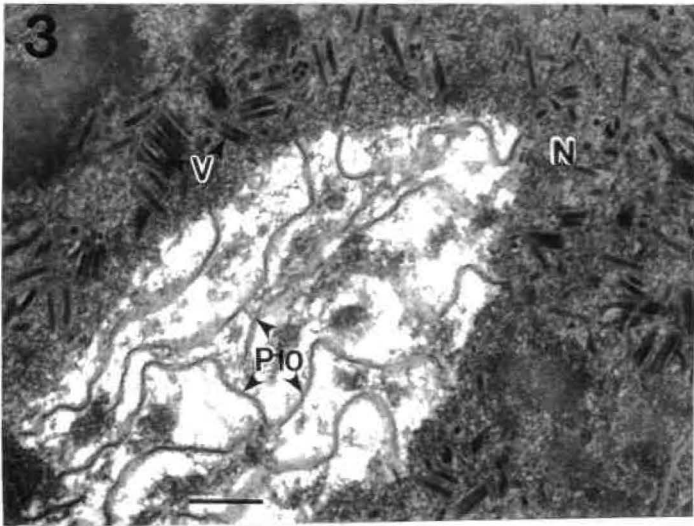
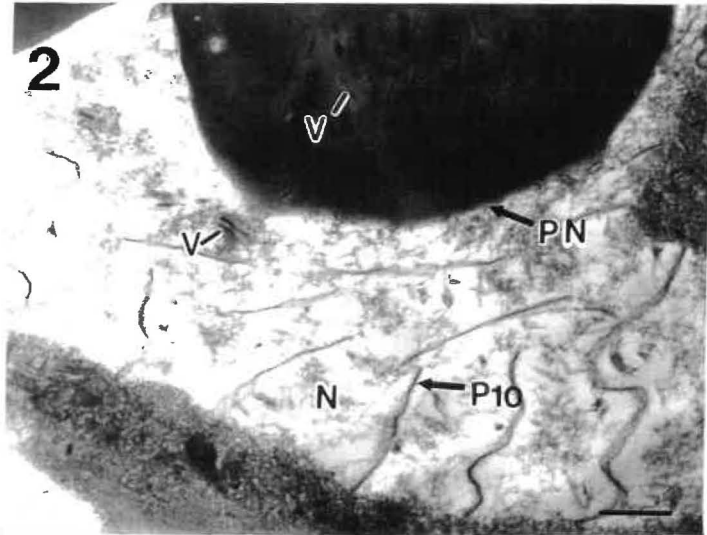
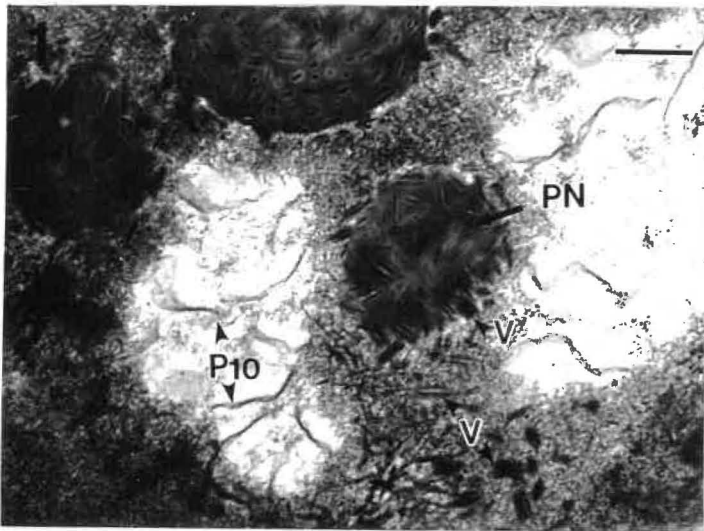
1 à 4

Figure 1.1: Hémocyte de larve infectée au *BmVPN* de type sauvage.
Barre = 500 nm; PN= Polyèdre de VPN; P10= Protéine p10; V= Virions de VPN

Figure 1.2: Cellules NISES BoMo-15-AIIC infectées avec le *BmVPN* de type sauvage.
Barre = 400 nm; N= Noyau; PN= Polyèdre de VPN; P10; Protéine p10; V= Virions de VPN.

Figure 1.3: Cellules NISES BoMo-15-AIIC infectées avec un *BmVPN* recombinant n'exprimant pas le gène de la polyédrine.
Barre = 400 nm; N= Noyau; P10= Protéine p10; V= Virion de VPN.

Figure 1.4: Cellules NISES BoMo-15-AIIC infectées avec un *BmVPN* recombinant n'exprimant pas le gène de la p10.
Barre = 667 nm; C= Cytoplasme; N= Noyau; M= Membrane nucléaire; PN= Polyèdre de VPN; V= Virions de VPN.



3.3 Les baculovirus comme vecteurs d'expression.

Une panoplie de vecteurs d'expression baculoviraux construits permet l'expression d'un ou de plusieurs gènes étrangers dans des lignées continues d'insectes (Bishop, 1992). Ces gènes étrangers sont introduits dans le génome baculoviral par la co-transfection de l'ADN viral avec un vecteur de transfert contenant le gène d'intérêt. Ce dernier peut être placé sous le contrôle de promoteurs viraux comme celui de la protéine p10 ou de la polyédrine, afin de permettre l'hyper-expression de la protéine dans des cellules permissives. Selon le promoteur et le gène inséré, on peut en obtenir jusqu'à 50% du poids total de la cellule en protéines. À part le type de glycosylation (Miller, 1986) toutes les autres modifications post-traductionnelles des protéines sont semblables aux autres cellules eukaryotes. Ainsi, la protéine exprimée est antigéniquement et immunogéniquement identique à la sauvage, si l'on en juge par le nombre de protéines déjà exprimées.

Plusieurs types de construction s'offrent quant aux choix du promoteur à utiliser. Nous avons opté pour ceux de la polyédrine et de la p10 qui sont toutes deux exprimées en fin du cycle de réplication. Ainsi, les gènes étrangers sous le contrôle de ces unités transcriptionnelles, sont exprimés environ 10 à 15 h post-infection. Afin de raccourcir ce temps, Miller (1988) a proposé l'utilisation de promoteurs précoces. Bien que ces derniers ne soient pas très puissants en comparaison avec ceux de la polyédrine et de la p10, l'expression précoce des gènes à caractères bio-insecticides pourrait compenser pour la réduction du niveau d'expression. Si un promoteur précoce était utilisé, le nouveau gène pourrait être exprimé lors d'infections semi ou non permissives, rompant alors la spécificité d'hôte (McClintock *et al.*, 1986).

4 Les polyédrines cypovirales.

4.1 Généralités.

Nous avons vu que la caractéristique cytologique principale de la virose cypovirale est la présence de corps d'inclusion ou polyèdres dans le cytoplasme des cellules infectées.

Alors que ces structures ressemblent aux polyèdres baculoviraux (VPN), les études faites aux niveaux génétiques et antigéniques ont démontré le contraire (Rohrmann *et al.*, 1980). Les points communs entre ces deux types de polyèdres, se résument en leur rôle ainsi qu'en leur capacité d'inclure les virions (pour la majorité (Hukuhara, 1985)) issus de la même souche. Il existe une panoplie de polyèdres de VPC différents quant à la séquence du gène correspondant, leur morphologie et leur lieu de cristallisation dans la cellule. Ces corps d'inclusion caractérisent chaque type et souche de VPC.

La présence de polyèdres dans les cellules infectées ne semble pas être à elle seule à l'origine de la pathologie. En effet, l'infection cypovirale entraîne une augmentation de la régénération de l'épithélium intestinal infecté, rappelant les phénomènes inflammatoires. La régénération active de l'épithélium infecté, due au taux élevé de desquamation des cellules matures présentant des polyèdres, serait à la base des épithéliums immatures retrouvés chez les insectes souffrant de polyédroses (Iwashita, 1971). Les fonctions physiologiques de l'organe devenant ainsi quasi inexistantes, explique le phénomène de malnutrition observé chez les larves infectées (Yamaguchi, 1962; Yamaguchi et Ayuzawa, 1970; Yamaguchi et Hukuhara, 1973). Lors de la transmission horizontale du virus, on attribue aux polyèdres la capacité de relâcher les virions uniquement lorsque le pH intestinal est alcalin (pH= 10,8). En effet, la capacité des corps d'inclusion à se dissoudre à des pH alcalins les rend particulièrement susceptibles aux sucs digestifs de l'insecte au niveau de l'intestin moyen. Ainsi, les polyèdres participent dans l'acheminement des virions jusqu'aux cellules susceptibles, par leurs propriétés chimiques.

4.2 Le processus de cristallisation de la polyédrine.

Lors des cinétiques de synthèse des protéines cypovirales, la polyédrine apparaît 9 h après l'infection (Kawase et Miyajima, 1969, Arella *et al.*, 1984). La polyédrine diffuse jusqu'à la surface des stroma virogéniques atrophiés ou jusqu'aux agrégats de virions libres

dans le cytoplasme. La polyédrique encore non cristallisée, antigéniquement différente de celle des polyèdres, (Belloncik *et al.*, 1986) débute sa cristallisation. Cette dernière résulte en l'assemblage compact des fibres de polyédrique formant ainsi une matrice cristalline régulière et dense autour des virions (Kobayashi, 1971; Hukuhara et Bonami, 1992). Tout au long de la cristallisation, il y a inclusion aléatoire de virions (Wittig *et al.*, 1960; Arnott *et al.*, 1968; Kobayashi, 1971) jusqu'à l'obtention de polyèdres matures pouvant atteindre 10 μm et contenir de 1 à 10^4 virions (Arnott *et al.*, 1968; Stairs *et al.*, 1968, Longworth et Spilling, 1970; Kobayashi, 1971). Il semblerait que les particules virales incluses ne diffèrent pas de celles qui restent libres (Lipa, 1977; Payne et Kalmakoff, 1974). Certaines souches de *BmVPC* (Hukuhara, 1985) possèdent des polyèdres n'encastrent pas de virions à cause de leur localisation cellulaire (dans le noyau: *BmVPC* A, B, B1 et B2), de leur cristallisation (*BmVPC* C2) ou de la combinaison de ces deux derniers (*BmVPC* C1 et C2). Mais pour la majorité des VPC, 30% des virions se retrouvent encastrent dans des polyèdres intracytoplasmiques à matrice cristalline rigoureuse (Hayashi, 1970). Alors que l'inclusion de particules virales se fait aléatoirement, on ne retrouve dans des polyèdres cypoviraux que des virions de VPC (Arella *et al.*, 1983; Payne et Mertens, 1983). En effet, l'absence d'organelles cellulaires ou d'autres contaminants dans les polyèdres cypoviraux, suggère la possibilité de phénomènes de reconnaissance entre les virions et la polyédrique (Arnott *et al.*, 1968).

4.3 Cristallisation en fonction de la cellule infectée.

Le microscope photonique et l'oeil nu nous permettent de noter les effets cytopathologiques et physiopathologiques de l'accumulation de polyèdres dans l'intestin (Iwashita, 1971; Belloncik, 1989). Mais les virions non inclus (Hayashi, 1970), échappent à ces observations. Certes, ils jouent un rôle capital dans la dissémination de l'infection à l'intérieur de l'intestin (Aruga *et al.*, 1963; Kobayashi, 1971). Par contre, la présence de hauts titres

viraux dans l'hémolymphe de larves infectées *per os*, démontre qu'il y a aussi une dissémination systémique des particules virales infectieuses. Mis à part des résultats de Stoltz (1969) encore non reproduits, aucun rapport n'a été fait concernant la présence de polyèdres ailleurs que dans l'épithélium de l'intestin. Mais certaines cellules comme les hémocytes, ne montrent *in vivo* aucun signe d'infection due au VPC bien qu'elles supportent la réplication complète de ce virus *in vitro*. Truong (1990) a démontré qu'il est possible d'obtenir la réplication de l'ARN viral *in vitro* sans l'expression des gènes, donc sans la synthèse de virions ou de polyèdres. Kobayashi et Belloncik (résultats non publiés) ont confirmé cette possibilité en montrant qu'il y a réplication du génome viral du *Es* VPC dans une lignée de *B. mori* (BmN4 et NISES BoMo-15-AIIC), sans formation de particules virales infectieuses ni de polyèdres.

Trois possibilités différentes peuvent être envisagées au niveau de la réplication incomplète d'un VPC. La première est la réplication du génome viral sans expression des gènes (Truong, 1990; Belloncik et Kobayashi, (données non publiées)). La seconde est la synthèse de particules virales infectieuses sans expression du gène de la polyédrine. La troisième est la réplication normale du virus sans cristallisation de la polyédrine exprimée comme c'est le cas pour certaines souches de *BmVPC* (Hukuhara, 1985). En bref, par réplication incomplète d'un VPC on peut entendre un phénomène d'inhibition de l'expression de certains ou de tous les gènes viraux (dont celui de la polyédrine) ou une entrave à l'agencement final des produits d'expression de ces gènes. A priori, on ne peut écarter une quatrième possibilité d'une infection abortive au VPC. Dans ce cas, il n'y aurait en début d'infection que la production de protéines non-structurales à partir du génome viral (donc sans particules virales, ni polyèdres). Par contre aucun indice d'un tel phénomène n'a encore été rapporté.

À la lumière de ces observations, la spéculation voulant que les VPC puissent se répliquer de façon partielle dans certaines cellules *in vivo* (comme les hémocytes) est fondée. Un

second fait appuyant cette spéculation est la présence de données faisant état de phénomènes d'infections latentes suggérant la persistance d'ARN viral ou de particules virales infectieuses en quantité infinitésimale, dans les cellules. L'induction de stress telles que la présence d'un autre virus (Grace, 1962; Belloncik *et al.*, 1992) ou l'injection de larves avec de l'eau stérile (Belloncik *et al.*, 1991), peut réveiller l'infection cypovirale latente. Une discussion plus approfondie de ce phénomène encore controversé, est présentée par Aruga (1971).

Nous avons investigué *in vivo* l'existence d'entraves à la cristallisation de la polyédrique. Ainsi, nous avons regardé si la polyédrique d'un VPC cristallisait une fois son expression assurée par un VPN recombinant. Lors de la réalisation de notre projet, nous avons étudié le lien entre l'expression et la cristallisation de la polyédrique sans se préoccuper de facteurs connexes tel que le processus de réplication du génome cypoviral. Il est important de rappeler que la réplication du vecteur de transfert, à savoir le VPN recombinant, n'interfère pas au niveau de l'expression et des modifications de la protéine étrangère exprimée (Maeda *et al.*, 1985; Horiuchi *et al.*, 1987; Miyajima *et al.*, 1987; Gheysen *et al.*, 1989; Prehaud *et al.*, 1989; Urakawa *et al.*, 1989; French et Roy, 1990; Mori *et al.*, 1993). Parallèlement, des études en cours portant sur la détection d'ARN viral dans les cellules ne montrant pas de signes d'infection tels que décrits plus haut, compléteront le tableau.

4.4 Facteurs influençant la cristallisation.

Des études ont montré que la cristallisation de la polyédrique cypovirale à elle seule, pouvait être influencée par des facteurs de types cellulaires, environnementaux et génétiques.

4.4.1 Influence de la cellule.

Lors de l'infection *per os* de vers à soie par un *BmVPC*, Iwashita (1971) a observé que la formation de polyèdres n'avait pas lieu dans les cellules immatures de l'épithélium intestinal. Par ailleurs, une fois le processus de différenciation des cellules enclenché, on notait l'accumulation de corps d'inclusion dans leur cytoplasme. L'auteur a attribué ces observa-

tions à l'absence de substance cellulaire requise pour la réplication du VPC dans les cellules immatures ou bien à l'absence de récepteur pour le VPC à la surface des cellules basales. Ainsi, la maturation de ces dernières permettrait de combler ces lacunes et de rendre les cellules susceptibles à l'infection. Dans le même ordre d'idée, l'infection *in vitro* de cultures d'embryons de *Bombyx mori* a permis de démontrer l'importance du niveau de différenciation à la fois fonctionnelle et structurale de l'épithélium intestinal quant à sa capacité à supporter une infection cypovirale (Takami *et al.*, 1967). À la lumière de ces résultats, il semblerait que le stade de maturation de la cellule d'insecte détermine sa susceptibilité au VPC.

Parallèlement, le type de cellule est aussi capital dans l'agencement du produit d'expression des gènes de VPC. Selon Lavallée *et al.* (1993) l'expression du gène de la polyédrique d'*Es* VPC dans un système procaryotique (*E. coli*) est possible mais la cristallisation normale de la protéine ne s'effectue pas. L'absence de glycosylation de la polyédrique (Payne et Kalmakoff, 1974; Arella *et al.*, 1988) aurait pu être à la source des observations faites. Mais, Lavallée *et al.* (1993) ont démontré que le phénomène de glycosylation absent chez les bactéries, ne pouvait justifier la cristallisation anormale de la polyédrique recombinante. En effet, si la polyédrique sauvage et la recombinante migrent au même niveau lors d'analyses sur gel de polyacrylamide, cela confirme l'absence de différence entre les deux polyédriques. On ne peut donc attribuer cette cristallisation anormale à la nature même de la protéine recombinante synthétisée dans ce système cellulaire. Il est fort probable que la présence ou l'absence de facteurs cellulaires et non des voies métaboliques, entravent le processus de cristallisation.

4.4.2 Influence de l'environnement extracellulaire.

La composition de l'environnement de la cellule est aussi un facteur dont il faut tenir compte lors de la recherche de cellules montrant des signes caractéristiques de l'infection due au VPC. En effet Belloncik (1989) a rapporté qu'en culture primaire, des hémocytes ne pré-

sentant aucun signe d'infection bien que provenant de larves infectées, supportent la réplication du virus et la formation de corps d'inclusion caractéristiques. L'auteur a attribué l'absence de signes d'infection chez les hémocytes *in vivo*, à la présence d'agents antiviraux empêchant soit la réplication du virus, soit l'expression des gènes ou directement affectant la cristallisation de la polyédrine. Afin de pouvoir identifier le niveau sur lequel jouent ces agents anti-VPC quant à l'infection d'hémocytes aux VPC *in vivo*, deux stratégies sont actuellement utilisées. La première est l'isolement d'ARN viral dans les cellules ne comportant pas de polyèdre, à partir de larves infectées. La seconde, est l'identification de l'expression du gène de la polyédrine par détection de la protéine non cristallisée.

Nous avons vu que l'accumulation de polyédrine mène à la formation de cristaux à l'intérieur d'une même cellule. Les études qui ont porté sur la formation des polyèdres montrent que des phénomènes de fusion (Stoltz et Hilsenhoff, 1969) ainsi que de morcellement des corps d'inclusion (Hukuhara, 1985) sont possibles. Ces réarrangements naturels semblent être sous l'égide de facteurs cellulaires, dont le dérèglement peut être induit par l'irradiation de type gamma des cellules infectées (Belloncik et Arella, 1981). Cette irradiation se traduit par l'augmentation de l'expression de la protéine ainsi que la cristallisation anormale et anarchique de la polyédrine. Le système atteint par l'irradiation reste à être identifié. Mais il est évident que ce dernier participe dans la régulation de la cristallisation des polyèdres de VPC.

Parallèlement, la présence de toxine dans le milieu de culture interfère avec le nombre et la morphologie des cristaux de polyédrine. En effet, l'ajout de la toxine 3'-déoxyadénosine de champignon ou cordycépine dans une culture cellulaire de *Lymantria dispar* infectée avec du VPC d'*E. scandens* entraîne une réduction de la réplication du VPC et du nombre total de polyèdres, proportionnelle à la dose de toxine utilisée (Belloncik et Arora, 1979). D'autre part, l'infection de cette même lignée avec l'*Es* VPC mais en présence d'Actinomycine-D (AMD), a montré que la réplication de l'ARN viral sans synthèse de polyédrine est

possible (Arella, 1983). La présence de ces toxines dans le milieu influence donc à la fois la réplication et l'expression des gènes de VPC; ce qui supporte ainsi l'hypothèse de Belloncik (1989) attribuant à des agents anti-viraux l'absence de polyèdres dans les hémocytes de larves infectées.

D'autre part, il est possible d'infecter une lignée cellulaire avec un VPC isolé *in vivo* à partir des virions libres présents dans l'hémolymphe de larves infectées. Ainsi, Quiot et Belloncik (1977) ont démontré que le passage sur une lignée *L. dispar* du virus *Es* VPC produit *in vivo*, entraîne la formation de corps d'inclusion parfaitement et exclusivement cubiques alors que chez les larves, 99% des polyèdres sont sphériques. Afin de démontrer que le groupe n'était pas en présence de deux souches différentes d'*Es* VPC, les auteurs ont passé *in vivo* le virus produit *in vitro* et vis versa plusieurs fois. Une seule souche de VPC donna des cristaux cubiques en culture cellulaire et sphériques *in vivo*. La présence d'un profil de migration électrophorétique identique pour l'ARNbc viral provenant de suspensions virales des deux systèmes, a permis aux auteurs de conclure que la cristallisation de la polyédrique semble être influencée par les conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les cellules.

4.4.3 Influence de la température.

Un troisième facteur bien connu influençant l'expression et la cristallisation de la polyédrique est la température. De hautes températures (37° C) empêchent la réplication en inactivant l'ARN polymérase du virus (Payne et Mertens, 1983). De basses températures (10° C) diminuent la quantité de polyèdre retrouvée dans les cellules infectées (Arella, 1983) voire inhibent l'expression du gène de la polyédrique tout en permettant la réplication du génome viral à 4° C (Truong, 1990). Paradoxalement, des études sur la souche C2 du VPC de *Bm* donnant une polyédrique ne cristallisant pas ont montré qu'*in vivo* plus la température était basse plus ces corps étaient volumineux (Yamaguchi, 1972). Par ailleurs, la souche A du

même VPC donnant des cristaux intranucléaires, a la propriété d'avoir des polyèdres déformés quand la température d'incubation varie entre 30° C et 40° C. Ces anomalies peuvent être rectifiées par un retour à la température optimale d'infection, soit 25° C. (Yamaguchi, 1968; Yamaguchi *et al.*, 1969). Hukuhara (1985) attribue ces changements de formes à la recherche d'états thermodynamiquement stables selon de la température du protoplasme.

4.4.4 Influence génétique de la souche virale.

La question des différentes souches de VPC à l'intérieur d'un même type n'est pas récente. Les études qui ont principalement porté sur le prototype cypovirale (*BmVPC*) ont démontré l'existence de 9 souches différentes donnant chacune un type particulier de corps d'inclusion. Trois groupes de souches peuvent être ainsi distingués. Le premier comporte les souches I, H et P possédant des polyèdres qui ne diffèrent que par leur forme. Le second groupe, les souches A, B et B2, est constitué de VPC dont la polyédrine peut cristalliser dans le noyau des cellules; évidemment sans inclure de virions. Enfin, le troisième groupe rassemble les VPC de *Bm* souche B1, C1 et C2, dont la polyédrine ne cristallise pas et peut se retrouver soit dans le noyau (C1, C2) soit dans le cytoplasme (B1 et rarement C2). À l'intérieur de toutes ces souches, seules la A, H et I possèdent une polyédrine sérologiquement identique dont la séquence en acide aminé est très similaire (Hukuhara et Hashimoto, 1966; Miyajima, 1976; Kawase et Yamaguchi, 1974; Hukuhara et Midorikawa, 1983). Récemment, Mori *et al.* (1989) ont montré que la seule différence entre les souche A et H se situe au niveau de la partie C-terminale de la polyédrine. Ainsi, la A présente une séquence qualifiée de signal d'internalisation nucléaire. Des variations au niveau de la séquence du gène de la polyédrine à l'intérieur même d'un type de VPC sont aussi à l'origine de la variété des polyèdres obtenus (Nakazawa *et al.*, 1994; 1995).

5 Présence simultanée de deux polyédrines dans une même cellule.

Comme nous l'avons vu, les VPC et les VPN induisent des viroses fréquemment ob-

servées dans la nature. Les doubles infections VPN/VPC rapportées confirment la présence des deux virus en même temps dans le tissu intestinal (Iwashita et Aruga, 1957; Bird, 1969; Belloncik *et al.*, 1982; St-Amand, 1982) et démontrent qu'il peut y avoir infection de deux cellules adjacentes avec deux virus différents sans observer la double infection d'une même cellule. D'un autre côté expérimentalement, plusieurs études ont été faites au niveau d'infections doubles concernant deux VPC, un VPC et un autre entomovirus et un VPC avec un VPN. Au niveau de l'expression des polyédrines deux possibilités ont été retenues: Soit la co-expression des deux polyédrines, soit l'expression sélective de l'une d'entre elles.

5.1 Double infection cypovirale.

L'infection de larves de *B mori* par deux souches de *BmVPC* (Aruga *et al.*, 1961; Tanaka et Aruga, 1967; Yamaguchi, 1974, 1975 a et b) ou par deux VPC différents (Tanada et Chang, 1964) ont montré la formation simultanée mais dans des cellules intestinales différentes, de polyèdres caractéristiques à une souche. La co-expression et la co-cristallisation de deux polyédrines peuvent ainsi avoir lieu dans des cellules différentes d'un même tissu. Payne (1976) montra que deux types de VPC pouvaient se répliquer dans un même intestin, en l'occurrence un VPC de type 2 et un du type 3 dans une larve d'*Arctia caja*. Par contre, seule la polyédrine du VPC type 3 était produite. Belloncik (1989) poussa l'expérience encore plus loin. Il démontra qu'*in vitro* trois VPC (*Es* VPC, *Heliothis armigera* (*Ha*) VPC et *BmVPC*) pouvaient se répliquer en même temps. Deux d'entre eux (*Es* et *Ha*) pouvaient le faire dans une même cellule avec production de polyèdres caractéristiques de chaque type identifiés au microscope électronique par marquage immunologique à l'or colloïdal.

5.2 Double infection VPC/VPN.

Iwashita et Aruga (1957), Belloncik *et al.* (1982) et St-Amand (1982) ont rapporté la possibilité de doubles infections *in vivo* entre un VPC et un VPN se traduisant par des polyèdres cypoviraux et baculoviraux dans des cellules distinctes, respectant le tropisme viral.

Paradoxalement, Inoue (1981) avait rapporté la double infection de larves de *Bm* avec un VPN endogène et un *Bm*VPC souche A (donnant des polyèdres intranucléaires). Dans la même cellule, il a montré que la cristallisation des deux polyédrines pouvait avoir lieu avec l'inclusion de certains virions baculoviraux dans les corps d'inclusion cypoviraux, situés ici dans le noyau. Cette observation allait à l'encontre du principe voulant que l'inclusion des particules virales infectieuses dans leurs polyèdres soit basée sur des phénomènes de reconnaissances spécifiques entre les virions et la polyédrine (Arella *et al.*, 1983; Payne et Mertens, 1983).

Le processus d'inhibition de l'inclusion de virions de VPN dans leurs polyèdres a été démontré par Quiot *et al.* (1980). Ce groupe a rapporté que suite au développement du VPC de *Es* dans une lignée *Spodoptera littoralis*, il y avait inhibition de l'inclusion des virions de VPN dans leur propre polyédrine. De plus ils ont montré que les particules baculovirales n'étaient pas enveloppées. Quiot *et al.* (1980) auraient ainsi démontré que la réplication du VPC et/ou l'expression du gène de la polyédrine cypovirale interfèrent avec le processus d'inclusion des VPN. Récemment, Akoury et Belloncik (1993) ont rapporté que les lipides et le cholestérol avaient un effet sur la synthèse de l'enveloppe et sur l'inclusion des virions *in vitro*. Ainsi, toutes ces données suggèrent que l'inhibition de la formation de l'enveloppe virale par la polyédrine cypovirale, la réplication du VPC Quiot *et al.* (1980) ou certains composés dans le milieu de culture des cellules (Akoury et Belloncik, 1993) pourraient être à l'origine de l'inhibition de l'inclusion des VPN dans les polyèdres.

En bref, trois scénarios différents ressortent, concernant les doubles infections VPC/VPN: Un, les polyèdres des deux virus se retrouvent dans des cellules différentes conformément au tropisme de chaque virus. Deux, les deux polyédrines peuvent cristalliser dans la même cellule et les virions baculoviraux peuvent s'inclure dans les deux sortes de polyèdres. Trois, les deux polyédrines peuvent cristalliser dans la même cellule mais l'inclusion des virions de VPN dans leurs propres polyèdres est inhibée.

5.3 Double infection VPC/Virus de la flacherie et Iridovirus.

Si on retrouve des phénomènes d'interférences lors de doubles infections cypovirales, les infections ayant pour protagonistes un VPC et un autre entomovirus sont plutôt indépendantes. En effet, la co-infection d'un VPC avec le Chilo Iridescent Virus (CIV) (Arella *et al.*, 1983) a montré l'absence d'interférence entre cet entomovirus et le cypovirus avec un certain favoritisme de la réplication du VPC. La présence simultanée des deux types de particules virales ne semblant pas avoir affecté l'inclusion spécifique des virions cypoviraux dans leur polyédrique. Par contre, l'infection de *Bombyx mori* avec un VPC et avec le virus de la flacherie (Iwashita, 1971) a démontré une interférence surtout au niveau de la grosseur des polyèdres de VPC dans les cellules cylindriques. En effet, il a été noté que les deux virus se répliquent dans le même type de cellule (cylindrique). Dans le cas de la double infection de ces cellules avec le VPC et le virus de la flacherie, les polyèdres de VPC normalement éparpillés à travers tout le cytoplasme se retrouve en moins grande concentration, dans la partie apicale des cellules et possède une taille inférieure en comparaison avec ceux présents lors d'infection simple due au VPC.

Matériel et Méthodes

1 Maintien de la lignée NISES BoMo- 15-AIIc

Cette lignée a été établie par Inoue *et al.* (1990) au National Institute of Sericultural and Entomological Sciences (NISES) à Tsukuba au Japon à partir de cellules d'embryons de *Bombyx mori*. Les cellules sont cultivées dans des flacons de 25 cm² (Falcon, F₂₅) à raison de 200 000 cellules par mL de milieu MGM-448 (Annexe 1) + 10 % Sérum de Veau Foetal (SVF) décomplémenté (56°C pendant 30 min) pH= 6.7, contenant 200 mM de gentamicine. La température optimale de croissance est de 25° C; température à laquelle la confluence est atteinte au bout de 7 jours. Suite à un lavage du tapis cellulaire avec 3 mL de solution de Carlson (Annexe 3) servant à éliminer les protéines du milieu, les passages se font par décollement des cellules avec 1 mL d'une solution contenant de la pancréatine (Annexe 2) à la température de la pièce pendant 10-15 min.

2 Élevage de larves de *Bombyx mori*.

Les larves reçues d'Agriculture Canada (Sault St-Marie, M. Robert McCron) au 3^{ème} stade, sont élevées en chambres à environnement contrôlé de type Conviron (I-23L Controlled Environmental Equipment, Manitoba, Canada) à 25 °C et 70 % d'humidité, avec une photopériode de 8 : 16 h (clarté : noirceur). La nourriture est constituée exclusivement de feuilles de mûriers fraîches, gardées à 4° C pour la durée d'un élevage, soit de 4 semaines. Les larves de troisième et quatrième stades sont nourries de feuilles jeunes, alors que les plus lignifiées sont données aux chenilles plus âgées.

3 Préparation de l'inoculum viral.

Les larves infectées sont recueillies et peuvent être saignées stérilement pour obtenir du virus libre de VPC ou de VPN à partir de l'hémolymphe. Au moyen d'une aiguille stérile, les larves infectées et stérilisées à l'éthanol 70%, sont piquées au niveau d'une patte. L'hémolymphe est alors recueillie à froid dans un tube contenant du PBS 1X avec 0,001% de phénylthiourée pour prévenir la mélanisation. Les échantillons sont ensuite centrifugés à

1 000g pendant 10 min à 4 °C, pour se débarrasser des cellules. Le surnageant contenant les virions libres est filtré puis congelé à -20° C pour un titrage éventuel sur une lignée permissive.

Dans le cas où l'état des larves ne permet pas une saignée, ces dernières sont placées dans un volume identique de milieu Grace (Sigma, Chemical company) sans SVF, contenant 0,001% de phénylthiourée et broyées dans un homogénéiseur Dupont™ de 50 mL. La chitine et autres débris larvaires sont éliminés du broyat dit brut, par filtration sur quatre épaisseurs de gaze stérile. Les polyèdres peuvent être séparés des virus libres par centrifugation à 4° C, 7 000 rpm pendant 10 min dans une centrifugeuse de type Sorval™ (Dupont Inc.) avec le rotor SS-34 de Beckmann. Le culot représentant les polyèdres est resuspendu dans du PBS 1 X et congelé à -20° C. Le surnageant contenant les virions libres est directement congelé ou filtré (filtre de 0,45 µm), titré et congelé pour une analyse ultérieure.

Dans le cas du *Es VPC* (Quiot et Belloncik, 1977), le virus avait déjà été produit sur des larves d'*Euxoa Scandens* dans notre laboratoire (Lot # 14). Quant au VPN de *Bombyx mori*, nous l'avions amplifié sur des vers à soie à partir d'un lot de polyèdres purifiés produit par le Dr. J. Kobayashi et conservé à -20° C.

4 Multiplication virale *in vivo* et *in vitro*.

4.1 Infection de BoMo-15-AIIc par un VPC et un VPN.

4.1.1 Infection de culture cellulaire en boîte (F₂₅).

Dans un F₂₅, 800 000 cellules sontensemencées dans 4 mL de milieu MGM-448 complet. Elles sont laissées 16 h dans le but qu'elles s'adsorbent à la surface du plastique. Après avoir vidangé le vieux milieu, les cellules sont infectées avec 1 millilitre (mL) de suspension virale (VPC et/ou VPN) à une Multiplicité d'Infection (MI) de 3.

Après une absorption de 60 min sous agitation constante sur une plaque basculante à la température de la pièce, l'inoculum est éliminé pour être remplacé par 4 mL de nouveau milieu MGM-448 + 10% SVF par F₂₅. L'infection se déclare généralement après 4 à 5 jours d'incubation dans les conditions optimales de croissance (25° C).

4.1.2 Infection de culture cellulaire en cupule (Lames Labtek™).

Les cellules NISES BoMo-15-AIIc sontensemencées sur lames Labtek™ à raison de 60 000 cellules par 200 µL, par puits. Une fois qu'elles ont adhéré (environ 16 h après), le milieu est enlevé et une suspension de virus libres (soit VPC ou VPN) préparée dans du milieu MGM-448 complet, est ajoutée dans les puits à une Multiplicité d'Infection de 3. Suite à une incubation de 72 h (temps optimal pour avoir le plus possible de polyédrique et le moins possible de polyèdres dans les cellules), l'infection est arrêtée en enlevant le milieu et en rinçant délicatement les cellules avec 300µL / puits de PBS 1X froid.

4.2 Infection de larves.

4.2.1 Par ingestion de polyèdres viraux (*per os*)

Sur une feuille fraîche d'environ 10 cm², 3 mL de suspension contenant 10⁷ polyèdres par mL sont répartis sur la totalité de la surface au moyen d'un pinceau à usage unique, préalablement stérilisé dans de l'éthanol 70%. Vingt larves sont placées sur la feuille et laissées dessus sans addition de nourriture, jusqu'à ce qu'elles aient consommé toute la feuille contaminée. Enfin, des feuilles sont placées dans le contenant pour satisfaire l'appétit des chenilles. Les larves infectées sont recueillies et sacrifiées 4 et 14 jours après en ce qui concerne une infection par un VPN et VPC respectivement.

4.2.2 Par injection de virus dans l'hémolymphe.

Deux suspensions virales ont été préparées pour être injectées. Une suspension virale de VPC provenant de virus libérés à partir polyèdres de VPC dissous dans le tampon

carbonate ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,1 M, pH = 10,8) et une suspension de VPN libres provenant de surnageants de cultures cellulaires infectées. Dans les deux cas, le titre de la suspension virale a été ramenée à 10^7 DICT₅₀/mL et les larves ont été injectées au niveau de l'avant dernière paire de pattes avec une seringue de 1 mL. Environ 50 μL sont injectés dans chaque larve du 4^{ème} stade juste après la mue, afin d'obtenir une réponse maximale. Douze h après l'injection, les larves mourantes sont éliminées, considérées comme souffrantes de contaminations autres que virales. L'élevage se poursuit pendant 4 jours lorsqu'on infecte avec le VPN afin de minimiser les effets de la mue sur l'infection de l'intestin; mue qui a périodiquement lieu tous les 5 à 6 jours. Quant à l'infection au VPC, son développement est laissé pendant 10 à 15 jours avant de récolter les virus.

5 Extraction de l'ARN du VPC d'*Euxoa scandens* (Es).

D'un broyat brut de larves *Euxoa scandens* infectées avec le VPC endogène (Lot # 14), 200 μL en sont extraits. De la protéinase k (Boehringer Mannheim) et du SDS sont ajoutés à une concentration finale respective de 1 mg/mL et de 1%. Suite à une incubation de 3 h à 37° C, un volume égal de solution saturée de phénol est ajouté pour ensuite poursuivre l'incubation pendant 1 h à 56° C dans un bain circulant en agitant toutes les 5 min. Le tout est ensuite centrifugé dans une centrifugeuse de table (Canlab) à la température de la pièce pendant 10 min à 10 000g. Après avoir retiré la phase aqueuse, l'ajout de 100 μL de tampon TE pH= 8 (tris HCl, 10 mM pH= 8; EDTA, 1 mM pH 8) sert à récupérer un maximum d'acide nucléique pris dans l'interphase juste au-dessus de la phase organique. Une fois bien mélangé au vortex, une centrifugation identique à la précédente est exécutée et le volume de TE récupéré est ajouté à celui de la phase aqueuse précédemment recueillie. Un second lavage à la température de la pièce avec un volume de phénol identique à la phase aqueuse est effectué sur la solution d'acides nucléiques précédente. La séparation des deux phases se fait selon le protocole de centrifugation cité plus haut. Une seconde extraction utilisant un

volume égal de solution de phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) suit, pour finir avec une centrifugation à 10 000g, pendant 5 min, à la température de la pièce. Afin de se débarrasser du phénol, deux extractions au chloroforme: alcool isoamylique (24:1) sont exécutées, entrecoupées de centrifugations de 10 000g, pendant 2 min, à la température de la pièce. La phase aqueuse contenant les acides nucléiques ainsi débarrassés des protéines, est traitée avec 0,3 µg/mL d'ADNase (Boehringer Mannheim) pendant 2 h à 37° C. À la fin de cette incubation, 3 unités de ARNase T1 (Gibco BRL, Life technologies Inc.) sont ajoutées et l'incubation se poursuit 30 min de plus dans les mêmes conditions. Un mg/ mL de Protéinase k est ajouté et l'incubation se poursuit pendant 12 h à 37° C. L'élimination des enzymes se fait par une extraction au phénol: chloroforme: alcool isoamylique précédant 2 extractions au chloroforme: alcool isoamylique selon les conditions précédemment décrites. La phase de précipitation de l'ARN a lieu suite à l'ajout de 1/10 du volume de la phase aqueuse en NH₄OAc, 3 M et de 2,5 fois ce dernier dans l'éthanol 95 % à -20° C. L'incubation pour la précipitation à -70° C dure 60 min ou une nuit si faite à -20 °C. Il suffit alors d'une centrifugation à 4° C, 10 000g pendant 20 min pour mettre au culot l'ARNdb. Après lavage dans de l'éthanol 70% glacial, le culot est séché sous vide pendant 5 min. La dissolution à lieu dans 10 µL d'eau distillée stérile, traitée au diethylpyrocarbonate (DEPC). L'échantillon d'ARNdb viral est ainsi conservé à 4° C en vue d'une migration sur gel d'électrophorèse dans les 24 h qui suivent (Figure 2).

6 Purification du gène de la polyédrine d'*Es* VPC.

Suite à la dilution de la solution d'ARNbc viral dans le tampon de chargement (0.1 % de bleu de bromophénol, 0,1% de xylène cyanol FF et 40% de glycérol), le tout est passé à travers un gel d'agarose 0,8 %, dans du TAE 1X (0,04 M tris acétate; 0,001 M EDTA) à 100 Volts (Fisher Scientific) pendant 45 min (Bio-Rad, Mini-Wide-Sub™). Le gel est ensuite coloré dans une solution de bromure d'éthidium 0,5 mg/ mL et le 10^{ème} segment est

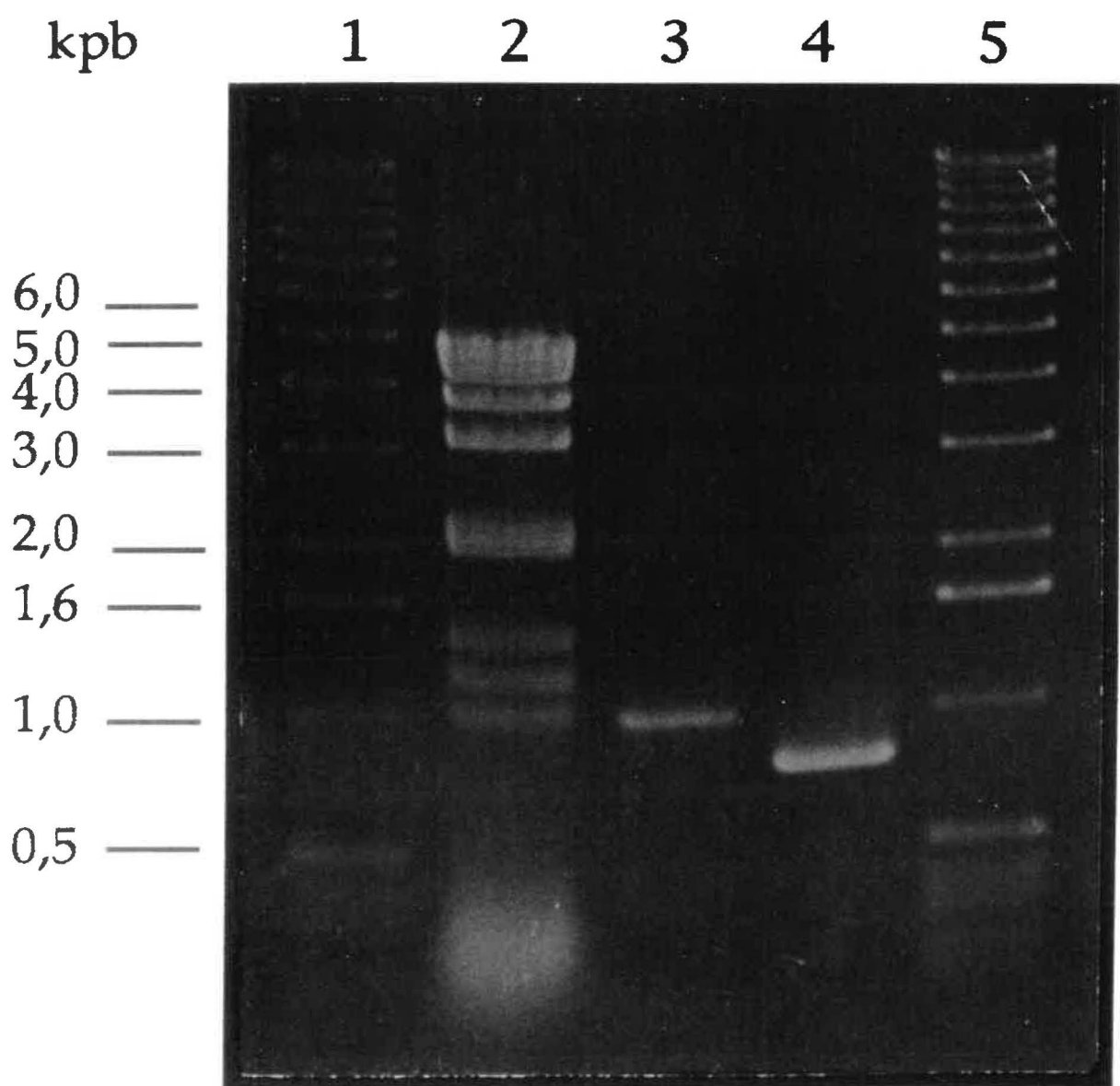
Figure 2: Profil électrophorétique de l'ARN viral du *Es* VPC. Extraction du segment #10 et comparaison avec l'ADNc synthétisé.

Puits 1 et 5: Standard de taille (1 kpb)

Puits 2: Profil électrophorétique de l'ARN viral d'*Es* VPC sur gel d'agarose 0,8%.

Puits 3: Segment #10 de l'ARN viral d'*Es* VPC isolé (environ 1 kpb).

Puits 4: ADNc du gène de la polyédriine d'*Es* VPC (846 pb).



excisé du gel sous une lampe à UV à longue longueur d'onde (300 nm). La purification de la bande se fait en suivant les instructions fournies par la trousse de Bio 101 Inc, RNaid-kit™. Brièvement, l'agarose est dissout à 56° C dans une solution de NaI et 5 µL de matrice sont ajoutés afin que l'ARNbc s'y lie. Le tout est incubé à la température de la pièce pendant 10 min puis centrifugé afin de concentrer la matrice combinée aux acides nucléiques. Le culot est lavé 3 fois dans la solution de lavage fournie et l'élution de l'ARNbc se fait dans 10 µL d'eau distillée stérile traitée au DEPC, à 56° C. L'élimination de la matrice par centrifugation à 10 000g permet de recueillir le segment d'ARN # 10. Un µL d'éluat est passé à travers un gel d'agarose 0,8% afin d'estimer la concentration et de s'assurer de la pureté du produit (Figure 2). La concentration du segment #10 de l'ARNdb viral est approximativement déterminée en comparant l'intensité de la bande représentant le fragment sur un gel d'agarose 0,8% coloré au bromure d'éthidium avec l'intensité des fragments de l'ADN du phage Lambda digéré avec EcoR I et Hind III (Voir la légende de la Figure 4).

7 Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène cypoviral

7.1 Choix des amorces

Les amorces ont été choisies en fonction de la séquence de l'ADNc publiée du gène de la polyédrique du *Es* VPC. Pour faciliter le clonage dans les différents vecteurs de transfert baculoviraux, un site Sma I/Xma I est inséré aux extrémités de l'amplicon.

Amorce PEsCH1: 5'-GTCCCCCGGGATGCACGGAAGCTAG-3'

Amorce PEsCH2: 5'-GAAGCGTTGACTGGAATGCA-3'

Amorce PEsCI1 : 5'-GTCCCCCGGGTTAAATCCCGGTT-3'

Ces amorces correspondent respectivement aux nucléotides 35 à 48, 410 à 430 et 830 à 843 de la séquence publiée par Fossiez *et al.* (1989).

7.2 Réaction de transcription inverse

Dans un tube Eppendorf (B) de 0,5 mL, 50 pmol d'amorce PEsCI1 et 200 à 400 ng

d'ARNbc du segment #10 sont mélangés dans un volume de 12 μL . Afin de dénaturer l'ARNbc, on chauffe à 100° C pendant 5 min, suivi d'un refroidissement subit sur glace durant au moins 2 min. À cette solution est ajouté le tampon RT constitué de: Deux μL de dNTP, 10 mM (Pharmacia), 2 μL de tampon d'amplification (50 mM tris HCl pH= 7,6; 50 mM KCl), 2 μL de MgCl_2 à 25 mM, 10 U (1 μL) d'inhibiteur de ARNase, RNAGuard™ (Pharmacia) et pour finir, 200 U (1 μL) de transcriptase inverse (MuLV Superscript™ RNase H⁻ de Gibco, BRL). Une incubation de 45 min à 37° C précède la dénaturation de l'enzyme et l'arrêt de la réaction par chauffage 98° C pendant 5 min.

7.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Dans un tube identifié A, est mélangé 80 μL du premier cocktail de la réaction contenant 50 pmol d'amorces PEsCI1 et PesCH1, 10 μL de tampon 10X de réaction de la polymérase à ADN Taq sans MgCl_2 et une unité de cette dernière (Gibco, BRL). Pour un départ à chaud (*Hot start*), ce cocktail est chauffé à 94° C pendant 5 min puis la température est abaissée à 72° C, température à laquelle le tube B est préalablement chauffé. Les contenus des tubes A et B sont mélangés, avec un plus une goutte de paraffine solide pour éviter les changements de concentrations par évaporation. Trente-cinq cycles de PCR sont effectués dans un thermocycleur programmable (Perkin Elmer Celtus). Chaque cycle étant: Une min à 98° C pour la dénaturation des brins, 1 min à 45 °C pour l'appariement amorce/ADNmc et 90 secondes à 72° C pour la réaction de polymérisation. Une fois les cycles complétés, le tube réactionnel est ramené à 4 °C pour solidifier la paraffine et la solution d'amplification est retirée.

La réaction de RT-PCR est répétée cinq fois afin de s'assurer du produit amplifié, vu les erreurs induites par la Taq ADN polymérase. Pour visualiser l'amplification, 5 μL de solutions sont passés sur gel d'agarose 0,8% et la présence d'une bande à environ 900 pb

confirma l'amplification de l'ADNc du gène de la polyédrine d'*Es* VPC selon le témoin positif (Figure 3).

7.4 Purification du produit d'amplification.

Les produits d'amplification sont purifiés de tous les réactifs ajoutés pour le déroulement de la réaction de RT-PCR, par la trousse GeneClean de Bio 101 Inc. Brièvement, selon les recommandations du fournisseur, 3 fois le volume de solution d'amplification sont ajoutés en NaI fourni et 10 μ L de matrice de silice y sont mélangés au vortex en vue d'une incubation de 15 min sur glace. Après la mise au culot du complexe silice-ADN, ce dernier est lavé trois fois avec la solution de lavage fournie par la trousse. L'éluion de l'ADN se fait dans un tampon TE pH= 8 à 56° C pendant 10 min. La silice éliminée par centrifugation à 12 000 rpm, nous nous retrouvons avec une solution pure d'ADNc du gène de la polyédrine cytopvirale, dont la détermination de la concentration se fait par estimation en comparaison avec un standard d'ADN lambda, digéré avec Hind III et EcoR I (Gibco-BRL) (Figure 4).

8 Clonage et séquençage de l'ADNc synthétisé.

8.1 Insertion de l'ADNc dans le plasmide pUC-18.

Selon les divers protocoles qui nous sont offerts, un ratio ADNc: plasmide de 5:1 paraît le plus approprié. Pour ce faire, 100 ng de pUC-18 linéarisé et déphosphorylé au site de clonage Sma I (Pharmacia) sont mélangés avec 143 ng de l'ADNc préalablement digérés avec l'endonucléase Sma I (1 ng d'ADNc à 900 pb donnant 3,5 fois plus de molécules que 1 ng de pUC-18 à 3,2 kpb). En suivant les instructions fournies avec la trousse de ADN Blunting™ (Bio/Can Scientific Inc.), nous procédons à l'insertion du fragment dans le plasmide en utilisant les propriétés de la T4 ADN ligase pour former les liens phosphodiester entre les extrémités franches du pUC-18 et du gène. La stratégie d'insertion choisie,

Figure 3: Gel d'agarose comportant les produits des cinq réactions de RT-PCR effectuées à partir du segment #10 de l'ARNbc du génome d'*Es* VPC.

Puits 1: Standard de taille (1 kpb)

Puits 2: Témoin positif. Amplification de l'ADNc contenu dans la construction de Fossiez (1990) pBR322 - ADNc du segment #10 d'*Es* VPC

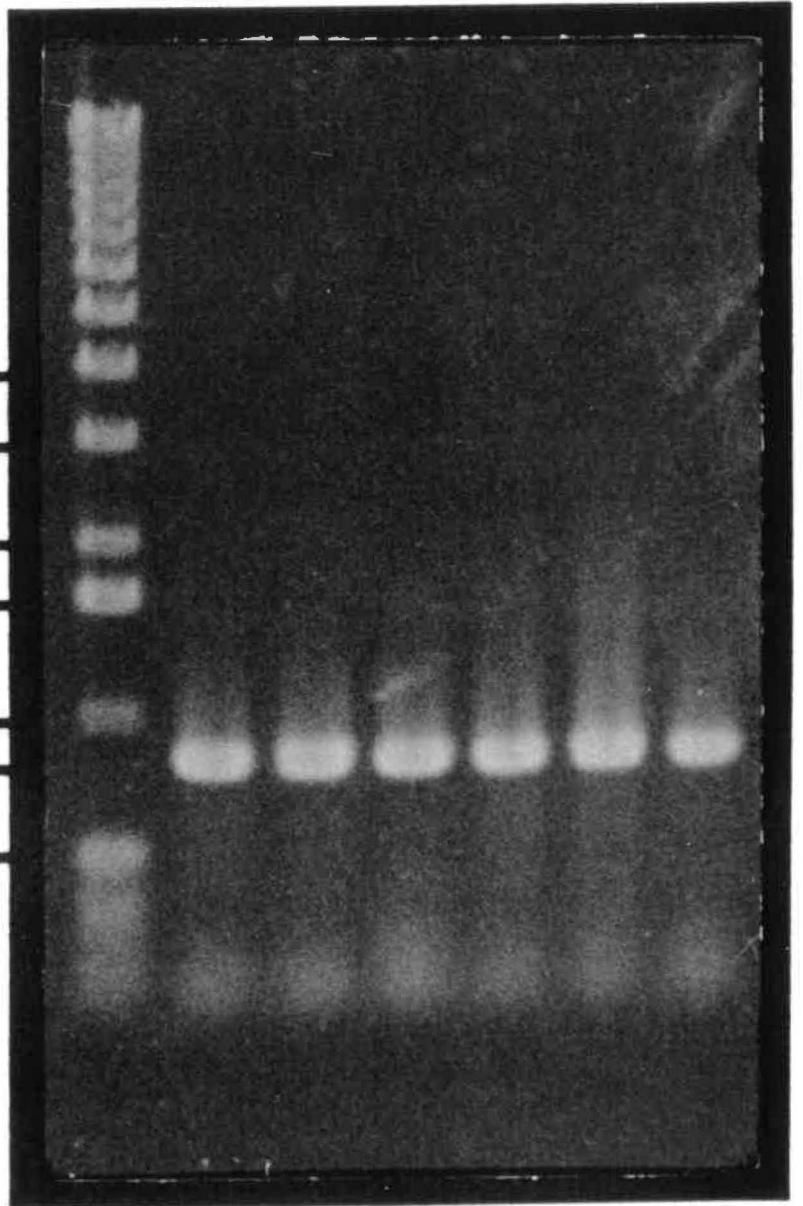
Puits 3 à 7: Produits de la réaction de RT-PCR sur le segment #10 de l'ARN viral d'*Es* VPC (846 pb)

N.B.: Le contrôle négatif (non montré ici) comportant à la place du segment #10 du *Es* VPC celui du *Bm*VPC ne donne aucun produit amplifié.

kpb

1 2 3 4 5 6 7

5,0
4,0
2,0
1,6
1,0
0,9
0,5



nous permet de recréer le site Sma I aux deux extrémités de l'ADNc, dans le but de pouvoir l'extraire par cette même enzyme du pUC-pol ainsi construit (Figure 5a).

8.2 Transformation de bactéries compétentes.

Deux cents μL de bactéries compétentes (*Epicurian coli* JM-109, Stratagene) sont décongelés sur la glace pendant 10 min et du β -mercaptoéthanol fraîchement préparé est ajouté pour avoir une concentration finale de 25 mM. Délicatement brassés, 50 ng de pUC-pol sont mélangés à 75 μL de bactéries. Après 30 min d'incubation sur glace, les cellules subissent un choc thermique de 42 °C pendant 45 sec et sont immédiatement refroidies sur glace. Six cents μL de milieu SOC (20 g de Bacto-tryptone™; 5 g de Bacto-Yeast™; 0,5 g de NaCl par litre; 20 mM de glucose) sont ajoutés et le tout est incubé pendant 60 min à 37 °C en rotation à 225 tours/min. Au terme de cette incubation, 200 μL de bouillon bactérien par Pétri sontensemencés sur des géloses Luria-Bertani (LB/ Litre: 10 g de Bacto-tryptone™; 5 g de Bacto-yeast™; 10 g de NaCl et 15 g/L de Bacto-Agar™) contenant 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'Ampicilline et 400 μg de 5-bromo4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) et 800 μg de isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG), dans le but d'opérer une sélection bleue/blanche des colonies. Les colonies blanches devant contenir le plasmide avec l'insert. Le tout est incubé 16 h à 37 °C.

8.3 Détection de pUC contenant l'insert (pUC-pol)

Les colonies blanches récoltées après 16 h sontensemencées dans 2 mL de bouillon 2x YT (Pour 1L: 16 g de Bacto-tryptone™; 10 g de Bacto-yeast™; 5 g de NaCl), contenant 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'Ampicilline. Leurs pendants sur gélose LB+Amp sont identifiés numériquement dans le but de pouvoir éventuellement y retourner. Suite à une incubation de 16 h à 37 °C, les bactéries sont mises au culot par centrifugation à 10 000g. Ce culot bactérien est resuspendu dans une solution glaciale de TEG (tris HCl, 25 mM pH= 8; EDTA 10 mM pH= 8; glucose 50 mM) et lysé avec une solution de SDS 1% et de NaOH 0,2 N.

Figure 4: Purification et quantification de deux produits de la réaction de RT-PCR effectuée à partir du segment #10 de l'ARNbc du génome d'*Es* VPC.

Puits 1: ADN du phage Lambda, digéré avec EcoR I et Hind III. Sachant que la grosseur du génome du phage Lambda est de 49 kpb, 9,8 μL d'une solution stock à 50 ng/ μL permet de déterminer la concentration d'ADN à partir de la taille de chaque segment.

Puits 2 et 3: 1 μL de produit d'amplification (2 et 3, Figure 3) purifié par la trousse GENE CLEAN™

L'estimation de la concentration en se basant sur l'échelle du puits #1, donne 100 ng/ μL dans l'échantillon du puits #2 et 200 ng/ μL dans le #3

ng/ μ l 1 2 3 4 kpb

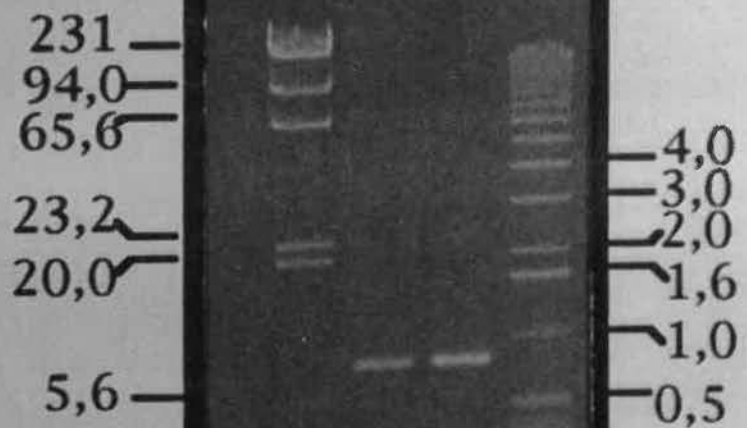
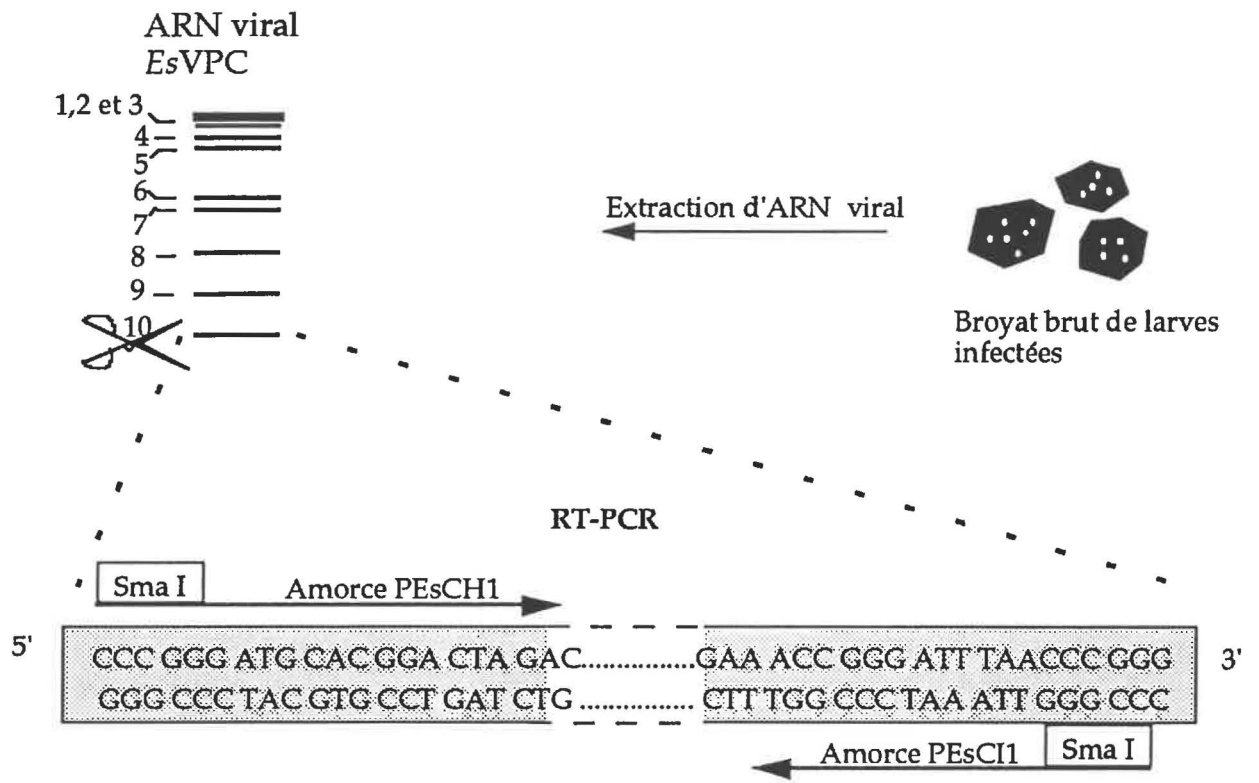
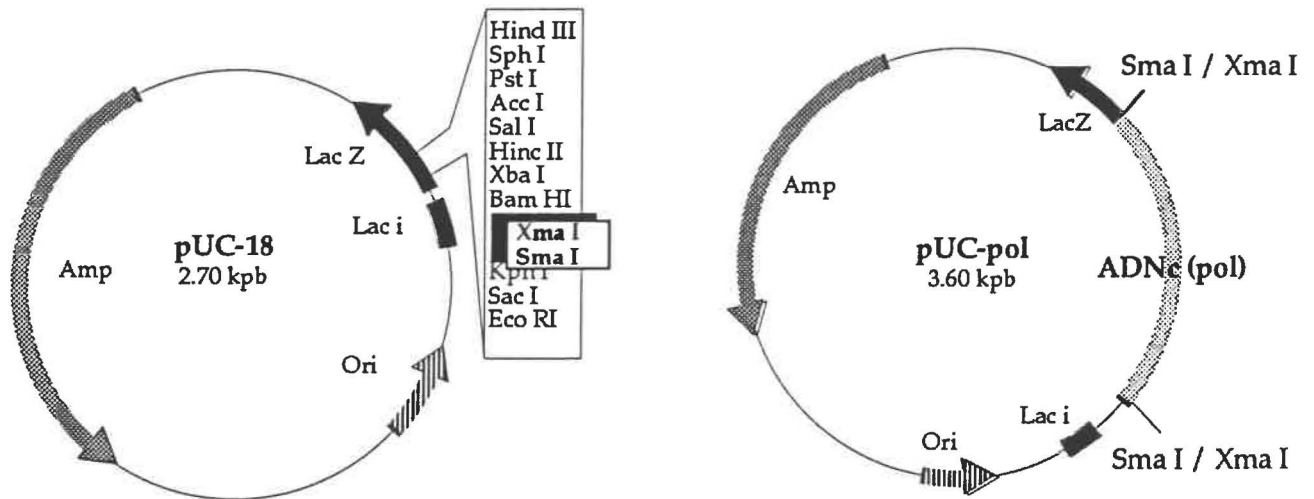


Figure 5a: Schéma récapitulatif de la construction du pUC-pol.



ADNc du gène de la polyédrine de *EsVPC* (ADNc (pol))

Clonage dans le pUC-18



La neutralisation se fait avec une solution d'acétate 5 M, potassium 3 M suivie d'une incubation de 5 à 60 min sur la glace. Après centrifugation, le surnageant contenant les plasmides est retiré et extrait avec un volume égal de phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1). Après la centrifugation, la phase aqueuse est resuspendue à deux reprises dans suffisamment de chloroforme:alcool isoamylique pour éliminer tout le phénol. Afin de concentrer l'ADN plasmidique, un volume d'isopropanol 100% égal à 2,5 fois le volume de l'échantillon est ajouté et la suspension est incubée à la température de la pièce pendant 10 min. Le précipité d'ADN est concentré par centrifugation à 4 °C à 12 000g pendant 10 min puis lavé à l'éthanol 70% pour enfin être séché et resuspendu dans 50 μ L de tampon TE pH= 8 contenant 20 μ g/mL de ARNase A. Deux μ L de cette dernière solution sont retirés, mélangés avec 1 μ L de tampon de chargement et 3 μ L d'eau stérile. Le tout migre sur gel d'agarose 0,8% dans du TAE 1X. Suite à une électrophorèse de 100 volts pendant 45 min, les résultats sont visualisés sous lampe UV (300 nm) après coloration du gel au bromure d'éthidium selon la méthode décrite plus haut (Figure 6).

8.4 Confirmation de la présence de l'insert.

Les clones positifs montrant une bande d'ADN plasmidique de 1 kpb (l'insert faisant 900 pb) plus grosse que les autres sont retenus. Suite à leur digestion par 1 U d'endonucléase Sma I dans les conditions requises suggérées par le fournisseur (Gibco-BRL), la présence d'un fragment d'ADN à environ 0,9 kpb permis de considérer les clones correspondant comme positifs, c'est à dire comme contenant le plasmide avec l'insert (pUC-pol) (Figure 7).

8.5 Amplification des clones bactériens positifs.

Cinq clones positifs provenant de différents produits d'amplification de l'ADNc par RT-PCR sont identifiés et amplifiés dans 4 mL de milieu 2x YT + Amp, 16 h à 37° C en agitation constante à 250 rpm. Le culot bactérien obtenu est traité selon la technique

Figure 6: Exemple de migration du plasmide pUC-pol sur gel d'agarose.

Puits 1: Standard de taille (ADN Lambda digéré avec EcoR I et Hind III)

Puits 2: ADN plasmidique (super-enroulé) pUC-18 ne contenant pas d'insert.
Les deux bandes de moindre intensité, comprises entre 2,3 kpb et 4,3 kpb
représentent différents isomères du vecteur pUC-18.

Puits 3 et 4: ADN plasmidique pUC-pol, environ 900 pb plus gros que celui de
pUC-18, contenant l'ADNc (846 pb) du gène de la polyédrine d'*Es VPC*.

Puits 5: Standard de taille (1 kpb)

кpb 1 2 3 4 5 кpb

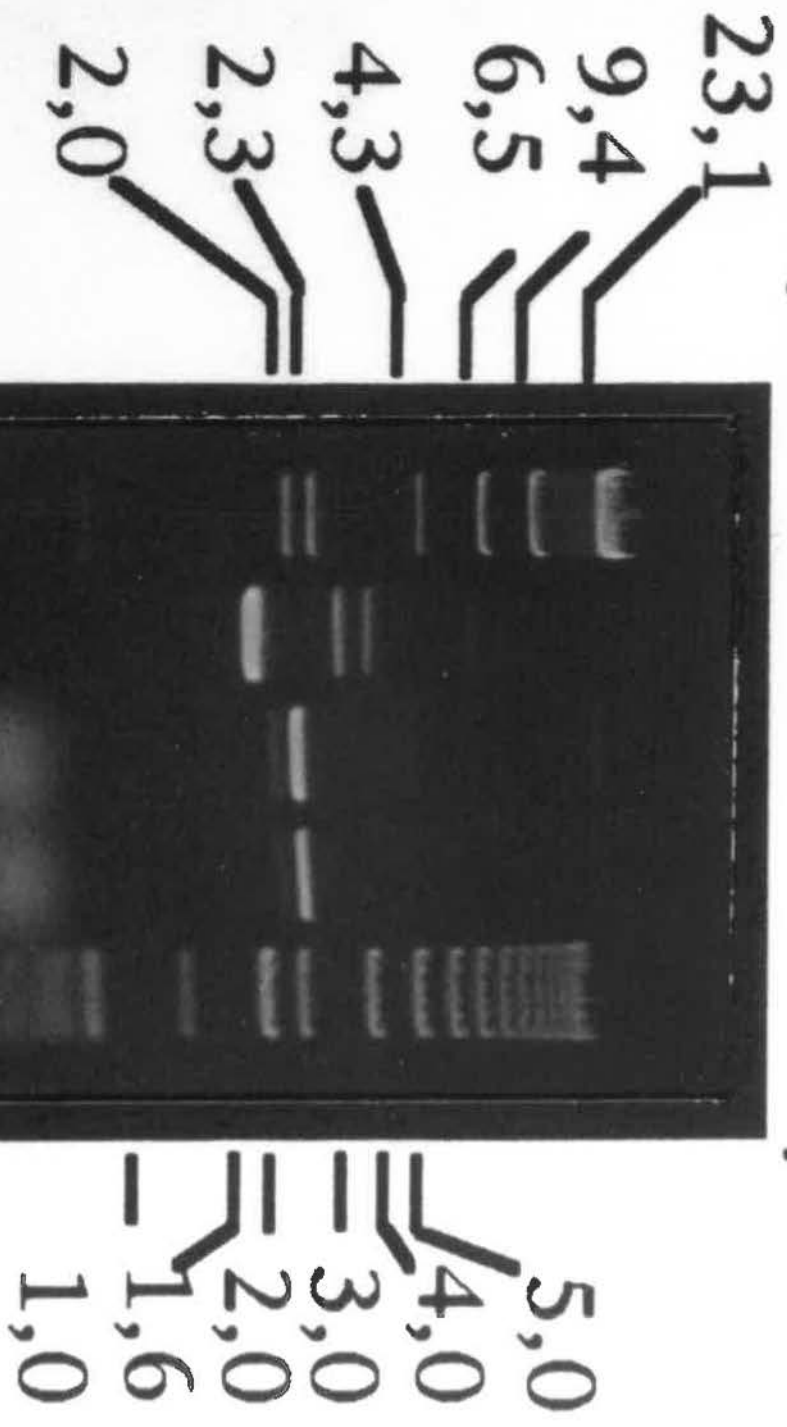


Figure 7: Visualisation sur gel d'agarose, de la réaction d'extraction de l'ADNc du plasmide pUC-pol.

Puits 1: Standard de taille (1 kpb)

Puits 2 à 5: Profil de digestion de pUC-pol avec 10 U d'endonucléase Sma I.

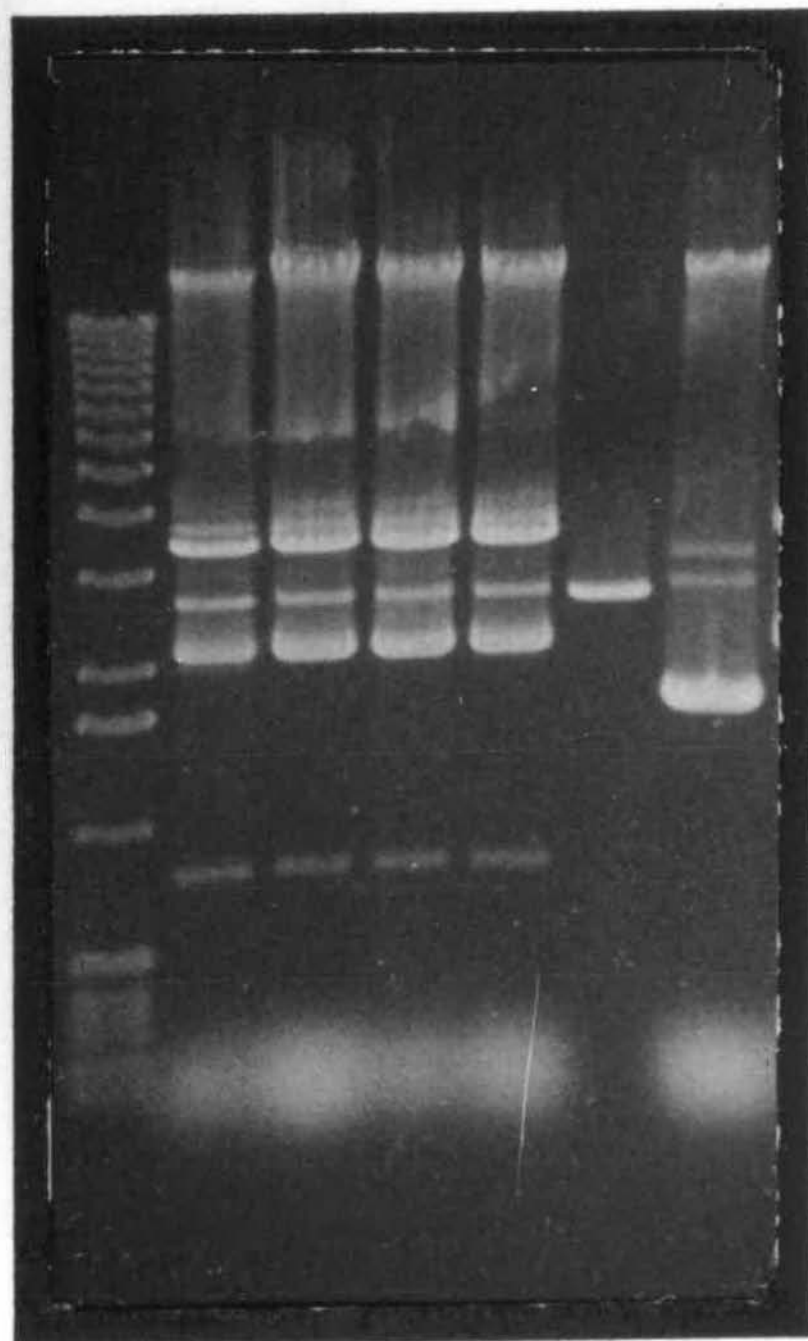
On note l'extraction d'un fragment de 900 pb correspondant à l'ADNc inséré.

Puits 6: Plasmide pUC-18 linéarisé avec Sma I

Puits 7: Plasmide pUC-pol non digéré comportant les trois isomères du vecteur (circulaire "nicked", circulaire fermé et super-enroulé)

kpb 1 2 3 4 5 6 7

5,0
4,0
3,0
2,0
1,6
1,0
0,5



recommandée par la trousse Magic Mini-Prep™ (Promega) dans le but d'obtenir un ADN suffisamment concentré et pure pour en déterminer la séquence nucléotidique. Brièvement, le culot bactérien est resuspendu dans un tampon tris HCl pH= 7,5; EDTA 10 mM; ARNase A 100 µg/ mL et lysé dans une solution contenant du SDS 1%, NaOH 0,2 N. La précipitation des produits de la lyse (protéines et ADN génomique) se fait dans de l'acétate de potassium 2,5 M pH = 4,8. Une fois débarrassée des débris suite à une centrifugation de 10 000g (2 min), la phase contenant l'ADN plasmidique est passée sur une colonne d'affinité permettant la rétention dans certaines conditions osmotiques des plasmides. Après lavage de cette résine, les ADN plasmidiques sont élués dans de tampon TE pH= 8. La concentration est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm où une unité de densité optique est égale à 50 ng/ µL d'ADNbc.

9. Séquençage de l'ADNc.

Le séquençage du fragment inséré est réalisé par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier, selon la méthode "Dideoxy" décrite par Sanger *et al.* (1977). Les trousse commerciales "sequenase sequencing Kit™" (USB) et "T7 sequencing Kit™" (Pharmacia) sont utilisées. Les séquences obtenues sont analysées par le programme GeneWorks IntelliGenetic™ sur Macintosh .

10. Construction des vecteurs baculoviraux recombinants.

10.1 Choix des vecteurs baculoviraux.

Deux vecteurs de transfert sont utilisés pour parvenir à la construction de baculovirus recombinants exprimant le gène de la polyédrine du *Es* VPC (Figure 5b). Le PBNT1 (7,9 kpb) gracieusement fourni par S. Tomita du NISES au Japon comporte un squelette pBluescript™ dans lequel est inséré le promoteur du gène de la p10 du *Bm*VPN en amont d'un fragment de la région 5' du gène de la protéine p10. Un site unique de clonage Nru I est créé entre ces deux fragments dans le but d'insérer le gène d'intérêt. Ce dernier se

retrouve ainsi inséré sous le contrôle du promoteur de la p10 dans le baculovirus recombinant, empêchant l'expression de cette protéine. Dans ce cas-ci, l'expression de la polyédrine baculovirale n'est pas perturbée. Le second vecteur de transfert pBm4 (8,6 kpb), fourni par Dr. J. Kobayashi (Kobayashi *et al.*, 1990) possède un squelette pUC-19. Il comporte le promoteur du gène de la polyédrine baculovirale en amont d'un fragment de la région 3' de ce dernier. Un unique site de clonage Nru I est créé dans le même but que précédemment cité. Le baculovirus recombinant issu de la recombinaison homologue entre le vecteur contenant le gène d'intérêt et l'ADN viral sauvage, exprimera le gène inséré à la place de la polyédrine endogène.

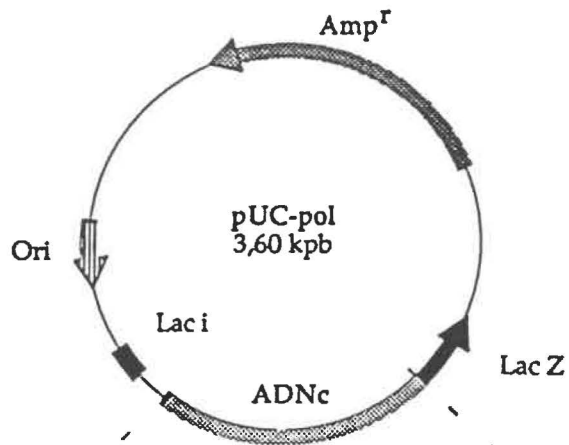
10.2 Extraction de l'ADNc du pUC-pol

À partir de différents clones positifs, l'ADN plasmidique pUC-pol est extrait par les enzymes Sma I ou Xma I en suivant les recommandations du fournisseur (Gibco-BRL). Suite à 2 h de digestion, les échantillons sont passés sur gel d'agarose 0,8% dans le tampon TPE 1X (tris-phosphate 90 mM; EDTA, 2 mM). La bande retrouvée à 900 pb selon l'échelle 1 kpb (Gibco-BRL), est excisée du gel et purifiée par la technique déjà décrite de GeneClean™ (Bio 101 Inc.). Un μL de solution contenant l'ADNc purifié est encore une fois passé à travers un gel en même temps que de l'ADN lambda digérée avec Hind III et EcoR I (Gibco-BRL) dans le but d'estimer sa concentration en acides nucléiques.

10.3 Linéarisation des vecteurs PBNT1 et pBm4.

Cinq cent soixante ng de vecteur sont linéarisés par digestion avec 10 unités d'enzyme Nru I dans les conditions optimales suggérées (New England Biolab) 4 h à 37 °C. Suite à l'inactivation de l'enzyme pendant 10 min à 56 °C, 30 U de BAP (Bovine Alkaline Phosphatase™) sont ajoutés avec du tris-HCl pH= 8 dont la concentration finale devait atteindre 0,1 M. Le tout est incubé 30 min à 65 °C et extrait deux fois au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) et une fois avec du chloroforme: alcool

Figure 5b: Schéma récapitulatif de la construction de pBm4-pol et PBNT1-pol.



Digestion avec Sma I

Digestion avec Xma I

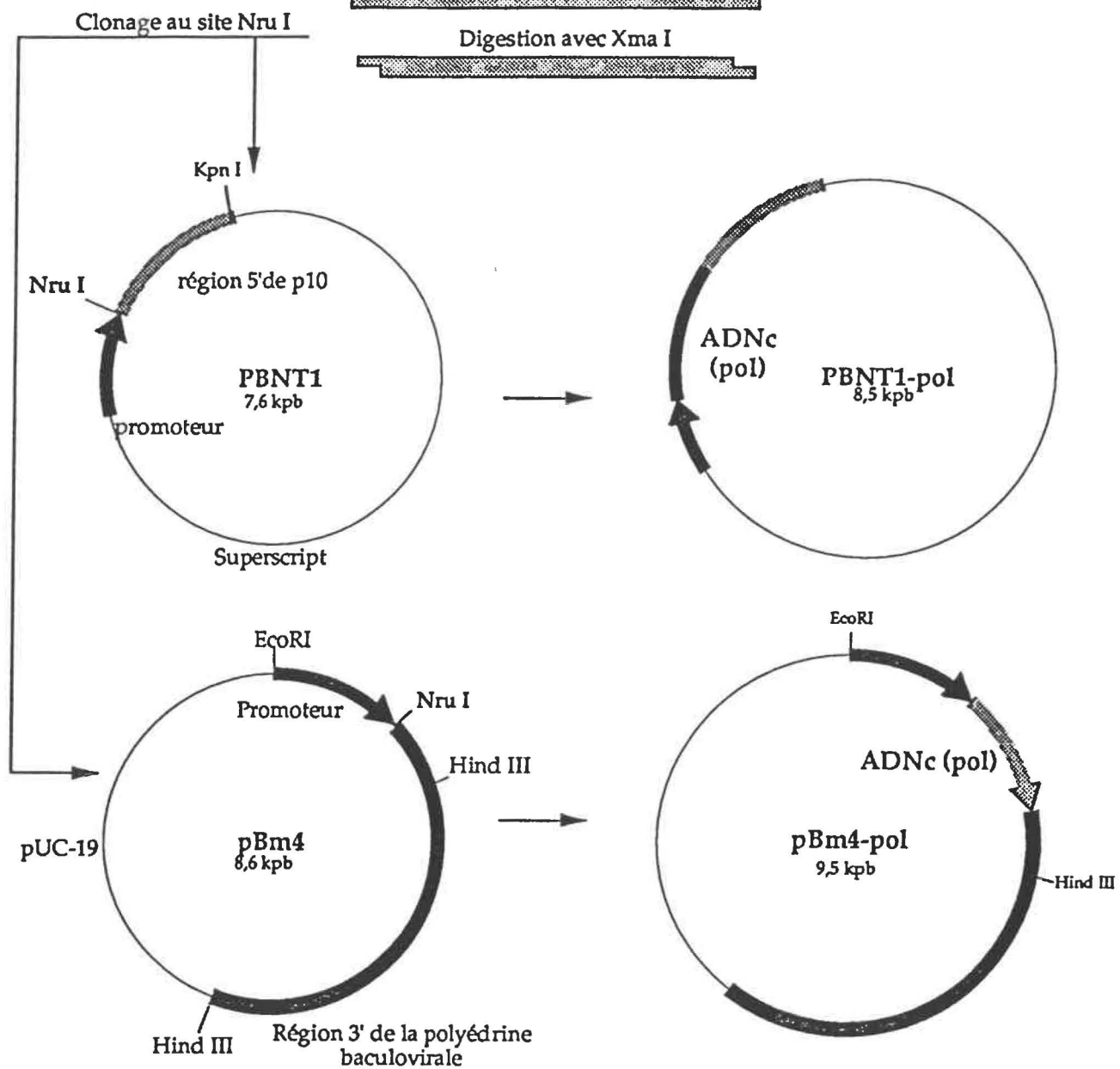


Figure 8: Migration sur gel d'agarose des vecteurs pBm4 et PBNT1 linéarisés.

Puits 1: Migration du vecteur PBNT1 (7,6 kpb) linéarisé par l'endonucléase Nru I.

Puits 2: Standard de taille (1 kpb).

Puits 3: Migration du vecteur pBm4 (8,7 kpb) linéarisé par l'endonucléase Nru I.

kpb

23,1 —

9,4 —

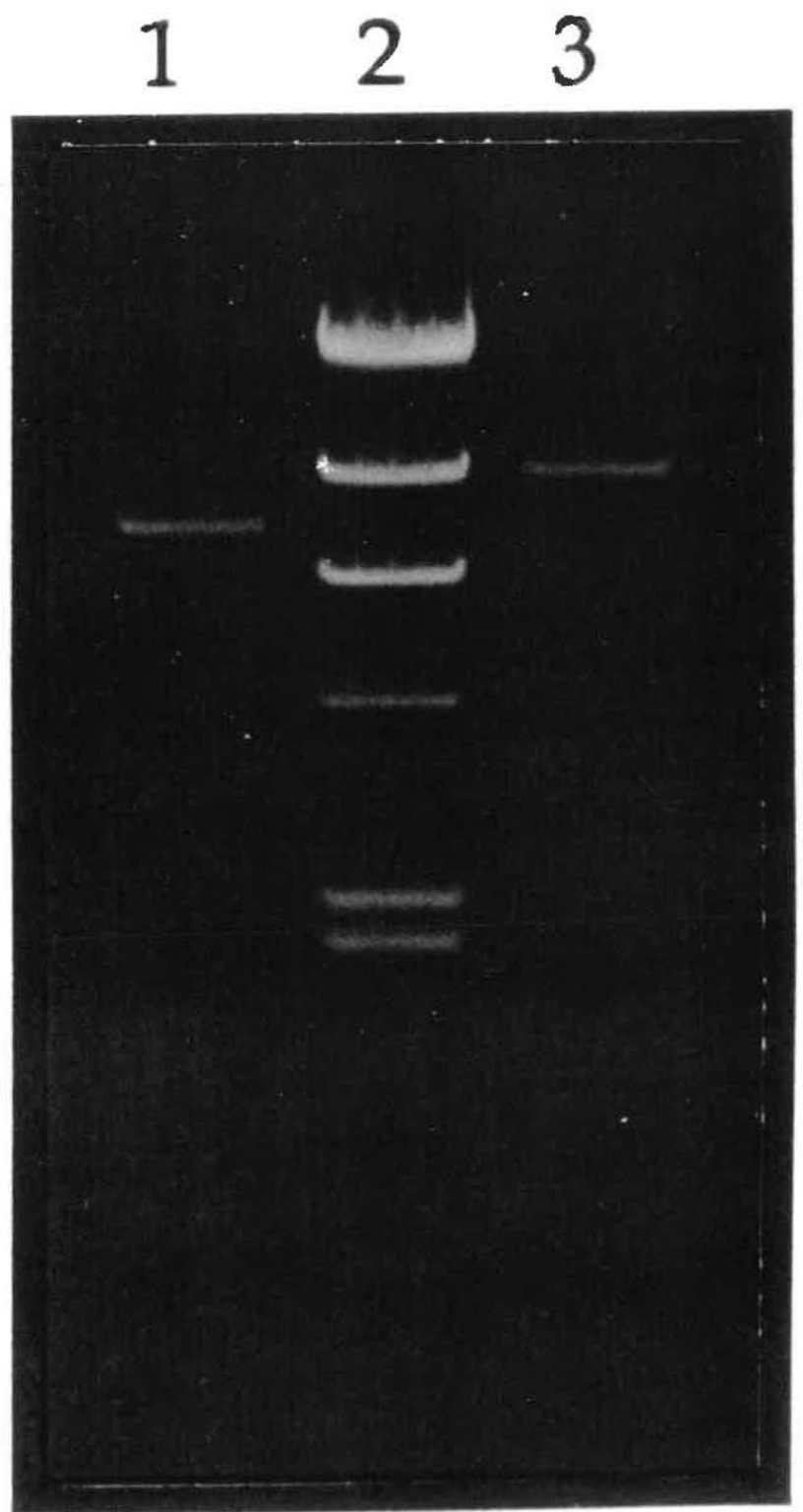
6,5 —

4,3 —

2,3 —

2,0 —

0,56 —



isoamylique (24:1). La précipitation des vecteurs ainsi linéarisés et déphosphorylés, se fait dans du NaCl 0,3 M avec l'ajout de 2,5 fois le volume de l'échantillon en éthanol 100% à -70 °C. Une incubation de 16 h à -20°C, s'avéra la meilleur façon de récolter un maximum d'ADN. Suite à la déshydratation du culot d'ADN obtenu par centrifugation à 10 000g. pendant 30 min à 4 °C, ce dernier est resuspendu dans un volume approprié de tampon TE pH= 8 et la concentration est estimée selon le protocole ci-haut mentionné (Figure 8).

10.4 Ligation de l'ADNc dans les vecteurs baculoviraux.

Le ratio vecteur: gène opté est celui de 1:5. Ainsi, 200 ng de vecteurs pBm4 d'environ 8,6 kpb sont mélangés avec 21 ng de ADNc de 0,9 kpb et 200 ng de PBNT1 (7,9 kpb) sont mélangés avec 23 ng de ADNc. Selon l'enzyme utilisée pour extraire le gène du pUC-pol, deux protocoles sont établis.

ADNc extrait par Sma I du pUC-pol: CCC / GGG

Huit U de Weiss de T4 ADN ligase (Pharmacia) sont ajoutés conjointement avec le tampon de réaction approprié, ramené à une concentration de 1X. Une incubation de 16 h à 11 °C suffit pour compléter la réaction.

ADNc extrait par Xma I du pUC-pol: CCCGG / G

En suivant les instructions fournis par la trousse DNA blunting™ (Takara Inc.), de la ligase T4 à ADN en même temps que le tampon de réaction contenant les dNTPs, sont ajoutés afin de rendre franches les extrémités cohésives produites par Xma I. Suite à cette réaction, la ligase T4 à ADN fournie est mélangée à la solution réactionnelle précédente et le tout est incubé 16 h à 11 °C. La purification et précipitation de l'ADN s'est faite selon le protocole classique d'extraction avec des solvants organiques et de précipitation dans l'éthanol en présence de sels.

Figure 9a: Migration sur gel d'agarose du vecteur pBm4-pol, isolé à partir de bactéries JM-109 transformées.

Puits 1 à 3: 5 μ L d'ADN plasmidique extraits de trois clones bactériens soupçonnés de contenir le vecteurs PBNT1-pol. La première bande de forte intensité correspondant au vecteur de forme circulaire fermé; la seconde de moindre intensité correspond au vecteur super-enroulé.

Puits 4: 2 μ L de Vecteur PBNT1 stock.

Les ADN plasmidiques des puits 1 à 3 sont d'environ 900 pb plus gros que celui du puits 4. La présence de l'ADNc (846 pb) dans le vecteur en 1, 2 et 3 est ainsi confirmée.

kpb

1 2 3 4

23,1 —

9,4 —

6,5 —

4,3 —

2,3 —

2,0 —

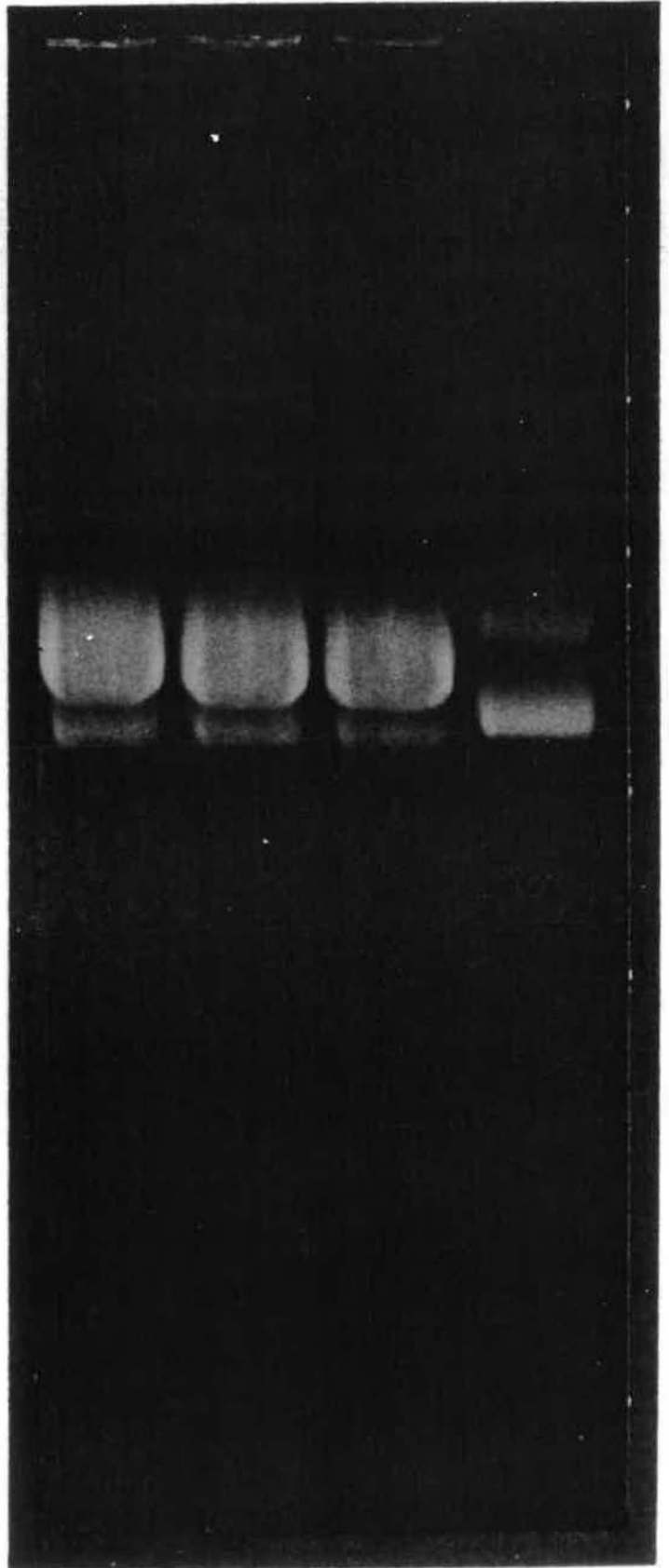


Figure 9b: Migration sur gel d'agarose du vecteur PBNT1-pol, isolé à partir de bactéries JM-109 transformées

Puits 1 à 3: 5 μ L d'ADN plasmidique extraits de trois clones bactériens soupçonnés de contenir le vecteurs pBm4-pol.

Puits 4 à 6: 5 μ L d'ADN plasmidique de trois clones bactériens comportant le Vecteur pBm4 sans insert.

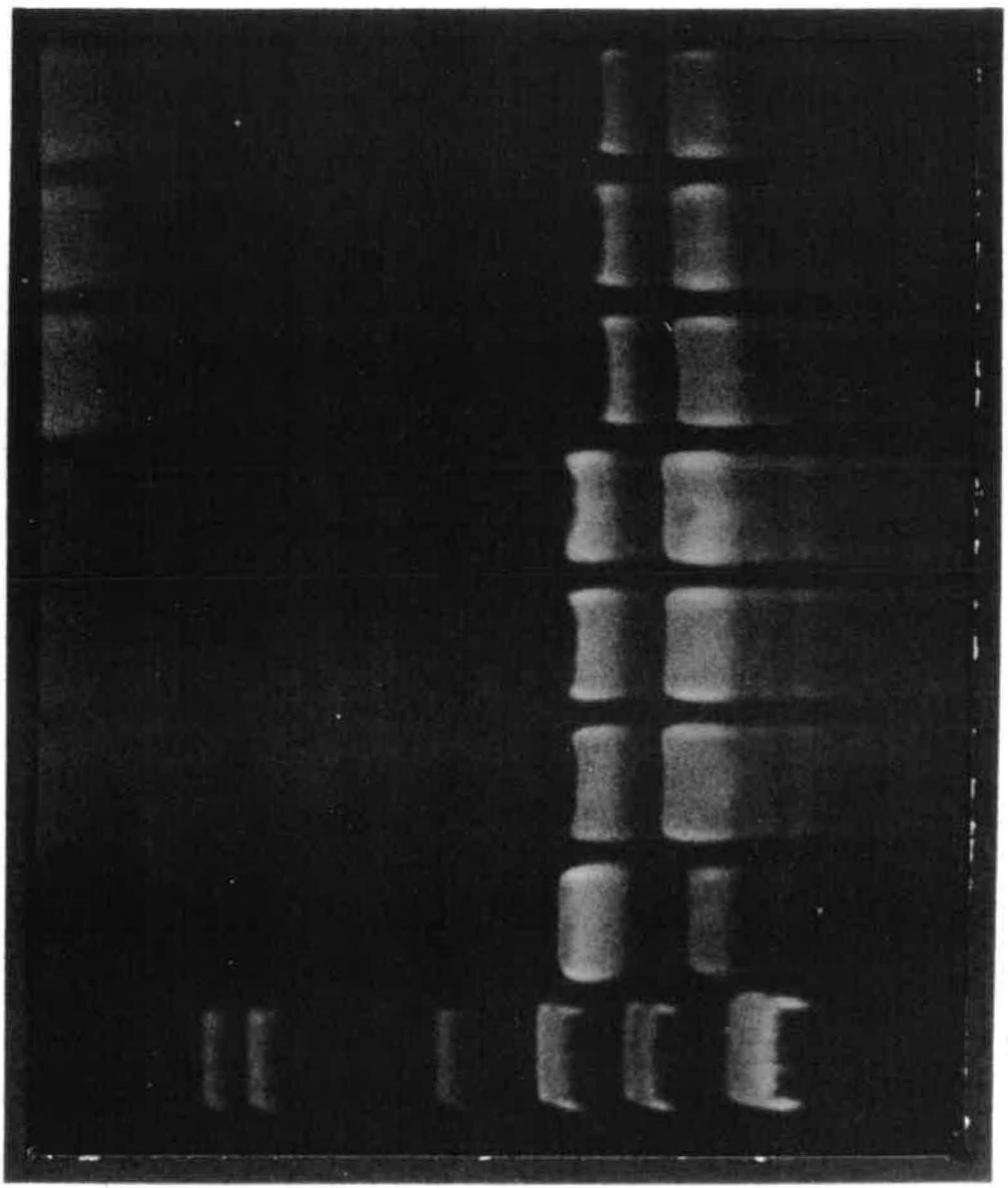
Puits 7: 2 μ L de Vecteur pBm4 (solution stock)

Puits 8: Standard de taille (ADN Lambda digéré avec EcoR I et Hind III)

Les ADN plasmidiques des puits 1 à 3 sont d'environ 900 pb plus gros que celui des puits 4 à 8. La Présence de l'ADNc (846 pb) dans le vecteur en 1, 2 et 3 est ainsi confirmée.

N.B.: Dans chaque puits, la bande de taille supérieur à 9,4 kpb correspond au vecteur circulaire fermé; la seconde de moindre taille correspond au vecteur super-enroulé.

kpb 1 2 3 4 5 6 7 8



23,1 —

9,4 —

6,5 —

4,3 —

2,3 —

2,0 —

Une fois concentré par centrifugation et séchage, l'ADN est redigéré avec l'enzyme Nru I afin d'éliminer les vecteurs recircularisés et les dimers avant la transformation de bactéries compétentes *E. coli* JM-109.

10.5 Isolement des clones possédant les vecteurs avec l'insert (PBNT1-pol et pBm4-pol).

Suite à l'ensemencement des bactéries transformées sur des gélose LB + Amp, les diverses colonies obtenues sont lysées par choc alcalin (Mini-préparation) et les profils de migration sur gel d'agarose 0,8 % sont analysés. Les clones retenus sont ceux ayant la plus grosse taille, soit environ 1 kpb de plus que les autres (Figure 9a et 9b). La confirmation de la présence de l'insert se fait conjointement avec la détermination de son orientation dans les vecteurs. Suite à l'extraction de l'ADN plasmidique des clones sélectionnés, deux digestions sont faites: Une digestion avec 10 U d'endonucléase EcoR I et une autre avec 10 U de Hinc II sur les vecteurs PBNT1-pol et pBm4-pol. Suivant le profil obtenu, la présence et le sens de l'insert ont été déduits. En parallèle, les vecteurs sans insert ont servi de témoins négatifs. Une fois la digestion complétée à 37 °C pendant 2 h, le tout est passé à travers un gel d'agarose 2% dans du TPE 1X afin de visualiser les bandes critiques de faibles tailles, après coloration au bromure d'éthidium (Figure 9c).

11 Obtention des baculovirus recombinants.

11.1 Infection de cellules BoMo-15-AIIc.

11.1.1 Extraction d'ADN viral à partir de virions inclus dans des polyèdres purifiés.

A partir d'un broyat brut de larves infectées au VPN (Sections 4.2.1- 4.2.2), les polyèdres sont séparés selon la méthode décrite en section 3. La suspension de corps d'inclusion est ensuite déposée sur un gradient discontinu de sucrose de 30 à 70 % p/v dans 50 mM de tris-HCl pH= 7,5. Le tout est centrifugé dans une ultracentrifugeuse de type

Figure 9c: Détermination de l'orientation de l'ADNc dans les vecteurs baculoviraux: Profil électrophorétique du PBNT1-pol et pBm4-pol digérés avec EcoR I et Hinc II.

Puits 1 à 6: PBNT1-pol digéré avec EcoR I

Puits 7: PBNT1 digéré avec EcoR I

Puits 8 et 14: Standard de taille (1 kpb)

Puits 8 à 12: PBNT1-pol digéré avec Hinc II

Puits 13: PBNT1 digéré avec Hinc II

Puits 15: pBm4-pol digéré avec Hinc II

Puits 16: pBm4 digéré avec Hinc II

Puits 18: pBm4 -pol digéré avec EcoR I

Puits 19: pBm4 digéré avec EcoR I

PBNT1-pol:

- Les puits 1 et 8 correspondent à un ADN plasmidique de PBNT1-pol contenant l'ADNc, dans la bonne orientation.
- Les puits 2 et 9 correspondent à un ADN plasmidique de PBNT1-pol contenant deux ADNc en tandem, dans la mauvaise orientation.
- Les puits 3 et 10 correspondent à un ADN plasmidique de PBNT1-pol contenant deux ADNc en tandem, dans la bonne orientation.
- Les puits 4 et 11 ainsi que 5 et 12 correspondent à deux ADN plasmidiques de pBNT1-pol, contenant un ADNc dans la mauvaise orientation.
- Les puits 6 et 13 correspondent au profil de digestion d'un ADN plasmidique de PBNT1 sans insert.

pBm4 -pol:

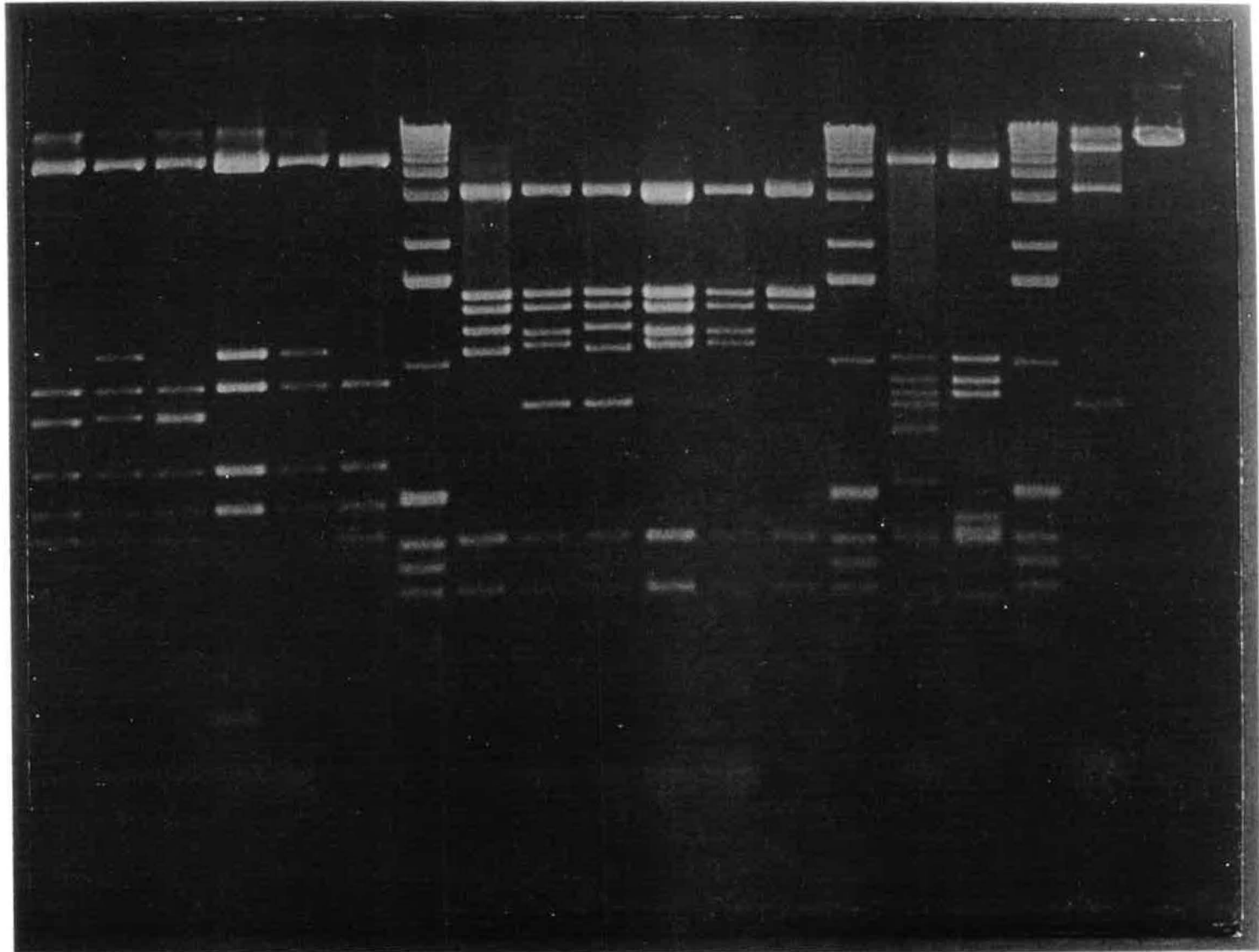
- Les puits 15 et 18 correspondent à un ADN plasmidique de pBm4-pol contenant un ADNc dans la bonne orientation.
- Les puits 17 et 19 correspondent au profil de digestion d'un ADN plasmidique de pBm4 sans insert.

kpb

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

4,07
3,05
2,01
1,63
1,02

0,506
0,396
0,344
0,298



Beckmann (rotor SW 40.1) à 25 000 rpm, pendant 120 min à 4° C. La bande de polyèdres située à l'interphase 60-70% est retirée et lavée à trois reprises dans 3 fois son volume en PBS 1X, entrecoupées de centrifugation de 10 min à 7 000 rpm au froid. Une fois débarrassé du sucrose, le culot de polyèdres est resuspendu dans du tampon stérile Na₂CO₃-NaHCO₃ 0,1 M, pH= 10,8 pendant 15 min à la température de la pièce. Un mg/mL de Protéinase k et 1% et SDS sont ajoutés pour digérer les protéines et l'incubation se poursuit à 56° C pendant 3 h. La purification de l'ADN se poursuit par 2 extractions au phénol saturé et au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1), pour finir avec 2 extractions au chloroforme: alcool isoamylique (24:1). Suite à la précipitation dans la solution sel/ éthanol, l'ADN est centrifugé, séché et resuspendu dans du TE pH= 8 stérile. La détermination de la concentration se fait sur gel d'agarose 0,8% et au spectrophotomètre à 260 nm.

11.1.2 Co-transfection de l'ADN viral sauvage avec PBNT1-Pol ou pBm4 -pol dans les cellules.

Deux flacons de 25 cm² (Falcon) sontensemencés avec des cellules NISES BoMo-15-AIIc à 200 000 cellules par mL dans le milieu MGM-448 contenant 10% de SVF (milieu complet). Après une incubation de 16 h à 25 °C, les cellules sont lavées à deux reprises avec le même milieu mais dépourvu de SVF. Un microgramme et demi de vecteurs recombinants sont mélangés à 300 ng d'ADN purifié de *BmVPN* sauvage. Cette solution d'acide nucléique est complétée à 12 µL avec de l'eau stérile distillée puis mélangée à 12 µL de solution contenant de la Lipofectine™ (8 µL de Lipofectine™ (Gibco-BRL) et 4µL d'eau distillée stérile). Après une incubation de 15 min à la température de la pièce, la solution d'ADN-Lipofectine est diluée dans 2,5 mL de milieu Grace (Sigma, Chemical company) sans SVF et ajoutée délicatement sur le tapis cellulaire. Après 12 heures à la température optimale de croissance des cellules (25° C), le milieu est vidangé et les cellules lavées trois fois avec du milieu MGM-448 complet, pour éliminer la lipofectine cytotoxique. Cinq mL

de ce milieu sont enfin ajoutés et les cellules ont été incubées à 25° C pendant 5 à 7 jours, ou jusqu'à l'obtention d'une cytopathologie maximale.

11.2 Isolement des baculovirus recombinants.

11.2.1 Isolement de populations virales.

Des plateaux de 6 puits (Flow Laboratories Inc.) sontensemencés avec 2×10^6 cellules par puits et incubés à 25 °C pendant une journée. Une fois les cellules attachées, le milieu est enlevé et 0,5 mL de dilutions décimales (10^{-2} à 10^{-5}) du surnageant de transfection est ajouté. Suite à une incubation de 90 min à la température de la pièce et sous agitation constante, l'inoculum est enlevé et remplacé par 2 mL de milieu MGM-448 + 10% de SVF+ 1% d'Agar Seaplaque™ (Sigma, Chemical company) ramené à 37° C. Une fois l'agar solidifié, les cellules sont incubées en position inversée à la température optimale de croissance. Quatre à cinq jours plus tard, les plages constituées de cellules contenant des polyèdres sont repiquées au moyen d'une pipette pasteur (Figure 10). Le repiquage se fait dans des plateaux de 96 puits préalablementensemencés avec 150 000 cellules NISES BoMo-15-AIIc par puits, à raison d'un puits par plage. Une seconde incubation de 4 jours à 25 °C permis le développement maximale de l'infection. Le surnageant des cupules préalablement infectées contenant du virus libre est retiré et gardé identifié à -20 °C. À partir des cellules collées au fond des puits, la présence du gène cypoviral est détectée par hybridation de type Southern.

Cette manipulation est répétée trois fois dans le but d'obtenir des populations virales recombinantes le plus homogène possible.

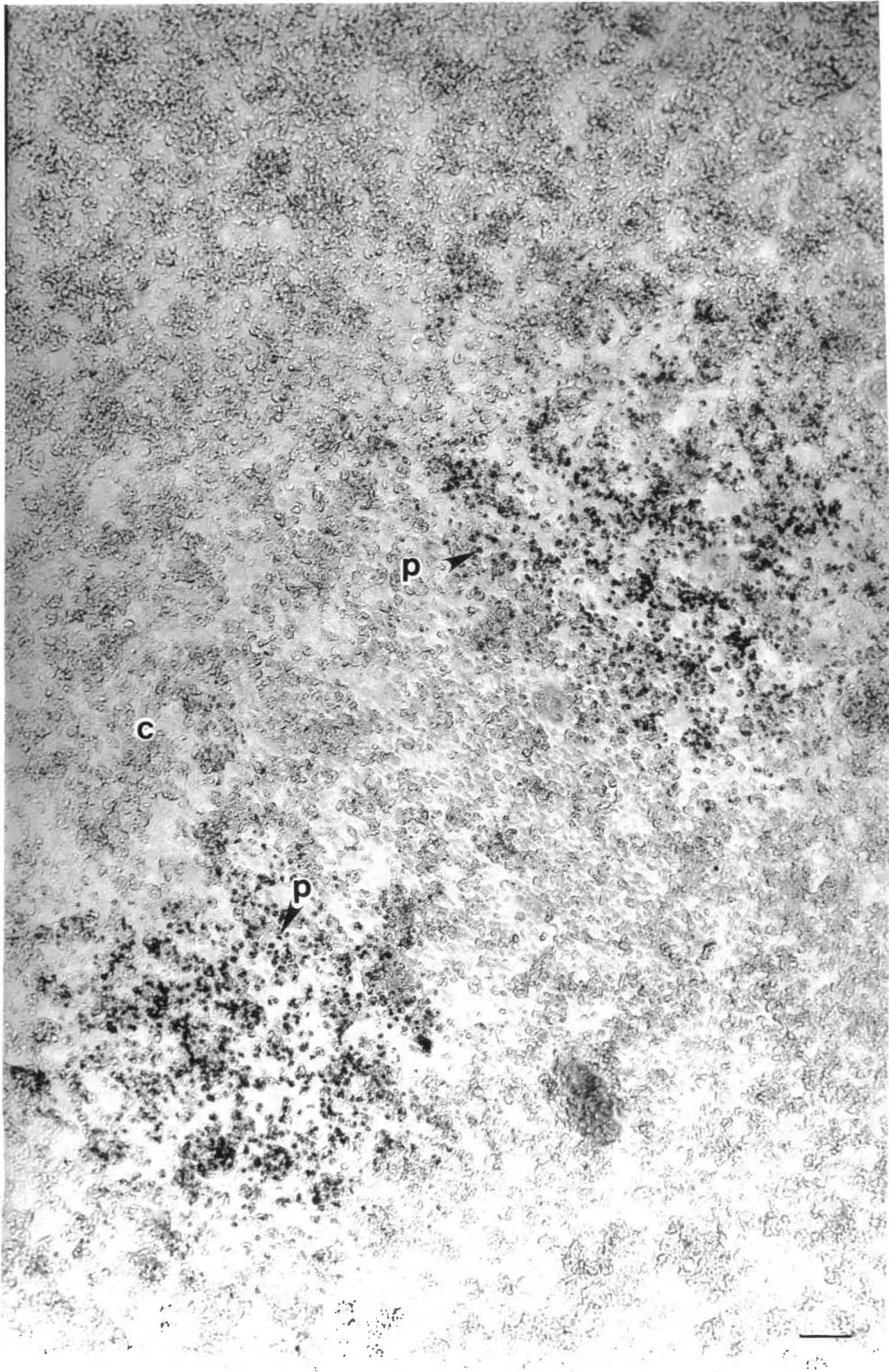
11.2.2 Détection des populations virales recombinantes par hybridation de type Dot Blot.

1- Préparation de la membrane avec les échantillons

Deux cents μL de NaOH 0,2 N sont ajoutés sur les cellules dans les cupules

Figure 10: Observation au microscope photonique de plages de populations de VPN recombinants, en milieu semi-solide.

Barre= 0,5 mm , C: Cellules, P: polyèdres



dépourvues de leur surnageant puis le tout est incubé 15 min à la température de la pièce. Pendant ce temps une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) est trempée dans du SSC 6X (Solution stock de 20 X: 175,3 g de NaCl; 88,1 g de citrate de sodium, pH= 7) et placée dans l'appareil Dot Blot de Bio-Rad. Quatre cents μL de NaCl 2 N sont vidés dans les puits de l'appareil où les 200 μL de lysat cellulaire sont subséquentement ajoutés. Une fois que tous les puits sont vidés de leur contenu sous l'effet du vide, la membrane de nitrocellulose est incubée à 80 °C sous vide pendant 2 h. Cette dernière est ensuite placée dans un sac à hybridation (Gibco, BRL) pour analyse ultérieure.

2- Préparation de la sonde

Un μL et demi d'amorce PEsCH2 à 15 μM sont mélangés avec 8 μL de tampon "forward" approprié (0,5 M de tris HCl, pH 7,6; 0,1 M de MgCl₂; 50 mM de DTT; 1 mM de Spermidine; 1 mM d'EDTA, pH= 8) et avec 125 μCi d'ATP-gamma-[³²]P (ICN Biochemical Canada, Ltd.). Dix unités de T4 polynucléotide kinase (Gibco BRL) sont ensuite ajoutées au cocktail et le tout est complété à 40 μL avec de l'eau distillée stérile. Une incubation de 30 min à 37° C précède le comptage du nombre de coups par minute (cpm) que contient 1 μL de sonde ainsi marquée. La sonde radioactive est ensuite gardée à 4 °C pour un maximum de 2 semaines, correspondant à la demi-vie du phosphore radioactif.

3- Hybridation

La membrane (10 X 10 cm) contenant les acides nucléiques dénaturés et fixés, est incubée 4 h à 68 °C sous agitation constante dans 10 mL de solution de pré-hybridation (900 mM de NaCl; 6 mM d'EDTA pH 8; 90 mM de tris-HCl pH 7,5; 0,1% de SDS; 100 μg /mL d'ARN de transfert de levures (Boehringer Mannheim). Suffisamment de sonde radioactive y est ajoutée en fin d'incubation pour avoir un décompte de 5×10^5 à 10^6 cpm/ mL. L'hybridation se fait à 42 °C pendant 16 h avant de procéder au lavage de la membrane. Trois lavages avec du SSC 2X, 0,1 % SDS à 55 °C permettent d'éliminer un maximum de

Figure 11: Détection de populations isolées de VPN recombinants par la technique d'hybridation radioactive de type Dot Blot.

Cupules A1 à H6: Plages provenant de surnageant de co-transfection de *BmVPN* avec le vecteur PBNT1-pol.

Cupules A7 à H12: Plages provenant de surnageant de co-transfection de *BmVPN* avec le vecteur pBm4-pol.

Côté supérieur droit: 100 ng d'ADNc purifié (Témoin positif).

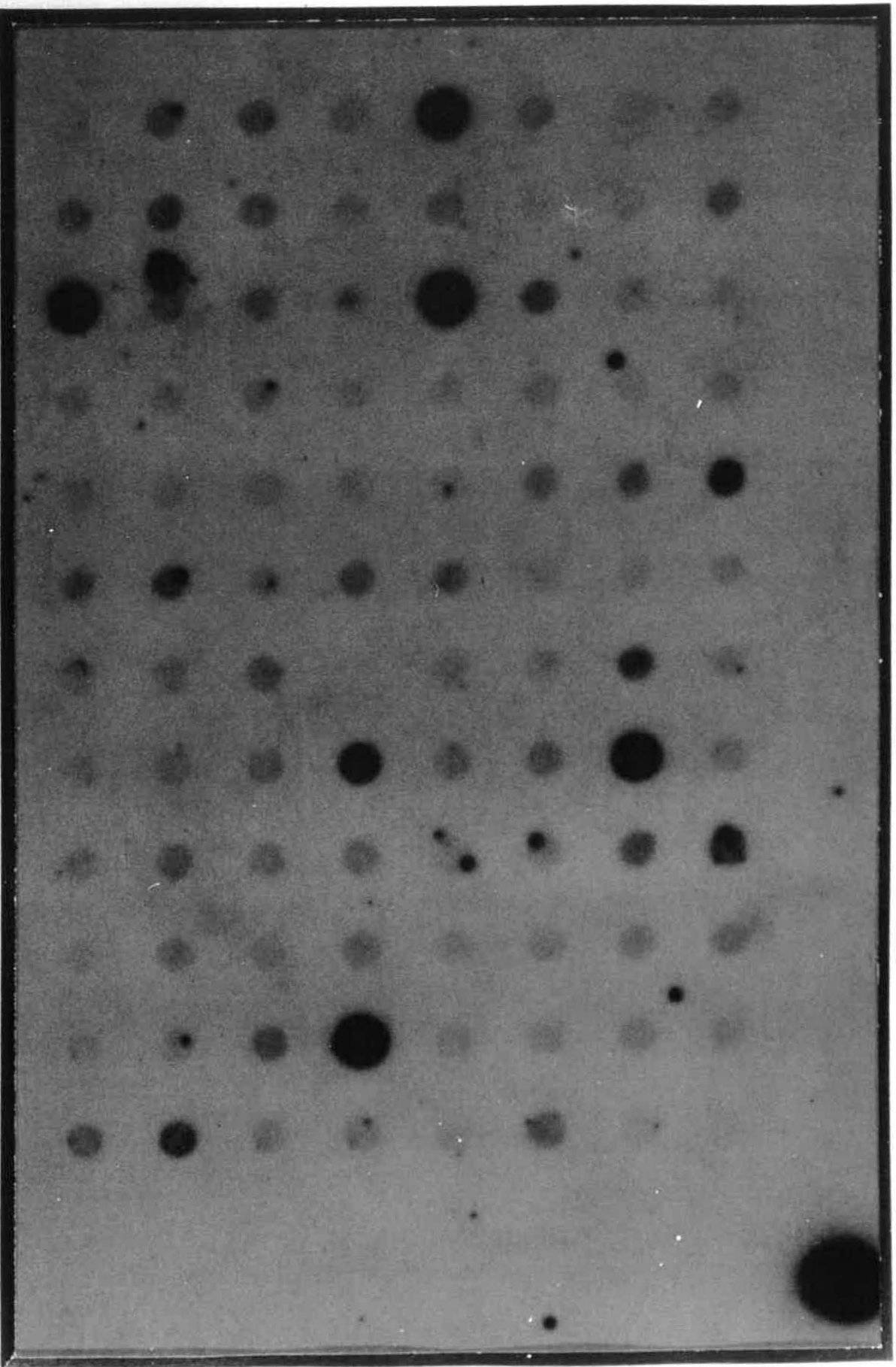
Côté inférieur droit: 100 ng d'ADN plasmidique de pBm4 (Témoin négatif).

Côté supérieur gauche: 100 ng d'ADN plasmidique de PBNT1 (Témoin négatif).

Les cupules D1, D3, H3 et A5 contiennent des populations de *BmVPN* exprimant les deux polyédrines.

Les cupules B8, E8 et E11 contiennent des populations de *BmVPN* exprimant uniquement la polyédrine de VPC

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



A
B
C
D
E
F
G
H

sonde non appariée; suivis de trois autres lavages dans du SSC 1X, 0,1 % SDS à 55 °C. Deux bains dans du SSC 0,1X, 0,1 % de SDS à la température de la pièce finalisent la manipulation et la membrane est ensuite placée sous un film à X-OMAT RP (Kodak) à -70 °C pour une nuit (Figure 11).

11.3 Amplification des populations virales recombinantes isolées.

Les surnageants des cellules infectées (300 µL) contenant une population virale recombinante isolée à partir des plages d'infection, sont inoculés à 800 000 cellules NISES BoMo-15-AIIc dans un volume final de 1 mL. Après une incubation de 30 min à 25 °C, les cellules sontensemencées dans un flacon F₂₅ avec 4 mL de milieu frais où se poursuit la croissance. Grace à cette technique, nous réussissons à mettre en contact un maximum de cellules avec un minimum d'inoculum. L'infection est arrêtée une fois les effets cytopathologiques maximales obtenus. Le surnageant contenant les virions libres est alors centrifugé à 500g pendant 10 min à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires. Ce dernier est ensuite divisé en aliquots et congelé à -20 °C. Le titre viral est déterminé suite à l'infection de cellules BoMo avec 25 µL d'inoculum en plateau de 96 puits (Belloncik et Chagnon, 1980) selon la formule de Kärber:

$$DICT_{50} / 25 \mu L = -\Delta - \partial (S - 0,5)$$

$\Delta = \log 10$ de la dernière dilution avec 100% d'infection $\partial = \log 10$ du facteur de dilution dernière dil 100%

$$S = \sum_{\text{dernière dilution}} [(\text{nbr de cupules (+)} / \text{nbr de cupules par répétition})]$$

Connaissant la MI à laquelle nous voulons infecter un nombre déterminé de cellules, il suffit d'effectuer le calcul suivant:

$$\text{Volume finale de la suspension virale} = \frac{DICT_{50} \times 0,693}{\text{Nombre de cellules} \times MI}$$

Figure 12a et b: Isolement de populations de VPN recombinants par la technique d'hybridation non-radioactive de type Dot Blot.

Figure 12a:

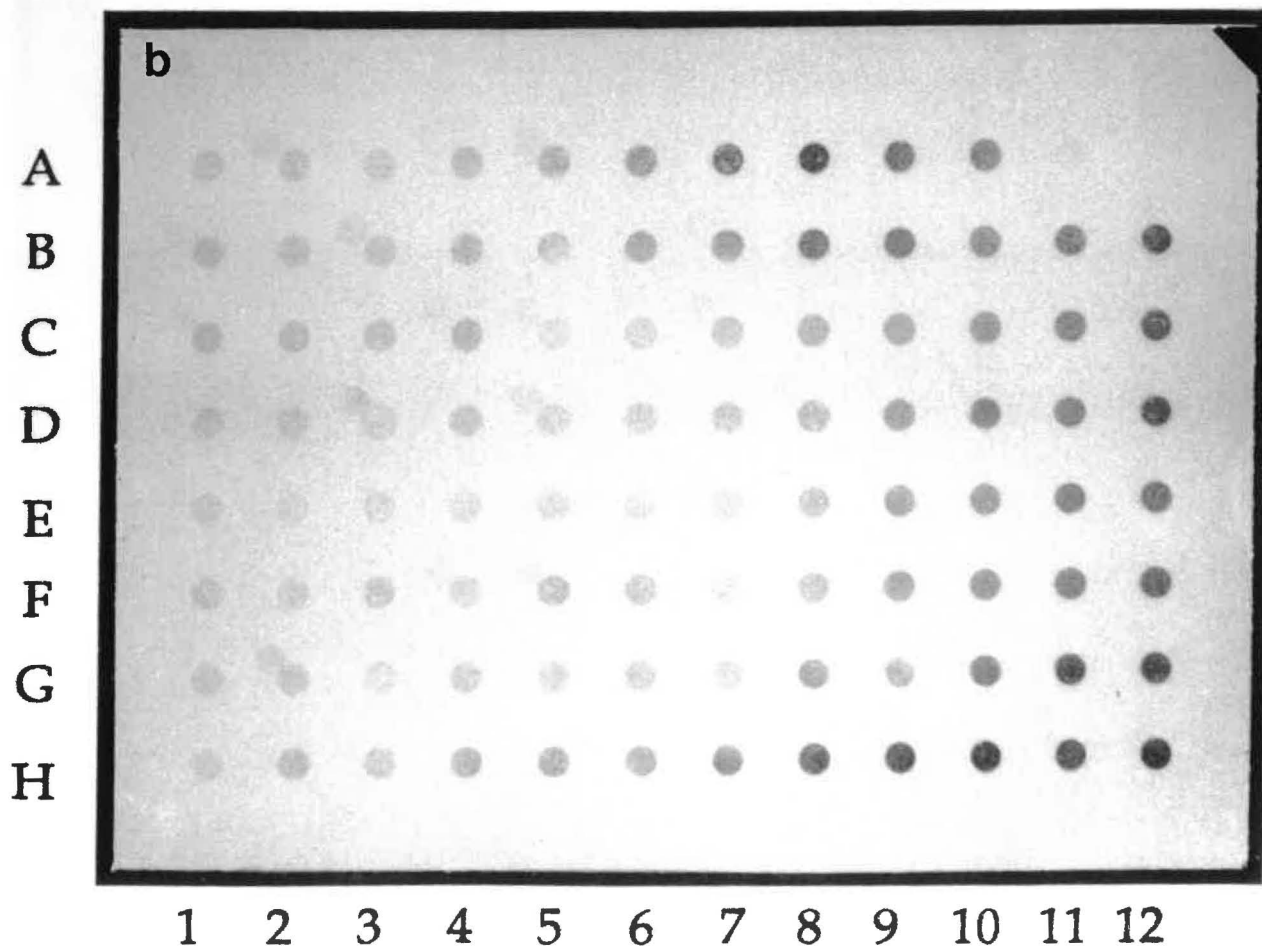
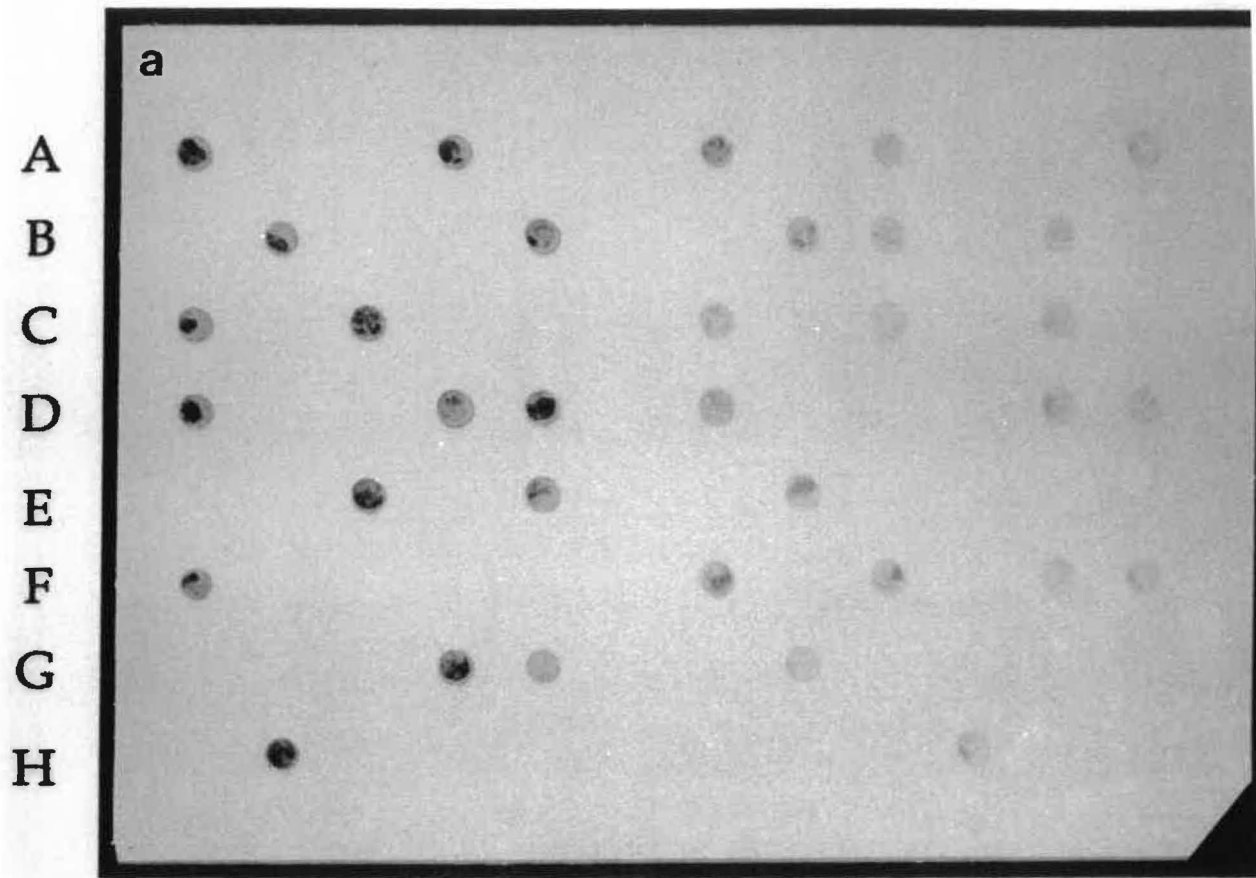
- Les cupules B2 à F6 contiennent des cellules infectées avec diverses populations virales isolées par technique de plaque en milieu semi-solide, à partir de la suspension virale provenant de la cupule D1 (Figure 11)
- Les cupules A7 à G12 contiennent des cellules infectées avec diverses populations virales isolées par la technique de plaque, à partir de la suspension virale provenant de la cupule B8 (Figure 11).
- La cupule A1 comporte 100 ng d'ADNc de la polyédrine du VPC (Témoin positif)
- La cupule H12 comporte 100 ng d'ADN purifié de *Bm* VPN (Témoin négatif)

Figure 12b:

- Les cupules A1 à H6 contiennent des cellules infectées avec une population virale provenant du surnageant d'infection de la cupule D1 (Figure 12a). Cette population virale exprime les deux polyédrines.
- Les cupules A7 à H12 (excepté A10, A11 et A12) contiennent les cellules infectées avec une population virale provenant du surnageant d'infection de la cupule A7 (Figure 12a). Cette population virale n'exprime que la polyédrine du VPC.
- A10 et A11 sont respectivement les témoins positif et négatif. La cupule A12 correspond à des cellules saines.

Le marquage de 100% des populations virales isolées dans le cas des deux recombinants, indique que les suspensions virales des cupules D1 et A7 (Figure 12a) sont homogènes et que les deux virus expriment le gène de la polyédrine du *Es* VPC.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



En générale, le titre est ajustée en fonction du nombre de cellule et de la MI désirées en diluant l'inoculum viral. Le repiquage des plages polyèdres (+), afin d'isoler une population virale homogène au niveau des deux virus recombinants, a été fait deux autres fois. Pour des raisons de sécurité, les hybridations se sont poursuivies avec la même sonde mais non radioactive. Le protocole suivi fut celui décrit en 11.2.1 quant à l'infection des cellules. L'ADN viral et cellulaire furent fixés sur une membrane de nitrocellulose comme en 11.2.2 (1) et l'hybridation ainsi que la révélation colorimétrique se firent selon la technique décrite en 13.4 (Figures 12a et b).

12 Détection du produit d'expression de l'ADNc par immunobuvardage de type Western

1- Gel de polyacrylamide

Selon la technique de Laemmli (1970), les cellules infectées débarrassées du milieu sont lavées à deux reprises dans du PBS 1X glacial en les ramenant au culot par des centrifugations à 500g. Ces cellules sont ensuite resuspendues dans un petit volume de PBS 1X et lysées par addition d'un volume égal de tampon de lyse (50 mM de tris HCl pH 6,8; 1% de SDS; 1% de β -mercaptoéthanol; 10% de glycérol; 0,003 % de bleu de bromophénol). Le tout est amené à 100 °C dans un bain-marie pendant 5 min et passé sur mini-gel d'acrylamide: bisacrylamide (29:1) dénaturant de 12,5 % (Mini-Protein II™ de Bio-Rad). La migration a lieu à 200 volts pendant 60 min dans du tampon 2 mM de tris, 250 mM de glycine, 0,1 % de SDS. Le gel est ensuite coloré dans une solution de bleu de Coomassie 0,3 % p/v (40% v/v de méthanol, 10% v/v d'acide acétique glacial) pendant une nuit et séché par chauffage à 80 °C sous vide (Figure 13).

2- Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Une fois la migration terminée, le gel est placé dans le tampon de transfert (20 % v/v de méthanol; 192 mM de glycine; 25 mM de tris) afin de l'équilibrer. La membrane de

nitrocellulose subit le même traitement pendant 10 min et est ensuite placée en contact avec le gel selon les recommandations du fournisseur de l'appareil de transfert Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell™ (Bio-Rad). L'électrotransfert se fait à 100 Volt et 250 mA pendant 60 min à 4°C. Une fois le transfert terminé, la membrane est asséchée à l'air et placée dans un sac de polypropylène (Gibco-BRL).

3- Révélation immunologique

Les sites non spécifiques sont bloqués par incubation de la membrane dans un tampon TBS (200 mM de tris; 5 M de NaCl, pH= 4,5) contenant 3% p/v de gélatine fondue pendant 1 h à 50°C. Afin d'éliminer l'excès d'agent bloquant, un lavage de 5 à 10 min dans du TTBS (TBS, Tween 20, 0,05% v/v) est exécuté. L'anticorps de lapin anti-polyédrique cypovirale (#540) est dilué 1/1000 dans un tampon TTBS + 1% p/v de gélatine et la membrane y est incubée 2 h à la température de la pièce. Pour se débarrasser des anticorps non liés, 2 lavages au TTBS sont faits avant d'ajouter l'anticorps de chèvre marqué à la peroxydase anti-anticorps de lapin dilué 1:3 000 dans le tampon TTBS. Suite à une incubation de 2 h à la température de la pièce, la membrane est lavée à deux reprises dans le tampon TTBS. La révélation se fait par addition de peroxyde d'hydrogène et de 4-chloro-1-naphtol aux concentrations recommandées par le fournisseur (Bio-Rad). La réaction colorimétrique est arrêtée par trempage de la membrane dans de l'eau distillée. Les photos sont prises sur un film Polaroid 665™ (Figure 13).

13 Détection de l'ADNc dans les virus recombinants.

13.1 Extraction de l'ADN viral recombinant.

Un mL d'hémolymphe de larves infectées par les virus recombinants est centrifugé à 7 000 rpm dans le rotor SS-34 (Beckmann) afin de mettre au culot les cellules et les polyèdres libérés. Le surnageant de centrifugation est recueilli et centrifugé sur un coussin de sucrose 20% p/v à 25 000 rpm (rotor SW 40.1 de Beckmann) pendant 2 h à 4°C. Les virus ainsi

mis au culot sont resuspendus dans un volume suffisant de tampon TE pH= 8. La moitié de l'échantillon est utilisé pour l'extraction d'ADN alors que le restant est congelé à -20°C. Aux virus libres est ajouté 1 mg/mL de Protéinase k et du SDS 10% pour avoir une concentration finale de 1% p/v. L'incubation se poursuit à 56 °C pendant 2 h pour éviter le clivage de l'ADN par des endonucléases contaminantes. Au bout de cette incubation, 2 extractions au phénol: chloroforme: alcool isoamilique (25:24:1) sont faites et deux lavages au chloroforme:alcool isoamilique suivent pour se débarrasser du phénol. L'ADN est ensuite précipité dans de l'acétate d'ammonium (NH₄OAc) 0,3 M et de l'éthanol 95% selon la méthode précédemment décrite. Le culot d'ADN resuspendu dans le tampon TE pH= 8 sert pour la digestion enzymatique.

13.2 Digestion de l'ADN viral par des endonucléases.

Tout l'ADN resuspendu est utilisé et 10 U d'enzyme EcoR I servent à la digestion de ce dernier dans les conditions osmotiques appropriées, à 37 °C pendant 2 h. La digestion est arrêtée après incubation de 10 min à 56°C pour dénaturer l'enzyme. Le produit de digestion est passé à travers un gel d'agarose de 0,8 % dans du TAE 1X à 100 volt pendant 1 h. La coloration dans un bain de bromure d'éthidium permet la visualisation du profil électrophorétique (Figure 14).

13.3 Transfert de l'ADN sur membrane.

Suivant le protocole #1 de Pharmacia LKB Biotechnology VacuGene XL, La membrane de nylon est hydratée dans du SSC 6 X et assemblée selon les recommandations du fournisseur dans l'appareil à transfert. Le gel d'agarose est placé par dessus en même temps que le vide était appliqué. Une solution de dépurination (HCl 0,2 N) recouvre le gel pendant 20 min ou jusqu'à ce que le bleu de bromophénol présent dans tampon de chargement tourne au jaune. Suite à cette réaction, une solution dénaturante de 0,15 M de

Figure 14: Détection de l'ADNc incorporé dans le génome des VPN recombinants, par la technique d'hybridation non radioactive de type Southern.

Puits 1: Standard de taille (1 kpb).

Puits 2: ADNc détecté dans le *Bm* VPN-PNC, par hybridation avec la sonde PEsCH2 marquée à la digoxigénine.

Puits 3: Profil de digestion de l'ADN du *Bm* VPN-PNC avec EcoR I.

Puits 4: ADNc détecté dans le vecteur PBNT1-pol, par hybridation avec la sonde PEsCH2 marquée à la digoxigénine.

Puits 5: Profil de digestion du vecteur PBNT1-pol avec EcoR I.

Puits 6: ADNc détecté dans le vecteur *Bm* VPN-PC, par hybridation avec la sonde PEsCH2 marquée à la digoxigénine.

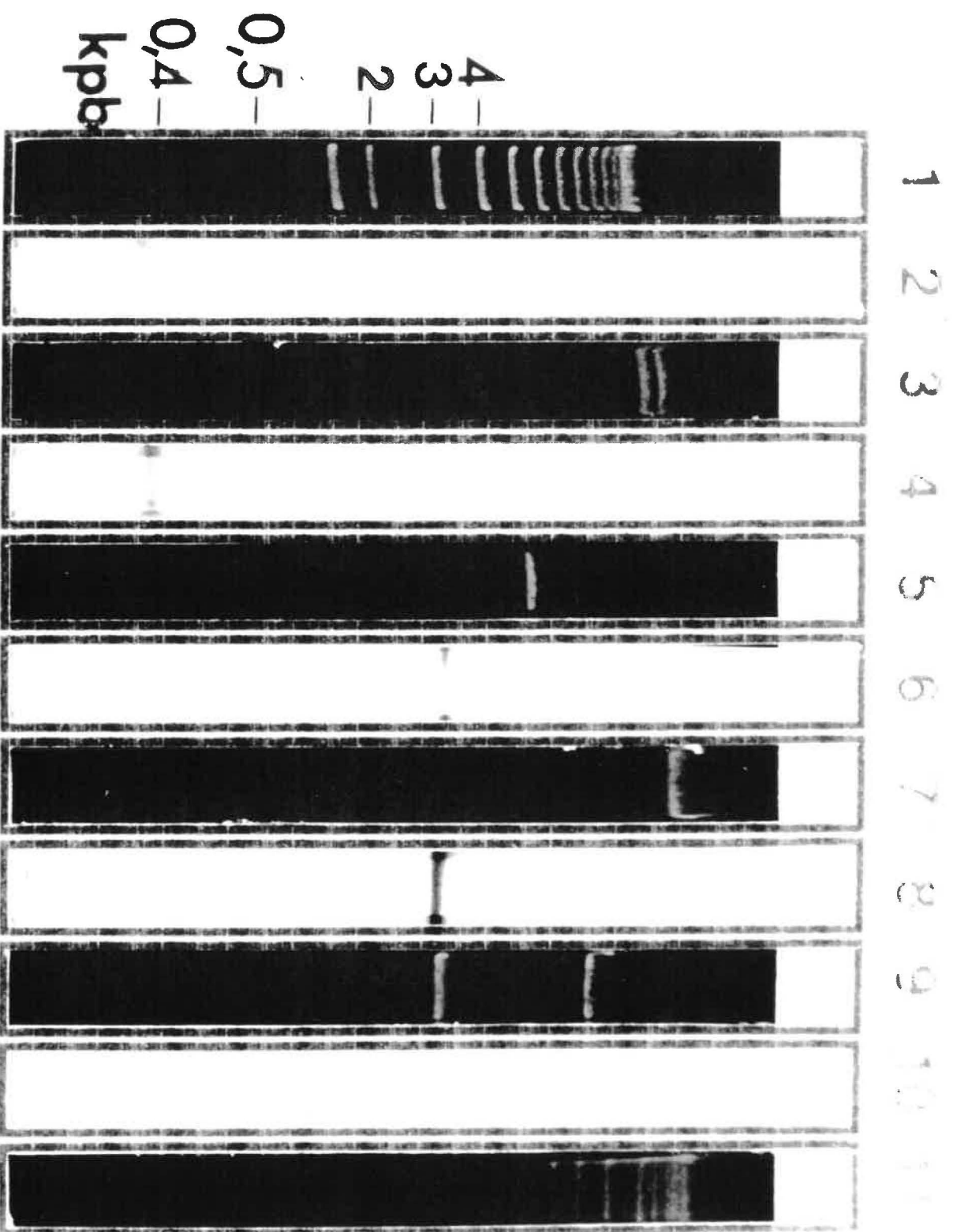
Puits 7: Profil de digestion du *Bm* VPN-PC avec EcoR I.

Puits 8: ADNc détecté dans le pBm4-pol, par hybridation avec la sonde PEsCH2 marquée à la digoxigénine.

Puits 9: Profil de digestion du vecteur pBm4-pol avec EcoR I.

Puits 10: ADNc détecté dans le *Bm* VPN sauvage, par hybridation avec la sonde PEsCH2 marquée à la digoxigénine.

Puits 11: Profil de digestion du *Bm* VPN sauvage avec EcoR I.



NaCl; 0,5 N de NaOH remplace la précédente pour aussi 20 min. La neutralisation se fait pendant 20 min avec du tris 1M, pH= 7,5 dans du NaCl, 1,5 M. Le transfert des acides nucléiques du gel sur la membrane se poursuit pendant 60 min avec du SSC 20X. La membrane contenant l'ADN viral digéré est ensuite lavée dans la même solution que précédemment pendant 10 min. L'ADN est ensuite fixé à la membrane par contact avec des rayons Ultra Violet (300 nm) pendant 5 min (UV Transluminator).

13.4 Hybridation de type Southern à la Digoxigénine (Dig.).

En suivant les instructions du fournisseur de la trousse Dig. Oligonucléotide Tailing™ (Boehringer Mannheim) à l'amorce interne (PEsCH₂) du gène de la polyédrique cypovirale est jointe une queue de Dig-11-dUTP /dATP (3'-déoxyuridine 5'-triphosphate couplé à la Dig, entrecoupée de dATP). Cette sonde stable à -20 °C est ensuite congelée en aliquots de 10 mL contenant 1 pmol de sonde par mL. La membrane contenant les acides nucléiques fixés est préhybridée pendant 4 h à 68 °C dans une solution contenant du SSC 5X, 1% de protéines purifiées du lait (Blocking Reagent™, Boehringer Mannheim), 0,1 % de N-laurylsarcosine (Sigma, Chemical company) et 0,02 % de SDS. La solution de préhybridation est remplacée par la même solution mais contenant 0,1 pmol/ mL de sonde marquée à la Dig. L'hybridation se poursuit pendant 16 h à 42 °C pour se terminer par des lavages de 10 min dans des bains successifs de concentrations décroissantes de SSC (2X à 0,1 X) dans du SDS 0,1 % à 55 °C.

La détection immunologique débute par un bain de 1 min pour équilibrer la membrane dans un tampon contenant de l'acide maléique 0,1 M et 0,15 M de NaCl pH= 7,5. Les sites non-spécifiques sont bloqués suite à une incubation de 30 min avec la solution de blocage à la température de la pièce (0,1 M d'acide maléique et 0,15 M de NaCl, pH= 7,5, 1% de Blocking reagent™) et l'anticorps anti-Dig-PA (phosphatase alcaline) à une dilution de 1: 5 000 dans la solution de blocage. La réaction effectuée pendant 2 h à la température de la pièce, est suivie par 2 lavages de 15 min dans le tampon d'acide maléique 0,1 M et 0,15 M

de NaCl pH= 7,5 équilibré avec une solution contenant 100 mM de tris-HCl; 100 mM de NaCl et 150 mM de MgCl₂, pH= 9,5. Afin de révéler colorimétriquement la présence du gène, une solution contenant 0,02 % de NTB (tétrazolium de nitrobleu) et 0,04% de 5-bromo-4-chloro-indolyl phosphate (X-Phosphate) est ajoutée à la membrane. Trente minutes d'incubation sans agitation et dans l'obscurité, permettent le développement de la couleur. Par rinçage de la membrane dans du tris HCl, 10 mM contenant de l'EDTA pH= 8, à 1 mM, le développement de la couleur est arrêté (Figure 14).

14 Détection de la polyédrique par immunoperoxydase.

14.1 Immunoperoxydase sur tapis cellulaire infecté.

Les cellules NISES BoMo-15-AIIc infectées (Section 4.1.2) sont fixées à -20° C pendant 20 min dans de l'éthanol 70% contenant de l'HCl 0,5 N. Le tapis est ensuite lavé à deux reprises avec du PBS 1X et incubé pendant 30 min à 37 °C dans du tampon Tween 20, 0,05%; PBS 1X; BSA 1% afin de bloquer les sites non-spécifiques. Sans rincer, l'anticorps de lapin anti-polyédrique d'*Es* VPC (lot #540) dilué 1: 1000 dans du PBS 1X, est incubé avec les cellules fixées. Suite à une incubation de 16 h à 4° C, les puits sont lavés trois fois pendant 5 min avec du TPBS (Tween 20, 0,05%; PBS 1X) pour éliminer l'excès d'anticorps libres. Le second anticorps de chèvre anti-immunoglobuline G (IgG) de lapin couplé à la peroxydase (Bio-Rad), est ajouté à une dilution de 1: 3 000. Deux lavages avec le tampon TPBS avec un au PBS 1X pour éliminer le Tween 20, succèdent à une incubation de 60 min à 37° C. Le substrat de la peroxydase, soit 0,01% de H₂O₂ est ajouté avec 0,05 mg/mL de diaminobenzidine (DAB) dans du tris-HCl, 50 mM fraîchement préparé et filtré. Une incubation de 20 à 30 min permet le développement de la couleur brunâtre caractéristique. Le développement est ensuite arrêté par un rinçage à l'eau distillée. Les lames sont ensuite montées et observées au microscope photonique.

14.2 Immunoperoxydase sur coupes histologiques de larves infectées.

Les larves infectées avec les VPN recombinants selon la technique décrite à la Section 4.2.2, sont fixées dans le fixateur de Carnoy (60% d'éthanol, 30% de chloroforme et 10 % d'acide acétique glacial) pendant 24 h et déshydratées dans des bains successifs d'éthanol à concentration en éthanol croissante (de 70% à 100%). Une fois enrobées dans la paraffine, ces dernières sont coupées au microtome et placées sur des lames de verre. Les spécimens sont ensuite trempés pendant 1 min dans le xylène 100% afin de se débarrasser de la paraffine. Pour éliminer la peroxydase endogène, les coupes sont incubées pendant 30 min dans une solution contenant 0,03 % de H₂O₂ puis rincées deux fois avec du PBS 1X. Suite à une incubation de 30 min dans la solution de blocage (PBS, Tween 20, BSA), l'anticorps de lapin anti-polyédrine d'Es VPC dilué 1:100 est ajouté. Deux heures d'incubation à la température de la pièce ou 16 h à 4° C suffisent pour que l'antisérum réagisse avec la polyédrine d'Es VPC non cristallisée. Enfin, 3 lavages au PBS 1X et l'ajout de l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Bio-Rad) sont faits. Après rinçage et révélation par addition du substrat et du chromogène, les lames sont montées et observées au microscope optique.

15 Détection du produit d'expression de l'ADNc au microscope électronique.

15.1 Préparation des échantillons.

Les tissus larvaires (hémocytes, adipocytes et intestins moyens) ainsi que les cellules infectées sont lavées à deux reprises dans du PBS 1X pH= 7,2 à la température de la pièce. Les échantillons sont ensuite fixés dans une solution de PBS 1X contenant 0,1 % de glutaraldéhyde et 4 % de paraformaldéhyde pH= 7,2- 7,4. Après 4 h d'incubation à 4° C, la paraformaldéhyde et la glutaraldéhyde sont éliminées par 3 lavages entrecoupés de centrifugations de 5 min à 3 000 rpm, avec du PBS 1X glacial contenant 3 % de sucrose.

La déshydratation des culots obtenus se fait progressivement dans des bains d'acétone : H₂O de 25%, 50%, 75%, 95% et 100%. Les spécimens sont laissés une nuit à 21 °C dans un mélange 1:1 d'acétone : résine spurr (10 g de dioxyde de Vinyl cyclohexène (ERL 4206); 6 g de diglycidyl d'ether de polypropylène glycol (DER 736), 26 g de nonenyl succinique anhydre (NSA) et 0,4 g de diméthylaminoethanol (DMAE)). Deux incubations dans la résine pure à la température de la pièce sont effectuées, une de 3 h et l'autre de 2 h. Les spécimens dans la résine sont alors incubés 24 heures à 60 °C pour que la résine spurr polymérise. Des coupes ultraminces sont faites à partir des blocs contenant les échantillons enrobés avec un ultramicrotome de type LKB 2128. Les coupes sont ensuite déposées sur des grilles de cuivre et colorées à l'acétate d'uranyl (5% p/v) dans de l'éthanol (50% p/v) pendant 20 min à l'abri de la lumière et au citrate de plomb (0,4 % p/v) pendant 5 min à l'abri du CO₂. Les grilles sont ensuite observées au microscope électronique Hitashi 200.

15.2 Marquage à l'or colloïdal.

Les coupes ultraminces déposées sur des grilles de nickel sont incubées pendant 60 min à la température de la pièce dans une solution saturée de métapériodate afin de libérer les sites antigéniques. Elles sont ensuite lavées dans du PBS 1X pH= 7,2 stérile pendant 5 min avant d'être placées dans une solution de PBS 1X contenant 1% d'ovalbumine (Sigma, Chemical company) afin de bloquer les sites non-spécifiques. Sans lavage, une goutte d'antisérum de lapin anti-polyédrique d'Es VPC dilué 1: 100 est déposée sur chaque grille qui incube 16 heures à 4 °C ou 60 min à la température de la pièce. Les grilles sont ensuite lavées 3 fois, dans 3 gouttes de PBS 1X afin d'éliminer tout anticorps non adsorbé. Une seconde incubation de 5 min dans la solution d'ovalbumine est faite avant de déposer de la protéine A marquée au grains d'or de 20 nm (Sigma, Chemical company) diluée 1: 20 dans une solution de PBS 1X, Tween 0,05% v/v, Albumine 0,5% p/v, filtrée. Après 60 min d'incubation à la température de la pièce, tout excès de protéine A-or est éliminé par un

lavage sous un jet de PBS 1X et par 3 trempages dans des gouttelettes d'eau distillée stérile. Les échantillons sont ensuite colorés par la technique de double coloration décrite précédemment et regardés au microscope électronique.

Résultats

1 Séquence de l'ADNc du gène de la polyédrine cypovirale

Suite à la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR à partir du segment #10 de l'ARN génomique du *Es* VPC (Figures 2 et 3), deux observations nous ont motivés à considérer le produit de la précédente réaction comme étant l'ADNc du gène cypoviral recherché. Premièrement, le produit d'amplification par la réaction de RT-PCR était unique et migrerait au même niveau que l'ADNc du même gène (témoin positif) produit par Fossiez (1990). Deuxièmement, le témoin négatif (le segment #10 du *Bm*VPC) ne donna aucun produit suite à la réaction de RT-PCR. Ainsi, nous avons procédé au séquençage de certains amplicons une fois insérés dans le plasmide pUC-18. Grâce aux amorces externes synthétisées à partir des séquences en amont et en aval du site de clonage dans le plasmide pUC, celle de l'ADNc insérée fut déterminée. Deux différences ont été notées en comparant la séquence de l'ADNc publiée par Fossiez *et al.* (1989) avec celle provenant de l'ADNc synthétisée (Figures 15 et 16). La première, de faible envergure, est la substitution en position 734 de l'ADNc d'une cytosine pour une guanine donnant un codon TGG au lieu de TCG. Cette substitution n'a pas entraîné de changement quant à l'acide aminé (a.a.) codé, c'est à dire une valine. Plus important, l'insertion en position 777 de la séquence nucléotidique d'une adénine s'est traduite par l'élagage de 16 a.a. de la partie carboxy-terminale de la protéine. La polyédrine que nous voulions ainsi exprimer était composée de 253 a.a. au lieu de 269 d'après les données Fossiez *et al.* (1989). Comme ces modifications se sont avérées présentes dans les cinq amplicons, elles ne pouvaient provenir d'erreurs de lecture par la Taq polymérase. Nous sommes donc confiants que l'ADNc synthétisé est fidèle au segment #10 de la souche d'*Es* VPC que nous avons utilisée.

2 Étude de l'expression de la polyédrine cypovirale *in vitro*.

2.1 Expression par le *Bm* VPN de la Polyédrine du VPC (*Bm* VPN-PC)

L'infection avec le *Bm*VPN-PC de la lignée NISES BoMo-15-AIIc susceptible au *Es* VPC et au *Bm*VPN, nous a permis d'observer des signes d'infection rappelant une réplika-

tion baculovirale classique *in vitro*. L'identité des corps d'inclusion était difficile à confirmer au microscope photonique (Figure 17.1). Ainsi, nous ne pouvions pas confirmer la nature des polyèdres observés (polyèdres de VPC ou de VPN ?). Par contre, l'analyse protéique de cellules infectées par une population virale isolée (technique de plage), a confirmé la présence d'une seule protéine hyper-exprimée, d'environ 33 kDa (Figure 13a). Cette protéine a été identifiée comme étant la polyédrine du VPC d'*E. scandens* par la technique d'immunobuvardage de type Western (Figure 13b) utilisant un antisérum reconnaissant uniquement la polyédrine d'*Es* VPC (Polyédrine-C). L'absence de signal dans les puits 3, 5 et 7 (Figure 13b) confirme que l'antisérum utilisé ne reconnaissait ni la polyédrine de VPN (polyédrine-N), ni les autres protéines virales et ni les protéines cellulaires. Sur le profil protéique de cellules infectées par le *Bm*VPN-PC (Figure 13a, puits 4), nous notons aucune protéine de 33 kDa hyper-exprimée. L'absence de la polyédrine-N de 33 kDa confirme la substitution du gène baculoviral par l'ADNc du gène de la polyédrine du VPC d'*E. scandens* chez le virus recombinant. Nous avons donc bien isolé par la technique de plage, une population de VPN recombinants exprimant uniquement le gène du VPC. L'expression de la polyédrine du VPC fut confirmée *in situ* par la technique d'immunoperoxydase. Celle-ci utilise le même antisérum que celui de l'immunobuvardage de type Western, permettant ainsi d'identifier la polyédrine de VPC (polyédrine-C) non cristallisée (Belloncik, 1989; Fossiez, 1990). Ainsi, la présence de la polyédrine-C exprimée par les cellules infectées avec le *Bm*VPN-PC a été identifiée par le marquage brunâtre de leur cytoplasme (Figure 17.5). Cette détection colorimétrique de la protéine non cristallisée, identique à celle observée *in vitro* lors d'infection de cellules avec l'*Es* VPC (Belloncik, 1989), donna un signal maximal 12 h avant l'apparition des corps d'inclusion, soit 72 h après l'infection des cellules avec une suspension virale ayant une MI de 3. L'atténuation du signal une fois

Figure 15: Séquence nucléotidique de l'ADNc du gène de la polyédrine d'*Es VPC*.

- La séquence de VPC pol 94 correspond à celle que nous avons obtenue et est comparée avec celle de Fossiez *et al.* (1989)
- Les nombres à droites indiquent la position du dernier nucléotide de la ligne correspondante, en fonction du codon ATG de départ.
- La séquence soulignée est celle reconnue par Sma I et Xma I.
- L'absence d'homologie est indiquée par la présence d'un tiret (-)

Séquence nucléotidique de pol 89 versus pol 94

| | | | |
|------------|---|--------------------------|-----|
| CPU pol 89 | ----- | AT GCACGGACTA GACGACGCAC | 22 |
| CPU pol 94 | TGCAGGTCGA CTCTAGAGGA TCCCCGGGAT | GCACGGACTA GACGACGCAC | 50 |
| CPU pol 89 | AATACCTACA GCAAAAAGCG CATATAAGC GTATCTCAGA ATTCAGAGC | | 72 |
| CPU pol 94 | AATACCTACA GCAAAAAGCG CATATAAGC GTATCTCAGA ATTCAGAGC | | 100 |
| CPU pol 89 | TCCAGCACT CAGGCATAAA TGTGACAGTA GTATTGAGT ACACCAATGG | | 122 |
| CPU pol 94 | TCCAGCACT CAGGCATAAA TGTGACAGTA GTATTGAGT ACACCAATGG | | 150 |
| CPU pol 89 | AGTGGTACAG GTATATAACT GGCRAAGGGAC CGAGGTGATT GCGGGTAGCT | | 172 |
| CPU pol 94 | AGTGGTACAG GTATATAACT GGCRAAGGGAC CGAGGTGATT GCGGGTAGCT | | 200 |
| CPU pol 89 | TGACACGGCA GTTGATGAG TTTCCCAATT ACATGAACCC AGACAACAT | | 222 |
| CPU pol 94 | TGACACGGCA GTTGATGAG TTTCCCAATT ACATGAACCC AGACAACAT | | 250 |
| CPU pol 89 | GGTAGAATTG AATGGCCAGG TGAAGGAGTC GACATCAGC ACGGATTAT | | 272 |
| CPU pol 94 | GGTAGAATTG AATGGCCAGG TGAAGGAGTC GACATCAGC ACGGATTAT | | 300 |
| CPU pol 89 | TCGCTCGAAC GGTGGAAATG GARGCTACGA TATCGGAGCA GGTGACCCTT | | 322 |
| CPU pol 94 | TCGCTCGAAC GGTGGAAATG GARGCTACGA TATCGGAGCA GGTGACCCTT | | 350 |
| CPU pol 89 | ACGCAATGCA ATTTATTGTT CAGGAGCG TTGACTGGAA TGCAACTCGT | | 372 |
| CPU pol 94 | ACGCAATGCA ATTTATTGTT CAGGAGCG TTGACTGGAA TGCAACTCGT | | 400 |
| CPU pol 89 | CTGAGATTCT TTGGTCCCGA CCGTAGCCGT TGGATGCCTG ATGACCAGGG | | 422 |
| CPU pol 94 | CTGAGATTCT TTGGTCCCGA CCGTAGCCGT TGGATGCCTG ATGACCAGGG | | 450 |
| CPU pol 89 | TGGTGCTTCC GTTCGCGCCG GATTATTAA CGCAGCTGAA GACATCATT | | 472 |
| CPU pol 94 | TGGTGCTTCC GTTCGCGCCG GATTATTAA CGCAGCTGAA GACATCATT | | 500 |
| CPU pol 89 | ACTCGAGAT GCAGCCATTG TACTTCTGCG ACCGTATGCC GGGAAATCG | | 522 |
| CPU pol 94 | ACTCGAGAT GCAGCCATTG TACTTCTGCG ACCGTATGCC GGGAAATCG | | 550 |
| CPU pol 89 | TACTACGTAC GTTTCGACGA TAAATATGCA CCGCGTTTCC CGACAATTGG | | 572 |
| CPU pol 94 | TACTACGTAC GTTTCGACGA TAAATATGCA CCGCGTTTCC CGACAATTGG | | 600 |
| CPU pol 89 | ATTTGAGGTT TACCGTTACA GAGTAGGAGC GACCAACGAA ATGGGTGGAG | | 622 |
| CPU pol 94 | ATTTGAGGTT TACCGTTACA GAGTAGGAGC GACCAACGAA ATGGGTGGAG | | 650 |
| CPU pol 89 | AGAGCGCGC TACCGCAGTA GCATCACTGA TTTCAATCCC AACATTCTCA | | 672 |
| CPU pol 94 | AGAGCGCGC TACCGCAGTA GCATCACTGA TTTCAATCCC AACATTCTCA | | 700 |

Séquence nucléotidique de pol 89 versus pol 94

| | | |
|------------|--|-----|
| CPU pol 89 | ACAGCATACG TGAATGAGAA AGT GCCGTA GAGAACTTCT TCCRACCGCG | 722 |
| CPU pol 94 | ACAGCATACG TGAATGAGAA AGT GCCGTA GAGAACTTCT TCCRACCGCG | 750 |
| | | |
| CPU pol 89 | CGAACTGGTT TACCAGA CA GCTATGGGTA CACCGTTTGA GGTCCGTTTG | 771 |
| CPU pol 94 | CGAACTGGTT TACCAGA CA GCTATGGGTA CACCGTTTGA GGTCCGTTTG | 800 |
| | | |
| CPU pol 89 | GTGCCTATGG ATCGATTCGT CACCGAACC GGGATTTAA ----- | 810 |
| CPU pol 94 | GTGCCTATGG ATCGATTCGT CACCGAACC GGGATTTAA CCGGGTACCG | 850 |
| | | |
| CPU pol 89 | ----- --- | 810 |
| CPU pol 94 | AGCTCGAATT CGT | 863 |

Figure 16: Séquence peptidique de l'ADNc du gène de la polyédrine d'*Es* VPC.

- La séquence peptidique de la protéine pol 94 correspond à celle déduite de la séquence nucléotidique VPC pol 94 de l'ADNc que nous avons obtenue. Cette séquence est comparée avec celle publiée par Fossiez *et al.* (1989).
- Les nombres situés à droite, indiquent à la position du dernier acide aminé sur la ligne adjacente, en fonction de l'acide aminé M (méthionine) correspondant au codon ATG (départ).
- Seules les régions homologues sont encadrées.
- Un "X" correspond au codon "Arrêt"

séquence peptidique de pol 89 versus pol 94

| | | |
|-----------------|---|-----|
| Protéine Pol 89 | MHGLDDAQYL QQKAHNKRAIS EFRSSSNSGI NUTVULKYTN GUVQVYNWQG | 50 |
| Protéine Pol 94 | MHGLDDAQYL QQKAHNKRAIS EFRSSSNSGI NUTVULKYTN GUVQVYNWQG | 50 |
| Protéine Pol 89 | TEUIAGSLNR QLMKFPNYMN PDKHGRIEWP GEGVEHQHGL IRSNGGNGSY | 100 |
| Protéine Pol 94 | TEUIAGSLNR QLMKFPNYMN PDKHGRIEWP GEGVEHQHGL IRSNGGNGSY | 100 |
| Protéine Pol 89 | DIGAGDPYAM QFIVQGSVDW NATALRFFGP DGSRWMPDDQ GGASURAGLL | 150 |
| Protéine Pol 94 | DIGAGDPYAM QFIVQGSVDW NATALRFFGP DGSRWMPDDQ GGASURAGLL | 150 |
| Protéine Pol 89 | NAAEDIINSK MQPLYFCRAM AGKSYVURFD DKYAPRFPTI GFEVYRYRUG | 200 |
| Protéine Pol 94 | NAAEDIINSK MQPLYFCRAM AGKSYVURFD DKYAPRFPTI GFEVYRYRUG | 200 |
| Protéine Pol 89 | ATNEMGGESA RTAVASLISF PTFSTAYUNE KUAUENFFQP RELUYQIANG | 250 |
| Protéine Pol 94 | ATNEMGGESA RTAVASLISF PTFSTAYUNE KUAUENFFQP RELUYQNSYG | 250 |
| Protéine Pol 89 | TPFEURLVPM DAFVTETGIX | 270 |
| Protéine Pol 94 | YTUXGPFGRY GSIRHRNADL | 270 |

les 72 h écoulées (résultats non présentés) coïncidait avec l'apparition de polyèdres et confirmait ainsi la spécificité de la détection de la polyédrine non cristallisée. Il est important de noter que cette technique permet de détecter la polyédrine non cristallisée qui persiste avec les polyèdres dans le cytoplasme des cellules (Figure 17.5). En effet, il peut rester dans le cytoplasme une certaine quantité de polyédrine qui ne cristallise pas. Nous avons ainsi prouvé que la polyédrine de VPC était hyper-exprimée *in vitro* par le VPN recombinant (*BmVPN-PC*) contenant l'ADNc du gène de la polyédrine cypovirale (PC) à la place du gène de la polyédrine baculovirale. De plus, nous avons confirmé que ces VPN recombinants n'exprimaient pas le gène de leur propre polyédrine.

Les observations au microscope électronique ont permis d'élucider plusieurs aspects de la cristallisation de la polyédrine recombinante. Une des premières observations corroborant les résultats obtenus précédemment, est l'absence de polyèdre baculoviral. En effet, il n'y avait pas de corps d'inclusion intranucléaire possédant des virions de VPN encastrés dans leur matrice (Figure 17.2). Le marquage à l'or colloïdal exclusivement des polyèdres-C par l'antisérum ne reconnaissant pas les protéines baculovirales (Figure 13b), nous a permis de montrer que tous les corps cristallins présents dans la cellule infectée par le *BmVPN* exprimant uniquement la polyédrine cypovirale, étaient des polyèdres de VPC. Il n'y avait pas de polyèdre baculoviral.

Parallèlement, la présence de corps d'inclusion de VPC dans le cytoplasme et dans le noyau fut observée (Figure 17.3). À plus fort grossissement il a été possible d'apprécier la structure régulière de la matrice cristalline des polyèdres nucléaires reconnus par l'antisérum #540 (Figures 17.4 et 18.6). Ainsi, deux types de polyèdres ont pu être identifiés: Des corps d'inclusion à matrice cristalline régulière dans le noyau (5 à 10) et d'autres, de formes variables, à matrice cristalline irrégulière dans le cytoplasme (2 à 3). Dans les deux cas, il s'agissait de la même protéine mais ayant pris une configuration différente selon le compartiment cellulaire dans lequel elle se trouvait. Un fait, ne tenant pas forcément de la

localisation des polyèdres recombinants, a été l'absence d'inclusion des virions de VPN dans ces cristaux. Bien que dans le noyau, les polyèdres de VPC se trouvaient à proximité des virions de VPN libres, cela ne suffisait pas pour permettre l'inclusion des particules virales infectieuses dans une polyédrine qui ne leur était pas propre. Ainsi, l'infection de cellules NISES BoMo-15-AIIc avec le VPN exprimant le gène de la polyédrine de VPC (*BmVPN-PC*) a montré qu'il y avait hyper-expression que de la polyédrine cypovirale recombinante. De plus, nous voyons que cette dernière cristallise à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules sans inclure de baculovirion.

2.2 Expression par le *Bm* VPN de polyédrines de VPN et de VPC (*BmVPN-PNC*).

L'infection de la lignée NISES BoMo-15-AIIc avec le *BmVPN-PNC* était plus facile à identifier au microscope photonique que celle avec le précédent VPN recombinant (Figure 18.1). En effet, les plages d'isolement de populations virales recombinantes ont été discriminées de celles du virus sauvage, par la présence simultanée de polyèdres cytoplasmiques et d'un noyau rempli à capacité de corps d'inclusion. Dans le cas de l'analyse protéique sur gel de type SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 13a), à cause de la faible différence de grosseur entre les deux polyédrines, une seule bande d'environ 30-33 kDa a été observée. Celle-ci était deux fois plus intense que celle observée lors d'une expression simple de la polyédrine par un VPC (puits 2), un VPN (puits 3 et 5) ou même par un VPN recombinant (puits 4). Les 2 polyédrine ayant des poids moléculaires comparables, l'intensité de la bande a suggéré la présence d'une double expression des polyédrines de VPC et de VPN. Cette expression de la polyédrine de VPC en parallèle avec la polyédrine de VPN a été définitivement prouvée par la technique d'immunobuvardage de type Western. Ainsi, la bande représentant à primabord une protéine hyper-exprimée de 30-33 kDa (Figure 13a; puits 6) s'est avérée contenir la polyédrine de VPC de 30 kDa (Figure 13b; puits 6) et celle de VPN

Figure 17 Détections *in situ* de l'expression et de la cristallisation de la polyédrique d'Es VPC par le *BmVPN-PC in vitro* .
(1 à 6):

Figure 17.1: Cellules NISES BoMo-15-AIIc infectées.

Observation au microscope photonique.

Barre = 40 μm ; P= polyèdres

Figure 17.2: Vue au microscope électronique d'une cellule infectée.

Barre = 1 μm ; C= Cytoplasme; M= Membrane nucléaire; N= Noyau; PC = polyèdres de VPC, V= Virions de VPN; ▲ = Grain d'or.

Figure 17.3: Agrandissement de la figure 17.2

Barre = 400 nm; C= Cytoplasme; M= Membrane nucléaire; N= Noyau; PC= polyèdres de VPC; V= Virion de VPN; ▲ = Grain d'or

Figure 17.4: Polyèdre de VPC exprimé par le *BmVPN-PC*

Barre = 35 nm; ma= matrice cristalline; PC= Polyèdre de VPC, ▲ = grain d'or.

Flèche: matrice cristalline régulière orientée dans une direction.

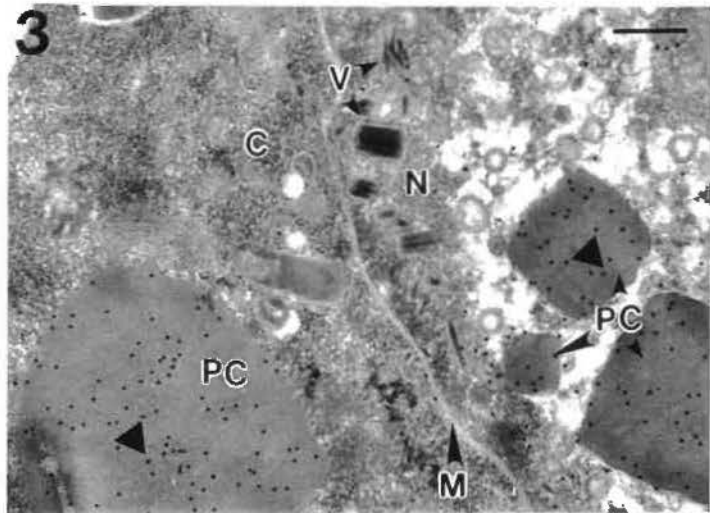
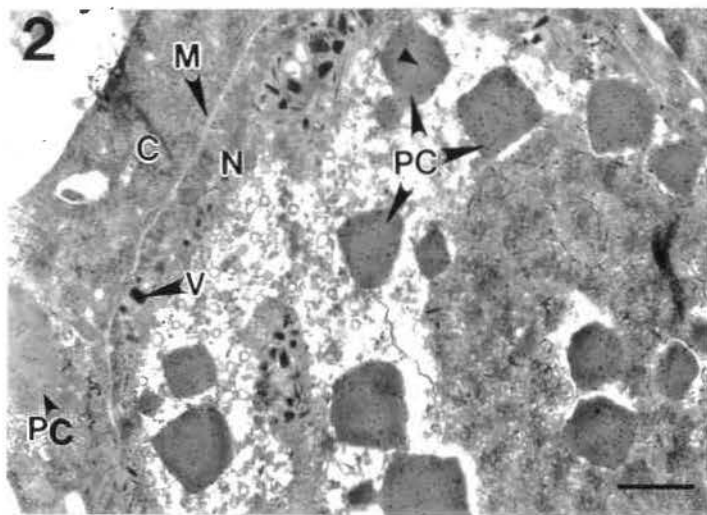
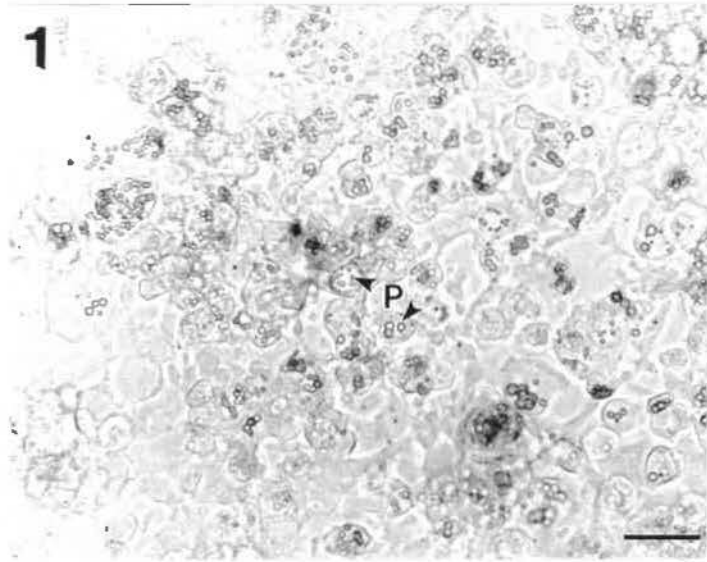
Figure 17.5: Cellules BoMo-15-AIIc infectées avec le *BmVPN-PC* et marquées à l'immunoperoxydase.

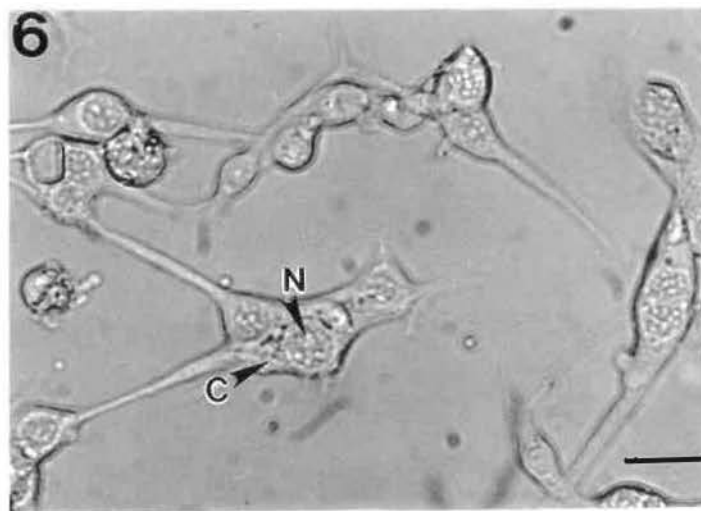
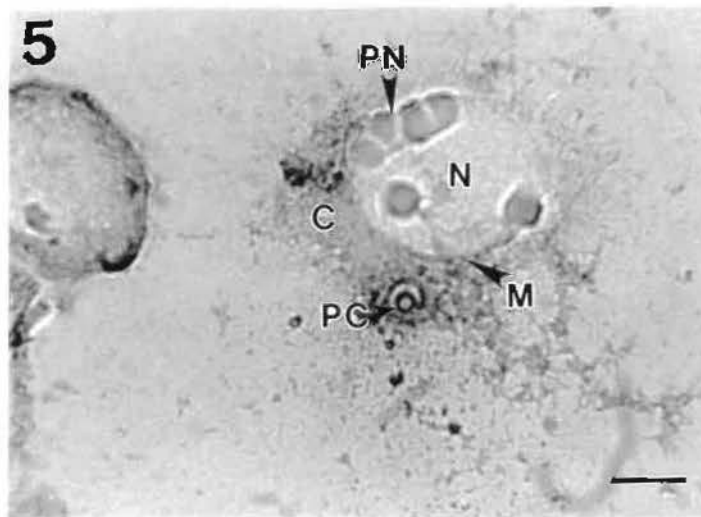
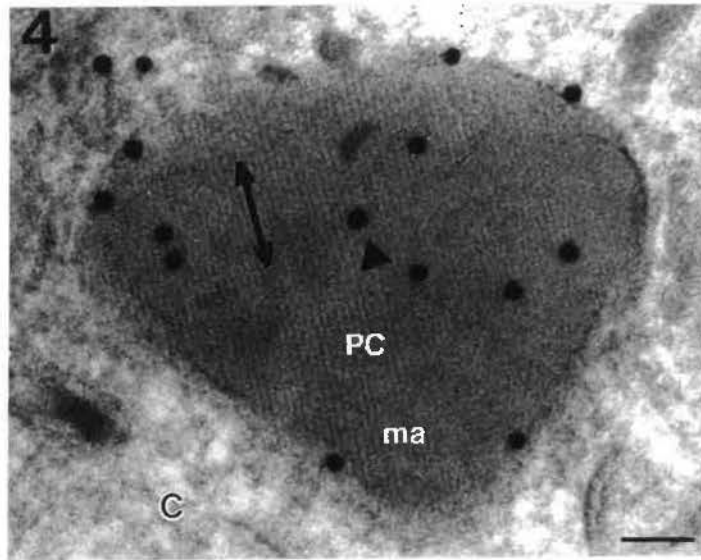
Barre = 9 μm ; C= Cytoplasme; M= Membrane nucléaire; PC= Polyèdres Cytoplasmiques; PN= Polyèdres Nucléaires

Une réaction négative résulte en l'absence de marquage. Voir Figure 18.4.

Figure 17.6: Cellules BoMo-15-AIIc non infectée observées au microscope photonique. Notez, l'absence de polyèdre.

C= Cytoplasme; N= Noyau





(33 kDa). L'antisérum #540 ne reconnaissant aucune protéine des cellules BoMo 15-AIIc saines (puits 7) ainsi qu'aucune protéine baculovirale (puits 5), les conclusions tirées des expériences faisant intervenir le marquage à l'immunoperoxydase et à l'or colloïdal pourront être considérées comme valables. La présence simultanée de la polyédrine baculovirale fut pour sa part confirmée lors des observations faites au microscope électronique.

Par la technique de marquage à l'immunoperoxydase des cellules infectées par le *BmVPN-PNC*, nous avons été en mesure de révéler la présence de l'expression dans le cytoplasme de la polyédrine du *Es VPC* (Figure 18.4). Comme nous pouvons le voir, la cellule saine (CS), celle ne présentant pas de polyèdre intranucléaire, ne démontre aucune coloration caractéristique du marquage à l'immunoperoxydase. Cela confirme bien que l'antisérum #540 utilisé reconnaît la polyédrine du *Es VPC* exprimée dans la cellule adjacente (CI) dont le noyau contient des polyèdres. À ce niveau-ci, nous avons démontré que la polyédrine du *Es VPC* peut être exprimée en même temps que la polyédrine de VPN par un baculovirus recombinant contenant l'ADNc du gène de la polyédrine cypovirale à la place du gène de la p10 (*BmVPN-PNC*). Le microscope électronique est venu compléter l'étude au niveau de la cristallisation des polyédriques (Figure 18.2). Dans le noyau des cellules infectées par le *BmVPN-PNC*, des virions de VPN ainsi que des polyèdres de VPN d'aspect apparemment normal ont été identifiés (Figure 18.3). Ces derniers contenaient une multitude de virus inclus et n'étaient pas marqués à l'or colloïdal (Figure 18.2). L'absence de marquage des corps d'inclusion baculoviraux par les grains d'or justifie encore une fois l'utilisation de l'antisérum #540 (Fossiez, 1990).

Ce marquage a permis de révéler la présence de deux types de polyèdres de VPC. Un type cubique, compact et à matrice cristalline très régulière dans le noyau auprès des polyèdres de VPN (Figure 18.6); ainsi qu'un type cytoplasmique informe pour certains, volumineux et à matrice cristalline lâche et irrégulière (Figure 18.5). À l'instar du VPN n'exprimant que la polyédrine de VPC (*BmVPN-PC*), aucune de ces deux sortes de polyèdres-C

Figure 18 (1 à 6): Détections *in situ* de l'expression et de la cristallisation de la polyédrine d'*Es VPC*, par le *BmVPN-PNC in vitro*.

Figure 18.1: Cellules NISES BoMo-15-AIIc infectées.

Observation au microscope photonique.

Barre = 22,5 μm ; PC= Polyèdres Cytoplasmiques; PN= Polyèdres Nucléaires.

Figure 18.2: Cellule infectée observée au microscope électronique.

Barre = 500 nm; C= Cytoplasme; M= Membrane Nucléaire; N= Noyau; PC= Polyèdre de VPC; PN= Polyèdre de VPN, V= Virion de VPN; ▲= Grain d'or

Figure 18.3: Agrandissement du noyau d'une cellule infectée au *BmVPN-PNC*.

Barre = 200 nm; PC= Polyèdre de VPC; PN= Polyèdre de VPN; V= Virion de VPN.

Figure 18.4: Cellules BoMo-15-AIIc saine (CS) et infectée (CI).

Marquage à l'immunoperoxydase .

Barre = 5,25 μm ; C= Cytoplasme; N= Noyau; PN= Polyèdres Nucléaires; T= Témoin négatif.

Figure 18.5: Polyèdre de VPC anarchiquement cristallisé, dans le cytoplasme, exprimé par le *BmVPN-PNC*.

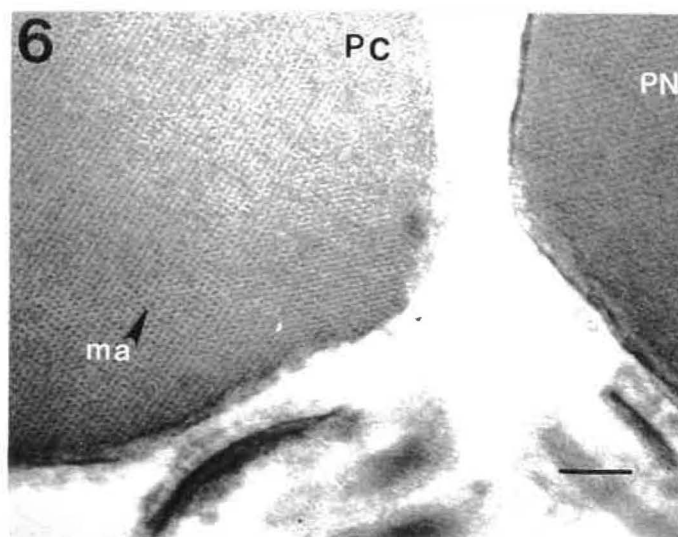
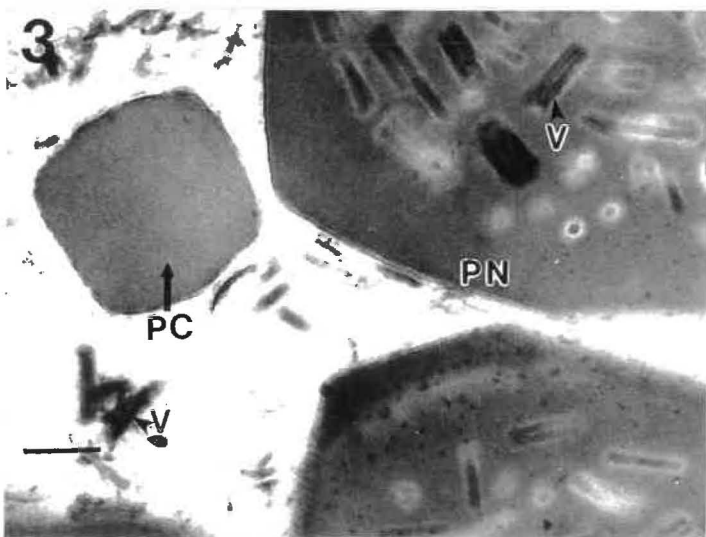
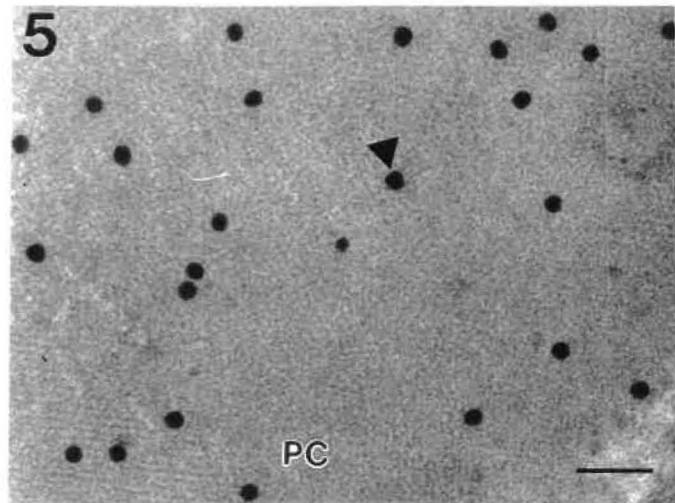
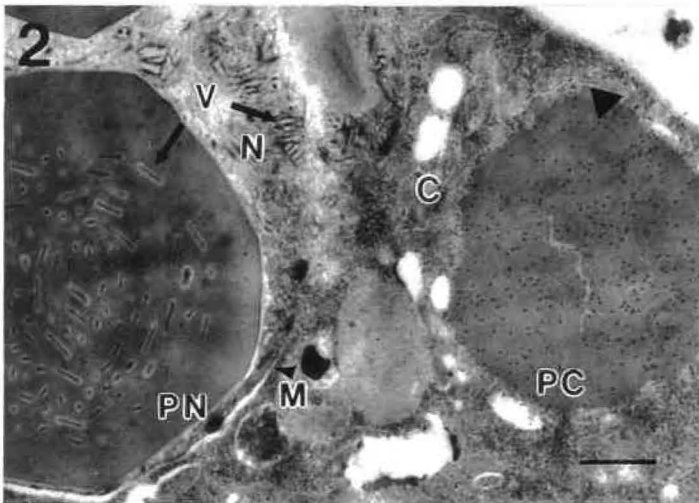
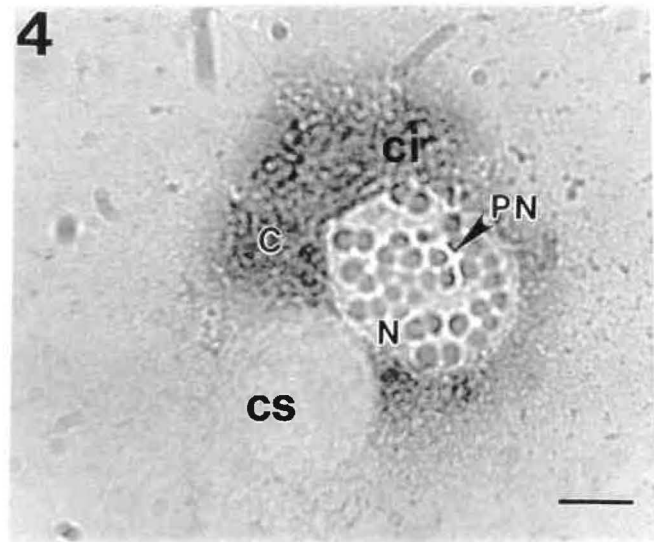
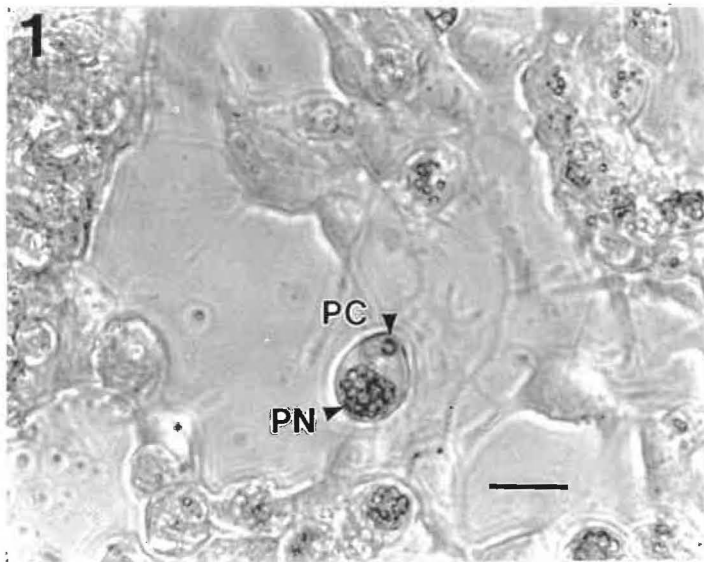
(Agrandissement de la figure 18.2)

Barre = 35 nm; PC= Polyèdre de VPC; ▲= grain d'or

Figure 18.6: Polyèdre de VPC dans le noyau de cellules infectées.

(Agrandissement de la figure 18.3).

Barre = 35 nm; PC= Polyèdre de VPC; PN= Polyèdre de VPN, ma= matrice cristalline



n'a inclus de virions de VPN dans leur matrice bien que ces derniers étaient parfois très proches des polyèdres de VPC (Figure 18.3).

Les résultats obtenus concernant l'infection *in vitro* avec le *BmVPN-PC*, c'est à dire la cristallisation de la polyédrine cypovirale recombinante dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules infectées sans inclure de virions de VPN ont été corroborés par ceux de l'infection avec le *BmVPN* exprimant la polyédrine de VPC et sa propre polyédrine (*BmVPN-PNC*). À ces observations sont venus se greffer celles démontrant la capacité de deux polyédrines différentes, cypovirale et baculovirale, à cristalliser en même temps dans une même cellule.

3 Étude de l'expression de la polyédrine-C *in vivo*.

Deux types de cellules susceptibles aux VPN ont été choisies afin d'analyser la cristallisation de la polyédrine cypovirale recombinante: Les hémocytes et les adipocytes. Notre choix s'est arrêté sur ces deux car faciles à isoler, ils représentent expérimentalement un échantillonnage suffisant pour permettre l'extrapolation des résultats. De plus, les hémocytes sont des candidats intéressants pour analyser la cristallisation de la polyédrine de VPC. En effet, ces cellules ne montrent aucun signe d'infection lors de la réplication du VPC chez la larve mais supportent la réplication complète de ce virus *in vitro*. L'analyse sur ces deux types de cellule de la cristallisation de la protéine recombinante à travers une infection baculovirale, a permis de comparer le phénomène de cristallisation de la polyédrine-C à celui observé lors de l'infection sauvage. À l'instar des études faites *in vitro*, l'immunoperoxydase *in situ* et le marquage à l'or colloïdal ont permis la détection et la distinction entre polyédrine et polyèdres.

Dans l'étude suivante, les larves infectées par l'injection de 100 μL de suspensions virales contenant des virus recombinants libres (titre = 10^7 DICT₅₀/ mL), ont montré des signes d'infection 4 jours après. Les larves d'apparence saines, contenaient une quantité im-

portante de polyèdres à la fois intrahémocytaires et libres dans l'hémolymphe. La distinction entre les larves infectées et saines s'est faite par un simple test d'analyse de l'hémolymphe des individus au microscope à contraste de phase. Isolés, les sujets positifs ont été disséqués pour extraire les divers tissus ou fixés pour l'analyse des coupes histologiques.

3.1 Expression par le *BmVPN-PC*.

Par immunoperoxydase sur des coupes histologiques d'intestin de larves infectées avec le *BmVPN* exprimant uniquement la polyédrine cypovirale, aucune détection d'expression de la protéine recombinante a été rencontrée. Ainsi, l'absence de coloration caractéristique par marquage à l'immunoperoxydase des cellules de l'épithélium intestinal de larves infectées et l'absence de polyèdres ainsi que de virions de VPN dans ces cellules vues au microscope électronique sont sans équivoque: L'intestin des larves n' a pas été infecté par le VPN. Cette interprétation origine de la comparaison entre ce dernier marquage et celui de l'intestin de larves infectées avec le VPC d'*E. scandens* (Figures 20.1 et 2).

Dans le tissu adipeux, la situation était totalement différente. En coupe histologique, le marquage à l'immunoperoxydase a révélé la présence de polyédrine en quantité importante dans le cytoplasme des cellules adipeuses à en juger par l'intensité du marquage (Figure 19.1). De plus, l'obtention de corps d'inclusion marqués à l'or colloïdal dans le cytoplasme, a confirmé que la cristallisation de la polyédrine de VPC recombinante a lieu dans ce type de cellule (Figure 19.2).

Mais ce fut dans les hémocytes que les résultats ont été les plus révélateurs. En effet, afin de mieux visualiser les corps d'inclusion dans ces cellules, 2 à 3 h de contact avec le fond en plastique d'un Pétri a permis l'adsorption des cellules. Une fois qu'elles étaient étalées, le microscope photonique a permis la distinction des polyèdres cubiques dans le noyau et dans le cytoplasme (Figures 21.1 et 2). Au microscope électronique, en comparaison avec le témoin négatif (Figure 21.3), la cristallisation de ces polyèdres a été démontrée par leur

Figure 19: Detections de l'expression et de la cristallisation du gène de la polyédrique d'*Es VPC*, par le *BmVPN-PC* dans le tissu adipeux.

Figure 19.1: Tissu adipeux d'une larve infectée au *BmVPN-PC* (marquage à l'immunoperoxydase)

Barre = 40 μm ; N= Noyau, PC= polyédrique de VPC marquée.

Figure 19.2: Polyédrique de VPC dans le cytoplasme d'un adipocyte, vu au microscope électronique

Barre = 700 nm; C= Cytoplasme; PC= Polyédrique de VPC, V= Vésicule lipidique, ▲= Grain d'or

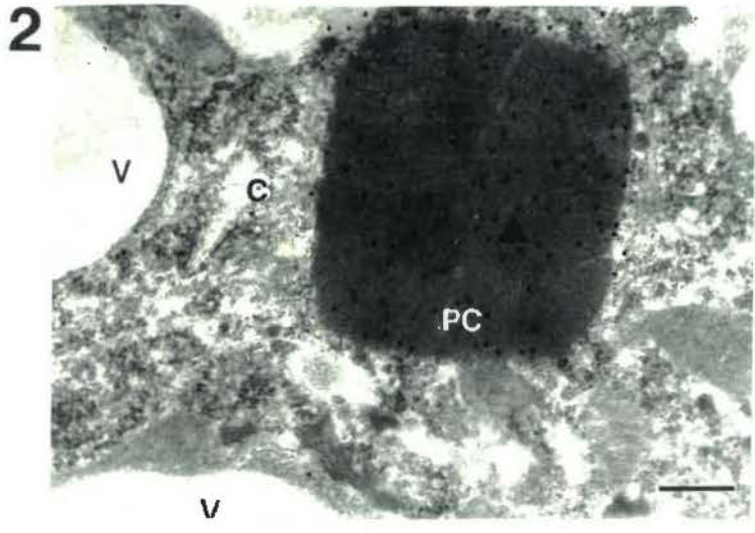


Figure 20 Detections de polyédrique et de polyèdres de VPC *in vivo*, lors d'une infection au *Es VPC* de larves de *Bombyx mori*.

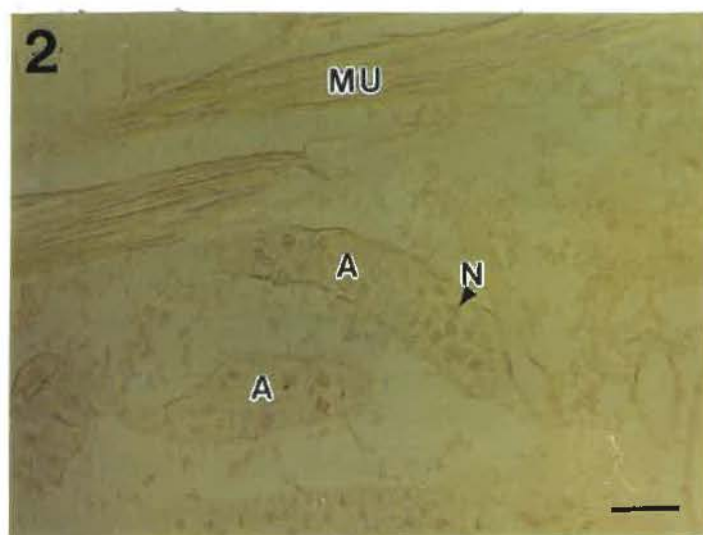
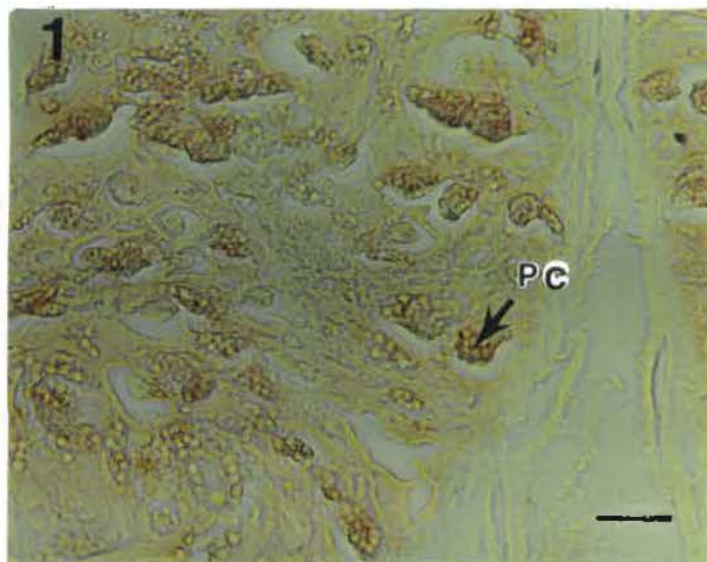
Figure 20.1: Coupe histologique d'intestin d'une larve infectée (marquage à l'immunoperoxydase).

Barre = 20 μm ; PC= Polyèdres de VPC.

Figure 20.2: Coupe histologique de tissus adipeux et musculaires d'une larve infectée (Marquage à l'immunoperoxydase).

Barre = 40 μm ; A= Adipocytes, MU= Muscle, N= Noyau.

On peut noter l'expression de polyédrique uniquement dans le tissu intestinal.



marquage aux grains d'or, caractéristique de la polyédrine cristallisée. L'absence de polyèdre de VPN et la présence de protéine p10 dans le noyau ont confirmé l'expression de l'ADNc du gène de la polyédrine du *Es VPC* sous le contrôle du promoteur puissant de la polyédrine baculovirale. De plus, les virions de VPN présents en grande quantité dans le noyau aux côtés des polyèdres recombinants, ne se sont pas inclus dans ces derniers. Ces observations sont aussi valides en ce qui concerne l'infection du tissu adipeux.

En bref, l'expression de la polyédrine cypovirale recombinante peut avoir lieu dans les adipocytes et les hémocytes là où elle n'a jamais été identifiée lors de l'infection avec un VPC. La production de virions libres possédant une enveloppe et s'incluant dans leurs propres polyèdres, ne semble pas être entravée par la présence de corps d'inclusion de VPC. Finalement, le processus de spécificité d'inclusion des virions de VPN dans leurs polyèdres n'est pas perturbé par la présence de polyèdres cypoviraux.

3.2 Expression par le *BmVPN-PNC*.

L'infection de larves de *Bombyx mori* par injection dans l'hémolymphe de virions de *BmVPN* devant exprimer les polyédrines baculovirale et cypovirale s'est traduite par la présence au bout de 3 à 4 jours, de polyèdres dans l'hémolymphe probablement due à la lyse des hémocytes infectés. Cela a permis d'arrêter l'expérience avant que la liquéfaction des tissus n'ait lieu. L'absence d'infection de l'épithélium intestinal par ce virus recombinant corrobore les résultats obtenus avec le baculovirus n'exprimant que la polyédrine du *Es VPC* (*BmVPN-PC*).

Quant au tissu adipeux, le noyau et le cytoplasme des cellules contiennent des polyèdres suite à l'infection avec le *BmVPN* exprimant les deux polyédrines. Sur des coupes transversales de larves infectées, ce tissu révèle par marquage à l'immunoperoxydase de la polyédrine, la présence d'une grande quantité de polyédrine de VPC non cristallisée. On l'y identifie conjointement avec des polyèdres dans le noyau (Figure 22.1). Suite au marquage à

Figure 21: Expression et la cristallisation de la polyédrine d'*Es* VPC, exprimée par le *Bm*VPN-PC dans les hémocytes.

Figure 21.1: Hémocytes de larves infectées au *Bm*VPN-PC vus au microscope photonique.

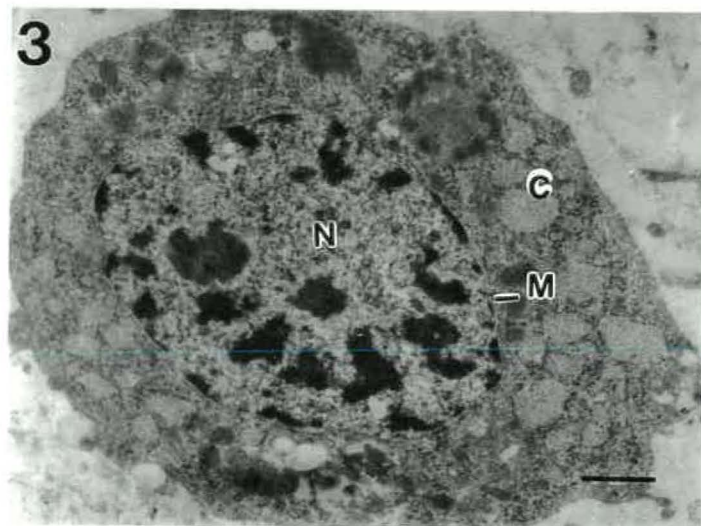
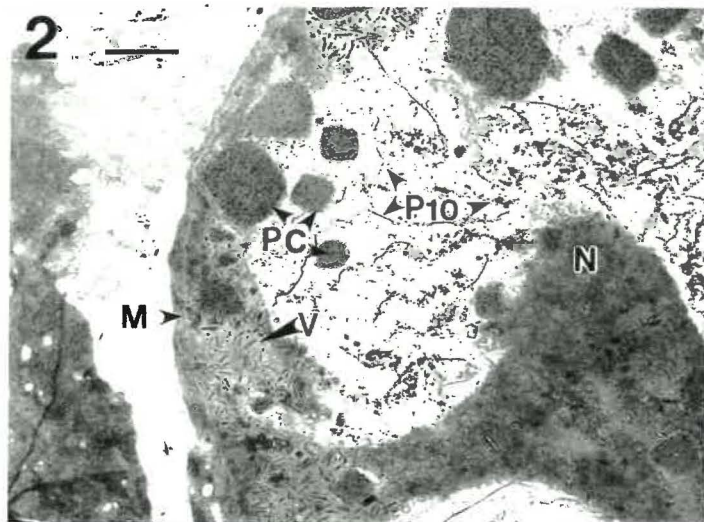
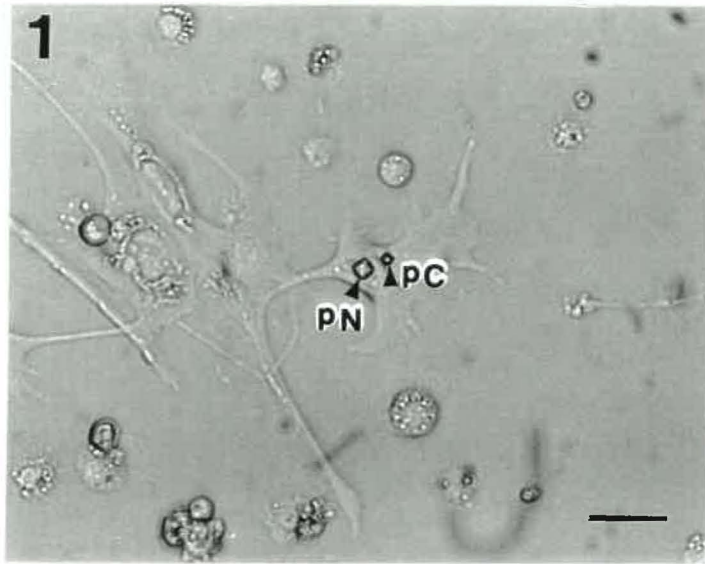
Barre= 22,5 μm ; PC= Polyèdres cytoplasmiques; PN= polyèdres nucléaires.

Figure 21.2: Hémocyte de larve infectée au *Bm*VPN-PC, vu au microscope électronique.

Barre = 1 μm ; M= Membrane nucléaire; PC= Polyèdres de VPC; P10= Protéine p10; V= Virion de VPN.

Figure 21.3: Hémocyte de larve saine, marquage à l'or colloïdal. Témoin négatif. On peut noter l'absence de polyèdres et de protéine P10.

Barre = 1.5 μm ; C= Cytoplasme; M= Membrane nucléaire; N= Noyau.



l'or colloïdal, il est possible de mettre en évidence au microscope électronique la présence de polyèdres de VPN dans le noyau de ces cellules. Ces derniers incluent au sein de leur matrice des virions de VPN. D'autre part, des polyèdres de petite taille parfaitement cristallisés, marqués aux grains d'or et ne possédant aucun virion inclus, sont aussi présents dans le noyau (Figure 22.2). Enfin, des polyèdres plus volumineux, intracytoplasmiques, dont la cristallisation est caractérisée par l'or colloïdal complète le tableau. De taille parfois équivalente aux polyèdres baculoviraux, ces derniers polyèdres sont exclusivement retrouvés dans le cytoplasme et ne comportent évidemment pas de particule virale de VPN (Figure 22.4). Ces résultats, montrent que la co-cristallisation des polyédrines cypovirale et baculovirale peut avoir lieu dans la même cellule adipeuse et que les deux phénomènes sont indépendants. De plus, nous notons que seulement les polyèdres baculoviraux (non marqués aux grains d'or) comportent des virions de VPN.

L'infection des hémocytes par le *Bm*VPN-PNC confirme les observations faites précédemment. Au microscope photonique la présence de polyèdres dans le noyau est évidente, alors qu'une masse informe et dense dans le cytoplasme suggère la présence de polyèdres anarchiquement cristallisés (Figure 23.1). À plus fort grossissement et à travers le marquage à l'or colloïdal des polyèdres de VPC, les hémocytes infectés redémontrent que la co-cristallisation des polyédrines de VPC et de VPN est possible (Figure 23.2). La cristallisation de la polyédrine de VPC dans le cytoplasme est confirmée par le marquage à l'or colloïdal du cristal dans le cytoplasme (Figure 23.3). Par ailleurs, la structure anarchique des polyèdres intracytoplasmiques rappelle celle observée lors des expériences faites avec ce même virus *in vitro*. (Figures 18.2 et 18.5). L'absence de la protéine p10 à la place de laquelle a été inséré le gène de la polyédrine cypovirale dont le produit d'expression est correctement agencé dans les cellules infectées, confirme la nature du VPN recombinant. Ces observations prouvent que la polyédrine cypovirale peut cristalliser avec la polyédrine des VPN. De plus, la cristallisation de la protéine recombinante n'interfère ni dans la cristallisation de la polyédrine

Figure 22: Détections de l'expression et la cristallisation de la polyédrine d'*Es VPC*, exprimée par le *BmVPN*-PNC dans le tissu adipeux.

Figure 22.1: Coupe histologique du tissu adipeux d'une larve infectée. (marquage à l'immunoperoxydase)

Barre = 40 μm ; A= Adipocytes; PC= Polyédrine cytoplasmique; PN= polyèdres nucléaires.

Figure 22.2: Vue au microscope électronique d'une cellule adipeuse infectée. Barre = 500 nm; C= Cytoplasme; M= Membrane nucléaire; N= Noyau; PC= polyèdre de VPC; PN= polyèdre de VPN; V= Virions de VPN; VL= Vacuole lipidique; Δ = Grain d'or.

Figure 22.3. Coupe histologique du tissu adipeux d'une larve infectée avec le *BmVPN* sauvage (marquage à l'immunoperoxydase). Notez l'absence de marquage.

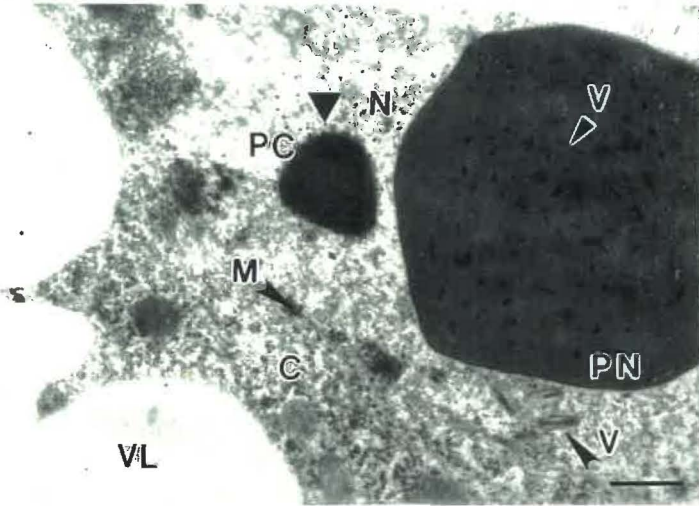
Barre = 40 μm ; A= Adipocytes; N= noyau; PN= Polyèdres nucléaires.

Figure 22.4: Vue au microscope électronique d'un polyèdre de VPC dans une cellule adipeuse infectée.

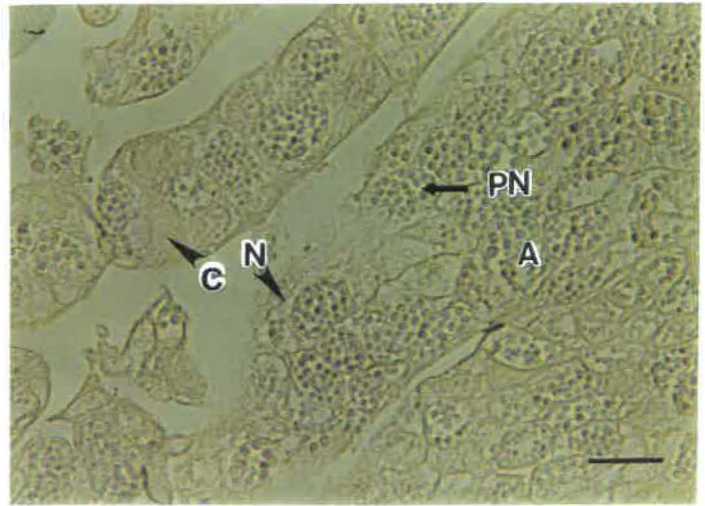
Barre = 450 nm; C= Cytoplasme; PC= Polyèdre de VPC; VL= Vacuole lipidique; \blacktriangle = Grain d'or



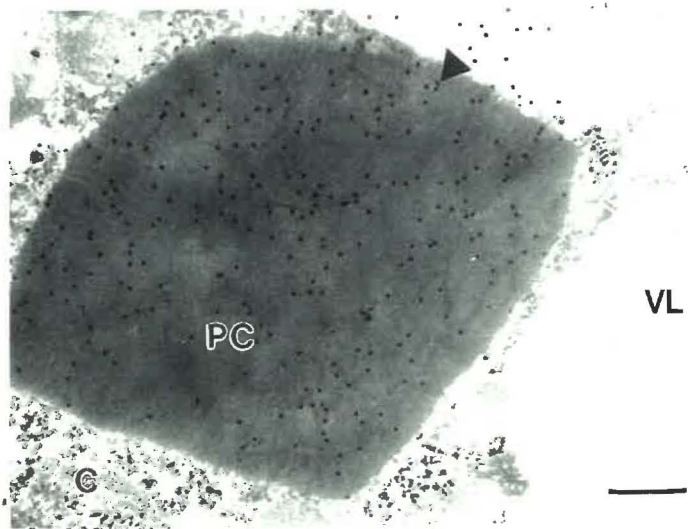
2



3



4



baculovirale ni dans les phénomènes d'inclusions des baculovirions dans leurs propres polyèdres.

Toutes ces expériences à la fois *in vitro* et *in vivo* ont la particularité de se confirmer mutuellement et de se compléter. Cela permet d'aboutir à un schéma très clair des possibilités existantes quant à la cristallisation et à la co-cristallisation de la polyédrine lors d'une infection baculovirale. Dans tous les tissus susceptibles à l'expression des gènes tardifs baculoviraux, l'expression simple de la polyédrine cypovirale par un VPN recombinant entraîne la formation de polyèdres de VPC dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules infectées. Cette cristallisation prend deux formes: Elle est régulière pour les polyèdres intranucléaires, ressemblant à la cristallisation lors d'infection sauvage due au VPC et elle est irrégulière pour les polyèdres cytoplasmiques. Dans tous les cas, l'inclusion dans les polyèdres de VPC de virions de VPN est inexistante.

Quant à la double expression des polyédrines cypovirale et baculovirale par le *BmVPN-PNC*, elle confirme les résultats obtenus avec le VPN exprimant que la polyédrine de VPC (*BmVPN-PC*). De plus nous avons prouvé que l'expression et la cristallisation de polyédrines de VPC et de VPN pouvaient se produire simultanément dans une même cellule, sans que la morphologie des polyèdres baculoviraux soit perturbée et sans que le(s) processus d'inclusion de virions soi(en)t entravé(s).

Figure 23: Expression et la cristallisation de la polyédrine d'*Es* VPC, par le *Bm*VPN-PNC dans les hémocytes.

Figure 23.1: Hémocytes de larves infectées par le *Bm*VPN-PNC.

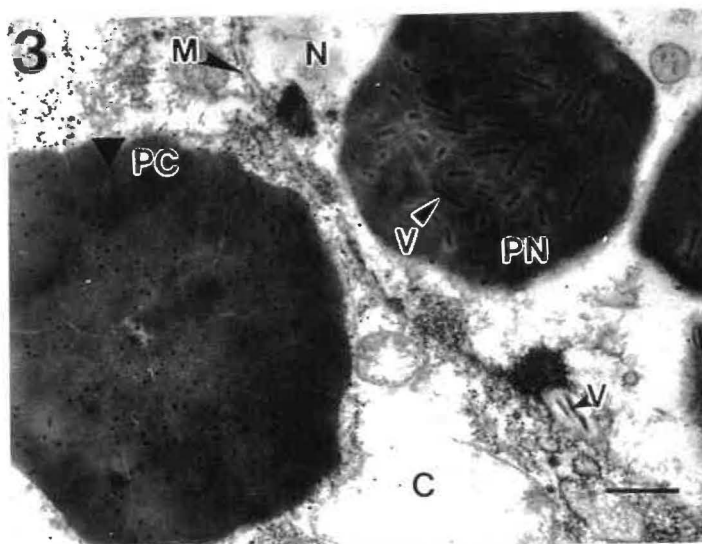
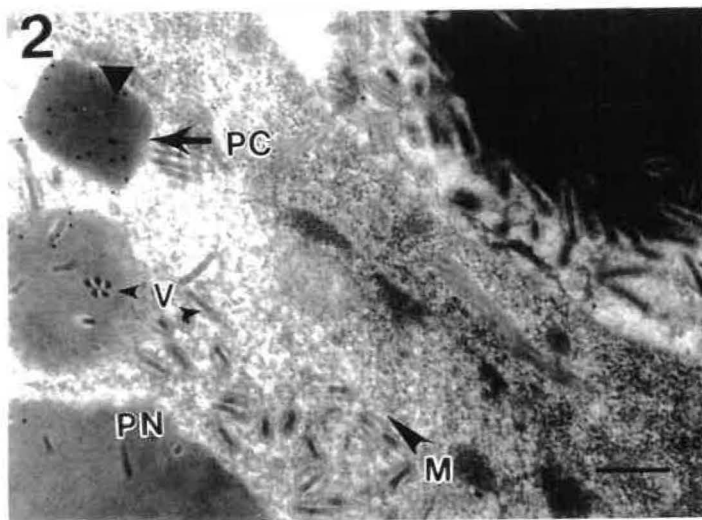
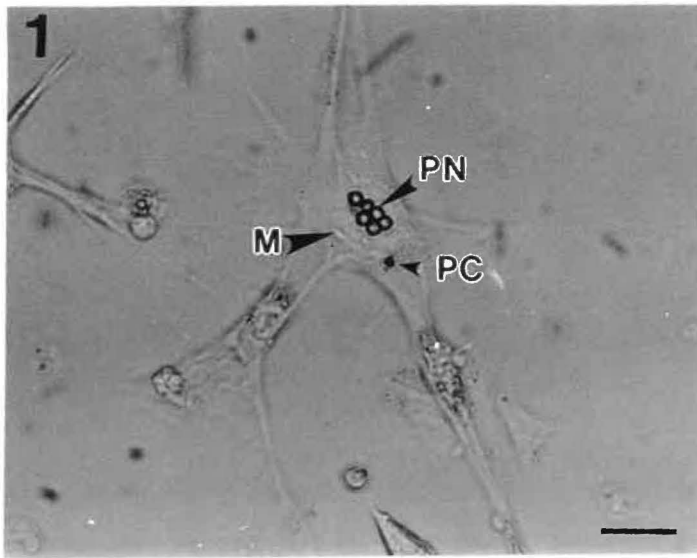
Barre= 25 μ m; M= Membrane Nucléaire, PC= Polyèdres Cytoplasmiques; PN= Polyèdres nucléaires

Figure 23.2: Hémocyte de larve infectée par le *Bm*VPN-PNC, vu au microscope électronique (marquage à l'or colloïdal).

Barre = 250 nm; M= membrane Nucléaire; PC= Polyèdre de VPC; PN= Polyèdre de VPN; V= Virions de VPN; ▲= Grain d'or.

Figure 23.3: Polyèdre de VPC dans le cytoplasme d'hémocyte de larve infectée par le *Bm*VPN-PNC, vu au microscope électronique.

Barre = 400 nm; C= Cytoplasme; M= Membrane nucléaire; N= Noyau; PC= Polyèdres de VPC; PN= Polyèdre de VPN; V= Virions de VPN; ▲= Grain d'or.



Discussion

Le choix des amorces lors de l'amplification par RT-PCR du gène de la polyédrine cypovirale, nous a permis d'insérer un site de restriction Sma I/ Xma I aux extrémités de l'ADNc produit. La nature isoschysométrique de ces deux endonucléases nous laissait un champ de clonage plus vaste. Les deux vecteurs baculoviraux PBNT1 et pBm4 utilisés dans notre projet de recherche, ont toujours été utilisés pour l'insertion de fragments d'ADN ayant des extrémités protrusives (Kobayashi *et al.*, 1990 et 1992, Tomita *et al.*, 1992) ou non franches. Sachant que leur site de clonage était constitué par Nru I (TCG / CGA), nous avons opté pour la synthèse d'un fragment d'insertion ayant des extrémités franches pour simplifier le clonage. Le problème résidait dans le fait que la distance entre le promoteur et le site d'initiation de la traduction influençait très fortement la transcription des ARNm (cf. sections 3.1.3 et 3.1.4). Nous ne voulions donc pas courir le risque de faire varier cette distance en changeant la stratégie de clonage, mais nous voulions aussi, éviter trop de manipulations inutiles surtout au niveau d'utilisations ultérieures de ces vecteurs. Afin de contourner cette difficulté, nous avons choisi de créer un site CCC GGG aux extrémités de notre ADNc, site reconnu par l'enzyme Sma I (5'-CCC/GGG-3') et par Xma I (5'-C/CC GGG-3'). Le clonage utilisant cette dernière ne différait pas des autres expériences faites avec ces vecteurs, c'est à dire la synthèse d'extrémités franches compatibles avec le site de clonage, par polymérisation via la polymérase T4 à ADN, des extrémités 3' récessives (Kobayashi *et al.*, 1992; Tomita *et al.*, 1992). Quant à Sma I, elle tronquerait de deux nucléotides la distance entre le promoteur et le codon ATG de l'ADNc permettant la synthèse directe d'extrémités franches. Les résultats obtenus par immunobuvardage de type Western, ont démontré qu'il n'y a pas de différence significative au niveau de l'expression de la polyédrine cypovirale quant aux recombinants VPN-PNC-Sma I et VPN-PNC-Xma I que nous avons réussis à isoler. En fait, l'intensité des bandes représentant la polyédrine cypovirale et baculovirale était la même dans les deux cas. Nous pouvons ainsi déduire que la délétion de deux nucléotides au niveau 5' juste en amont du codon départ (ATG) du gène

inséré, n'a pas interféré dans l'efficacité de la transcription de ce dernier. Il semble donc que selon les observations faites par Matsuura *et al.* (1987), Possee et Howard (1987), Rankin *et al.* (1988) ainsi que par Weyer et Possee (1989) au sujet de l'efficacité d'un promoteur tronqué, ne s'appliquent pas ici; la séquence altérée en amont de l'ADNc de la polyédrine cypovirale que nous avons insérée n'appartenant pas aux promoteurs.

La synthèse de l'ADNc par la technique de RT-PCR utilisant les amorces basées sur la séquence du gène de la polyédrine du VPC d'*E. scandens* publiée (Fossiez *et al.*, 1989), nous a permis d'amplifier un fragment d'ADN de 846 pb soit une paire de nucléotides de plus que la séquence prédite. Ce résultat est dû à l'insertion d'un nucléotide en position 777, entraînant un changement du cadre de lecture en C-terminal de la séquence du gène. Cette insertion se répercute sur la longueur et la séquence de la protéine codée. En effet, cette dernière de 269 a.a. possède 16 a.a. de moins que la polyédrine déjà publiée par Fossiez *et al.* (1989). Elle se rapproche d'avantage des polyédrines de *BmVPC* qui possèdent 248 a.a. (Nakazawa *et al.*, 1994; 1995). L'insertion à l'origine de ces résultats ne peut être attribuée à la polymérase Taq à ADN utilisée lors des amplifications, car l'anomalie a été identifiée au niveau de clones provenant de 5 amplifications différentes.

À la différence des résultats obtenus par Fossiez *et al.* (1989) où la protéine avec 16 a.a. de plus cristallisait uniquement dans le noyau, la présence de polyèdres dans les deux compartiments cellulaires suggère que cette séquence supplémentaire d'a.a. en C-terminale, joue un rôle important dans l'acheminement de la protéine vers le noyau avant l'initiation de la cristallisation. L'hypothèse que nous venons d'émettre est corroborée par la découverte de signaux à action similaire pour la polyédrine de *BmVPC* souche A (Mori *et al.*, 1989). La seule présence d'un signal RLLV en C-terminale de la polyédrine de la souche *BmVPC*-A, permet le transport de cette protéine dans le noyau des cellules où elle cristallise. L'absence d'un tel signal au niveau de la polyédrine de la souche *BmVPC*-H quasi homologue à la A, se traduit par l'accumulation de corps d'inclusion uniquement dans le cytoplasme. Par

contre, les études de Nakazawa *et al.* (1994; 1995) montrent que cette séquence signale n'est pas à elle seule à l'origine du transport des polyédrides cypovirales. En effet, une mutation en position 234, soit proche de la partie carboxy-terminale de la polyédride de la souche *BmVPC-C2*, favorise son internalisation dans le noyau malgré l'absence de séquence RLLV au niveau de la protéine sauvage. Il est donc difficile de dresser un mécanisme de transport définitif de la polyédride de VPC dans les différents compartiments cellulaires. On retiendra de ces résultats qu'il n'y a pas une unique séquence responsable de l'internalisation des polyédrides cypovirales dans le noyau. À la lumière de ces observations, l'identité du peptide de 16 a.a. identifié au niveau de la polyédride d'*Es* VPC reste à être déterminée. Dans notre cas, l'obtention de polyèdres à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme peut être la résultante de la présence de plusieurs de ces signaux dont un vient probablement d'être identifié. Des études plus poussées de mutagenèse dirigée pourraient éclairer ce phénomène encore mal compris.

Hors mis l'influence de peptides signaux responsables de la mobilité des polyédrides de VPC, nous pouvons aussi spéculer sur la présence de facteurs baculoviraux. Ces derniers peuvent régir le transport de toute protéine issue de la traduction du génome des VPN (recombinant ou non) vers le noyau cellulaire. Ainsi, il se peut que les protéines recombinantes exprimées par un VPN soient automatiquement acheminées vers le noyau de la cellule. Cette hypothèse explique les résultats de Fossiez (1990) où la polyédride d'*Es* VPC exprimée par un *BmVPN* recombinant, cristallise uniquement dans le noyau. Mais depuis, l'expression par un baculovirus recombinant de Type *AcVPN* de la polyédride du *BmVPC-H* cristallisant normalement que dans le cytoplasme, a permis d'observer une polyédride cypovirale recombinante présente à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme en proportion identique (Mori *et al.*, 1993; Nakazawa *et al.*, 1994; 1995). Nos propres observations sur l'expression de la polyédride du *Es* VPC par un baculovirus recombinant confirment les études précédentes. En effet, nous avons détecté dans les deux

compartiments cellulaires des polyèdres cypoviraux de structure cristalline régulière et antigéniquement similaire aux polyèdres issus d'une infection par un VPC. Il semble qu'exprimées dans le contexte d'une infection baculovirale, l'acheminement de la polyédrine cypovirale serait sous l'influence du vecteur d'expression. Ce dernier favoriserait le transport de la polyédrine vers le noyau et ce peu importe le système d'expression (*Ac* ou *BmVPN*), la lignée cellulaire d'insecte (*BmN4*, *Sf-9* ou *NISES BoMo-15-AIIc*) utilisée pour l'obtention de virus recombinants (Mori *et al.*, 1993; Nakazawa *et al.*, 1994; 1995 et ce mémoire) ou le type de polyèdre exprimé soit le type 1 (Mori *et al.*, 1993; Nakazawa *et al.*, 1994; 1995) ou le type 5 (ce mémoire).

Néanmoins, en regardant de plus proche les deux scénarios envisagés (signal peptidique ou pression du vecteur), un consensus peut être établi. En effet, il est logique d'envisager la présence d'un équilibre entre la nature protéique des polyédrines de VPC régissant leur localisation et leur cristallisation, et les facteurs baculoviraux exerçant une pression additionnelle sur le devenir des polyédrines recombinantes. Cet équilibre justifie dans le cas de Mori *et al.* (1993), de Nakazawa *et al.* (1994; 1995) et dans notre cas, la présence de polyèdres à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules infectées par les baculovirus recombinants qui les expriment. L'exception restera le rapport de Fossiez *et al.* (1990); résultats que nous attribuons à la séquence nucléotidique du gène de la polyédrine exprimé: La présence du peptide de 16 a.a. en C-terminal de la protéine exprimée ferait pencher l'équilibre en faveur de l'internalisation de la polyédrine recombinante dans le noyau de la cellule. Nous verrons plus loin que l'affinité naturelle de la polyédrine-C pour une région particulière de la cellule présentant une activité reliée à la réplication virale peut aussi être à l'origine de l'accumulation de polyédrine en un endroit plutôt qu'en un autre.

L'analyse des protéines provenant de cellules *BoMo-15-AIIc* infectées avec les *VPN* recombinants sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE), démontre bien l'efficacité de l'expression par un système baculoviral au niveau des deux sortes de recombinants obtenus.

nus. De plus, l'hyper-expression de la polyédrine baculovirale (polyédrine-N) conjointement avec la polyédrine de VPC (polyédrine-C) souligne l'indépendance de ces deux phénomènes. La virose de type VPN étant lytique, l'utilisation de promoteurs tardifs aurait pu paraître injustifiée. Néanmoins, malgré le dérèglement des fonctions cellulaires au profit du VPN, l'obtention de grandes quantités de polyédrine-C à la fois en simple et en double expression avec la polyédrine-N, confirme le choix des constructions effectuées. Parallèlement, à l'instar des protéines de type sauvage, la quantité de polyédrine-C exprimée est sensiblement la même que lors d'une infection cypovirale.

Nos résultats au niveau de la détection de polyédrines cypovirales cristallisées par marquage sélectif à l'or colloïdal, corroborent ceux de Nakazawa *et al.* (1994; 1995). En effet, ce groupe a confirmé la structure cristalline des polyédrines de certaines souches de *BmVPC* exprimées par un baculovirus recombinant de type *AcVPN*. Ainsi, l'absence de marquage à l'or colloïdal des corps d'inclusion d'apparence fibreux issus de la souche *BmVPC* C1 confirme la nature sélective de ce type de marquage. C'est d'ailleurs la raison nous avons opté pour cette technique afin d'identifier et de discriminer la polyédrine des polyèdres (Belloncik, 1989).

Les résultats de l'infection *in vivo* ont démontré pour la première fois que la polyédrine d'un VPC pouvait cristalliser ailleurs que dans les cellules épithéliales intestinales. La spécificité cellulaire de l'expression du gène de la polyédrine qui est observée *in vivo* lors de l'infection avec l'*Es VPC* (Belloncik, 1989) et qui se traduit comme pour les autres souches de VPC par la présence de polyèdres uniquement dans les cellules épithéliales intestinales (Kobayashi, 1971) a été rompue pour la première fois. Le marquage positif des adipocytes par la technique d'immunoperoxydase *in situ* (Figures 21.1 et 19.1) et des hémocytes et adipocytes par la technique d'or colloïdal (Figures 20.2; 21.4 et 22.3) suggère que la dissémination de l'expression de la protéine cypovirale recombinante responsable de la formation des corps d'inclusion est possible.

Dans notre cas, l'absence de polyédricité voire d'infection par le VPN dans l'épithélium intestinal peut provenir du fait que l'inoculum infectieux administré par injection contenait des virus bourgeonnants (VB) prélevés du milieu de culture (surnageant cellulaire) où l'amplification des VPN recombinants a été faite. Nous pouvons envisager le cas où les VB utilisés dans l'inoculum ne sont pas infectieux pour l'intestin. En effet, nous avons vu que la caractéristique des VB est la présence de la gp64 à la surface de l'enveloppe virale issue de la membrane cytoplasmique des cellules infectées (Blissard et Rohrmann, 1989). Cette glycoprotéine est reconnue comme étant impliquée au niveau de la pénétration des VB dans la cellule cible. Ainsi, il est suggéré que les nucléocapsides nues envahissent le cytoplasme cellulaire suite à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique. (Volkman et Goldsmith, 1985; Volkman, 1986). La gp64 étant responsable de la pénétration des virions dans la cellule (Volkman et Goldsmith, 1984, 1985), un système de reconnaissance spécifique entre la gp64 et une protéine trans-membranaire cellulaire est sans doute à l'origine du processus. Ainsi, un VB ne rencontrant pas ce système de reconnaissance (au niveau des cellules de l'épithélium intestinal) ne peut que s'adsorber à la surface de la cellule (Volkman et Goldsmith, 1984, 1985). Au niveau de l'infection de l'intestin par les virions issus des polyèdres (VI), un système n'impliquant pas la gp64 est sûrement en place (Derksen et Granados, 1988; Uchima *et al.*, 1988; Granados et Corsaro, 1990; Wood et Granados, 1991). Ainsi, en plus du fait que les VB sont sujets à l'inactivation par les conditions physico-chimiques de l'intestin (Volkman et Summers, 1977; Pritchett *et al.*, 1982), l'absence d'un système de reconnaissance adéquat (gp64/membrane cellulaire) pourrait expliquer l'absence d'infection de l'épithélium intestinal que nous avons observée. Étant donné que les VPN recombinants exprimant uniquement la polyédricité cypovirale, ne s'incluent pas dans les polyèdres, et sachant que les virions libres sont susceptibles à l'inactivation par les sucs intestinaux (Volkman et Summers, 1977; Pritchett *et al.*, 1982), nous étions contraints de procéder par injection des particules virales infectieuses. Dans le

but d'uniformiser nos expériences, nous avons procédé de la même manière quant aux autres infections (*Bm*VPN-PNC et VPC).

Flipsen *et al.*(1993) rapportent que la quantité de corps d'inclusion de VPN dans l'épithélium intestinal est dramatiquement réduite chez les larves ayant mué après l'infection. Nous ne pouvons attribuer nos résultats à ce phénomène physiologique car toutes les précautions furent prises pour éviter le chevauchement entre l'infection et la période de mue. En effet un signe caractéristique d'une larve en mue est le jeûne. Comme nous l'avons décrit dans la section "Matériel et Méthodes", les larves furent infectées tout de suite après l'arrêt du jeûne. De plus, les larves jugées suffisamment infectées furent sacrifiées alors qu'elles se nourrissaient encore, donc alors qu'elles étaient entre deux périodes de mue. Ainsi, nous pouvons écarter la possibilité que les tissus intestinaux étudiés provenaient de larves infectées mais ayant mué. Quant aux autres tissus, l'obtention de polyèdres de VPC dont la matrice cristalline est régulière (démontrée par les observations au microscope électronique) et dont l'antigénicité est conservée (selon les expériences de marquage à l'or colloïdal) confirme les observations de Fossiez (1990) soit, l'absence d'altérations du produit d'expression au niveau de son agencement final, malgré le caractère cytolytique de la virose baculovirale.

Nous avons pour la première fois démontré que la cristallisation de la polyédrine cypovirale exprimée par un baculovirus recombinant est possible dans des cellules ne présentant pas de signe d'infection cypovirale *in vivo*. Ainsi à l'exception du tissu intestinal où le marquage à l'or colloïdal s'est avéré négatif, les hémocytes et adipocytes comportent tous des polyèdres de VPC et donc, sont capables de supporter la cristallisation de la polyédrine *in vivo*. Les résultats au niveau de la nature des corps d'inclusion cypoviraux obtenus nous permettent d'envisager trois facteurs influençant la cristallisation de la polyédrine: La concentration en un point de la polyédrine exprimée, la quantité totale présente dans un compartiment cellulaire et l'osmolarité intracellulaire.

Certains indices montrent que la cristallisation de la polyédrine des VPC est étroitement liée à la concentration de celle-ci dans la cellule. L'expression du gène ne serait plus le facteur déterminant la présence de cristaux. Selon Gatenby (1992), l'assemblage des protéines en une structure définitive dite mature, nécessite entre autres des conditions où en un point donné, la concentration en protéine immature est très élevée. Il est donc fort possible qu'en certains points dans le cytoplasme, la quantité de protéine exprimée est insuffisante pour amorcer le phénomène de cristallisation. Nous pouvons extrapoler ce principe afin d'expliquer la présence de polyédrine anarchiquement cristallisée dans le cytoplasme de certaines cellules infectées avec les baculovirus recombinants. En effet, une concentration insuffisante mais dépassant le seuil critique pour amorcer la cristallisation serait éventuellement à la source de nos observations. Lavallée *et al.* (1993) ont montré aussi l'absence de cristallisation de la polyédrine-C exprimée chez des procaryotes. Par contre, il est intéressant de noter que la formation de cristaux ne peut avoir lieu que suite à la congélation des bactéries exprimant le gène de la polyédrine. Encore une fois, suivant les règles de la thermodynamique, la congélation d'une solution entraîne inévitablement la concentration en un point du soluté. Ce phénomène de concentration par congélation est peut-être à l'origine des observations faites par ce groupe. De ce fait, nous pouvons rajouter à l'hypothèse voulant que l'expression résulte en la cristallisation, la notion de quantité. Un certain seuil minimal critique d'expression amorce la cristallisation de la polyédrine cypovirale. Cette quantité selon Belloncik et Arella (1981), est aussi importante pour la cristallisation lorsqu'elle atteint un niveau extrême. En effet, due à l'irradiation de cellules infectées au VPC, une trop importante expression de la polyédrine a entraîné la cristallisation anormale de la protéine. À la lumière de ces observations nous pouvons dire qu'il existe une quantité optimale de polyédrine en dessous et au dessus de laquelle la cristallisation de la protéine de VPC est affectée.

Nous avons démontré que le transport de la polyédrine cypovirale peut être influencé

par des signaux peptidiques présents au sein même de cette dernière. D'autres facteurs semblent aussi jouer un rôle dans la concentration de la polyédrine de VPC en un point donné. L'exemple de la cristallisation de la ferritine est particulièrement intéressant pour expliquer la présence de polyèdres recombinants anormalement cristallisés dans le cytoplasme cellulaire. Selon Arosio *et al.* (1983), l'isoferritine provenant de la rate de cheval cristallise à partir d'un noyau d'ions sulfate de cadmium (CdSO_4^{2-}). La cristallisation a donc lieu à partir d'un foyer dense en sels. Il est intéressant de noter que dans l'infection cypovirale, les seuls foyers denses vus au microscope électronique sont les stroma virogéniques présents au niveau du cytoplasme des cellules infectées au VPC (Xeros, 1956, Sohi *et al.*, 1971). Selon Hukuhara (1985), la polyédrine diffuse vers ces stroma contenant des particules virales infectieuses en assemblage et y cristallise de façon concentrique. Une certaine affinité de la polyédrine pour ces foyers est mise en cause. Dans notre cas, la cristallisation régulière des polyèdres recombinants dans le noyau des cellules nous permet de faire un lien entre les stroma virogéniques présents dans le cytoplasme des cellules infectées avec un VPC et le noyau des cellules infectées avec un VPN où le virus se réplique et où les particules virales sont assemblées. Dans le cytoplasme, l'absence de tels foyers peut expliquer l'absence de régularité dans les polyèdres recombinants de VPC. En effet, la polyédrine ne trouvant pas de foyers pour initier sa concentration en un point et sa subséquente cristallisation, se trouve à former des structures cristallines irrégulières et lâches. Ainsi, pour la polyédrine de VPC, nous soupçonnons une interaction avec les régions de répllication et d'assemblage des virions infectieux. Cela permettrait à la fois l'attraction de la protéine non-cristallisée, la concentration et la cristallisation de cette dernière.

Le processus de cristallisation peut lui aussi être influencé par des facteurs environnementaux locaux à l'intérieur de la cellule. Ainsi, on peut envisager que tout comme la ferritine (Tripathi *et al.*, 1994) la teneur en sel ainsi que la nature des ions présents dans la cellule sont à l'origine de la forme des cristaux observés. Cette hypothèse a été déjà soulevée par

Hukuhara (1971) pour expliquer les différentes formes de polyèdres observés pour les *BmVPC*. Ainsi, sachant que l'infection au VPN entraîne d'importantes modifications au niveau du métabolisme cellulaire (Volkman et Knudson, 1986), il est logique de penser qu'il y a modification de l'osmolarité dans le cytoplasme des cellules infectées. Cette modification affecterait la cristallisation de la polyédrine retrouvée dans ce compartiment. La présence dans certaines cellules de polyèdres intracytoplasmiques dont nous qualifions la cristallisation d'anarchique, vient renforcer cette hypothèse.

Comme nous l'avons vu, certains polyèdres cytoplasmiques possèdent une matrice cristalline irrégulière et une forme anormale à la différence des polyèdres de VPC intranucléaires. Cette différence morphologique peut provenir du fait que dans l'éventualité où la quantité de polyédrine est identique dans les deux principaux compartiments cellulaires, un plus grand confinement de celle-ci dans le noyau contribue à l'accroissement de la concentration de la polyédrine-C. Ceci expliquerait la présence de cristaux à réseau cristallin régulier et homogène. Dans le cytoplasme, due à une plus grande dilution de celle-ci, la concentration en polyédrine peut atteindre le seuil minimal critique entraînant la formation de polyèdres anarchiquement cristallisés, manquant de cohésion et de régularité. Évidemment on ne peut soustraire les effets des signaux de transport sur la destinée de la protéine et donc directement, sur les concentrations dans les divers compartiments cellulaires. Par contre nous pouvons aussi attribuer la forme anarchique des polyèdres de VPC dans le cytoplasme à des changements osmotiques induits par la virose au VPN. Étant donné que l'assemblage final des protéines baculovirales a lieu dans le noyau, ce compartiment peut rester relativement in affecté par ces modifications et ainsi favoriser la formation de cristaux de VPC apparemment normaux. L'environnement dans lequel se retrouve la polyédrine non cristallisée est donc déterminant pour la forme des polyèdres.

Nous avons spéculé sur le rôle de l'environnement intracellulaire pouvant influencer la cristallisation de la polyédrine cytovirale. Indirectement cet environnement est lié au milieu

extracellulaire. Ainsi toute modification de ce dernier se répercutera à moindre échelle sur le milieu intracellulaire. Alors que des expériences telle que l'irradiation de type gamma des cellules (Belloncik et Arella, 1981) ont permis de noter la présence de cristallisation anormale de la polyédrine de VPC, les répercussions directes au niveau de la composition du hyaloplasme cellulaire en divers sels et composés organiques n'ont pas été étudiées. Pourtant à la lumière de nos observations, nous pouvons suggérer une altération du milieu intracellulaire due à l'irradiation entraînant les résultats décrits. Cette suggestion est corroborée par les expériences de Belloncik (1989) sur des hémocytes de *Galleria mellonella* infectés *in vivo*. Sachant que l'environnement dans lequel baignent les cellules *in vitro* est différent de l'hémolymphe, nous pouvons encore une fois spéculer sur l'altération du milieu intracellulaire ou des récepteurs viraux, lorsque les hémocytes sont cultivés *in vitro*. Ces altérations peuvent être à l'origine de la cristallisation de la polyédrine cypovirale dans les hémocytes infectés, en cultures primaires. Nos résultats suggèrent donc que se n'est pas tant la cellule qui empêche la cristallisation de la polyédrine cypovirale lors d'une infection de type VPC mais que l'environnement dans lequel cette dernière évolue est déterminant.

Le travail présenté ici suggère pour la première fois la possibilité d'interaction entre le vecteur d'expression baculoviral et la protéine exprimé. En effet, les polyèdres du VPC d'*E. scandens* sont les seuls corps d'inclusion cristallins ayant été artificiellement disséminés à travers plusieurs tissus larvaires par des VPN recombinants. La transition de la polyédrine en polyèdres peut être attribuée à des facteurs baculoviraux. En effet, ces derniers pourraient favoriser la cristallisation de protéines ayant la capacité de cristalliser, comme par exemple la polyédrine cypovirale. Néanmoins, cette hypothèse devra être confirmée par la répétition de telles expériences avec d'autres protéines capables de cristalliser. À ce jour, aucun rapport n'a été fait suggérant l'existence d'interaction entre le VPN recombinant et la (ou les) protéine étrangère qu'il exprime. Afin de confirmer la présence de tels facteurs, il serait judicieux d'exprimer le gène de la polyédrine cypovirale sous le contrôle de promoteur(s) de

gènes baculoviraux précoces. Ceci permettrait la diminution des effets provenant de facteurs viraux croissant au fur et à mesure que l'infection progresse. On s'assurerait ainsi d'un minimum d'interventions de la part du vecteur viral tout en maintenant la dissémination de la protéines à travers plusieurs tissus larvaires.

L'inclusion de particules baculovirales infectieuses dans les polyèdres de VPC recombinants est inexistante que ce soit lors de l'expression simple de la polyédrine cypovirale ou lors d'une double expression avec la polyédrine de VPN. Ces observations corroborent ceux de Fossiez (1990) et de Nakazawa *et al.* (1994; 1995) À ce niveau, les observations faites par Inoue (1981) voulant que les virions baculoviraux s'incluent dans des polyèdres de *BmVPC-A* cristallisant dans le noyau, restent isolées. Nos résultats soulèvent deux points. Le premier est que la polyédrine cypovirale ainsi exprimée (recombinante) ne reconnaît pas les virions baculoviraux; tout comme la polyédrine de type sauvage. Deuxièmement, la théorie de spécificité d'inclusion des virions dans leur propre polyédrine tient toujours. Néanmoins, il reste la composante "réplication des VPC" qui est intentionnellement absente de notre étude et qui pourrait expliquer les résultats rapportés par Inoue (1981). Ainsi, il est possible que certains facteurs dérivant de la réplication du VPC interfèrent dans le cycle de réplication des VPN et plus particulièrement au niveau de la cristallisation de la polyédrine baculovirale, lors de double infection d'une même cellule avec un VPC et un VPN.

En bref, nous pouvons affirmer que la cristallisation de la polyédrine de VPC est la résultante d'une multitude de facteurs tels que les signaux peptidiques l' affinité pour une région d'activité particulière ou l'osmolarité du milieu intracellulaire. Nous avons vu qu'il est possible que le recrutement de la polyédrine cypovirale recombinante vers le noyau est à l'origine des polyèdres à structure cristalline régulière. Nous avons aussi suggérer que la présence de polyédrine non cristallisée et de polyèdres anarchiquement cristallisés dans le cytoplasme est la résultante d'une faible concentration de polyédrine dans ce compartiment cellulaires. Afin de confirmer ces hypothèses, il sera important d'isoler la fraction cyto-

plasmique de la fraction nucléaire de cellules suite à une infection par l'un des deux VPN re-combinants obtenus, afin de quantifier la concentration de protéine dans ces deux compartiments.

Afin de pousser l'étude des VPC et de leur cycle infectieux, des études portant sur l'isolement d'ARN viraux à partir de tissus de larves infectées par un VPC permettront de démontrer si le virus se réplique ailleurs que dans l'intestin. Deux scénarios sont possibles. Soit qu'il n'y a pas répllication des VPC ailleurs que dans l'intestin, soit qu'il y a répllication et expression sélective de certains gènes selon l'environnement dans lequel se trouve le virus et/ou le tissu infecté. Ainsi, dans les cellules épithéliales intestinales les virions exprimeraient le gène tardif de la polyédrine. Cela favoriserait la transmission horizontale de la virose par la libération de virions inclus dans des polyèdres et donc protégés de l'environnement. Dans les autres tissus, la production des polyèdres ne serait pas justifiée vue que ces derniers n'atteindraient l'environnement que très tard étant donnée la nature chronique de l'infection. De ce fait on referait les mêmes observations faites aujourd'hui soient des polyèdres dans l'intestin et du virus libre ailleurs dans la larve.

Toutes les expériences faites *in vivo* et *in vitro* montrent que les deux polyédrines peuvent cristalliser en même temps dans les tissus susceptibles à une répllication complète du VPN. À la différence des observations faites par Quiot *et al.* (1980), la cristallisation de la polyédrine de VPC n'interfère aucunement dans l'inclusion des virions baculoviraux dans leur propre polyèdre (Figure 23.2 et 23.3). Nous pouvons dire que la double cristallisation des polyédrines cypovirales et baculovirales se fait sans interférence de la part des deux protéines lorsqu'elle ne fait pas intervenir la répllication des cypovirus. Notre conclusion voulant que l'expression et la cristallisation de la polyédrine de VPC en même temps que la répllication complète d'un VPN dans une même cellule ne vient pas démentir celle de Quiot *et al.* (1980) mais ne fait que limiter le nombre d'éventuels agents causals, responsables de l'inhibition de l'inclusion des virions baculoviraux dans leurs cristaux. En effet, nos résultats

indiquent que l'infection avec le virus exprimant les deux polyédrides ne fait que reproduire les effets cytopathologiques de l'infection sauvage avec un VPN avec la présence additionnelle de polyèdres de VPC. Nous pouvons ainsi supposer que le processus de réplication des VPC peut être à l'origine de l'inhibition de l'inclusion des virions de VPN observée par Quiot *et al.* (1980). De plus selon ce groupe, ce phénomène aurait lieu non seulement au sein d'une même cellule, mais aussi à distance, à partir d'autres cellules infectées par le VPC. Les auteurs avaient ainsi conclu en la production de facteurs inhibiteurs diffusibles, rappelant l'action des interférons. La réponse cellulaire à une infection de type VPC est donc une autre voie à explorer pour expliquer les interférences que Quiot *et al.* (1980) ont notées. Les études présentement en cours dans notre laboratoire explore la possibilité d'infecter simultanément des cellules avec un VPC et un VPN. Ces expériences devraient permettre de reproduire les conditions de double expression des polyédrides en y rajoutant la réplication des deux virus.

Finalement, à l'instar de la double infection avec certains cypovirus (*Es VPC* et *Heliothis armigera VPC*) (Belloncik, 1989), nos résultats mènent à croire que deux polyédrides différentes peuvent coexister dans une même cellule sans que l'on observe d'interférence. Nous avons noté que les polyèdres de VPC exprimés par le VPN contenant les deux gènes actifs de polyédrides, étaient de grosseur inférieure à ceux exprimés par le VPN n'exprimant que la polyédride cypovirale. Malgré un niveau d'expression du gène identique à celui obtenu lors de l'expression simple comme le démontre l'analyse par immunobuvardage de type Western et bien que nous n'observons pas une augmentation du nombre de polyèdres cytoplasmiques qui suggère une redistribution de la polyédride, la petitesse des corps d'inclusion cypoviraux dans le noyau ne peut être expliquée que par la présence des polyèdres de VPN. Ces derniers peuvent empêcher de façon stérique le plein développement des cristaux recombinants. L'hypothèse voulant que les polyèdres baculoviraux soient à l'origine du phénomène, est confirmée par la présence de corps d'inclusion cytoplasmiques

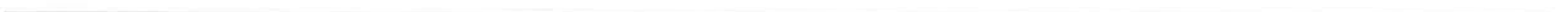
de taille normale, lors d'infection avec le VPN exprimant les deux types de polyédries. Cette interférence ne peut survenir dans des conditions normales de co-infection. En effet, les polyèdres de VPC ne cristallisent que dans le cytoplasme des cellules où il n'y a jamais de cristaux de VPN (sauf pour quelques souches de VPC cristallisant dans le noyau). Nous ne pouvons tenir compte de tels résultats dans l'analyse des phénomènes de co-cristallisation des deux polyédries. Un point particulier vient à l'esprit lorsque nous parlons de double cristallisation de polyédries C et N: La susceptibilité d'une cellule à deux viroses responsables de la formation des deux types de corps d'inclusion. Le fait que l'on a jamais observé la présence de deux types de polyèdres dans une même cellule lors de double infection d'une larve par un VPC et un VPN peut provenir du fait que la population de VPC infectant les hémocytes et les adipocytes n'exprime pas la polyédrie. Nous avons prouvé que l'expression simple ou double des polyédries pouvait avoir lieu en dehors des cellules intestinales. Notre étude ayant portée sur l'aspect expression des gènes cypoviraux à travers la larve en prenant pour exemple celui de la polyédrie, elle reste à être complétée par l'étude de la réplication des VPC ailleurs que dans les cellules épithéliales intestinales.

Bien que notre projet de maîtrise n'a pas porté sur l'élaboration d'un VPN ayant un potentiel bio-insecticide accru, nous avons démontré que la dissémination d'une protéine normalement confinée à un tissu, était possible à travers toutes les cellules susceptibles à une infection au VPN à condition que suffisamment de temps soit donné pour que le virus puisse atteindre tous les tissus cibles. Les répercussions de cette dissémination au niveau physiopathologiques sur les larves se situent à deux niveaux. Le premier consiste en la généralisation de cristaux protéiques (polyèdres) à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules. L'étude des répercussions au niveau physiologique de l'engorgement des tissus avec des polyèdres à la fois cypoviraux et baculoviraux pourrait défricher le terrain pour l'obtention future de baculovirus exprimant une protéine non pas chimiquement toxique mais de nature physique "encombrante". À un second niveau, l'insertion d'un gène codant pour une pro-

téine toxique, permettrait l'expression de cette dernière à travers la majorité des tissus larvaires via un VPN recombinant, augmentant ainsi le pouvoir insecticide des VPN.

Puisque l'utilisation de virus dans le cadre de lutte biologique nécessite la connaissance de toutes les répercussions environnementales possibles, les applications ci-haut mentionnées méritent d'être sérieusement étudiées afin d'en connaître toutes les répercussions et implications, avant de se lancer dans l'application sur le terrain de ce type d'agent bio-insecticide.

Conclusion



Nos avons pour la première fois démontré que la polyédrine d'un VPC peut cristalliser dans les cellules adipeuses et dans les hémocytes des larves infectées. Ceci a été accompli avec deux VPN recombinants différents, exprimant l'ADNc du gène de la polyédrine du VPC d'*E. scandens*. Ces résultats nous permettent d'affirmer que l'expression de la polyédrine cypovirale dans ces cellules, entraîne sa cristallisation.

Nos travaux montrent que l'expression normale du gène de la polyédrine entraîne la cristallisation de son produit. Ainsi, ils laissent présumer que la cristallisation de la polyédrine dans des cellules ne montrant pas de signes d'infection au VPC *in vivo*, signifie que l'expression du gène lors de l'infection cypovirale n'a pas lieu ou est très limitée dans ces cellules. Deux possibilités sont ainsi induites quant à la susceptibilité de ces cellules aux VPC *in vivo*. La première est qu'elles sont incapables de supporter la répllication complète de ces virus dans l'environnement naturel dans lequel elles baignent, due à différents facteurs déjà élaborés. La seconde, est que d'après les scénarios rapportés par la littérature, le VPC se réplique dans ces cellules avec une expression du gène de la polyédrine quasi, sinon complètement absente. Afin de compléter l'étude, la détection quantitative d'ARN viral en fonction du temps ainsi que la détection de particules virales infectieuses dans ces cellules, sont présentement en cours.

Nos travaux portant sur l'expression simultanée de polyédrines cypovirale et baculovirale dans une même cellule, ont démontré que ces deux phénomènes n'interfèrent pas entre eux. Ainsi la cristallisation des deux polyédrines se fait indépendamment l'une de l'autre. Ces résultats permettent d'éclaircir les travaux de Quiot *et al.* (1980). En effet, l'expression et la cristallisation de la polyédrine cypovirale, lors d'une double infection VPC/VPN d'une même cellule, ne sont pas à l'origine des interférences noté par ce dernier groupe. Ainsi, la polyédrine cypovirale n'est pas impliquée dans l'empêchement du passage de nucléocapsides à des virions enveloppés et de l'inclusion des particules baculovirales dans leurs propres po-

lyèdres. Les résultats de ce groupe seraient ainsi dues à la répllication conjointe du VPC et du VPN, dans une même cellule.

Quant aux observations d'Inoue (1981), il se pourrait fort bien que la répllication d'une souche de VPC exprimant ses polyèdres dans le noyau de la cellule soit elle aussi à l'origine de l'inclusion des virions baculoviraux dans les polyèdres cypoviraux. En effet, selon notre étude portant sur deux types de VPN recombinant, l'unique expression et cristallisation de la polyédrine de VPC ne sont pas suffisants pour reproduire ce phénomène.

Dans un autre cadre, notre projet a montré que la dissémination de l'expression d'une protéine d'intérêt dans les tissus larvaires susceptibles au VPN, par l'intermédiaire d'un baculovirus recombinant, est possible. La généralisation de l'expression *in vivo* de la polyédrine cypovirale montre que d'autres protéines d'intérêt dont l'expression est limitée à un seul tissu, peuvent subir le même sort. Ainsi, les études portant sur les possibilités d'augmenter le potentiel bio-insecticide des VPN pourrons alors cibler toute une gamme de protéines à caractère insecticide, afin de les répandre dans tout l'organisme de la larve.

Remerciements.

Je veux souligner ici l'aide financière mise à ma disposition par le Dr. Belloncik lors de ma première année de maîtrise, au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier M^{me} Monique Couillard, pour son assistance technique, ainsi que pour l'amitié dont elle a fait preuve à mon égard.

Je désire exprimer ma reconnaissance à M^{me} J. Roger du service de Séquençage de l'I.A.F., et à M. Robert Alain du service de la microscopie électronique, pour leur disponibilité et leur support technique.

Je prends cette occasion pour remercier l'organisme FCAR pour son support financier.

Finalement, je voudrais remercier le Centre de Recherche en Virologie et l'Institut Armand-Frappier.

Bibliographie

- ADAMS, J.R., R.H. GOODWIN et T.A. WILCOX. 1977. Electron microscopic investigations of invasion and replication of insect baculovirus *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Cell*, 28: 261-268.
- ANTHONY, D.W., E.I. HAZARD et S.W. COSBY. 1973. A virus disease in *Anopheles quadrimaculatus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 22: 1-5.
- ARELLA, M. 1983. Réplication en culture cellulaire du virus de la polyédrose cytoplasmique (VPC) d'*Euxoa scandens*, Riley (Noctuidae: Agrotinae). Thèse de Doctorat, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 227 P.
- ARELLA M., S. BELLONCIK et G. DEVAUCHELLE. 1984. Protein synthesis in a *Lymantria* cell line infected by cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Virol.*, 52: 10-24.
- ARELLA M., G. DEVAUCHELLE et S. BELLONCIK. 1983. Dual infection of a lepidopteran cell line with the cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) and the chilo iridescent virus (CIV). *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 134: 455-463.
- ARELLA M., C. LAVALLÉE, S. BELLONCIK et Y. FURUISHI. 1988. Molecular cloning and characterization of cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin and a viable mutant gene. *J. Virol.*, 62: 211-17.
- ARIF, B.M. et W. DOERFLER. 1984. Identification and localization of reiterated sequences in the *Choristoneura fumiferana* MNPV genome. *EMBO J.*, 3: 525-529.
- ARNOTT, H.J., K.M. SMITH et S.L. FULLILOVE. 1968. Ultrastructure of a cytoplasmic polyhedrosis virus affecting the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. I. Development of virus and normal polyhedra in the larva. *J. Ultrastruct. Res.*, 24: 479-507.
-

AROSIO, P., G. GATTI et M. BOLOGNESI. 1983. Selective crystallization of horse isoferritins. *Biochim. Biophys. Acta*, 744: 230-232.

ARUGA, H. 1971. Cytoplasmic polyhedrosis of the silkworm historical, economical and epizootiological aspects. Dans: *The cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm*. Aruga H. & Y. Tanada, (eds). University of Tokyo press, p. 3-21.

ARUGA, H., T. HUKUHARA, N. YOSHITAKE et A. ISRANGKUL. 1961. Interference and latent infection in cytoplasmic polyhedrosis of the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus). *J. Insect Pathol.*, 3: 81-92.

ARUGA, H et E. NAGASHIMA. 1962. Generation to generation transmission of the cytoplasmic polyhedrosis virus of *Bombyx mori* Linnaeus. *J. Insect Pathol.*, 4: 313-320.

ARUGA, H., N. YOSHITAKE, T. HUKUHARA et M. OWADA. 1963. Invasion route of the cytoplasmic polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. (Jpn)*, 32: 58-62.

BELL, M.R. 1977. Pink bollworm: Effect of infection by a cytoplasmic polyhedrosis virus in diapausing larvae. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 70: 675-677.

BELL, M.R. et L.R.F. KANAVEL. 1976. Effect of dose of cytoplasmic polyhedrosis virus on infection, mortality and development site and larval & pupal weights of the pink bollworm. *J. Invertebr. Pathol.*, 28: 121-126.

BELLEMARE, N. et S. BELLONCIK. 1981. Études au laboratoire des effets d'une polyédrose cytoplasmique sur le ver gris blanc *Euxoa scandens* (Lépidoptère: Noctuidae Agrotinae). *Ann. Soc. Entomol., Qué*, 26: 28-34.

BELLONCIK, S. 1989. Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses-Reoviridae. *Adv. Virus Res.*, 37: 173-208.

BELLONCIK, S. 1994. Interaction of cytoplasmic polyhedrosis virus with insects. *Adv. Insect Physiol.* (sous presse).

BELLONCIK, S. et W. AKOURY. 1993. Evaluation of a chemical semi-defined serum-free medium for the production in Sf-9 cell line of nuclear and cytoplasmic polyhedrosis viruses. Congress on Cell and Tissue Culture. San Diego, California, U.S.A. 5-9 Juin.

BELLONCIK, S. et M. ARELLA. 1981. Production of cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) polyhedra in a gamma irradiated *Lymantria dispar* cell line. *Arch. Virol.*, 68: 303-308.

BELLONCIK, S. et D.J.S. ARORA. 1979. Effect of cordycepine (3'-deoxyadénosine) on the formation of polyhedra of cytoplasmic polyhedrosis virus. *Proc. Congr. Am. Soc. Microbiol.*, Honolulu, Abstract S(H)92.

BELLONCIK, S., L. BERTHIAUME, J.-P. DESCOTEAUX et M. ARELLA. 1987. Biosafety studies for natural viral insecticide. *Proc. Int. Princess 1st Congr. Use Nat. Prod.*, Thailand, Bangkok, 9-14 Déc.

BELLONCIK, S. et A. CHAGNON. 1980. Titration of a cytoplasmic polyhedrosis virus by a tissue microculture assay: some applications. *Intervirology*, 13: 28-32.

BELLONCIK, S., G. CHARPENTIER, M. ARELLA, H. STRYKOWSKY et S. GARZON. 1986. Ultrastructure localization of cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) polyhedrin by immunogold method. *J. Electron. Microsc. (Jpn)*, 35: 2331-2332.

- BELLONCIK, S., F. KENDIRGI, R. ATHANASSIOUS, L. TAO, C.J. CHEN, Z.X. WANG et J.W. CHEN. 1991. Susceptibility of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (clemens) to two different cytoplasmic polyhedrosis viruses. Meeting of the Canadian, Ontarian and Quebec societies of Entomology. Montréal, Canada, 21-23 Octobre.
- BELLONCIK S., F. KENDIRGI, R. ATHANASSIOUS L. TAO, C.J. CHEN, Z.X. WANG et J.W. CHEN. 1992. Adaptation of cytoplasmic polyhedrosis viruses (CPV) to the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clemens). XIX International Congress of Entomology. Beijing, Chine, 28 Juin - 4 Juillet.
- BELLONCIK, S., J. LIU, D. SU et M. ARELLA. 1995. Identification and characterization of a new 14th Cytoplasmic Polyhedrosis Virus type from chinese infected *Heliothis armigera*.. J. Invertebr. Pathol. (sous presse).
- BELLONCIK, S., J.M. QIUOT, M. ARELLA et J. LECOMTE. 1985. Établissement d'une nouvelle lignée cellulaire (IAF Es1) à partir d'ovarioles d'*Euxoa scandens* (Lepidoptera:Noctuidae). Entomophaga, 30: 51-54.
- BELLONCIK, S., L. ST-AMAND et E.W. RUD. 1982. Efficacy of simultaneous and sequential treatment of cytoplasmic polyhedrosis virus, nuclear polyhedrosis virus and permethrin on *Euxoa scandens* (Lepidoptera, Noctuidae) larva. Proc. IIIrd Int. Colloq. Soc. Invertebr. Pathol., Brighton Angleterre, Sept.7- 13.
- BERGOLD, G.H. 1947. Die Isolierung des Polyedre. Virus und die Natur der Polyeder. Naturforsch, 26: 122-143.
- BIRD, F.T. 1969. Infection and mortality of spruce budworm *Choristoneura fumiferana*, and forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* caused by nuclear and cytoplasmic polyhedrosis viruses. Can. Entomol., 101: 1269-1281.
-

- BIRD, R.G., C.C. DRAPER et D.S. ELLIS. 1972. A cytoplasmic polyhedrosis virus in midgut cells of *Anopheles stephensi* and the sporogonic stages of *Plasmodium berghei yoelii*. Bull. Wld. Hlth. Org., 46: 337-343.
- BISHOP, D.H.L. 1992. Baculovirus expression vectors. Dans: Animal virus expression vectors, Seminar in Virology. C. M. Rice (ed.), Saunders Scientific Publication, Academic Press, 3: 253-264.
- BISHOP, D.H.L.; D. GOULSON; B.M. GREEN; R.S.HAILS; T. WILLIAMS et J.S. CORY. 1995. Fields trials of genetically engineered baculovirus insecticides. Baculovirus and insect cell gene expression conference. Pinehurst, N.C., USA. 26-30 mars.
- BLISSARD, G.W. 1995. Early transcriptional regulation of the baculovirus *gp64 efp* gene: Promoter structure and interactions. Baculovirus and insect cell gene expression conference. Pinehurst, N.C., USA. 26-30 mars.
- BLISSARD, G.W. et G.F. ROHRMANN. 1989. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the *gp64* envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. Virology, 170: 537-555.
- BLISSARD, G.W. et G.F. ROHRMANN. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Annu. Rev. Entomol., 35: 127-155.
- BOTH, G.W., Y. FURUICHI, S. MUTHUKRIHMAN et A.J. SHATKIN. 1975. Ribosome binding to reovirus mRNAs in protein synthesis requires 5' terminal 7-methylguanosine. Cell, 6: 185-195.
- BOUCIAS, D.G. et G.L. NORDIN. 1978. A scanning electron microscope study of *Hyphantria cunea* CPV-infected midgut tissue. J. Invertebr. Pathol., 32: 229-233
-

- BULLOCK, H.R., E. MARTINEZ et C.W. STUERMER Jr.. 1970. Cytoplasmic polyhedrosis virus and the development and fecundity of the pink bollworm. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 109-112
- CARBONNELL, L.F., M.J. KLOWDEN et L.K. MILLER. 1985. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipterian and mammalian cells. *J. Virol.*, 56: 153-160.
- CHAABIHI, H., M.H. OGLIASTRO, M. MARTIN, C. GIRAUD, G. DEVAUCHELLE et M. CERUTTI. 1993. Competition Between baculovirus Polyhedrin and p10 Gene Expression during Infection of Insect Cells. *J. Virol.*, 67: 2664-2671.
- CHARLTON, C.A. et L.E.VOLKMAN. 1993. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsides into IBPL Sf21 cells induces actin cable formation. *Virology*, 197: 245-254.
- CROIZIER, G., P. GONNET et G. DEVAUCHELLE. 1987. Localisation cytoologique de la protéine non structurale p10 du baculovirus de la polyédrose nucléaire du Lépidoptère *Galleria mellonella* L. *C. R. Acad. Sci.*, 305: 677-681.
- DAI, R., A. WU, X. SHEN, L. QIAN et Y. SUN. 1982. Isolation of genome-enzyme complex from cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm *Bombyx mori*. *Scientia Sinica*, 25: 29-35.
- DERKSEN, A.C.G. et R.R. GRANADOS. 1988. Alteration of lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*, 167: 242-250.
- FEDERICI, B.A. et E.I. HAZARD. 1975. Iridovirus and cytoplasmic polyhedrosis virus in fresh water daphnid, *Simocephalus expinosus*. *Nature*, 254: 327-328
-

- FEDERICI, B.A., E.I. HAZARD et D.W. ANTHONY. 1973 . A new cytoplasmic polyhedrosis virus from chironimids collected in Florida. *J. Invertebr. Pathol.*, 22: 136-138.
- FLIPSEN J.T.M., W.M.J. VAN LENT, R.W. GOLDBACH et J.M. VLAK. 1993. Expression of polyhedrin and p10 in the midgut of AcMNPV-infected *Spodoptera exigua* larvae: An immunoelectron microscopic investigation. *J. Invertebr. Pathol.*, 61: 17-23.
- FOSSIEZ, F. 1990. Séquençage et expression du gène de la polyédriine du virus de la polyédrose cytoplasmique d'*Euxoa scandens*. Thèse de Doctorat, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Canada pp. 203.
- 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. Persistence of occluded viruses in the nest of the paper wasp polistes hebraeus (Hym, Vespidae). *Entomophaga*, 39: 137-147.
- FRANCKI, R.I.B., C.M. FAUQUET, D.L. KNUDSON et F. BROWN (eds.). Classification and nomenclature of viruses. 1991. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses (ICTV). Virology division of the international union of microbiological societies Dans: *Archives of Virology, Supp. 2.*, Springer-Verlag Wein New York., p. 193-194.
- FRENCH, J. et P. ROY. 1990. Synthesis of bleuetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing two major core proteins of BTV. *J. Virol.*, 64: 1530-1536.
-

- FURUICHI, Y. 1974. "Methylation-coupled" transcription by virus associated transcriptase of cytoplasmic polyhedrosis virus containing double stranded RNA. *Nucleic Acid Res.*, 1: 809-822.
- FURUICHI, Y. 1978. "Pretranscriptional capping" in the biosynthesis of cytoplasmic polyhedrosis virus mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1086-1090.
- FURUICHI, Y. 1981. Allosteric stimulatory effect of s-adenosylmethionine 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. et K. MIURA. 1975. A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature*, 253: 374-375.
- GATENBY, A.A. 1992. Protein folding and chaperonins. *Plant Mol. Biol.*, 19: 667-687.
- GHEYSEN, D., F. JACOBS, F. DE FORESTA, C. THIRIART, M. FRANCOLTE, D. THINES et M. DE WILDE. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr 55 gag virus particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*, 59: 103-112.
- GRACE, T.C.D. 1962. The development of a cytoplasmic polyhedrosis in insect cells growing *in vitro*. *Virology*, 18: 33-42.
- GRANADOS, R.R. 1978. Biology of cytoplasmic polyhedrosis viruses and entomopoxviruses. Dans: *Viral pesticides: Present knowledge and potential effects on public and environmental health*. M.D. Summers et C.Y. Kawanishi, (eds.). Environmental Protection Agency report No 600/9-78-026, p. 89-101.
-

GRANADOS, R.R. et B.G. CORSARO. 1990. baculovirus enhancing proteins and their implication for insect control. 5th Proc. Int. Coll. Invertebr. Pathol., Adelaide, Australie, pp. 174-178.

GRANADOS, R.R. et Y. HASHIMOTO. 1989. Infectivity of baculoviruses to cultured cells. Dans: Invertebrate cell system applications. J. Mitsuhashi, (ed.), Boca Raton, FL: CRC Press, 2: 3-13.

GRANADOS, R.R. et K.A. LAWLER. 1981. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology*, 108: 297-308.

GRANADOS, R.R., W.J. McCARTHY et M. NAUGHTON. 1974. Replication of a cytoplasmic polyhedrosis virus in an established cell line of *Trichoplusia ni* cells. *Virology*, 59: 584-586.

GRANADOS, R.R. et K.A. WILLIAMS. 1986. *In vivo* infection and replication of baculovirus. Dans: Biology of baculovirus. R.R. Granados et B. A. Federici, (eds.), Boca Raton, FL: CRC Press, Vol 1: 89-108.

GRANCHER-BARRAY, S., J. BOISVERT et S. BELLONCIK. 1981. Electrophoretic Characterization of Proteins and RNA of Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (CPV) from *Euxoa scandens*. *Arch. Virol.*, 70: 55-61.

HAMBLIN, M., N.A.M. VAN BEEK, P.R. HUGHES et H.A. WOOD. 1990. Co-occlusion and persistence of a baculovirus mutant lacking the polyhedrin gene. *Appl. and Env. Microbiol.*, 56: 3057-3062.

- HAMMOCK, B.D., B.C. BONNING, R.D. POSSEE, T.N. HANZLIK et S. MAEDA. 1990. Expression and effects of the juvenil hormone esterase in baculovirus vector. *Nature*, 344: 458-60.
- HARPAZ, I., E. ZOLTKIN, et Y. BEN SHAKED. 1965. On the pathology of cytoplasmic and nuclear polyhedrosis of the cyprus processionary caterpillar. *J. Invertebr. Pathol.*, 7: 15-21
- HAYASHI, Y. 1970. Occluded and free virions in midgut cells of *Malacosoma disstria* infected with cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV). *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 442-450.
- HILLS, G.J. et K.M. SMITH. 1959. Further studies on the isolation and cristallization of insect cytoplasmic viruses. *J. Insect Pathol.*, 1: 121-128.
- HOLMES, H.I. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses (ICTV). Virology division of the international union of microbiological societies. Dans: *Achives of Virology, Supp. 2*, Springer-Verlag Wein New York. Francki, R.I.B., C.M. Fauquet, D.L. Knudson et F. Brown (eds.).p. 193-194.
- HORIUCHI, T., Y. MARUMOTO, Y. SAEKI, Y SATO, D. FURUSAWA, A. KONDO et S. MAEDA. 1987. High-level expression of the human alpha-interferon gene through the use of an improved baculovirus vector in the silworm, *Bombyx mori*. *Agri. Biol. Chem.*, 51: 1573-1580.
- HOSAKA, Y. et K. AISAWA. 1964. The fine structure of the cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm *Bombyx mori* (Linnaeus). *J. Insect Pathol.*, 6: 53-77.
-

- HUKUHARA, T. 1962. Generation-to-generation transmission of the cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Pathol., 16: 132-135.
- HUKUHARA, T. 1985. Pathology associated with cytoplasmic polyhedrosis virus. Dans: Viral insecticides for biological control. K. Maramorosch et K.E. Sherman, (eds.), Academic Press Inc., p. 121-162.
- HUKUHARA, T et J.-R. BONAMI. 1992. Viruses of Insects. Dans: Atlas of Invertebrate viruses, Reoviridae, J.R. Adams et J.-R. Bonami (eds), Chap.15 p. 393-434.
- HUKUHARA, T. et Y. HASHIMOTO. 1966. Studies of two strains of cytoplasmic-polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., 8: 184-192.
- HUKUHARA, T et M. MIDORIKAWA. 1983. Pathogenesis of cytoplasmic polyhedrosis in the silkworm. Dans: Double stranded RNA viruses. D.H.L. Bishop et R.W. Copans (eds). Elsevier, Amsterdam. p. 405-414.
- HUKUHARA, T, S. SATAKE et Y. SATO. 1981. Rythmic contractile movements of the larval midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 27: 469-473.
- IGNOFFO, C.M. 1968. Specificity of insect viruses. Bull. Entomol. Soc. Am., 14: 265-274.
- IGNOFFO, C.M. 1973. Development of a viral insecticide: Concept to commercialization. Exp. Parasitol., 33: 380-406.
- 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: 59-66
-

- INOUE, H. 1981. Double infection of midgut epithelial cells with nuclear and cytoplasmic polyhedrosis viruses. *J. Sericult. Sci. Jpn*, 50: 311-319.
- INOUE, H., K. TANIAI et J. KOBAYASHI. 1990. Establishment and characterization of substrate depending cell lines of *Bombyx mori*. *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci. (Jpn)*, 1: 13-25.
- IRAHIM, I.K.A., M.M. JOSHI et J.P. HOLLIS. 1978. Swarming disease of nematodes: Host range in *Tylenchorhynchus martini*. *Proc. Helminth. Soc. Wash.*, 45: 233-238.
- ISHIKAWA, Y. et T. ASAYAMA. 1959. On the translocation of the cytoplasmic polyhedral bodies in the midgut during metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. (Jpn)*, 28: 308-312.
- ISHIMORI, N. 1934. Contribution à l'étude de la grasserie du ver à soie (*Bombyx mori*). *C. R. Soc. Biol.*, 116: 1169-1170.
- IWASHITA, Y. 1971. Histopathology of cytoplasmic polyhedrosis. Dans: *The Cytoplasmic Polyhedrosis Virus of the Silkworm*. H. Aruga et Y. Tanada (eds.), Univ. of Tokyo Press, p. 79-102
- IWASHITA, Y. et H. ARUGA. 1957. Mechanism of resistance to virus diseases in the silkworm, *Bombyx mori*. III. Histological studies on the polyhedrosis in the silkworm. *J. Sericult. Sci. Jpn*, 26: 323-328
- IWASHITA, Y., K. INOUE et K. YAMAGUCHI. 1968. Light and electron microscopic investigation of midgut-nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Bull. Coll. Agr. Utsunomia Univ.*, 7: 81-95.
-

- JOKLIK, W.K. 1974. Replication of reoviridae. Dans: Comprehensive virology. R.R. Wagner et H. Fraenkel-Conrat (eds), Plenum Press, N.Y. Vol.2 p. 231-334.
- KATAGIRI, K. 1981. Pest control by cytoplasmic polyhedrosis viruses. Dans: Microbial control of pests and plants diseases. H.D. Burges (ed), Acad. Press, p. 433-440.
- KATAGIRI, K. et Z. IWATA. 1976. Control of *Dendrolimus spectabilis* with a mixture of cytoplasmic polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis*. Appl. Entomol. Zool., 11: 363-364.
- KAWARABATA, T. et Y. HAYASHI. 1971. Development of a cytoplasmic polyhedrosis virus in an insect cell line. J. Invertebr. Pathol., 7: 113-116.
- KAWASE, S. et S. MIYAJIMA. 1969. Immunofluorescence studies on the multiplication of cytoplasmic-polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol., 13: 330-336.
- KAWASE, S., F. KAWAMOTO et Y. YAMAGUCHI. 1973. Studies on the polyhedrosis virus forming polyhedra in the midgut cell nucleus of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification procedure and form of the virus. J. Invertebr. Pathol., 22: 266-279.
- KAWASE, S. et K. YAMAGUCHI. 1974. A polyhedrosis virus forming polyhedra in midgut-cell nucleus of silkworm, *Bombyx mori*. II. Chemical nature of the virion. J. Invertebr. Pathol., 24: 106-111.
- KEDDIE, B.A., G.W. APONTE et L.E. VOLKMAN. 1989. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in insect host. Science, 243: 1728-1730.
- KELLY, D.C. 1982. Baculovirus replication. J. Gen. Virol., 63: 1-13.
-

- KENDIRGI, F., R. ATHANASSIOUS et S. BELLONCIK. 1993. Characterization of an isolate of cytoplasmic polyhedrosis virus infecting *Choristoneura fumiferana* larva. 12th Annual Meeting of the American Society for Virology, Davis, Californie USA, 10-14 juin.
- KOBAYASHI, J., S. IMANISHI, H. INOUE, K. OHUYE, K. YAMAICHI, N. TSURUOKA et S. TANAKA. 1992. High level expression of a frog alpha-amidating enzyme, AE-II, in cultured cells and silkworm larvae using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus expression vector. *Cytotechnology*, **8**: 103-108.
- KOBAYASHI, J., H. INOUE, I. KATOH, Y. YOSHINAKA et Y. IKAWA. 1990. Construction of a new baculovirus vector system of the silkworm, *Bombyx mori*. Dans: HH Hagedorn, JG hildebrand, MG kidwell et JH Law (eds.) *Molecular Insect Science*, Plenum, N.Y. p. 325.
- KOBAYASHI, M. 1971. Replication of cytoplasmic-polyhedrosis virus as observed with the electron microscope. Dans: *The cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm*. H. Aruga et Y. Tanada, (eds.), University of Tokyo Press, 103-128.
- KUZIO, J., D.Z. ROHEL, C.J. CURRY, A. KREBS, E.H. CARSTENS et P. FAULKNER. 1984. Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, **139**: 414-418.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- 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. *Prot. Expr. Purif.*, **4**: 570-579.

LEWANDOWSKI, L.J., J. KALMAKOFF et Y. TANADA. 1969. Characterization of ribonucleic acid polymerase activity associated with purified cytoplasmic-polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Virol., 4: 857-865.

LEWANDOWSKI, L.J. et B.L. TRAYNOR. 1972. Comparison of the structure and polypeptide composition of three double-stranded ribonucleic acid containing viruses (diplorna viruses). Cytoplasmic polyhedrosis virus, wound tumor virus and reovirus. J. Virol., 10: 1053-1070.

LI, I, M. LOPEZ FERBER, A.T. MEERYWEATHER et R.D. POSSEE. 1995. An engineering baculovirus expressing *Bacillus thuringiensis var israelensis* Cyt A gene in insect cells. baculovirus and insect cell gene expression conference. Pinehurst, N.C.; USA. 26-30 mars.

LIPA, J.J. 1977. Electron microscope observations on the development of cytoplasmic polyhedrosis virus in *Scotogramma tripolii* Rott. (Lepidoptera, Noctuidae). Bull. Acad. Polon. Ser. Sci Biol., 25: 155-158.

LONGWORTH, J.F. 1980. The replication of a cytoplasmic polyhedrosis virus from *Chrysodeixis eriosoma* (Lepidoptera, Noctuidae) in *Spodoptera frugiperda* cells. J. Invertebr. Pathol., 37: 54-61.

LONGWORTH, J.F. et C.R. SPILLING. 1970. A cytoplasmic polyhedrosis of the larch sawfly, *Anoplonyx destructor*. J. Invertebr. Pathol., 15: 407-412.

LOTMAR, R. 1941. Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on larval and postlarval stages of the gypsy moth, *Porthetria dispar*. J. Invertebr. Pathol., 23: 263-274.

- LUCKOW, V. A. et M. D. SUMMERS. 1988a. Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*, 167: 56-71.
- LUCKOW, V.A. et M. D. SUMMERS. 1988b. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, 6: 47-55.
- MAEDA, S. 1989. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.*, 34: 351-372.
- MAEDA, S., T. KAWAI, M. OBINATA, H. FUJIWARA, T. HORIUCHI, Y. SAEKI, Y. SATO et M. FURASAWA. 1985. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315: 592-594.
- MAEDA, S., S.L. VOLRATH, T.N. HANZLIK, S.A. HARPER, K. MAJIMA, D.W. MADDOX, B.D. HAMMOCH et E. FOWLER. 1991. Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus. *Virology*, 184: 777-780.
- MAGNOLER, A. 1970. Susceptibility of gypsy moth larvae to *Lymantria* spp. nuclear- and cytoplasmic- polyhedrosis viruses. *Entomophaga*, 15: 407-412.
- MAGNOLER, A. 1974. Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on larval and postlarval stages of the gypsy moth, *Porthetria dispar*. *J. Invertebr. Pathol.*, 23: 263-274.
- MARTIGNONI, M.E. et P.J. IWAI. 1981. A catalog of viral diseases of insects, mites and ticks. Dans: *Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980*. H.D. Burges (ed.), Academic Press, N.Y. p. 897-911.
- MARTIGNONI, M.E. et P.J. IWAI. 1986. A catalog of viral diseases of insects, mites and ticks. Dans: *USDA Forest Service General Technical Report. PNW-195, 4^{ème} (ed.)*.

- MARTIGNONI, M.E. , P.J. IWAI K.M. HUGHES et R.B. ADDISON. 1969. A cytoplasmic polyhedrosis of *Hemerocampa pseudotsugata*. J. Invertebr. Pathol., 13: 15-18.
- MATHEWS, R.E.F. 1979. Classification and nomenclature of viruses. Intervirology, 12: 131-296.
- MATHEWS, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. VI th Report of the international Committee on Taxonomy of viruses. Intervirology, 17: 1-197.
- MATSUURA, Y., R.D. POSSEE, H.A. OVERTON et D.H.L. BISHOP. 1987. baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. J. Gen. Virol., 68: 1233-1250.
- McCLINTOCK, J.T., E.M. DOUGHERTY et R. M. WEINER. 1986. Semipermissive replication of a nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* in a gypsy moth cell line. J. Gen. Virol., 57: 197-204.
- McCRAE, W.A. 1982. Coding assignments for the genes of a cytoplasmic polyhedrosis virus. Processing 3rd International Colloquium on Invertebrate Pathology, University of Essex, Brighton, Grande Bretagne, pp. 20-24.
- McCRAE, W.A. et W.K. JOKLIK. 1978. The nature of polypeptides encoded by each of the double stranded RNA segments of reovirus type 3. Virology, 89: 578-593.
- McCRAE, W.A. et P.P.C. MERTENS. 1983. *In vitro* translation studies on RNA coding assignments for cytoplasmic polyhedrosis viruses. Dans: Double-Stranded RNA viruses, W.R. Compans et D.H.L. Bishop (ed.), Elsevier, Amsterdam p. 35-41.
- MERRYWEATHER, A. T., U. WEYER, M.P.G. HARRIS, M. HIRST, T. BOOTH et R. D. POSSEE. 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides

containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 Delta endotoxin. J. Gen. Virol., 71: 1535-1544.

MERTENS, P.P.C. 1979. A study of the transcription and translation (*in vitro*) of the genomes of cytoplasmic polyhedrosis viruses type I and II. Thèse de Doctorat. Oxford University, Grande Bretagne.

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.

MILLER, L.K. 1986. The genetics of baculoviruses. Dans: Biology of baculoviruses. Granados R.R. et B.A. Federici, (eds) Boca Raton, FL: CRC Press p. 217-238.

MILLER, L.K. 1988. baculovirus as gene expression vectors. Annu. Rev. Microbiol., 42: 177-199.

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.

MIURA, K., I. FUJII-KAWATA, H. IWATA et S. KAWASE. 1969. Electron-microscopic observation of cytoplasmic polyhedrosis virus from the silkworm. J. Invertebr. Pathol., 14: 262-268.

MIYAJIMA, S. 1975. Changes in virus-infectivity titer in the hemolymph and midgut by peroral infection with cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* L. Res. Bull. Aichi Agr. Res. Ctr D6: 19-26.

- MIYAJIMA, S. 1976. Serological properties of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. (Jpn), 45: 245-250.
- MIYAJIMA, S. et S. KAWASE. 1968. Changes in virus infectivity titer in the hemolymph and midgut during the course of a cytoplasmic polyhedrosis in the silkworm. J. Invertebr. Pathol., 12: 329-334.
- MIYAJIMA, A., J. SCHREURS, K. OTSU, A. KONDO, K. ARAI et S. MAEDA. 1987. Use of silkworm, *Bombyx mori*, and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biologically active mouse IL-3. Gene, 58: 273-281.
- MORI, H., R. ITO., H. NAKAZAWA, M. SUMIDA, F. MATSUBARA et Y. MINOBE. 1993. Expression of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus in insect cells by using a baculovirus expression vector, and its assembly into polyhedra. J. Gen. Virol., 74: 99-102.
- MORI, H., Y. MINOBE, T. SASAKI et S. KAWASE. 1989. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus strain A with nuclear localization of polyhedra. J. Gen. Virol., 70: 1885-1888.
- NAKAZAWA, H., F. KENDIRGI, S. BELLONCIK, R. ITO, S. TAKAGI, Y. MINOBE, K.-I. HIGO, M. SUMIDA, F. MATUBARA et H. MORI. 1995. Effect of mutations on the intracellular localization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin. J. gen. Virol.(sous presse).
- NAKAZAWA, H., F. KENDIRGI, S. BELLONCIK, S. MORI et F. MATSUBARA. 1994. Characterization, intracellular localization and crystallisation of polyhedrins of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus strains. VI International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbils Control. Montpellier, France.
-

- NEILSON, M.M. 1965. Effects of a cytoplasmic polyhedrosis virus on adult lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.*, 7: 306-314.
- PAYNE, C.C. 1976. Biochemical and serological studies of a cytoplasmic polyhedrosis virus from *Arctia caja*. A naturally occurring mixture of two virus types. *J. Gen. Virol.*, 30: 357-371.
- PAYNE, C.C. 1981. Cytoplasmic polyhedrosis viruses. Dans: Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. E.W. Davidson (ed.) Allandheld, Osmun, Totowa, New-Jersey, Chap.3, p. 61-100.
- PAYNE, C.C. et K.A. HARRAP. 1977. Cytoplasmic polyhedrosis virus. Dans: The Atlas of insect and plants viruses. K. Maramorosch, (ed.), Academic Press, N.Y., p. 105-129.
- PAYNE, C.C. et J. KALMAKOFF. 1974. Biochemical properties of polyhedra and virus particles of the cytoplasmic polyhedrosis virus of *Bombyx mori*. *Intervitology*, 4: 354-364.
- PAYNE, C.C. et P.P.C. MERTENS. 1983. Cytoplasmic polyhedrosis viruses. Dans: The Reoviridae. W.K. Joklik (ed.), Plenum Press, N.Y., Chap.9, p. 425-504.
- PAYNE, C.C., P.P.C. MERTENS, S. PEDLEY, N.E. CROOK et R. RUBINSTEIN. 1986. Classification of cytoplasmic polyherdrosis viruses RNA-RNA homology electrophoretype and serological analyses. Dans: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. R.A. Samson, J.M. Vlask et D. Peter (eds). Society of Invertebrate Pathology, p. 65- 68.
- PAYNE, C.C. et P.F. RIVERS. 1976. A Provisional classification of cytoplasmic polyhedrosis viruses based on the RNA genome segments. *J. Gen. Virol.*, 33: 71-85.
-

PAYNE, C.C., R. RUBINSTEIN, N.E. CROOK et P.P.C. MERTENS. 1983. Serological and molecular studies of variation in cytoplasmic polyhedrosis viruses. Dans: Double stranded RNA viruses. R.W. Compans et D.H.L. Bishop (eds), Elsevier, Amsterdam, p. 253-261.

PAYNE C.C. et T.W. TINSLEY. 1974. The structural proteins and rna components of cytoplasmic polyhedrosis virus from *Nymphalis io* (Lepidoptera : Nymphalidae). J. Gen. Virol., 25: 291-302.

PENNOCK, G.D., C. SHOEMAKER et L.K. MILLER. 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* Beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. Molec. Cell. Biol., 4: 399-406.

POSSEE, R.D., 1986. Cell-surface expression of influenza virus haemagglutinin in insect cells using a baculovirus vector. Virus Res., 5: 43-59.

POSSEE, R.D.; M.D. AYRES, S.C. HOWARD; P. ZANOTTO et J. KUZIO. 1995. baculovirus genome organization. baculovirus and insect cell gene expression conference. Pinehurst, N.C., USA. 26-30 mars.

POSSEE, R.D. et S.C. HOWARD. 1987. Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Nucleic Acids Res., 15: 10233-10248.

PREHAUD, C., K. TAKEHARA, A. FLAMAND et D.H.L. BISHOP. 1989. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. Virology, 173: 390-399.

- PRITCHETT, D.W., S.Y. YOUNG et W.C. YEARIAN. 1982. Dissolution of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra by the digestive fluid of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 354-361
- PULLIN, J.S. et N.F. MOORE. 1985. Gene assignments of a cytoplasmic polyhedrosis virus (type 2) from *Nymphalis io*. *Microbiologica*, 8: 131-140.
- 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: 145-154.
- QUIOT, J.-M., C. VAGO et M. TCHOUKCHRY. 1980. Étude expérimentale sur culture de tissus de Lépidoptères, de l'interaction de deux virus d'Invertébrés. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 290: 199-201.
- RANKIN, C., B.G. OOI et L.K. MILLER. 1988. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene*, 70: 39-49.
- ROCHELEAU, H. 1987. Étude de la réplication du virus de la polyédrose cytoplasmique d'*Euxoa scandens*, Riley (Lepidoptera: Nactuidae) en cultures cellulaires d'insecte. Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier, Université du Québec. pp. 94.
- ROELVINK, P.W., M.M.M. van MEER, C.A.D. de KORT, R.D. POSSEE, B.D. HAMMOCK et J.M. VLAK. 1992. Dissimilar expression of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts. *J. Gen. Virol.*, 73: 1481-1489.
-

- ROHRMANN, G.F. 1986. Evolution of occluded baculoviruses. Dans: Biology of baculoviruses. R.R. Granados et B.A. Federici, (eds.), Boca Raton FL: CRC Press, 203-215.
- ROHRMANN, G.F. 1992. Baculovirus structural proteins. J. gen. Virol., 73: 749-761.
- ROHRMANN, G.F., T.J. BAILEY, R.R. BECKER et G.S. BEAUDREAU. 1980. Comparison of the structure of C- and N-polyhedrins from two occluded viruses pathogenic for *Orgyia pseutsugata*. J. Virol., 34: 360-365.
- SAITO, C et T. YAMAGUCHI. 1960. Studies on flacherie of the silkworm, *Bombyx mori* L. I. On the cytoplasmic polyhedrosis. Bull. Gunma Sericult. Exp. Sta., 36: 1-79.
- SANGER, F. S. NICKELSEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74: 5463-5467.
- SHATKIN, A.J. 1976. Capping of eukaryotic mRNAs. Cell, 9: 645-654.
- SHIMOTOHNO, K. et K. MIURA. 1973. Single-stranded RNA synthesis *in vitro* by the RNA polymerase associated with cytoplasmic polyhedrosis virus containing double-stranded RNA. J. Biochem., 74: 117-125.
- SHIMOTOHNO, K. et K. MIURA. 1974. 5'-terminal structure of messenger RNA transcribed by the RNA polymerase of silkworm cytoplasmic polyhedrosis virus containing double-stranded RNA. J. Biochem. (Tokyo), 81: 371-379.
- SHIMOTOHNO, K. et K. MIURA. 1977. Nucleoside triphosphate phosphohydrolase associated with cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Biochem. (Tokyo), 81: 371-379.
-

- SIKOROWSKI, P.P., G.L. ANDREWS et J.R. BROOME. 1971. Presence of cytoplasmic-polyhedrosis virus in the hemolymph of *Heliothis virescens* larvae and adults. *J. Invertebr. Pathol.*, 18: 167-168.
- 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: 369-371.
- SMITH, G.E., M.D. SUMMERS et M.J. FRASER. 1983a. Production of human beta interferon in insects cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.*, 3: 156-165.
- SMITH, G.E., J.M. VLAK, et M.D. SUMMERS. 1983b. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000-molecular-weight protein. *J. Virol.*, 45: 215-25.
- SMITH, K.M. 1967. The polyhedrosis cytoplasmic type. Dans: *Insect virology*. Academic Press, N.Y. London, Chap. 3:, p. 41-58.
- SMITH, K.M. et R.W.G. WYCKOFF. 1950. Structure within polyhedra associated with virus diseases. *Nature*, 166: 861.
- SOHI, S.S., F.T. BIRD et Y. HAYASHI. 1971. Development of *Malacosoma disstria* cytoplasmic polyhedrosis virus in *Bombyx mori* ovarian and tracheal tissue cultures. *Proc. 4th Intern. Coll. Insect Pathol.* College Park, Maryland, 1970. p. 340-351.
- St-AMAND, L. 1982. Recherche sur le synergisme entre infections virales sur *Euxoa scandens* et *Euxoa messoria*. Mémoire de la maîtrise en virologie, Université du Québec, Institut Armand-Frappier. pp. 189.
-

- STAIRS, G.R., W.B. PARRISH et M. ALLIETTA. 1968. An histopathological study involving a cytoplasmic polyhedrosis virus of the salt-marsh caterpillar, *Estigmene Acraea*. J. Invertebr. Pathol., 12: 359-365.
- STEINHAUS, E.A. et J.P. DINEEN. 1959. A cytoplasmic polyhedrosis of the alfalfa caterpillar. J. Insect Pathol., 12: 359-365.
- STOLTZ, D.B. 1969. Observations of naturally occurring viruses in larvae of the midge *Chironomus plumosus*. Thèse de Doctorat. McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada.
- STOLTZ, D.B. et W.L. HILSENHOFF. 1969. Electron-microscopic observations on the maturation of a cytoplasmic-polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., 14: 39-48.
- STORER, G.B., M.G. SHEPHERD et J. KALMAKOFF. 1973. Enzyme activities associated with cytoplasmic polyhedrosis virus from *Bombyx mori* II. Comparative studies. Intervirology, 2: 193-199.
- STORER, G.B., M.G. SHEPHERD et J. KALMAKOFF. 1974. Enzyme activities associated with cytoplasmic polyhedrosis virus from *Bombyx mori* I. nucleotide phosphohydrolase and nuclease activities. Intervirology, 2: 87-94.
- SUMMERS, M.D. 1995. Recombinant protein expression and production with baculovirus vectors. baculovirus and insect cell gene expression conference. Pinehurst, N.C. USA. 26-30 Mars.
- SUMMERS, M.D. et G.E. SMITH. 1975-76. Comparative studies of baculovirus granulins and polyhedrins. Intervirology, 6: 168-180.
-

- TANADA, Y et G.Y. CHANG. 1964. Interactions of two cytoplasmic-polyhedrosis viruses in three insect species. *J. Insect Pathol.*, 6: 500-516
- TAKAMI, T., H. SUGIYAMA, T. KITAZAWA et T. TANADA. 1967. Infection of cultured silkworm embryos with the cytoplasmic-polyhedrosis virus. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.*, 11: 182-186.
- TANAKA, S. et H. ARUGA. 1967. Interference between the midgut nuclear-polyhedrosis virus and the cytoplasmic-polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. (Jpn)*, 36: 169-176.
- TOMITA, S., J. KOBAYASHI et S. IMANISHI. 1992. Comparison of promoter activities between p10-like gene and polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus using firefly luciferase assay. 19th International Congress of Entomology, Pékin, Chine, IVP-6, 28 juin - 4 Juillet 1992.
- TRIKHA, J., G.S. WALDO, F.A. LEWANDOWSKI, Y. HA, E.C. THEIL, P.C. WEBER et N.M. ALLEWELL. 1994. Crystallization and structural analysis of bullfrog red cell L-subunit ferritins. *Proteins*, 18: 107-118
- TRUONG, T.-L. 1990. Influence de certaines conditions de culture sur la réplication *in vitro* du virus de la polyédose cytoplasmique d'*Euxoa scandens*, Riley (Lepidoptera: Noctuidae). Mémoire de Maîtrise. Institut Armand-Frappier, Université du Québec. pp.126.
- UCHIMA, K., J.P. HARVEY, E.M. OMI et Y. TANADA. 1988. Binding sites on the midgut cell membrane for the synergetic factor of a granulosis virus of the armyworm (*Pseudaletia unipuncta*). *Insect Biochem.*, 18: 645-650.
-

- URAKAWA, T., M. FERGUSON, P.D. MINOR, J. COOPER, M. SULLIVAN, J.W. ALMOND et D.H.L. BISHOP. 1989 . Synthesis of immunogenic, but non-infectious poliovirus particles in insect cells by a baculovirus expression vector. *J. Gen. Virol.*, 70: 1453-1463.
- VAGO, C. et M. BERGOIN 1963. Développement du virus à corps d'inclusion du lépidoptère *Lymantria dispar* en cultures cellulaires. *Entomophaga*, 4: 253-261.
- VAIL, P.V. et D. GOUGH. 1970. Effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on adult cabbage loopers and their progeny. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 397-400.
- VAN DER WILK, F., J.W.M. VAN LENT et J. M. VLAK. 1987. Immunogold detection of polyhedrin, p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Gen. Virol.*, 68: 2615-2623.
- VAN OERS, M.M., D. MALARME, J.M.P. JORE et J.M. VLAK. 1992. Expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene: Effect of polyhedrin gene expression. *Arch. Virol*: 123: 1-11.
- VLAK, J.M., F.A. KLINKENBERG, K.J.M. ZAAL, M. USMANY, E.C. KLINGE-ROODE, J.B. GEERVLIET, J. ROOSIEN et J.W. VAN LENT. 1988. Fonctional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-beta-galactosidase fusion gene. *J. Gen. Virol.*, 69: 765-776.
- VOLKMAN, L.E. 1986. The 64 K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 131: 103-118.
-

- VOLKMAN, L.E. et P.A. GOLDSMITH. 1984. Budded *Autographa californica* NPV 64K protein: Further biochemical analysis and effects of postimmunoprecipitation sample preparation conditions. *Virology*, 139: 295-302.
- VOLKMAN, L.E. et P.A. GOLDSMITH. 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody. Inhibition of entry by abortive endocytosis. *Virology*, 143: 185-195.
- VOLKMAN, L.E. et D. L. KNUDSON. 1986. *In vitro* replication of baculoviruses. Dans: Biology of baculovirus. R.R. Granados et B. A. Federici, (eds.), Boca Raton, FL: CRC Press, Vol.2: 109-128.
- VOLKMAN, L.E. et M.D. SUMMERS. 1977. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: Comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated and nonoccluded forms. *J. Invertebr. Pathol.*, 30: 102-103
- WATANABE, H. 1971. Pathophysiology of cytoplasmic polyhedrosis in silkworm. Dans: The Cytoplasmic polyhedrosis Virus of the silkworm. Aruga H. & Y. Tanada, (eds). University of Tokyo Press, p. 151-155.
- 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.
- WEYER U. et R.D. POSSEE. 1989. Analysis of the promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene. *J. Gen. Virol.*, 70: 203-208.
-

- WILLIAMS, G.V., D.Z. ROHEL, J. KUZIO et P. FAULKNER. 1989. A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants. *J. Gen. Virol.*, 70: 187-202.
- WITTIG, G., E.A. STEINHAUS et J.P. DINEEN. 1960. Further studies of the cytoplasmic polyhedrosis virus of the alfalfa caterpillar. *J. Insect Pathol.*, 2: 334-335.
- WOOD, H.A. et R.R. GRANADOS. 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45: 69-87.
- WU, A.Z., R.M. DAI, X.R. SHEN et Y.K. SUN. 1981. [3H-Methyl]-methionine as possible methyl donor for formation of 5' -terminus of *in vitro* synthesized mRNA of cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm *Bombyx mori*. *Scientia Sinica*, 24: 1737-1742.
- XEROS, N. 1956. The virogenic stroma in nuclear and cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature*, 178: 412-413.
- XEROS, N. 1966. Light microscopy of the virogenic stroma of cytopolyhedrosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 8: 79-87.
- YAMAGUCHI, K. 1968. Studies on the midgut-nuclear polyhedrosis in the silkworm, *Bombyx mori* L. II. Temperature effects on the formation of polyhedra. *J. Sericult. Sci. (Jpn)*, 37: 462-470.
- YAMAGUCHI, K. 1972. Studies on the midgut- nuclear polyhedrosis of the silkworm, *Bombyx mori* L. (VII) Electron microscopic observation on the inclusion formation of C2 strain. *Bull. Saitama Sericult. Exp. Sta.*, 44: 45-51
-

YAMAGUCHI, K. 1974. Studies on the interference between viruses in the silkworm, *Bombyx mori* L. I. Interference between typical and new strains of the cytoplasmic polyhedrosis virus. Bull. Saitama Sericult. Exp. Sta., 46: 78-83.

YAMAGUCHI, K. 1975a. Studies on the interference between viruses in the silkworm, *Bombyx mori* L. II. Interference between B, C1 and C2 strains of the cytoplasmic polyhedrosis virus. Bull. Saitama Sericult. Exp. Sta., 47: 59-61.

YAMAGUCHI, K. 1975b. Studies on the interference between viruses in the silkworm, *Bombyx mori* L. III. Interference between A and C1 strains of cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Sericult. (Jpn), 44: 468-471.

YAMAGUCHI, K. et C. AYUZAWA. 1970. Studies on the midgut-nuclear polyhedrosis of the midgut nuclear-polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* L. (IV) Two previously undescribed virus strains, B and C1. J. Sericult. Sci. (Jpn) 39: 342-350.

YAMAGUCHI, K. et T. HUKUHARA. 1973. Studies on the midgut nuclear polyhedrosis of the silkworm, *Bombyx mori* L. (IX) New Virus strain B2. J. Sericult. Sci. (Jpn), 42: 239-243.

YAMAGUCHI, K. , Y. IWASHITA et K. INOUE. 1969. Studies on the midgut-nuclear polyhedrosis of the silkworm, *Bombyx mori* L. III. Effects of high temperature treatment on the shape of the polyhedron of the infected larvae. J. Sericult. Sci. (Jpn), 38: 157-162.

YAMAGUCHI, S. 1962. Studies on the functional localization of the digestive system in the silkworm larva, *Bombyx mori* L. VI. Susceptibility and its local difference of the midgut epithelial cell for virus multiplication. J. Sericult. Sci. (Jpn), 31: 90-96.

YASAKI, K. et K.L. MIURA. 1980. Relation of the structure of cytoplasmic polyhedrosis virus, its genome, and the synthesis of its mRNA. *Virology*, 105: 467-479.

Annexes

ANNEXE 1**Milieu MGM-448 complet****Solution: GMA-Vit-Mix-1B**

| | |
|------------------------|-------|
| Riboflavine | 5 mg |
| Thiamine- HCl | 5 mg |
| Ca-Pantothenate | 5 mg |
| Pyridoxine-HCl | 5 mg |
| Acide P-Aminobenzoïque | 5 mg |
| Acide de Niacine | 5 mg |
| Chlorure de Choline | 50 mg |
| i-Inositol | 5 mg |
| H ₂ O | 50 mL |

Dissoudre la Riboflavine dans de l'eau distillée à 50 °C et laisser refroidir à la température de la pièce pour ensuite ajouter les autres produits. Conserver à -20 °C.

Solution: GMA-Vit-Mix-IIB

| | |
|---------------------------|-------|
| Solution : GMA-Vit-Mix-1B | 20 mL |
| H ₂ O | 80 mL |

Conserver à - 20°C

Solution: GMA-Vit-Mix-1A

II

| | |
|------------------|--------|
| Acide Folique | 5 mg |
| Biotine | 2,5 mg |
| H ₂ O | 50 mL |

- Dissoudre les deux vitamines dans l'eau et ajuster le pH à 10,0 avec du KOH 1M.
- Neutraliser la solution avec du HCl 1N
- Conserver à -20 °C

Solution: GMA-Vit-Mix-IIA

Solution: GMA-Vit-Mix-IA 20 mL

H₂O 80 mL

- Conserver à -20 °C

Solution: GMA-Salt-Mix-A (10X)

| | |
|---------------------------------------|----------|
| NaHCO ₃ | 3,5 g |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 27,8 g |
| H ₂ O | 1 000 mL |

- Conserver à 4 °C

Solution: GMA-Salt-Mix-B (10X)

| | |
|--|--------|
| NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O | 5,7 g |
| KCl | 11,2 g |
| MgCL ₂ . 6H ₂ O | 11,4 g |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O | 6,6 g |
| H ₂ O | 500 mL |

- Conserver à 4 °C

MGM-4-O. S. A. (5X)

| | |
|---------------------|---------|
| L- Cystéine | 105 mg |
| L- Tyrosine | 210 mg |
| L- Alpha-Alanine | 1,315 g |
| β- Alanine | 835 mg |
| L- Arginine- HCl | 2,915 g |
| Acide L- Aspartique | 1,465 g |
| L- Asparagine | 1,465 g |
| Acide L- Glutamique | 2,50 g |
| L- Glutamine | 2,50 g |
| Glycine | 2,710 g |
| L- Histidine | 10,42 g |
| L- Isoleucine | 210 mg |
| L- Leucine | 315 mg |
| L- Lysine- HCl | 2,605 g |
| L- Methionine | 210 mg |
| L- Phenylalanine | 615 mg |
| L- Proline | 1,460 g |
| DL- Serine | 4,585 g |
| L- Threonine | 730 mg |

IV

| | |
|-----------------------------|-------------|
| L- Thryptophane | 415 mg |
| L- Valine | 415 mg |
| Glucose (Anhydre) | 16, 665 g |
| Fructose | 2,085 g |
| Sucrose | 110,4 g |
| Acide L- Malique | 2,79 g |
| Acide Alpha- Ketoglutarique | 1,54 g |
| Acide Succinique | 250 mg |
| Acide Furamique | 230 mg |
| H2O | jusqu'à 1 L |

- Conserver à -20 °C

Préparation du MGM-443:

| | |
|------------------------------------|----------|
| MG-4-0.S.A. | 200 mL |
| GMA-Salt-Mix-A | 83 mL |
| GMA-Salt-Mix-B | 83 mL |
| GMA-Vit-Mix-IIA | 85 mL |
| GMA-Vit-Mix-IIB | 85 mL |
| PVP-K90 | 0,5 g |
| SVF | 100 mL |
| Eau | 516,5 mL |
| Sulfate de gentamycine (2,5 mg/mL) | 0,8 mL |

Préparation du MGM-448 + SVF

| | |
|-----------------------|---------|
| MGM-443 | 1000 mL |
| Albumine, fraction V | 20 mg |
| Fetaine | 40 mg |
| Cytochrome C type III | 200 mg |
| Inosine | 400 mg |

Ajuster le pH à 6,3 avec du KOH 1M et filtrer au travers d'un filtre de 0,22 μm .

ANNEXE 2**Solution de Pancréatine****Solution A**

| | |
|--------------------|---------|
| H ₂ O | 90 mL |
| NaCl | 1,12 g |
| Glucose | 0,1 g |
| NaHCO ₃ | 0,035 g |
| EDTA | 0,02 g |
| Pancréatine | 0,31 g |
| KCl | 0,02 g |
| Total | 100 mL |

Ajuster le pH à 7,2 avec du NaOH ou du HCl 1N

Solution de travail

| | |
|--------------------|---------|
| H ₂ O | 85 mL |
| NaCl | 1,12 g |
| Glucose | 0,1 g |
| NaHCO ₃ | 0,035 g |
| EDTA | 0,02 g |
| Solution A | 10 mL |
| KCl | 0,02 g |
| Total | 100 mL |

Filtrer successivement sur filtres de 0,45 μ m et 0,22 μ m

VII

ANNEXE 3

Solution de Carlson

Solution A: 10X

| | |
|---------------------------------------|--------|
| NaCl | 7 g |
| CaCL ₂ . 2H ₂ O | 0,23 g |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,2 g |
| KCl | 0,2 g |
| MgCL ₂ . 6H ₂ O | 0,1 g |
| H ₂ O | 100 mL |

Solution B: 10X

| | |
|--------------------|--------|
| NaHCO ₃ | 0,12 g |
| H ₂ O | 100 mL |

Solution de travail

| | |
|------------------|--------|
| Solution A 10X | 10 mL |
| Solution B 10X | 10 mL |
| H ₂ O | 80 mL |
| Glucose | 0,8 g |
| Gentamycine | 0,1 g |
| total | 100 mL |

Stériliser sur filtre de 0,22 μ m.