

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
**INRS - Institut Armand-Frappier**

**Identification et caractérisation du gène *p49* du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) : Expression de la protéine P49 recombinante dans un système procaryote et eucaryote et production d'anticorps anti-P49**

**Par**

**Samia Tazi**

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

**Jury d'évaluation**

Président du Jury	: Dr Maximilien Arella
Examineur externe	: Dr Jean-Charles Côté
Directeur de recherche	: Dr Abderrazzak Merzouki
Codirecteur de recherche	: Dr Claude Guertin

**Juin 2005**

© Droits réservés de Samia Tazi, 2005

*« L'idéal de la vie n'est pas l'espoir de devenir parfait, c'est la  
volonté d'être toujours meilleur »*

*- Ralph Waldo Emerson -*

*À mon papa, À ma maman,*

*À ma tendre moitié,*

*À mon neveu, ma sœur et mes frères adorés,*

*Merci d'avoir répondu présent quand j'en avais besoin*

## Résumé

L'infection associée au granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) fait intervenir plusieurs protéines virales dont la majorité ne sont pas encore identifiées. Parmi ces protéines, la P49 retrouvée chez certains baculovirus joue un rôle majeur lors de la pathogenèse virale. Cette protéine inhibe le processus apoptotique induit par les cellules hôtes, comme système de défense, lors de l'infection virale. Ce projet de recherche rapporte, pour la première fois, la présence et la caractérisation du gène codant pour la protéine P49 chez le ChfuGV.

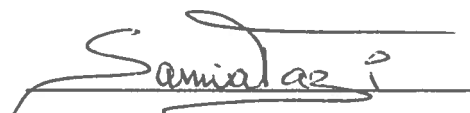
Le gène *p49* a été localisé sur le brin anti-sens du génome de ChfuGV, entre les positions 8 632 pb et 9 999 pb, et immédiatement en aval du gène viral codant pour la protéine structurale ODVe-18. Ce gène code pour une protéine de 455 acides aminés, ayant une masse moléculaire de 53 kDa. Les analyses des séquences nucléotidiques et en acides aminés ont permis de confirmer l'identité du gène *p49* au sein des granulovirus étudiés. La séquence de la protéine P49 de ChfuGV partage une homologie de 40-55 % avec celle des autres GV. Toutefois, les faibles homologies obtenues avec les baculovirus de type nucléopolyédrovirus (NPV) ont suggéré une divergence évolutive entre les GV et les NPV au niveau de la protéine P49.

Dans le but d'une caractérisation immunobiologique, la protéine recombinante P49 a été produite dans les bactéries *E. coli* M15 [pREP4] en utilisant le système d'expression procaryote pQE32. La purification de la protéine recombinante P49 a été effectuée en conditions dénaturantes par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Ni-NTA). Le rendement obtenu de la purification correspond à environ 5.5 mg/litre de culture. L'utilisation de la protéine recombinante P49 lors de l'immunisation classique des souris Balb/c a permis la production d'anticorps polyclonaux anti-P49 spécifiques. Les analyses par ELISA ont démontré que l'induction des réponses en anticorps anti-P49 par immunisation classique est efficace, avec des titres importants à partir du 41<sup>ème</sup> jour post-immunisation.

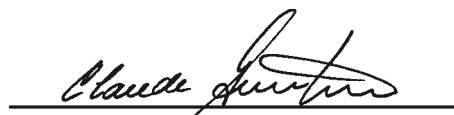
Au cours du projet, il a été également question d'explorer l'efficacité de l'immunisation génétique (ADN nu) dans la production des anticorps anti-P49, comparativement à

l'immunisation classique. L'immunisation génétique des souris Balb/c, en utilisant le système d'expression eucaryote pcDNA3 exprimant la protéine P49 (pcDNA3/p49), a permis la production d'anticorps anti-P49 très spécifiques. Les titres des anticorps générés sont d'environ  $10^3$  et ont été atteints au bout du 81<sup>ème</sup> jour post-immunisation. Cette réponse en anticorps anti-P49 s'est ainsi avérée plus faible et plus tardive que celle générée par l'immunisation classique. Toutefois, les titres des anticorps anti-P49 produits par immunisation génétique ne tiennent compte d'aucune protéine contaminante d'origine bactérienne. En effet, contrairement aux anticorps générés par immunisation classique, les anticorps anti-P49 produits par immunisation génétique résultent strictement de l'immunogénicité de la protéine P49. En plus de cette spécificité des anticorps, l'immunisation génétique s'est avérée une méthode moins coûteuse, plus rapide et largement moins laborieuse que l'immunisation classique. De ce fait, l'immunisation génétique a été considérée comme étant une approche plus fiable pour la production des anticorps anti-P49.

Les expériences d'immunisation génétique ont permis également de confirmer le potentiel immuno-adjuvant du plasmide codant pour l'IL-2. En effet, cette étude a démontré que la réponse humorale peut être améliorée par la co-injection du vecteur exprimant cette cytokine (pcDNA3/IL-2) en présence du vecteur codant pour la P49. L'IL-2 a ainsi permis d'activer l'induction de la réponse humorale et d'augmenter de plus de 10 fois les titres des anticorps anti-P49, par rapport à l'immunisation en l'absence de cette cytokine.

  
Étudiant

  
Directeur de recherche

  
Codirecteur de recherche

## Remerciements

D'abord et avant tout, je voudrais exprimer toute ma gratitude à mes parents et à ma famille dont l'amour, la confiance et les encouragements m'ont fortement soutenue durant mes études.

J'aimerais vivement remercier mon directeur de recherche, Dr Abderrazzak Merzouki, pour son encadrement exemplaire tout au long de ce projet, pour sa rigueur et sa précision scientifique. Mes sincères remerciements s'adressent également à mon codirecteur, Dr Claude Guertin, pour la pertinence de ses conseils.

Je suis particulièrement reconnaissante à notre technicien du laboratoire, Mr Marc Henrichon, M.Sc, dont la générosité, la confiance et les conseils m'ont été si précieux.

Un très grand merci à tous mes amis, pour leur sincère compréhension, ainsi qu'à mes collègues de l'INRS-Institut Armand-Frappier, en particulier ceux qui ont pu contribuer à cette recherche.

Pour terminer, je tiens à adresser ma reconnaissance à la fondation Armand-Frappier, de m'avoir octroyé des bourses d'excellence pour mes années de maîtrise.

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>II</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
1 Tordeuse des bourgeons de l'épinette.....	5
2 Baculovirus .....	6
2.1 Généralités.....	6
2.2 Potentiel insecticide des baculovirus et leurs avantages dans la lutte biologique.....	7
3 Granulovirus .....	8
3.1 Propriétés morphologiques et structurelles des granulovirus.....	8
3.2 Génome des Granulovirus.....	11
3.2.1 Structure et organisation .....	11
3.2.2 Régulation de l'expression des gènes .....	12
3.3 Processus d'infection et de réplication des granulovirus .....	13
3.3.1 Infection et réplication <i>in vivo</i> des granulovirus.....	13
3.3.2 Infection et réplication <i>in vitro</i> des granulovirus .....	15
3.4 Interaction des baculovirus avec les cellules hôtes .....	16
3.4.1 Réponse cellulaire à l'infection virale : l'apoptose.....	16
3.4.2 Stratégies des baculovirus dans l'inhibition de l'apoptose cellulaire .....	17
4 La protéine P49 des baculovirus .....	19
4.1 Rôle fonctionnel de la protéine P49 .....	19
4.2 Mécanisme anti-apoptotique et structure tridimensionnelle de la protéine P49.....	21
4.3 Gènes exprimant la protéine P49 .....	24
4.4 Homologies structurales des protéines P49.....	25
4.5 Expression de la protéine P49 et production d'anticorps anti-P49.....	25
5 Systèmes d'expression de protéines recombinantes .....	25
5.1 Généralités.....	25
5.2 Système d'expression acellulaire .....	26
5.3 Systèmes d'expression procaryote .....	27
5.4 Systèmes d'expression eucaryote.....	29
6 Immunisation génétique.....	30
6.1 Historique.....	31
6.2 Induction de la réponse immunitaire .....	33
6.2.1 Mécanismes de maturation et de présentation de l'antigène.....	33
6.2.2 Réponse humorale.....	35
6.3 Éléments modulateurs de la réponse immunitaire.....	36

6.3.1	Caractéristiques du vecteur d'expression.....	36
6.3.2	Méthodes et voies d'immunisation .....	37
6.3.3	Rôle des cytokines comme adjuvants génétiques .....	38
6.4	Études comparatives : immunisation génétique et classique.....	40
7	But et objectifs .....	42
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>		<b>44</b>
1	Granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i> (ChfuGV) .....	45
1.1	Production de ChfuGV .....	45
1.2	Purification de ChfuGV sur gradient de glycérol.....	45
1.3	Visualisation des particules de ChfuGV purifiées par microscopie électronique .....	46
1.4	Isolement des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV .....	46
1.5	Extraction de l'ADN génomique de ChfuGV .....	47
1.6	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN de ChfuGV .....	48
2	Identification du gène codant pour la protéine P49 de ChfuGV.....	48
2.1	Localisation du gène <i>p49</i> dans la banque génomique de ChfuGV.....	48
2.2	Amplification par PCR du gène codant pour la protéine P49 .....	49
2.3	Clonage du gène codant pour la protéine P49.....	49
2.3.1	Réaction de ligation dans le vecteur pCR <sup>®</sup> 2.1 .....	49
2.3.2	Transformation des bactéries <i>E. coli</i> INV $\alpha$ F' .....	50
2.3.3	Principe du criblage des colonies INV $\alpha$ f' recombinantes.....	51
2.3.4	Purification de l'ADN plasmidique .....	51
2.3.5	Séquençage et analyses bioinformatiques.....	52
3	Système d'expression procaryote .....	53
3.1	Construction du vecteur d'expression recombinant pQE32/ <i>p49</i> .....	53
3.1.1	Amplification par PCR du gène <i>p49</i> .....	54
3.1.2	Clonage du gène <i>p49</i> dans le vecteur pCR <sup>®</sup> 2.1 .....	54
3.1.3	Sous-clonage du gène codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression pQE32 .....	55
3.2	Expression de la protéine recombinante P49 dans un système d'expression procaryote.....	59
3.2.1	Transformation des bactéries <i>E. coli</i> M15 [pREP4] par le plasmide recombinant pQE32/ <i>p49</i> .....	60
3.2.2	Induction de l'expression de la protéine recombinante P49 .....	60
3.2.3	Analyse de l'expression de la protéine recombinante P49 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) .....	61
3.3	Purification de la protéine recombinante P49 par chromatographie d'affinité .....	62
3.3.1	Mise au point des conditions de purification de la protéine recombinante P49.....	62
3.3.2	Stratégie de purification de la protéine recombinante P49 .....	63
3.3.3	Détection de la protéine recombinante P49 par immunobuvardage de type western (Western blot).....	64
3.3.4	Dialyse et concentration de la protéine recombinante P49 .....	65
3.3.5	Test de confirmation de la purification de la protéine recombinante P49 .....	65
3.3.6	Quantification de la protéine recombinante P49.....	65
4	Système d'expression eucaryote .....	66
4.1	Construction du vecteur d'expression recombinant pcDNA3/ <i>p49</i> .....	66
4.1.1	Amplification par PCR du gène <i>p49</i> .....	66
4.1.2	Stabilisation du gène <i>p49</i> dans le vecteur pCR <sup>®</sup> 2.1 .....	67
4.1.3	Sous-Clonage du gène <i>p49</i> dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 .....	67
4.2	Production des vecteurs recombinants nécessaires à l'immunisation génétique.....	71
4.2.1	Transformation des bactéries XL-1 Blue par le plasmide contrôle pcDNA3 et par le vecteur pcDNA3/IL2.....	72

4.2.2	Maxipréparation des vecteurs recombinants pcDNA3/p49, pcDNA/IL-2 et du plasmide pcDNA3 .....	72
4.2.3	Digestion et dosage des plasmides pcDNA3/p49, pcDNA3, et pcDNA/IL-2 .....	73
5	Immunsation classique et génétique des souris Balb/c .....	73
5.1	Protocole des immunisations.....	74
5.1.1	Groupes de souris et produits injectés .....	74
5.1.2	Calendrier et voie d'immunsation : injections et prélèvements.....	76
5.2	Évaluation de la réponse immunitaire humorale.....	76
5.2.1	Caractérisation des anticorps anti-p49 par le test ELISA indirect.....	76
5.2.2	Évaluation de la spécificité des anticorps anti-P49 par Immunobuvardage de type Western .....	77
	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>79</b>
1	Caractérisation moléculaire du gène codant pour la protéine P49 du ChfuGV .....	80
1.1	Localisation et identification du gène <i>p49</i> dans le génome de ChfuGV .....	80
1.2	Analyses comparatives de la séquence déduite en acides aminés de la protéine P49 de ChfuGV .....	86
2	Expression de la protéine P49 de ChfuGV dans un système procaryote .....	94
2.1	Clonage du gène codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression pQE32 .....	94
2.2	Expression de la protéine recombinante P49 dans les bactéries <i>E. coli</i> M15 [pREP4].....	97
2.3	Purification de la protéine recombinante P49 .....	97
2.3.1	Purification par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel en conditions dénaturantes.....	100
2.3.2	Renaturation, concentration et quantification de la protéine recombinante P49 purifiée.....	103
2.3.3	Confirmation de l'identité de la protéine recombinante P49 purifiée.....	106
3	Expression de la protéine P49 de ChfuGV dans un système eucaryote.....	106
4	Préparation des vecteurs recombinants pcDNA3/p49, pcDNA3/IL-2 et du plasmide pcDNA3 pour l'immunsation génétique des souris Balb/c.....	109
5	Caractérisation de la réponse humorale générée par immunsation classique et génétique.....	112
5.1	Évaluation par ELISA de la réponse en anticorps anti-P49 .....	112
5.2	Analyse du niveau de production des anticorps anti-P49.....	118
5.3	Titration des anticorps anti-P49 .....	123
5.4	Évaluation de la spécificité des anticorps anti-P49 par immunobuvardage de type Western ... ..	126
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>129</b>
	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>138</b>
	<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>141</b>



## Liste des figures

Figure 1 : Granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i> (ChfuGV).....	9
Figure 2 : Modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine P49 de SINPV à partir de la structure cristallisée de la protéine P35 de AcMNPV.....	22
Figure 3 : Représentation schématique du clonage du gène codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression procaryote pQE32 (Qiagen).....	56
Figure 4 : Représentation schématique du clonage du gène codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (Invitrogen).....	68
Figure 5 : Profils électrophorétiques du gène <i>p49</i> de ChfuGV amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique (A) et des plasmides recombinants pCR <sup>®</sup> 2.1/ <i>p49</i> digérés par l'endonucléase <i>EcoRI</i> (B).....	81
Figure 6 : Séquence nucléotidique du gène <i>p49</i> de ChfuGV et sa séquence déduite en acides aminés. ...	83
Figure 7 : Alignement multiple des séquences déduites en acides aminés des protéines P49 des granulovirus. ....	89
Figure 8 : Comparaison des profils d'hydrophobicité de la protéine P49 des baculovirus établis à partir des valeurs de Kyte et Doolittle. ....	91
Figure 9 : Profil électrophorétique des produits de la digestion des vecteurs recombinants pQE32 contenant l'ORF codant pour la protéine P49 par les endonucléases <i>BamHI</i> et <i>HindIII</i> .....	95
Figure 10 : Profil électrophorétique de l'expression de la protéine recombinante P49 par les cellules bactériennes <i>E. coli</i> M15 [(pREP4) (pQE32/ <i>p49</i> )] après 4 et 8 heures d'induction par l'IPTG... ..	98
Figure 11 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE A) et par immunobuvardage de type Western B) de la protéine recombinante P49 purifiée à partir des bactéries <i>E. coli</i> M15 [(pREP4) (pQE32/ <i>p49</i> )]. .....	101
Figure 12 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE de la protéine recombinante P49 dialysée et concentrée. ....	104
Figure 13 : Test de confirmation de l'identité de la protéine recombinante P49 par immunobuvardage de type Western. ....	107
Figure 14 : Analyse des profils électrophorétiques des vecteurs recombinants pcDNA3/ <i>p49</i> et pcDNA3/IL-2 et du plasmide pcDNA3 produits pour l'immunisation génétique. ....	110
Figure 15 : Analyse par ELISA de la réponse en anticorps anti-P49 induite par immunisation classique. ....	114

Figure 16 : Analyse par ELISA de la réponse en anticorps anti-P49 induite par immunisation génétique.....	116
Figure 17 : Variation du niveau de production des anticorps anti-P49 durant l'immunisation des groupes de souris Balb/c contrôles. ....	119
Figure 18 : Variation du niveau de production des anticorps anti-P49 au cours de l'immunisation classique et génétique. ....	121
Figure 19 : Titres des anticorps anti-P49 présents dans les différents prélèvements de sérums selon le type d'immunisation. ....	124
Figure 20 : Analyse par immunobuvardage de type Western de la spécificité des anticorps anti-P49 générés par immunisation classique et génétique. ....	127

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Immunisation classique et génétique des souris Balb/c.....	75
Tableau 2 : Comparaison de quelques caractéristiques physico-chimiques de la protéine P49 des baculovirus. ....	87
Tableau 3 : Homologies relatives entre les séquences déduites en acides aminés des protéines P49 des baculovirus. ....	88

## Liste des abréviations

A	:	adénine
$\alpha$	:	alpha
a.a	:	acide aminé
AcMNPV	:	nucléopolyédrovirus multiple de <i>Autographa californica</i>
ADN	:	acide désoxyribonucléique
AdorGV	:	granulovirus de <i>Adoxophyes orana</i>
ARLA	:	Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
ARN	:	acide ribonucléique
$\beta$	:	bêta
BmNPV	:	nucléopolyédrovirus du <i>Bombyx mori</i>
BSA	:	albumine sérique bovine
BV	:	virus bourgeonnant
C	:	cytosine
ChfuGV	:	granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
CPA	:	cellule présentatrice d'antigène
CpGV	:	granulovirus du <i>Cydia pomonella</i>
CrleGV	:	granulovirus de <i>Cryptophlebia leucotreta</i>
CTL	:	lymphocytes T-cytotoxiques
D.O	:	densité optique
<i>E. Coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	:	acide éthylène diamine tétraacétique
ELISA	:	enzyme linked immunosorbent assay
G	:	guanine
GV	:	granulovirus
HaSNPV	:	nucléopolyédrovirus simple de <i>Helicoverpa armigera</i>
HzSNPV	:	nucléopolyédrovirus simple de <i>Helicoverpa zea</i>
IgG	:	immunoglobuline Gamma
IL-2	:	interleukine-2
kb	:	kilobase
kDa	:	kilodalton
$\mu$ g	:	microgramme
$\mu$ l	:	microlitre
mg	:	milligramme
ml	:	millilitre
mM	:	millimolaire
NK	:	cellules tueuses naturelles
nm	:	nanomètre
NPV	:	nucléopolyédrovirus
nt	:	nucléotide
OpNPV	:	nucléopolyédrovirus multiple du <i>Orgyia pseudotsugata</i>
ORF	:	cadre de lecture ouvert ( <i>open reading frame</i> )
OV	:	virus inclus ( <i>occluded virus</i> )

pb	:	paires de base
PBS	:	solution saline phosphatée
PCR	:	réaction de polymérisation en chaîne
PhopGV	:	granulovirus de <i>Phthorimaea operculella</i>
PrGV	:	granulovirus de <i>Pieris rapae</i>
PVDF	:	polyvinylidifluoride
p/v	:	poids par volume
SCF	:	Service canadien des forêts
SDS	:	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	:	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SINPV	:	nucléopolyédrovirus de <i>Spodoptera littoralis</i>
SpltNPV	:	nucléopolyédrovirus de <i>Spodoptera litura</i>
T	:	thymine
TAE	:	Tris acétate EDTA
TE	:	Tris-HCL EDTA
TnMNPV	:	multinucléopolyédrovirus du <i>Trichoplusia ni</i>
UV	:	ultraviolet
V	:	volt
v/v	:	volume par volume
XcGV	:	granulovirus du <i>Xestia c-nigrum</i>
×g	:	force gravitationnelle

# **Introduction**

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens), est un lépidoptère indigène des forêts nord-américaines. Cet insecte représente l'un des plus importants ravageurs des espèces de conifères. Face aux épidémies cycliques de la tordeuse et aux répercussions sur les ressources forestières et sur l'économie en générale, de nombreuses stratégies ont été adoptées pour lutter contre cet insecte (Bonneau et al., 2003; Service canadien des forêts (SCF), 2000). Parmi celles-ci, le recours aux bioinsecticides s'avère indispensable face aux contraintes reliées à l'usage des insecticides chimiques, incluant l'émergence d'insectes résistants, l'élimination d'insectes non ciblés et surtout la contamination environnementale.

Depuis déjà de nombreuses années, les baculovirus ont été reconnus comme des agents efficaces dans le contrôle des insectes ravageurs, principalement ceux de l'ordre des lépidoptères. L'utilisation du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV), un membre de la famille des baculovirus, constitue une alternative prometteuse dans la lutte contre la tordeuse des bougeons de l'épinette. En effet, le ChfuGV présente de nombreux avantages qui résident principalement, dans son degré de spécificité accrue envers l'insecte ciblé, dans sa stabilité environnementale et la facilité de sa production (Forté et Guertin, 1999; Guertin, 1995). Cependant, bien que son potentiel contre la tordeuse ait été démontré, l'étude moléculaire du ChfuGV demeure indispensable afin d'appuyer l'intégration d'un tel outil dans le contrôle biologique. Dans notre laboratoire, un projet d'envergure a été entrepris afin de caractériser le ChfuGV au niveau génomique et protéomique. Plus particulièrement, ce projet de recherche s'intéresse à l'étude du gène *p49* de ChfuGV et de son produit, la protéine P49.

Les organismes multicellulaires utilisent l'apoptose non seulement comme mécanisme pour le développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire mais aussi comme moyen de défense contre les infections opportunistes, notamment celles d'origine virales. Toutefois, pour assurer leur survie dans les cellules hôtes, les baculovirus ont le potentiel d'exprimer certaines protéines qui ciblent et inhibent des points stratégiques du processus apoptotique (Hasnain et al., 2003). La protéine P49 des baculovirus représente une classe majeure de protéines anti-apoptotiques exprimée durant la phase précoce et tardive du cycle d'infection virale (Du et al., 1999; Liu et al., 2003). Cette protéine s'associe et inhibe directement les caspases initiatrices et effectrices de

l'apoptose (Pei et *al.*, 2002; Zoog et *al.*, 2002). Jusqu'à présent, le rôle fonctionnel de la protéine P49 a été caractérisé uniquement chez le baculovirus du genre nucléopolyédrovirus de *Spodoptera littoralis* (SINPV). Cependant, les ORF codant pour la protéine P49 ont été identifiés chez d'autres baculovirus.

L'importance des protéines anti-apoptotiques dans la pathogenèse virale nous a incités à émettre l'hypothèse selon laquelle le ChfuGV devrait aussi exprimer une protéine anti-apoptotique telle que la P49 d'autres baculovirus, afin d'assurer sa survie chez l'hôte. Ce projet de recherche vise donc à démontrer, et ce pour la première fois, la présence du gène *p49* dans le génome de ChfuGV. À cette fin, le gène codant pour la protéine P49 du ChfuGV devait être localisé, cloné puis séquencé avant d'analyser sa séquence nucléotidique et celle déduite en acides aminés. Cette caractérisation moléculaire devait nous permettre en premier lieu de confirmer l'identité du gène *p49* de ChfuGV et, en second lieu, de réaliser son sous-clonage dans des vecteurs d'expression procaryote et eucaryote. Les produits d'expression ont servi dans les expériences d'immunisation de souris afin de produire des anticorps polyclonaux spécifiques à la P49.

Ainsi, l'objectif général de cette étude a été d'apporter une contribution significative au projet d'envergure, en cours dans nos laboratoires, visant la caractérisation génomique et protéomique du ChfuGV. Grâce à cette étude, les anticorps anti-P49 produits sont actuellement utilisés dans nos laboratoires, dans des projets visant à démontrer le rôle fonctionnel de la protéine P49 de ChfuGV. Avec ces anticorps anti-P49, d'autres projets permettraient, notamment par les techniques d'immunohistochimie, de localiser la protéine P49 dans les tissus larvaires et de démontrer son expression temporelle durant le cycle d'infection virale.

Ce projet de recherche permettra sans aucun doute d'améliorer nos connaissances sur la biologie moléculaire du ChfuGV et sur son interaction avec l'insecte hôte durant la pathogenèse associée à l'infection virale.



# **Revue bibliographique**

## 1 Tordeuse des bourgeons de l'épinette

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* [Clem.], est un lépidoptère de la famille *Tortricidae*, considéré comme le ravageur le plus nuisible des forêts de résineux en Amérique du Nord. Cet insecte s'attaque particulièrement au sapin baumier [*Abies balsamea* (L.)], à l'épinette blanche [*Picea glauca* (Moench) Voss], à l'épinette rouge [*Picea rubens* Sarg (L)] et à l'épinette noire [*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.] (Bonneau et al., 2003). Toutefois, en période épidémique, un élargissement de son spectre d'hôtes peut se produire entraînant des dommages à d'autres essences résineuses. Au Canada, plus de 25 essences de conifères peuvent être attaquées par la tordeuse. Cet insecte forestier se nourrit des feuillages des conifères, soit des nouvelles pousses et des aiguilles. La défoliation résultante a pour conséquence une diminution de l'activité photosynthétique suivi du ralentissement de la croissance des conifères. Des analyses dendrochronologiques, permettant la mesure de la largeur des cernes des arbres, ont en fait démontré que la défoliation des conifères par la tordeuse entraîne une réduction de l'accroissement radiale le long de la tige et du système racinaire (Krause et Morin, 1999). En général, la mortalité des conifères infestés survient après 3 à 4 années de défoliations consécutives sévères (Service canadien des forêts (SCF), 1999).

La défoliation causée par la tordeuse des bourgeons de l'épinette s'étend sur toutes les écozones forestières du Canada. Depuis au moins le XVIII<sup>e</sup> siècle, les populations de cet insecte ont atteint des proportions épidémiques sur de grandes étendues de forêts, à des intervalles réguliers d'environ 30 ans (Blais, 1983; Krause, 1997; Morin et Laprise, 1990). Une étude récente a révélé que la fréquence de ces épidémies est demeurée stable depuis le milieu du XVI<sup>e</sup> siècle (Boulanger et Arseneault, 2004). Au XX<sup>e</sup> siècle, la dernière épidémie qui a sévit au Québec entre 1967 et 1992 a dévasté plus de 55 Mha de forêts, détruisant entre 139 Mm<sup>3</sup> et 238 Mm<sup>3</sup> de sapin et d'épinette. Les pertes enregistrées durant cette période représentent 10 années d'exploitation du bois par l'industrie forestière, soit une valeur de 14 milliards de dollars (Bonneau et al., 2003; Morin, 1998; SCF, 2000).

Plusieurs stratégies gouvernementales ont été adoptées afin de prévenir les pertes de matières

ligneuses et ainsi d'atténuer l'impact socio-économique des épidémies de la tordeuse. La lutte biologique s'avère la plus efficace approche pouvant minimiser les ravages des ressources forestières causés par cet insecte. Au Québec, la bactérie *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* est utilisée depuis 1987 comme agent biologique dans le contrôle des populations de la tordeuse (Bonneau et al., 2003; Dorais et al., 1995; Cooke et Régnière, 1999). Cependant, devant l'importance des enjeux économiques et des risques d'une adaptation des insectes à la bactérie *B. thuringiensis*, des études ont été menées sur d'autres insecticides biologiques, notamment sur la famille des baculovirus. Dans cette famille, le ChfuGV (granulovirus de *Choristoneura fumiferana*) constitue un pathogène naturel de la tordeuse (Bird et al., 1959). Des études ont déjà démontré le potentiel du ChfuGV dans le contrôle des populations de *C. fumiferana* et suggère que son utilisation serait une alternative prometteuse dans la lutte biologique (Forté et Guertin, 1999; Guertin, 1995).

## 2 Baculovirus

### 2.1 Généralités

La famille *Baculoviridae* regroupe plus de 600 espèces virales divisées en deux genres, soit les granulovirus (GV) et les nucléopolyédrovirus (NPV) (Volkman et al., 1995). Le nom de cette famille provient du terme latin *baculum* qui signifie bâtonnet et fait référence à la morphologie de la nucléocapside virale. Les virions ont un génome d'ADN bicaténaire et circulaire de taille variant entre 80 et 180 kb (Blissard, 1996). Le génome viral est contenu dans une nucléocapside enveloppée qui est entourée d'une matrice protéique, appelé corps d'inclusion. Le corps d'inclusion stabilise les virions de façon à les maintenir viables et infectieux dans l'environnement durant de longues périodes (Javis et Garcia, 1994; Rohrmann, 1992; Volkman et al., 1995). Les deux genres de baculovirus sont différenciés selon la structure du corps d'inclusion (Van Regenmortel et al., 2000). Chez les GV, le corps d'inclusion présente un diamètre de 0.25 à 0.5 µm et est principalement constitué de la protéine appelée granuline. Les GV forment généralement un seul virion à l'intérieur du corps d'inclusion (Winstanley et O'Reilly, 1999; Rohrmann, 1992). Les NPV ont une forme polyédrique et leur corps d'inclusion, d'un diamètre de 1 à 15 µm, est majoritairement composé de la protéine appelée polyédrine. Les

NPV peuvent renfermer plus de 100 virions dans le corps d'inclusion. Il existe deux formes de NPV, soit les NPV multiples (MNPV) dont les virions sont regroupés dans la même enveloppe et les NPV simples (SNPV) qui présentent des virions enveloppés individuellement (Kelly, 1982; Rohrmann, 1992 et 1999).

Les baculovirus infectent les arthropodes principalement les insectes de l'ordre des lépidoptères, des hyménoptères, des diptères, des trichoptères et des coléoptères. Les NPV constituent l'un des larges groupes de virus d'insectes le plus diversifié et le plus étudié. L'infection par les GV est particulièrement limitée aux larves des lépidoptères appartenant aux familles *Tortricidae*, *Noctuidae*, *Pyralidae* et *Pieridae* (Tanada et Hess, 1991, Van Regenmortel et al., 2000; Wood et Granados, 1991). En général, la nomenclature des baculovirus se base sur l'hôte à partir duquel le virus a été initialement isolé. Ainsi, le granulovirus qui infecte *Choristoneura fumiferana* est nommé *Choristoneura fumiferana* granulovirus (ChfuGV).

L'intérêt des chercheurs pour l'étude des baculovirus a pris de l'ampleur particulièrement depuis la découverte de leur potentiel insecticide. De plus, l'avènement de la biotechnologie et du génie génétique a favorisé la construction de baculovirus recombinants exprimant des gènes étrangers. Le progrès dans le développement de systèmes de cultures cellulaires pour la propagation de certains baculovirus a grandement contribué à la compréhension des propriétés de ces virus.

## **2.2 Potentiel insecticide des baculovirus et leurs avantages dans la lutte biologique**

Le potentiel des baculovirus dans le contrôle des populations d'insectes ravageurs a été reconnu depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle. Ces virus peuvent infecter plus de 600 espèces d'arthropodes mais leur spectre d'hôte individuel est limité à une ou quelques espèces reliées phylogénétiquement. Grâce à leur spécificité et ainsi à leur innocuité envers les organismes non ciblés, les baculovirus représentent des agents de choix dans les programmes de lutte biologique (Moscadi, 1999). De plus, les GV et les NPV ont la capacité de persister dans l'environnement grâce à la protection conférée par leur corps d'inclusion (Javis et Garcis, 1994; Miller, 1996). Depuis quelques années, certains baculovirus ont été modifiés génétiquement afin d'améliorer l'efficacité de leur virulence envers les espèces ciblées et, par conséquent, d'accroître leur

intérêt économique (Bonning et Hammock, 1996). Le MNPV d'*Autographa californica* (AcMNPV), le mieux étudié des baculovirus, a été le premier organisme génétiquement modifié à être appliqué comme insecticide biologique (biocide) dans l'environnement (Bishop, 1986).

Plusieurs baculovirus ont été homologués comme biocides en agriculture et en foresterie dans divers pays. Au Canada, certains NPV et GV ont été produits à l'échelle industrielle pour le contrôle de certains insectes ravageurs (SCF, 1999). Le Lecontevirus (*Neodiprion lecontei* NPV) a été notamment utilisé pour lutter contre le Diprion de Leconte (*Neodiprion lecontei* [Fitch]). Les GV ont été utilisés avec succès dans le programme de la lutte biologique, notamment contre la teigne de la pomme de terre (*Phthorimaea operculella*) et la pyrale indienne de la farine (*Plodia interpunctella*) (McGaughey, 1975; Reed et Springett, 1971). Le PrGV (*Pieris rapae* GV) a joué un rôle majeur dans la diminution des populations de la Piéride de la rave (*Pieris rapae*) (Jacques, 1973). Depuis l'an 2000, le GV de *Cydia pomonella* a été commercialisé pour lutter contre le carpocapse dans les cultures de pommes (ARLA, 2000).

### **3 Granulovirus**

#### **3.1 Propriétés morphologiques et structurales des granulovirus**

La structure des GV a été initialement examinée par microscopie électronique en 1963. Les GV présentent une forme ovocylindrique mesurant 300 nm à 500 nm de longueur par 120 nm à 350 nm de largeur (Tweeten et *al.*, 1981). Le ChfuGV présente notamment une dimension d'environ 343 nm par 195 nm (figure 1). Le corps d'inclusion des GV, formé essentiellement de granuline, entoure une nucléocapside enveloppée à l'intérieur de laquelle se trouve le génome viral. Aussi bien chez les GV que chez les NPV, le corps d'inclusion confère aux virions une protection contre les dangers environnementaux tels que les rayons ultraviolets et la dessiccation. Le corps d'inclusion est enveloppé et ainsi stabilisé dans une structure protéique appelée le calice (Russell et Rohrmann, 1990; Gross et *al.*, 1994).

Les baculovirus acquièrent le corps d'inclusion à la fin du cycle d'infection virale et sont de

**Figure 1 : Granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV).**

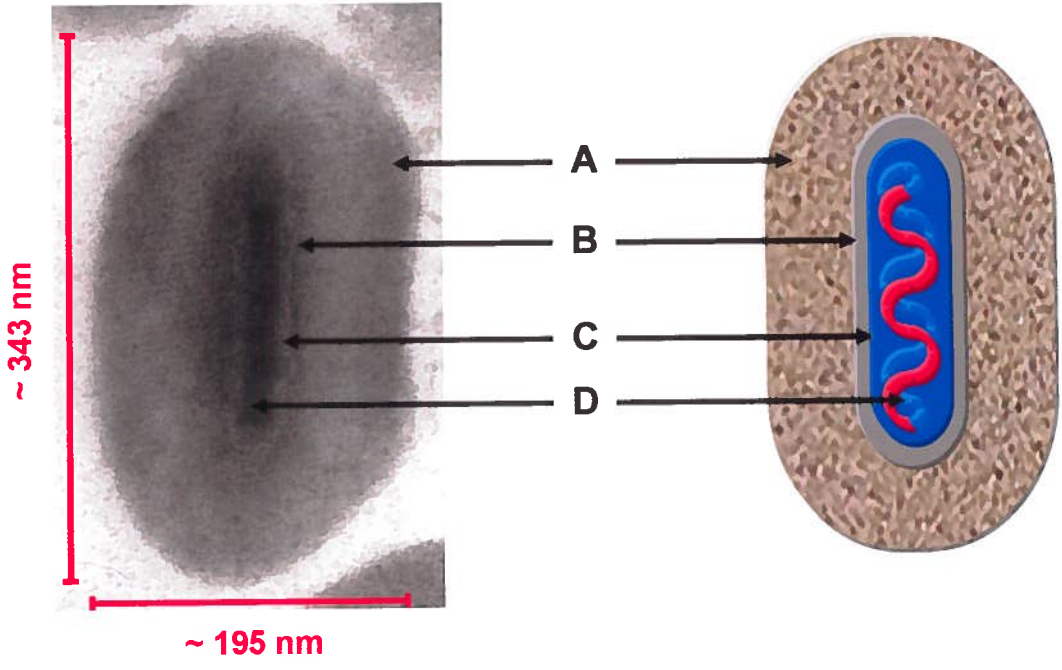
Photographie du ChfuGV, obtenue par microscopie électronique à un agrandissement de 200 000 X, accompagnée de sa représentation schématique montrant :

**A** : le corps d'inclusion

**B** : l'enveloppe

**C** : la nucléocapside

**D** : l'ADN génomique



phénotype OV (virus inclus). Ce phénotype assure la transmission horizontale du virus dans l'environnement, soit sa propagation d'un insecte à l'autre (Blissard, 1996). Un autre phénotype caractérise les GV et les NPV, il s'agit du phénotype BV (virus bourgeonnants ou non inclus). Celui-ci est produit durant le cycle d'infection virale et se distingue morphologiquement du phénotype OV par l'absence du corps d'inclusion. Les virus de phénotype BV sont constitués d'une seule nucléocapside enveloppée et sont responsables de la propagation du virus au sein des cellules de l'insecte hôte (Blissard, 1996; Rohrmann, 1992). La biologie des deux phénotypes des GV est détaillée dans la section 3.3.1 de ce chapitre.

Les GV ont une nucléocapside enveloppée en forme de bâtonnet de 260 nm à 360 nm de longueur et de 30 nm à 60 nm de largeur. L'enveloppe des virions forme trois couches lipoprotéiques de 5 nm à 6 nm d'épaisseur (Tweeten et *al.*, 1981). Une région appelée le tégument espace la nucléocapside de l'enveloppe (Kawamoto et *al.*, 1977). La nucléocapside est composée de sous-unités protéiques, assemblées en anneaux et empilés les uns sur les autres parallèlement à son axe. Cette structure protéique permet entre autres de protéger le génome viral de l'action des exonucléases (Blissard, 1996).

## **3.2 Génome des Granulovirus**

### **3.2.1 Structure et organisation**

Les granulovirus ont été initialement identifiés comme des virus à ADN par Wyatt en 1952. L'ADN génomique des GV est bicaténaire circulaire dont la taille varie de 99 657 pb, chez *Adoxophyes orana* GV (AdorGV), à 178 733 pb, chez *Xestia c-nigrum* GV (XcGV) (Hayakawa et *al.*, 1999; Wormleaton et *al.*, 2003). La taille du génome de ChfuGV a été estimée à environ 107 kb (Arif et *al.*, 1986). L'ADN circulaire des GV est principalement sous une forme relâchée avec 21 % à 24 % du génome sous une forme de super hélice (Tweeten et *al.*, 1981). Les séquences génomiques des GV renferment entre 119 et 181 cadres de lecture ouverts (ORF). Jusqu'à 96 % de ces ORF ont des homologues de séquences avec ceux des autres baculovirus (Lange et Jehle, 2003). En général, les ORF des baculovirus ont une distance intergénique minimale (jusqu'à 200 pb), pouvant même se chevaucher, et sont orientés dans les deux sens sur



le génome (Miller, 1996). Le génome de AdorGV présente 56.3 % de ses ORF orientés dans le sens des aiguilles d'une montre alors que le restant est orienté dans le sens opposé (Wormleaton et *al.*, 2003). L'orientation et l'ordre des gènes sont essentiellement conservés à travers les granulovirus (Lange et Jehle, 2003; Wormleaton et *al.*, 2003). Toutefois, des études comparatives sur l'organisation génomique des baculovirus ont révélé une faible conservation entre les GV et les NPV (Hashimoto et *al.*, 2000; Hayakaya et *al.*, 1999).

Par convention, la numérotation des nucléotides du génome des GV est initiée à partir de l'adénine du codon d'initiation de la traduction du gène de la granuline et dans le sens de la transcription de ce gène (sens des aiguilles d'une montre). Dans le cas des NPV, le premier nucléotide de leur génome est représenté par l'adénine du codon d'initiation de la traduction du gène de la polyédrine (Luque et *al.*, 2001; Garcia-Maruniak et *al.*, 2004).

### **3.2.2 Régulation de l'expression des gènes**

Chez les baculovirus, l'expression des gènes est régulée selon un modèle en cascade temporelle et coordonnée. Les gènes sont successivement exprimés en quatre phases interdépendantes permettant la régulation du cycle d'infection virale. Il s'agit de la phase précoce immédiate, de la phase précoce, de la phase tardive et de la phase très tardive de l'expression virale. Le contrôle de l'expression est principalement effectué au niveau de la région promotrice des gènes (Friesen, 1997; Lu et Miller, 1997).

Les gènes précoces immédiats et les gènes précoces (aussi appelés gènes  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement) sont transcrits par l'ARN polymérase II de la cellule hôte et leur expression précède la réplication du génome viral (Huh et Weaver, 1990; Blissard et Rohrmann, 1990; Blissard, 1996). Ces gènes ont une région promotrice contenant la boîte TATA située à environ 25 à 31 pb en amont du site d'initiation de la transcription CAGT. La région promotrice des gènes précoces peut comprendre d'autres éléments reconnus par l'ARN polymérase II de la cellule hôte, notamment les motifs (T/A)GATA(A/G) et CACGTG (Kogan et Blissard, 1994; Krappa et *al.*, 1992). L'expression des gènes précoces immédiats ne requiert aucun facteur viral ni produit trans-régulateur nécessaire à l'expression des gènes précoces (Blissard et Rohrmann, 1990).

Les produits des gènes précoces immédiats et des gènes précoces interviennent dans la régulation de la transcription des gènes viraux, dans la synthèse de l'ADN viral et dans l'expression des autres catégories de gènes (Lu et Carstens, 1993).

Les gènes tardifs et les gènes très tardifs (aussi appelés gènes  $\gamma$  et  $\delta$  respectivement) sont transcrits par l'ARN polymérase viral qui reconnaît le site d'initiation de la transcription (A/G/T)TAAG situé dans leur région promotrice (Ayres et *al.*, 1994; Blissard et Rohrmann, 1990). Cependant, la transcription de certains gènes tardifs des baculovirus peut être initiée à partir d'autres sites, notamment à partir des séquences TATTG, ATTAG ou GTAAAAC (Carstens et *al.*, 1993; Kuzio et *al.*, 1989; Wu et Miller, 1989). Les gènes tardifs sont exprimés pendant et après la réplication du génome viral (entre 12 à 24 heures post-infection). L'expression de ces gènes est essentielle à la production des protéines structurales, à la synthèse de l'ADN viral et à l'expression des gènes très tardifs. Suite à la réplication de l'ADN viral, les gènes très tardifs sont fortement exprimés (à partir de 18 heures post-infection) et leurs produits sont impliqués dans la formation du corps d'inclusion. En plus du motif (A/G/T)TAAG, d'autres éléments du promoteur, notamment la région non transcrite (5' UTR), sont requis pour l'expression des gènes très tardifs. L'expression de ces gènes demeure ainsi active jusqu'à la lyse cellulaire (Mans et Knebel-Morsdorf, 1998; Yang et Miller, 1999).

Certains gènes des baculovirus, notamment le gène *p49*, peuvent appartenir aux catégories de gènes précoces et tardifs (Du et *al.*, 1999). Ces gènes possèdent ainsi une région promotrice contenant les sites d'initiation de la transcription précoce et tardive. L'expression de ces gènes est essentielle à la progression du cycle d'infection virale.

### **3.3 Processus d'infection et de réplication des granulovirus**

#### **3.3.1 Infection et réplication *in vivo* des granulovirus**

Les granulovirus, tout comme les nucléopolyédrovirus, se caractérisent par un cycle d'infection biphasique durant lequel deux phénotypes viraux, de structure et de fonction distinctes, sont produits. La première phase d'infection génère les virus de phénotype bourgeonnants (BV).

Ces derniers initient la seconde phase d'infection en causant une infection systémique et polyorganotrophique, soit la propagation de l'infection virale à travers les organes de l'insecte hôte. La phase secondaire de l'infection est caractérisée par la production des virus de phénotype inclus (OV) qui, une fois relâchés dans l'environnement, assurent l'initiation du cycle d'infection au sein des populations d'insectes hôtes (Federici, 1997; Rohrmann, 1992).

### **3.3.1.1 Phase primaire du cycle d'infection**

Le processus d'infection par les granulovirus est initié lorsque les insectes hôtes se nourrissent de feuillages contaminés par les virus inclus (OV). Ces derniers, une fois ingérés, sont transportés vers l'intestin moyen de l'insecte dont le pH alcalin entraîne la dissolution du corps d'inclusion viral. Les nucléocapsides enveloppées sont libérées et ciblent les cellules épithéliales de l'intestin pour déclencher la phase primaire du cycle d'infection (Blissard, 1996). Il a été démontré que les virions dégradent la membrane péritrophique recouvrant l'épithélium intestinal de l'insecte, pour acheminer les nucléocapsides enveloppées vers leurs cellules cibles (Granados et Corsaro, 1990; Wang et *al.*, 1994). Les nucléocapsides enveloppées s'adsorbent aux cellules épithéliales de l'intestin par interaction avec des sites de liaison spécifiques situés au niveau des bordures en brosse membranaires. L'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire permettant l'entrée de la nucléocapside dans le cytoplasme. Par un mécanisme impliquant les microtubules de la cellule, la nucléocapside est dirigée vers la membrane nucléaire (Lanier et Volkman, 1998). Le génome viral est ensuite introduit dans le noyau via les pores nucléaires tandis que la capsid demeure dans le cytoplasme. Il se produit une période d'éclipse dans le noyau (d'environ 12 à 18 heures) durant laquelle a lieu la réplication du génome viral, l'expression de certaines protéines virales et la synthèse de la nouvelle génération de nucléocapsides. La réplication de l'ADN viral entraîne la formation dans le noyau d'un stroma virogène impliqué dans l'assemblage des nucléocapsides (Granados, 1980). Durant cette période, une hypertrophie du noyau cellulaire se produit entraînant la désintégration de la membrane nucléaire (Blissard et Rohrmann, 1990; Granados, 1980). Une fois assemblées dans le noyau, les nucléocapsides sont transportées vers la membrane plasmique qui a été modifiée par des protéines virales. Les virions de phénotype BV acquièrent leur enveloppe par bourgeonnement à travers la membrane plasmique modifiée. Ils

initient alors la seconde phase du cycle d'infection (Blissard, 1996; Rohrmann, 1992).

### **3.3.1.2 Phase secondaire du cycle d'infection**

La libération des virus bourgeonnants (BV) dans l'hémolymphe de l'insecte amorce la phase secondaire du cycle d'infection. En plus des cellules épithéliales, plusieurs autres types cellulaires sont susceptibles à l'infection par les BV notamment les cellules du corps gras, du système trachéen, les cellules musculaires et les hémocytes. Contrairement aux virus inclus, les BV entrent dans les cellules par le processus d'endocytose (Blissard, 1996). Suite à l'internalisation du virus dans l'endosome, l'acidification du milieu favorise la fusion de l'enveloppe virale et endosomale qui est suivie par la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme. Par l'intermédiaire des filaments d'actine nouvellement formés, la nucléocapside est transportée vers le noyau (Blissard, 1996; Lanier et Volkmann, 1998). Dans le noyau, la réplication de l'ADN viral est associée à la formation d'un stroma virogène plus important que celui observé lors de l'infection par les OV (Tweeten et *al.*, 1981). Suite à l'expression du génome viral, les nucléocapsides sont générés et peuvent acquérir soit le phénotype BV, soit le phénotype OV. Il a été démontré que, durant le cycle d'infection, environ 16 % des copies de l'ADN viral générées se retrouvent dans les virions de phénotype BV alors que le restant se retrouve dans les virions de phénotype OV (Rosinski et *al.*, 2002). Les virus de phénotype OV sont produits au stade final du cycle d'infection. Ainsi, les nucléocapsides virales se procurent l'enveloppe par invagination de la membrane nucléaire interne, un procédé aussi appelé la synthèse de *novo* (Williams et Faulkner, 1997). Les virions ayant acquis leur corps d'inclusion, s'accumulent à l'intérieur des cellules infectées et entraînent la lyse cellulaire. Les virus inclus sont disséminés dans l'environnement et peuvent ainsi initier un nouveau cycle d'infection (Blissard et Rohrmann, 1990; Blissard, 1996).

### **3.3.2 Infection et réplication *in vitro* des granulovirus**

Les études du processus d'infection *in vitro* par les GV sont limitées à cause de la difficulté à développer des lignées cellulaires permissives. Contrairement aux NPV, les GV sont difficiles à propager et à maintenir en culture cellulaire (Winstanley et Crook, 1993). À l'origine, l'infection

par les GV réalisée *in vitro* a été rapportée dans les cultures primaires de *Lymantria dispar* inoculées par le GV de *Pieris brassicae* (Tweeten et al., 1981). Cependant, la production virale dans cette culture cellulaire a été irrégulière et incomplète. La première culture cellulaire permissive pour les GV a été établie pour la propagation du GV de *Cydia pomonella* (CpGV) (Winstenley et Crook, 1993). Les auteurs de cette étude ont rapporté que les stades du cycle d'infection de CpGV en culture cellulaire sont similaires à ceux observés *in vivo*. Les GV de *Phthorimaea operculella* et *Spodoptera littoralis* ont été par la suite propagés dans la lignée cellulaire issue des cellules d'organes de *Phthorimaea operculella* (Lery et al., 1997a et b).

Les baculovirus du genre NPV se répliquent plus aisément en culture cellulaire. La disponibilité de tels systèmes pour la propagation des NPV a favorisé les études notamment sur la biologie moléculaire de ces virus (Miltener et al., 1984; Volkman et Knudson, 1988). Toutefois, il a été démontré que seuls les virus de phénotype BV sont infectieux en culture cellulaire, contrairement au mécanisme *in vivo* impliquant les deux phénotypes, BV et OV, dans le cycle d'infection (Granados, 1980).

### **3.4 Interaction des baculovirus avec les cellules hôtes**

#### **3.4.1 Réponse cellulaire à l'infection virale : l'apoptose**

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique essentiel au développement et au maintien de l'homéostasie tissulaire des organismes multicellulaires (Vaux et Strasser 1996). Au cours de ce processus, les cellules mettent en place des "mécanismes de suicide" qui se traduisent par de nombreux changements morphologiques : la membrane plasmique se désorganise et exprime des signaux pro-phagocytaires, des corps apoptotiques sont formés et la chromatine se condense avant d'être dégradée en un profil caractéristique dit en "barreaux d'échelle" (Hasnain et al., 2003; Wyllie et al., 1980). L'intégrité des organelles cellulaires est préservée durant ce processus. Les corps apoptotiques formés sont ensuite rapidement phagocytés par les cellules adjacentes afin de prévenir l'établissement d'une réaction inflammatoire. L'apoptose est un processus conservé à travers les espèces. Selon un modèle en cascade, la transduction des voies de suicide cellulaire entraîne l'activation protéolytique d'une

famille de protéases à cystéine appelée caspases. Une fois activées, ces protéases clivent leur substrats protéiques à des sites spécifiques contenant un résidu aspartate, engageant ainsi la phase terminale et irréversible de l'apoptose (Chang et Yang, 2000).

L'apoptose cellulaire est activée en réponse à divers stimuli. Ce processus est notamment déclenché lors d'une infection opportuniste afin d'éliminer sa propagation (Thomson, 1995; Hay et Kannourakis, 2002; Williams, 1994). Dans le cas d'une infection virale, l'apoptose affecte la pathogenèse virale, l'établissement d'une infection latente et persistante ainsi que la réplication virale (Antoni et *al.*, 1995; Clem et Miller, 1993). L'induction de l'apoptose par les baculovirus a été initialement observée dans les cellules d'insectes Sf21 infectées par un mutant de AcMNPV, dont le gène *p35* est inactif (Clem et *al.*, 1991). Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'induction de l'apoptose dans les cellules infectées par les baculovirus est peu connu. Clem et Miller (1994) ont suggéré que ce mécanisme était relié à la perturbation du métabolisme cellulaire causée par l'activité biosynthétique virale. Certaines évidences suggèrent que l'apoptose peut être stimulée par l'attachement viral aux récepteurs cellulaires, par les trans-activateurs précoces et les facteurs viraux impliqués dans la réplication de l'ADN viral. Il a été démontré que la protéine trans-activatrice IE1, produit du gène précoce immédiat *ie1*, stimule l'apoptose et que son niveau d'induction est accentué en présence du produit du gène précoce *pe38* (Zhang et *al.*, 2002; Prikhod'ko et Miller, 1996 et 1999). L'apoptose semble être induite durant la phase précoce de l'infection virale (Ishikawa et *al.*, 2003). D'autres études ont révélées que la synthèse de l'ADN viral et l'expression des gènes tardifs contribuent également à l'induction de l'apoptose (Clem et Miller, 1993; LaCount et Friesen, 1997). Dans le but d'assurer leur réplication dans les cellules hôtes, les baculovirus ont cependant développé diverses stratégies leur permettant d'inhiber l'apoptose cellulaire.

### **3.4.2 Stratégies des baculovirus dans l'inhibition de l'apoptose cellulaire**

Les baculovirus font partie des premiers virus dont le potentiel à inhiber la réponse apoptotique de l'hôte a été démontré (Clem et *al.*, 1991). Ces virus se caractérisent par l'expression de trois classes de protéines qui ciblent et inhibent des points stratégiques des voies apoptotiques. Il s'agit de la protéine P35, des protéines inhibitrices de l'apoptose appelées IAP et de la

protéine P49. Ces protéines anti-apoptotiques agissent directement ou indirectement sur les caspases activées en réponse à l'infection virale.

Parmi les classes de protéines anti-apoptotiques des baculovirus, la P35 est la plus étudiée. Initialement identifiée chez AcMNPV, la P35 inhibe l'apoptose induite par différentes voies de transduction (Hasnain et *al.*, 2003). Son activité anti-apoptotique a été démontrée non seulement dans les cellules d'insectes mais aussi dans les cellules de plusieurs systèmes hétérologues tels que les nématodes et les mammifères (Beidler et *al.*, 1995; Hay et *al.*, 1994; Sugimoto et *al.*, 1994). Jusqu'à présent, cette protéine de 35 kDa n'a aucun homologue cellulaire et est exprimée uniquement par quelques NPV en plus de AcMNPV, notamment par BmNPV et TnMNPV. Produite durant la phase précoce et tardive de l'infection virale, la P35 cible et inhibe directement plusieurs caspases effectrices de l'apoptose de type I, II et III, dont les caspases-1, -3, -6, -7, -8 et -10 (Bump et *al.*, 1995, Bertin et *al.*, 1996, Zhou et *al.*, 1998). Au niveau moléculaire, la P35 agit en substrat de ces caspases et se fait cliver en deux fragments de 10 kDa et 25 kDa. Ces fragments, une fois générés, forment un complexe stable avec la caspase ciblée pour l'inactiver. Sur la séquence de la P35 de AcMNPV, le clivage par les caspases se fait au niveau du résidu aspartate situé en position 87 du motif de reconnaissance  $^{84}\text{DQMD}^{87}\downarrow\text{G}$  (Bertin et *al.*, 1996; Xue et Horvitz, 1995). L'inhibition fonctionnelle des caspases par la P35 se fait de façon stoechiométrique. Une étude *in vitro* de cette interaction a révélé d'une part, que la P35 inhibe à 90 % l'activité de la caspase-1 et d'autre part, que cette inhibition est irréversible et maximale lorsque les deux produits sont en concentration équimolaire (Bump et *al.*, 1995). Il a été également démontré que la P35 peut agir comme antioxydant lors de l'apoptose induite par les espèces réactives d'oxygène (Sah et *al.*, 1999). La structure tridimensionnelle de la P35, établie par Fisher et *al.* (1999), présentent le polypeptide comme un monomère globulaire. Le domaine d'interaction avec les caspases forme une boucle réactive appelé RSL (*Reactive Site Loop*) constituée de résidus hydrophobes et exposant le site de clivage (Fisher et *al.*, 1999). La RSL contribue à la stabilité de la P35 qui, une fois clivée, forme une liaison covalente avec la caspase ciblée (Riedl et *al.*, 2001).

Les IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) représentent une famille de protéines anti-apoptotiques initialement caractérisées chez les baculovirus puis chez les insectes et les mammifères. À

l'exception du NPV de *Culex nigripalpus*, tous les baculovirus dont le génome a été séquencé possèdent au moins un gène codant pour une IAP (Afonso et *al.*, 2001; Ikeda et *al.*, 2004). Tout comme la P35, les IAP des baculovirus inhibent l'apoptose induite par différents stimuli et dans différents systèmes. Toutefois, les IAP sont des protéines structurellement différentes de la P35. Ces protéines possèdent un domaine répété riche en cystéine, appelé BIR (*Baculovirus IAP Repeat*), présent en une à trois copies dans l'extrémité N-terminale de leur séquence peptidique. Les IAP se caractérisent également par la présence d'un motif en doigt de zinc appelé RING, situé à leur extrémité C-terminale (Deveraux et Reed, 1999). Ces deux motifs sont essentiels à l'activité anti-apoptotique des IAP. Par ailleurs, le mode d'action des IAP est différent de celui de la P35. En fait, les IAP semblent fonctionner en amont de la P35 (Manji et *al.*, 1997). Ces protéines inhibent l'apoptose en supprimant l'activation protéolytique des caspases. Il a été démontré que, contrairement à la P35, les IAP sont incapables de bloquer l'apoptose une fois que les caspases ciblées sont activées (Seshagiri et Miller, 1997). D'autres études ont révélé que les IAP des baculovirus inhibent l'apoptose chez la drosophile par interaction avec les protéines pro-apoptotiques *Doom*, *hid*, *grim* et *reaper* (Harvey et *al.*, 1997; Vucic et *al.*, 1997 et 1998).

#### **4 La protéine P49 des baculovirus**

La protéine P49 représente une autre classe de protéines anti-apoptotiques identifiées chez les baculovirus. Jusqu'à présent, l'activité de la P49 a été caractérisée uniquement chez les NPV de *Spodoptera littoralis* (SINPV) (Du et *al.*, 1999). La protéine P49 présente des homologies structurales et fonctionnelles avec la protéine P35. En raison de ces homologies, la protéine P49 est considérée comme un second membre de la famille de la P35 (Jabbour et *al.*, 2002; Jabbour et Hawkins, 2004). Le rôle de la P49 dans l'infection virale a été démontré par sa capacité à inhiber l'apoptose dans les cellules d'insectes SF9, infectées par AcMNPV défectueux au niveau du gène *p35* (Du et *al.*, 1999). Le nom de cette protéine provient de sa masse moléculaire de 49 kDa.

##### **4.1 Rôle fonctionnel de la protéine P49**

La protéine P49 inhibe l'apoptose induite dans les cellules hôtes suite à l'infection virale.



L'activité anti-apoptotique de cette protéine a été observée aussi bien dans les cellules d'insectes que dans divers systèmes tels que les cellules de mammifères et les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Jabbour et al., 2002). Ainsi, il a été suggéré que la protéine P49 agit à une étape conservée dans le processus du suicide cellulaire.

Comme la P35, la protéine P49 est un inhibiteur direct de diverses caspases effectrices de l'apoptose. Cependant, Zoog et al. (2002) ont démontré que la protéine P49 inhibe également les caspases initiatrices de l'apoptose qui sont insensibles à l'activité de la P35. L'inhibition de ces caspases empêche, par conséquent, l'activation protéolytique des caspases effectrices de l'apoptose. Dans les cellules SF21, la protéine P49 bloque l'activation protéolytique des caspases effectrices *Sf*-caspase-1 et -2 en empêchant le clivage de leur forme inactive par la caspase initiatrice *Sf*-caspase-X (Manji et Friesen 2001; Zoog et al., 2002). Aussi, la caspase-9, une caspase initiatrice humaine, et la protéine DRONC, une caspase initiatrice chez la drosophile, sont inhibées par la protéine P49 mais s'avèrent insensibles à la P35 (Jabbour et al., 2002; Zoog et al., 2002). À travers ces études, il a été suggéré que la protéine P49 agit en amont de la protéine P35 dans la cascade de signalisation de l'apoptose. Toutefois, dans cette cascade, la protéine P49 semble fonctionner en aval des IAP. En effet, il a été démontré que Op-IAP, une IAP de OpMNPV, inhibe l'activation ou l'activité de la *Sf*-caspase-X, empêchant ainsi son interaction avec la P49 qui est co-exprimée dans le même système (Zoog et al., 2002).

Récemment, une étude a révélé que l'inhibition de l'apoptose dans les cellules d'insectes LD652Y par la protéine P49, induit un arrêt global de la machinerie transcriptionnelle de la cellule. De plus, cet arrêt se produit 12 heures après l'infection virale (Thiem et Chejanovsky, 2004). La protéine P49 inhibe l'apoptose médiée par divers facteurs de signalisation, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Il a été démontré que l'apoptose induite par les rayons ultraviolets dans les cellules SF21 a été supprimée suite à l'expression de la protéine P49 (Zoog et al., 2002). L'activité de la P49 a été également observée lors de la stimulation de l'apoptose par les protéines proapoptotiques FasL (ligand Fas) et TRAIL (ligand du facteur de nécrose tumorale, TNF) (Jabbour et al., 2002).

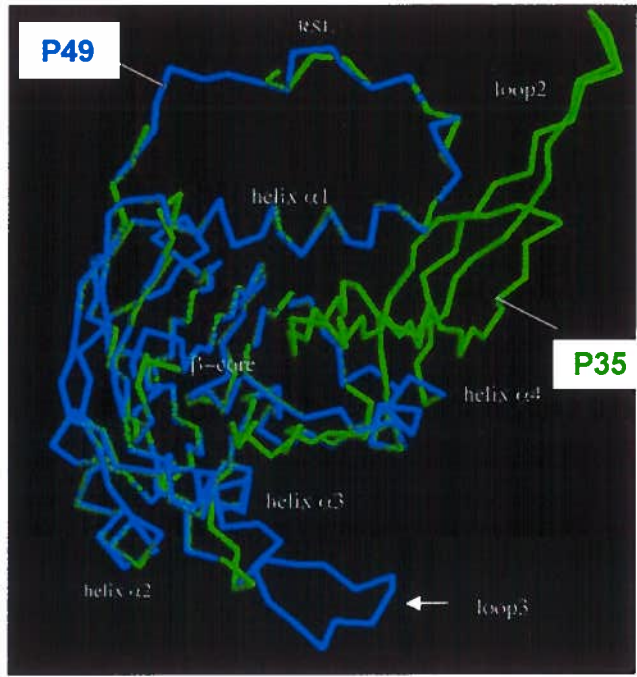
## 4.2 Mécanisme anti-apoptotique et structure tridimensionnelle de la protéine P49

La protéine P49 inhibe les caspases selon un mécanisme moléculaire similaire à celui de la P35. Les caspases ciblées reconnaissent la protéine P49 comme un substrat et la clivent en deux fragments, d'environ 10 et 40 kDa. Suite à un réarrangement conformationnel, les deux fragments générés forment un complexe stable avec les caspases ciblées, abolissant ainsi leur activité protéasique (Pei *et al.*, 2002; Zoog *et al.* 2002). Le motif TVTD représente le site actif de la protéine P49 de SINPV et est situé entre la position 91 et 94 de la séquence polypeptidique. Le clivage de la P49 par les caspases se produit au niveau du résidu aspartate en position 94 du motif de reconnaissance  $^{91}\text{TVTD}^{94}\downarrow\text{G}$ . Par mutagenèse dirigée, il a été démontré que ce résidu est essentiel pour le clivage de la P49 alors que le résidu thréonine, en position 91, est requis pour l'association de la P49 aux caspases ciblées et leur inhibition (Pei *et al.*, 2002). Zoog *et al.* (2002) ont cependant prouvé que la substitution du motif de reconnaissance  $^{91}\text{TVTD}^{94}\downarrow\text{G}$  par le motif  $^{84}\text{DQMD}^{87}\downarrow\text{G}$  de la P35 n'altère pas la fonction de la protéine P49. Ceci a également suggéré que d'autres éléments sont requis pour la spécificité de la P49 aux caspases. Suite au clivage par les caspases, il se produit un réarrangement conformationnelle de la protéine P49, favorisant l'association de cette protéine aux caspases ciblées (Pei *et al.*, 2002).

La structure tridimensionnelle de la protéine P49 de SINPV (figure 2) a été modélisée par ordinateur en se basant sur la structure cristallisée de la protéine P35 (Fisher *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 2002). La comparaison de la structure monomérique des deux protéines a permis de décrire certains domaines importants pour la fonction de la P49. Le domaine d'interaction de la P49 avec les caspases forme une boucle réactive (RSL ou Reactive Site Loop) constituée de résidus hydrophobes. Cette boucle commence par une hélice  $\alpha_1$ , traverse un core hydrophobe (ou core  $\beta$ ) et expose à son sommet le motif  $^{91}\text{TVTD}^{94}$ . L'exposition de ce motif favorise la reconnaissance et le clivage par la caspase ciblée. Le core hydrophobe, auquel est reliée la RSL, forme un repliement en tonneaux  $\beta$  (Pei *et al.*, 2002). Dans la P35, l'interaction des feuilletts  $\beta$  du core de la protéine avec la RSL semble cruciale pour l'inhibition des caspases mais non pas pour le clivage (Zoog *et al.*, 1999). Il a été démonté par mutagenèse dirigée que la stabilité du repliement du core  $\beta$  est essentielle à l'activité anti-apoptotique de la protéine P49. De plus, l'extrémité

**Figure 2 : Modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine P49 de SINPV à partir de la structure cristallisée de la protéine P35 de AcMNPV.**

Photographie tirée de Pei *et al.* (2002). Le modèle de la protéine P49 et la structure de la protéine P35 sont indiqués en bleu et vert, respectivement.



N-terminale de la P49 semble incluse dans le core  $\beta$  (Pei et *al.*, 2002). L'hélice  $\alpha 1$  de la P49 semble responsable du changement conformationnel de la RSL qui est nécessaire, après le clivage, pour la formation du complexe stable avec la caspase ciblée. En effet, la mutation de certains résidus de l'hélice  $\alpha 1$  entraîne la perte de l'activité anti-apoptotique de la P49 (Pei et *al.*, 2002; Zoog et *al.*, 2002). Des études ont montré que, suite au clivage, la RSL de la P35 change de conformation et forme une liaison thioester avec le site actif de la caspase, inhibant ainsi leur activité (de la Cruz et *al.*, 2001; Xu et *al.*, 2001; Riedl et *al.*, 2001). En considérant l'analogie structurale et fonctionnelle avec la P35, Zoog et *al.* (2002) ont supposé qu'une telle liaison covalente se produit entre la protéine P49 clivée et la caspase ciblée, aboutissant ainsi à l'inhibition de l'apoptose dans la cellule hôte.

### 4.3 Gènes exprimant la protéine P49

Le gène *p49*, codant pour la protéine anti-apoptotique P49, a été identifié pour la première fois dans le génome de SINPV (Du et *al.*, 1999) puis dans le génome de SpltNPV (Pang et *al.*, 2001). Le gène *p49* de SINPV, autrefois appelé *Slp49*, a été localisé entre les unités 37.2 et 38.7 de la carte de restriction génétique virale. Du et *al.* (1991) ont montré que le gène *p49* de SINPV code pour un polypeptide de 446 acides aminés ayant une masse moléculaire de 49 kDa. La région promotrice de ce gène comprend la boîte TATA et le motif d'initiation de la transcription ATTAG (Ayles et *al.*, 1994; Du et *al.*, 1999). La présence de ces éléments a suggéré que le gène *p49* est à la fois un gène précoce et tardif. Des expériences d'hybridation de type Northern ont montré en effet que la transcription du gène *p49* a lieu entre 8 et 12 heures après l'infection des cellules SF9 par SINPV (Du et *al.*, 1999 et Liu et *al.*, 2003).

L'ORF codant pour la protéine P49 a été localisé dans le génome d'autres baculovirus, notamment de *Helicoverpa armigera* single nucléopolyédrovirus (HaSNPV), *Helicoverpa zea* single nucléopolyédrovirus (HzSNPV), *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV), *Phthorimaea operculella* granulovirus (PhopGV) et *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus (CrleGV). Toutefois, ces ORF n'ont pas encore été caractérisés.

#### **4.4 Homologies structurales des protéines P49**

La protéine P49 des baculovirus ne semble avoir aucune homologie avec les protéines d'origine cellulaire. Pei et *al.* (2002) ont réalisé le séquençage de la protéine P49 de SINPV, confirmant ainsi son contenu en acides aminés. La séquence en acides aminés de la protéine P49 de SINPV partage une identité de 79 % avec la séquence déduite de son homologue chez SpltNPV (Jabbour et *al.*, 2002; Zhang et *al.*, 2002). Des études ont révélées que la protéine P49 constitue le premier homologue structural de la protéine P35 des baculovirus (Du et *al.*, 1999; Pei et *al.*, 2002). La structure primaire de la protéine P49 de SINPV et de SpltNPV montre une identité de 48.8 % et 30 %, respectivement, avec celle de la P35 de AcMNPV (Du et *al.*, 1999; Zhang et *al.*, 2002). L'alignement des séquences en acides aminés des protéines de la famille de la P35 a indiqué que les extrémités N- et C-terminales de ces protéines sont conservées (Jabbour et *al.*, 2002; Pei et *al.*, 2002).

#### **4.5 Expression de la protéine P49 et production d'anticorps anti-P49**

Plusieurs études, notamment sur la fonction anti-apoptotique de la protéine P49, ont requis l'expression de cette protéine et la production d'anticorps qui lui sont spécifiques. Jusqu'à présent, la protéine P49 des baculovirus a été exprimée efficacement dans un système eucaryote. En effet, la protéine P49 de SINPV a été exprimée à partir du vecteur recombinant AcMNPV dans les cellules d'insectes SF9 et SF21 (Pei et *al.*, 2002; Zoog et *al.*, 2002). Des tentatives d'expression dans les bactéries *Escherichia coli* ont produit cependant une protéine insoluble. Des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine P49 ont été utilisés dans plusieurs expériences d'immunobuvadage de type Western pour démontrer le clivage de la P49 par les caspases ciblées.

### **5 Systèmes d'expression de protéines recombinantes**

#### **5.1 Généralités**

Depuis quelques décennies, l'avènement de la technologie du clonage moléculaire a suscité de

nombreuses recherches sur les possibilités d'expression génique. Dès lors, de nombreux systèmes d'expression ont été mis au point afin de produire et de purifier, à grande échelle, des protéines recombinantes d'importance économique, pharmaceutique et médicale. La première protéine recombinante synthétisée est la somatostatine humaine, un peptide neurotransmetteur de 14 acides aminés (Itakura et *al.*, 1977). Le gène codant pour cette protéine avait été cloné dans un vecteur plasmidique permettant son expression dans la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*). Par la suite, Goeddel et *al.* (1979) ont réussi à produire dans *E. coli* l'insuline humaine, hormone régulant le métabolisme des sucres. Cette protéine, destinée au traitement du diabète, a été le premier médicament recombinant commercialisé (Wong, 1997). En 1981, il a été possible d'exprimer pour la première fois le gène humain codant pour l'interféron dans la levure (Hitzeman et *al.*, 1981). Une des applications des systèmes d'expression qui a révolutionné la médecine moderne est la production de vaccins recombinants. Le premier vaccin recombinant a été développé en 1986 contre le virus de l'hépatite B (HBV). La protéine HBsAg, un antigène de surface recouvrant la particule virale, a été exprimée en grande quantité dans la levure puis utilisée pour l'immunisation contre le HBV (Vyas, 1986).

Les systèmes d'expression de protéines recombinantes peuvent être catégorisés en systèmes d'expression procaryote et eucaryote, impliquant la production de protéines recombinantes respectivement dans des cellules procaryotes et eucaryotes. Un autre système a été décrit, le système d'expression acellulaire, permettant la production *in vitro* des protéines recombinantes. Le choix du système d'expression dépend des applications prévues et des propriétés de la protéine recombinante à produire.

## **5.2 Système d'expression acellulaire**

Une protéine recombinante peut être produite dans un système acellulaire couplant la transcription et la traduction *in vitro* du gène d'intérêt. Dans ce système, la protéine recombinante est synthétisée à partir d'un vecteur recombinant ou d'un produit de PCR contenant tous les éléments nécessaires à son expression (Betton, 2003; Lamla et *al.*, 2001). La transcription du gène d'intérêt est initialement effectuée par l'ARN polymérase, notamment du phage T7 ou SP6. Par la suite, la protéine d'intérêt est traduite dans un extrait de cellules

bactériennes ou eucaryotes, fournissant les facteurs nécessaires à la traduction (Lamla et *al.*, 2001; Madin et *al.*, 2000; Sawasaki et *al.*, 2002). Le système acellulaire est bénéfique en particulier pour l'expression de protéines instables, cytotoxiques ou de régulation qui affectent la physiologie des cellules vivantes. D'autres applications de ce système ont été développées, notamment le marquage radioactif des protéines ou leur modification à des sites spécifiques (Stiege et Erdmann, 1995). En guise d'exemple, la protéine P49 de SINPV, marquée avec un radioisotope du soufre ( $S^{35}$ ), a été synthétisée par ce système pour tester son clivage et son association avec les caspase ciblées (Pei et *al.*, 2002). Le système d'expression acellulaire offre l'avantage de manipuler directement les réactions de transcription, de traduction et de repliement des protéines (Betton, 2003). Il a été démontré que ce système permet la synthèse de quantités appréciables de protéines fonctionnelles avec une pureté relativement élevée (Lamla et *al.*, 2001; Sawasaki et *al.*, 2002).

### **5.3 Systèmes d'expression procaryote**

L'expression de protéines recombinantes dans les systèmes procaryotes est simple, peu coûteuse et offre généralement de bons rendements. Cependant, certains inconvénients sont liés à l'utilisation de tels systèmes. D'une part, les cellules bactériennes sont incapables d'effectuer les modifications post-traductionnelles caractéristiques des cellules eucaryotes, telles que la phosphorylation, l'acylation et la O- et N-glycosylation. Ces modifications sont souvent nécessaires à l'activité et à la stabilité des protéines. D'autre part, certaines protéines recombinantes sont produites dans les bactéries sous forme insoluble et inactive à cause d'un repliement inadéquat. En fait, l'expression à grande échelle dans ces systèmes entraîne souvent la précipitation des protéines recombinantes en agrégats insolubles appelés des corps d'inclusion. Dans ce cas, la solubilisation de la protéine recombinante est laborieuse et peut entraîner une perte irréversible de son activité. Un autre problème majeur est lié à la toxicité de certaines protéines pour les bactéries, pouvant induire la mort cellulaire avant d'atteindre une expression optimale. Les protéines recombinantes peuvent également être dégradés par les protéases des cellules bactériennes. Malgré ces inconvénients, le système d'expression procaryote demeure l'outil le plus utilisé pour la production de protéines recombinantes.



Les innovations dans les systèmes d'expression procaryote ont considérablement simplifié les procédures de purification des protéines recombinantes. Depuis quelques années, il est devenu possible de fusionner à la protéine recombinante un marqueur d'affinité permettant de la séparer des constituants cellulaires. Les marqueurs d'affinité sont souvent associés à l'extrémité N- ou C-terminale de la protéine. Grâce à cet outil, les protéines recombinantes sont désormais purifiées par chromatographie d'affinité. Plusieurs vecteurs plasmidiques ont été conçus de façon à exprimer une protéine recombinante, fusionnée à un marqueur ayant une affinité donnée. Le vecteur pQE32 de Qiagen possède, en amont de son site de clonages multiples, une séquence codant pour six résidus histidines (6x His). Ce vecteur permet ainsi l'expression d'une protéine recombinante contenant une queue de 6x His à son extrémité N-terminale. Il a été démontré que les protéines recombinantes associées à une séquence riche en histidine peuvent se fixer sur une matrice de nickel-nitrilotriacétique (Ni-NTA) (Hochuli et *al.*, 1988). L'acide nitrilotriacétique (NTA) est un chélateur permettant d'immobiliser le nickel sur les matrices de chromatographie (Hochuli et *al.*, 1987). Il s'agit d'un complexant quadridentate, formant quatre liaisons avec l'ion nickel. Une fois complexé, l'ion nickel, ayant une valence de 6, garde deux sites accessibles à des molécules d'eau ou aux histidines d'une molécule. Saturées en ions de nickel, les résines Ni-NTA sont très stables et lient spécifiquement les protéines présentant plusieurs histidines consécutives en surface. Un autre avantage de cette technique de chromatographie consiste en la possibilité de réaliser la purification dans des conditions où les protéines sont sous forme native ou dénaturée. Le principe de la purification par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA repose sur trois étapes : 1) l'adsorption de la protéine recombinante 6x His à la résine, 2) l'élimination des protéines contaminantes par une série de lavages et 3) l'élution de la protéine d'intérêt. Ainsi, en milieu basique, les résidus histidines interagissent avec les ions de nickel de la matrice et permettent la rétention de la protéine recombinante. La récupération des protéines fixées sur la colonne peut se faire par l'ajout de l'imidazole, un homologue de l'histidine (conditions natives) ou d'une solution à pH acide (condition dénaturante). En diminuant la force ionique, l'histidine se protonne (base faible) et se décroche ainsi de la résine Ni-NTA (Schmitt et *al.*, 1993).

## 5.4 Systèmes d'expression eucaryote

Le succès de l'expression des protéines recombinantes dans des systèmes eucaryotes a pour origine le développement et la propagation optimale des cultures cellulaires eucaryotes. Ces systèmes sont plus adaptés à la production de protéines nécessitant des modifications post-traductionnelles. Les protéines recombinantes générées via ces systèmes ont souvent une conformation tridimensionnelle similaire à la structure native. Les systèmes eucaryotes impliquant les levures, les cellules d'insectes ou de mammifères sont largement utilisés dans l'expression de protéines recombinantes. Le choix du système d'expression eucaryote dépend de la quantité et de la qualité de la protéine recombinante à générer ainsi que du temps nécessaire à sa production (Geisse et Kocher, 1999).

L'expression des protéines recombinantes dans un système eucaryote inférieur tel que la levure offre généralement de bons rendements, pouvant représenter jusqu'à 30 % de la masse protéique totale de la cellule. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* ont été conventionnellement utilisées pour l'expression de protéines recombinantes (Romanos et al., 1992; Gregg et al., 1993; Rosenfeld, 1999). Les protéines recombinantes peuvent être secrétées dans le milieu de culture, facilitant ainsi leur purification. Cependant, les protéines sécrétées notamment par *S. cerevisiae* sont généralement hyperglycosylées et souvent retenues dans l'espace périplasmique cellulaire (Buckholz et Gleeson, 1991). De plus, l'hyperglycosylation peut entraîner un repliement inadéquat de la protéine d'intérêt et une perte de son activité. Cette caractéristique limite ainsi l'utilisation de certaines levures pour la production de glycoprotéines (Jung et Williams, 1997).

Les cultures de cellules d'insectes, principalement des lépidoptères, sont fréquemment utilisées pour la production à grande échelle de protéines recombinantes. Le potentiel des baculovirus à se propager dans les lignées cellulaires d'insectes a été exploité pour le développement de vecteurs d'expression dans ces cellules eucaryotes. Le gène d'intérêt est inséré dans le baculovirus recombinant par recombinaison homologue, pouvant être effectuée aussi bien dans les cellules d'insectes que bactériennes (Luckow et al., 1993). Des études ont démontré que les baculovirus recombinants peuvent également exprimer des protéines étrangères dans les cellules de

mammifères (Cheng et al., 2004; Boyce et Bucher, 1996). Les systèmes d'expression utilisant les vecteurs des baculovirus (appelés aussi BEV, baculovirus expression vector) offrent de nombreux avantages. Les BEV possèdent notamment les promoteurs des gènes codant pour la polyédrine et la protéine P10 qui permettent de fort niveaux d'expression du gène d'intérêt (Jusqu'à 50 % du contenu protéique total de la cellule) (Anonyme, 2001). Comparativement aux autres systèmes d'expression, les BEV favorisent la production de diverses protéines incluant les protéines cytotoxiques, membranaires et sécrétées (Geisse et Kocher, 1999). Cependant, la construction des BEV et leur propagation dans les cellules d'insectes peuvent être laborieuses et coûteuses. De plus, l'augmentation de la densité des cellules d'insectes peut s'accompagner d'une diminution de la production des protéines recombinantes.

Les lignées cellulaires de mammifères constituent généralement le meilleur système d'expression des protéines d'origine eucaryote. Ce système dispose en effet de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle complète, nécessaire à la maturation adéquate de protéines complexes et biologiquement actives. Le premier médicament produit commercialement par ce système a été l'activateur tissulaire du plasminogène. Il s'agit d'une protéase administrée aux victimes d'attaques cardiaques pour permettre la dissolution de caillots sanguins (Watson et al., 1994). Les techniques d'expression dans les cellules de mammifères sont cependant exigeantes, comparativement à celles des systèmes précédemment décrits. Les lignées cellulaires eucaryotes ont une croissance lente et sont difficilement maintenues à grande échelle à cause de contaminations d'origine virale. De plus, l'expression des protéines recombinantes dans ces systèmes est coûteuse et les rendements sont généralement faibles.

## **6 Immunisation génétique**

L'immunisation génétique, ou immunisation à ADN, est un procédé de transfection *in vivo* par lequel un vecteur plasmidique est introduit à l'intérieur d'un organisme vivant pour exprimer une protéine d'intérêt et susciter une réponse immunitaire contre celle-ci (Tang et al., 1992).

## 6.1 Historique

Le développement de la technologie des vaccins à ADN occupe une place prépondérante dans la recherche en vaccinologie moderne. Cette technologie repose sur la stimulation et la modulation du système immunitaire par le produit de l'ADN plasmidique, ou de l'ADN " nu ", injecté dans un organisme vivant.

Déjà dans les années cinquante, il a été observé que l'injection de la chromatine isolée de cellules tumorales peut induire des tumeurs chez les rongeurs. Par la suite, il a été établi que le principe actif de la chromatine est l'ADN et que le transfert d'acide nucléique dans les cellules animales est désormais réalisable. Une dizaine d'années plus tard, des études ont démontré que l'injection d'ADN du Polyomavirus à des souris induit à la fois des tumeurs et la production d'anticorps contre ce virus (Koprowski et Weiner, 1998). En 1990, Wolff et *al.* ont été les premiers à introduire le concept de la vaccination à ADN. Ces auteurs ont démontré que l'injection de vecteurs plasmidiques, portant des gènes rapporteurs, dans le muscle de souris permet l'expression *in vivo* de protéines biologiquement actives (Wolff et *al.*, 1990). Cette découverte a ainsi suggéré que le transfert de gènes *in vivo* peut s'effectuer sans l'utilisation de vecteurs viraux. Des études ont révélé que suivant l'injection, le vecteur plasmidique persiste et s'exprime pendant plusieurs mois dans les cellules musculaires du model animal. L'ADN plasmidique demeure sous forme extrachromosomique, excluant toute possibilité de réplication ou d'intégration dans le génome animal (Nichols et *al.*, 1995; Wolff et *al.*, 1990 et 1992).

En 1992, les expériences de Tang et *al.* ont montré que l'injection de souris avec de l'ADN plasmidique codant pour l'hormone de croissance humaine entraîne une réponse en anticorps spécifiques à l'antigène exprimé. Cette étude a ainsi suggéré que l'immunisation génétique peut être une approche favorable pour la production d'anticorps, comparativement aux méthodes de vaccination conventionnelles. Subséquemment, plusieurs études ont démontré que l'injection *in vivo* de vecteurs recombinants (de quelques nanogrammes à une centaine de microgrammes) peut aboutir à l'induction d'une réponse immune humorale et cellulaire contre l'antigène exprimé, voire même à la protection contre une infection. La première démonstration de l'immunité protectrice induite par un vaccin à ADN a été réalisée par Ulmer et *al.* (1993). Leurs travaux

ont révélé que l'injection intramusculaire de souris avec le vecteur exprimant une protéine conservée du virus de l'influenza, la nucléoprotéine (NP), active les lymphocytes T cytotoxiques et auxiliaires en plus de la production d'anticorps anti-NP (Ulmer et *al.*, 1993 et 1998). Ces études ont également rapporté que la protection est induite contre plusieurs souches létales du virus de l'influenza et est conférée par l'immunité à médiation cellulaire. D'autres travaux ont rapporté que la vaccination à ADN stimule la réponse immunitaire d'un grand nombre de model animal contre une variété d'agents infectieux incluant les virus, les parasites et les bactéries (Gurunathan et *al.*, 2000a; Montgomery et *al.*, 1997). Il a été démontré que l'immunité stimulée par des vaccins à ADN codant pour les sous-unités de la toxine de *Bacillus anthracis* empêche la germination des spores bactérienne chez les souris et les lapins pour ainsi les protéger contre l'infection à l'anthrax (Gu et *al.*, 1999; Hermanson et *al.*, 2004). Par la vaccination à ADN, la réponse en anticorps neutralisants a pu être induite notamment contre le virus de l'immunodéficience acquise (VIH), le virus de l'herpes simplex (HSV) et le virus de la rage (Montgomery et *al.*, 1997).

Chez l'humain, plusieurs vaccins à ADN sont en cours d'expérimentation pour susciter une réponse immunitaire prophylactique et/ou thérapeutique. Il s'agit notamment des vaccins dirigés contre le cancer, la malaria, l'hépatite B et contre le VIH (Gurunathan et *al.*, 2000a; Srivastava et Liu, 2003). Des essais cliniques en phase I ont été amorcés pour évaluer l'innocuité et l'immunogénicité des vecteurs à ADN exprimant les protéines env et rev du VIH de type I chez des sujets séropositifs et séronégatifs (Boyer et *al.*, 2000; MacGregor et *al.*, 1998 et 2000). Toutefois, jusqu'à présent, les réponses humorales et cellulaires induites chez l'humain par immunisation génétique n'ont pas été satisfaisantes (Srivastava et Liu, 2003; Rodriguez, 2004).

L'immunisation génétique a été utilisée avec succès dans la production d'anticorps polyclonaux. Les travaux de Gardsvoll et *al.* (2000) ont démontré que l'immunisation des lapins avec l'ADN plasmidique exprimant un fragment du récepteur de l'urokinase murin induit une réponse en anticorps polyclonaux qui persiste jusqu'à 6 mois suivant la dernière injection. D'autres études ont révélé que l'immunisation génétique a permis la production d'anticorps polyclonaux qui n'ont pas pu être obtenus par les techniques classiques d'immunisation. Par immunisation

génétique, Tymciu et *al.* (2002) ont pu notamment produire, à long terme, des anticorps polyclonaux dirigés contre la forme native du récepteur humain hNK1R du neuropeptide SP.

## **6.2 Induction de la réponse immunitaire**

L'immunisation génétique implique initialement la pénétration du vecteur plasmidique codant pour la protéine antigénique dans les cellules de l'organisme. L'expression du gène d'intérêt est ensuite amorcée à partir du fort promoteur eucaryote contenu dans le vecteur grâce à la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle des cellules hôtes. Une fois exprimée, l'antigène subit une maturation moléculaire avant d'être présenté au système immunitaire, selon des mécanismes qui seront discutés dans ce chapitre. La présentation de l'antigène peut ainsi induire une immunité à médiation humorale et cellulaire. Toutefois, ce chapitre traitera uniquement de certaines caractéristiques de la réponse humorale.

### **6.2.1 Mécanismes de maturation et de présentation de l'antigène**

Il a été généralement admis que la quantité d'antigène produite *in vivo* par immunisation génétique est de l'ordre des pico et nanogrammes. Compte tenu de cette faible quantité, il a été ainsi suggéré que l'induction de la réponse immunitaire est reliée aux types et au mode d'action des cellules présentatrices d'antigène. Il existe au moins trois mécanismes par lesquels l'antigène exprimé *in vivo* à partir de l'ADN plasmidique est traité puis présenté au système immunitaire pour susciter une réponse. Il s'agit soit de : a) l'induction directe par les cellules somatiques (toutes cellules n'exprimant pas les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II telles que les myocytes et les kératinocytes); b) la transfection directe des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles (cellules dendritiques, macrophages); c) l'induction croisée au cours de laquelle l'ADN plasmidique peut transférer à la fois une cellule somatique et une CPA professionnelle et l'antigène sécrétée est récupéré par une autre CPA professionnelle qui le présente aux lymphocytes T (Gurunathan et *al.*, 2000b).

Plusieurs études ont rapporté le potentiel des cellules somatiques, notamment des myocytes, à internaliser l'ADN plasmidique suite à une injection intramusculaire (Payette et *al.*, 2001;

Ulmer *et al.*, 1996). Certains travaux ont indiqué que ce potentiel est accentué lors de la régénération des fibres musculaires notamment à la suite d'un dommage du muscle causé par un traitement à la bupivacaine ou la cardiotoxine (Davis *et al.*, 1993; Le Borgne *et al.*, 1998). Wolff *et al.* (1992) ont suggéré que l'ADN plasmidique entre dans les cellules musculaires via les tubules T et les cavéoles. Il a été démontré que l'ADN plasmidique injecté *in vivo* dans les muscles peut être exprimé et secrété par les myocytes. Aussi, plusieurs études ont précisé que les cellules musculaires ont un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunitaire suite à la vaccination à ADN (Henke, 2002; Whitton *et al.*, 1999). Cependant, une question se pose quant à l'induction directe des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) par les myocytes exprimant l'antigène ou, indirecte par le transfert de l'antigène d'une cellule musculaire à une CPA professionnelle. Cette ambiguïté provient du fait que les myocytes n'expriment pas les molécules nécessaires à l'activation des cellules T naïves, telles que les molécules du CMH de type II et les molécules de costimulation (ex : CD80, CD86). De plus, seules les CPA professionnelles et non pas les myocytes sont capables de présenter l'antigène via le CMH de type I (Henke, 2002; Leitner *et al.*, 2000). Torres *et al.* (1997) ont démontré que l'ablation du muscle après 10 minutes suivant l'injection de l'ADN plasmidique n'affecte pas l'intensité et la longévité de la réponse immunitaire. Il a été ainsi suggéré que les cellules musculaires nécessitent la collaboration des CPA professionnelles pour l'induction de la réponse immunitaire. Les kératinocytes et les cellules de Langerhans constituent les principales cellules transfectées lors d'une injection cutanée avec l'ADN plasmidique (Raz *et al.*, 1994). Il a été démontré que la transplantation de la peau préalablement vaccinée (jusqu'à 12 heures post-vaccination) permet de stimuler le système immunitaire chez l'animal receveur (Klinman *et al.*, 1998). D'autres études ont suggéré que les kératinocytes transfèrent l'antigène aux CPA professionnelles suite à la mort cellulaire (Akbari *et al.*, 1999). Ainsi, les cellules somatiques seraient des réservoirs de production d'antigène qui procèdent probablement par induction croisée pour la stimulation du système immunitaire.

L'immunisation génétique implique également la transfection directe des cellules présentatrices d'antigène dérivées de la moelle osseuse. Suite à la biosynthèse et la maturation, l'antigène est présenté via les molécules du CMH de classe I et II des CPA professionnelles qui activent les cellules T effectrices et mémoires. Il a été observé que les macrophages présentant l'antigène à leur surface migrent à partir du muscle injecté vers les ganglions lymphatiques (Chattergoon et

*al.*, 1998). Les cellules dendritiques (CD) semblent particulièrement efficaces dans l'induction de la réponse immunitaire. Toutefois, des études ont démontré que seulement une faible proportion de CD (0.4 %) peut être transfectée par l'ADN plasmidique (Casares et *al.*, 1997). Lors de l'induction croisée, les CPA professionnelles internalisent, par phagocytose ou endocytose, l'antigène présenté par d'autres cellules (Cellules somatiques ou CPA professionnelles). Une fois l'antigène présenté, la réponse immunitaire est déclenchée (Gurunathan et *al.*, 2000).

### **6.2.2 Réponse humorale**

Depuis la découverte des vaccins à ADN, plusieurs travaux ont démontré le potentiel de l'immunisation génétique dans l'induction d'une réponse intense en anticorps contre une variété de protéines issues de différents systèmes. De plus, la réponse humorale générée par les vaccins à ADN peut conférer une protection contre une variété d'agents infectieux. Des études ont rapporté que la réponse en anticorps à la suite d'une seule immunisation avec le vecteur exprimant l'hémagglutinine du virus de l'influenza atteint un plateau au bout de 4 à 12 semaines (Deck et *al.*, 1997; Robinson et *al.*, 1998). Ces études ont cependant indiqué que la réponse humorale est dépendante de la dose, des fréquences et des voies d'injection de l'ADN plasmidique. Toutefois, il a été intéressant de constater qu'une fois le plateau atteint, la quantité d'anticorps produits n'est quasiment plus affectée par la dose ou la fréquence des injections de l'ADN plasmidique. Raz et *al.* (1994) ont pu détecter pendant 17 mois la réponse en anticorps suscitée à la suite de l'injection intradermique du vecteur exprimant la protéine NP du virus de l'influenza. Cependant, le prolongement de la réponse humorale induite par immunisation génétique est très variable et dépend notamment de l'hôte choisi et du vaccin utilisé.

Les classes d'immunoglobulines produites lors de l'immunisation génétique incluent généralement les IgG, les IgA et les IgM (Gurunathan et *al.*, 2000). La vaccination à ADN semble cependant stimuler faiblement les réponses systémiques en IgG chez les primates comparativement aux réponses produites chez les souris (Wang et *al.*, 2000). Par ailleurs, il a été rapporté que la vaccination à ADN peut induire aussi bien la production des cytokines Th1, protéines impliquées dans la réponse inflammatoire et l'activité des CTL, que les cytokines Th2 qui stimulent la réponse humorale. Ainsi, l'induction des réponses Th1 et Th2 entraîne



respectivement la production des isotypes IgG2a et IgG1 (Gurunathan *et al.*, 2000; Leitner *et al.*, 1997).

### **6.3 Éléments modulateurs de la réponse immunitaire**

L'efficacité de la vaccination à ADN repose sur certains facteurs impliqués dans l'induction et la modulation de la réponse immunitaire. Cette réponse est particulièrement influencée par les motifs constituant le vecteur d'expression et les modes de son administration *in vivo*. De plus, l'utilisation d'adjuvants génétiques tels que les cytokines lors de la vaccination à ADN peut moduler l'activité des cellules du système immunitaire.

#### **6.3.1 Caractéristiques du vecteur d'expression**

Les vecteurs plasmidiques utilisés lors de l'immunisation génétique ont été conçus de façon à livrer les gènes clonés à l'intérieur des cellules eucaryotes et à assurer leur expression optimale *in vivo*. Il est généralement admis que le niveau d'expression des gènes *in vivo* suite à la vaccination à ADN influence la réponse immunitaire générée. Pour une production à grande échelle, les vecteurs d'expression eucaryote doivent nécessairement contenir une origine de réplication, telle que ColE1 de *E. coli*, pour leur prolifération dans les cellules bactériennes. La présence d'au moins un gène de résistance à un antibiotique (ex : ampicilline, kanamycine) est essentielle à la sélection des bactéries transformées par l'ADN plasmidique. Certains éléments constitutifs des vecteurs eucaryotes influencent directement l'expression de la protéine antigénique. Des promoteurs viraux, notamment ceux du cytomegalovirus (CMV) ou du virus simien 40 (SV40), permettent de hauts niveaux de transcription dans les cellules eucaryotes (Xiang *et al.*, 1995). La présence et le choix de la séquence de polyadénylation s'avèrent cruciales à l'activité du promoteur et à la stabilisation des transcrits. Il a été démontré que l'utilisation de la séquence de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine en présence du fort promoteur du CMV optimise l'expression du gène d'intérêt (Montgomery *et al.*, 1997).

L'ADN plasmidique comporte des séquences nucléotidiques spécifiques qui jouent le rôle d'immunostimulateurs lors de l'immunisation génétique. Ces séquences immunostimulatrices

(ISS) comportent plus d'un motif CpG étant un dinucléotide cytosine-phosphate-guanine non méthylé, flanqué de deux purines et pyrimidines respectivement en 5' et 3' (Krieg et *al.*, 1995; Sato et *al.*, 1996). La présence des motifs CpG dans les vaccins à ADN stimule la réponse immunitaire en exerçant le rôle endogène d'adjuvant (Krieg et *al.*, 1998; Ren et *al.*, 2004). Ces motifs peuvent être soit co-injectés avec l'ADN plasmidique, sous forme d'oligonucléotides, soit inclus dans la construction du vecteur. Des études ont révélé que ces motifs induisent préférentiellement une immunité de type Th1 lors de la vaccination à ADN et peuvent augmenter la réponse en anticorps de 500 fois (Klinman, 2003). Les motifs CpG stimulent la sécrétion des cytokines, par les lymphocyte B et T et par les cellules tueuses naturelles NK (Natural killer), soit l'activité des CTL et de la réponse inflammatoire (Klinman et *al.*, 1996 et 1997).

### **6.3.2 Méthodes et voies d'immunisation**

Les techniques utilisées pour administrer un vaccin à ADN dans un organisme hôte peuvent influencer quantitativement et/ou qualitativement la réponse immunitaire générée. Deux principales méthodes sont couramment appliquées lors de l'immunisation génétique. La première méthode consiste en l'injection directe de l'ADN plasmidique suspendu en solution aqueuse, souvent saline, dans les tissus de l'organisme hôte. Grâce à son efficacité, l'injection intramusculaire d'ADN plasmidique au niveau des quadriceps antérieurs est la voie d'immunisation la plus utilisée. Wolff et *al.* (1992) ont rapporté que l'utilisation de cette voie d'immunisation chez la souris permet l'expression dans le muscle de protéines antigéniques pendant une période de 19 mois. Une autre méthode d'administration d'un vaccin à ADN *in vivo* est basée sur l'utilisation d'un canon à gène (*Gene Gun* ou GG). Ce procédé consiste à bombarder la cellule par des micro-projectiles recouverts d'ADN plasmidique. La taille des micro-projectiles utilisés, souvent des particules d'or de 1 à 3 µm, ainsi que la forte vitesse de bombardement permettent de propulser l'ADN directement à l'intérieure des cellules ciblées (Gurunathan et *al.*, 2000; Pertmer et *al.*, 1995).

L'utilisation du canon à gène implique de faibles quantités d'ADN plasmidique (0.016 - 4 µg) pour susciter une réponse immunitaire comparativement à l'injection intramusculaire (10 - 2500 µg). Plusieurs études ont rapporté que l'immunisation génétique par l'utilisation du canon à

gène induit principalement une réponse de type Th2 alors que l'immunisation par voie intramusculaire suscite davantage une réponse de type Th1. L'induction préférentielle d'une réponse par rapport à une autre est probablement reliée à la dose d'ADN plasmidique injecté selon la voie d'immunisation. Il a été en effet supposé que les faibles quantités d'ADN plasmidique injectées par canon à gène ne favorisent pas la médiation d'une réponse Th1 (Barry et Johnston, 1997). Ces mêmes études ont démontré que l'injection intramusculaire de faibles quantités d'ADN plasmidique suscite une réponse de type Th2. Feltquate et *al.* (1997) ont postulé que l'immunité de type Th2 générée à la suite de l'injection de faibles doses d'ADN plasmidique résulte du faible contenu en motifs immunostimulateurs CpG. Récemment, Li et *al.* (2004) ont rapporté que les profils isotypiques d'anticorps générés par les deux voies d'immunisation (intramusculaire et par canon à gène) peuvent être influencées par la nature intrinsèque de l'antigène. Ces auteurs ont ainsi observé que certains vecteurs recombinants induisent la production des anticorps IgG1 ou IgG2a indépendamment de la voie d'injection. D'autres études ont démontré que la localisation cellulaire de l'antigène exprimé affecte la réponse immunitaire générée suivant les deux voies d'immunisation. L'injection notamment par GG de vecteurs exprimant des protéines cytoplasmiques ou transmembranaires semble susciter une forte réponse Th1, tandis que les antigènes sécrétés induisent la réponse Th2 (Morel et *al.*, 2004).

### **6.3.3 Rôle des cytokines comme adjuvants génétiques**

L'importance des cytokines dans la communication cellulaire et plus spécifiquement dans le contrôle de l'interaction entre les cellules du système immunitaire a suggéré leur utilisation potentiel comme adjuvant lors de la vaccination à ADN. Raz et *al.* (1993) ont démontré que l'immunisation en présence d'ADN plasmidique codant pour des cytokines permet l'expression de protéines biologiquement actives et que leur activité systémique est respectueuse à leur fonction d'origine. Par la suite, diverses études ont rapporté que la co-injection de vecteurs exprimant des cytokines peut intensifier la réponse immunitaire dirigée contre un antigène et l'orienter vers une réponse de type Th1 ou Th2 (Chow et *al.*, 1998; Maecker et *al.*, 1997).

L'administration de vaccins à ADN en présence de vecteurs plasmidiques exprimant les cytokines IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, INF-  $\gamma$  et GM-CSF stimule une réponse de type Th1 (Gurunathan et *al.*, 2000b). La première cytokine utilisée comme adjuvant génétique a été l'interleukine-2 (IL-2). Cette cytokine joue un rôle majeur dans le système immunitaire en activant les CTL et en stimulant la prolifération et la maturation des cellules T et B naïves en cellules effectrices et mémoires ainsi que le développement des cellules NK (Janeway et Travers, 1994; Smith, 1988). Plusieurs études ont démontré que l'injection simultanée d'ADN plasmidique codant pour l'IL-2 stimule l'immunité humorale et cellulaire. En effet, il a été rapporté que l'expression de l'IL-2 lors de l'immunisation génétique entraîne une augmentation de la réponse en anticorps spécifiques et du niveau d'IgG total dans le sérum, en plus de l'induction de la réponse inflammatoire d'hypersensibilité retardée (Raz et *al.* 1993). Cette étude a également indiqué que l'activité de l'IL-2 est inhibée par le TGF- $\beta$ 1, une cytokine antagoniste, lors de la co-injection des deux vecteurs respectifs. Chow et *al.* (1998) ont montré que l'utilisation de l'IL-2 comme adjuvant favorise le développement des cellules T auxiliaires de type 1 (Th1) sans affecter le développement des cellules Th2 (cellules T auxiliaires de type 2) et intensifie ainsi la production des anticorps IgG1 et IgG2a. Chez les macaques, l'utilisation de l'IL-2 comme adjuvant génétique a permis une augmentation de plus de 100 fois du titre d'anticorps dirigés contre les protéines gag et env du VIH-1 (Kim et *al.*, 2000). La co-administration des vecteurs exprimant respectivement l'IL-2 et la protéine antigénique au même site d'injection semble plus favorable à la modulation de la réponse immunitaire comparativement à l'injection séparée des deux vecteurs (Chow et *al.* 1998). L'activité immunostimulatrice de l'IL-2 a été également observée lorsque cette cytokine est conjuguée à l'antigène exprimé *in vivo* (Chow et *al.*, 1997).

L'IL-12 est une cytokine hétérodymérique pro-inflammatoire induisant la production de l'IFN-  $\gamma$  par les macrophages et les cellules NK ainsi que la différenciation des cellules Th1 (Trinchieri, 2003). Des études ont démontré que la co-injection de vecteurs à ADN du virus de l'hépatite B et de vecteurs codant pour l'IL-12 ou l'INF-  $\gamma$  induit fortement l'activation des cellules Th1 et la production d'anticorps IgG2a spécifiques à l'antigène. Toutefois, l'activité de ces cytokines implique l'inhibition des cellules Th2 et ainsi une baisse des anticorps IgG1 (Chow et *al.* 1998). Une autre étude a révélé que l'IL-12 diminue la réponse humorale spécifique lors de la vaccination à ADN contre le VIH-1 (Kim et *al.*, 1997). Récemment, Matsui et *al.* (2004) ont

démontré le potentiel immuno-adjuvant de deux nouvelles cytokines, l'IL- 23 et l'IL-27, similaires à l'IL-12. Lors de la vaccination à ADN, la co-injection de vecteurs exprimant l'une de ces cytokines stimule quantitativement et qualitativement les CTL caractéristiques de l'immunité à médiation cellulaire. La cytokine IL-18 a également été utilisée comme adjuvant lors de l'immunisation génétique et semble amplifier l'activité des CTL et la réponse Th1 sans moduler la réponse humorale (Chen et *al.*, 2004). Une autre cytokine, le GM-CSF (*Granulocyte Macrophages - Colony Stimulating Factor*), est reconnue pour son efficacité d'adjuvant génétique. Son activité intrinsèque consiste en l'initiation de la prolifération, la différenciation et l'activation des macrophages, des neutrophiles ainsi de plusieurs CPA (Disis et *al.*, 1996). Des études ont montré que le GM-CSF permet d'accentuer aussi bien l'immunité de type Th1 que Th2 suite à la co-injection de vecteurs codant pour cette cytokine avec les vecteurs exprimant la glycoprotéine gp160 du VIH-1 (Kusakabe et *al.*, 2000; Moore et *al.*, 2002).

Les vaccins à ADN peuvent être administrés en présence de plasmides codant pour des cytokines (ex : IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10 et IL-13) qui orientent l'immunité vers une réponse de type Th2 (Gurunathan et *al.*, 2000b). En effet, plusieurs études ont démontré le potentiel de ces cytokines à accroître le niveau de la réponse humorale en induisant l'augmentation des anticorps totaux, des IgG1 et du ratio IgG1/IgG2a. Lors de l'immunisation génétique, l'activité de certaines cytokines Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-10, peut supprimer la réponse des CTL, abolissant ainsi l'immunité protectrice (Chow et *al.*, 1998). D'autres cytokines, telles que l'IL-6 et l'IL-7, peuvent avoir un effet prophylactique et thérapeutique en stimulant la réponse cellulaire, en plus de la réponse humorale (Irvin et *al.*, 1996; Sin et *al.*, 2000).

#### **6.4 Études comparatives : immunisation génétique et classique**

De nombreux facteurs semblent privilégier l'immunisation génétique, impliquant l'administration d'un vaccin à ADN, à la vaccination classique à base de protéines recombinantes purifiées, de microorganismes inactivés ou atténués. Les premiers avantages de la vaccination à ADN résident dans la simplicité de construction des vecteurs plasmidiques et leur faible coût de préparation à grande échelle (Henke, 2002). En plus de leur pureté, les vaccins à ADN sont définitivement plus rapides à produire que les vaccins à base de protéines

recombinantes qui nécessitent des systèmes d'expression et de purification complexes. Les vaccins à ADN offre une thermo stabilité très élevée comparativement aux vaccins traditionnels, facilitant leur conservation et leur manipulation (Kucerova, 1998).

Dans un vaccin à ADN, la protéine antigénique est produite localement par les cellules de l'individu à immuniser. Ceci suggère que cette protéine reçoit toutes les modifications post-traductionnelles nécessaires à une conformation native. La conformation tridimensionnelle d'une protéine antigénique est essentielle à l'interaction avec les cellules du système immunitaire. Le modèle de glycosylation d'une protéine recombinante produite dans la levure ou les bactéries peut notamment affecter son immunogénicité (Srivastava et Liu, 2003). De plus, la protéine antigénique est produite de façon prolongée par les cellules de l'organisme. La présentation durable de l'antigène au système immunitaire devrait ainsi permettre d'éviter le recours aux injections de rappel pour certains vaccins.

Comparativement à la plupart des vaccins conventionnels, les vaccins à ADN ont l'avantage d'induire aussi bien les réponses humorales que cellulaires et à long terme (Robinson, 1999). Ces vaccins sont souvent favorisés aux vaccins à base de protéines recombinantes purifiées qui stimulent uniquement la réponse humorale. De plus, il est possible de moduler qualitativement et quantitativement les réponses immunes générées par un vaccin à ADN en co-exprimant notamment des molécules immunostimulatrices telles que les cytokines. L'immunisation génétique permet de mimer l'infection naturelle des pathogènes et déclenche efficacement l'activité des CTL, la production d'anticorps neutralisants et ainsi l'immunité protectrice contre la majorité des agents infectieux (Gurunathan et *al.*, 2000b).

Bien que l'immunisation à ADN offre de nombreux avantages, l'utilisation de cette approche en vaccinologie soulève certaines inquiétudes. L'une des préoccupations majeures est associée à l'intégration potentielle du vecteur plasmidique dans le génome de l'hôte qui pourrait activer des oncogènes ou inactiver des gènes de régulation dont les suppresseurs tumoraux. Temin (1990) a rapporté que la probabilité d'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur suite à l'injection de molécules d'ADN (linéaires) *in vivo* est moins de  $10^{-16}$  à  $10^{-19}$ . Jusqu'à présent, aucune évidence

d'intégration de l'ADN plasmidique dans le génome de l'hôte n'a été rapportée mais le risque demeure théoriquement existant (Donnelly et *al.*, 2003).

Le risque de développement de maladies auto-immunes est une autre préoccupation associée à la vaccination à ADN (Gurunathan et *al.*, 2000b). Il est reconnu que l'ADN bactérien peut induire la production d'anticorps anti-ADN chez des souris saines et accélérer le développement de maladies auto-immunes. Des études ont démontré que les motifs CpG présents dans les vaccins à ADN et dans le génome bactérien peuvent induire l'augmentation de la production des IgG anti-ADN (Gilkeson et *al.*, 1998; Mor et *al.*, 1997). Cependant, le niveau des auto-anticorps produits est insuffisant pour provoquer ou accélérer les maladies auto-immunes.

## 7 But et objectifs

Étant donnée la particularité des baculovirus à inhiber l'apoptose cellulaire et le rôle crucial que pouvait jouer la protéine anti-apoptotique P49 dans la pathogenèse virale, nous nous sommes intéressés à l'étude de cette protéine et de son gène respectif, le gène *p49*, chez le ChfuGV. Plus spécifiquement, ce projet de recherche a pour but de caractériser au niveau moléculaire le gène *p49* de ChfuGV et, au niveau immunobiologique, son produit, la protéine P49. Ainsi, plusieurs objectifs ont été établis afin d'atteindre notre but.

- Dans le cadre de la caractérisation moléculaire, nous devons :

- 1) Localiser et identifier le gène codant pour la protéine P49, le cloner et le séquencer.
- 2) Confirmer l'identité du gène *p49* par l'analyse des séquences nucléotidiques et des séquences déduites en acides aminés.

- Dans le cadre de la caractérisation immunobiologique, nous devons :

- 3) Exprimer la protéine recombinante P49 dans un système procaryote : Le gène *p49* sera ainsi cloné dans le vecteur d'expression procaryote pQE32. La protéine recombinante P49 sera ensuite exprimée dans la bactérie *E. coli* M15 [pREP4] puis purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel Ni-NTA.

- 4) Exprimer la protéine recombinante P49 dans un système eucaryote : Le gène *p49* sera ainsi cloné dans le vecteur eucaryote pcDNA3 pour l'expression de la protéine P49 dans les cellules des souris Balb/c lors de l'immunisation génétique.
- 5) Produire des anticorps anti-P49 chez les souris Balb/c, par immunisation classique, en injectant la protéine recombinante P49 purifiée et, par immunisation génétique, en injectant le vecteur eucaryote exprimant la P49.
- 6) Caractériser les anticorps anti-P49 produits, par ELISA et immunobuvardage de type Western. La réalisation de cet objectif va nous permettre de répondre à deux questions, à savoir :
  - Laquelle des deux voies d'immunisation sera favorable à la production optimale des anticorps anti-P49.
  - Si l'utilisation de la cytokine IL-2 aura un effet stimulant lors de l'immunisation génétique.



# **Matériel et méthodes**

## **1 Granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV)**

La réalisation de notre premier objectif de recherche étant d'identifier et de caractériser le gène codant pour la protéine P49 de ChfuGV a nécessité l'extraction de l'ADN génomique à partir du virus produit et purifié.

### **1.1 Production de ChfuGV**

Le ChfuGV a été produit *in vivo* dans les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Service Canadien des forêts de Sault-Sainte-Marie, Ontario) selon la technique décrite par Forté et Guertin (1999). Brièvement, les insectes au 2<sup>ème</sup> stade larvaire ont été maintenues sur une nourriture artificielle, élaborée par Grisdale et Wilson (1993), dans une chambre environnementale (Growth Cabinet, Sanyo, USA) à une température de 25°C, une humidité relative de 50 % et une photopériode de 14 : 10 heures (jour : nuit). Au quatrième stade larvaire, une suspension de ChfuGV de  $3 \times 10^5$  particules virales a été étalée sur le milieu nutritif. Les larves ont été ensuite incubées pendant 12 jours dans les mêmes conditions environnementales afin de permettre une importante réplication virale. Les larves mortes ou présentant des signes d'infection virale, tels qu'un flétrissement, liquéfaction ou un changement de coloration, ont été recueillies et conservées à -20°C jusqu'à l'extraction virale.

### **1.2 Purification de ChfuGV sur gradient de glycérol**

La purification du ChfuGV a été effectuée selon la méthode décrite par Tomkins (1991). Ainsi, les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette infectées par le ChfuGV ont été broyées (Omni-Mixer 17150, Du Pont Instruments, USA) dans un volume de SDS 1 %. La suspension homogénéisée a été filtrée à travers trois épaisseurs de coton à fromage et le filtrat a été centrifugé à 300 ×g pendant 5 minutes afin d'éliminer les débris larvaires. Le surnageant récolté a été ensuite soumis à une centrifugation à 10 000 ×g pendant 25 minutes, afin de précipiter les cellules infectées par le ChfuGV. La lyse des cellules infectées a été réalisée durant une incubation de 30 minutes à température ambiante dans une solution de NaCl 0.5 M. Le lysat a été

par la suite centrifugé 3 fois à 10 000 ×g pendant 10 minutes et le culot obtenu, contenant les particules virales, a été resuspendu dans l'eau distillée stérile. La purification des particules virales a été effectuée par ultracentrifugation sur gradient de glycérol. Pour cela, la suspension virale a été déposée sur un gradient discontinu de glycérol (50 % à 100 % (v/v)) (Sigma, Canada) qui a été ensuite centrifugé à 80 000 ×g pendant 45 minutes (ultracentrifugeuse L5-50, Beckman Instruments Inc., USA). La migration des granulovirus à travers le gradient de glycérol se fait selon leur densité. La fraction de glycérol 80 %, contenant les particules virales, a été récupérée lavée à l'eau distillée stérile puis centrifugée (10 000 ×g, 10 minutes à 4°C) à trois reprises. Les particules virales purifiées ont été conservées à - 20°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

### **1.3 Visualisation des particules de ChfuGV purifiées par microscopie électronique**

La pureté et l'intégrité du ChfuGV purifié ont été examinées au microscope électronique à transmission (Phillips EM300, Pays-Bas) selon la technique décrite par Alain et *al.* (1989). Brièvement, un volume de 100 µl de la suspension virale purifiée (diluée 1/2 000) a été mélangé à un volume équivalent d'une suspension de billes en latex «S130-3 polystyrène latex» (Agar Scientific, Royaume-Uni) de concentration de  $3,51 \times 10^8$  billes/ml. Le mélange a été transféré dans un tube Beckman dans lequel a été placée une grille de cuivre (MECALAB, Canada) pour microscopie électronique. Une centrifugation à 50 000 ×g pendant 5 minutes a été réalisée afin de permettre la fixation du mélange de particules virales et de billes de latex à la surface de la grille de cuivre. La grille de cuivre a été ensuite rincée 3 fois à l'eau distillée, séchée sur un papier buvard puis contrastée négativement à l'aide d'une goutte d'acide phosphotungstique (PTA) 3 % (pH 6.0) avant l'observation des particules virales au microscope électronique, à un grossissement de 13 000 X.

### **1.4 Isolement des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV**

Le virus purifié sur gradient de glycérol a été utilisé pour la purification des nucléocapsides enveloppées. La suspension virale purifiée a été initialement centrifugée à 10 000 ×g pendant 5 minutes. Le culot obtenu a été resuspendu dans un volume de 500 µl d'une solution de carbonate

de sodium 0.5 M (pH 10.5). Suite à une incubation de 30 minutes sur glace, favorisant la dissolution des corps d'inclusion et la libération des nucléocapsides enveloppées, le mélange a été centrifugé à 6 000 ×g pendant 10 minutes. Le surnageant résultant du traitement alcalin a été déposé sur un gradient de saccharose discontinu de 10 % à 50 % (v/v). Le gradient a été soumis à une ultracentrifugation à 25 000 ×g pendant 1 heure à 4°C. La fraction contenant les nucléocapsides enveloppées (entre la fraction de saccharose 20 % et 30 %) a été récupérée, lavée à l'eau distillée puis centrifugée à 100 000 ×g pendant 1 heure à 4°C. Les nucléocapsides enveloppées contenues dans le culot ont été resuspendues dans 200 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation pour la purification de l'ADN viral.

### **1.5 Extraction de l'ADN génomique de ChfuGV**

L'ADN génomique viral a été isolé par extraction au phénol/chloroforme à partir des nucléocapsides enveloppées purifiées. Tout d'abord, les nucléocapsides enveloppées purifiées ont été digérées avec la protéinase K [250 µg/ml] en présence du tampon TKS (tampon TE, pH 7.4, contenant 0,5 % de SDS) pendant 2 heures à 37°C. L'ADN viral a été ensuite extrait 2 fois avec un volume phénol saturé de tampon TE (pH 7.4), 4 fois avec un volume identique de phénol : chloroforme : isoamyl (25 : 24 : 1) puis 2 fois avec un volume de chloroforme : isoamyl (24 : 1). L'ADN viral, contenu dans la phase aqueuse, a été précipité avec 2.5 volumes d'éthanol 100 % froid en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5.2) pendant 18 heures à -20°C. Après une centrifugation à 16 000 ×g pendant 25 minutes, le culot d'ADN purifié a été lavé avec 1 ml d'éthanol 70 %. Suite à une seconde centrifugation à 16 000 ×g pendant 10 minutes, l'ADN viral a été resuspendu dans un volume de 50 µl de tampon TE (pH 7.4) puis conservé à -20°C. La pureté et la quantité de l'ADN viral ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % et par densitométrie selon la formule  $A_{260} \times \text{le facteur de dilution} \times 50 \mu\text{g/ml}$ , où  $A_{260}$  est la densité optique à 260 nm.

## **1.6 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN de ChfuGV**

Toutes les analyses d'ADN par électrophorèse ont été effectuées sur gel d'agarose 0.8 % (p/v) (Boehringer Ingelheim, Canada) dans le tampon TAE 1X (40 mM tris-acétate, 1mM EDTA, pH 8.0). Les échantillons d'ADN à analyser ainsi que les marqueurs de masse moléculaire de 1 Kb (Invitrogen, Canada) ont été mélangés avec du tampon de charge (0.25 % (p/v) de bleu de bromophénol, 0.25 % (p/v) de Xylène-Cyanol et de 30 % (v/v) de Glycérol) avant leur application dans les puits du gel. Suite à la migration électrophorétique, le gel a été coloré dans le tampon TAE 1X contenant 20 µg/ml de bromure d'éthidium et les bandes d'ADN ont été révélées sous les rayons UV d'un transilluminateur (Bio-Rad, Canada).

## **2 Identification du gène codant pour la protéine P49 de ChfuGV**

### **2.1 Localisation du gène *p49* dans la banque génomique de ChfuGV**

Tel que mentionné auparavant, ce projet de recherche fait partie d'un projet d'envergure, en cours dans nos laboratoires, visant le séquençage du génome complet du ChfuGV et la caractérisation immunobiologique des principales protéines virales. Le génome de ChfuGV a été séquencé en utilisant la technologie TrueBlue (Génomics One, Canada) et en se basant sur la méthode de clonage et de séquençage aléatoire « Shotgun » (Zabarovsky et *al.*, 1994; Karlyshev et *al.*, 1999). Brièvement, l'ADN viral a été aléatoirement brisé par ultrasons et les fragments d'ADN ainsi générés, de taille allant de 1 kb à 2 kb, ont été isolés puis clonés dans le vecteur pTrueBlue (Slilaty et Lebel, 1998). Le séquençage a été effectué en utilisant la trousse ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction (Roche Diagnostics, Canada) utilisant l'ADN polymérase FS AmpliTaq. Les séquences générées ont été analysées à l'aide du programme ABI 3700 DNA analyzer (Perkin-Elmer, Canada) et, à partir des chevauchements de séquences, plusieurs contiguës ont été constitués. Le gène *p49* a été localisé dans la banque génomique de ChfuGV en se basant sur les homologies des alignements de séquences générées par séquençage aléatoire avec celles des gènes *p49* d'autres baculovirus présents dans la banque de données GenBank. L'alignement et l'analyse des séquences ont été effectués à l'aide du programme GeneWorks 2.5 (Intelligenetics Inc., USA).

## **2.2 Amplification par PCR du gène codant pour la protéine P49**

Le choix des amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier le gène codant pour la protéine P49 a été fait à partir de la séquence du gène de ChfuGV homologue à celles des gènes *p49* d'autres baculovirus. L'amorce sens (*p49* Fr1) comporte 23 nucléotides et sa séquence (5'- TGT ATAATCAATAATATAGTAAC-3') est spécifique à la séquence en 5' du gène viral *p49*. L'amorce anti-sens (*p49* R1) présente une séquence (5'-CCATTTAATATTACTTTCTTAC-3') spécifique à la séquence en 3' du gène *p49*. La synthèse des amorces a été effectuée par le service de synthèse d'oligonucléotides de Alpha DNA Inc. (Canada).

La réaction d'amplification par PCR du gène *p49* a été effectuée à partir de 10 ng d'ADN viral purifié (section 1.5) dans un volume réactionnel de 50 µl contenant du Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, un mélange de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à une concentration finale de 50 µM chacun, deux amorces (*p49* Fr1 et *p49* R1) à une concentration de 0.8 µM chacune et une unité de l'enzyme ADN polymérase Taq<sup>2000</sup>™ (Stratagene, USA). La réaction de polymérisation s'est déroulée dans un thermocycleur programmable de Applied Biosystems (Gene AmPCRsystem 9700) selon les conditions expérimentales suivantes : une pré-dénaturation de l'ADN viral à 94°C pendant 2 min suivie d'un programme de 35 cycles consistant chacun en une étape de dénaturation de l'ADN viral à 94°C pendant 20 secondes, une étape d'hybridation des amorces à l'ADN matrice dénaturée à 47°C pendant 20 secondes et une étape d'extension des amorces par l'enzyme ADN polymérase Taq à 72°C pendant 30 secondes. La réaction a été enfin complétée par une étape d'extension à 72°C pendant 10 min. Cette étape d'extension permet ainsi d'achever l'élongation des amplicons. Les fragments d'ADN amplifiés par PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %.

## **2.3 Clonage du gène codant pour la protéine P49**

### **2.3.1 Réaction de ligation dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1**

Afin de s'assurer de son identité et de permettre son séquençage, l'amplicon du gène *p49* a été cloné dans le vecteur de clonage pCR<sup>®</sup>2.1 (Invitrogen), en utilisant le système de clonage « TA

cloning<sup>®</sup> Kit » d'Invitrogen. Ce système de clonage prend avantage de la capacité de l'ADN polymérase Taq à incorporer, durant la réaction de PCR, une désoxyadénosine (A) à chacune des deux extrémités des amplicons doubles brins. Cette construction facilite la ligation dans le vecteur linéarisé qui possède une désoxythymidine (T) de part et d'autre du site d'insertion du produit de PCR.

Préalablement à la réaction de ligation, le produit de PCR a été purifié en utilisant un filtre microcon<sup>®</sup> PCR (Millipore, Canada). Les amplicons ont été filtrés suite à une centrifugation à 1 000 ×g pendant 15 minutes. Le produit de PCR purifié a été par la suite récupéré en plaçant 20 µl d'eau stérile sur le filtre et en le centrifugeant à 1 000 ×g pendant 2 minutes en position inversée dans un tube collecteur. La ligation du produit de PCR purifié dans le vecteur de clonage pCR<sup>®</sup>2.1 a été effectuée grâce à l'enzyme T4 ADN ligase qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3' hydroxy et l'extrémité 5' monophosphate de deux nucléotides. Ainsi, la réaction a été effectuée à partir d'environ 50 ng du produit de PCR purifié et de 25 ng du plasmide pCR<sup>®</sup>2.1 dans un volume final de 10 µl contenant 4 unités de l'enzyme T4 ADN ligase (Invitrogen) et du tampon de ligation (Tris-HCl 6 mM (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub> 6 mM, NaCl 5 mM, BSA 1 mg/ml, β-mercaptoéthanol 7 mM, ATP 0.1 mM, DDT 2 mM, spermidine 1 mM). Le mélange réactionnel a été par la suite incubé pendant 16 heures dans un bain à 14°C pour permettre l'insertion de l'amplicon dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1.

### 2.3.2 Transformation des bactéries *E. coli* INVα F'

La transformation des cellules bactériennes *E. coli* INVα F' compétentes par le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 contenant le gène *p49* a été réalisée selon le protocole proposé par Invitrogen (TA cloning<sup>®</sup> Kit). Dans la réaction de transformation, 2 µl du produit de ligation ont été incubés en présence de 50 µl de bactéries *E. coli* INVα F' compétentes «One Shot<sup>™</sup>» (Invitrogen) pendant 30 minutes sur glace. Le mélange a été ensuite soumis à un choc thermique pendant 30 secondes à 42°C, permettant la pénétration de l'ADN plasmidique dans les bactéries, puis transféré sur glace. Les parois bactériennes ont été régénérées durant une incubation de 1 heure à 37°C sous agitation (225 rpm) en présence de 250 µl du milieu de culture SOC (tryptone 2.0 % (p/v), extrait de

levure 0.5 % (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10 mM, glucose 20 mM). Après l'étape de régénération, des volumes de 25 µl, 50 µl et 150 µl de la suspension de bactéries transformées ont été étalés sur une gélose 2× YT (agar 1.5 % (p/v), bacto-tryptone 1.6 % (p/v), extrait de levure 1.0 % (p/v), NaCl 0.5 % (p/v), pH 7.2) contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 40 mg/ml du substrat de sélection bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) (Invitrogen). Les géloses ont été ensuite incubées en position inversée pendant 18 heures à 37°C à l'abri de la lumière avant de procéder à la sélection des colonies recombinantes.

### 2.3.3 Principe du criblage des colonies INVα f' recombinantes

La sélection des colonies bactériennes transformées s'est basée sur leur résistance à l'ampicilline et leur réaction en présence du substrat chromogène X-Gal. En fait, le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 possède, comme marqueur de sélection, le gène codant pour la β-lactamase qui confère la résistance à l'ampicilline. Ainsi, seules les bactéries transformées par le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 peuvent croître sur un milieu contenant l'ampicilline. Par ailleurs, la réaction au substrat X-Gal dépend de l'activité de l'enzyme β-galactosidase qui l'hydrolyse pour produire un chromophore bleu. Les souches INVα F' de *E. coli* possèdent une mutation au niveau du gène *lacZ* et codent pour la portion carboxy terminale de la β-galactosidase, soit pour un enzyme inactif. Or, le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1 possède la séquence du gène *LacZα* codant pour la sous-unité α de l'enzyme β-galactosidase. Une fois exprimée, la sous unité α rétablit l'activité de la β-galactosidase par α-complémentation (Ullmann et al., 1967; Shuman et Silhavy, 2003). Ainsi, les bactéries ayant incorporées le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1 peuvent cliver le substrat X-Gal grâce à l'activité de la β-galactosidase rétablie et former des colonies bleues. Toutefois, l'insertion d'un fragment d'ADN dans le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1 interrompt le cadre de lecture du gène qui code pour la sous unité α de la β-galactosidase, empêchant l'α-complémentation et donc la dégradation du substrat X-Gal. De ce fait, seules les bactéries contenant le vecteur recombinant peuvent former des colonies blanches.

### 2.3.4 Purification de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique recombinant a été extrait à partir des colonies bactériennes transformées par



la méthode de lyse alcaline en utilisant le système «QIA prep<sup>®</sup> Miniprep» de Qiagen (Canada). Pour cela, une douzaine de colonies recombinantes a été prélevée des géloses et séparément ensemencée dans 3 ml de milieu de culture 2x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Suite à une incubation de 16 heures à 37°C sous agitation constante (225 rpm), un volume de 1.5 ml de chaque culture bactérienne a été prélevé pour l'extraction de l'ADN plasmidique puis centrifugé à 10 000 ×g pendant 1 minute. Les surnageants ont été décantés et les culots bactériens resuspendus dans 250 µl de tampon de suspension (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) en présence de 100 µg/ml de ribonucléase A. Les parois bactériennes ont été ensuite digérées avec 250 µl de tampon de lyse (NaOH 200 mM, SDS 1 % (p/v)) durant 5 minutes à température ambiante. Une fois neutralisés avec 350 µl de tampon de neutralisation (3 M acétate de potassium, pH 5.5), les lysats bactériens ont été centrifugés à 10 000 ×g pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires et l'ADN génomique des bactéries. Les surnageants ont été récoltés puis transférés sur des filtres composés d'une membrane de gel-Silice (Qiagen). Les filtres ont été ensuite placés dans des tubes collecteurs, centrifugés à 10 000 ×g pendant 1 minute puis lavés deux fois avec 750 µl d'éthanol 75 %. L'ADN plasmidique a été élué de chaque filtre par l'addition de 50 µl d'eau distillée puis récupéré par centrifugation à 10 000 ×g pendant 1 minute.

La présence du gène *p49* dans les vecteurs recombinants a été confirmée suite à une analyse, par électrophorèse sur gel d'agarose, des produits de la digestion des vecteurs recombinants par l'endonucléase de restriction *EcoRI* (Invitrogen). Brièvement, 0.3 µg d'ADN plasmidique purifié a été incubé en présence de 5 unités de l'enzyme de restriction *EcoRI* et du tampon de digestion «react<sup>®</sup> 3» 1X (Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM) (Invitrogen) dans un volume réactionnel de 10 µl, pendant 1 heure à 37°C. Les produits de digestion ont été ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %.

### 2.3.5 Séquençage et analyses bioinformatiques

Les plasmides recombinants, pCR<sup>®</sup>2.1 contenant le gène *p49* (noté pCR<sup>®</sup>2.1/*p49*), ont été séquencés par le service de séquençage de DNA LandMarks Inc. (Canada), en utilisant les

amorces universelles M13 sens et anti-sens. Les chromatogrammes générés ont été visualisés grâce au logiciel Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd., Australie). Le séquençage des vecteurs recombinants a ainsi permis de s'assurer de l'identité et de l'intégrité du gène *p49*. L'analyse de la séquence nucléotidique du gène *p49* et celle déduite en acides aminés ont été effectuées à l'aide des programmes BLAST et Fasta3 disponibles dans le serveur ExPASy (Swiss Institute of Bioinformatics). L'alignement de la séquence déduite en acides aminés de la protéine P49 de ChfuGV avec celles d'autres baculovirus disponibles dans la banque de données GenBank/EMBL a été réalisé à l'aide du programme CLUSTAL W version 1.4 (EMBL-EBI European Bioinformatics Institute). Les points isoélectriques ont été établis à l'aide du logiciel BioEdit version 7.0.1 (Isis Pharmaceuticals, USA). Les profils d'hydropathie ont été obtenus en utilisant les valeurs (-4.5 à 4.5) de Kyte et Doolittle (1982), à l'aide du programme DS Gene version 1.1 (Accelrys Inc., USA). Les séquences des protéines P49 utilisées dans cette étude ont les numéros d'accès suivants : HaSNPV (AAG53752), HzSNPV (AAL56154), SINPV (CAA07223), SpltNPV (AAL01739), CpGV (AAK70682), PhopGV (AAM70211), et CrleGV (AAQ21611).

### **3 Système d'expression procaryote**

Suite à la caractérisation moléculaire du gène *p49* de ChfuGV, le second objectif de ce projet a été de produire la protéine recombinante P49 en utilisant un système d'expression procaryote. Ainsi, le gène *p49* a été cloné dans le vecteur d'expression procaryote pQE32 (Qiagen, Canada). La protéine recombinante P49 a été par la suite exprimée dans les bactéries *E. coli* M15 [pREP4] puis purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA. L'utilisation d'un tel système offre généralement d'importants rendements de production de protéines recombinantes comparativement à d'autres systèmes d'expression.

#### **3.1 Construction du vecteur d'expression recombinant pQE32/*p49***

Le gène *p49* a été préalablement modifié à ses extrémités par PCR, en y introduisant des sites de restriction, puis stabilisé dans le vecteur de clonage pCR<sup>®</sup> 2.1 (Invitrogen) avant d'être cloné

dans le vecteur d'expression procaryote pQE32 (Qiagen).

### 3.1.1 Amplification par PCR du gène *p49*

Afin de diriger le clonage dans le vecteur d'expression pQE32, la séquence de l'ORF (Cadre de lecture ouvert) du gène *p49* a été amplifiée par PCR en utilisant des amorces oligonucléotidiques spécifiques auxquelles ont été ajoutées des séquences de sites de restriction. L'amorce sens (pQE. 49Fr : 5'- GCGG ATCCAGATGGATTTTAA -3') comporte à l'extrémité 5', la séquence du site reconnu par l'enzyme de restriction *Bam*HI. L'amorce anti-sens (pQE. 49Rw : 5'- GCAA GCTTCCATTTAATATTAC -3') présente la séquence du site de clivage de l'enzyme de restriction *Hind*III à son extrémité 5'. La réaction d'amplification par PCR du gène *p49* a été effectuée selon la procédure décrite dans la section 2.2 de ce chapitre, en utilisant comme matrice le vecteur recombinant pCR<sup>®</sup>2.1/*p49* purifié (section 2.3.4). Les amplicons d'ADN ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %.

### 3.1.2 Clonage du gène *p49* dans le vecteur pCR<sup>®</sup> 2.1

L'étape de clonage dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 a été réalisée dans le but de conserver la stabilité et l'intégrité du gène *p49* amplifié par PCR et, en particulier, pour faciliter son sous-clonage dans le vecteur d'expression procaryote pQE32. Ainsi, le produit de PCR a été purifié puis cloné dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 en utilisant le système de clonage «TA cloning<sup>®</sup> Kit» (Invitrogen) selon les procédures décrites dans les sections 2.3.1, 2.3.2 et 2.3.4. La présence du gène *p49* dans les vecteurs recombinants, notés pCR<sup>®</sup>2.1/*pQE.49*, a été confirmée suite à une analyse, par électrophorèse sur gel d'agarose, des produits de la double digestion des vecteurs recombinants par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III (Amersham Pharmacia, Canada). Ainsi, les vecteurs recombinants ont été initialement digérés pendant 30 minutes à 37°C par l'endonucléase *Bam*HI dans le tampon de digestion « One-Phor-All » 1X (Tris acétate 10 mM, acétate de magnésium 10 mM, acétate de potassium 50 mM, pH 7.5) (Amersham Pharmacia), tel que décrit dans la section 2.3.4. Par la suite, 5 unités de l'enzyme *Hind*III dans le tampon de digestion 1X (One-Phor-All) ont été ajoutées aux produits de la première digestion. La deuxième digestion a

été réalisée durant 1 heure avant l'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %.

### **3.1.3 Sous-clonage du gène codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression pQE32**

Le gène *p49* a été sous-cloné dans le vecteur d'expression procaryote pQE32 (figure 3). Ce vecteur permet un fort niveau d'expression dans les bactéries *E. coli* grâce à la présence du système promoteur T5 / opéron lac. De plus, le vecteur pQE32 possède une séquence d'ADN, codant pour six résidus histidines, insérée en amont de son site de clonage multiple. Ainsi, l'expression génère une protéine recombinante dont l'extrémité amino - terminale est fusionnée à une queue de six résidus histidines. Ces résidus permettent la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA et sa détection par immunobuvardage de type Western (section 3.3). Le vecteur pQE32 possède aussi le gène codant pour la  $\beta$ -lactamase, utilisé comme marqueur de sélection en présence de l'ampicilline.

#### **3.1.3.1 Digestion du gène codant pour la protéine P49 et du vecteur d'expression pQE32**

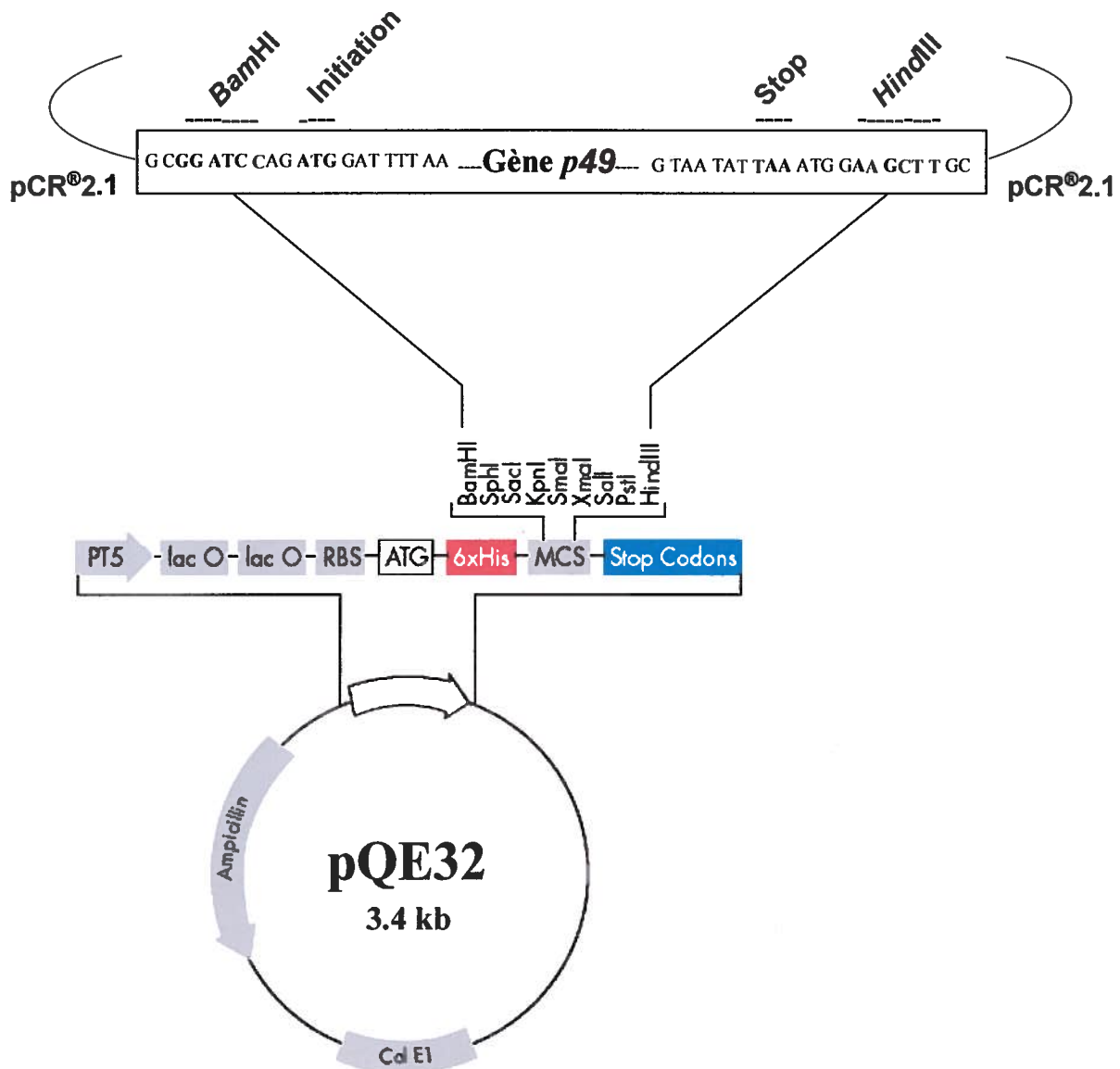
Afin de cloner le gène *p49* dans le vecteur d'expression pQE32, une double digestion des deux produits a été effectuée en utilisant les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III (Amersham Pharmacia). Ainsi, 3  $\mu$ g du vecteur recombinant pCR<sup>®</sup>2.1/*pQE.49* (section 3.1.2) ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C en présence de 20 unités de l'endonucléase *Bam*HI et du tampon de digestion 1X (One-Phor-All) dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ l. Par la suite, 20 unités de l'enzyme *Hind*III et du même tampon de digestion ont été ajoutés aux produits de la première digestion, dans un volume final de 60  $\mu$ l, puis incubés durant 1 heure à 37°C. Parallèlement, 600 ng du vecteur pQE32 ont été digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III dans un volume réactionnel de 25  $\mu$ l et dans les mêmes conditions expérimentales. Les produits des doubles digestions ont été ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %.

#### **3.1.3.2 Extraction et purification du gène *p49* et du vecteur d'expression pQE32 digérés**

Les fragments correspondant au gène *p49* et au plasmide pQE32 préalablement digérés par les

**Figure 3 : Représentation schématique du clonage du gène codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression procaryote pQE32 (Qiagen).**

Le gène *p49* contenu dans le vecteur pCR2.1 a été sous cloné dans le vecteur d'expression pQE32, au niveau des sites de restriction *Bam*HI et *Hind*III, afin de produire la protéine recombinante P49 dans un système procaryote.



Promoteur T5 / opéron lac : 7 - 87 nt

Site d'initiation de la transcription T5 : 61 nt

Séquence codant pour la queue 6x His : 127 - 144 nt

Site de clonage multiple : 146 - 193 nt

Site de terminaison de la transcription de Lambda  $t_0$  : 209 - 303 nt

Site de terminaison de la transcription de *rrnB* T1 : 1 065 - 1 163 nt

Origine de répliation ColE1 : 1 640 nt

Gène codant pour la  $\beta$ -lactamase (résistance à l'ampicilline) : 3 258 - 2 398 nt

enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III ont été extraits à partir du gel d'agarose puis purifiés en utilisant le système « Sphaglas™ BandPrep » (Amersham Pharmacia).

Ainsi, les bandes d'ADN relatives à l'ORF du gène *p49* (environ 1.4 kb) et au vecteur d'expression pQE32 (3.4 kb) digérés ont été visualisées sous UV puis excisées à partir du gel d'agarose. Les fragments de gel contenant les bandes d'intérêt ont été incubés, dans un premier temps, pendant 10 minutes à 60°C en présence de 250 µl d'une solution de solubilisation contenant de l'iodure de sodium (Amersham Pharmacia) et, dans un second temps, en présence de 5 µl d'une solution de billes de Sphaglas BP (Sphaglas 20 % (p/v), Kathon™ CG/ICP Biocide 0.15 %) (Amersham Pharmacia) pendant 5 minutes à température ambiante. L'ADN lié aux billes de Sphaglas a été centrifugé deux fois pendant 30 secondes à 13 000 ×g puis lavé trois fois avec 80 µl de tampon de lavage (Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM, NaCl 0.1 mM, éthanol 70 %) (Amersham Pharmacia). L'ADN a été élué à partir des billes de Sphaglas suite à une incubation de 5 minutes à température ambiante en présence de 20 µl de tampon d'éluion (Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM) (Amersham Pharmacia). Après une centrifugation de la suspension à 13 000 ×g pendant 30 secondes, l'ADN contenu dans le surnageant a été récupéré puis analysé par électrophorèse sur gel d'agarose de 0.8 %.

### **3.1.3.3 Clonage du gène *p49* dans le vecteur d'expression pQE32 et transformation des bactéries compétentes *E. coli* XL-1 Blue**

L'ORF du gène *p49* préalablement digéré et purifié par le système « Sphaglas™ BandPrep » (Amersham Pharmacia) a été inséré de façon directionnelle dans le site de clonage multiple du vecteur linéarisé pQE32. La réaction de ligation a été effectuée avec l'enzyme T4 ADN ligase (Invitrogen) selon la procédure décrite dans la section 2.3.1, en utilisant 200 ng de l'ORF du gène *p49* et 50 ng du plasmide pQE32.

Le produit de la ligation a été utilisé pour transformer les cellules bactériennes compétentes *E. coli* XL-1Blue (Qiagen) tel que décrit dans la section 2.3.2. Dans cette expérience de transformation, le choc thermique appliqué aux cellules bactériennes s'est déroulé durant 90

secondes à 42°C pour permettre la pénétration de l'ADN plasmidique dans ces cellules. La régénération des parois cellulaires a eu lieu par incubation de 90 minutes à 37°C dans 500 µl du milieu Psi (2x YT contenant 4 mM de MgSO<sub>4</sub> et 10 mM de KCl). Les cellules bactériennes transformées ont été ensuite étalées sur les géloses 2x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

#### **3.1.3.4 Extraction du vecteur recombinant pQE32/p49 à partir des bactéries *E. coli* XL-1 Blue transformées**

Grâce à la présence du gène codant pour la β-lactamase dans le vecteur pQE32, seules les bactéries transformées peuvent croître sur la gélose 2x YT contenant l'ampicilline. Ainsi, une douzaine de colonies bactériennes transformées a été ensemencée dans le milieu de culture 2x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline, pour extraire l'ADN plasmidique recombinant en utilisant le système « QIA prep<sup>®</sup> Miniprep » de Qiagen (section 2.3.4).

La présence du gène codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression pQE32 a été confirmée suite à une analyse, par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %, des produits de la double digestion des vecteurs recombinants avec les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Hind*III. Afin de s'assurer de l'intégrité de la séquence de l'ORF codant pour la protéine P49, deux vecteurs recombinants positifs, pQE32/p49, ont été sélectionnés puis séquencés par le service de séquençage de DNA LandMarks Inc. (Canada). Le séquençage a été effectué en utilisant des amorces sens (5'- CGGATAACAATTC ACACAG -3') et anti-sens (5'- GTTCTGAGGTCATTACTGG -3') spécifiques aux séquences situées respectivement en amont et en aval du site de clonage multiple du vecteur pQE32. Le chromatogramme généré suite au séquençage a été visualisé grâce au logiciel Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd., Australie). Les séquences ainsi obtenues ont été analysées à l'aide du programme GeneWorks 2.5 (Intelligenetics Inc., USA).

## **3.2 Expression de la protéine recombinante P49 dans un système d'expression procaryote**

Le gène qui code pour la protéine P49 cloné dans le vecteur d'expression pQE32 a été exprimé dans les souches M15 [pREP4] des bactéries *E. coli* en utilisant le système « The



QIAexpressionist » de Qiagen. Dans ce système, l'expression du gène d'intérêt est fortement contrôlée par la protéine répressive Lac, codée constitutivement par le gène *lac I* qui est contenu dans le plasmide pREP4 bactérien. En fait, cette protéine répressive se lie aux opérons lac du vecteur pQE32 et assure la répression du promoteur T5 et donc de la transcription du gène d'intérêt. L'expression de la protéine recombinante dans les cellules bactériennes *E. coli* M15 [pREP4] est induite par l'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) qui inactive la protéine répressive Lac. En plus du gène codant pour la protéine répressive Lac, le plasmide pREP4 bactérien comporte également le gène de résistance à la kanamycine.

### **3.2.1 Transformation des bactéries *E. coli* M15 [pREP4] par le plasmide recombinant pQE32/p49**

La réaction de transformation a été initiée en incubant séparément 1.5  $\mu$ g du vecteur recombinant pQE32/p49 (section 3.1) et 0.2  $\mu$ g du plasmide intact pQE32 en présence de 100  $\mu$ l de bactéries compétentes *E. coli* M15 [pREP4] pendant 20 minutes sur glace. La transformation avec le plasmide pQE32 seul servira en fait de contrôle négatif lors de l'expression et la purification de la protéine recombinante. Les bactéries ont été ensuite soumises à un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes, permettant la pénétration de l'ADN plasmidique. La régénération des parois cellulaires s'est déroulée durant une incubation de 90 minutes à 37°C sous agitation (225 rpm) en présence de 500  $\mu$ l du milieu Psi. Par la suite, les cellules bactériennes transformées ont été étalées sur les géloses 2x YT contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline et 25  $\mu$ g/ml de kanamycine puis incubées en position inversée pendant 18 heures à 37°C. Ainsi, seules les bactéries transformées sont capables de croître et ce, grâce à leur résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, respectivement conférée par le plasmide pQE32 et pREP4.

Suite à une extraction plasmidique avec le système « QIA prep<sup>®</sup> Miniprep » (Qiagen) puis une digestion avec les enzymes *Bam* HI et *Hind* III, la présence du vecteur recombinant pQE32/p49 et du plasmide contrôle pQE32 dans les bactéries transformées *E. coli* M15 [pREP4] a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %.

### **3.2.2 Induction de l'expression de la protéine recombinante P49**

À partir de la culture de bactéries *E. coli* M15 [pREP4] contenant le vecteur recombinant pQE32/p49, un volume de 20 µl a été prélevé puis inoculé dans 3 ml de milieu liquide 2x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine. Pour des fins de comparaison des profils d'expression, la culture des bactéries transformées par le plasmide pQE32 seule (contrôle négatif), a été traitée dans les mêmes conditions expérimentales. Suite à une incubation de 16 heures à 37°C sous agitation constante (225 rpm), 0.5 ml de la culture bactérienne a étéensemencé dans 10 ml de milieu liquide 2x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine. Par la suite, une incubation à 37°C sous agitation constante a été effectuée jusqu'à ce que les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance (environ 70 minutes). Cette phase exponentielle est atteinte lorsque la mesure de la densité optique de la culture bactérienne se situe entre 0,6 et 0,8 à une longueur d'onde de 600 nm. L'expression de la protéine recombinante P49 par les bactéries *E. coli* M15 [pREP4] en phase exponentielle de croissance a été induite par l'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Suite à une induction de 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 et 24 heures, un prélèvement de 1ml de chaque culture bactérienne a été effectué puis centrifugé à 13 000 ×g pendant 1 minute. Les culots bactériens et les surnageants ont été conservés à -70°C jusqu'à leur analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

### **3.2.3 Analyse de l'expression de la protéine recombinante P49 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)**

Le profil d'expression de la protéine recombinante P49 par les bactéries *E. coli* M15 [pREP4] induites par l'IPTG a été visualisé à l'aide d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 %, réalisée selon la méthode décrite par Laemmli (1970). Ainsi, les culots bactériens et leur surnageant respectif, provenant des différents temps d'induction à l'IPTG, ont été incubés durant 5 minutes à 100°C en présence du tampon réducteur 1X (SDS 2 % (p/v), glycérol 10 % (v/v), β-mercaptoéthanol 2.5 %, bleu de bromophénol 0.005 %, Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8). Cette incubation, permettant la dénaturation des protéines, a été suivie d'une centrifugation de 5 minutes à 10 000 ×g pour clarifier les suspensions protéiques. Un volume de 14 µl de chaque échantillon et du marqueur de masse moléculaire « Broad Range » (Bio-Rad, Canada) a été chargé sur le gel de polyacrylamide 10 %. Celui-ci a été préalablement disposé dans une

cellule électrophorétique « Mini-Protean ® II Dual Slab Electrophoresis » (Bio-Rad) contenant du tampon Tris-glycine (glycine 192 mM, Tris 25 mM (pH 8.3), SDS 0.1 % (p/v)). À la fin de la migration, le gel de polyacrylamide a été incubé, pendant 45 minutes sous agitation, dans une solution colorante (bleu de coomassie R-250 (Bio-Rad) 0,4 % (p/v), méthanol 40 % (v/v), acide acétique 10 % (v/v)). La décoloration du gel a été effectuée dans une solution contenant 40 % (v/v) de méthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique, durant 3 heures sous agitation.

### **3.3 Purification de la protéine recombinante P49 par chromatographie d'affinité**

La protéine recombinante P49, liée à une queue de six résidus histidines, a été purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne de nickel en interaction avec l'acide nitrilotriacétique (Ni-NTA) (Qiagen). Au niveau moléculaire, l'acide nitrilotriacétique (NTA) occupe quatre des six sites de liaison de l'ion nickel laissant ainsi deux sites disponibles pour la liaison de la queue de six résidus histidines fusionnée à la protéine recombinante. Selon sa solubilité, la protéine recombinante peut être purifiée sous conditions natives ou dénaturantes. En condition native, l'imidazole, un composé homologue à l'histidine, est utilisé en concentration croissante afin de favoriser sa compétition avec l'histidine pour la liaison aux ions de nickel. À forte concentration, l'imidazole permet ainsi la dissociation de la queue de six résidus histidines de la colonne Ni-NTA et donc l'élution de la protéine recombinante. Sous conditions dénaturantes, la protéine recombinante, solubilisée en présence de détergents, peut être purifiée en diminuant le pH jusqu'à la protonation des six résidus histidines et donc leur dissociation de la colonne Ni-NTA.

#### **3.3.1 Mise au point des conditions de purification de la protéine recombinante P49**

Différentes conditions expérimentales ont été testées avant d'optimiser la purification de la protéine recombinante P49 préalablement exprimée dans les cellules *E. coli* M15 [pREP4]. Initialement, une tentative de purification a été réalisée sous des conditions natives. Pour cela, les cellules bactériennes recombinantes ont été lysées en présence d'un tampon de lyse (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM, pH 8.0) contenant 1 mg/ml de lysosyme et sous différentes conditions de sonication (de 3 fois 10 secondes à 5 fois 120 secondes). La protéine

recombinante P49 étant insoluble, des conditions dénaturantes de purification ont alors été testées. Suite à la lyse des cellules bactériennes dans le tampon dénaturant ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris·Cl 10 mM (pH 8.0), urée 8 M), divers paramètres ont été expérimentés, notamment plusieurs temps de sonication des cellules bactériennes, différentes concentrations de plusieurs détergents tels que le Tween 20, le NP-40, le SDS et le Triton 100 X.

### 3.3.2 Stratégie de purification de la protéine recombinante P49

La protéine recombinante P49, produite sous forme insoluble, a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel Ni-NTA en utilisant des conditions dénaturantes. Ainsi, une culture de 500 ml de bactéries recombinantes *E. coli* M15 [pREP4], en phase exponentielle de croissance, a été induite par 1 mM d'IPTG pendant 8 heures à 37°C. Pour des fins de comparaison des profils de purification, la culture de *E. coli* M15 [pREP4] contenant le plasmide pQE32 seul (contrôle négatif) a été traitée sous les mêmes conditions expérimentales. Suite à l'expression, une centrifugation à 4 000  $\times$ g a été effectuée pendant 25 minutes à 4°C afin de récupérer les cellules bactériennes. Le culot bactérien a été ensuite resuspendu dans 100 ml de tampon de lyse ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris·Cl 10 mM, urée 8 M, pH 8.0) contenant 0.25 % de SDS, puis incubé durant 2 heures à 37°C sous agitation (150 rpm). Le lysat bactérien a été centrifugé à 4 000  $\times$ g durant 30 minutes à température ambiante afin d'éliminer les débris cellulaires. Le culot obtenu et un échantillon de 100  $\mu$ l prélevé du surnageant ont été conservés à -70°C jusqu'à leur analyse ultérieure. Par la suite, une concentration de 1 % de Triton X-100 a été ajoutée au surnageant (ou lysat clarifié) suivie d'une incubation de 15 minutes à température ambiante. Toutes les étapes subséquentes de la purification de la protéine recombinante P49 ont été réalisées à température ambiante. Ainsi, le lysat clarifié contenant la protéine recombinante P49 solubilisée a été incubé en présence de 1 % de résine Ni-NTA, dans un volume final de 50 ml, pendant 2 heures sous une agitation constante de 150 rpm. Suite à cette incubation permettant l'adsorption de la protéine P49 recombinante aux ions de nickel, le mélange a été introduit dans une colonne de 5 ml (Qiagen) fixée à la verticale puis coulé par gravité. L'échantillon exclu de la colonne (correspondant aux protéines non adsorbées à la colonne) a été récolté et conservé pour des analyses ultérieures. Par la suite, une série de quinze lavages de 1 ml avec le tampon de lavage ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris·Cl 10 mM, urée 8 M, pH 6.3) a été effectuée sur la colonne

afin d'éliminer les protéines contaminantes. La protéine recombinante P49 a été éluée de la matrice Ni-NTA suite à l'application de huit volumes de 1 ml de tampon d'éluion ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris·Cl 10 mM, urée 8 M, pH 5.9) contenant 0.1 % de SDS. Les fractions récoltées des différentes étapes de la purification de la protéine recombinante P49 ont été analysées par électrophorèse (SDS-PAGE) sur gel de polyacrylamide de 10 % et par immunobuvardage de type Western. Les fractions issues de chaque étape de la purification à partir des bactéries contrôles (*E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32)]) ont également été analysées sous les mêmes conditions.

### **3.3.3 Détection de la protéine recombinante P49 par immunobuvardage de type western (Western blot)**

Les fractions de la purification de la protéine recombinante P49 et celles des protéines d'origine bactérienne ont été séparément analysées par immunobuvardage de type Western selon la technique décrite par Burnette (1981). Initialement, chaque fraction a été chargée sur deux gels identiques de polyacrylamide de 10 %. Suite à l'électrophorèse (SDS-PAGE) effectuée telle que décrit dans section 3.2.3 de ce chapitre, les protéines du premier gel ont été colorées au bleu de coomassie alors que celles du deuxième gel ont été transférées sur une membrane de polyvinylidifluorure (PVDF), durant 75 min à 200 V, pour l'analyse par Western blot. Après le transfert, la membrane de PVDF a été bloquée dans une solution de blocage (BSA 2 % (v/v), Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) et 0.1 % (v/v) de Tween-20) pendant 16 heures à température ambiante et ensuite incubée durant 1 heure en présence de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de l'anticorps monoclonal IgG1 de souris anti-histidine « Penta-His<sup>TM</sup> Antibody » (Qiagen). Une série de trois lavages de 20 minutes a été effectuée sur la membrane en utilisant un tampon contenant 0,05 % (v/v) de Tween-20 et 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5). La membrane a été ensuite incubée pendant 1 heure en présence d'une dilution de 1/250 de l'anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de souris conjugué à la biotine (Calbiochem, EMD Biosciences Inc., USA). À la suite de trois lavages consécutifs, la membrane a été incubée durant 30 minutes dans la solution de révélation contenant le complexe streptavidine-peroxydase (Calbiochem) dilué 1/250. La membrane a été lavée puis développée suite à une incubation de 15 minutes dans une solution contenant le substrat 3,3'-diaminobenzidine dilué 1/50 (DAB, Calbiochem).

### **3.3.4 Dialyse et concentration de la protéine recombinante P49**

Avant de procéder à la concentration de la protéine recombinante P49 purifiée, les éluats contenant la protéine d'intérêt ont d'abord été dialysés contre le tampon PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 6.5 mM, pH 7.4). Ainsi, ces fractions éluées ont été dialysées deux fois dans le tampon PBS 1X durant 2 heures à température ambiante puis une fois le même volume de tampon à 4°C durant 24 heures. L'éluat dialysé contenant la protéine recombinante P49 a été par la suite concentré sous vide à température ambiante durant 2 heures, après en avoir prélevé un échantillon de 100 µl pour des analyses ultérieures. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % (SDS-PAGE) a été effectuée afin de vérifier la présence de la protéine recombinante P49 dans l'éluat dialysé et concentré.

### **3.3.5 Test de confirmation de la purification de la protéine recombinante P49**

Une expérience a été conçue de façon à s'assurer que la protéine purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA soit bien la protéine recombinante P49 et non une protéine d'origine bactérienne. Cette expérience consiste en l'immunodétection, par immunobuvardage de type Western, de toutes les protéines d'origine bactérienne pouvant être co-éluées avec la protéine recombinante P49. Pour cela, les protéines d'origine bactérienne, qui s'adsorbent de façon non spécifique à la colonne Ni-NTA durant la purification, ont été injectées à des souris Balb/c en vue de produire des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. Ainsi, ces anticorps ne devraient pas reconnaître la protéine recombinante P49 contenue dans l'éluat.

### **3.3.6 Quantification de la protéine recombinante P49**

La protéine recombinante P49 purifiée a été quantifiée par la technique de Bradford (1976). Dans ce test, six concentrations différentes (1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,035 mg/ml) de la protéine standard, l'albumine du sérum bovin lyophilisé «Assay Standard II » (Bio-Rad), ont été préparées dans le tampon PBS 1X à pH 7.4. En parallèle, la protéine recombinante P49 a été diluée (1/2, 1/4, 1/8 et 1/6) dans le même tampon PBS. Un volume de 10 µl de chaque concentration du standard et de la protéine recombinante P49 a été transféré dans les puits d'un

plateau de 96 puits « NUNC™ Brand Products » (Nalge Nunc International, Danemark). Par la suite, 200 µl du réactif de Bradford « Dye reagent » (Bio-Rad) préalablement dilué dans de l'eau distillée (dilution 1/5) ont été ajoutés dans chacun des puits. La densité optique des protéines contenues dans chacun des puits a été mesurée à une longueur d'onde de 620 nm à l'aide du spectrophotomètre « Digiscan microplate » et du logiciel « Digiwin Software, version 3.1 » (ASYS Hitech GmbH, source Phonenix Biotech corp., Canada). Une courbe standard a été établie en utilisant la densité optique de chaque dilution du standard et ce pour déterminer la concentration de la protéine recombinante P49.

#### **4 Système d'expression eucaryote**

L'expression de la protéine P49 dans un système eucaryote implique le clonage de l'ORF codant pour cette protéine dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (Invitrogen). Celui-ci permettra par la suite de diriger la production *in vivo* de la protéine P49 suite à l'injection du vecteur recombinant dans les cellules de souris Balb/c. L'utilisation d'un tel système offre principalement l'avantage de produire une protéine sous une conformation native.

##### **4.1 Construction du vecteur d'expression recombinant pcDNA3/p49**

Les étapes de construction du vecteur recombinant d'expression eucaryote sont similaires à celles décrites lors de la production du vecteur d'expression procaryote. Ainsi, l'ORF du gène *p49* a été modifiés à ses extrémités par PCR, en y introduisant notamment la séquence de Kozak et les sites de restriction des enzymes *HindIII* et *XbaI*. Suite à l'amplification, l'ORF du gène *p49* a été stabilisé dans le vecteur pCR®2.1 avant de procéder à son sous-clonage dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (Invitrogen).

##### **4.1.1 Amplification par PCR du gène *p49***

L'ORF du gène *p49* a été amplifié par PCR en utilisant des amorces oligonucléotidiques spécifiques auxquelles des modifications ont été apportées pour favoriser le clonage et l'expression dans un système eucaryote. L'amorce sens (pc. 49Fr : 5'- GCAAGCTTACCATG

GATTTTAATA -3') comporte à l'extrémité 5', la séquence du site reconnu par l'enzyme de restriction *HindIII* suivie de la séquence préférentielle de Kozak (ACC) (Kozak, 1987). L'amorce anti-sens (pc. 49Rw : 5'- GCTCTAGACCATTTAATATTACTT -3') comporte à l'extrémité 5', la séquence du site de clivage de l'enzyme de restriction *XbaI*. La présence de sites de restriction distincts aux extrémités des amorces a pour but d'orienter l'insertion du gène *p49* dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3. La réaction d'amplification par PCR du gène *p49* a été effectuée, en utilisant comme matrice le vecteur recombinant pCR<sup>®</sup>2.1/*p49* purifié (section 2.3.4), selon la procédure décrite dans la section 2.2 de ce chapitre. Les amplicons d'ADN ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %.

#### 4.1.2 Stabilisation du gène *p49* dans le vecteur pCR<sup>®</sup> 2.1

Le clonage dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 a pour but de stabiliser et de conserver l'intégrité de l'ORF codant pour la protéine P49 amplifié et surtout, de faciliter son sous-clonage dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3. Ainsi, le produit de PCR a été purifié puis cloné dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 en utilisant le système «TA Cloning<sup>®</sup>Kit» (Invitrogen) selon les procédures décrites dans les sections 2.3.1, 2.3.2 et 2.3.4. La présence du gène *p49* dans les vecteurs recombinants, notés pCR<sup>®</sup>2.1/*pc.49*, a été confirmée suite à une analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (0.8 %), des produits de la double digestion des vecteurs recombinants par les enzymes de restriction *HindIII* et *XbaI* (Amersham Pharmacia, Canada). Cette double digestion a en fait été effectuée dans 1X du tampon de digestion M (Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, dithiothreitol 1 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5) tel que décrit dans la section 3.1.2.

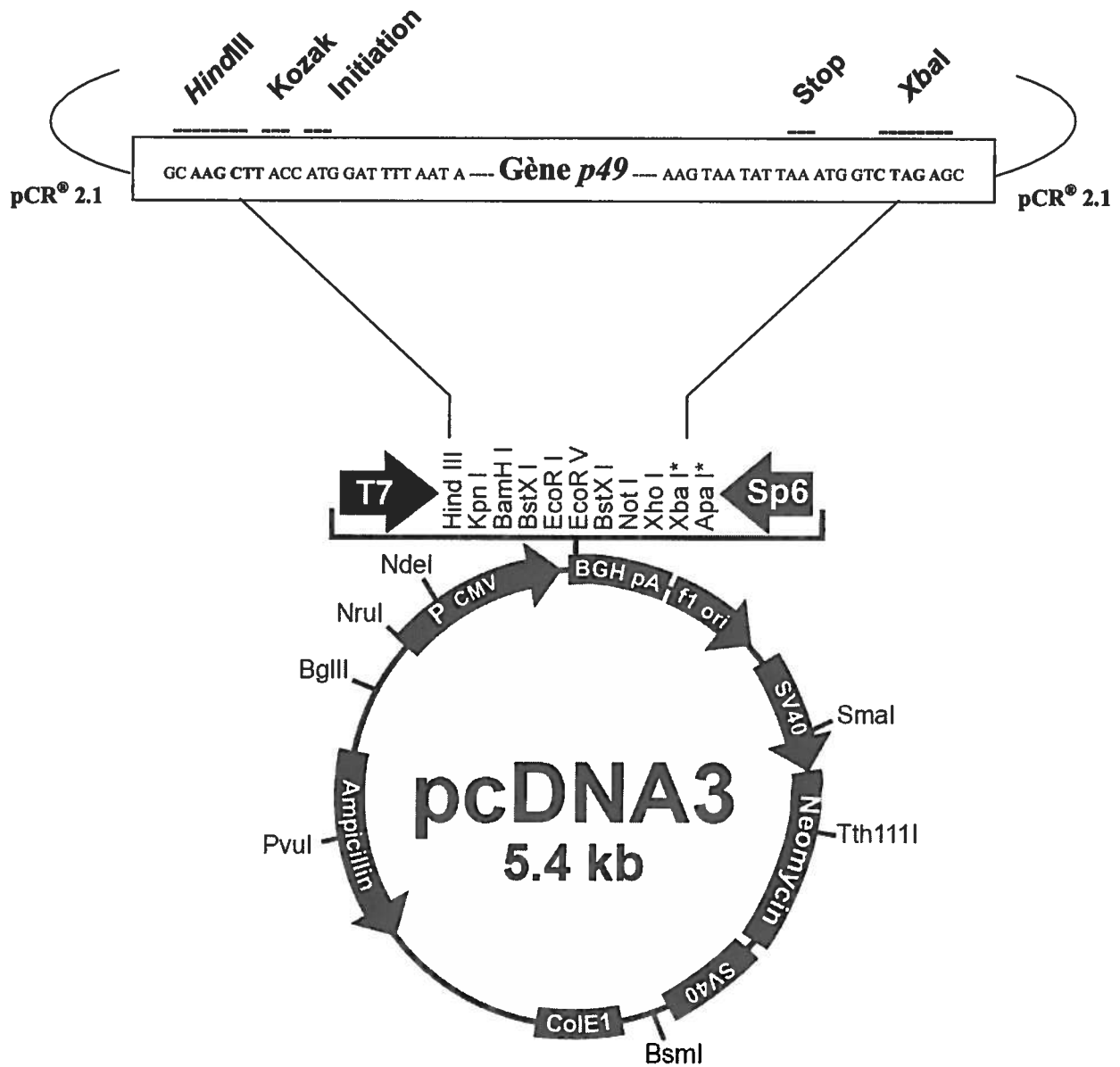
#### 4.1.3 Sous-Clonage du gène *p49* dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3

L'ORF codant pour la protéine P49 a été sous-cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (figure 4). Celui-ci est doté de certains paramètres génétiques nécessaires à l'expression du gène d'intérêt dans un système eucaryote. En effet, le vecteur pcDNA3 comporte notamment le promoteur du cytomégalovirus humain (CMV) qui assure un fort niveau transcriptionnel du fragment d'ADN inséré au site de clonage multiple. De plus, ce vecteur d'expression est pourvu



**Figure 4 : Représentation schématique du clonage du gène codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (Invitrogen).**

Le gène *p49* contenu dans le vecteur pCR2.1 a été sous cloné dans le vecteur d'expression pcDNA3, au niveau des sites de restriction *Hind*III et *Xba*I, afin de produire la protéine recombinante P49 dans un système eucaryote.



- Promoteur CMV : 209 - 863 nt
- Promoteur T7 : 864 - 882 nt
- Site de clonage multiple : 889 - 994 nt
- Promoteur Sp6 : 999 - 1 016 nt
- Poly A du BGH : 1018 - 1249 nt
- Promoteur SV40 : 1790 - 2115 nt
- Origine de répliation du SV40 : 1984 - 2069 nt
- Gène de résistance à la néomycine : 2151 - 2945 nt
- Poly A du SV40 : 3 000 - 3 372 nt
- Origine de répliation ColE1 : 3 632 - 4 305 nt
- Gène codant pour la  $\beta$ -lactamase (résistance à l'ampicilline) : 4 450 - 5 310 nt

d'une origine de répllication ColE1 qui lui permet la propagation dans les bactéries *E. coli*. Le vecteur pcDNA3 est caractérisé aussi par la présence des séquences du promoteur T7 et SP6, respectivement en amont et en aval du site de clonage multiple, permettant le séquençage de l'insert. Enfin, le vecteur pcDNA3 confère une résistance à l'ampicilline grâce à la présence du gène codant pour la  $\beta$ -lactamase.

#### **4.1.3.1 Digestion et purification du gène *p49* et du vecteur d'expression pcDNA3**

Dans le but d'un clonage directionnel du gène *p49* dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3, le vecteur recombinant pCR<sup>®</sup>2.1/*pc.49* (3  $\mu$ g) et le vecteur d'expression pcDNA3 (1.2  $\mu$ g) ont été séparément digérés par les endonucléases de restriction *Hind*III et *Xba*I (Amersham Pharmacia). Suite à la migration sur gel d'agarose des produits de la double digestion, les bandes d'ADN correspondant au vecteur d'expression pcDNA3 (5.4 kb) et à l'ORF codant pour la protéine P49 (environ 1.4 kb) ont été séparément excisées puis extraites du gel. Les fragments d'ADN ont été ensuite purifiés en utilisant le système Sephaglas<sup>™</sup> BandPrep (Amersham Pharmacia) dont la procédure est décrite dans la section 3.1.3.2 de ce chapitre.

#### **4.1.3.2 Clonage du gène *p49* dans le vecteur d'expression pcDNA3 et transformation des bactéries compétentes *E. coli* XL1-Blue**

Le gène *p49* préalablement digéré et purifié a été inséré de façon directionnelle dans le site de clonage multiple du vecteur linéarisé pcDNA3. La réaction de ligation a été effectuée avec l'enzyme T4 ADN ligase (Invitrogen) selon la procédure décrite dans la section 2.3.1, en utilisant 250 ng du gène *p49* et 60 ng du plasmide pcDNA3.

Le vecteur recombinant pcDNA3/*p49* issu de la réaction de ligation a été propagé par transformation des bactéries compétentes *E. coli* XL1-Blue selon la procédure décrite à la section 3.1.3.3. Les cellules bactériennes transformées ont étéensemencées sur les géloses 2x YT contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline puis incubées en position inversée pendant 18 heures à 37°C.

#### **4.1.3.3 Criblage des bactéries *E. coli* XL-1 Blue et purification du vecteur recombinant pcDNA/p49**

La sélection des bactéries *E. coli* XL-1blue recombinantes a été basée sur leur résistance à l'ampicilline conférée par le vecteur pcDNA3. Ainsi, une douzaine de colonies bactériennes transformées a été prélevée des géloses pour l'extraction et la purification des vecteurs recombinants en utilisant le système « QIA prep<sup>®</sup> Miniprep » de Qiagen (section 2.3.4).

La présence de l'ORF codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression pcDNA3 et dans l'orientation prévue a été confirmée par analyse de la cartographie des vecteurs recombinants. Ainsi, deux clones purifiés par minipréparation ont été séparément digérés en série de deux enzymes de restriction : *Hind* III et *Xba* I, *Nde* I et *Hind* III, *Nde* I et *Cla* I (Amersham Pharmacia). Les fragments générés par les doubles digestions ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %. Les deux vecteurs recombinants contenant l'ORF *p49* ont été également séquencés afin de s'assurer de l'intégrité et du cadre de lecture de l'insert. Le séquençage a été effectué à partir des amorces universelles T7 et Sp6 qui sont respectivement complémentaires aux séquences situées en amont et en aval du site de clonage multiple du vecteur pcDNA3. Le chromatogramme généré suite au séquençage a été visualisé grâce au logiciel Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd., Australie) et les séquences résultantes ont été analysées en utilisant le logiciel GeneWorks 2.5 (Intelligenetics Inc., USA).

#### **4.2 Production des vecteurs recombinants nécessaires à l'immunisation génétique**

Lors des expériences d'immunisation génétique (sections 5), les souris Balb/c ont été injectées avec le vecteur recombinant pcDNA3/*p49* permettant l'expression *in vivo* de la protéine P49. Cette injection a été effectuée en présence du vecteur pcDNA/IL-2 permettant l'expression de l'interleukine-2 murin utilisé comme adjuvant biologique afin de stimuler la réponse immunitaire contre la protéine recombinante P49. Parallèlement, d'autres souris ont été injectées avec le plasmide pcDNA3 seul, servant de témoins négatifs. Ces expériences ont nécessité ainsi la production à grande échelle des vecteurs pcDNA3/*p49*, pcDNA3/IL-2 et pcDNA3.

#### **4.2.1 Transformation des bactéries XL-1 Blue par le plasmide contrôle pcDNA3 et par le vecteur pcDNA3/IL2**

Le vecteur recombinant pcDNA3/IL-2, fourni par le laboratoire du Dr H.Ertl de l'institut Wistar de Philadelphie, ainsi que le plasmide pcDNA3 (Invitrogen) ont été initialement propagés dans les cellules bactériennes compétentes *E. coli* XL-1Blue, avant de procéder à une production à grande échelle. La réaction de transformation bactérienne a été effectuée telle que décrit dans la section 3.1.3.3 de ce chapitre. Les cellules bactériennes transformées ont étéensemencées sur les géloses 2x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline puis incubées en position inversée pendant 18 heures à 37°C. Quelques colonies bactériennes recombinantes ont été prélevées à partir des géloses puis inoculées séparément dans 3 ml de milieu liquide 2x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline pour une croissance de 16 heures à 37°C.

#### **4.2.2 Maxipréparation des vecteurs recombinants pcDNA3/p49, pcDNA/IL-2 et du plasmide pcDNA3**

Pour des fins d'immunisation génétique, les vecteurs recombinants pcDNA3/p49 et pcDNA3/IL-2 ainsi que le contrôle plasmidique pcDNA3 ont été produits à grande échelle à l'aide de la trousse « QIAGEN® Plasmid Purification » de Qiagen. À partir de chaque culture de bactéries *E. coli* XL1-Blue recombinantes, un volume de 1.2 ml a été prélevé puisensemencé dans 600 ml de milieu liquide 2x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Suite à une incubation de 16 heures à 37°C sous agitation, les cultures bactériennes ont été divisées en 6 fractions de 100 ml puis centrifugées à 6 000 ×g durant 15 minutes à 4°C. Chaque culot bactérien a été resuspendu dans 10 ml de tampon de suspension (Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O 10 mM, RNase A 100 µg/ml). Les parois bactériennes ont été digérées suite à une incubation en présence de 10 ml de tampon de lyse (NaOH 200 mM, SDS 1 % (p/v)) pendant 5 minutes à température ambiante. Les lysats bactériens ont été ensuite neutralisés par une incubation de 20 minutes sur glace avec 10 ml de tampon neutralisant (pH 5.5) contenant 3 M d'acétate de potassium. Une centrifugation à 20 000 ×g a été effectuée pendant 30 minutes à 4°C, permettant de précipiter les débris cellulaires, l'ADN génomique, les protéines ainsi que le SDS. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique a été centrifugé une seconde fois (20 000 ×g, 15 minutes à 4°C) puis appliqué sur une colonne de résine « QIAGEN-tip 500 » (Qiagen) préalablement équilibrée avec une

solution à pH neutre (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM (pH 7.0), isopropanol 15 % (v/v)). Par la suite, la colonne a été lavée à deux reprises avec 30 ml de tampon de lavage (NaCl 1 M, MOPS 50 mM (pH 7,0), isopropanol 15 % (v/v)). L'élution de l'ADN plasmidique a été effectuée en appliquant sur la colonne un volume de 15 ml de tampon d'élution (NaCl 1.4 M, MOPS 50 mM (pH 7.0), isopropanol 15 % (v/v)). Suite à l'ajout d'un volume de 10,5 ml d'isopropanol, l'ADN plasmidique a été précipité en centrifugeant à 20 000 ×g pendant 30 minutes à 4°C. Le précipité obtenu a été lavé avec 5 ml d'éthanol à 70 % puis centrifugé à 20 000 ×g pendant 10 minutes. L'ADN plasmidique a été resuspendu dans un volume de 300 µl de tampon PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 6.5 mM, pH 7.4).

#### **4.2.3 Digestion et dosage des plasmides pcDNA3/p49, pcDNA3, et pcDNA/IL-2**

La présence de l'ORF codant pour la protéine P49 dans le vecteur recombinant pcDNA3/p49 issu de la maxipréparation a été confirmée par une double digestion avec les endonucléases de restriction *HindIII* et *XbaI* (Amersham Pharmacia). Le vecteur recombinant pcDNA3/IL-2, a été digéré par l'endonucléase de restriction *BamHI* (Amersham Pharmacia) afin de confirmer la présence du gène codant pour la cytokine IL-2. Le plasmide pcDNA3 a également été digéré par l'endonucléase de restriction *BamHI* dans le but de s'assurer de l'absence d'insert. Tous les produits des digestions ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %.

Les ADN plasmidiques, produits en maxipréparation pour les expériences d'immunisation, ont été quantifiés et leur pureté a été évaluée par spectrophotométrie. La concentration finale des ADN plasmidiques a été par la suite ajustée à 3 mg/ml avec du tampon PBS 1X.

## **5 Immunisation classique et génétique des souris Balb/c**

Le dernier objectif de ce projet a consisté en la production d'anticorps dirigés contre la protéine P49 en utilisant les souris Balb/c comme modèle animal. Les anticorps anti-P49 ont été ainsi produits par deux méthodes d'immunisation, soit la méthode classique impliquant l'injection aux souris de la protéine recombinante P49 et, la méthode génétique impliquant l'injection d'ADN

plasmidique codant pour la protéine P49.

## **5.1 Protocole des immunisations**

### **5.1.1 Groupes de souris et produits injectés**

Les expériences d'immunisation ont été réalisées sur 5 groupes de 3 souris femelles Balb/c, âgées de 4 à 6 semaines (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, Canada). L'immunisation classique a été expérimentée sur deux groupes de souris et l'immunisation génétique a été effectuée sur les groupes restants.

Le protocole d'immunisation des souris Balb/c est résumé dans le tableau 1. Brièvement, les souris du premier et du deuxième groupe ont été respectivement injectées avec la solution saline PBS 1X (pH 7.4) et 10 µg de la protéine recombinante P49. Lors de la première immunisation, ces deux groupes ont été injectés en présence de l'adjuvant complet de Freund et, lors de l'injection des doses de rappel, en présence de l'adjuvant incomplet de Freund. Les souris du troisième groupe ont été injectées avec 50 µg du vecteur plasmidique pcDNA3 et 50 µg du vecteur recombinant pcDNA3/IL-2. Quant au quatrième groupe, les souris ont été injectées avec 50 µg de chacun des vecteurs pcDNA3 et pcDNA3/p49. Enfin, les souris du cinquième groupe ont été injectées avec 50 µg de chacun des vecteurs recombinants pcDNA3/p49 et pcDNA3/IL-2. Le premier et le troisième groupe de souris servent de témoins négatifs pour les tests d'immunisation classique et génétique, respectivement.

Pour les expériences d'immunisation classique, chaque injection de souris a été effectuée dans un volume final de 100 µl, à l'exception de l'injection intraveineuse qui a impliqué 200 µl de produits. Tous les autres groupes de souris (groupe 3, 4 et 5) ont reçu 50 µl de vecteurs plasmidiques par injection.

**Tableau 1 : Immunisation classique et génétique des souris Balb/c.**

	Groupe d'animaux	Produit injecté	Adjuvant	Quantité et voie d'injection
Immunisation classique	Groupe 1	PBS	AFC	sc
			AFI	sc
			-	iv
	Groupe 2	P49 recomblante	AFC	10 µg, sc
			AFI	10 µg, sc
			-	10 µg, iv
Immunisation génétique	Groupe 3	plasmide pcDNA3	vecteur pcDNA3 / IL-2	50 µg, im
	Groupe 4	vecteur pcDNA3 / p49 + pcDNA3	-	100 µg, im
	Groupe 5	vecteur pcDNA3 / p49	vecteur pcDNA3 / IL-2	100 µg, im

AFC : Adjuvant de Freund Complet  
 AFI : Adjuvant de Freund Incomplet

Voie d'injection:  
 sc: sous-cutanée; iv : intraveineux; im: intramusculaire



### **5.1.2 Calendrier et voie d'immunisation : injections et prélèvements**

Les souris immunisées par la méthode classique ont reçu trois injections sous-cutanées au niveau du cou, à l'aide d'une seringue hypodermique équipée d'une aiguille 25G. Une dernière injection intraveineuse a été administrée à ces souris, au niveau de la veine latérale de la queue, à l'aide d'une aiguille 26G. Ces injections ont été effectuées aux jours 0, 14, 28 et 42. Dans la méthode d'immunisation génétique, six injections intramusculaires ont été administrées au niveau du quadriceps caudal des pattes postérieures des souris à l'aide d'une aiguille 26G et à un intervalle de deux semaines (aux jours 0, 14, 28, 42, 56 et 70). Les souris ont été anesthésiées par inhalation du méthoxyflurane avant les prélèvements sanguins. Ces prélèvements ont été effectués à partir de la veine rétro-orbitale de l'œil aux jours 0 et 41, chez les souris immunisées par la méthode classique et, aux jours 0 et 55, chez les souris immunisées via la méthode génétique. Les saignées finales des souris ont été réalisées par une ponction cardiaque aux jours 55 et 81, respectivement pour les groupes immunisés selon la méthode classique et génétique. Les sérums ont été récupérés des prélèvements sanguins, suite à une centrifugation à 2000 ×g pendant 10 min, puis conservés à – 70 °C jusqu'à analyse ultérieure.

## **5.2 Évaluation de la réponse immunitaire humorale**

Suite aux immunisations classique et génétique, les réponses en anticorps murins anti-P49 ont été caractérisées qualitativement et quantitativement par un test "ELISA" (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) et par immunobuvardage de type "Western".

### **5.2.1 Caractérisation des anticorps anti-p49 par le test ELISA indirect**

Un test ELISA indirect a été mis au point dans le but d'évaluer la spécificité, le niveau de production ainsi que le titre des anticorps anti-P49 présents dans les sérums murins. Dans des plateaux à 96 puits (MaxiSorp™, NUNC International, Danemark), une quantité de 20 ng de protéine recombinante P49 a été transférée dans chaque puits et incubée durant 4 heures à température ambiante. Les plateaux ont été ensuite lavés en ajoutant 300 µl/puits de tampon de

lavage (tampon PBS 1X contenant 0.05 % (v/v) de Tween 20, pH 7.4), afin d'éliminer l'excédant de protéines non adsorbées au fond des puits. Les sites libres présents dans les puits ont été saturés suite à une incubation de 16 heures à 4°C en présence de 300 µl/puits d'une solution de blocage (BSA 2 % (p/v), sucrose 5 % (p/v), lait écrémé en poudre 10 % (p/v), Tween-20 0.2 % (v/v), PBS 1X, pH 7.4) contenant 0.5 % de sérum de chèvre (Calbiochem, EMD Biosciences Inc., USA). Toutes les étapes subséquentes ont été réalisées à température ambiante. Les plateaux ont été lavés et 100 µl de sérums de souris Balb/c dilués (dilutions : 1/1 000 à 1/128 000 de sérums issus de l'immunisation classique et 1/25 à 1/3 200 de sérums issus de l'immunisation génétique) ont été transférés dans chaque puits avant une incubation d'une heure. La solution utilisée pour la dilution des sérums correspond à la solution de blocage diluée 1 : 2 et tous les sérums ont été testés en duplicata. Chaque puits a été par la suite lavé 5 fois avec 300 µl de tampon de lavage, puis incubé pendant une heure en présence de 100 µl d'anticorps anti-IgG de souris (dilués 1/8 000) produits chez la chèvre et couplés à la peroxydase « Horse Radish Peroxidase » (Calbiochem). Suite à 5 lavages consécutifs, 100 µl / puits de la solution de développement (OPD 0.4 % (p/v), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.012 % (v/v), acide citrique 0.05 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, pH 5.0) ont été ajoutés et les plateaux ont été incubés durant 20 minutes à l'abri de la lumière. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 50 µl/puits de HCl 2 N. La densité optique (D.O) dans chacun des puits a été subséquentement mesurée à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre « Digiscan microplate » et du logiciel Digiwin Software 3.1 (ASYS Hitech GnbH, Phonenix Biotech Corp., Canada).

### **5.2.2 Évaluation de la spécificité des anticorps anti-P49 par Immunobuvardage de type Western**

Les expériences d'immunobuvardage de type Western ont été effectuées dans le but de comparer qualitativement la spécificité des anticorps anti-P49 générés à la suite des différentes immunisations. L'échantillon contenant la protéine recombinante P49 purifiée et dialysée a été initialement séparé par électrophorèse (SDS-PAGE) sur gel de polyacrylamide 10 % puis transféré sur une membrane de PVDF. La membrane de PVDF a été ensuite bloquée à l'aide d'une solution contenant du BSA 1 % (v/v), du Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), 0.05 % (v/v) de Tween-20 et 0.5 % de sérum de chèvre (Calbiochem), pendant 16 heures à température

ambiante. Toutes les étapes subséquentes de la technique d'immunodétection ont été aussi effectuées à température ambiante. La membrane a été ensuite incubée durant une heure en présence des sérums de souris immunisées selon la méthode classique (dilution 1/4 000) et génétique (dilution 1/10). Une série de trois lavages de 20 minutes a été effectuée sur la membrane en utilisant un tampon contenant 0,05 % (v/v) de Tween-20 et 50 mM de Tris-HCl, (pH7.5). La membrane a été ensuite incubée pendant 1 heure en présence d'une dilution de 1/8 000 des anticorps de chèvre, conjugués à la peroxydase « Horse Radish Peroxidase », dirigés contre les IgG de souris (Calbiochem). Après trois lavages consécutifs, la membrane a été incubée durant 15 minutes dans une solution de développement contenant le substrat 3,3'-diaminobenzidine dilué 1/50 (DAB, Calbiochem).

# Résultats

## 1 Caractérisation moléculaire du gène codant pour la protéine P49 du ChfuGV

### 1.1 Localisation et identification du gène *p49* dans le génome de ChfuGV

Le gène codant pour la protéine P49 a été localisé dans la banque génomique de ChfuGV qui a été construite en utilisant la méthode de clonage et de séquençage aléatoire « *Shotgun* ». La localisation du gène *p49* a été établie à partir des homologues obtenues par l'alignement des séquences de contiguës constitués avec celles des gènes *p49* d'autres baculovirus, présents dans la banque de données GenBank. Dans le génome de ChfuGV, l'ORF codant pour la protéine P49 est situé entre 8 632 pb et 9 999 pb, en position inverse par rapport au gène de référence codant pour la granuline. De plus, cet ORF a été localisé en aval du gène codant pour la protéine structurale ODVe-18 et dans la même orientation. Afin de s'assurer de l'identité et de l'intégrité du gène *p49*, celui-ci a été amplifié par PCR, cloné dans le vecteur de clonage pCR<sup>®</sup>2.1 puis séquencé. L'amplification par PCR du gène *p49* a été effectuée à partir du génome viral en utilisant des amorces, sens et anti-sens, spécifiques (figure 5 A, puits 2). La présence de l'amplicon de 1 450 pb du gène *p49* dans le vecteur de clonage pCR<sup>®</sup>2.1 a été confirmée par une digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* (figure 5 B, puits 2). La séquence nucléotidique du gène *p49* de ChfuGV comprend un ORF de 1 368 pb codant pour un polypeptide de 455 acides aminés (figure 6). Cet ORF est précédé d'une région promotrice comprenant plusieurs éléments pouvant être impliqués dans la régulation de l'expression du gène *p49*. Ainsi, cette région comprend une boîte TATA, située à 55 nucléotides (nt) en amont du codon d'initiation, trois motifs TAAG, situés à -16 nt, -30 nt et -190 nt, ainsi que quatre motifs TCATT, situés à -71 nt, -130 nt, -227 nt et -351 nt. L'élément GATA a été également observé au niveau du promoteur du gène *p49* à la position -377 nt, en amont du codon d'initiation. Le gène *p49* possède aussi un site de polyadénylation AATAAA, caractéristique des gènes des baculovirus, situé à 278 nt en aval du codon de terminaison.

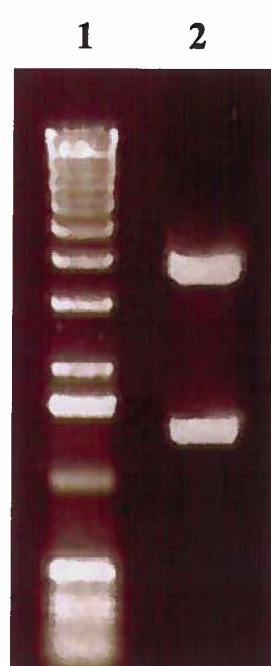
**Figure 5 : Profils électrophorétiques du gène *p49* de ChfuGV amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique (A) et des plasmides recombinants pCR<sup>®</sup>2.1/*p49* digérés par l'endonucléase *EcoRI* (B).**

L'électrophorèse a été effectuée sur gel d'agarose 0.8 % et les bandes d'ADN ont été visualisées sous UV suite à une coloration au bromure d'éthidium. A) L'amplicon du gène codant pour la protéine P49 correspond à un fragment de 1 436 pb (puits 2). B) Les produits de la digestion incluent le fragment cloné de même taille que l'amplicon du gène *p49* (puits 2). Le marqueur de masse moléculaire est représenté en pb dans les puits 1.

A)



B)



**Figure 6 : Séquence nucléotidique du gène *p49* de ChfuGV et sa séquence déduite en acides aminés.**

Les codons d'initiation (ATG) et de terminaison (TAA) sont indiqués en caractère gras rouge. Les régions 5' et 3' non codantes sont présentées en italique. Les zones en caractère gras noir représentent les motifs du promoteur du gène codant pour la protéine P49. Les motifs colorés et soulignés constituent des éléments potentiels de régulation de la transcription du gène *p49*. Le site de polyadénylation est indiqué en rouge souligné.



AAGTGTATCGGACAATTTTTGACCATAATATTAGTGATAGGGGGGAATTTAGTTTTGCT  
 TTTTCATTGGATTTATAATCTACAAAGTAACTATAACGAAAAGAAGTATATGAACACGAGT  
 TAATAATGAGCGTGAGTTAAAATTAAAAATTTAATTTTAAAAATATTTGCTATTTTATG  
 TCGCGCTCATTATTTGCTAAAAATACACAAATTTGTATATCGATTAAGCGCGAGTTAAAAC  
 AGCAAAAATTTTTAAATTTTTAATTTGCTGTTTTAACTCGCGCTCATTTCTAGAAACAAA  
 CAAGCGAAGAGCGAGCGGTGTAACCCAAATTGAGATTAAAGCTCATTTGTAATAATGTGTA  
TAATCAATAATATAGTAACATATTAAGTGATGTAAAATAAGTATTTTAGCGAG

**ATG**GATTTTAATAGTAGTGATGAAAATCTTCCGCTGGCGTTTATGCATTTG 51  
 M D F N S S D E N L P L A F M H L 17

TATTTGAGTTAGACAAAAGACATACAGAAATTGACAATTATATTAGTGAC 102  
 Y F E L D K R H T E I D N Y I S D 34

AGCAAAAATTATGCAAGAATATTAGATTATTTGAACGAAATAAATCTAAAA 153  
 S K N Y A R I L D Y L N E I N L K 51

TTTATAATTGGCGACGCTAGTGTCGACACCTTTATTTACATCATGCCACAA 204  
 F I I G D A S V D T F I Y I M P Q 68

TTCAAATTTGTTTTCGATAAAGATTATCAGTTGGAAATTGTAAAGTTTAGT 255  
 F K F V C D K D Y Q L E I V K F S 85

TTTGGAAATGCGTATTTAAGAAAAGGTGCATTGGTGTGCTACAAATTTT 306  
 F G N A Y L R K G A L V F A T N F 102

TTTGTAACAAATCCGTCTGATGCTTTTGATTTTATTATACCAAAAATACCT 357  
 F V T N P S D A F D F I I P K I P 119

CTTTTACGAGAACTTTTCGAAACACAACTAGAATTGGAACCAAATTTTAT 408  
 L L R E T F E T Q T R I G T K F Y 136

ATATGGAATGGCACAGACGGCATAATTTTTTCTCGTACATACCTCGATTGG 459  
 I W N G T D G I I F S R T Y L D W 153

ATGGGTATGAAAGTTTGCAACGGTAAACCTTACTATACAAATAACTATTAT 510  
 M G M K V C N G K P Y Y T N N Y Y 170

AGAATGTATGTTGTTCGGAGAACGACTTGCTAAACAAATTATAGAAGAAAAG 561  
 R M Y V V G E R L A K Q I I E E K 187

ATTTCTATAGAAAACACACCCTTCGATGCTGTTCTGAAAATTATTATAAA 612  
 I S I E N T P F D A V L K N Y Y K 204

GGCACATTTTTAAGGTTACCCGATAATGAAAATATGTATTAGCGGATAAA 663  
 G T F L R F T D N E K Y V L A D K 221

AAGATTAACACCAACAATTATGATGTGGTGTGTTGACATGTTTGAAGAAGAA 714  
 K I N T N N Y D V V F D M F E E E 238

TTCAAATCCAACGTCGCGCAAATACATTTTCATACAGCGCGATTATATATTT	765
F K S N V A Q I H F I Q R D Y I F	255
GATGGAAAGTTTCCTTTAGATCTGTAAATGAATTACAAAGTTATTGGACT	816
D G K F P L D L L N E L Q S Y W T	272
TCCGACACTTCAGTATACAAAGTGATTAACAAATTTGGGCCAAAAACCAA	867
S D T S V Y K V I N K F G P K N Q	289
ATACAAGATTTAATCAAAACCATTGTAATCGATAGATATTCTGTAAACGGA	918
I Q D L I K T I V I D R Y S V N G	306
TACAGAAAAATGATAGTTGACAATATACATTTTGTTTTGCCAGCAAACAGA	969
Y R K M I V D N I H F V L P A N R	323
TCCTCTGATGTAGAACATGTGTTTATTCCTAGAAATGTCATTCAAATTAGG	1020
S S D V E H V F I P R N V I Q I R	340
CACACTTTGAACGCAGCGTTTGTACCCAACCTGGGTTTAGTAATAATGGCC	1071
H T L N A A F V P N L G L V I M A	357
TCAAATGTTTTTTTCGGCGCTCGAATTGTGCTTAACTTTGAGCCTCACGTA	1122
S N V F F G A R I V L N F E P H V	374
GATTTAAATTATTTTGTAAAACTAAAATTAATGTAAAAGACACTGACATT	1173
D L N Y F V K T K I N V K D T D I	391
TTTTATCATGTGGGCGGATCTTACTTTTTAGAAAGAACATTTTTTAACACT	1224
F Y H V G G S Y F L E E T F F N T	408
AACAATGTGCAGATATATATTTTTGGTAAGAATAGATGAAGATTTAATAGTA	1275
N N V Q I Y I L V R I D E D L I V	425
AGACATAATTTAATAAGAACTTCTCATAAATTGACAGACCTAAAATACTAT	1326
R H N L I R T S H K L T D L K Y Y	442
TGGGTGTTGAATACTATTTTGAGTTTATTTGTAAGAAAGTAA	1368
W V L N T I L S L F V R K *	455

*TATTAATGGACACATTTAGAGGAACCGCTGATACTGGCGTTAATCGACGTATAGCTGGTCTTGAGCCAA  
 ACTTATTAATGACCATACTGGTCGTGTTGGTAATAGTCATTTATTAGTATTATTGTTTAATATGAGTAG  
 TGGCAGTGACAGTTCTGGTTCGGGCGCAAATCCAAATGCAGGGTTTTCAATCCACTAAACACAGCTTAT  
 GAGAAACAACACAGTTAGAAACACACCCGTGGTAACCACAGCAACCACCACTCGTGCTGTTAAAAATAA  
AATAAAATATTTTTAAAAAATAGTTTTATTTAATATACAGATCGGGAACAATTACATTATCATAGATAGC  
 CATGCCATAATTGTACGTATTGTTATCATTTTGTTCCTCCATCAAAATGATACCATCGCAACTTTCCTTA  
 TTTCCATATGTGTTTATACCCGATTTCGT*

## 1.2 Analyses comparatives de la séquence déduite en acides aminés de la protéine P49 de ChfuGV

La structure primaire de la protéine P49 de ChfuGV, déduite à partir de la séquence nucléotidique du gène *p49*, a été initialement étudiée en déterminant ses propriétés physico-chimiques. La séquence déduite de la protéine P49 présente une masse moléculaire d'environ 53 kDa et un point isoélectrique de 6.87. De façon générale, les protéines P49 des baculovirus montrent des différences en terme de taille, de masse moléculaire et de point isoélectrique (tableau 2). Le nombre d'acides aminés des protéines P49 varie de 426 chez PhopGV à 468 chez HaSNPV et HzSNPV. Dans le même sens, on observe une variation de la masse moléculaire estimée des protéines P49 des baculovirus, allant de 49 kDa chez SINPV à 55 kDa chez HaSNPV et HzSNPV. Une plus grande variabilité a été obtenue au niveau des valeurs des points isoélectriques (entre 6 et 9) des protéines P49 étudiées.

La comparaison des séquences en acides aminés des protéines P49 des baculovirus révèle que la protéine P49 de ChfuGV partage de faibles homologies avec les protéines P49 des NPV comparativement à celles des GV (tableau 3). Les séquences des protéines P49 de CrleGV et de CpGV présentent la plus importante homologie en acides aminés (55 %) avec la séquence de la protéine P49 de ChfuGV. Les homologies de séquences des protéines P49 sont plus conservées à l'intérieur des GV que des NPV. Les homologies entre les protéines P49 des NPV peuvent en effet varier entre 17 % et 99 %. La figure 7, présentant l'alignement de la séquence en acides aminés de la protéine P49 de ChfuGV avec celles des GV, illustre toutes les régions qui sont à 100 % conservées dans toutes les protéines P49 des GV étudiés.

Les profils d'hydrophobicité des protéines P49 des baculovirus ont été générés en utilisant la méthode générale de Kyte et Doolittle (1982) selon les paramètres par défaut (Figure 8). Les valeurs positives caractérisent les segments hydrophobes des protéines. Le profil d'hydrophobicité de la protéine P49 de ChfuGV ressemble à ceux prédits pour les protéines P49 des GV, à l'exception de la région située entre les résidus 110 et 150 de la P49 de PhopGV.

**Tableau 2 : Comparaison de quelques caractéristiques physico-chimiques de la protéine P49 des baculovirus.**

<b>Protéines P49</b>			
<b>Baculovirus</b>	<b>Tailles (a.a)</b>	<b>Masses moléculaires (kDa)</b>	<b>Points isoélectriques</b>
<b>ChfuGV</b>	455	53.34	6.87
<b>CrleGV</b>	451	52.96	6.66
<b>CpGV</b>	457	53.12	7.44
<b>PhopGV</b>	426	49.57	6.33
<b>HaSNPV</b>	468	55.22	9.59
<b>HzSNPV</b>	468	55.30	9.34
<b>SpltNPV</b>	439	51.10	6.51
<b>SINPV</b>	446	49.00	6.57

N.B. Les séquences des protéines P49 des baculovirus proviennent de la banque de données GenBank sous les numéros d'accès suivants : CrleGV (AAQ21611), CpGV (AAK70682), PhopGV (AAM70211), HaSNPV (AAG53752), HzSNPV (AAL56154), SINPV (CAA07223), SpltNPV (AAL01739).

**Tableau 3 : Homologies relatives entre les séquences déduites en acides aminés des protéines P49 des baculovirus.**

	<b>ChfuGV</b>	<b>CrleGV</b>	<b>CpGV</b>	<b>PhopGV</b>	<b>HaSNPV</b>	<b>HzSNPV</b>	<b>SpltNPV</b>	<b>SINPV</b>
<b>ChfuGV</b>	100							
<b>CrleGV</b>	55	100						
<b>CpGV</b>	55	72	100					
<b>PhopGV</b>	40	38	38	100				
<b>HaSNPV</b>	34	32	33	29	100			
<b>HzSNPV</b>	33	32	32	28	99	100		
<b>SpltNPV</b>	10	13	11	14	17	16	100	
<b>SINPV</b>	11	14	12	14	18	17	79	100

N.B. Les valeurs présentées correspondent aux pourcentages d'homologie des séquences.

Les séquences des protéines P49 des baculovirus proviennent de la banque de données GenBank sous les numéros d'accès suivants : CrleGV (AAQ21611), CpGV (AAK70682), PhopGV (AAM70211), HaSNPV (AAG53752), HzSNPV (AAL56154), SpltNPV (AAL01739), SINPV (CAA07223).

**Figure 7 : Alignement multiple des séquences déduites en acides aminés des protéines P49 des granulovirus.**

Les régions ombrées correspondent aux séquences conservées à travers tous les granulovirus étudiés. Les tirets indiquent l'insertion d'un espace pour optimiser l'alignement.

**ChfugV** ---MDFNSSDENLPLAFMHLTEELDKRHEIDNYISDSKNYARILDELNEINLKFIIEDA 57  
**CpGV** MGDNSATVDDTMDLPRAFIHMTEFVDTVDVDVDFNRNEQNYESI LNLGSIQLKYMVEDA 60  
**PhopGV** ---MATIEENILLAKAFAYTEELTDESDILDYIK--QNSNKLMDTISQMRDLHNMIGES 55  
**CrlegV** -----MADERLLQLSFIHMTEFVDTIDTEVENFINDENNYEQIINLIASVQLKKNMVEEA 54

**ChfugV** SVDTFFIYIMPEQTKFVCDKDTQLEIVKFSFGNAVLRGALVVFATNFEVTNPSDAFDFFIIPK 117  
**CpGV** TADTFKYVMPQFRYVCDRDTLQLIVKFDAGKVTLKRESVVYATNLEFVNPSAAMDYLL-R 119  
**PhopGV** --FDFNRVLEQTRFVCDERTKLEIVRHNETGAYLRREVPVYATNLES LNEGTLTDYMMNT 113  
**CrlegV** TSDTLNylimPEQTKFVCDRDTLQLIVKFDAGDVTLKREAVVYATNLEFVKTPSSFWQYIIT-G 113

**ChfugV** IPLLRETFETQTR---IGTKFVIWNTEGIIIFSRTELDMMGMKRVONCKPYYTNNYYRMTV 174  
**CpGV** VPAVGEYFLNRTEAAVGGKFTMWNTEEGVVVARPTLDMMGMKRIKNCAPHTENKWRVVEL 179  
**PhopGV** IMKNND--WKNDNCVITATMFLCDERFIVGSPFIDMKKMKLCAE--TSQNNYTRLEL 169  
**CrlegV** VKTISTYLVNKNHTISIGNKFTMWNTEGIIIVIARPTLDMMGMKRIKNCSPHTEDNYYRIIL 173

**ChfugV** VGERLAFQIIEKISIENTPFDAVLKNTYRGT-FLRFTDNEKYVLADKKINTNNYDVVFD 233  
**CpGV** LBETVARLFIEGKFDGTQIP-DAVLKNTYHRGTPLVRAVNNERHVISEKVFTTNNYDVVFD 238  
**PhopGV** VGERMTRIFVEKP---HDVPMDCIENNYRGT---RLTKRKK-PADGKNFVGM--DKVFD 220  
**CrlegV** LBETIARLFIESKLEVTEIT-DGILKNTYHRGTPLKEVLLNNEsnVVNDRTFTTNNYDAVFD 232

**ChfugV** MFEFEFHSNVAQIHFIRDIYFDGK-FEELDLNEIQSYWTSDTSVYRVINKFGPKNQIQD 292  
**CpGV** AFDQEFHTKIRNIHTVORDIYDQAT-FEEDLAEILQKQYISPTSIYRKVNRFFVNN-LYD 296  
**PhopGV** MIENNLHS---NVVEVORDIYFDAMRFEDSLNLIIMDEYECSSVIRRVHKY---DKCEM 274  
**CrlegV** AFEFEFHTKIRYIDEVORDIYDQAV-FEEDLAVLLQKNYMSPTSVYRKINRFVSND-VYD 290

**ChfugV** LIKTIVIDRESVNGYRKMIVDNIHFVLEANRSSDVEHVFIER-NVICIRHTLNAAFVPNL 351  
**CpGV** LTNKLVIDRETVMKFRKMLVN-DNYALETQALEN--YIEAFN-HIFVIRHTLNAAFVPKL 352  
**PhopGV** ETDSVTIERIGINKYR--VFESINLIEPIIECY----FVPEKMLVIRHTLNAAAYLIGT 328  
**CrlegV** LNMKLVIDRESINKFRKMLVN-DNYILEDNLTQN--YIEVEN-QIFVIRHTLNAAFVPNL 346

**ChfugV** ELVIMASNVFEGARIVLNTEEHVDLNYFVRTKINVKDTDIFVYHVGGSEFLEETFFNTQNV 411  
**CpGV** ELVILAQHMFEGARRVLNTEENEDLATFIRTKVEVHDDDFVYHVGGSEFLEETSFVSMGA 412  
**PhopGV** GIVIFADYSLGARCVLDFEESQDLEYYVVDLRHHNPSBLIYHLGENYLLQQTQLGSMGA 388  
**CrlegV** ELVILAKHIFEGARQVLNTEEKQDLHTFVFSKVEIHDRDFVYHVGGSEFLEETNFVSMGA 406

**ChfugV** QIYILVRIDEDLIVRHMLIRTSRRLTDLKYVWVLTILSLFVRR- 455  
**CpGV** PIYIVRVDDNLIVRHMLIRSRRLRDLKNNWVYNTILSLFVRRY 457  
**PhopGV** NAFVIVRS-----LVLISGRRLSELNLCNWLNTVLSLFVRRY 426  
**CrlegV** PIYIVRHIDEDLIVRHMLIRTSRRLRDLKNNWVYNTILNLFVRRY 451

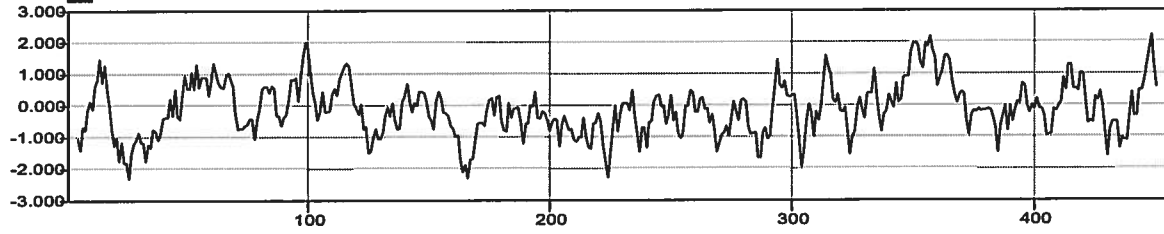
**Figure 8 : Comparaison des profils d'hydrophobicité de la protéine P49 des baculovirus établis à partir des valeurs de Kyte et Doolittle.**

Les profils d'hydrophobicité ont été générés à partir des séquences déduites en acides aminés des protéines P49 des baculovirus. La valeur de la fenêtre utilisée est de 10 résidus. Les valeurs d'hydrophobie de Kyte et Doolittle sont représentées sur l'axe des ordonnées. Les positions des acides aminés dans la séquence sont indiquées sur l'axe des abscisses.



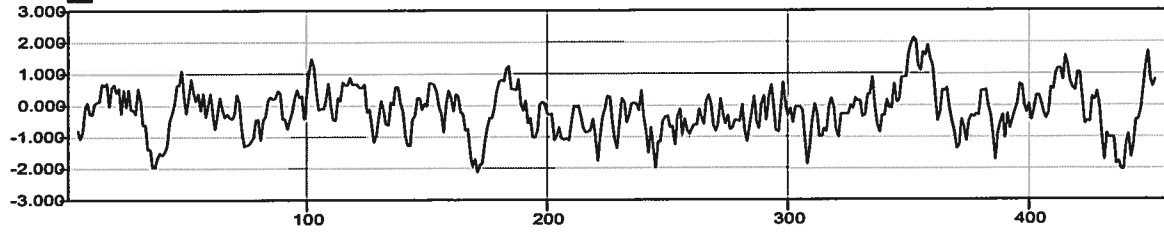
### ChfuGV :

Kyte/Doolittle hydrophobicity/Window size = 10  
Score



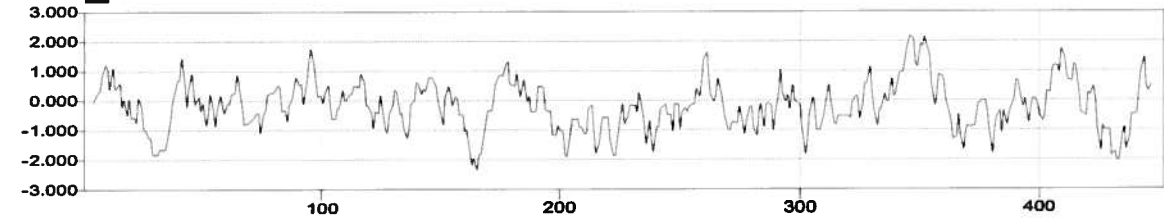
### CpGV :

Kyte/Doolittle hydrophobicity/Window size = 10  
Score



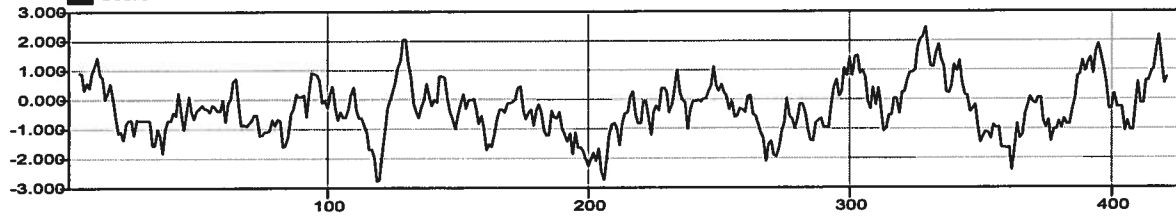
### CrleGV :

Kyte/Doolittle hydrophobicity/Window size = 10  
Score



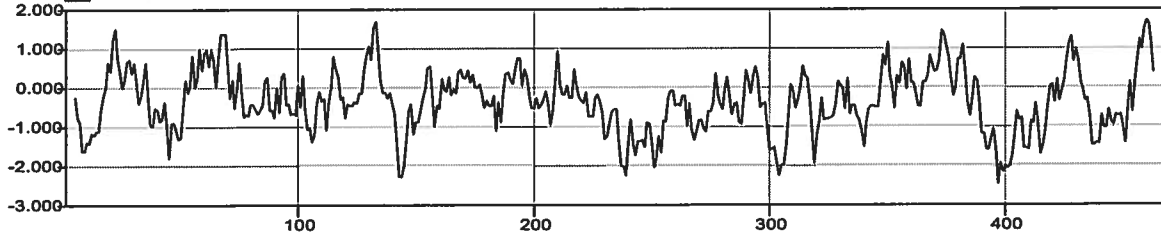
### PhopGV :

Kyte/Doolittle hydrophobicity/Window size = 10  
Score



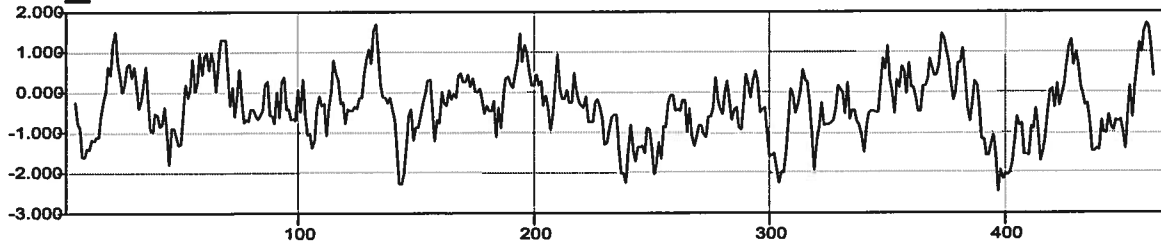
### HaSNPV :

Kyte/Doolittle hydrophobicity/Window size = 10  
Score



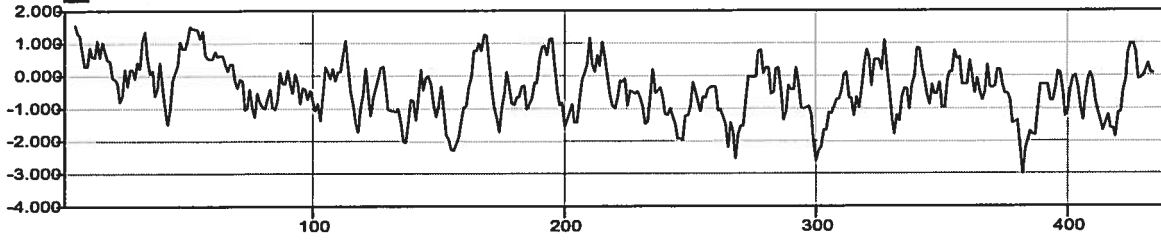
### HzSNPV :

Kyte/Doolittle hydrophobicity/Window size = 10  
Score



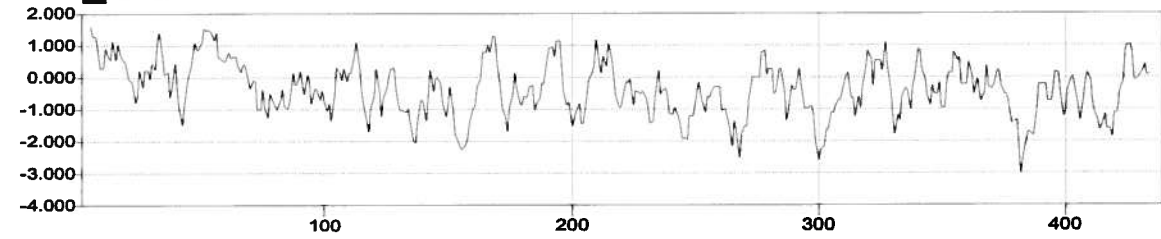
### SINPV :

Kyte/Doolittle hydrophobicity/Window size = 10  
Score



### SpltNPV :

Kyte/Doolittle hydrophobicity/Window size = 10  
Score



De plus, le profil d'hydrophobicité généré pour la protéine P49 de ChfuGV diffère de ceux des NPV, en particulier des profils de la protéine P49 de SINPV et SpltNPV. Une comparaison globale entre tous les profils d'hydrophobicité générés suggère une conservation structurale de la protéine P49 à travers les GV que les NPV (Figure 8).

## **2 Expression de la protéine P49 de ChfuGV dans un système procaryote**

La production de la protéine P49 de ChfuGV à partir d'un système d'expression procaryote a impliqué le clonage du gène *p49* dans le vecteur d'expression pQE32, l'expression de la protéine recombinante P49 dans les cellules bactériennes *E. coli* M15 [pREP4] et la purification de cette protéine par un système de chromatographie d'affinité.

### **2.1 Clonage du gène codant pour la protéine P49 dans le vecteur d'expression pQE32**

L'ORF codant pour la protéine P49 a été cloné de façon directionnelle dans le vecteur d'expression procaryote pQE32. À cette fin, le gène *p49* a été initialement amplifié par PCR à partir du vecteur recombinant pCR<sup>®</sup>2.1/*p49* en utilisant des amorces sens et anti-sens présentant à leur extrémité 5' respective, les sites de restriction des endonucléases *Bam*HI et *Hind*III. L'amplicon de 1 395 pb contenant l'ORF codant pour la protéine P49 a été par la suite purifié puis cloné dans le vecteur de clonage pCR<sup>®</sup>2.1 afin de maintenir sa stabilité et son intégrité ainsi que de faciliter son sous clonage dans le vecteur d'expression pQE32. Le vecteur recombinant pCR<sup>®</sup>2.1 contenant l'ORF codant pour la protéine P49 a été digéré par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III. L'insert ainsi digéré a été purifié suite à son extraction à partir du gel d'agarose puis cloné dans le vecteur d'expression pQE32. Deux clones positifs, pQE32/*p49*-D et pQE32/*p49*-F, ont été sélectionnés puis digérés par les deux enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III. L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la digestion révèle la présence du fragment de 1 395 pb, correspondant à l'ORF codant pour la protéine P49, dans les deux vecteurs recombinants sélectionnés (Figure 9).

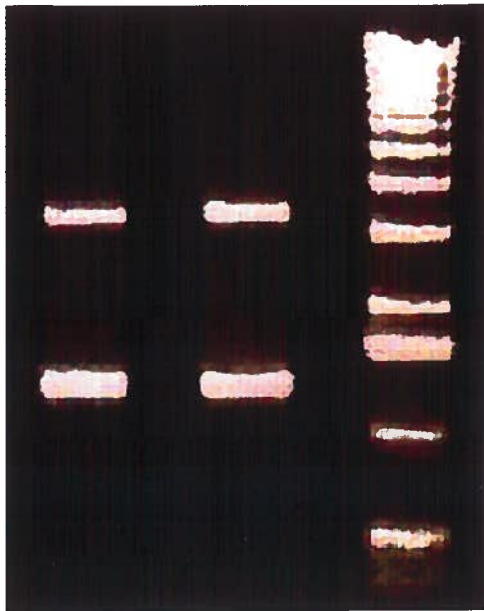
**Figure 9 : Profil électrophorétique des produits de la digestion des vecteurs recombinants pQE32 contenant l'ORF codant pour la protéine P49 par les endonucléases *Bam*HI et *Hind*III.**

L'électrophorèse a été effectuée sur gel d'agarose 0.8 %. Les produits de la digestion des vecteurs pQE32/p49-D (puits 1) et pQE32/p49-F (puits 2) par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III sont représentés. Un fragment de 1 395 pb correspondant au gène codant pour la protéine P49 est inséré dans les deux vecteurs analysés. Le marqueur de masse moléculaire est représenté en pb dans le puits M.

1

2

M



pb

— 5 090

— 4 072

— 3 054

— 2 036

— 1 636

— 1 018

— 506

Le séquençage du vecteur recombinant pQE32/p49-F a permis de s'assurer de l'intégrité de la séquence de l'ORF codant pour la protéine P49 de ChfuGV. La séquence nucléotidique ainsi obtenue a été comparée à la séquence du gène *p49* antérieurement caractérisée. Cette comparaison a en effet confirmé l'homologie absolue des deux séquences. L'analyse de la séquence générée a également indiqué que l'ORF codant pour la protéine P49 est inséré à l'intérieur du vecteur pQE32 selon un cadre de lecture permettant son expression. Le vecteur recombinant pQE32/p49-F a ainsi été sélectionné pour l'expression de la protéine recombinante P49 dans les souches M15 [pREP4] des bactéries *E. coli*.

## **2.2 Expression de la protéine recombinante P49 dans les bactéries *E. coli* M15 [pREP4]**

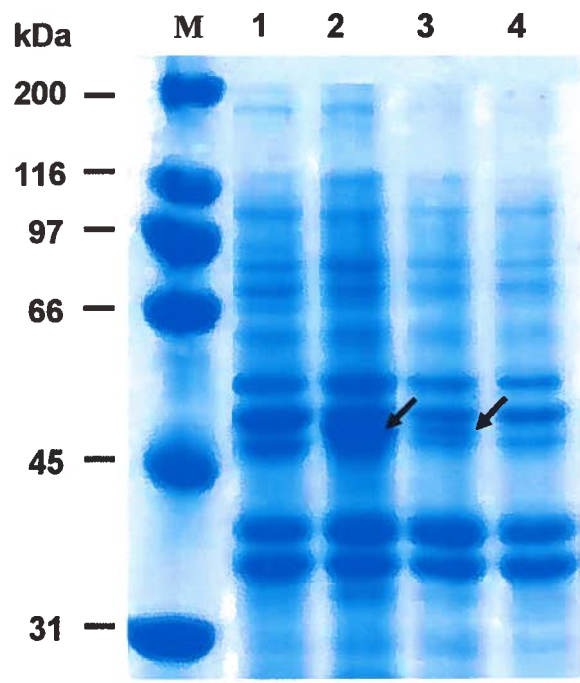
Dans un premier temps, les cellules bactériennes *E. coli* M15 [pREP4] ont été transformées par le vecteur pQE32/p49-F codant pour la protéine recombinante P49. Par la suite, différents temps d'induction par l'IPTG, à une concentration de 1 mM à 37°C, ont été testés afin de déterminer la condition optimale d'expression de la protéine recombinante P49. L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % (SDS-PAGE) des protéines produites par les bactéries recombinantes après 8 heures et 4 heures d'induction par l'IPTG 1mM montre la présence d'une protéine de 53 kDa (figure 10, puits 2 et 3) qui n'est pas exprimée par les bactéries contenant le plasmide seul (contrôle négatif; figure 10, puits 1 et 4). Ainsi, il a été conclu de cette analyse que la protéine de 53 kDa exprimée par *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p49-F)] correspond à la protéine recombinante P49. Ce résultat indique également l'expression optimale de la protéine recombinante P49 qui est obtenue après 8 heures d'induction par l'IPTG (figure 10, puits 2).

## **2.3 Purification de la protéine recombinante P49**

La purification de la protéine recombinante P49 a constitué une étape essentielle du projet puisqu'elle a permis de récolter la quantité de protéines requise aux expériences d'immunisation des souris Balb/c ainsi qu'aux tests de caractérisation des anticorps produits.

**Figure 10 : Profil électrophorétique de l'expression de la protéine recombinante P49 par les cellules bactériennes *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p49)] après 4 et 8 heures d'induction par l'IPTG.**

L'électrophorèse (SDS-PAGE) a été effectuée sur gel de polyacrylamide 10 % à partir des lysats bactériens. Les protéines ont été visualisées suite à une coloration du gel au bleu de coomassie. Les protéines exprimées par les bactéries recombinantes *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p49-F)] suite à l'induction de 8 heures et 4 heures avec 1 mM d'IPTG sont respectivement représentées dans les puits 2 et 3. Les profils protéiques des bactéries *E. coli* M15 [pREP4] transformées par le plasmide pQE32 seul et également induites par l'IPTG 1 mM durant 8 heures et 4 heures (puits 1 et 4) servent de contrôles négatifs. La protéine de 53 kDa (flèche noire) correspond à la protéine recombinante P49. Ce résultat montre ainsi l'expression optimale de la protéine recombinante P49 qui est obtenue après 8 heures d'induction par l'IPTG (puits 2) comparée à une expression moindre obtenue après 4 heures d'induction (puits 3). Le marqueur de masse moléculaire est indiqué en kDa dans le puits M.





### **2.3.1 Purification par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel en conditions dénaturantes**

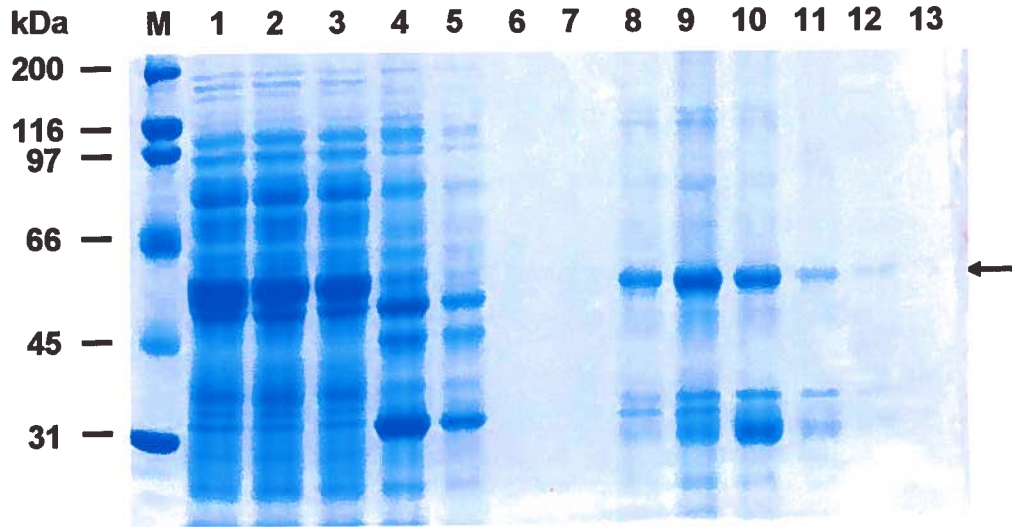
La protéine recombinante P49, liée à une queue de 6 résidus histidines, a été exprimée dans les bactéries sous forme de corps d'inclusion insolubles et seules les conditions dénaturantes ont permis sa purification. Les bactéries *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p49-F)], exprimant la protéine recombinante P49, ont été initialement induites par l'IPTG pendant 8 heures à 37°C. Afin de solubiliser la protéine recombinante P49, la lyse des cellules bactériennes a été effectuée en présence d'urée 8 M et de SDS 0.25 % et le lysat clarifié a été ensuite traité avec 1 % de Triton X-100 tel que décrit auparavant (section 3.3.2 de «matériel et méthodes»). La solubilisation de la protéine recombinante P49 a ainsi favorisé son adsorption à la colonne d'affinité Ni-NTA par interaction de la queue de six résidus histidines avec l'ion nickel de la résine. La présence de 0.1 % de SDS dans le tampon d'élution a permis une plus importante récupération de la protéine recombinante P49, sous forme soluble, comparativement à l'élution sans ce détergeant.

Dans un premier temps, les protéines recueillies dans les différentes fractions de la purification ont été analysées par électrophorèse (SDS-PAGE) sur gel de polyacrylamide 10 % coloré au bleu de coomassie (figure 11 A). L'analyse des protéines contenues dans le lysat bactérien clarifié montre la présence de la protéine recombinante P49 solubilisée, à une masse moléculaire de 53 kDa (figure 11 A, puits 1). Seules les protéines d'origine bactérienne, et non pas la protéine recombinante P49, ont été détectées dans les fractions contenant les protéines non adsorbées à la colonne (figure 11 A, puits 2) et dans les fractions recueillies lors des lavages de la colonne (figure 11 A, puits 3 à 6). L'analyse des protéines éluées révèle la présence de quantités importantes de la protéine recombinante P49, à une masse moléculaire de 53 kDa, dans les fractions relatives aux puits 8 à 12 (figure 11 A). Certaines protéines d'origine bactérienne ont été détectées dans les mêmes fractions éluées contenant la protéine recombinante P49 (figure 11 A, puits 8 à 12). La présence de ces protéines contaminantes dans les éluats a été également observée lors de la purification à partir des bactéries M15 [pREP4] contenant le plasmide pQE32 (contrôle négatif), mais aucune protéine de 53 kDa n'y a été détectée.

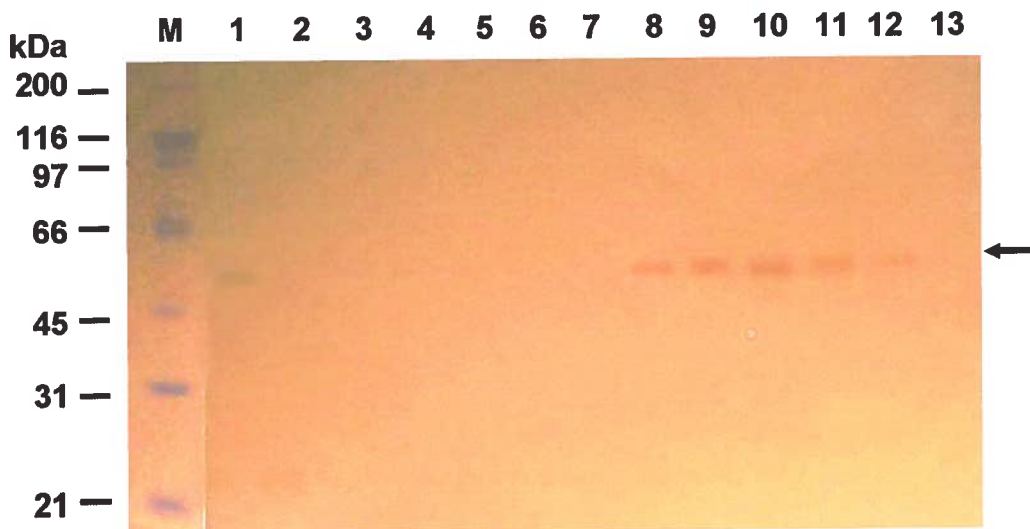
**Figure 11 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE A) et par immunobuvardage de type Western B) de la protéine recombinante P49 purifiée à partir des bactéries *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p49)].**

La purification de la protéine recombinante P49 a été réalisée en conditions dénaturantes par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel Ni-NTA, à partir du lysat bactérien. A) L'électrophorèse SDS-PAGE a été effectuée sur gel de polyacrylamide 10 %. Les protéines recueillies dans chaque fraction de la purification ont été visualisées suite à une coloration du gel au bleu de coomassie. Respectivement, les protéines contenues dans le lysat bactérien clarifié (puits 1), les protéines non adsorbées (ou exclues) à la colonne (puits 2), les protéines des fractions recueillies lors des lavages de la colonne (puits 3 à 6) ainsi que les protéines contenues dans les fractions éluées (puits 7 à 13) sont représentées. Une grande quantité de la protéine recombinante P49, correspondant à la protéine de masse moléculaire de 53 kDa (flèche noire), a été identifiée dans les puits 8 à 12. B) L'analyse par immunobuvardage de type Western des protéines recueillies chaque fraction de la purification, en utilisant les anticorps monoclonaux anti-6x His, confirme la présence et l'intégrité de la protéine recombinante P49 (flèche noire) dans les fractions éluées (B, puits 8 à 12). Le marqueur de masse moléculaire est représenté en kDa dans les puits M.

A)



B)



Afin de confirmer les résultats obtenus par SDS-PAGE, une analyse des protéines recueillies dans les différentes fractions de la purification a été également effectuée par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps dirigés contre la queue de 6 résidus histidines, ou 6x His (figure 11 B, puits 1 à 13). Cette étude a démontré que la queue de 6 résidus histidines a été détectée uniquement au niveau de la protéine de 53 kDa correspondant à la protéine recombinante P49 (figure 11 B, puits 1 et 8 à 12). Cette analyse confirme ainsi l'intégrité de la protéine recombinante P49 purifiée. De plus, aucune des protéines contaminantes co-éluées avec la protéine recombinante P49 ne réagit avec les anticorps anti-6x His.

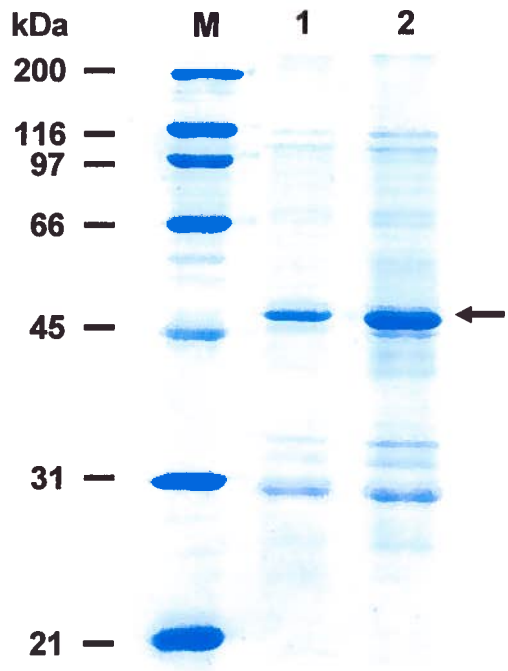
### **2.3.2 Renaturation, concentration et quantification de la protéine recombinante P49 purifiée**

Afin d'éliminer les détergents utilisés lors de la purification et de permettre ainsi la renaturation de la protéine recombinante P49 purifiée, les fractions éluées ont été dialysées, concentrées sous vide puis analysées par électrophorèse SDS-PAGE (figure 12). Cette analyse indique que la protéine recombinante P49 a été obtenue sous forme soluble dans l'échantillon dialysé (figure 12, puits 1) et qu'une grande quantité de cette protéine a été recueillie suite à la concentration (figure 12, puits 2). À partir de ces résultats, il a été conclu que la dialyse et la concentration n'entraînent pas l'agrégation et la précipitation de la protéine recombinante P49 purifiée. Toutefois, la concentration de la protéine recombinante P49 entraîne également la concentration des protéines contaminantes obtenue lors de l'élution.

La protéine recombinante P49 concentrée a été quantifiée par le test de Bradford afin d'établir le rendement de la purification. Les résultats obtenus ont indiqué que la protéine recombinante P49 a été purifiée avec un rendement de 5.5 mg par litre de culture. Cette analyse a permis également de s'assurer de la présence d'une quantité suffisante de la protéine recombinante P49 pour les expériences de production et de caractérisation des anticorps anti-P49.

**Figure 12 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE de la protéine recombinante P49 dialysée et concentrée.**

La protéine recombinante P49 purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Ni-NTA) a été dialysée puis concentrée sous vide. La protéine recombinante P49 dialysée (puits 1) et concentrée (puits 2) a été analysée par électrophorèse SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide 10 %. Ces résultats démontrent la présence de la protéine recombinante P49, à une masse moléculaire de 53 kDa (flèche noire), dans l'échantillon dialysé et, à une quantité plus importante, dans l'échantillon concentré. Le marqueur de masse moléculaire est représenté en kDa dans le puits M.



### **2.3.3 Confirmation de l'identité de la protéine recombinante P49 purifiée**

Avant de procéder aux expériences d'immunisation des souris Balb/c pour la production des anticorps anti-P49, une dernière expérience a été effectuée afin de s'assurer que la protéine de 53 kDa purifiée n'est autre que la protéine recombinante P49, non pas une protéine d'origine bactérienne. Ainsi, un test d'immunobuvardage de type Western a été effectué sur certaines fractions de la purification en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines d'origine bactérienne en comparaison à l'utilisation des anticorps anti-6x His (figure 13). Comme prévu, l'immunodétection en présence des anticorps anti-6x His a révélée uniquement la présence de la protéine de 53 kDa dans le lysat clarifié des bactéries *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p49)] et dans la fraction éluée et dialysée (figure 13 A, puits 2, 3 et 4). Dans la même analyse, aucune protéine n'a été détectée dans la fraction correspondant à l'éluat de la purification à partir des bactéries *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32)] contenant le plasmide seul (contrôle négatif) (figure 13 A, puits 1). L'analyse par immunobuvardage en utilisant les anticorps dirigés contre les protéines bactériennes a démontré l'absence de la protéine à une masse moléculaire de 53 kDa, correspondant à la P49 recombinante, et ce dans toutes les fractions étudiées (figure 13 B). Ainsi, seules les protéines d'origine bactérienne ont été reconnues par leurs anticorps spécifiques. Fait intéressant, les protéines contaminantes présentes dans la fraction de l'éluat dialysé de la protéine recombinante P49 (figure 13 B, puits 4) ont faiblement réagi avec les anticorps dirigés contre les protéines bactériennes comparativement à la réaction des protéines contenues dans la fraction éluée seulement (figure 13 B, puits 3). À partir des résultats de cette expérience, l'identité de la protéine recombinante P49 a pu être confirmée avant son utilisation pour la production des anticorps anti-P49 spécifiques.

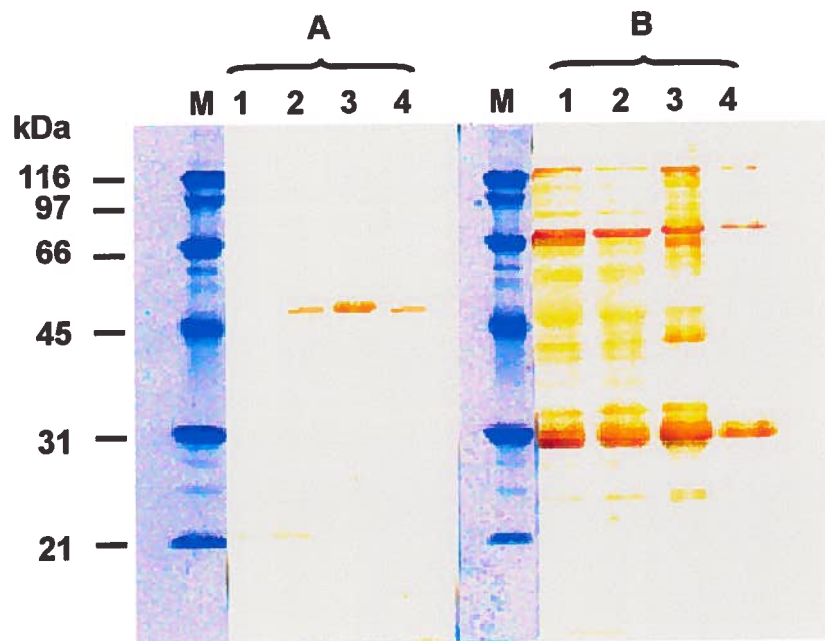
### **3 Expression de la protéine P49 de ChfuGV dans un système eucaryote**

L'expression de la protéine P49 de ChfuGV à partir d'un système d'expression eucaryote repose sur le principe de la vaccination à ADN. Ainsi, le gène codant pour la protéine P49 a été

**Figure 13 : Test de confirmation de l'identité de la protéine recombinante P49 par immunobuvardage de type Western.**

L'immunobuvardage de type Western a été effectué en utilisant les anticorps monoclonaux dirigés contre la queue de 6x His (A) et des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines provenant des bactéries *E. coli* M15 [pREP4] (B). Les protéines analysées correspondent aux protéines contenues dans l'éluat du contrôle négatif (puit 1), dans le lysat clarifié des bactéries M15 [(pREP4) (pQE32/p49)] (puits 2), dans l'éluat de la protéine recombinante P49 (puits 3) et dans l'éluat dialysé de la protéine recombinante P49 (puits 4). Les résultats en A confirment que les anticorps anti-6x His reconnaissent uniquement la protéine de 53 kDa correspondant à la protéine recombinante P49 (puits 2 à 4) et que cette protéine n'est pas détectée dans l'éluat du contrôle négatif (puits 1). La protéine correspondant à la P49 recombinante n'a pas été détectée par les anticorps spécifiques aux protéines bactériennes (B). Ces analyses confirment donc que la protéine recombinante P49 purifiée n'est pas une protéine d'origine bactérienne. Le marqueur de masse moléculaire est représenté en kDa dans les puits M.





initialement cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3. Le vecteur recombinant a été par la suite injecté par voie intramusculaire dans les cellules des souris Balb/c pour l'expression *in vivo* de la protéine recombinante P49 et l'induction de la réponse immunitaire.

Afin de permettre un clonage directionnel dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3, l'ORF codant pour la protéine P49 a été préalablement amplifié par PCR, à partir du vecteur recombinant pCR<sup>®</sup>2.1/*p49*, en utilisant des amorces sens et anti-sens présentant à leur extrémité 5' respective, les sites de restriction des endonucléases *Hind*III et *Xba*I. Comme prévu, le fragment amplifié par PCR puis analysé par électrophorèse sur gel d'agarose présente une taille de 1 397 pb. L'amplicon correspondant à l'ORF codant pour la protéine P49 a été par la suite purifié puis cloné dans le vecteur de clonage pCR<sup>®</sup>2.1. Cette étape de clonage a été réalisée dans le but de maintenir la stabilité et l'intégrité de l'amplicon, ainsi que de faciliter son sous clonage dans le vecteur d'expression pcDNA3. Le vecteur recombinant pCR<sup>®</sup>2.1 contenant l'ORF du gène *p49* a été digéré par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I afin de permettre l'extraction de l'insert. Celui-ci, une fois purifié à partir du gel d'agarose, a été cloné dans le vecteur d'expression pcDNA3. L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose du vecteur recombinant pcDNA3/*p49* digéré par *Bam*HI et *Hind*III révèle la présence du fragment de 1 397 pb, correspondant à l'ORF codant pour la protéine P49 (Figure 14, puits 6).

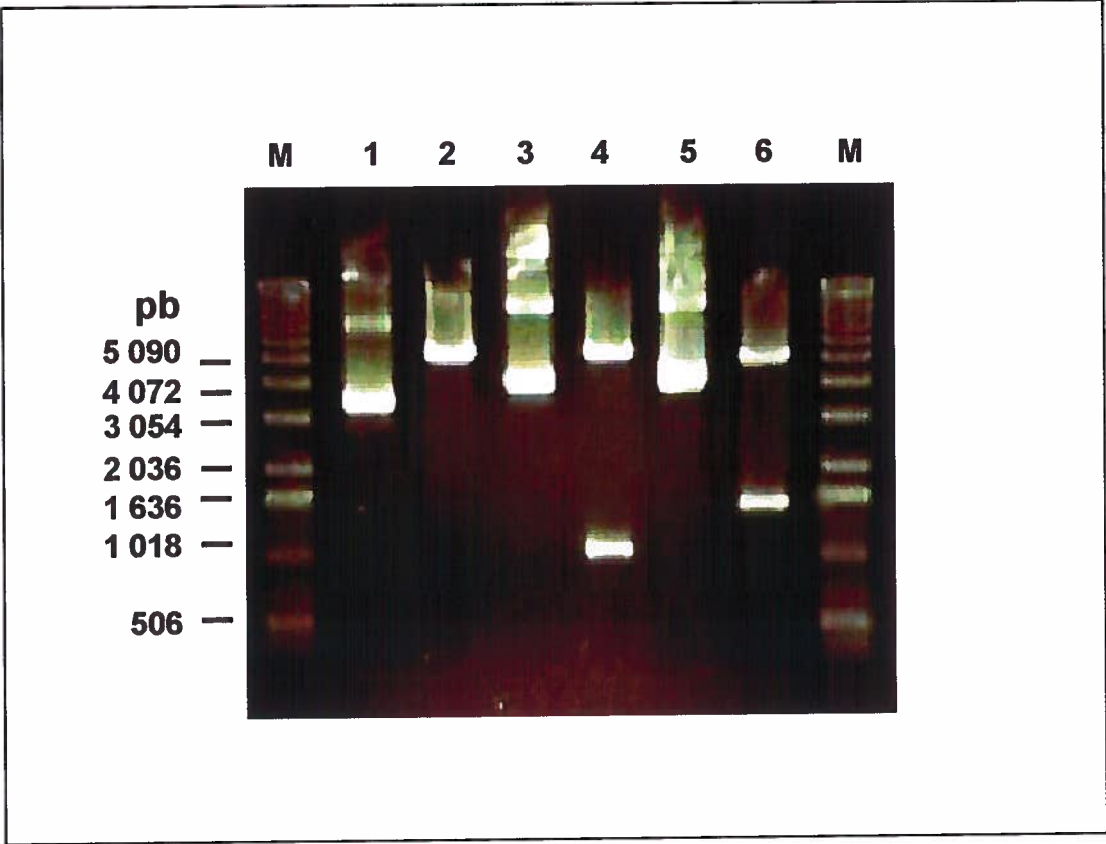
L'analyse de la séquence nucléotidique du vecteur recombinant pcDNA3/*p49* a permis de confirmer l'identité et l'intégrité de l'ORF codant pour la protéine P49 de ChfuGV ainsi que son insertion adéquate dans le vecteur d'expression pcDNA3. Le vecteur recombinant pcDNA3/*p49* a ainsi été sélectionné pour être utilisé lors de l'immunisation génétique des souris Balb/c.

#### **4 Préparation des vecteurs recombinants pcDNA3/*p49*, pcDNA3/IL-2 et du plasmide pcDNA3 pour l'immunisation génétique des souris Balb/c**

Les vecteurs recombinants pcDNA3/*p49* et pcDNA3/IL-2 ainsi que le plasmide pcDNA3 ont été produits en maxipréparation afin d'obtenir des quantités suffisantes pour l'immunisation des

**Figure 14 : Analyse des profils électrophorétiques des vecteurs recombinants pcDNA3/p49 et pcDNA3/IL-2 et du plasmide pcDNA3 produits pour l'immunisation génétique.**

Les vecteurs plasmidiques ont été produits par maxipréparation puis digérés par des endonucléases de restriction. Les vecteurs intacts et leurs produits digérés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %. Le plasmide pcDNA3 (puits 1) a été digéré par l'endonucléase *Bam*HI et présente une taille de 5 400 pb (puits 2). Le vecteur recombinant pcDNA3/IL-2 (puits 3) a été digéré par l'endonucléase *Bam*HI pour libérer un fragment de 1 020 pb (puits 4). Le vecteur recombinant pcDNA3/p49 (puits 5) a été digéré par les endonucléases *Hind*III et *Xba*I et le produit de la digestion présente une taille de 1 397 pb correspondant au gène codant pour la protéine P49 (puits 6). Le marqueur de masse moléculaire est représenté en pb dans les puits M.



souris Balb/c. Pour tous les vecteurs purifiés, le rapport des densités optiques obtenues à 260 nm et à 280 nm est supérieur à 1.8, démontrant ainsi leur haut niveau de pureté. Une analyse par électrophorèse sur gel d'agarose a été effectuée afin de s'assurer de l'intégrité des vecteurs plasmidiques produits (figure 14). Lors de l'immunisation génétique, le vecteur recombinant pcDNA3/p49 a été injecté aux souris pour permettre l'expression *in vivo* de la protéine P49 ainsi que la production d'anticorps dirigés contre cette protéine. Le plasmide pcDNA3/IL-2 a été utilisé pour permettre l'expression de l'interleukine-2 murin et tester ainsi son potentiel immunoadjuvant lors de l'immunisation génétique. Le vecteur recombinant pcDNA3/IL-2 et le plasmide pcDNA3 ont été co-injectés à un groupe de souris qui représentent des contrôles négatifs pour les expériences d'immunisation génétique.

## **5 Caractérisation de la réponse humorale générée par immunisation classique et génétique**

Les réponses humorales générées par immunisation classique, en injectant aux souris la protéine recombinante P49 purifiée, et par immunisation génétique, en utilisant le vecteur pcDNA3/p49 en présence et en absence du vecteur pcDNA3/IL-2, ont été analysées en évaluant qualitativement et quantitativement les niveaux d'anticorps anti-P49 produits.

### **5.1 Évaluation par ELISA de la réponse en anticorps anti-P49**

Les anticorps anti-P49 générés en réponse aux différentes immunisations classiques et génétiques des souris Balb/c ont été analysés par ELISA à partir des sérums prélevés. Le groupe de souris injectées avec la solution saline (PBS) a été utilisé comme contrôle négatif pour l'immunisation classique, alors que le groupe de souris injectées avec le plasmide pcDNA3 en présence du vecteur pcDNA3/IL-2 a servi de contrôle négatif pour l'immunisation génétique. Afin de s'assurer de l'exactitude et de la reproductibilité des résultats, l'indice de sensibilité, COI (Cut Off Index), a été estimé pour chaque type d'immunisation (classique et génétique) en testant par ELISA les derniers prélèvements de sérums des deux groupes de souris contrôles négatifs.

Ainsi, l'indice COI (0.025) pour l'immunisation classique a été calculé en additionnant la valeur de la densité optique moyenne (0.014) des sérums de souris injectées avec du PBS à deux fois la valeur de l'écart-type (0.005). De la même façon, la densité optique moyenne (0.092) des sérums de souris co-injectées avec le plasmide pcDNA3 et pcDNA3/IL-2 et l'écart-type (0.028) ont permis d'établir à 0.148 la valeur du COI relatif à l'immunisation génétique. Pour chaque type d'immunisation, seules les densités optiques excédant la valeur du COI sont considérées significatives.

Dans les figures 15 et 16, les densités optiques excédant la valeur du COI sont positives et indiquent, de façon générale, la présence d'anticorps anti-P49. Pour minimiser le signal provenant des interactions non spécifiques, les densités optiques relatives aux sérums pré-immuns (prélèvements au jour 0) ont été préalablement soustraites des valeurs obtenues pour tous les sérums immuns des derniers prélèvements. Les résultats indiquent que les valeurs des densités optiques des sérums de souris contrôles sont négatives, soit inférieures à l'indice COI, et ce dans les deux types d'immunisation (figure 15 et 16). Cette analyse démontre bien l'absence de production d'anticorps anti-P49 par les groupes de souris contrôles négatifs.

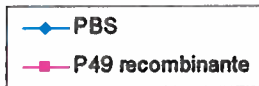
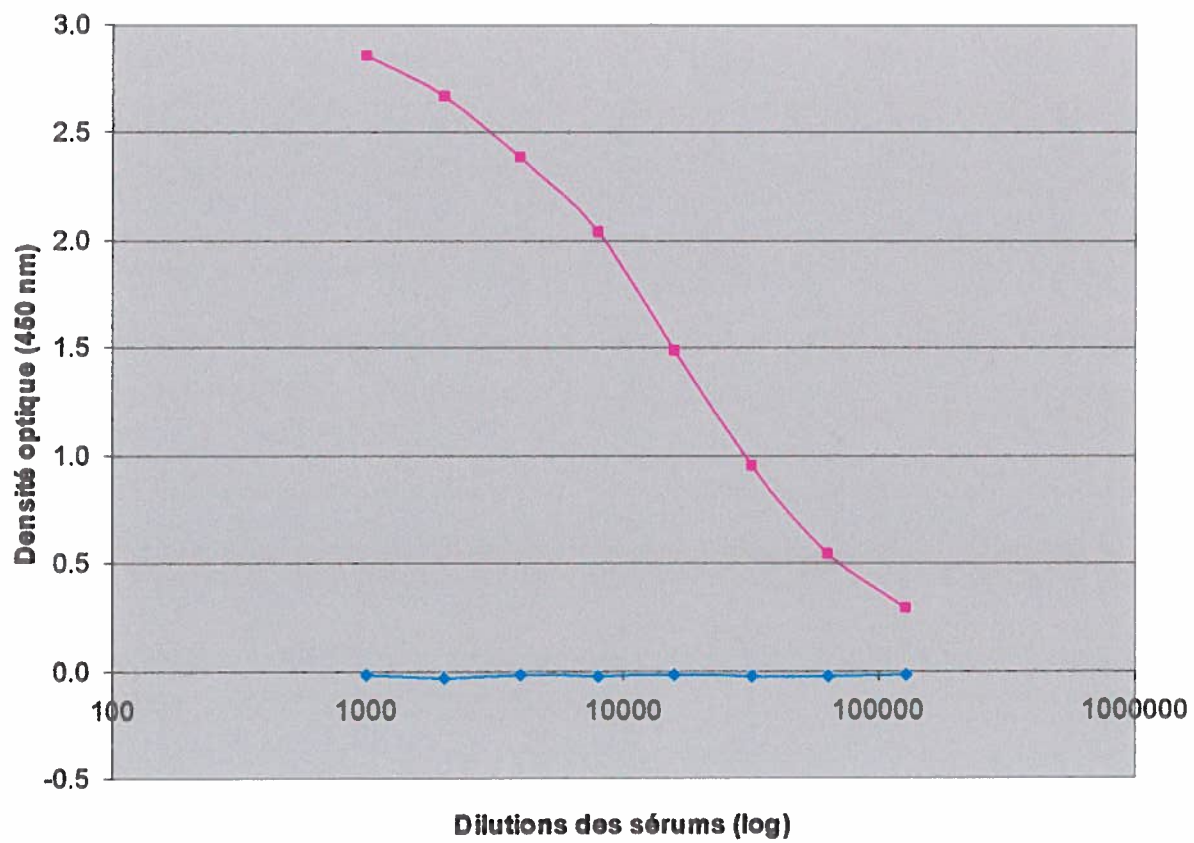
L'immunisation des souris avec la protéine recombinante P49 purifiée, injectée en présence de l'adjuvant de Freund, induit la production d'anticorps anti-P49 (figure 15). Les tests ELISA effectués sur les sérums provenant de l'immunisation génétique indiquent une faible production d'anticorps anti-P49 par le groupe de souris immunisées avec le vecteur recombinant pcDNA3/p49 en l'absence du vecteur pcDNA3/IL-2 comparativement au groupe de souris co-injectées en présence du vecteur exprimant l'interleukine-2 murin (figure 16). Une analyse comparative des résultats obtenus indique toutefois que l'immunisation classique a suscité une plus importante réponse en anticorps anti-P49 par rapport à l'immunisation génétique.

**Figure 15 : Analyse par ELISA de la réponse en anticorps anti-P49 induite par immunisation classique.**

Les tests ELISA ont été effectués sur les sérums de souris Balb/c des groupes immunisés avec :

- PBS : Témoin négatif pour l'immunisation classique.
- P49 recombinante : Protéine purifiée injectée en présence de l'adjuvant de Freund.

Les sérums analysés ont été prélevés au 55<sup>ème</sup> jour suivant la première injection et ont été dilués de façon exponentielle de 1/1 000 à 1/128 000. La moyenne des densités optiques de sérums des individus de chaque groupe est indiquée.



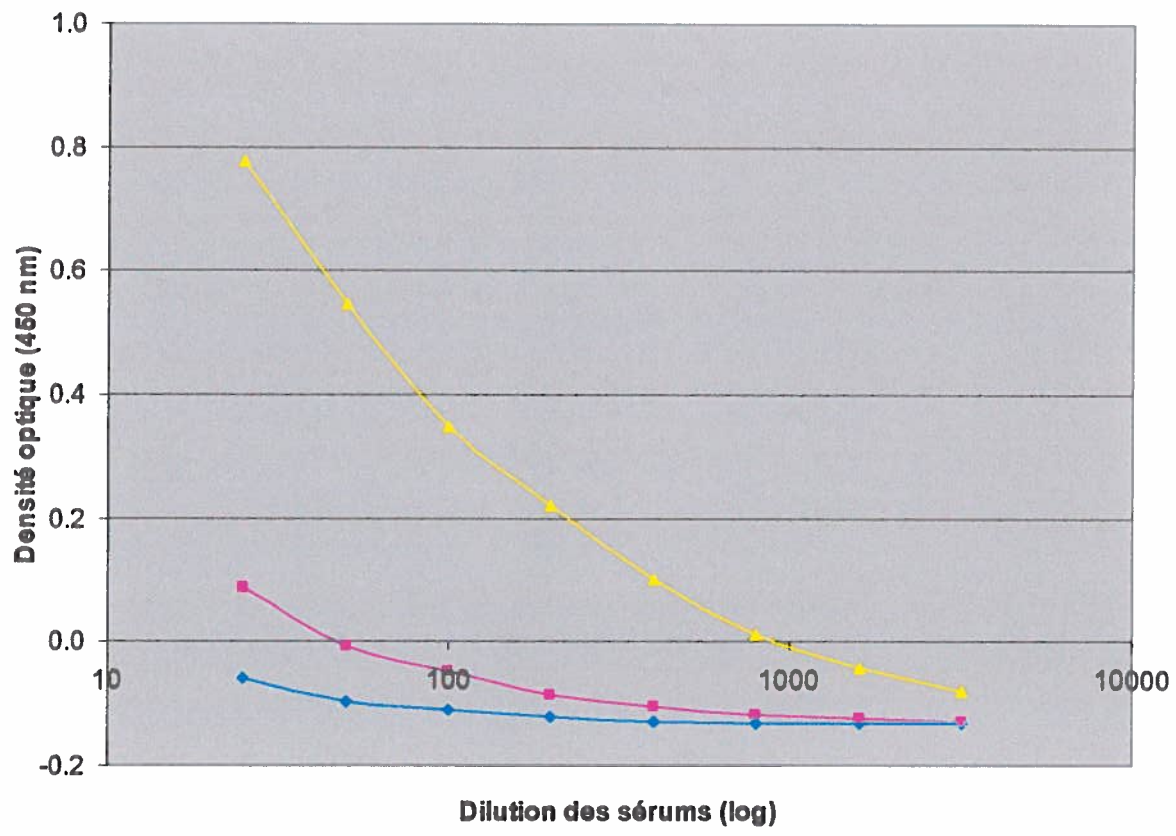


**Figure 16 : Analyse par ELISA de la réponse en anticorps anti-P49 induite par immunisation génétique.**

Les tests ELISA ont été effectués sur les sérums de souris Balb/c des groupes immunisés avec :

- pcDNA3 + pcDNA3/IL-2 : Témoin négatif pour l'immunisation génétique.
- pcDNA3/p49 + pcDNA3 : Vecteur recombinant exprimant la protéine P49 co-injecté avec le plasmide eucaryote.
- pcDNA3/p49 + pcDNA3/IL-2 : Vecteur recombinant exprimant la protéine P49 co-injecté avec le vecteur exprimant l'IL-2.

Les sérums analysés ont été prélevés au 81<sup>ème</sup> jour suivant la première injection et ont été dilués de façon exponentielle de 1/25 à 1/3 200. La moyenne des densités optiques de sérums des individus de chaque groupe est indiquée.



- pcDNA3 + pcDNA3/IL-2
- pcDNA3/p49 + pcDNA3
- pcDNA3/p49 + pcDNA3/IL-2

## 5.2 Analyse du niveau de production des anticorps anti-P49

D'autres analyses par ELISA ont été effectuées afin de suivre et de comparer le niveau ainsi que l'évolution du taux de production des anticorps anti-P49 au cours des immunisations classiques et génétiques. Tel que démontré dans la figure 17, aucune variation significative en anticorps anti-P49 n'a été observée durant l'immunisation des groupes de souris contrôles négatifs. Cette analyse a permis en particulier de s'assurer que l'injection du vecteur recombinant pcDNA3/IL-2 et du plasmide pcDNA3 seuls n'influence pas le niveau des réponses en anticorps anti-P49 induites. À noter que les individus du même groupe immunisés ont généré des réponses humorales comparables et ainsi, seules les valeurs moyennes des densités optiques sont indiquées.

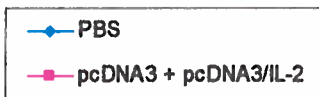
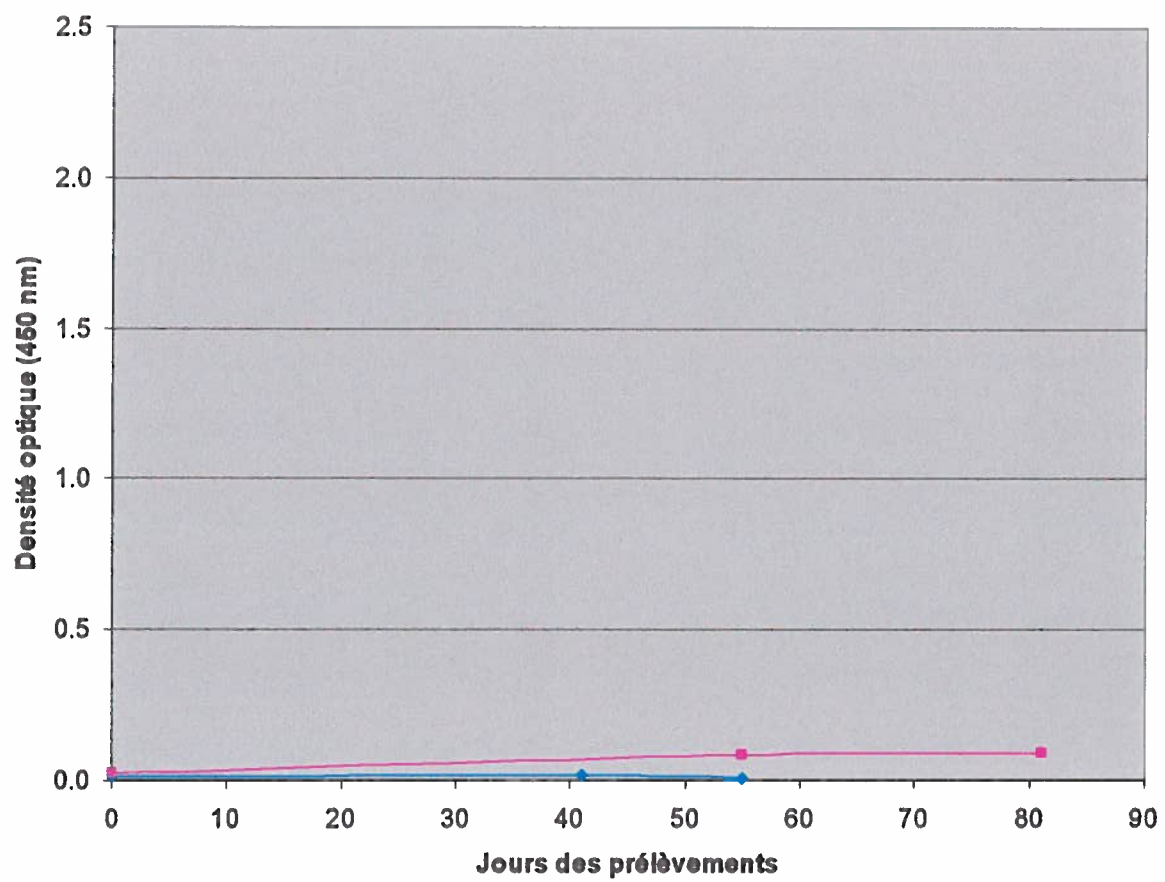
La variation des taux de production des anticorps anti-P49 durant l'immunisation avec la protéine recombinante P49 purifiée et avec le vecteur recombinant pcDNA3/p49 en présence et en absence du vecteur exprimant l'IL-2 murin est analysée dans la figure 18. Ainsi, l'utilisation de la protéine recombinante P49 purifiée comme antigène induit une augmentation graduelle du niveau de la réponse en anticorps anti-P49 en fonction des injections. L'immunisation génétique en présence du vecteur pcDNA3/p49 a suscité une production d'anticorps anti-P49 spécifiques mais dont le taux n'est significatif qu'au dernier prélèvement (jour 81). L'utilisation de la cytokine IL-2 comme immuno-adjuvant, exprimée à partir du vecteur pcDNA3/IL-2, a permis l'augmentation du taux de production des anticorps anti-P49 au cours de l'immunisation en présence du vecteur pcDNA3/p49. De plus, la co-injection du vecteur pcDNA3/IL-2 a suscité une réponse humorale significative plus précoce que celle générée en l'absence de cet adjuvant. En effet, la présence de l'IL-2 semble avoir activée la réponse en anticorps anti-P49 de près de 26 jours par rapport à l'immunisation génétique en l'absence de cette cytokine. L'ensemble de ces analyses ont démontré cependant que les réponses en anticorps anti-P49 induites par immunisation génétique sont produites tardivement comparativement à la réponse humorale générée par immunisation classique (figure 18).

**Figure 17 : Variation du niveau de production des anticorps anti-P49 durant l'immunisation des groupes de souris Balb/c contrôles.**

Le groupe de souris injecté avec du PBS a reçu une première dose au jour 0 puis trois doses de rappel aux jours 14, 28 et 42. Les sérums testés par ELISA proviennent des prélèvements des jours 0, 41 et 55.

Le groupe de souris injecté avec le plasmide eucaryote pcDNA3 en présence du vecteur pcDNA3/IL-2 a reçu une première dose au jour 0 suivie de 5 doses de rappel aux jours 14, 28, 42, 56 et 70. Les sérums testés par ELISA proviennent des prélèvements des jours 0, 55 et 81.

La moyenne des densités optiques de sérums des individus de chaque groupe est représentée pour chaque prélèvement.

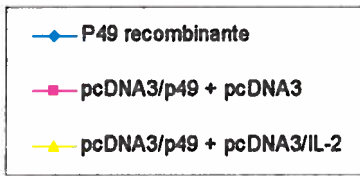
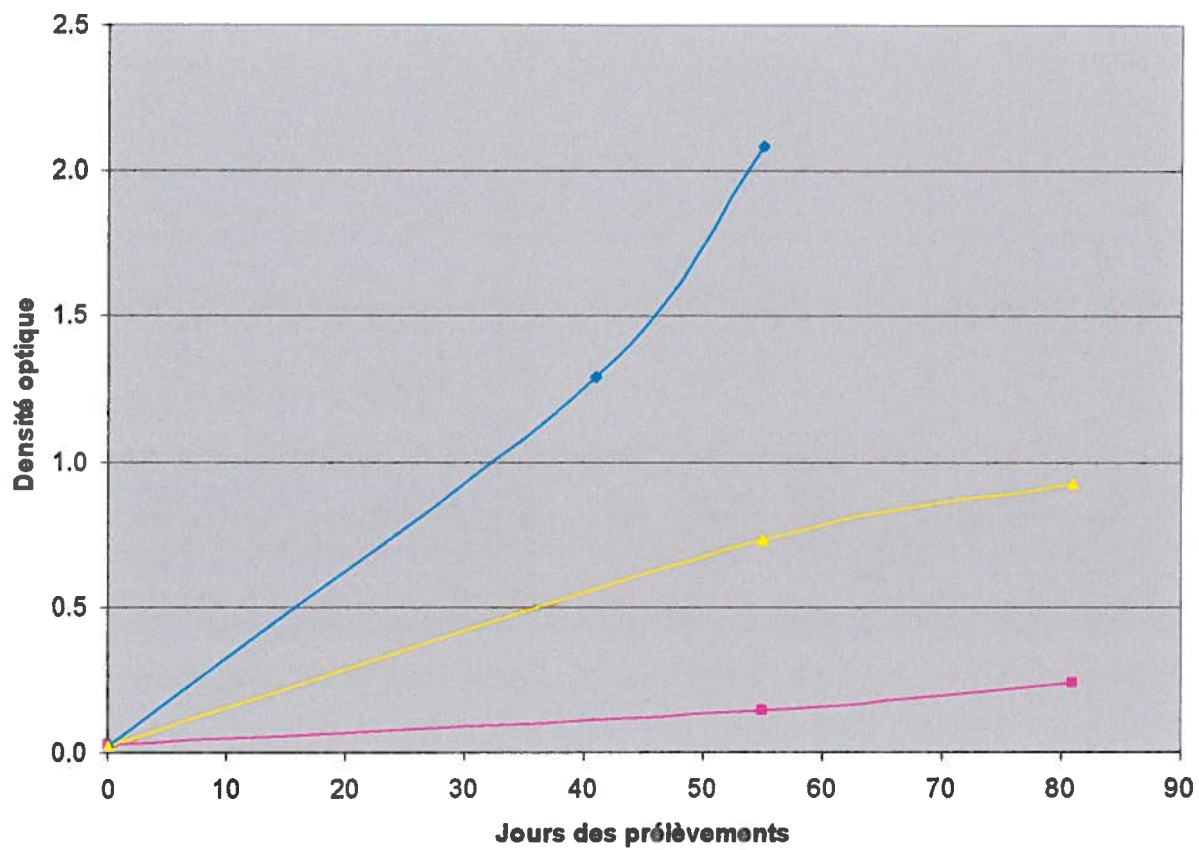


**Figure 18 : Variation du niveau de production des anticorps anti-P49 au cours de l'immunisation classique et génétique.**

Le groupe de souris injecté avec la protéine recombinante P49 (immunisation classique) en présence de l'adjuvant de Freund a reçu une première dose au jour 0 puis trois doses de rappel aux jours 14, 28 et 42. Les sérums testés par ELISA (dilution 1/8 000) proviennent des prélèvements des jours 0, 41 et 55.

Le groupe de souris injecté (immunisation génétique) avec le vecteur pcDNA3/p49 en présence du plasmide pcDNA3 et le groupe injecté avec le vecteur pcDNA3/p49 en présence du vecteur pcDNA3/IL-2 ont reçu une première dose au jour 0 suivie de 5 doses de rappel aux jours 14, 28, 42, 56 et 70. Les sérums testés par ELISA (dilution 1/25) proviennent des prélèvements des jours 0, 55 et 81.

La moyenne des densités optiques de sérums des individus de chaque groupe est représentée pour chaque prélèvement.



### 5.3 Titration des anticorps anti-P49

Les titres des anticorps anti-P49 ont été établis afin d'évaluer quantitativement l'immunogénicité de la protéine P49, présentée au système immunitaire selon les différentes conditions d'immunisation. L'analyse des titres des anticorps anti-P49 a permis également d'estimer l'efficacité de l'immunisation génétique comparativement à l'immunisation classique. Ainsi, les titres des anticorps anti-P49 ont été déterminés à partir des courbes d'absorbance établies pour les différentes immunisations. Ces courbes d'absorbance représentent les densités optiques, obtenues à 450 nm, en fonction du logarithme des dilutions du sérum testé. Grâce au logiciel Microsoft® Excel, la pente « m » et l'ordonnée à l'origine « b » de chacune des courbes ont été établies à partir de l'équation de la courbe de tendance logarithmique  $y = m \ln(x) + b$ , où « y » représente la densité optique et « x », la dilution du sérum. Par définition, le titre des anticorps correspond à l'inverse de la plus grande dilution de sérum permettant la détection limite de l'antigène. Ainsi, le titre des anticorps anti-P49 a été établi en calculant la valeur de la dilution du sérum lorsque la densité optique équivaut à la valeur du COI, étant l'indice de sensibilité préalablement déterminé pour chaque type d'immunisation. Dans le cas de l'immunisation classique, la valeur de « x » a été calculée lorsque la valeur de « y » est égale à 0.025, à partir de la formule  $x = e^{((0.025-b)/m)}$ . Les titres des anticorps anti-P49 relatifs à l'immunisation génétique ont été calculés à partir de la même formule mais lorsque la valeur de « y » est égale à 0.148.

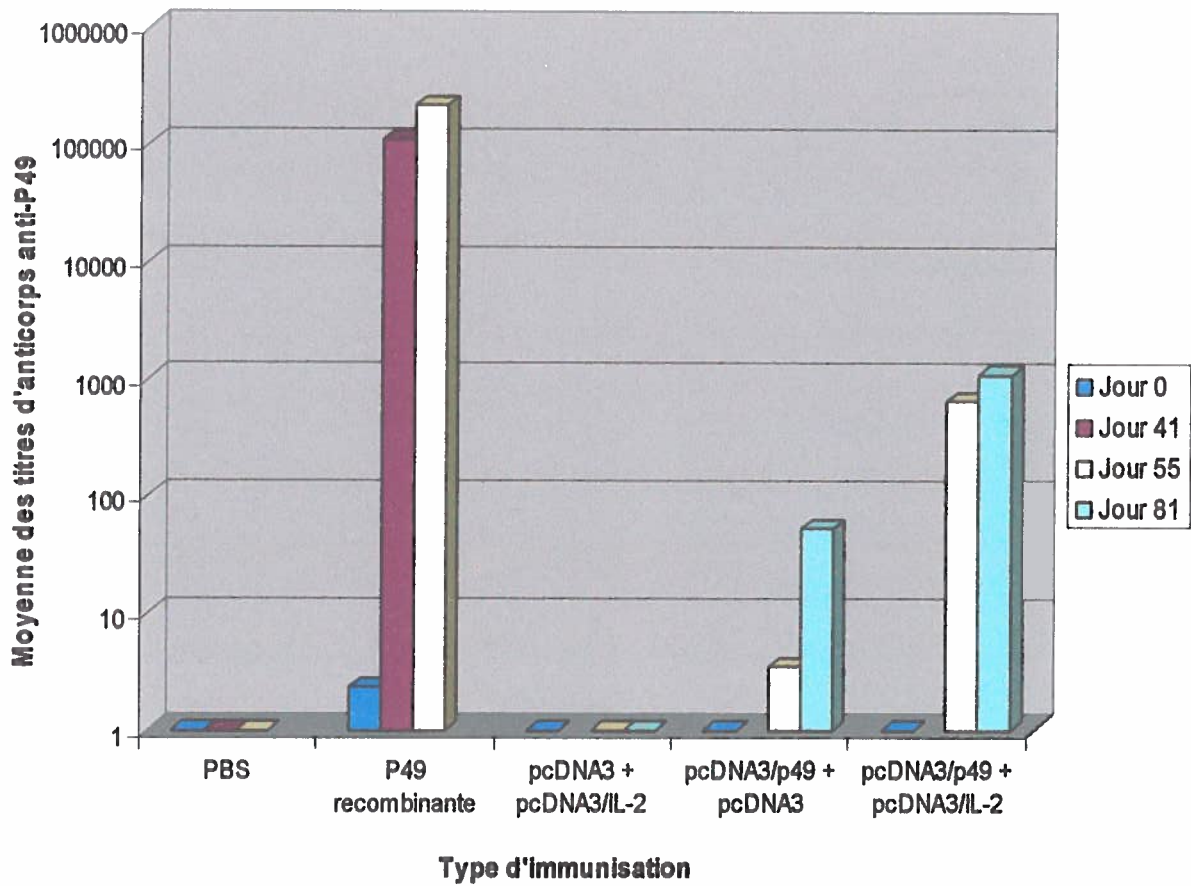
Tel que présenté dans la figure 19, les sérums provenant des groupes de souris contrôles négatifs présentent des titres relativement nuls, prouvant ainsi l'absence d'anticorps spécifiques à la protéine recombinante P49. Une moyenne des titres des anticorps anti-P49 inférieure à  $10^2$  a été obtenue chez les individus immunisés avec le vecteur recombinant pcDNA3/p49 + pcDNA3 (figure 19). Néanmoins, ces titres sont rendus plus importants, dans l'ordre de  $10^3$ , lorsque le vecteur pcDNA3/p49 a été administré en présence du vecteur pcDNA3/IL-2, exprimant l'IL-2 murin. Fait intéressant, l'effet immunostimulant de l'IL-2 est particulièrement intense même au jour 55. En effet, la présence de cette cytokine a entraîné une augmentation des titres d'anticorps anti-P49 au 55<sup>ème</sup> jour d'environ 200 fois. Les sérums du groupe d'individus immunisés avec la



**Figure 19 : Titres des anticorps anti-P49 présents dans les différents prélèvements de sérums selon le type d'immunisation.**

Les résultats représentent la moyenne des titres des anticorps anti-P49 obtenue chez les individus de chaque groupe de souris Balb/c immunisées.

- PBS : Témoin négatif pour l'immunisation classique
- P49 recombinante : Protéine purifiée injectée en présence de l'adjuvant de Freund.
- pcDNA3 + pcDNA3/IL-2 : Témoin négatif pour l'immunisation génétique
- pcDNA3/p49 + pcDNA3 : Vecteur recombinant exprimant la protéine P49 co-injecté avec le plasmide eucaryote.
- pcDNA3/p49 + pcDNA3/IL-2 : Vecteur recombinant exprimant la protéine P49 co-injecté avec le vecteur exprimant l'IL-2.



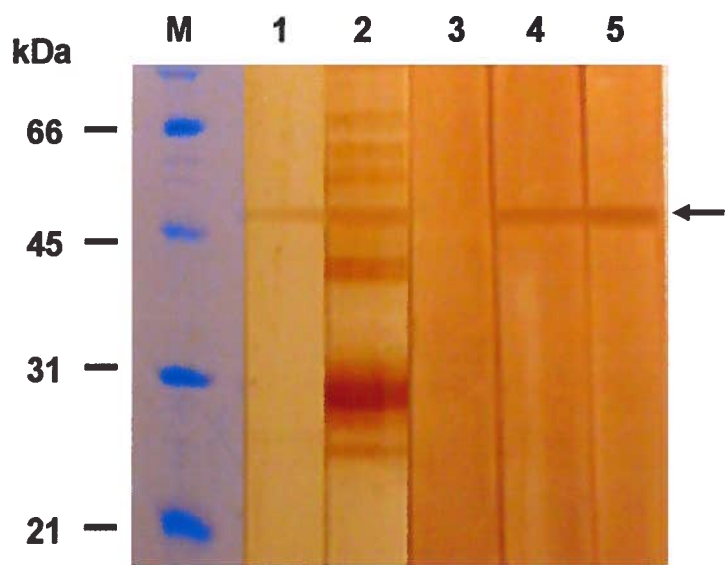
protéine recombinante P49 purifiée démontrent des titres d'anticorps anti-P49 au delà de  $10^5$ , dépassant largement ceux obtenus lors de l'immunisation génétique (figure 19). En effet, la moyenne des titres des anticorps anti-P49 obtenus par immunisation classique est de l'ordre de 197 fois supérieure à celle des titres suscités par immunisation génétique.

#### **5.4 Évaluation de la spécificité des anticorps anti-P49 par immunobuvardage de type Western**

La spécificité des anticorps anti-P49 générés en réponse à l'immunisation classique et génétique des souris Balb/c a été évaluée par immunobuvardage de type Western en utilisant les sérums des derniers prélèvements (figure 20). Tel que prévu, l'immunisation du groupe de souris contrôles négatifs, co-injectées avec le plasmide pcDNA3 et pcDNA3/IL-2, n'induit aucune production des anticorps anti-P49 (figure 20, puits 3). L'utilisation du sérum issu du groupe de souris injectées avec la protéine recombinante P49 purifiée, en présence de l'adjuvant de Freund, a permis la détection d'une bande à 53 kDa (figure 20, puits 2). Cette bande est ainsi située au même niveau que la protéine recombinante P49 identifiée par les anticorps anti-6x His (figure 20, puits 1). L'immunisation classique des souris Balb/c a donc suscité la production d'anticorps polyclonaux spécifiques à la protéine P49. Il faut préciser cependant, qu'en plus de la protéine recombinante P49, d'autres protéines (environ 66 kDa, 61 kDa, 59 kDa, 43 kDa, 30 kDa et 25 kDa) ont été reconnues par les anticorps provenant de l'immunisation classique (figure 20, puits 2). Il s'agit en fait de protéines contaminantes d'origine bactérienne ayant été co-purifiées par chromatographie d'affinité et ainsi co-injectées aux souris avec la protéine recombinante P49. Tel que présenté dans la figure 20, seule la protéine recombinante P49 a été détectée par les anticorps générés suite à l'immunisation avec le vecteur recombinant pcDNA3/p49, en absence ou en présence du vecteur exprimant l'IL-2 (puits 4 et 5). Ainsi, l'immunisation génétique a induit la production d'anticorps largement plus spécifiques à la protéine P49 que les anticorps issus de l'immunisation classique.

**Figure 20 : Analyse par immunobuvardage de type Western de la spécificité des anticorps anti-P49 générés par immunisation classique et génétique.**

L'analyse par immunobuvardage de type Western a été effectuée en utilisant les sérums de souris Balb/c immunisées avec la protéine recombinante P49 purifiée, le plasmide eucaryote pcDNA3 en présence du vecteur pcDNA3/IL-2 (contrôle négatif), le vecteur recombinant pcDNA3/p49 en présence et en absence du vecteur pcDNA3/IL-2. La détection de la protéine recombinante P49 en présence des anticorps anti-6x His a été utilisée comme contrôle positif (puits 1). Les anticorps présents dans les sérums de souris immunisées avec la protéine recombinante P49 reconnaissent celle-ci (masse moléculaire de 53 kDa) ainsi que des protéines contaminantes d'origine bactérienne (puits 2). Aucune protéine n'a été détectée lors de l'utilisation des sérums de souris contrôles négatifs (puits 3). Les sérums de souris immunisés avec le vecteur recombinant pcDNA3/p49 en absence (puits 4) et en présence du vecteur pcDNA3/IL-2 (puits 5) contiennent des anticorps qui reconnaissent uniquement la protéine recombinante P49, détectée ainsi à 53 kDa (flèche noire). Le marqueur de masse moléculaire est représenté en kDa dans le puits M.



## **Discussion**

Les baculovirus ont la particularité d'exprimer trois classes de protéines, dont la P49, la P35 et les IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), qui inhibent le processus de l'apoptose déclenché par la cellule hôte suite à l'infection virale. Grâce à l'activité anti-apoptotique de ces protéines, les baculovirus assurent conséquemment l'infection de leurs cellules hôtes, leur réplication et leur propagation (Hasnain et *al.*, 2003; Liu et *al.*, 2003). Jusqu'à présent, aucune de ces classes de protéines anti-apoptotiques n'a été étudiée chez le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV). Nous avons montré lors de ce projet de recherche et ce pour la première fois, l'existence du gène codant pour la protéine P49 dans le génome de ChfuGV.

L'identification du gène codant pour la protéine P49 de ChfuGV a été réalisée par comparaison des séquences correspondant à la banque génomique de ChfuGV obtenue par la méthode « Shotgun » avec les séquences des gènes *p49* des autres baculovirus. Le gène *p49* a été localisé immédiatement en aval du gène qui code pour la protéine structurale ODVe-18 et, précisément, entre les positions 8 632 pb et 9 999 pb dans le brin anti-sens du génome viral. Par ailleurs, la proximité du gène *p49* par rapport au gène *odve-18* a été également observée dans le génome de CpGV (Luque et *al.*, 2001), de CrleGV (Lange et Jehle, 2003) et de PhopGV (non publié). Cette localisation est toutefois variable à travers les gènes *p49* des NPV, suggérant ainsi une divergence entre les NPV au niveau de cette région comparativement aux GV.

L'analyse de la région promotrice du gène *p49* de ChfuGV a révélé la présence de la boîte TATA et du motif TAAG suggérant ainsi l'expression précoce et tardive du gène *p49* de ChfuGV. L'expression précoce et tardive du gène *p49* a été démontrée chez SINPV, indiquant que ce gène est transcrit entre 8 et 12 heures suivant l'infection virale (Du et *al.*, 1999 et Liu et *al.*, 2003). Le promoteur tardif TAAG est présent en trois copies dans la région 5' non codante du gène *p49* de ChfuGV (figure 6). Plusieurs gènes des baculovirus peuvent en effet contenir plus d'une copie du motif consensus (G/T/A)TAAG en amont de leur ORF et la transcription peut être initiée à partir de certaines ou toutes les copies présentes (Blissard et Rohrmann, 1990). La redondance du promoteur tardif TAAG a été observée dans plusieurs gènes des baculovirus dont les gènes *gp64 efp*, *gp41*, *lef-6*, *p39*, *v-ubi* et *sod* (Garrity et *al.*, 2003; Guarino et Smith, 1992; Guarino, 1990; Passarelli et Miller, 1994; Whitford et Faulkner, 1992). Toutefois, le gène

*p49* de SINPV présente la séquence promotrice ATTAG à la place du motif TAAG et en une copie seulement (Du et *al.*, 1999). Dans le gène *p49* de ChfuGV, la copie du motif TAAG contenu dans la séquence AATAAGTATTTT, située à 16 nt en amont du codon d'initiation, est particulièrement intéressante. En effet, il a été rapporté que la présence de cette séquence consensus de 12 nt dans la région promotrice favorise l'hyperexpression des gènes chez les baculovirus (Blissard et Rohrmann, 1990, Morris et Miller, 1994). De plus, il a été démontré que le promoteur tardif du gène codant pour la chitinase de AcMNPV est fonctionnel malgré sa proximité de 14 nt en amont du codon d'initiation (Hawtin et *al.*, 1995).

Le rôle de la boîte TATA retrouvée dans les promoteurs eucaryotes ARN polymérase II - dépendants est bien défini. Cet élément d'expression précoce constitue un site de reconnaissance et de liaison des protéines TBP (TATA binding protein). En se liant à la séquence TATA, la protéine TBP entraîne la formation du complexe actif de l'ARN polymérase II qui initie la transcription à environ 25 à 30 nt en aval du site de liaison (Blissard, 1996; Ogbourne et Antalis, 1998). Dans le gène *p49* de ChfuGV, la boîte TATA a été précisément localisée à 55 nt en amont du codon d'initiation.

Le motif TCATT caractéristique des promoteurs précoces des baculovirus a été retrouvé en quatre copies (-71 nt, -130 nt, -227 nt et -351 nt) dans le gène *p49* de ChfuGV (figure 6). En fait, la séquence consensus (T/C/A)CA(G/T)T, constitue un site d'initiation de la transcription précoce retrouvée en une ou plusieurs copies dans de nombreux gènes des baculovirus et des arthropodes qui sont transcrits par l'ARN polymérase II (Blissard et *al.*, 1992; Cherbas et Cherbas, 1993; Kogan et *al.*, 1995). Il a été démontré que ce site d'initiation peut être impliqué aussi bien dans le mode de transcription TATA - dépendante que - indépendante et que sa présence contribuerait au contrôle de la vitesse et de l'efficacité de la transcription des gènes précoces (Kogan et *al.*, 1995, Guarino et Smith, 1992).

Un autre élément, le motif GATA, a été localisé au niveau de la région promotrice du gène *p49* de ChfuGV et pourrait jouer un rôle dans sa régulation. Identifié dans les régions promotrices de plusieurs gènes des baculovirus, le motif GATA se lie aux facteurs transcriptionnels de l'hôte



activant ainsi la transcription médiée par l'ARN polymérase II (Blissard, 1996). L'activité de cet élément de régulation en *cis* peut avoir lieu en présence et en absence de la boîte TATA (Kogan et al., 1995). Toutefois, son rôle au niveau de l'expression du gène *p49* de ChfuGV reste à élucider.

La présence de divers éléments de régulation transcriptionnelle en *cis* et de façon redondante est souvent observée au niveau de gènes essentiels des baculovirus tels que les gènes *p35* et *pp31* de AcMNPV et le gène *gp64* de OpMNPV (Dickson et Friesen, 1991; Guarino et Smith, 1992; Kogan et al., 1995). La présence de ces éléments au niveau du gène *p49* de ChfuGV pourrait ainsi accélérer et augmenter le niveau de son expression suite à l'infection.

Le gène *p49* de ChfuGV code pour une protéine de 455 acides aminés d'une masse moléculaire déduite de 53 kDa. Les analyses comparatives effectuées sur la séquence déduite en acides aminés de la protéine P49 de ChfuGV avec celles des autres baculovirus suggèrent l'existence d'une divergence de la structure de cette protéine entre les GV et les NPV. Cette divergence est très apparente au niveau des homologies relatives obtenues entre les structures primaires des protéines P49 des baculovirus (tableau 3). La protéine anti-apoptotique IAP présente également des différences d'homologies structurales entre les GV et les NPV. En effet, cette protéine peut avoir des homologies de 43-60 % à travers les GV contre des homologies de 17-38 % lorsque la comparaison est effectuée entre les IAP des NPV (Garcia-Maruniak et al., 2004; Hayakawa et al., 1999; Lauzon et al., 2004; Lange et Jehle, 2003; Wormleaton et al., 2003). À noter que certains NPV sont plus apparentés entre eux que les GV, notamment HaSNPV avec HzSNPV et SINPV avec SpltNPV. En fait, il a été rapporté que ces virus sont phylogénétiquement proches (Bulach et al., 1999). Leur faible divergence au cours de l'évolution pourrait probablement expliquer les fortes homologies observées entre leur séquence de la protéine P49 (tableau 3).

La comparaison de la séquence déduite en acides aminés de la protéine P49 de ChfuGV avec celle de la protéine P35 de AcMNPV n'a démontré aucune similarité significative (résultat non présenté). Cependant, Du et al. (1999) ainsi que Jabbour et al. (2002) ont rapporté que la protéine P49 de SINPV partage de fortes homologies (50 % d'identité) avec son homologue

fonctionnel, la protéine P35 des baculovirus et ce, au niveau des extrémités N - et C - terminales. Cette homologie structurale avec la protéine P35 a été également observée au niveau de la protéine P49 de SpltNPV (30 % d'identité) (Zhang et *al.*, 2002). Les extrémités N - et C - terminales de la protéine P49 de SINPV ainsi que celles des protéines P35 sont en fait essentielles à leur activité anti-apoptotique (Du et *al.*, 1999; Pei et *al.*, 2002; Bertin et *al.*, 1996; Zoog et *al.*, 1999). Au niveau fonctionnel, la protéine P49 s'associe aux caspases initiateuses et effectrices d'apoptose pour former un complexe stable qui inhibe la mort cellulaire suite à l'infection virale (Pei et *al.*, 2002; Zoog et *al.*, 2002). Des études ont démontré que le motif fonctionnel  $^{91}\text{TVTD}^{94}$  de la protéine P49 de SINPV est essentiel pour la reconnaissance par les caspases ciblées et ainsi pour le processus anti-apoptotique (Pei et *al.*, 2002; Zoog et *al.*, 2002). Au niveau moléculaire, la protéine P49 est clivée par les caspases au niveau du résidu aspartate situé en position 94 du site actif  $^{91}\text{TVTD}^{94}\downarrow\text{X}$  (X = G). L'association subséquente des fragments générés (10 kDa et 40 kDa) de la protéine P49 avec les caspases entraîne leur désactivation et, par conséquent, l'inhibition de l'apoptose. À date, la présence du motif  $^{91}\text{TVTD}^{94}$  a été rapporté également dans la protéine P49 de SpltNPV (Jabbour et *al.*, 2002). Toutefois, ce motif ne semble pas conservé à travers les protéines P49 des GV. En effet, la présence de ce motif n'a été observée dans aucune protéine P49 des GV étudiés (figure 7). Ceci appuie davantage notre hypothèse précédente qui suggère la divergence des GV par rapport aux NPV au niveau de la protéine P49. Ainsi, il est probable qu'un autre motif soit responsable de la fonction anti-apoptotique de la protéine P49 chez les GV. D'ailleurs, l'analyse des profils d'hydropathie de la protéine P49 des baculovirus (figure 8) suggère une très faible conservation de sa structure tertiaire entre les deux espèces virales (GV et NPV). En guise d'exemple, le motif fonctionnel de reconnaissance et de clivage par les caspases, identifié dans la protéine P35 n'est pas totalement conservé à travers les baculovirus. En effet, la protéine P35 présente les motifs DQMD et DKID respectivement chez AcMNPV et BmNPV (Bertin et *al.*, 1996; Bump et *al.*, 1995; Morishima et *al.*, 1998; Xue et Horvitz, 1995). De plus, les séquences du domaine répété BIR et du motif en doigt de zinc RING, requises pour la fonction anti-apoptotique des IAP, présentent des différences en terme de localisation à travers les baculovirus (Bideshi et *al.*, 1999; Hozak et *al.*, 2000). Des tests fonctionnels seraient donc requis pour identifier le ou les sites actifs de la protéine P49 des GV.

L'activité anti-apoptotique de la protéine P49 de ChfuGV demeure à confirmer. Ainsi, il est important de produire préalablement la protéine P49 dans un système d'expression et de générer des anticorps anti-P49 dans le but, entre autres, de vérifier la réaction de clivage de la P49 par les caspases. C'est d'ailleurs dans ce sens que nous nous sommes intéressés, lors du deuxième volet de ce projet, à la caractérisation immunobiologique de la protéine P49 de ChfuGV. Ainsi, la protéine P49 a été exprimée à l'aide de deux systèmes d'expression, l'un procaryote et l'autre eucaryote, afin d'obtenir une protéine présentant aussi bien des épitopes linéaires que conformationnels pour la production d'anticorps anti-P49. Les anticorps spécifiques à la protéine P49 ainsi produits seront utilisés dans des projets visant notamment la caractérisation de l'activité fonctionnelle de la protéine P49 de ChfuGV.

L'expression de la protéine P49 dans un système procaryote et son analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ont permis de confirmer sa masse moléculaire déduit étant de 53 kDa (figure 10). C'est la première fois que la protéine recombinante P49 a réussi à être produite à l'aide d'un système d'expression procaryote. En effet, jusqu'à présent, seuls les systèmes eucaryotes et acellulaires ont été utilisés pour l'expression de la protéine P49 et les essais d'expression dans les bactéries n'ont généré que des protéines insolubles (Jabbour et al., 2002; Pei et al., 2002; Zoog et al., 2002). Jabbour et al. (2002) ont rapporté que la faible solubilité et le bas niveau d'expression de la P49, en utilisant notamment les systèmes d'expression pET, pMAL et pGEX, ont constitué un obstacle à sa purification. D'ailleurs, malgré l'expression de la P49 à un niveau détectable dans les levures, il a été impossible de l'isoler avec un rendement et une pureté nécessaires aux tests biochimiques (Jabbour et al., 2002). Certes, la difficulté relative à l'insolubilité de la protéine recombinante P49 de ChfuGV, exprimée dans les bactéries *E. coli* M15 [pREP4], a été rencontrée dans ce projet. C'est pourquoi des conditions dénaturantes ont été optimisées afin de solubiliser la P49 recombinante et de permettre sa purification par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA (figure 11). En réalité, la présence du SDS, à une concentration de 0.25 % dans le tampon dénaturant de lyse bactérienne, a contribué efficacement à la solubilisation de la P49 recombinante. Des études ont d'ailleurs rapporté que l'utilisation de détergents anioniques à groupement alkyl, tels que le SDS ou le Sarkosyl, permet la solubilisation de protéines recombinantes exprimées dans les bactéries sous forme de corps d'inclusion (Frangioni et Neel, 1993; Frankel et al., 1991; Henrichon, 1997; McNally et al.,

1991; Mercado-Pimentel *et al.*, 2002). L'addition subséquente du Triton X-100 (concentration de 1 %) lors de la solubilisation de la P49 recombinante a permis une meilleure adsorption à la colonne Ni-NTA. Il semble en effet que les détergents ioniques utilisés lors de la solubilisation se font séquestrés dans des micelles par les détergents non ioniques, tels que le Triton X-100, ce qui permet la renaturation partielle de la protéine recombinante et ainsi son adsorption efficace à la colonne de purification (Frangioni et Neel, 1993; Mercado-Pimentel *et al.*, 2002).

Un des objectifs majeurs de ce projet de recherche consiste en la production d'anticorps polyclonaux spécifiques à la protéine P49 par immunisation classique et génétique des souris Balb/c. L'immunisation classique est définie par l'injection aux souris de la protéine recombinante P49 purifiée par chromatographie d'affinité. Quant à l'immunisation génétique, elle implique l'injection de l'ADN nu, en l'occurrence, le plasmide pcDNA3/p49, pouvant exprimer la protéine P49 suite à la transfection des cellules animales. Les deux méthodes d'immunisation ont effectivement permis l'induction d'une réponse humorale spécifique dirigée contre la P49 (figures 15, 16). En théorie, dans les deux cas, la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes entraîne la production d'anticorps polyclonaux anti-P49 dirigés contre les différents déterminants antigéniques de la protéine P49. Le but à long terme de ces expériences d'immunisation consiste, entre autres, à évaluer si la technologie de la vaccination à ADN pouvait être une meilleure approche pour la production d'anticorps comparativement à la méthode d'immunisation classique.

Afin de caractériser efficacement les réponses humorales suscitées par immunisation classique et génétique, un test ELISA, utilisant la protéine recombinante P49 purifiée, a été optimisé de façon à éliminer toutes les interactions non spécifiques ainsi que les signaux des bruits de fond. Ainsi, l'immunisation classique des souris Balb/c a permis d'atteindre des niveaux d'anticorps anti-P49 avec des titres moyens supérieurs à  $10^5$  après deux doses de rappel, soit à partir d'une période de 41 jours suivant la première injection (figures 18, 19). La réponse en anticorps anti-P49 induite par immunisation génétique a été initialement détectée au 55<sup>ème</sup> jour, suivant la première immunisation, et a atteint un titre de l'ordre de  $10^3$  au bout du 81<sup>ème</sup> jour (figures 18, 19). À partir de ces résultats, il a été évident de constater, dans un premier temps, que l'immunisation génétique induit une réponse humorale plus tardive que l'immunisation classique. Des études

ont rapporté que l'induction d'une réponse immunitaire par un vaccin à ADN, administré par voie intramusculaire, peut en effet requérir plusieurs doses de rappel comparativement à un vaccin conventionnel (Ulmer et *al.*, 1993). L'une des explications plausibles à cette observation pourrait être reliée à la période nécessaire à l'expression *in vivo* de la protéine P49, suite à la transfection des cellules de souris Balb/c, à la maturation de l'antigène produit et à sa présentation au système immunitaire. Néanmoins, les anticorps produits par immunisation génétique sont très spécifiques à la protéine recombinante P49 et, comme en témoignent les analyses par immunobuvardage de type Western, aucun contaminant n'a été détecté (figure 20). Dans ce sens, en considérant la spécificité des anticorps anti-P49 produits, il serait approprié de suggérer que les titres obtenus par immunisation génétique sont en réalité similaires, ou même supérieurs, aux titres d'anticorps anti-P49 obtenus lors de l'immunisation classique. En fait, cette hypothèse pourra être confirmée si l'immunisation classique est effectuée en l'absence des protéines contaminantes d'origine bactérienne qui ont été co-purifiées avec la P49 recombinante (figures 12, 13) et co-injectées aux souris. Les expériences d'immunobuvardage de type Western ont d'ailleurs révélé la présence dans le sérum, d'anticorps dirigés contre plusieurs de ces protéines contaminantes, en plus des anticorps spécifiques à la protéine recombinante P49 (figure 20). Cependant, durant la période du projet, il ne nous a pas été possible d'éliminer ces contaminants bactériens avant les expériences d'immunisation. Il faudrait effectivement optimiser davantage le système d'expression bactérienne et en particulier le système de purification sur colonne Ni-NTA. En effet, le système de chromatographie d'affinité utilisé a entraîné la fixation non spécifique de protéines bactériennes qui ne semblent pas contenir de résidus histidines successifs dans leur séquence. Leur présence n'a d'ailleurs pas été détectée par les anticorps monoclonaux anti-6x His (figure 11). Cette contamination pourrait également résulter des conditions de purification utilisées, notamment de solubilisation de la protéine recombinante P49.

Lors des expériences d'immunisation génétique, le potentiel immuno-adjuvant de l'interleukine-2 murin a été évalué. La co-injection du vecteur exprimant cette cytokine (pcDNA3/IL-2) en présence du vecteur codant pour la P49 (pcDNA3/p49) a eu un effet stimulant sur la réponse humorale. En effet, la présence de l'IL-2 a permis d'accélérer le processus d'induction de la réponse humorale en plus d'augmenter les titres des anticorps de plus de 10 fois par rapport à

l'immunisation génétique en l'absence de cette cytokine (figures 18, 19). Ces résultats appuient ainsi le rôle de l'IL-2 en tant qu'activateur de la réponse immunitaire lors de son administration simultanée dans un vaccin à ADN. En effet, il a été rapporté que l'utilisation de l'IL-2 comme immuno-adjuvant durant l'immunisation génétique entraîne une augmentation de la réponse en anticorps spécifiques et du niveau d'IgG total dans le sérum (Chow et *al.*, 1998; Raz et *al.* 1993). Watanabe et *al.* (1993) ont montré que la co-injection du vecteur exprimant l'IL-2 avec le vecteur contenant le gène d'intérêt permet des réponses en anticorps 5 fois supérieure qu'en absence de l'adjuvant. Une fois exprimée, l'IL-2 a le potentiel d'activer directement les lymphocytes et les monocytes et de stimuler les fonctions sécrétrices des macrophages, ce qui permet de renforcer la réponse immunitaire dirigée contre l'antigène (Kucerova, 1998). Ainsi, nous pouvons confirmer notre hypothèse de départ selon laquelle l'IL-2, co-administrée sous forme de vecteur plasmidique en présence du vecteur codant pour la P49, peut être utilisé comme immuno-adjuvant lors de la production des anticorps par immunisation génétique.

L'adjuvant de Freund a été utilisé lors des expériences d'immunisation classique en raison de son potentiel à accroître l'immunogénicité d'une protéine antigénique. En effet, de nombreuses études ont démontré que l'injection d'un antigène en émulsion avec l'adjuvant de Freund stimule plus efficacement la réponse immunitaire que l'antigène seul. L'adjuvant de Freund consiste en une émulsion d'huile minérale contenant, lorsqu'il s'agit de l'adjuvant complet, des particules du bacille inactivé de la tuberculose (*Mycobacterium butyricum*). Il permet de véhiculer l'antigène en l'enrobant dans les gouttelettes d'huile, favorise ainsi son relargage progressif et son exposition plus durable aux cellules du système immunitaire (Cox et Coulter, 1997).

Durant ce projet de recherche, nous avons ainsi réussi à démontrer la présence du gène codant pour la protéine P49 dans le génome de ChfuGV. La protéine recombinante P49 a pu être produite aussi bien dans le système d'expression procaryote choisi que eucaryote. Nous avons ainsi produit des anticorps polyclonaux anti-P49 en utilisant la protéine recombinante P49 produite par les cellules bactériennes (immunisation classique) et par les cellules eucaryotes des souris Balb/c (immunisation génétique).

# **Conclusion**

Ce projet de recherche a permis d'apporter une contribution significative à la caractérisation du gène *p49* de ChfuGV et de son produit, la protéine P49. Ainsi, nous avons réalisé, d'une part, une caractérisation moléculaire du gène *p49* de ChfuGV et, d'autre part, une caractérisation immunobiologique de la protéine P49. Cette protéine, identifiée chez certains baculovirus, joue le rôle d'inhibiteur direct des mécanismes apoptotiques déclenchés par les cellules hôtes et utilisés comme moyen de défense contre l'infection virale. La réalisation de ce projet offre sans aucun doute un avancement des connaissances sur la biologie moléculaire du ChfuGV qui représente un agent potentiel pour la lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

À travers ce projet, nous avons démontré, pour la première fois, l'existence du gène codant pour la protéine P49 chez le ChfuGV. Le gène *p49* a été localisé sur le brin anti-sens du génome viral, entre les positions 8 632 pb et 9 999 pb, et se retrouve immédiatement en aval, et dans la même orientation, du gène codant pour la protéine structurale ODVe-18 de ChfuGV. L'analyse de la région promotrice du gène *p49* de ChfuGV suggère que celui-ci, comme tous les gènes *p49* des baculovirus, est exprimé durant la phase précoce et tardive dans le cycle d'infection virale. Les études comparatives des séquences déduites en acides aminés de la protéine P49 des baculovirus ont révélé que cette protéine est bien conservée à travers les GV mais qu'une divergence structurale se serait produite par rapport à celles des NPV. Des études plus avancées devraient cependant être effectuées afin de révéler les domaines fonctionnels des protéines P49 des GV.

À partir des systèmes d'expression procaryote et eucaryote utilisés, nous avons pu produire la protéine recombinante P49 pour les expériences d'immunisation des souris Balb/c. Toutefois, l'obtention de protéines contaminantes d'origine bactérienne avec la protéine recombinante P49 purifiée nous pousse à remettre en question les conditions de purification du système procaryote utilisé.

L'immunisation classique (protéine recombinante P49 purifiée) et génétique (vecteur recombinant pcDNA3/*p49*) ont ainsi permis de générer des anticorps polyclonaux spécifiques à la protéine recombinante P49, avec des titres respectifs de l'ordre de  $10^5$  et de  $10^3$ . Nous avons pu évaluer le potentiel de l'immunisation génétique comparativement à l'immunisation



classique. D'une part, l'immunisation génétique s'est avérée moins coûteuse, plus rapide et définitivement moins laborieuse que l'immunisation classique. D'autre part, les anticorps anti-P49 produits par immunisation génétique sont largement plus spécifiques à la protéine recombinante P49 comparativement à ceux générés par immunisation classique. Ainsi, nous avons pu démontrer que les titres des anticorps obtenus lors de l'immunisation classique résultent non seulement de l'immunogénicité de la protéine recombinante P49 purifiée mais aussi de celle des protéines contaminantes bactériennes co-injectées avec la protéine d'intérêt. De ce fait, nous pouvons conclure que l'immunisation génétique est définitivement plus efficace dans la production des anticorps anti-P49.

Les expériences d'immunisation génétique nous ont permis également de confirmer le potentiel immuno-adjuvant de l'IL-2. En effet, l'utilisation de cette cytokine, injecté sous forme de vecteur pcDNA3/IL-2, a permis d'accélérer l'induction de la réponse humorale et d'augmenter significativement les taux de production des anticorps anti-P49.

Des projets utilisant les anticorps anti-P49 produits durant cette étude sont actuellement en cours dans nos laboratoires pour démontrer le rôle anti-apoptotique de la protéine P49 de ChfuGV. Les anticorps anti-P49 produits vont aussi servir à immunolocaliser la protéine P49 dans des coupes de tissus de larves infectées par le ChfuGV. Ceci permettrait ainsi de démontrer son expression temporelle et son implication durant la pathogenèse virale.

# Références

AGENCE DE RÉGLEMENTATION DE LA LUTTE ANTIPARASITAIRE (ARLA). 2000. Virosoft CP4 : Virus de la granulose de *Cydia pomonella*. Note réglementaire. Santé Canada. Ottawa. Pp: 1-22.

AFONSO, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Balinsky, C. A. & Moser, B. A., Becnel, J. J., Rock, D. L., et Kutish, G. F. 2001. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. J Virol, 75(22): 11157-11165.

AKBARI, O., Panjwani, N., Garcia, S., Tascon, R., Lowrie, D., et Stockinger, B. 1999. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. J Exp Med, 189(1): 169-178.

ALAIN, R., Berthiaume, L., Trudel, M. 1989. Microscopie électronique. Dans P. Payment et Trudel, M. (Ed.), Manuel de techniques virologiques. Presses de l'Université du Québec. Sillery, Québec. Pp: 107-119.

ANONYME. 2001. The Qiaexpressionist. Handbook for high-level expression and purification of 6 His-tagged proteins. 5<sup>ème</sup> Édition, Qiagen.

ANTONI, B. A., Sabbatini, P., Rabson, A. B., et White, E. 1995. Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection. J Virol, 69(4): 2384-2392.

ARIF, B. M., Guangyu, Z., et Jamieson, P. 1986. A comparison of the three granulosis viruses isolated from *Choristoneura* Spp. J Inverteb Pathol, 48: 180-186.

AYRES, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., et Possee, R. D. 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 202(2): 586-605.

BARRY, M. A., et Johnston, S. A. 1997. Biological features of genetic immunization. Vaccine, 15(8): 788-791.

BEIDLER, D. R., Tewari, M., Friesen, P. D., Poirier, G., et Dixit, V. M. 1995. The baculovirus P35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. J Biol Chem, 270(28): 16526-16528.

BELGORD, G. H. 1963. The molecular structure of some insect virus inclusion bodies. J Ultrastructure Research, 8: 360-378.

BERTIN, J., Mendrysa, S. M., LaCount, D. J., Gaur, S., Krebs, J. F., Armstrong, R. C., Tomaselli, K. J., et Friesen, P. D. 1996. Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. J Virol, 70(9): 6251-6259.

BETTON, J. M. 2003. Rapid translation system (RTS): a promising alternative for recombinant protein production. Curr Prot Pept Sci, 4(1): 73-80.

- BIDESHI, D. K., Anwar, A. T., et Federici, B. A. 1999. A baculovirus anti-apoptosis gene homolog of the *Trichoplusia ni* granulovirus. Virus Genes, 19(2): 95-101.
- BIRD, F. T. 1959. Polyhedrovirus and granulovirus causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens. J Insect Pathol, 1: 406-430.
- BISHOP, D., H, L. 1986. UK release of genetically marked virus. Nature: 323:496.
- BLAIS, J. R. 1983. Trends in frequency, extent and severity of spruce budworm outbreaks in eastern Canada. Can J For Res, 13: 539-547.
- BLISSARD, G. W., et Rohrmann, G. F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Annu Rev Entomol, 35: 127-155.
- BLISSARD, G. W., Kogan, P. H., Wei, R., et Rohrmann, G. F. 1992. A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription. Virology, 190(2): 783-793.
- BLISSARD, G. W. 1996. Baculovirus--insect cell interactions. Cytotechnology, 20(1-3): 73-93.
- BONNEAU, G., Bordeleau, C., Boulet, B., Chabot, M., Davidson, J-G., Garneau, J., Moranville, D., et Therrien, P. 2003. Tordeuse des bourgeons de l'épinette. Ministère des ressources naturelles. Gouvernement du Québec.
- BONNING, B. C., et Hammock, B. D. 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. Annu. Rev. Entomol., 41: 191-210.
- BOULANGER, Y., et Arseneault, D. 2004. Spruce budworm outbreaks in eastern Quebec over the last 450 years. Canadian Journal of Forest Research., 34(5): 1035-1043.
- BOYCE, F. M., et Bucher, N. L. 1996. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(6): 2348-2352.
- BOYER, J. D., Cohen, A. D., Vogt, S., Schumann, K., Nath, B., Ahn, L., Lacy, K., Bagarazzi, M. L., Higgins, T. J., Baine, Y., Ciccarelli, R. B., Ginsberg, R. S., MacGregor, R. R., et Weiner, D. B. 2000. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. J Infect Dis, 181(2): 476-483.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248-254.
- BUCKHOLZ, R. G., et Gleeson, M. A. 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. Biotechnology (N Y), 9(11): 1067-1072.
- BULACH, D. M., Kumar, C. A., Zaia, A., Liang, B., et Tribe, D. E. 1999. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. J Invertebr Pathol, 73(1): 59-73.

BUMP, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., Licari, P., Mankovich, J., Shi, L., Greenberg, A.H., Miller, L.K., et Wong, W.W. 1995. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein P35. Science, 269(5232): 1885-1888.

BURNETTE, W. N. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins A. Anal. Biochem, 112: 195-203.

CARSTENS, E. B., Lu, A. L., et Chan, H. L. 1993. Sequence, transcriptional mapping, and overexpression of *p47*, a baculovirus gene regulating late gene expression. J Virol, 67(5): 2513-2520.

CASARES, S., Inaba, K., Brumeanu, T. D., Steinman, R. M., et Bona, C. A. 1997. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. J Exp Med, 186(9): 1481-1486.

CHANG, H. Y., et Yang, X. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. Microbiol Mol Biol Rev, 64(4): 821-846.

CHATTERGOON, M. A., Robinson, T. M., Boyer, J. D., et Weiner, D. B. 1998. Specific immune induction following DNA-based immunization through *in vivo* transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. J Immunol, 160(12): 5707-5718.

CHEN, J. Z., Zhu, H. H., Liu, K. Z., et Chen, Z. 2004. Enhancing cellular immune response to HBV M DNA vaccine in mice by codelivery of interleukin-18 recombinant. J Zhejiang Univ Sci, 5(4): 467-471.

CHENG, T., Xu, C. Y., Wang, Y. B., Chen, M., Wu, T., Zhang, J., et Xia, N. S. 2004. A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. World J Gastroenterol, 10(11): 1612-1618.

CHERBAS, L., et Cherbas, P. 1993. The arthropod initiator: the capsite consensus plays an important role in transcription. Insect Biochem Mol Biol, 23(1): 81-90.

CHOW, Y. H., Huang, W. L., Chi, W. K., Chu, Y. D., et Tao, M. H. 1997. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. J Virol, 71(1): 169-178.

CHOW, Y. H., Chiang, B. L., Lee, Y. L., Chi, W. K., Lin, W. C., Chen, Y. T., et Tao, M. H. 1998. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. J Immunol, 160(3): 1320-1329.

CLEM, R. J., Fechheimer, M., et Miller, L. K. 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. Science, 254(5036): 1388-1390.

CLEM, R. J., et Miller, L. K. 1993. Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and the *in*

*vivo* infectivity of a baculovirus. J Virol, 67(7): 3730-3738.

CLEM, R. J., et Miller, L. K. 1994. Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. Mol Cell Biol, 14(8): 5212-5222.

COOKE, B. J., et Régnière, J. 1999. Predictability and measurability of *Bacillus thuringiensis* efficacy against spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). Environ. Entomol., 28: 711-721.

COX, J. C., et Coulter, A. R. 1997. Adjuvants: a classification and review of their modes of action. Vaccine, 15(3): 248-256.

CREGG, J. M., Vedvick, T. S., et Raschke, W. C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology (N Y), 11(8): 905-910.

DAVIS, H. L., Whalen, R. G., et Demeneix, B. A. 1993. Direct gene transfer into skeletal muscle *in vivo*: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. Hum Gene Ther, 4(2): 151-159.

DECK, R. R., DeWitt, C. M., Donnelly, J. J., Liu, M. A., et Ulmer, J. B. 1997. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. Vaccine, 15(1): 71-78.

DELA CRUZ, W. P., Friesen, P. D., et Fisher, A. J. 2001. Crystal structure of baculovirus P35 reveals a novel conformational change in the reactive site loop after caspase cleavage. J Biol Chem, 276(35): 32933-32939.

DEVERAUX, Q. L., et Reed, J. C. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. Genes Dev, 13(3): 239-252.

DICKSON, J. A., et Friesen, P. D. 1991. Identification of upstream promoter elements mediating early transcription from the 35,000-molecular-weight protein gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J Virol, 65(8): 4006-4016.

DISIS, M. L., Bernhard, H., Shiota, F. M., Hand, S. L., Gralow, J. R., Huseby, E. S., Gillis, S., et Cheever, M. A. 1996. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. Blood, 88(1): 202-210.

DONNELLY, J., Berry, K., et Ulmer, J. B. 2003. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. Int J Parasitol, 33(5-6): 457-467.

DORAIS, L., Auger, M., Pelletier, M., Chabot, M., Bordeleau, C. et Cabana, J. 1995. La répression des insectes au Québec, 1974 -1987. Dans J. A. Armstrong et Ives, W. G. H. (Ed.), Insectes forestiers ravageurs au Canada. Service canadien des forêts, Ottawa. Pp: 667-678.

DU, Q., Lehavi, D., Faktor, O., Qi, Y., et Chejanovsky, N. 1999. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. J Virol, 73(2): 1278-1285.

FEDERICI, B. A. 1997. Baculovirus pathogenesis. Dans L. K. Miller (Ed.), The Baculoviruses.

Plenum Press. New York. Pp: 33-59.

FELTQUATE, D. M., Heaney, S., Webster, R. G., et Robinson, H. L. 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. J Immunol, 158(5): 2278-2284.

FISHER, A. J., Cruz, W., Zoog, S. J., Schneider, C. L., et Friesen, P. D. 1999. Crystal structure of baculovirus P35: role of a novel reactive site loop in apoptotic caspase inhibition. Embo J, 18(8): 2031-2039.

FORTÉ, A. J., et Guertin, C. 1999. Pathogenicity of granulovirus toward *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). The Canadian Entomologist., 131: 725-727.

FRANGIONI, J. V., et Neel, B. G. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. Anal Biochem, 210(1): 179-187.

FRANKEL, S., Sohn, R., et Leinwand, L. 1991. The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. Proc Natl Acad Sci U S A, 88(4): 1192-1196.

FRIESEN, P. D. 1997. Regulation of baculovirus early gene expression. Dans L. K. Miller (Ed.), The Baculoviruses. Plenum Press. New York. Pp: 141-170.

GARCIA-MARUNIAK, A., Maruniak, J. E., Zanotto, P. M., Doumbouya, A. E., Liu, J. C., Merritt, T. M., et Lanoie, J. S. 2004. Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus. J Virol, 78(13): 7036-7051.

GARDSVOLL, H., Solberg, H., Dano, K., et Hoyer-Hansen, G. 2000. Generation of high-affinity rabbit polyclonal antibodies to the murine urokinase receptor using DNA immunization. J Immunol Methods, 234(1-2): 107-116.

GARRITY, D. B., Chang, M. J., et Blissard, G. W. 1997. Late promoter selection in the baculovirus *gp64* envelope fusion protein gene. Virology, 231(2): 167-181.

GEISSE, S., et Kocher, H. P. 1999. Protein expression in mammalian and insect cell systems. Methods Enzymol, 306: 19-42.

GILKESON, G. S., Conover, J., Halpern, M., Pisetsky, D. S., Feagin, A., et Klinman, D. M. 1998. Effects of bacterial DNA on cytokine production by (NZB/NZW)F1 mice. J Immunol, 161(8): 3890-3895.

GOEDDEL, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., et Riggs, A. D. 1979. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. Proc Natl Acad Sci U S A, 76(1): 106-110.

GRANADOS, R. R. 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. Biotech Bioeng, 22: 1377-1405.

GRANADOS, R. R., et Corsaro, B. G. 1990. Baculovirus enhancing proteins and their

implication for insect control. Proceeding of the International Colloquium of Invertebrate Pathology and Microbial Control. Australie. Pp: 174-178.

GROSS, C. H., Russell, R. L., et Rohrmann, G. F. 1994. *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. J Gen Virol, 75(5): 1115-1123.

GU, M. L., Leppla, S. H., et Klinman, D. M. 1999. Protection against anthrax toxin by vaccination with a DNA plasmid encoding anthrax protective antigen. Vaccine, 17(4): 340-344.

GUARINO, L. A. 1990. Identification of a viral gene encoding an ubiquitin-like protein. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(1): 409-413.

GUARINO, L. A., et Smith, M. 1992. Regulation of delayed-early gene transcription by dual TATA boxes. J Virol, 66(6): 3733-3739.

GUERTIN, C. 1995. Étude du potentiel insecticide de certains virus, du *Bacillus thuringiensis* et de certaines substances phagostimulantes contre les insectes défoliants de la forêt. Ministère des ressources naturelles du Québec. Rapport sur l'avancement des travaux. Projet 10240S.

GURUNATHAN, S., Wu, C. Y., Freidag, B. L., et Seder, R. A. 2000. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. Curr Opin Immunol, 12(4): 442-447.

GURUNATHAN, S., Klinman, D. M., et Seder, R. A. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. Annu Rev Immunol, 18: 927-974.

HARVEY, A. J., Bidwai, A. P., et Miller, L. K. 1997. Doom, a product of the *Drosophila* mod(mdg4) gene, induces apoptosis and binds to baculovirus inhibitor-of-apoptosis proteins. Mol Cell Biol, 17(5): 2835-2843.

HASHIMOTO, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y., et Matsumoto, T. 2000. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. Virology, 275(2): 358-372.

HASNAIN, S. E., Begum, R., Ramaiah, K. V., Sahdev, S., Shajil, E. M., Taneja, T. K., Mohan, M., Athar, M., Sah, N. K., et Krishnaveni, M. 2003. Host-pathogen interactions during apoptosis. J Biosci, 28(3): 349-358.

HAWTIN, R. E., Arnold, K., Ayres, M. D., Zanotto, P. M., Howard, S. C., Gooday, G. W., Chappell, L. H., Kitts, P. A., King, L. A., et Possee, R. D. 1995. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, 212(2): 673-685.

HAY, B. A., Wolff, T., et Rubin, G. M. 1994. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. Development, 120(8): 2121-2129.

HAY, S., et Kannourakis, G. 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. J Gen Virol, 83(7): 1547-1564.



HAYAKAWA, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S. I., Goto, C., et Maeda, S. 1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. Virology, 262(2): 277-297.

HENKE, A. 2002. DNA immunization--a new chance in vaccine research? Med Microbiol Immunol (Berl), 191(3-4): 187-190.

HENRICHON, M. 1997. Expression de la sous-unité HA1 du gène de l'hémagglutinine du virus influenza A(H1N1) associé à la pneumonie proliférative et nécrosante. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Science (M. Sc) en virologie et immunologie, Institut Armand-Frappier. Université du Québec, Laval.

HERMANSON, G., Whitlow, V., Parker, S., Tonsky, K., Rusalov, D., Ferrari, M., Lalor, P., Komai, M., Mere, R., Bell, M., Brenneman, K., Mateczun, A., Evans, T., Kaslow, D., Galloway, D., et Hobart, P. 2004. A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(37): 13601-13606.

HITZEMAN, R. A., Hagie, F. E., Levine, H. L., Goeddel, D. V., Ammerer, G., et Hall, B. D. 1981. Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature, 293(5835): 717-722.

HOCHULI, E., Dobeli, H., et Schacher, A. 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. J Chromatogr, 411: 177-184.

HOCHULI, E., Bannwarth, W., Doebeli, H., Gentz, R., Stueber, D. 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. Bio/Technology: 1321-1325.

HOZAK, R. R., Manji, G. A., et Friesen, P. D. 2000. The BIR motifs mediate dominant interference and oligomerization of inhibitor of apoptosis Op-IAP. Mol Cell Biol, 20(5): 1877-1885.

HUH, N. E., et Weaver, R. F. 1990. Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J Gen Virol, 71(1): 195-201.

IKEDA, M., Yanagimoto, K., et Kobayashi, M. 2004. Identification and functional analysis of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus iap genes. Virology, 321(2):359-371.

IRVINE, K. R., Rao, J. B., Rosenberg, S. A., et Restifo, N. P. 1996. Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases. J Immunol, 156(1): 238-245.

ISHIKAWA, H., Ikeda, M., Yanagimoto, K., Alves, C. A., Katou, Y., Lavina-Caoili, B. A., et Kobayashi, M. 2003. Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB-Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses. J Gen Virol, 84(3): 705-714.

ITAKURA, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., et Boyer, H. W. 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone

somatostatin. Science, 198(4321): 1056-1063.

JABBOUR, A. M., Ekert, P. G., Coulson, E. J., Knight, M. J., Ashley, D. M., et Hawkins, C. J. 2002. The P35 relative, P49, inhibits mammalian and *Drosophila* caspases including DRONC and protects against apoptosis. Cell Death Differ, 9(12): 1311-1320.

JABBOUR, A. M., et Hawkins, C. J. 2004. The P35 Family of Apoptosis Inhibitors. Current Genomics, 5(3): 215-229.

JACQUES, R. P. 1973. Tests on microbial and chemical insecticides for control of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: *Pieridae*) on cabbage. Can. Entomol., 105: 21-27.

JANEWAY, C. A., et Travers, P. 1994. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Current Biology Ltd. London. Pp: 7:31-7:32.

JARVIS, D. L., et Garcia, A., Jr. 1994. Long-term stability of baculoviruses stored under various conditions. Biotechniques, 16(3): 508-513.

JUNG, E., et Williams, K. L. 1997. The production of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. Biotechnol Appl Biochem, 25 ( Pt 1): 3-8.

KARLYSHEV, A. V., Henderson, J., Ketley, J. M., et Wren, B. W. 1999. Procedure for the investigation of bacterial genomes: random shot-gun cloning, sample sequencing and mutagenesis of *Campylobacter jejuni*. Biotechniques, 26(1): 50-52, 54, 56.

KAWAMOTO, F., Kumada, N., & Kobayashi, M. 1977. Envelopment of the nuclear polyhedrosis virus of the oriental tussock moth, *Euproctis subflava*. Virology, 77(2): 867-871.

KELLY, D. C. 1982. Baculovirus replication. J Gen Virol, 63: 1-13.

KIM, J. J., Ayyavoo, V., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M. A., Dang, K., Wang, B., Boyer, J. D., et Weiner, D. B. 1997. *In vivo* engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. J Immunol, 158(2): 816-826.

KIM, J. J., Yang, J. S., VanCott, T. C., Lee, D. J., Manson, K. H., Wyand, M. S., Boyer, J. D., Ugen, K. E., et Weiner, D. B. 2000. Modulation of antigen-specific humoral responses in rhesus macaques by using cytokine cDNAs as DNA vaccine adjuvants. J Virol, 74(7): 3427-3429.

KLINMAN, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., et Krieg, A. M. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(7): 2879-2883.

KLINMAN, D. M., Yamshchikov, G., et Ishigatsubo, Y. 1997. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. J Immunol, 158(8): 3635-3639.

KLINMAN, D. M., Sechler, J. M., Conover, J., Gu, M., et Rosenberg, A. S. 1998. Contribution

of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. J Immunol, 160(5): 2388-2392.

KLINMAN, D. M. 2003. CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert Rev Vaccines, 2(2): 305-315.

KOGAN, P. H., et Blissard, G. W. 1994. A baculovirus gp64 early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements. J Virol, 68(2): 813-822.

KOGAN, P. H., Chen, X., et Blissard, G. W. 1995. Overlapping TATA-dependent and TATA-independent early promoter activities in the baculovirus gp64 envelope fusion protein gene. J Virol, 69(3): 1452-1461.

KOPROWSKI, H., et Weiner, D. B. 1998. DNA vaccination/genetic vaccination. Curr Top Microbiol Immunol, 226: V-XIII.

KOZAK, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res, 15(20): 8125-8148.

KRAPPA, R., Behn-Krapa, A., Jahnel, F., Doerfler, W., et Knebel-Morsdorf, D. 1992. Differential factor binding at the promoter of early baculovirus gene PE38 during viral infection: GATA motif is recognized by an insect protein. J Virol, 66(6): 3494-3503.

KRAUSE, C., et Morin, H. 1995. Impact of spruce budworm defoliation on the number of latewood tracheids in balsam fir and black spruce. Canadian Journal of Forest Research, 25: 2029-2034.

KRAUSE, C. 1997. The use of dendrochronological material from buildings to get information about past spruce budworm outbreaks. Canadian Journal of Forest Research, 27: 69-75.

KRAUSE, C., et Morin, H. 1999. Tree-ring patterns in stems and root systems of black spruce (*Picea mariana*) caused by spruce budworms. Canadian Journal of Forest Research, 29: 1583-1591.

KRIEG, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., et Klinman, D. M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature, 374(6522): 546-549.

KRIEG, A. M., Yi, A. K., Schorr, J., et Davis, H. L. 1998. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. Trends Microbiol, 6(1): 23-27.

KUCEROVA, L. 1998. DNA/genetic vaccination (minireview). Viral Immunol, 11(2): 55-63.

KUSAKABE, K., Xin, K. Q., Katoh, H., Sumino, K., Hagiwara, E., Kawamoto, S., Okuda, K., Miyagi, Y., Aoki, I., Nishioka, K., et Klinman, D. 2000. The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA vaccine. J Immunol, 164(6): 3102-3111.

KUZIO, J., Jaques, R., et Faulkner, P. 1989. Identification of p74, a gene essential for virulence

of baculovirus occlusion bodies. Virology, 173(2): 759-763.

LACOUNT, D. J., et Friesen, P. D. 1997. Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses. J Virol, 71(2): 1530-1537.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680-685.

LAMLA, T., Mammeri, K., et Erdmann, V. A. 2001. The cell-free protein biosynthesis--applications and analysis of the system. Acta Biochim Pol, 48(2): 453-465.

LANGE, M., et Jehle, J. A. 2003. The genome of the *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus. Virology, 317(2): 220-236.

LANIER, L. M., et Volkman, L. E. 1998. Actin binding and nucleation by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. Virology, 243(1): 167-177.

LAUZON, H. A., Lucarotti, C. J., Krell, P. J., Feng, Q., Retnakaran, A., et Arif, B. M. 2004. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome. J Virol, 78(13): 7023-7035.

LE BORGNE, S., Mancini, M., Le Grand, R., Schleef, M., Dormont, D., Tiollais, P., Riviere, Y., et Michel, M. L. 1998. *In vivo* induction of specific cytotoxic T lymphocytes in mice and rhesus macaques immunized with DNA vector encoding an HIV epitope fused with hepatitis B surface antigen. Virology, 240(2): 304-315.

LEITNER, W. W., Seguin, M. C., Ballou, W. R., Seitz, J. P., Schultz, A. M., Sheehy, M. J., et Lyon, J. A. 1997. Immune responses induced by intramuscular or gene gun injection of protective deoxyribonucleic acid vaccines that express the circumsporozoite protein from *Plasmodium berghei* malaria parasites. J Immunol, 159(12): 6112-6119.

LEITNER, W. W., Ying, H., et Restifo, N. P. 1999. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. Vaccine, 18(9-10): 765-777.

LERY, X., Khamiss, O., Nour-el-Din, A., Giannotti, J., et Abol-Ela, S. 1997. Multiplication of *Spodoptera littoralis* granulosis virus in a cell line established from *Phthorimaea operculella*. Acta Virol, 41(3): 169-174.

LERY, X., Giannotti, J., Taha, A., Ravalec, M., et Abol-Ela, S. 1997. Multiplication of a granulosis virus isolated from the potato tuber moth in a new established cell line of *Phthorimaea operculella*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 33(8): 640-646.

LI, B. W., Rush, A., Zhang, S. R., Curtis, K. C., et Weil, G. J. 2004. Antibody responses to *Brugia malayi* antigens induced by DNA vaccination. Filaria J, 3(1): 1.

LIU, Q., Qi, Y., et Chejanovsky, N. 2003. Identification and classification of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus inhibitor of apoptosis gene. Virus Genes, 26(2): 143-149.

LU, A., et Carstens, E. B. 1993. Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 195(2): 710-718.

LU, A., et Miller, L. K. 1997. Regulation of baculovirus late and very late gene expression. Dans L. K. Miller (Ed.), The Baculoviruses. Plenum Press. New York. Pp: 193-216.

LUCKOW, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F., et Olins, P. O. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J Virol, 67(8): 4566-4579.

LUQUE, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D. R., et Winstanley, D. 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. J Gen Virol, 82(10): 2531-2547.

MACGREGOR, R. R., Boyer, J. D., Ugen, K. E., Lacy, K. E., Gluckman, S. J., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M. A., Baine, Y., Higgins, T. J., Ciccarelli, R. B., Coney, L. R., Ginsberg, R. S., et Weiner, D. B. 1998. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. J Infect Dis, 178(1): 92-100.

MACGREGOR, R. R., Boyer, J. D., Ciccarelli, R. B., Ginsberg, R. S., et Weiner, D. B. 2000. Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow-up data. J Infect Dis, 181(1): 406.

MACLEAN, D. A., Erdle, T. A., MacKinnon, W. E., Porter, K. B., Beaton, K. P., Cormier, G., Morehouse, S., et Budd, M. 2001. The Spruce Budworm Decision Support System: forest protection planning to sustain long-term wood supply. Canadian Journal of Forest Research, 31(10): 1742-1757.

MADIN, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., et Endo, Y. 2000. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(2): 559-564.

MAECKER, H. T., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H., et Levy, S. 1997. DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin. Vaccine, 15(15): 1687-1696.

MANJI, G. A., Hozak, R. R., LaCount, D. J., et Friesen, P. D. 1997. Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor P35 to prevent programmed cell death. J Virol, 71(6): 4509-4516.

MANJI, G. A., et Friesen, P. D. 2001. Apoptosis in motion. An apical, P35-insensitive caspase mediates programmed cell death in insect cells. J Biol Chem, 276(20): 16704-16710.

MANS, R. M., et Knebel-Morsdorf, D. 1998. *In vitro* transcription of pe38/polyhedrin hybrid promoters reveals sequences essential for recognition by the baculovirus-induced RNA polymerase and for the strength of very late viral promoters. J Virol, 72(4): 2991-2998.

MATSUI, M., Moriya, O., Belladonna, M. L., Kamiya, S. & Lemonnier, F. A., Yoshimoto, T., et Akatsuka, T. 2004. Adjuvant activities of novel cytokines, interleukin-23 (IL-23) and IL-27, for

induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-A\*0201 transgenic mice. J Virol, 78(17): 9093-9104.

MCGAUGHEY, W. H. 1975. A granulosis virus for Indian meal moth control in stored wheat and corn. J. Econ. Entomol., 68: 346-348.

MCNALLY, E., Sohn, R., Frankel, S., et Leinwand, L. 1991. Expression of myosin and actin in *Escherichia coli*. Methods Enzymol, 196: 368-389.

MERCADO-PIMENTEL, M. E., Jordan, N. C., et Aisemberg, G. O. 2002. Affinity purification of GST fusion proteins for immunohistochemical studies of gene expression. Protein Expr Purif, 26(2): 260-265.

MILLER, L. K. 1996. Insect viruses. Dans B. N. Fields, Knipe, D. M., et Howley, P. M (Ed.), Fundamental Virology. Raven Press. New York. Pp: 401-424.

MILTENBURGER, H. G., Naser, W. L., Harvey, J. P., Huber, J., et Huger, A. M. 1984. The cellular substrate: a very important requirement for baculovirus *in vitro* replication. Z Naturforsch [C], 39(9-10): 993-1002.

MONTGOMERY, D. L., Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., et Liu, M. A. 1997. DNA vaccines. Pharmacol Ther, 74(2): 195-205.

MOORE, A. C., Kong, W. P., Chakrabarti, B. K., et Nabel, G. J. 2002. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. J Virol, 76(1): 243-250.

MOR, G., Singla, M., Steinberg, A. D., Hoffman, S. L., Okuda, K., et Klinman, D. M. 1997. Do DNA vaccines induce autoimmune disease? Hum Gene Ther, 8(3): 293-300.

MOREL, P. A., Falkner, D., Plowey, J., Larregina, A. T., et Faló, L. D. 2004. DNA immunisation: altering the cellular localisation of expressed protein and the immunisation route allows manipulation of the immune response. Vaccine, 22(3-4): 447-456.

MORIN, H., et Laprise, D. 1990. Histoire récente des épidémies de la Tordeuse des bourgeons de l'épinette au nord du Lac Saint-Jean, Québec : une analyse dendrochronologique. Canadian Journal of Forest Research, 20: 1-8.

MORIN, H. 1998. Importance et évolution des épidémies de la tordeuse des bourgeons de l'épinette dans l'est du Canada : l'apport de la dendrochronologie. Géographie physique et Quaternaire, 52(2): 1-8.

MORISHIMA, N., Okano, K., Shibata, T., et Maeda, S. 1998. Homologous P35 proteins of baculoviruses show distinctive anti-apoptotic activities which correlate with the apoptosis-inducing activity of each virus. FEBS Lett, 427(1): 144-148.

MORRIS, T. D., et Miller, L. K. 1994. Mutational analysis of a baculovirus major late promoter. Gene, 140(2): 147-153.

- MOSCADI, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Adv Virus Res, 44: 257-289.
- NICHOLS, W. W., Ledwith, B. J., Manam, S. V., et Troilo, P. J. 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. Ann N Y Acad Sci, 772: 30-39.
- OGBOURNE, S., et Antalis, T. M. 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. Biochem J, 331 ( Pt 1): 1-14.
- PANG, Y., Yu, J., Wang, L., Hu, X., Bao, W., Li, G., Chen, C., Han, H., Hu, S., et Yang, H. 2001. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. Virology, 287(2): 391-404.
- PASSARELLI, A. L., et Miller, L. K. 1994. Identification and transcriptional regulation of the baculovirus *lef-6* gene. J Virol, 68(7): 4458-4467.
- PAYETTE, P. J., Weeratna, R. D., McCluskie, M. J., et Davis, H. L. 2001. Immune-mediated destruction of transfected myocytes following DNA vaccination occurs via multiple mechanisms. Gene Ther, 8(18): 1395-1400.
- PEI, Z., Reske, G., Huang, Q., Hammock, B. D., Qi, Y., et Chejanovsky, N. 2002. Characterization of the apoptosis suppressor protein P49 from the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. J Biol Chem, 277(50): 48677-48684.
- PERTMER, T. M., Eisenbraun, M. D. & McCabe, D., Prayaga, S. K., Fuller, D. H., et Haynes, J. R. 1995. Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. Vaccine, 13(15): 1427-1430.
- PRIKHOD'KO, E. A., et Miller, L. K. 1996. Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1. J Virol, 70(10): 7116-7124.
- PRIKHOD'KO, E. A., et Miller, L. K. 1999. The baculovirus PE38 protein augments apoptosis induced by transactivator IE1. J Virol, 73(8): 6691-6699.
- RAZ, E., Watanabe, A., Baird, S. M., Eisenberg, R. A., Parr, T. B., Lotz, M., Kipps, T. J., et Carson, D. A. 1993. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A, 90(10): 4523-4527.
- RAZ, E., Carson, D. A., Parker, S. E., Parr, T. B., Abai, A. M., Aichinger, G., Gromkowski, S. H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M. A. et al. 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. Proc Natl Acad Sci U S A, 91(20): 9519-9523.
- REED, E. M., et Springett, B. P. 1971. Large-scale field testing of a granulosis virus for the control of the potato moth (*Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep. Gelechiidae)). Bulletin of Entomological Research, 61: 223-233.

- REN, J., Zheng, L., Chen, Q., Li, H., Zhang, L., et Zhu, H. 2004. Co-administration of a DNA vaccine encoding the prostate specific membrane antigen and CpG oligodeoxynucleotides suppresses tumor growth. J Transl Med, 2(1): 29.
- RIEDL, S. J., Renatus, M., Snipas, S. J., et Salvesen, G. S. 2001. Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35. Biochemistry, 40(44): 13274-13280.
- ROBINSON, H. L., Boyle, C. A., Feltquate, D. M., Morin, M. J., Santoro, J. C., et Webster, R. G. 1997. DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin- and nucleoprotein-expressing DNAs. J Infect Dis, 176 Suppl 1: S50-55.
- ROBINSON, H. L. 1999. DNA vaccines: basic mechanism and immune responses (Review). Int J Mol Med, 4(5): 549-555.
- RODRIGUEZ, E. G. 2004. Nonviral DNA vectors for immunization and therapy: design and methods for their obtention. J Mol Med, 82(8): 500-509.
- ROHRMANN, G. F. 1992. Baculovirus structural proteins. J Gen Virol, 73 (4): 749-761.
- ROHRMANN, G. F. 1999. Nuclear polyhedrosis viruses. In R. G. Webster, et Granoff, A. (Ed.), Encyclopedia of virology, 2nd ed. Academic Press ed. Londre, Angleterre.
- ROMANOS, M. A., Scorer, C. A., et Clare, J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. Yeast, 8(6): 423-488.
- ROSENFELD, S. A. 1999. Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. Methods Enzymol, 306: 154-169.
- ROSINSKI, M., Reid, S., et Nielsen, L. K. 2002. Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction. Biotechnol Bioeng, 77(4): 476-480.
- RUSSELL, R. L., et Rohrmann, G. F. 1990. A baculovirus polyhedron envelope protein: immunogold localization in infected cells and mature polyhedra. Virology, 174(1): 177-184.
- SAH, N. K., Taneja, T. K., Pathak, N., Begum, R., Athar, M., et Hasnain, S. E. 1999. The baculovirus antiapoptotic p35 gene also functions via an oxidant-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(9): 4838-4843.
- SATO, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A., et Raz, E. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. Science, 273(5273): 352-354.
- SAWASAKI, T., Ogasawara, T., Morishita, R., et Endo, Y. 2002. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(23): 14652-14657.
- SCHMITT, J., Hess, H., et Stunnenberg, H. G. 1993. Affinity purification of histidine-tagged proteins. Mol Biol Rep, 18(3): 223-230.



SERVICE CANADIEN DES FORÊTS (SCF). 1999. La santé des forêts au Canada : Aperçu 1998. Ressources naturelles Canada. Ottawa. Pp: 60.

SERVICE CANADIEN DES FORÊTS (SCF). 2000. La tordeuse des bourgeons de l'épinette : 100 ans d'expertise au SCF. Ressources naturelles Canada. Québec.

SESHAGIRI, S., et Miller, L. K. 1997. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(25): 13606-13611.

SHUMAN, H. A., et Silhavy, T. J. 2003. The art and design of genetic screens: *Escherichia coli*. Nat Rev Genet, 4(6): 419-431.

SIN, J. I., Kim, J., Pachuk, C., Weiner, D. B., et Patchuk, C. 2000. Interleukin 7 can enhance antigen-specific cytotoxic-T-lymphocyte and/or Th2-type immune responses *in vivo*. Clin Diagn Lab Immunol, 7(5): 751-758.

SLILATY, S. N., et Lebel, S. 1998. Accurate insertional inactivation of lacZ  $\alpha$ : construction of pTrueBlue and M13 TrueBlue cloning vectors. Gene, 213(1-2): 83-91.

SMITH, K. A. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. Science, 240(4856): 1169-1176.

SRIVASTAVA, I. K., et Liu, M. A. 2003. Gene vaccines. Ann Intern Med, 138(7): 550-559.

STIEGE, W., et Erdmann, V. A. 1995. The potentials of the *in vitro* protein biosynthesis system. J Biotechnol, 41(2-3): 81-90.

SUGIMOTO, A., Friesen, P. D., et Rothman, J. H. 1994. Baculovirus P35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a ced-9 mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Embo J, 13(9): 2023-2028.

TANADA, Y., et Hess, R. T. 1991. *Baculoviridae*. Granulosis virus. Dans J. R. Adams et Bonami, J. R. (Ed.), Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press, Boca Raton, FL. Pp: 227-257.

TANG, D. C., DeVit, M., et Johnston, S. A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature, 356(6365): 152-154.

THIEM, S. M., et Chejanovsky, N. 2004. The role of baculovirus apoptotic suppressors in AcMNPV-mediated translation arrest in Ld652Y cells. Virology, 319(2): 292-305.

THOMSON, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 267: 1456-1462.

TOMPKINS, G. J. 1991. Purification of invertebrate viruses. Dans J. R. Adam et Bonami, J. R. (Ed.), Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press, Boca Raton. Pp: 31-40.

TORRES, C. A., Iwasaki, A., Barber, B. H., et Robinson, H. L. 1997. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. J Immunol, 158(10):

4529-4532.

TRINCHIERI, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol, 3(2): 133-146.

TWEETEN, K. A., Bulla, L. A. Jr., Consigli, R. A. 1981. Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses. Microbiol Rev, 45(3): 379-408.

TYMCIU, S., Wijkhuisen, A., Sagot, M. A., Frobert, Y., Grassi, J., Creminon, C., Couraud, J. Y., et Boquet, D. 2002. Use of DNA immunization to produce polyclonal antibodies against the native human neurokinin-1 receptor for substance P. J Neuroimmunol, 128(1-2): 23-30.

ULLMANN, A., Jacob, F., et Monod, J. 1967. Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. J Mol Biol, 24(2): 339-343.

ULMER, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., et Friedman, A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science, 259(5102): 1745-1749.

ULMER, J. B., Deck, R. R., Dewitt, C. M., Donnelly, J. J., et Liu, M. A. 1996. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. Immunology, 89(1): 59-67.

ULMER, J. B., Fu, T. M., Deck, R. R., Friedman, A., Guan, L., DeWitt, C., Liu, X., Wang, S., Liu, M. A., Donnelly, J. J., et Caulfield, M. J. 1998. Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. J Virol, 72(7): 5648-5653.

VAN REGENMORTEL, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., et Wickner, R. B. 2000. Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press ed. San Diego, Californie. Pp: 195-202

VAUX, D. L., et Strasser, A. 1996. The molecular biology of apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(6): 2239-2244.

VOLKMAN, L. E., et Knudson, D. L. 1988. *In vitro* replication of Baculoviruses. Dans M. D. Summers et Smith, G. E (Ed.), A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555. Pp: 109-127.

VOLKMAN, L. E., et Blissard, G. W. 1995. *Baculoviridae*: Taxonomic structure and properties of the family. Dans F. A. Murphy, Fauquet, C. M., Bishop D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P, Mayo M. A., et Summers M. D. (Ed.), Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Wien New York: Archives of virology/ Supplément 10. Pp: 104-113

VUCIC, D., Kaiser, W. J., Harvey, A. J., et Miller, L. K. 1997. Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). Proc Natl Acad Sci U S A,

94(19): 10183-10188.

VUCIC, D., Kaiser, W. J., et Miller, L. K. 1998. Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* proteins HID and GRIM. Mol Cell Biol, 18(6): 3300-3309.

VYAS, G. N. 1986. A brief overview of the new vaccines against hepatitis B virus infection: immunogenic gene products and peptide analogues of antigenic epitopes. Dev Biol Stand, 63: 141-146.

WANG, P., Hammer, D. A., et Granados, R. R. 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. J Gen Virol, 75 ( Pt 8): 1961-1967.

WANG, S. W., Kozlowski, P. A., Schmelz, G., Manson, K., Wyand, M. S., Glickman, R., Montefiori, D., Lifson, J. D., Johnson, R. P., Neutra, M. R., et Aldovini, A. 2000. Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific systemic and mucosal immune responses in primates by vaccination with proviral DNA producing intact but noninfectious virions. J Virol, 74(22): 10514-10522.

WATANABE, A., Raz, E., Kohsaka, H., Tighe, H., Baird, S. M., Kipps, T. J., et Carson, D. A. 1993. Induction of antibodies to a kappa V region by gene immunization. J Immunol, 151(5): 2871-2876.

WATSON, J. D., Gilamn, M., Witkowski, J., et Zoller, M. 1994. ADN recombinant: 2e Édition. DeBoeck Université, Bruxelles.

WHITFORD, M., et Faulkner, P. 1992. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J Virol, 66(8): 4763-4768.

WHITTON, J. L., Rodriguez, F., Zhang, J., et Hassett, D. E. 1999. DNA immunization: mechanistic studies. Vaccine, 17(13-14): 1612-1619.

WILLIAMS, G. T. 1994. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. Trends Microbiol, 2(12): 463-464.

WILLIAMS, G. V., et Faulkner, P. 1997. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. Dans L. K. Miller (Ed.), The Baculoviruses. Plenum Press. New York. Pp: 61-107.

WINSTANLEY, D., et Crook, N. E. 1993. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. J Gen Virol, 74 ( Pt 8): 1599-1609.

WINSTANLEY, D., et O'Reilly, D. R. 1999. Granulovirus. In R. G. Webster, et Granoff, A. (Ed.), Encyclopedia of virology, Academic Press Limited ed. Londre, R.-U. Pp: 140-146.

WOLFF, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., et Felgner, P. L.

1990. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. Science, 247(4949 Pt 1): 1465-1468.
- WOLFF, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., et Jani, A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. Hum Mol Genet, 1(6): 363-369.
- WOLFF, J. A., Dowty, M. E., Jiao, S., Repetto, G., Berg, R. K., Ludtke, J. J., Williams, P., et Slautterback, D. B. 1992. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. J Cell Sci, 103 (4): 1249-1259.
- WONG, D. W. S. 1997. Applications in medicine and related areas. Dans: The ABCs of Gene Cloning. Chapman and Hall. New York, USA.
- WOOD, H. A., et Granados, R. R. 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. Annu Rev Microbiol, 45: 69-87.
- WORMLEATON, S., Kuzio, J., et Winstanley, D. 2003. The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome. Virology, 311(2): 350-365.
- WU, J. G., et Miller, L. K. 1989. Sequence, transcription and translation of a late gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus encoding a 34.8K polypeptide. J Gen Virol, 70 (9): 2449-2459.
- WYLLIE, A. H., Kerr, J. F., et Currie, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. International Review of cytology, 68: 251-306.
- XIANG, Z. Q., Spitalnik, S. L., Cheng, J., Erikson, J., Wojczyk, B., et Ertl, H. C. 1995. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. Virology, 209(2): 569-579.
- XU, G., Cirilli, M., Huang, Y., Rich, R. L., Myszka, D. G., et Wu, H. 2001. Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. Nature, 410(6827): 494-497.
- XUE, D., et Horvitz, H. R. 1995. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus P35 protein. Nature, 377(6546): 248-251.
- YANG, S., et Miller, L. K. 1999. Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. J Virol, 73: 3404-3409.
- ZABAROVSKY, E. R., Kashuba, V. I., Pettersson, B., Petrov, N., Zakharyev, V., Gizatullin, R., Lebedeva, T., Bannikov, V., Pokrovskaya, E. S., Zabarovska, V. I., et al. 1994. Shot-gun sequencing strategy for long-range genome mapping: a pilot study. Genomics, 21(3): 495-500.
- ZHANG, P., Yang, B., Dai, X. J., Pang, Y., Zhong, J., et Su, D. M. 2002. Apoptosis of *Spodoptera litura* cells induced by AcMNPV *ie-1* gene. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 34(6): 707-711.
- ZHANG, P., Yang, K., Dai, X., Pang, Y., et Su, D. 2002. Infection of wild-type *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus induces *in vivo* apoptosis of *Spodoptera litura*

larvae. J Gen Virol, 83(Pt 12): 3003-3011.

ZHOU, Q., Krebs, J. F., Snipas, S. J., Price, A., Alnemri, E. S., Tomaselli, K. J., et Salvesen, G. S. 1998. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein P35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. Biochemistry, 37(30): 10757-10765.

ZOOG, S. J., Bertin, J., et Friesen, P. D. 1999. Caspase inhibition by baculovirus P35 requires interaction between the reactive site loop and the beta-sheet core. J Biol Chem, 274(37): 25995-26002.

ZOOG, S. J., Schiller, J. J., Wetter, J. A., Chejanovsky, N., et Friesen, P. D. 2002. Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 *in vivo*. Embo J, 21(19): 5130-5140.