

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier  
Décembre 2006

**ÉTUDE HISTOPATOLOGIQUE COMPARATIVE DES INFECTIONS PAR DES  
BACULOVIRUS CHEZ DEUX ESPÈCES DE TORDEUSE  
*CHORISTONEURA FUMIFERANA* (CLEMENS)  
ET *CHORISTONEURA OCCIDENTALIS* (FREEMAN)**

Par

Rosa Maria de Moraes

Thèse présentée à l'INRS-Institut Armand-Frappier comme exigence partielle pour  
l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en biologie

Jury d'évaluation

Maximilien Arella, président de jury  
Claude Guertin – directeur de recherche  
Charles Dozois- co-directeur de recherche  
Paul Albert, évaluateur externe  
Éric Bauce, évaluateur externe

©droits réservés Rosa Maria De Moraes, 2006

## ***Remerciements***

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Claude Guertin, pour son soutien scientifique et moral tout au long de mon Doctorat.

J'aimerais remercier aussi Charles Dozois, mon co-directeur de recherche;

À l'INRS pour mon acceptation au programme de Doctorat en Biologie;

À la Fondation CAPES du Brésil, pour l'octroi de ma bourse d'études;

A tous les étudiants et collègues avec qui j'ai eu la chance d'interagir pendant ces années d'études à l'Institut Armand-Frappier.

## Table des matières

Remerciements.....	i
Table des matières.....	ii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations.....	vii
Résumé.....	1
Chapitre 1.....	5
Introduction générale.....	5
Chapitre 2.....	9
Revue bibliographique.....	9
2.1 Espèces de <i>Choristoneura</i> ssp.....	9
2.1.1 <i>Choristoneura fumiferana</i> (Clemens).....	10
2.1.2 <i>Choristoneura occidentalis</i> (Freeman).....	11
2.1.3 Cycle de vie.....	11
2.1.4 Dynamique des populations de <i>Choristoneura fumiferana</i> .....	12
2.1.5 Dynamique des populations de <i>Choristoneura occidentalis</i> .....	13
2.2 Entomopathogènes.....	14
2.2.1.1 Cycle d'infection des baculovirus.....	15
2.2.1.2 Synthèse protéique chez les baculovirus.....	16
2.2.1.3 Protéines majeures des baculovirus.....	17
2.2.1.4 Spectre d'hôte.....	18
2.2.1.5 Baculovirus comme outil de lutte biologique.....	19
2.3 Histopathologie des baculovirus.....	22
2.3.1 Histopathologie des nucléopolyédrovirus.....	23
2.3.2 Histopathologie des Granulovirus.....	27
2.4 Tissus des lépidoptères ciblés par des baculovirus.....	28
2.4.1 Corps gras.....	28
2.4.2 Tube alimentaire.....	29
2.4.3 Tégument.....	31
2.4.4 Système respiratoire.....	31
2.5 Transmissions horizontale et verticale.....	32
2.5.1 Système reproductif des femelles.....	36
2.6 Hypothèse et objectifs.....	38
Chapitre 3.....	40
Matériel et Méthodes.....	40
3.1 Insectes.....	40
3.2 Production des baculovirus et purification de l'ADN génomique.....	40
3.2.1 Production et purification des baculovirus.....	40
3.2.2 Analyse par microscopie électronique.....	42
3.2.3 Extraction et purification de l'ADN des baculovirus.....	43
3.2.3.1 Isolation des nucléocapsides enveloppées des baculovirus.....	43
3.2.3.2 Extraction et purification de l'ADN viral.....	43

3.3	Évaluation de l'efficacité des baculovirus.....	45
3.4	Histopathologie.....	47
3.4.1	Préparation des coupes .....	48
3.4.2	Coloration d'Azan.....	48
3.5	Détection des baculovirus par hybridation <i>in situ</i> et immunohistochimie .....	49
3.5.1	Production des sondes marquées à la digoxigénine .....	50
3.5.2	Hybridation <i>in situ</i> .....	52
3.5.3	Immunohistochimie .....	54
3.6	Protocole suivi pour la démonstration de la transmission verticale .....	55
3.6.1	Infections sous-létales .....	55
3.6.2	Détection par PCR de l'ADN viral du ChfuGV.....	56
3.6.2.1	Hybridation <i>in situ</i> des ovaires infectés.....	57
3.6.2.2	Coloration Azan des ovaires infectés et des larves F1 .....	58
Chapitre 4.....		59
Résultats.....		59
4.1	Épreuves biologiques.....	59
4.2	Étude histopathologique .....	63
4.2.1	Anatomie interne des larves de <i>C. fumiferana</i> au 4 <sup>e</sup> stade .....	63
4.2.2	Infection par le granulovirus .....	63
4.2.2.1	Infection des larves de <i>C. fumiferana</i> par le ChfuGV .....	63
4.2.2.2	Infection des larves de <i>C. occidentalis</i> par le ChfuGV .....	72
4.2.3	Infection par le nucléopolyédrovirus.....	79
4.2.3.1	Infection des larves de <i>C. fumiferana</i> par le CfMNPV .....	79
4.2.3.2	Infection des larves de <i>C. occidentalis</i> par le CfMNPV .....	82
4.2.4	Confirmation de la présence du granulovirus par hybridation <i>in situ</i> et immunohistochimie .....	87
4.2.4.1	Hybridation <i>in situ</i> .....	87
4.2.4.2	Hybridation <i>in situ</i> chez CfMNPV .....	99
4.3	Transmission verticale.....	106
4.3.1	Obtention des insectes adultes de <i>C. fumiferana</i> infectées sous-létalement ..	106
Chapitre 5.....		122
Discussion .....		122
Chapitre 6.....		128
Conclusion .....		128
Chapitre 7.....		131
Bibliographie.....		131

## Liste des figures

Figure 1. Anatomie interne d'une larve saine de <i>C. fumiferana</i> au 4 <sup>ème</sup> stade en coupe transversale colorée par Azan. Montage des micrographies prises en photomicroscopie (Nikon E-800, 100X).....	64
Figure 2. Étude histopathologique des larves de <i>C. fumiferana</i> soumises au ChfuGV à une concentration de 10 <sup>5</sup> granules/larve. Altérations de l'organisation des tissus larvaires en fonction du temps d'infection. Les photographies de la colonne de gauche correspondent à des larves saines, tandis que celles de la colonne droite correspondent à des larves infectées par le ChfuGV .....	67
Figure 3. Détail des altérations morphologiques au niveau de l'intestin moyen chez les larves de <i>C. fumiferana</i> infectées par le ChfuGV .....	70
Figure 4. Étude histopathologique de l'infection du ChfuGV en larves de <i>C. occidentalis</i> soumises à une concentration de 10 <sup>5</sup> granules/larve.....	73
Figure 5. Comparaison des altérations morphologiques suite à l'infection du ChfuGV en différents tissus chez les larves de <i>C. fumiferana</i> et <i>C. occidentalis</i> au 7 <sup>ème</sup> jour.....	76
Figure 6. Histopathologie des principaux tissus des larves de <i>C. fumiferana</i> infectées après 72h et au 7 <sup>ème</sup> Jour (168h) par le CfMNPV .....	80
Figure 7. Détail de l'intestin moyen d'une larve de <i>C. fumiferana</i> infectée par le CfMNPV et par le ChfuGV au 7 <sup>ème</sup> jour d'infection .....	83
Figure 8. Histopathologie de des principaux tissus des larves de <i>C. occidentalis</i> infectées au 7 <sup>ème</sup> Jour (168h) par le CfMNPV .....	85
Figure 9. Gel d'agarose coloré avec bromure d'éthidium, réalisé avec l'ADN total extrait du ChfuGV et du CfMNPV .....	88
Figure 10. Gel d'agarose coloré avec bromure d'éthidium réalisé avec les produits du PCR d'amplification de la sonde du gène de la granuline marquée à la digoxigénine .....	90
Figure 11. Gel d'agarose coloré avec bromure d'éthidium, réalisé avec les produits du PCR d'amplification de la sonde du gène p10 marquée à la digoxigénine.....	92

Figure 12. Hybridation <i>in situ</i> réalisée avec la sonde complémentaire au gène de la P10 et de la granuline marquée par la molécule digoxigénine chez les larves infectées par ChfuGV ( <i>C. fumiferana</i> ) .....	95
Figure 13. Hybridation <i>in situ</i> réalisée avec la sonde complémentaire au gène de la granuline et de la protéine P10 marquée par la molécule digoxigénine en larves infectées par le ChfuGV ( <i>C. occidentalis</i> ).....	97
Figure 14. Réaction positive à l'immunopéroxydase accouplée à des anticorps anti-granuline au niveau du corps gras et épiderme chez les larves de <i>C. fumiferana</i> (à gauche) et <i>C. occidentalis</i> (à droite).....	100
Figure 15. Détection indirecte du CfMNPV chez les larves infectées par le CfMNPV en utilisant la sonde du gène de la granuline de ChfuGV .....	102
Figure 16. Hybridation <i>in situ</i> réalisée avec une sonde complémentaire au gène de la P10 marquée à la digoxigénine chez les larves infectées par le CfMNPV .....	104
Figure 17. Gonades de larves au 4 <sup>ème</sup> stade de <i>C. fumiferana</i> infectés par ChfuGV .....	107
Figure 18. Dissection des femelles de <i>C. fumiferana</i> .....	110
Figure 19. Détection du granulovirus par la technique de PCR chez des insectes infectés avec un dosage sous-létale en utilisant les amorces codants pour le gène p10.....	113
Figure 20. Réaction d'hybridation <i>in situ</i> avec une sonde du gène de la granuline marquée à la digoxigénine et révélée par la fluorescéine au niveau de l'ovaire d'une femelle de <i>C. fumiferana</i> survivante à une infection sous-létale du ChfuGV.....	115
Figure 21. Développement des ovarioles des femelles de <i>C. fumiferana</i> saines et infectées par une dose sous-létale de ChfuGV .....	117
Figure 22. Observation de la présence des particules virales dans les tissus d'une larve F1 provenant de l'accouplement des adultes de <i>C. fumiferana</i> survivantes à l'infection sous-létale du ChfuGV dans les corps gras et l'épiderme .....	120

## Liste des abréviations

AcMNPV :	nucléopolyédrovirus d' <i>Autographa californica</i>
ADN :	acide désoxyribonucléique
AgMNPV :	nucléopolyédrovirus d' <i>Anticarsia gemmatalis</i>
BCIP :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BSA :	albumine de sérum bovin
CfMNPV :	nucléopolyédrovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
ChfuGV :	granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
ChocGV :	granulovirus de <i>Choristoneura occidentalis</i>
c.i :	corps d'inclusion
cm :	centimètre
CpGV :	granulovirus de <i>Cydia pomonella</i>
DL10 :	dose qui est létale pour 10% des insectes
DL20 :	dose qui est létale pour 20% des insectes
DL50 :	dose qui est létale pour 50% des insectes
DL90 :	dose qui est létale pour 90% des insectes
EpapGV	granulovirus d' <i>Epinotia aporema</i>
FW :	amorces sens 5' 3'
g :	force gravitationnelle
GV :	granulovirus
h :	heure
LdNPV	nucléopolyédrovirus de <i>Lymantria dispar</i>
J :	jour
Kb :	kilo paires de bases
Min :	minute
ml :	millilitre
mM :	milli-molaire
MNPV :	multinucléopolyédrovirus
Mm <sup>3</sup> :	millions de mètres cubiques
NBT :	nitro- blue tetrazolium salt
dNTP :	nucléotides marqués à la digoxigénine
NTP :	nucléotides
PCR :	réaction de la polymérase en chaîne
PiGV :	granulovirus de <i>Plodia interpunctella</i>
p-moles :	pico-moles
p.i :	post-infection
PTA :	acide phosphotungstique
p/v :	poids/volume
P10 :	protéine P10
p10 :	gène de la protéine P10
°C :	degré Celsius
ng :	nanogramme

RII : amorce anti-sens 5' 3'  
μl : microlitre  
μg : microgramme  
TAE : tampon tris -acetate EDTA  
TMS : temps moyen de survie  
v/v : volume/volume  
μM : micro-Molaire



## ***Résumé***

Les espèces du genre *Choristoneura* font partie de l'ordre des lépidoptères et de la famille des Tortricidés. Ils sont les plus importants insectes ravageurs de conifères d'Amérique du Nord. Durant les 25 dernières années, plusieurs efforts furent déployés afin de développer et de mettre en place des stratégies de lutte permettant de contrer les pertes économiques associées aux épidémies périodiques de ces insectes. Depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle, l'application d'insecticides chimiques était la principale stratégie utilisée pour réduire les dommages. Actuellement, de nouvelles avenues de lutte sont en usage, notamment celle à base de *Bacillus thuringiensis*. Afin de diversifier les modes de lutte, de nombreuses recherches sont menées afin d'identifier d'autres organismes entomopathogènes capables de réduire l'impact des populations d'insectes ravageurs. Dans ce contexte, l'emploi de certains hyphomycètes entomopathogènes et de certains virus, notamment ceux de la famille des *Baculoviridae*, est envisagé.

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana*, et la tordeuse occidentale de l'épinette, *Choristoneura occidentalis*, sont deux importantes espèces d'insectes ravageurs, qui affectent la production de la biomasse des forêts de conifères du Canada. Ces insectes sont naturellement susceptibles aux infections baculovirales causées par certains nucléopolyédrovirus et granulovirus. Chez les insectes, il existe des différences notables dans le développement et la sévérité des maladies associées aux infections par ces virus. Il est généralement admis que les nucléopolyédrovirus sont plus efficaces pour réduire les populations d'insectes que les granulovirus. Des études ont démontré que, durant la première phase de l'infection, les granulovirus passent plus de

temps dans les cellules de l'intestin moyen avant de se rendre aux autres tissus larvaires augmentant du même coup le temps d'infection.

Plusieurs études indiquent de grandes variations dans l'efficacité des baculovirus à contrôler les populations de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis*. Des résultats prometteurs ont été obtenus en laboratoire et au terrain suite à l'application d'un granulovirus contre les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Par contre, l'utilisation du granulovirus contre les larves de la tordeuse occidentale de l'épinette ne donne pas les résultats attendus. Dans ce cas, l'emploi des nucléopolyédrovirus semble plus prometteur. Dans ce sens, une meilleure connaissance histologique touchant les infections baculovirales chez les tordeuses est importante afin d'établir, de comprendre et de comparer l'évolution de la pathologie liée au tropisme cellulaire des infections chez *C. fumiferana* et *C. occidentalis*. L'étude histologique de la pathologie des infections par les granulovirus et les nucléopolyédrovirus chez ces deux espèces de tordeuses devrait permettre de mieux comprendre les relations hôtes-virus et, éventuellement, d'intégrer ces connaissances dans l'élaboration de meilleures stratégies de lutte biologique.

L'hypothèse proposée dans ce projet est que la susceptibilité de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis* au granulovirus et au nucléopolyédrovirus est due à des variations au niveau de la cinétique de l'infection et des voies de prolifération des virus chez chaque espèce d'insecte. Afin de vérifier cette hypothèse, différents groupes de larves des deux espèces ont été infectés avec le ChfuGV (granulovirus de *C. fumiferana*) ou le CfMNPV (multiple nucléopolyédrovirus de *C. fumiferana*). La cinétique de l'infection, des épreuves biologiques ont été réalisées. Finalement, des coupes histologiques des larves infectées par les deux virus ont été effectuées, analysées et comparées afin de suivre

l'évolution de la pathologie virale et d'identifier les différences pouvant exister au niveau de l'infection des tissus larvaires des deux espèces d'insectes.

Les résultats des épreuves biologiques indiquent que les larves de *C. fumiferana* sont plus susceptibles au ChfuGV que les larves de *C. occidentalis*. En effet, la dose létale du granulovirus qui provoque 50% de mortalité dans la population larvaire est significativement plus faible chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette que chez la tordeuse occidentale de l'épinette. De plus, le temps requis pour observer une mortalité de 50% des larves pour une dose spécifique est significativement plus court chez *C. fumiferana* que chez *C. occidentalis*. Par contre, aucune différence significative n'est observée au niveau de la dose létale et le temps moyen de survie causant une mortalité chez les larves des deux espèces d'insectes soumises au CfMNPV. Ces résultats appuient les observations antérieures suggérant une plus grande spécificité des granulovirus.

Pour chaque espèce d'insectes, des études histologiques de la pathologie associée aux ChfuGV et au CfMNPV furent réalisées en observant des sections de tissus larvaires traités par la coloration d'Azan. De plus, la présence des virus a été détectée par hybridation « *in situ* » ou par l'immunohistochimie des deux protéines baculovirales (granuline et protéine P10). Les observations histologiques ont démontré une altération morphologique importante au niveau de l'intestin moyen chez les larves de *C. fumiferana* infectées par le ChfuGV. Ces altérations n'ont pas été observées chez les larves de *C. occidentalis* soumises au même virus. Cette variation pourrait expliquer en partie les observations faites au niveau de la pathogénicité du ChfuGV chez *C. fumiferana* et semble découler d'une spécificité plus grande entre le granulovirus et les larves de cette espèce. Les observations histologiques montrent que le ChfuGV a un tropisme tissulaire

élargi puisque, dans le cas des deux espèces, il affecte plusieurs tissus, notamment les corps gras, la matrice trachéale et la cuticule. Au niveau de l'infection par le CfMNPV, aucune variation n'a été trouvée au niveau des tissus infectés des deux espèces. Les résultats montrent un polytropisme tissulaire du virus qui affecte l'intestin moyen, la matrice trachéale, les corps gras, les muscles et l'épiderme.

Un deuxième volet de ce projet a été ajouté suite à l'observation des tissus de larves infectées avec le ChfuGV. En effet, la présence de particules virales a été remarquée et détectée dans les gonades des larves de *C. fumiferana*, infectées sept jours auparavant. À partir de ces observations, une expérience a été réalisée afin d'étudier la possibilité d'une transmission verticale du ChfuGV chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Pour la première fois, les résultats montrent que chez des larves survivantes à l'infection par le ChfuGV, on retrouve des particules virales au niveau des femelles et des larves de la progéniture. Enfin, des particules virales ont été détectées chez les œufs, mais non chez les chrysalides.

## ***Chapitre 1***

### ***Introduction générale***

La protection des forêts contre les insectes englobe l'ensemble des mesures visant à réduire l'impact de ces ravageurs sur les activités humaines. Depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle, le contexte industriel et le développement technologique ont influencé les besoins en protections et les outils de lutte permettant l'atteinte de cet objectif. Ainsi, les progrès dans le domaine de l'aviation, des techniques de pulvérisation et de la chimie permettaient l'application d'insecticides sur de vastes territoires. À partir des années 1980, la population s'intéresse de plus en plus à la gestion des forêts. Les inquiétudes exprimées relativement à l'application d'insecticides chimiques et les préoccupations grandissantes du public relativement aux questions environnementales ont largement contribué au développement d'approches intégrées en matière de protection des forêts contre les insectes forestiers (Comtois 1988).

Cependant, il arrive que des populations d'insectes atteignent un seuil épidémique qui nécessite de recourir à l'application d'insecticides afin de limiter les dommages. C'est dans ce contexte que des efforts soutenus sont déployés afin de développer des approches basées sur l'emploi d'agents biologiques ayant des impacts réduits sur l'environnement. Parmi les insectes ravageurs de forêts en Amérique du Nord, les lépidoptères du genre *Choristoneura* sont parmi les plus importants (Fellin et Dewey, 1982). Deux espèces causent d'importants dommages aux forêts de conifères du Canada, soit la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens) et la tordeuse occidentale de l'épinette, *Choristoneura occidentalis* Freeman. Dans le premier cas, l'insecte se

retrouve dans l'est du Canada, tandis que l'autre a une aire de distribution se situant à l'ouest des montagnes Rocheuses. *C. fumiferana* et *C. occidentalis* sont des espèces étroitement liées (Fellin et Dewey, 1982). Leurs populations se caractérisent par des épidémies récurrentes auxquelles sont associées de sévères défoliations qui provoquent de considérables dommages et qui peuvent entraîner la mort des arbres (MacLean, 1985).

Différentes stratégies de lutte peuvent être utilisées pour limiter l'impact des insectes ravageurs. Parmi celles-ci, l'utilisation des micro-organismes comme agents de contrôle des populations d'insectes est très prometteuse. Les micro-organismes entomopathogènes regroupent les virus, les bactéries, les protozoaires et les champignons. La bactérie, *Bacillus thuringiensis*, est le premier agent biologique produit commercialement et homologué pour lutter contre les tordeuses (Van Frankenhuyzen *et al.*, 2000). Depuis plusieurs années, des travaux de recherche sont aussi réalisés afin de documenter l'efficacité des baculovirus à lutter contre les populations de tordeuses. Les virus sont des agents de lutte biologique très fascinants compte tenu de leur grande spécificité. Chez *C. fumiferana* et *C. occidentalis*, deux baculovirus sont particulièrement considérés, soit le nucléopolyédrovirus (CfMNPV) et le granulovirus (ChfuGV) de *C. fumiferana* (Moscardi, 1999).

La connaissance des agents régulateurs microbiens est un élément essentiel à leur intégration dans les régies de lutte intégré. Entre 1970 et 1980, de nombreux essais de terrain avec des baculovirus contre les populations de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis* ont été réalisés (Cunningham, 1985). Cependant, les résultats obtenus étaient peu concluants. Le développement des infections latentes et la présence simultanée de contaminants viraux opportunistes, notamment des Entomopoxvirus et des Cypovirus

ont largement contribué à ces échecs. En 1982, en Ontario, les traitements avec des préparations insecticides à base de ChfuGV ont entraîné une diminution de 34 % de la population larvaire de *C. fumiferana* (Otvos *et al.*, 1989). D'autres études ont démontré que le ChfuGV causait un taux plus élevé d'infection chez les larves de *C. occidentalis* que le CfMNPV (Cunningham *et al.*, 1983a). Par contre, le temps de réponse, caractérisé par la mort des insectes, à l'infection des larves de *C. fumiferana* par le CfMNPV était plus rapide que dans le cas du ChfuGV (Otvos *et al.*, 1989). Le CfMNPV a été évalué pour trois fois en parcelles infestées par *C. occidentalis* et les résultats indiquent que le CfMNPV ne donnait pas une protection effective à long terme (Shepherd and Cunningham, 1984). Comme l'indiquait Ryan (1983), l'efficacité des moyens biologiques de lutte ne peut être assurée et constante, puisqu'ils peuvent être influencés par de nombreux facteurs. Otvos *et al.* (1989) postulent qu'un des facteurs possibles pour justifier la basse virulence des virus chez les tordeuses soit relié à leur écologie et comportement, ce qui les rend réfractaires à des épidémies virales.

Une connaissance des agents régulateurs sélectionnés pour la lutte biologique est la prémisses à l'élaboration de stratégies efficaces. C'est dans ce contexte que la présente étude se situe. Elle vise la comparaison du titre insecticide et des pathologies associées aux infections par le ChfuGV et le CfMNPV chez les populations de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis* afin de fournir des informations susceptibles de mieux comprendre les interactions entre les virus et leurs hôtes. Les observations obtenues devraient fournir des pistes à la compréhension des échecs et des réussites antécédents et fournir des éléments qui pourront être considérés lors de l'élaboration des stratégies d'intervention basées sur l'emploi des baculovirus.

L'objectif principal de cette étude était celui de comparer en conditions contrôlées, la voie d'infection du ChfuGV et du CfMNPV, chez les deux espèces de tordeuses, *C. fumiferana* et *C. occidentalis*. Pour ce faire, dans un premier temps, des essais biologiques ont été réalisés afin d'établir la cinétique de l'infection chez des larves infectées avec chacun de ces virus. Les doses létales et les temps moyen de survie sont les paramètres qui ont été considérés afin de déterminer la virulence des virus. Par la suite, une étude histopathologique chez les insectes infectés a été réalisée afin de comparer les altérations histologiques des tissus larvaires des deux espèces de tordeuses soumises aux baculovirus.

Il est généralement admis que les baculovirus ont la capacité de se transmettre d'une génération à l'autre. Par contre, cette transmission verticale transovarienne est difficile à démontrer. Suite aux observations faites lors de l'étude histopathologique, une étude a été réalisée afin de documenter ce phénomène chez *C. fumiferana* infecté par le ChfuGV. Suite à des infections virales sous-létales de larves de l'insecte, des adultes survivants furent accouplés entre eux et différents stades de développements des insectes (larves, chrysalides, adultes) et de leur progéniture furent échantillonnés et analysés pour l'observation de la présence du virus. Pour la première fois, les résultats supportent l'hypothèse d'une transmission verticale transovarienne du ChfuGV chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette.



## **Chapitre 2**

### **Revue bibliographique**

Au Canada, les forêts de conifères constituent un habitat pour plusieurs insectes ravageurs. Parmi ceux-ci, on retrouve les espèces de l'ordre *Lepidoptera*, de la famille *Tortricidae* et du genre *Choristoneura*.

#### **2.1 Espèces de *Choristoneura***

En Amérique du Nord, le genre *Choristoneura* (Lepidoptera : Tortricidae) regroupe dix espèces et cinq sous-espèces de tordeuses qui se nourrissent sur le feuillage et les bourgeons de conifères. Ces espèces sont : la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens); la tordeuse occidentale de l'épinette, *C. occidentalis* (Freeman); la tordeuse du pin gris, *C. pinus* Freeman; la tordeuse bisannuelle de l'épinette, *C. biennae* (Freeman); ainsi que les espèces *C. orae* Freeman, *C. retiniana* (Walsingham), *C. carnana* Barnes & Busck et *C. lambertiana* (Busck). Ces espèces sont phylogénétiquement reliées et se caractérisent par des épidémies récurrentes qui sont plus ou moins importantes (Harvey, 1985).

Les espèces du genre *Choristoneura* sont aussi fortement polymorphiques et elles se distinguent par des caractéristiques écologiques telles que la spécificité hôte-plante et l'univoltinisme larvaire (Castrovillo, 1982; Harvey, 1985; Dang, 1992). En effet, chaque espèce s'alimente sur deux ou plusieurs plantes hôtes. Cependant, elles forment deux groupes, selon leur préférence alimentaire. Ainsi, on retrouve les espèces *Abietoideae* qui s'alimentent principalement de sapins et d'épinettes, notamment la tordeuse des bourgeons de l'épinette et la tordeuse occidentale de l'épinette, et les espèces *Pinoideae*

qui se nourrissent sur les pins. Les espèces peuvent également être divisées en deux groupes selon leur aire de distribution géographique. Ainsi, on retrouve les espèces des forêts de l'est et du centre du continent parmi lesquelles on retrouve *C. fumiferana* et *C. pinus*, et celles des forêts des régions des cordillères occidentales (Stehr, 1967). Il existe aussi une différence importante entre les espèces au niveau de leur développement, puisque certaines, comme la tordeuse des bourgeons de l'épinette, ont une diapause obligatoire et d'autres, comme la tordeuse occidentale de l'épinette, se caractérisent par une diapause facultative (Lyon *et al.*, 1972).

Cependant, deux espèces, *C. fumiferana* et *C. occidentalis*, ont une importance économique majeure. En effet, lors des épidémies périodiques et récurrentes, ces espèces provoquent des défoliations importantes qui affectent la production de la biomasse et qui peuvent provoquer la mort d'arbres sur de vastes territoires (MacLean, 1985).

### **2.1.1 *Choristoneura fumiferana* (Clemens)**

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *C. fumiferana*, est le plus important ravageur des peuplements de conifères d'Amérique du Nord. Dans le nord-est du continent, l'aire de distribution de ce ravageur est délimitée par le Labrador à l'est, l'état de la Virginie au sud, la rivière Mackenzie à l'ouest et le Yukon au nord (Stehr, 1967; Harvey, 1985; BNDF, 1997). Dans l'est du Canada, elle se retrouve largement associée à la forêt boréale, les forêts de conifères de la vallée du Saint-Laurent et dans les forêts acadiennes (Rowe, 1972). Au Québec, *C. fumiferana* est répandue dans toute l'aire de distribution des plantes hôtes, soit le sapin baumier, *Abies balsamea* (L.) Mill., son hôte préférentiel, l'épinette blanche, *Picea glauca* (Moench) Voss, l'épinette noire, *P. mariana* (Mill.) B.S.P. et l'épinette rouge, *P. rubens* Sarg. Elle peut aussi s'attaquer à d'autres

essences résineuses comme la pruche, *Tsuga canadensis* (L.) Carr., le mélèze, *Larix laricina* (DuRoi) K. Koch et le pin blanc, *Pinus strobus* L. (Mattson *et al.*, 1988).

### 2.1.2 *Choristoneura occidentalis* (Freeman)

La tordeuse occidentale de l'épinette, *C. occidentalis*, est le défoliateur le plus destructeur de la Colombie-Britannique. Comme son nom l'indique, l'aire de distribution se limite à la partie occidentale du continent. Cet insecte est largement associé à l'aire de distribution du sapin de Douglas, *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel), son hôte préférentiel. Au sud, on retrouve l'insecte dans les états de la Californie et du Nouveau-Mexique et au nord principalement dans la vallée de la rivière Fraser en Colombie-Britannique. En plus du sapin de Douglas, les larves de *C. occidentalis* s'attaquent à plusieurs autres espèces, dont le sapin gracieux, *Abies amabilis* (Dougl.) Forb., le sapin grandissime, *Abies grandis* Lindl., le sapin alpin, *Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt., le mélèze de l'Ouest, *L. occidentalis* Nutt., l'épinette d'Engelmann, *P. engelmannii* Parry ex Engelm et l'épinette blanche (Brookes *et al.*, 1987).

### 2.1.3 Cycle de vie

En se référant à plusieurs auteurs (Brookes *et al.* 1987; Martineau, 1985; Mattson *et al.*, 1988; Rose et Lindquist, 1994; et Sanders *et al.*, 1985), on remarque que les cycles de vie de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis* sont très semblables. Au printemps, à la fin du mois d'avril et au début du mois de mai, les larves du deuxième stade émergent de leur hibernaculum (abri fait de fils de soie), où elles ont passé l'hiver, et commencent à s'alimenter, soit en minant les vieilles aiguilles ou en s'attaquant aux fleurs mâles pleines de pollens dans l'attente du développement des nouveaux bourgeons. Au fil du

débourrement des bourgeons en mai, elles ravagent les nouvelles aiguilles en croissance. Autour de leur site d'alimentation, les larves en développement tissent un abri fait de fils de soie retenant ensemble les nouvelles aiguilles. Les larves matures se transforment en chrysalides dans cet abri de la fin du mois de juin à la mi-juillet. Dans le cas de *C. fumiferana*, six différents stades larvaires sont nécessaires avant la transformation en chrysalide, tandis que *C. occidentalis* nécessite seulement cinq stades. Après 12 à 18 jours, les adultes émergent des chrysalides. L'accouplement se produit dans les dix jours suivant l'émergence des adultes. Après l'accouplement, les femelles pondent environ 150 œufs adossés sur le dessous des aiguilles. Les œufs éclosent en l'espace de 12 jours. Après l'éclosion des œufs, les larves du premier stade se déplacent afin de rechercher un site propice à l'hivernation. Quand elles trouvent un endroit approprié, elles muent au deuxième stade, tissent leur hibernaculum et entrent en diapause hivernale.

#### **2.1.4 Dynamique des populations de *C. fumiferana***

Les insectes du genre *Choristoneura* constituent un groupe remarquablement adapté à l'environnement de la forêt boréale. Les épidémies qui caractérisent *C. fumiferana* sont plus fréquentes depuis le début du XX siècle (MacLean, 1985). Avant, les épidémies étaient limitées à des régions spécifiques. Aujourd'hui, elles sont plus étendues et leur fréquence a considérablement augmenté. L'augmentation des fréquences et des aires affectées par les épidémies est attribuée aux changements provoqués par l'interférence humaine sur l'écosystème forestier (Blais, 1985). Les conditions pour le déclenchement d'une épidémie semblent être la présence de grandes quantités de plantes hôtes matures et de fleurs staminées. Certains printemps, le climat chaud et la baisse de

l'humidité de l'air pousseraient la production de fleurs ce qui favoriserait le déclenchement des épidémies (Mattson *et al.*, 1988; Blais, 1985).

Au Québec, les épidémies de la tordeuse des bourgeons de l'épinette ont eu lieu dans les années 1909, 1938 et 1967 et elles ont affecté, respectivement, 30, 26 et 35 millions d'hectares de forêts de sapins baumiers. La dernière épidémie, qui a eu lieu en 1992, a touché près de 12,9 millions d'hectares de forêts commerciales. Dans ce dernier cas, les estimations des pertes se chiffraient entre 139 Mm<sup>3</sup> et 238 Mm<sup>3</sup> de bois perdus (Rhodes, 1996).

#### **2.1.5 Dynamique des populations de *C. occidentalis***

Parmi les espèces qui s'alimentent principalement du sapin Douglas, *C. occidentalis* est l'espèce la plus répandue et la plus dévastatrice. Les épidémies de la tordeuse occidentale de l'épinette se produisent dans de vastes régions de forêt de conifères de l'Amérique du Nord occidentale. La dynamique des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette est déterminée par des facteurs abiotiques tels que la température, l'humidité et les vents; et également des facteurs biotiques qui comprennent des oiseaux prédateurs, d'autres insectes, des parasitoïdes et des entomopathogènes, comme les champignons, bactéries et virus (McLean, 1985).

Les défoliations massives et répétées ont comme conséquence une réduction des anneaux de croissance radiale, une perte dans la production de graines et des dommages au dessous de l'arbre jusqu'à la mort des arbres affectés (Fellin, 1980). Depuis 1909, six épidémies de *C. occidentalis* furent enregistrées en Colombie-Britannique (Harris *et al.*, 1985). Au cours de la dernière épidémie, qui a commencé en 1967, l'infestation a graduellement augmenté pour atteindre 81 000 ha en 1980. En 1987, plus de 834 000 ha

de sapins Douglas ont subi des défoliations dans cette province, dont 22 000 ha étaient considérés comme sévères (Wood *et al.*, 1987).

## **2.2 Entomopathogènes**

Dans le milieu forestier, les ennemis naturels des insectes sont responsables en grande partie de la régulation des populations. Ces ennemis sont les prédateurs (insectes, mammifères et oiseaux), les parasitoïdes et des agents pathogènes. Dans ce dernier cas, les agents entomopathogènes peuvent être des bactéries, des virus, des champignons ou des protozoaires. Les bactéries et les virus sont considérés comme des agents très intéressants pour la lutte biologique. L'utilisation de la bactérie *B. thuringiensis* a, au cours des dernières années, connu un essor considérable, notamment par l'introduction de formulations plus puissantes pouvant être appliquées à moindre volume (Van Frankenhuyzen *et al.*, 2000). Cependant, cette bactérie ne prolifère pas de façon naturelle en milieu forestier. Il faut donc répéter les interventions jusqu'à ce que les populations déclinent sous le seuil de nuisance. Dans ce contexte, le développement d'outil de lutte basé sur l'utilisation de micro-organismes régulateurs naturels des populations d'insectes ravageurs peut être intéressant. Parmi ceux-ci, les virus, notamment les baculovirus, se multiplient dans l'environnement avant de se propager dans les populations saines d'insectes en causant des épizooties.

### **2.2.1 Baculovirus**

Les *Baculoviridae* regroupent les virus du genre nucléopolyédrovirus et granulovirus (Miller, 1996). Ces virus sont caractérisés par la présence d'un ADN double brin circulaire ayant une masse moléculaire se situant entre 100 et 180 paires de kilobases. Dans l'environnement, les baculovirus se présentent enveloppés par une

matrice protéique, appelée corps d'inclusion (CI) qui a comme rôle de protéger le virus des dommages causés par les rayons ultra-violets (Federici, 1997). La matrice protéique est formée par une structure paracristalline qui contient un ou plusieurs virions. Cette matrice forme le corps d'inclusion qui est constitué principalement d'une protéine appelée granuline chez les granulovirus et polyédrique chez le nucléopolyédrovirus. Chez les granulovirus, le corps d'inclusion enferme généralement un virion simple avec une nucléocapside enveloppée. Pour leur part, les nucléopolyédrovirus se différencient par la présence de plusieurs virions avec une nucléocapside enveloppée simple (*Simple Nucleopolyhedrovirus* - SNPV) ou plusieurs virions avec plusieurs nucléocapsides enveloppées (*Multiple Nucleopolyhedrovirus* - MNPV).

#### 2.2.1.1 Cycle d'infection des baculovirus

L'infection des baculovirus se divise en deux phases. Dans un premier temps, les virus doivent être ingérés par les larves afin que le cycle d'infection se tienne. La matrice protéique des corps d'inclusion est alors dissoute par une protéase alcaline présente dans le jus gastrique de l'intestin moyen des insectes. Les nucléocapsides sont alors libérées et elles se dirigent vers les cellules intestinales. C'est dans ces cellules que se tiendra la phase initiale de l'infection. Summers (1971) a observé, chez le granulovirus de *Trichoplusia ni*, appelé TnGV, que les nucléocapsides vont s'attacher à l'intérieur du lumen de la membrane microvillaire des cellules épithéliales de l'intestin moyen. Les virions pénètrent dans le cytoplasme des cellules intestinales par fusion. À l'intérieur du cytoplasme épithélial, les virions sont transportés au noyau, site de la réplication. L'infection primaire permet l'expression d'un nouveau phénotype viral puisqu'il y aura production de virions non inclus. Ces virions quittent les cellules épithéliales par

bourgeoisement pour atteindre l'hémolymphe des insectes. Les virions peuvent alors infecter plusieurs tissus, notamment l'haemocèle, la matrice trachéale, les corps gras et l'épiderme larvaire. Ces tissus seront l'hôte de la deuxième phase de l'infection, appelée l'infection secondaire. Comme lors de l'infection primaire, les virions non inclus pénètrent dans le cytoplasme des différentes cellules par fusion. Ils se dirigent vers le noyau, site de la réplication virale. Les virus produits sont munis d'un corps d'inclusion et ils seront libérés lors de la lyse cellulaire. L'infection des tissus et la lyse cellulaire qui y est associée causent la mort des larves dans un laps de temps plus ou moins important. Il y a alors libération dans l'environnement d'une quantité massive de virus inclus (Adams et Bonami, 1991).

#### 2.2.1.2 Synthèse protéique chez les baculovirus

Lors de l'infection et la réplication des baculovirus, la synthèse protéique se divise en quatre phases, soit la phase précoce, la phase précoce tardive, la phase tardive et la phase très tardive. Au niveau chronologique et en fonction des virus, l'expression des gènes précoces et précoces tardifs se produit dans les premières 6h suivant l'invasion de cellules. Les gènes tardifs et très tardifs sont exprimés 24h après que les cellules soient infectées. Généralement, les gènes sont considérés comme des gènes précoces, s'ils sont exprimés avant le début de la réplication de l'ADN virale. La synthèse des protéines non structurales a lieu durant la phase précoce de l'infection. Pour leur part, les gènes tardifs sont associés au déclenchement de la réplication (Rohrman, 1986). Finalement, durant la phase très tardive, ce sont les protéines structurales du virion qui sont produites, notamment la granuline, la polyédrique, la VP39, la VP32 et la P10. Ces protéines se retrouvent principalement au niveau du corps d'inclusion. La phase très tardive est



reconnue par une expression abondante du gène codant pour la granuline chez les granulovirus, du gène de la polyédrine chez les nucléopolyédrovirus et du gène de la protéine P10 (Federici et Stern, 1990; Vans Oers *et al.*, 1999).

#### 2.2.1.3 Protéines majeures des baculovirus

La granuline et la polyédrine sont, respectivement, les constituants protéiques majeurs des granulovirus et des nucléopolyédrovirus. Ces deux protéines entrent dans la formation du corps d'inclusion autour de la nucléocapside (Tanada et Hess, 1991). Dans le cas du granulovirus de *C. fumiferana*, appelé aussi ChfuGV, le gène de la granuline code par une protéine de 248 acides aminés (Bah *et al.*, 1997). La masse moléculaire de la granuline et de la polyédrine est d'environ 29kDa et elles sont remarquablement stables (Tanada et Hess, 1991). Selon Russel et Consigli (1986), la granuline des granulovirus se caractérise par la présence d'emplacements phosphorylés et glycosylés qui joueraient un rôle important dans la réplication virale, notamment en permettant l'attachement du virus à la surface de cellules.

La protéine P10 est une autre protéine associée aux nucléopolyédrovirus et granulovirus. Cette protéine d'expression tardive semblerait jouer un rôle prépondérant dans la formation de structures fibreuses au noyau et au cytoplasme des cellules infectées. Les gènes p10 du nucléopolyédrovirus d'*Autographa californica* (AcMNPV) et du nucléopolyédrovirus d'*Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV) ont été séquencés et coderaient pour des protéines de, respectivement, 92 et 94 acides aminés (Leisy *et al.*, 1986). Selon les mêmes auteurs, il semble que les séquences associées aux gènes codant pour les protéines P10 ne soient pas conservées. En effet, ils observent une homologie de séquences d'à peine 42 % entre AcMNPV et OpMNPV. Jean (2003) signale, pour la

première fois, la présence du gène de la protéine P10 chez le ChfúGV. Chez les baculovirus, la protéine P10 est hyper-exprimée au stade tardif du cycle d'infection. Elle serait impliquée dans la morphogénèse de l'enveloppe du corps d'inclusion du virus et dans la libération des virions hors des cellules infectées.

#### 2.2.1.4 Spectre d'hôte

Les baculovirus sont présents chez plus de 900 espèces d'insectes. Les granulovirus sont connus pour leur grande spécificité d'hôte. Aujourd'hui, plus de 150 isolats de granulovirus ont été répertoriés, principalement chez des espèces de lépidoptères (Tanada et Hess, 1991). Les granulovirus sont principalement associés aux larves lépidoptères (Blissard et Rohrmann, 1990). Une étude récente faite sur la spécificité d'hôte d'un nouveau granulovirus isolé chez *Epinotia aporema*, un insecte ravageur du soya et d'autres cultures légumineuses en Amérique du Sud, confirme le caractère hôte-spécifique de ces virus (Sciocco-Cap *et al.*, 2001). En effet, des essais infructueux ont été tentés afin d'infecter, avec le EpapGV, les larves d'*Anticarsia gemmatalis*, de *Rachiplusia nu* et de *Spodoptera frugiperda*, d'autres ravageurs d'importance dans cette région. D'autre part, le spectre d'hôtes des nucléopolyédrovirus est moins limité, puisque l'on retrouve ce virus dans plusieurs ordres d'insectes, notamment chez les coléoptères, les hyménoptères, les lépidoptères et, aussi, chez les crustacés (Fields *et al.*, 1996).

Rohrmann (1986) a classifié les baculovirus dans quatre catégories en fonction du profil sérologique de la polyédrine. Cette classification reflète la co-évolution virus-hôte des baculovirus. Les divisions principales sont les suivantes : (1) le groupe Diptera qui présente une polyédrine semblable en taille à d'autres polyédrines des baculovirus des

lépidoptères, mais qui ne montre aucune association sérologique et aucune insertion d'acides aminés spécifiques en position N-terminales comme chez d'autres polyédriques; (2) le groupe Hymenoptera qui possède une polyédrique ayant très peu de similitudes avec les autres polyédriques des baculovirus, notamment celles des lépidoptères; (3) le groupe Granulovirus, dans lequel la protéine granuline est caractérisée par la présence des résidus additionnels de cystéine et une insertion d'acides aminés en position N-terminale que l'on ne retrouve pas chez les polyédriques des nucléopolyédrovirus des lépidoptères. Selon l'auteur, ce groupe semble avoir divergé du nucléopolyédrovirus bien avant la période de rayonnement de ces derniers chez les lépidoptères; et finalement, (4) le groupe des nucléopolyédrovirus des lépidoptères, dans lequel la polyédrique des différents virus est étroitement liée et démontre une homologie d'acides aminés entre 85 et 90 %.

#### 2.2.1.5 Baculovirus comme outil de lutte biologique

L'emploi des baculovirus est une solution de rechange très prometteuse pour le contrôle des populations de certaines espèces d'insectes. C'est notamment le cas des espèces qui ont développé une résistance aux insecticides chimiques comme dans le cas de la noctuelle de la betterave, *Spodoptera exigua* (Brewer et Tumble, 1989). Il existe de nombreux exemples de réussites liées à l'utilisation des baculovirus en tant qu'insecticides biologiques. Moscardi (1999) mentionne, entre autres, le contrôle des populations d'*Anticarsia gemmatilis*, un insecte ravageur de soya au Brésil, avec un nucléopolyédrovirus (AgMNPV), des populations de *Lymantria dispar*, un ravageur des forêts feuillues au Canada et aux États-Unis, avec un nucléopolyédrovirus (LdMNPV) et des populations de *Spodoptera exigua*, un insecte affectant les plantes ornementales et les légumes, avec un nucléopolyédrovirus (SeMNPV). Au Canada, le nucléopolyédrovirus

du *Neodiprion abietis*, NeabNPV, un insecte ravageur du sapin baumier, a été isolé et caractérisé récemment (Moreau *et al.*, 2005) et s'avère un moyen efficace de lutter contre cet insecte. Il fait actuellement l'objet d'une demande d'homologation.

Différentes espèces de virus furent isolées chez les espèces du genre *Choristoneura*. Au niveau des baculovirus, on a identifié six nucléopolyédrovirus et quatre granulovirus. C'est Bergold en 1949 qui isole le premier nucléopolyédrovirus de *C. fumiferana* dont l'abréviation est CfMNPV. Pour sa part, c'est Bird en 1959 qui identifie le premier granulovirus de la tordeuse des bourgeons de l'épinette aussi appelé (ChfuGV). De nombreux essais visant l'utilisation du CfMNPV contre les populations de *C. fumiferana* ont été réalisés en Ontario entre 1971 et 1983 (Cunningham et Howse, 1984; Cunningham, 1985). Les résultats obtenus sur l'efficacité de ce baculovirus sont pour le moins contradictoires. En effet, ces premiers essais de terrain n'ont pas permis de faire ressortir le potentiel de ces agents. Cunningham (1985) fait état d'une liste de facteurs susceptibles d'expliquer l'absence de résultat concluant. L'auteur souligne, entre autres, que les populations d'insectes testées étaient déjà fragilisées par des infections baculovirales antérieures, qu'il y avait présence de virus latents dans certaines populations d'insectes et qu'il y avait des cas de contamination des préparations insecticides par d'autres virus tels que des entomopoxvirus et des cypovirus.

Des essais similaires ont aussi été réalisés afin de vérifier le potentiel du CfMNPV comme outil de contrôle des populations de la tordeuse occidentale de l'épinette. Comme dans le cas de *C. fumiferana*, les résultats obtenus étaient tout autant décevants (Shepherd et Cunningham, 1976). Hodgkinson *et al.* (1979) ont démontré que l'utilisation d'une préparation à base de CfMNPV n'avait que peu d'impact sur le niveau

de défoliation par *C. occidentalis*. Cependant, les auteurs observaient tout de même un niveau élevé de larves infectées par le baculovirus. Les auteurs ne donnent aucune indication sur les effets à long terme de cette épizootie sur les populations d'insectes et des dommages subséquents. Dans les mêmes années, des essais furent aussi réalisés afin de documenter l'efficacité du granulovirus de *C. occidentalis* (ChocGV) contre les populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Cunningham et Howse, 1984).

En 1990, Kaupp et Ebling ont établi une méthode efficace pour déterminer les doses létales des préparations insecticides à base de baculovirus chez les larves d'insectes. Cette approche a permis de déterminer de façon plus précise le titre insecticide des préparations à base d'agents microbiens. Avec cette approche, les auteurs ont été en mesure de déterminer la  $DL_{50}$  d'une population du 4<sup>e</sup> stade larvaire de *C. fumiferana* soumise au CfMNPV à  $1,14 \times 10^3$  CI/larve. En utilisant cette méthode, Forté et Guertin (1999) ont trouvé une  $DL_{50}$  de  $5,72 \times 10^5$  granules/larve chez des larves de *C. fumiferana* soumises à un isolat de ChfuGV recueilli en Gaspésie.

C'est aussi à partir des années 90 que des améliorations significatives au niveau des techniques de production, du développement de nouvelles formulations pour le transport des agents infectieux et de l'application des baculovirus ont été réalisées. Ces innovations permirent de révéler le potentiel des baculovirus pour lutter contre les populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Otvos *et al.* (1989) ont démontré, lors d'essais sur le terrain, une mortalité de 34,6 % des populations larvaires de *C. fumiferana* suite à l'application de préparation à base de ChfuGV à une concentration de  $1,7 \times 10^{14}$  CI/hectare. Les mêmes auteurs indiquent aussi une baisse de 51,8 % des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette soumises à une concentration de

5,4 X 10<sup>11</sup> CI/hectare de CfMNPV. Lors d'applications aériennes sur plus de 100 hectares de forêts, Rashidan *et al.*(2004) a démontré l'efficacité du ChfuGV à une concentration de 1 X 10<sup>8</sup> CI/hectare avec une réduction de 40 % du niveau de défoliation des arbres traités et une réduction de plus de 35 % du nombre de larves de *C. fumiferana*.

Les résultats de terrain réalisés par Shepherd *et al.* (1995) ont démontré que les larves de *C. occidentalis* étaient plus sensibles au ChocGV et au CfMNPV que les larves de *C. fumiferana*. Cunningham *et al.* (1983) indiquent que l'efficacité des baculovirus était inférieure chez les larves de *C. fumiferana* provenant du terrain que chez les larves élevées en laboratoire. Forté (1999) a montré une augmentation de la susceptibilité au granulovirus chez les larves de *C. fumiferana* élevées sur du feuillage de conifères comparativement à celles qui s'alimentaient sur la nourriture artificielle. D'autre part, Li et Otvos (1999) et Otvos *et Duan* (2001) ont démontré, lors d'une étude sur les effets sous-létaux du CfMNPV chez les populations de *C. occidentalis*, que les femelles étaient plus susceptibles que les mâles et que les jeunes larves sont plus vulnérables à l'infection que les larves plus vieilles.

### **2.3 Histopathologie des baculovirus**

Pendant que l'infection virale s'installe suite à l'ingestion des virus, les insectes continuent à s'alimenter normalement. Après quelques jours, les insectes infectés se gonflent, cessent de s'alimenter et mourront par la suite (Adams et Bonami, 1991). En général, les larves infectées par les nucléopolyédrovirus trouveront la mort après 7 à 8 jours (Tanada et Hess, 1991). Selon les mêmes auteurs, l'infection par le granulovirus entraîne la mort des larves après 12 à 14 jours.

La première évidence de l'infection des larves par un baculovirus est l'hypertrophie des noyaux des cellules de l'intestin moyen. Ce phénomène semble le résultat d'une activité intense au niveau de la division cellulaire et du renflement des noyaux associé à la synthèse de l'ADN virale. Comme indiqué précédemment, les virions sont produits *de novo* enveloppés et, selon qu'il s'agisse de l'infection primaire ou secondaire, ils seront, respectivement, non inclus ou inclus. L'infection des cellules par les granulovirus ou les nucléopolyédrovirus diffère. Dans le premier cas, il y a une rupture précoce de la membrane nucléaire avant la formation des virions inclus (Federici, 1993). Ce phénomène n'est pas observé chez les nucléopolyédrovirus. Parmi les tissus les plus souvent affectés par les infections baculovirales, on retrouve les corps gras, le système digestif, notamment l'intestin moyen, et l'épiderme (Adams et Bonami, 1991).

L'infection larvaire par des baculovirus nécessite qu'ils soient ingérés afin que le processus puisse se tenir. Il est donc normal que les cellules épithéliales de l'intestin moyen des larves soient le site de la première phase de réplication des virus. Par la suite, les études histopathologiques des infections secondaires montrent que les baculovirus ont une grande affinité avec les corps gras. Sur une base chronologique, ce tropisme s'élargit puisque l'on retrouve des virus au niveau de l'épiderme, de la matrice trachéale et des muscles.

### **2.3.1 Histopathologie des nucléopolyédrovirus**

Actuellement, le nucléopolyédrovirus d'*Autographa californica* (AcMNPV) est le baculovirus le plus intensivement étudié et connu. Granados et Lawler (1981) ont examiné la voie d'infection des AcMNPV chez les larves de *Trichoplusia ni*. Après la dissolution rapide des polyèdres dans l'intestin moyen, les virions libérés entrent dans les







cellules hôtes par la fusion de l'enveloppe du virion avec des microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin moyen. Dans les cellules de l'intestin moyen, des nucléocapsides sont transportés au noyau où ils perdent leur enveloppe, environ une heure après l'infection. Les virus entrent alors dans la première phase de réplication. Il faut environ 8 heures après le début de l'infection pour observer la présence de nouvelles nucléocapsides. Les effets cytopathiques observés pendant cette phase incluent l'hypertrophie du noyau et la présence d'un stroma viral dans le noyau. Après 12 heures, on observe le bourgeonnement des nouvelles progénitures à travers la membrane nucléaire des cellules infectées. Une fois que les nouvelles nucléocapsides se retrouvent dans le cytoplasme, l'enveloppe acquise de la membrane nucléaire est perdue, et la nucléocapside est transportée à la membrane basale où elle bourgeonne à travers d'elle. Ces virions non inclus peuvent infecter plusieurs types de tissus : corps gras, muscles, matrice trachéale, hémocytes et épiderme. À l'intérieur des cellules infectées, les nucléocapsides de la progéniture produite au noyau peuvent faire deux parcours différents: ils peuvent se déplacer hors du noyau dans le cytoplasme et bourgeonner par la membrane plasmique, où ils peuvent être enveloppés *de novo* au noyau pour plus tard acquérir la polyédricité ce qui donnera des virions inclus. Les deux phénotypes de virion des nucléopolyédrovirus diffèrent dans leur morphologie. En effet, on observe des différences au niveau de la composition protéique, le tropisme tissulaire et le mode de l'entrée virale dans des cellules hôtes. Les virions non inclus issus de la phase primaire forment des nucléocapsides enveloppés simples sans corps d'inclusion, tandis que les virions inclus provenant de la seconde phase de réplication peuvent avoir un ou plusieurs nucléocapsides enveloppés dans un corps d'inclusion (Adams et Bonami, 1991). Les

enveloppes de deux phénotypes de virion sont probablement dérivées de différentes sources et semblent montrer une certaine affinité tissulaire. Les virions inclus semblent être spécialisés pour des interactions avec la polyédrine et pour l'infection des cellules épithéliales colonnaires matures de l'intestin moyen, alors que les virions non inclus issus par bourgeonnement sont spécialisés dans les interactions avec d'autres cellules et tissus de l'insecte (Granados, 1980). En plus, les différences dans la spécificité tissulaire, les deux phénotypes viraux diffèrent également dans la façon d'entrée virale dans des cellules hôtes. Considérant que le phénotype inclus entre dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen par la fusion de l'enveloppe virale avec des microvillosités, le phénotype non inclus pénètre dans les cellules par endocytose absorptive. Ces différents mécanismes d'envahissement des virions sont probablement liés aux différences dans les enveloppes virales. L'enveloppe du virion non inclus, acquis lorsque la nucléocapside traverse la membrane cytoplasmique, contient une glycoprotéine de l'enveloppe virale, appelée Gp64 (Stoltz, 1973; Granados, 1980 ; Granados et Willians, 1986). Washburn *et al.* (1995, 1998, 2000, 2003) postulent que certains nucléopolyédrovirus ayant plusieurs nucléocapsides enveloppées (MNPVs), acquièrent la protéine Gp64 de la membrane de la cellule hôte et bourgeonnent directement à travers la membrane basale de l'insecte. Ce mécanisme serait une façon pour les MNPV de faire face aux mécanismes de résistance de l'hôte suite au détachement des cellules épithéliales infectées. Pour leur part, l'enveloppe des virions inclus, qui n'est pas bien caractérisée, est *de novo* acquise au noyau. Ces virions, qui seront plus tard inclus dans les polyèdres, ne contiennent pas la glycoprotéine gp64 (Stoltz, 1973; Granados, 1980 ; Granados et Willians, 1986).

Engelhard *et al.* 1994 ont démontré que le multinucléopolyédrovirus de *Autographa californica* AcMNPV se multiplie davantage dans la matrice trachéale et suggère que plus d'un tropisme tissulaire pour le développement de la phase secondaire de l'infection ce virus utilise la matrice trachéale comme voie de prolifération systémique, ce qui le rendrait plus efficace en son action bioinsecticide.

L'étude réalisée par Keddie *et al.* (1989) porte aussi sur la caractérisation des infections baculovirales à l'aide du modèle *Trichoplusia ni* infectés par AcMNPV. Les résultats indiquent que l'infection initiale a lieu dans l'intestin moyen et prend place simultanément dans les cellules épithéliales columnaires matures et les cellules régénératrices. Une diffusion cellule à cellule a été détectée dans plusieurs tissus. La formation des polyèdres, qui se manifeste normalement lors de l'infection secondaire, peu, dans quelques rares occasions, être observés dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen. Dans ces cas, les polyèdres sont plus petits que les polyèdres issus des cellules des corps gras (Granados et Lawler, 1981; Granados et Willians, 1986).

Une étude chez *Spodoptera exigua* montre l'établissement d'une infection systémique dans l'haemocoel avant la réplication du virus dans les cellules de l'intestin moyen chez certaines larves infectées par AcMNPV (Flipsen *et al.*, 1995). L'auteur a observé le passage des nucléocapsides parentales d'AcMNPV dans l'épithélium de l'intestin moyen des larves de *T. ni* directement à travers des cellules colonnaires vers les cellules régénératrices fondamentales avant la réplication du virus. L'infection des tissus n'a pas été détectée avant la réplication virale dans l'intestin moyen, suggérant que l'infection de l'intestin moyen soit un prélude important à l'infection systémique.

### 2.3.2 Histopathologie des Granulovirus

Bien que les premiers granulovirus aient été découverts dans les années 1920 (Paillot, 1926), il faut attendre les années 1940 afin qu'ils soient considérés en tant que groupe distinct des nucléopolyédrovirus. Des études d'ultrastructures ont confirmé les différences de conformation entre ces deux types de virus (Bergold, 1948 ; Steinhaus, 1949).

Les Granulovirus causent trois différentes formes d'infection, qui sont nommées syndromes: syndrome 1, où l'intestin moyen et le corps gras sont infectés; syndrome 2, où l'intestin moyen et d'autres tissus peuvent être infectés; et le syndrome 3 où seulement l'intestin moyen est infecté (Tanada et Hess, 1984 ; 1991 ; Federici et Stern, 1990). L'infection de type 3 est observée seulement chez un insecte *Harrisina brillians* infecté par son granulovirus HbGV (Smith *et al*, 1956). Dans ce cas, l'infection primaire et l'infection secondaire ont lieu dans les cellules de l'épithélium de l'intestin moyen (Federici et Stern, 1990). Le syndrome du type 2 ressemble étroitement au syndrome des nucléopolyédrovirus affectant certaines larves de lépidoptères. Le temps léthal associé au syndrome type 2 est habituellement plus courte que celle du syndrome du type 1.

Hess and Falcon (1987) proposent que la membrane basale de larves de *Cydia pomonella*, produite et sécrétée par les cellules épithéliales, en subissant une infection par le granulovirus CpGV, fonctionne comme une vraie barrière à la libération des virions. Cela peut être un facteur significatif à la cinétique de la dissémination virale du CpGV et des granulovirus en général.

Vincent (2000) a classifié le ChfuGV comme un granulovirus qui cause un syndrome type 2 chez les larves de *C. fumiferana*. L'infection du ChfuGV est déclenchée

dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen et est disséminée aux corps gras et à l'épiderme. Les adipocytes infectés ont démontré une atrophie des lobes lipidiques (Vincent, 2000). Cette étude a montré des variations morphologiques entre les tissus sains et infectés seulement au niveau des adipocytes et de l'épiderme. Les cellules infectées ont montré une hypertrophie nucléaire remarquable résultante du processus de réplication virale à leur intérieur. Pour leur part, Sciocco-Cap *et al.* (2001) ont caractérisé le granulovirus EpapGV isolé de *Epinotia aporema*. L'infection par EpapGV semble polyorganotropique et les tissus infectés incluent les corps gras, la matrice trachéale et l'épiderme, malgré l'infection chez la matrice trachéale ait été légère et tardive (Goldeberg *et al.*, 2002).

## **2.4 Tissus des lépidoptères ciblés par des baculovirus**

### **2.4.1 Corps gras**

Les corps gras ou tissus adipeux sont les principaux organes impliqués dans la synthèse des macromolécules et dans le métabolisme des nutriments et autres composés qui traversent la paroi de l'épithélium de l'intestin moyen des larves de lépidoptères. Les cellules adipeuses sont responsables de la synthèse, de l'entreposage et de l'élimination des métabolites importants tout en possédant les principaux enzymes nécessaires à la désintoxication. L'organisation des corps gras varie selon les espèces d'insectes et selon leur stade de développement. Les corps gras peuvent être décrits comme une agglomération de deux ou trois types cellulaires. On retrouve premièrement des cellules trophocytes qui sont responsables de la synthèse de molécules, l'entreposage et la désintoxication de métabolites. En plus des cellules trophocytes, on retrouve les cellules urocytes qui sont impliquées dans l'entreposage et l'excrétion de l'acide urique et les

cellules mycetocytes dont le rôle n'est pas très bien connu. Ces cellules sont maintenues ensemble par des structures complexes appelées desmosomes qui sont des jonctions d'ancrage formant des agglomérats de tissus qui sont enveloppés par une membrane basale qui est accolée aux cellules par des hémidesmosomes (Eaton, 1987).

Chez les insectes holométaboles, qui ont une métamorphose complète durant leur développement, les corps gras sont reconstruits à chaque mue à partir des cellules déjà existantes suite à l'histolyse des tissus larvaires (Eaton, 1987).

#### **2.4.2 Tube alimentaire**

Le tube alimentaire des insectes est divisé en trois régions principales : l'intestin antérieur, lequel est d'origine ectodermique; l'intestin moyen qui est d'origine endodermique et l'intestin postérieur qui est d'origine ectodermique. L'épithélium de toutes les parties du tube alimentaire est formé d'une seule couche cellulaire. Dans l'intestin antérieur et l'intestin postérieur, les cellules sécrètent une cuticule qui est continue à celle qui recouvre l'extérieur du corps. Elle est malléable et est renouvelée à chaque mue. Bien que l'on ne retrouve pas la cuticule dans l'intestin moyen, la majorité des insectes sécrète une membrane péritrophique de constitution protéique autour de la couche épithéliale. C'est notamment le cas chez les lépidoptères (Chapman, 1998).

La fonction de l'intestin antérieur est reliée à la digestion mécanique et à la mobilité de la nourriture vers l'intestin moyen. Il est divisé en quatre parties : le pharynx, l'œsophage, le jabot et le proventricule. Dans le cas des chenilles, il fonctionne aussi comme un endroit de stockage temporaire de la nourriture.

L'intestin moyen contient les *caeca* gastriques qui produisent des enzymes permettant la digestion chimique de la nourriture. Les cellules épithéliales de l'intestin moyen sont responsables de la production des enzymes et leur sécrétion. Elles sont aussi responsables de l'absorption de nutriments. La grande majorité des cellules sont colonnaires et leur membrane apicale est constituée de microvillosités. Chaque microvillosité est supportée par des filaments d'actine concentrés que l'on retrouve à la bordure apicale des cellules épithéliales (Steinhaus, 1949).

Les cellules principales de l'intestin moyen ont une vie limitée. Chez les insectes, ces cellules sont continuellement remplacées à partir des cellules régénératrices qui sont situées près de la membrane basale. Elles apparaissent souvent regroupées dans une structure appelée « nids », et forment des cryptas visibles en forme de petites papilles. Dans la couche épithéliale, il y a aussi des cellules endocrines qui sont responsables de la sécrétion des enzymes. Dans l'épithélium de l'intestin moyen, on retrouve aussi des cellules à gobelet qui sont parsemées entre les cellules principales. Il forme des invaginations dans la membrane plasmique qui ont la forme de bouteilles. Ces cellules sont responsables de la sécrétion d'une grande concentration de potassium qui est envoyé vers le lumen intestinal, où le pH est hautement alcalin (Steinhaus, 1949).

La nourriture retrouvée dans l'intestin moyen est contenue par la membrane péritrophique qui est sécrétée par les cellules épithéliales. Cette membrane est constituée principalement de chitine et de protéines qui jouent plusieurs rôles dans la protection de l'épithélium. Elle protège la couche épithéliale contre l'abrasion causée par les aliments et joue le rôle de barrière pour contrer l'envahissement par des microorganismes pathogènes, incluant les virus (Chapman, 1998).



L'intestin postérieur est impliqué dans la fabrication et l'excrétion des déchets alimentaires. Les tubules de Malpighi, jouant le rôle des reins, récupèrent les pertes en nitrate et en sels alors que l'intestin absorbe tous les résidus alimentaires et le surplus d'eau. Les déchets sont entreposés au rectum avant d'être éliminés (Chapman, 1998).

### **2.4.3 Tégument**

Le tégument est davantage un organe sensoriel, capable de percevoir des stimuli sous forme chimique, électrique, mécanique, lumineuse et thermique. Il comprend la cuticule et l'épiderme. La cuticule, qui est l'exosquelette de l'insecte, est composée d'une série de couches protéiques, principalement la chitine, dont le rôle est d'assurer le soutien et de garder la forme de l'insecte en garantissant sa protection contre l'environnement externe (Chapman, 1998). L'épiderme est composé d'une seule couche de cellules dans laquelle sont intégrées plusieurs cellules à fonction glandulaires. Bien qu'il soit un tissu spécialisé, il réalise les mêmes fonctions communes à d'autres types de cellules, soit l'absorption de composés chimiques pour la synthèse et sécrétion des déchets, le métabolisme cellulaire ainsi que la production de la cuticule (Chapman, 1998).

### **2.4.4 Système respiratoire**

Le système respiratoire chez les insectes est principalement composé d'un réseau de tubes trachéaux amenant l'air externe à leurs cellules. Ce réseau de tubes de différents diamètres est nommé matrice trachéale. Les spiracles, qui sont des ouvertures situées de chaque côté de l'abdomen, sont ramifiés aux trachées et trachéides (Borror, 1981).

## 2.5 *Transmissions horizontale et verticale*

Les moyens par lesquels les microorganismes pathogènes, tels que les virus, persistent chez les populations animales, en particulier quand la densité de l'hôte est basse ou quand l'hôte est fortement mobile, sont une composante clé de la relation hôte-pathogène. Ce phénomène a intrigué des épidémiologistes et des écologistes pendant des décennies. Les virus ont développé de nombreuses manières d'assurer leur persistance, notamment par leur insertion dans le génome de l'hôte et par leur inclusion dans les structures résistantes capables d'assurer leur viabilité en dehors de l'hôte. De plus, les virus, notamment les virus d'invertébrés, peuvent compter sur les mécanismes verticaux et horizontaux de la transmission (D'Amico *et al.*, 1996, Cory *et al.*, 1997). La stabilité du corps d'inclusion est considérée comme une caractéristique fondamentale pour la réussite de la transmission horizontale des baculovirus dans l'environnement. Selon Anderson et May (1981), la transmission horizontale est efficace seulement au-dessus d'un certain seuil de la population de l'insecte hôte. Ce mécanisme nécessite la présence d'un nombre important de corps d'inclusion libérés dans l'environnement qui joueront un rôle lorsque la population d'insectes est élevée et dans un habitat propice. Ce mécanisme de transmission ne peut expliquer la persistance du baculovirus lorsque les densités d'hôtes sont basses, lorsque les insectes sont hautement mobiles ou lorsque les virus se trouvent dans un secteur avec des niveaux élevés de rayons ultra-violets.

Il semble que les baculovirus aient la capacité d'être transmis verticalement des femelles adultes vers les jeunes larves (Kukan, 1999). Cependant, les facteurs qui déterminent ce processus ne sont pas encore très connus. Du point de vue de la lutte biologique, la transmission verticale des virus et les effets sous-létaux peuvent être très

importants puisqu'ils offrent un important mécanisme de rétention du virus indépendant de la densité de la population d'insectes. De plus, cette forme de transmission peut soumettre les insectes ravageurs à un contrôle bénéfique puisqu'elle peut réduire la performance des hôtes, notamment au niveau du taux de développement, de la perte de poids des chrysalides et des adultes et de la diminution de la capacité reproductive (Rothman and Myers, 1996). Les auteurs indiquent que la présence du virus chez l'insecte ne mène pas toujours à une infection virale manifeste, mais produit toujours des effets mesurables sur les insectes survivants. Ces effets sous-létaux incluent des réductions significatives de la fécondité (Myers *et al.*, 2000) et des retardements du temps de développement de l'insecte hôte (Goulson et Cory, 1995), ce qui pourrait, en théorie, avoir un impact important sur la dynamique de population des insectes hôtes (Boots et Norman, 2000). L'infection sous-létale peut jouer un rôle important dans la transmission verticale en favorisant la surface et l'intérieur des œufs (Goulson et Cory, 1995). La transmission verticale des infections causées par les nucléopolyédrovirus est relativement commune chez les insectes de l'ordre des lépidoptères (Kukan, 1999). Bien qu'il ait été suggéré chez les granulovirus (Melamed-Madjar et Raccah, 1979), il existe très peu de documents le démontrant et les facteurs impliqués dans le processus ne sont pas connus.

L'infection latente est aussi importante dans une perspective de transmission verticale. L'infection latente se définit comme une infection par un agent qui ne produit pas de symptômes ou signaux visibles de la maladie, mais qui peut être transmis à un autre hôte (Hale et Margham, 1988). Dans ce sens, Fuxa *et al.* (1992) indiquent que la latence implique que l'agent pathogène soit dans un état non infectieux et non reproductible. C'est sous l'action d'un stress que le pathogène quitte son état de latence

pour entrer dans la phase infectieuse et reproductible. Deux mécanismes ont été suggérés pour expliquer les infections latentes. Howard (1986) a proposé que le matériel génétique puisse incorporer le génome de la cellule hôte comme c'est le cas du virus de l'hépatite B. D'autre part, il est proposé que l'infection latente résulterait de la manutention du virus dans le noyau de la cellule hôte comme un matériel génétique viral indépendant, comme dans le cas du virus herpes simplex (Mellerik et Fraser, 1987). Fuxa *et al.* (1992) affirment que les nucléopolyédrovirus ont un avantage à se maintenir dans un état latent chez les insectes adultes, puisque ce sont eux qui sont largement impliqués dans la dispersion et la reproduction de l'espèce hôte.

Hughes *et al.* (1993) ont observé une infection latente du nucléopolyédrovirus de *Mamestra brassicae* (MbMNPV), laquelle a persisté d'une génération à l'autre sans que les insectes manifestent de symptômes de la maladie. Les séquences du génome du virus latent ne furent pas détectées par hybridation de l'ADN, mais le furent par réaction de la polymérase en chaîne (PCR) réalisée sur un échantillon des corps gras. Hughes *et al.* (1997), en utilisant la même colonie d'insectes de *Mammestra brassicae*, ont démontré la continuité de l'expression des protéines virales dans les cellules adipeuses après plusieurs générations sans qu'il y ait apparition de symptômes associés à l'infection.

La transmission verticale peut se faire de façon vénère, suite à l'accouplement de femelles par des males infectés, où de façon transovarienne suivant l'accouplement de mâles avec de femelles infectées. Khurad *et al.* (2004) ont indiqué deux façons d'observer la transmission verticale du nucléopolyédrovirus de *Bombyx mori* (BmMNPV). Dans un premier cas, des chenilles du vers à soie furent infectées avec différentes doses sous-létales du virus BmMNPV et les adultes survivants furent accouplés en trois différentes

combinaisons : (1) femelles infectées avec mâles non infectés; (2) femelles non infectées avec mâles infectés; et (3) mâles et femelles infectés. La prévalence du nucléopolyédrovirus fut rapportée dans la progéniture des trois types accouplements. Cependant, la mortalité fut de 100 % chez les larves du 1<sup>er</sup> stade de la seconde génération issue de l'accouplement des mâles et femelles infectés. Dans le cas de l'accouplement des femelles infectées avec des mâles non infectés, la mortalité de la progéniture fut de 78 % au premier stade larvaire et 22 % au deuxième stade larvaire. Ces résultats confirmaient la présence de la transmission transovarienne chez cet insecte. La transmission vénère fut aussi démontré par l'accouplement de femelles non infectées avec des mâles infectés avec un taux de mortalité de la progéniture de 57 % au troisième stade larvaire et 43 % au quatrième stade larvaire (Khurad *et al.*, 2004).

Burden *et al.* (2003) ont rapporté la transmission verticale du granulovirus de *Plodia interpunctella* (PiGV) chez les insectes infectés avec des doses sous-létales. Ils ont détecté, par la technique du RT-PCR, la présence de transcrits du gène de la granuline chez des larves de seconde génération provenant de l'accouplement des adultes survivants infectés pendant leurs stades larvaires. L'ADN viral fut détecté chez tous les stades de développement des individus qui ont survécu, incluant les adultes et les larves de la seconde génération. De la même façon, les transcrits de l'ARNm correspondant au gène de la granuline, furent détectés dans tous les stades et aussi dans la progéniture, mais en très faibles quantités.

Des études plus approfondies sont nécessaires pour élucider les facteurs impliqués dans l'écologie et épidémiologie des baculovirus. La transmission verticale ne semble pas dépendante de la densité des populations d'insectes. Ceci jouerait probablement un rôle

significatif dans le maintien d'un pool de virus dans la population ayant de basses densités. De plus, la transmission verticale peut accroître la dispersion virale, notamment dans le cas d'insectes ayant une grande mobilité. L'infection virale peut persister en faible quantité dans la population seulement s'il y a un petit nombre d'individus infectés. Fuxa et Richter (1991) ont démontré l'existence d'un mécanisme de sélection qui pourrait augmenter le taux de transmission verticale chez *Spodoptera frugiperda*. En effet, ils proposent que des éléments génétiques soient impliqués dans la transmission verticale.

### **2.5.1 Système reproductif des insectes**

Dans la majeure partie des cas, la reproduction des insectes est bisexuelle ce qui implique la combinaison d'un sperme du mâle avec l'ovule de la femelle. Le système reproducteur comprend une paire de gonades se situant dans l'abdomen des insectes. Chez les mâles, il s'agit des testicules, et chez les femelles des ovaires. Chez les femelles, les ovaires sont reliés par deux oviductes latéraux qui forment un oviducte médian qui s'ouvre postérieurement dans la chambre génitale. La chambre génitale forme un tube, le vagin, et ce tube est développé en formant la bursa copulatrice qui accueillera l'édéage ou le pénis. Près du vagin, on retrouve la spermatèque ou receptacle séminal où sont entreposés les spermatozoïdes reçus lors de l'accouplement. Finalement, le vagin est aussi bordé de glandes accessoires qui servent, notamment, à la production de colle permettant aux œufs d'adhérer au substrat et à la production d'une substance utilisée pour la formation du chorion (Eaton, 1987).

Chaque ovaire est normalement formé par quatre ovarioles polytrophiques. Chaque ovariole est subdivisée en un germarium antérieur ou apical, un vitellarium médian et un pédicelle postérieur appelé aussi filament terminal. Les œufs sont

transportés des cellules germinatives ou oogonia du germarium antérieur vers le vitellarium où l'on retrouve une série d'œufs en développement, le plus petit et le plus jeune se situant près du germarium. Les œufs sont déchargés dans les oviductes latéraux et transitent vers l'oviducte médian pour aboutir dans le vagin. C'est au niveau de l'oviducte médian que les œufs sont fertilisés. Finalement, les œufs laissent le système reproductif de la femelle en passant par l'ovipore de l'oviducte postérieur (Eaton, 1987).

Pendant l'accouplement, l'édéage du mâle est inséré dans la bursa copulatrice et les spermatozoïdes reçus migrent vers la spermatèque, où ils restent entreposés jusqu'au moment de l'ovoposition (Eaton, 1987).

## 2.6 Hypothèse et objectifs

Étant donnée la grande spécificité à l'hôte caractérisant les baculovirus et compte tenu des variations importantes observées lors des essais visant le contrôle des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de la tordeuse occidentale de l'épinette avec le ChfuGV et le CfMNPV, il devenait intéressant de mieux comprendre la pathogénicité de ces virus. En fait, deux hypothèses principales ont été les prémisses aux différentes expériences. La première portait sur la virulence des baculovirus chez les deux espèces de *Tortricidae* phylogénétiquement proches. Elle se formule ainsi :

*La susceptibilité des larves de C. fumiferana et C. occidentalis aux infections de deux baculovirus, le ChfuGV et le CfMNPV, sera différente chez les deux insectes et que cette variation résulte d'une différence dans la pathogénicité, notamment au niveau de l'invasion et de la vitesse de prolifération des virus.*

En regard de cette hypothèse, plusieurs objectifs ont été établis. Ainsi, le premier visait à démontrer les différences de l'activité insecticide des baculovirus chez les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de la tordeuse occidentale de l'épinette soumises au ChfuGV et au CfMNPV. Deux paramètres ont été considérés, soit la dose létale entraînant 50 % de mortalité dans la population ( $DL_{50}$ ) et le temps moyen de survie (TMS). De plus, un suivi de l'histopathologie des infections baculovirales a été réalisé afin de suivre et documenter les différences existant entre une infection par les ChfuGV et le CfMNPV chez les larves des deux espèces. Sur une base chronologique, des coupes histologiques avec coloration d'Azan, spécifique aux virus inclus, couplée à des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont été utilisées afin de suivre l'évolution de l'infection chez les deux espèces. De façon plus précise, cette approche



permettait une meilleure identification du tropisme viral du CfMNPV et du ChfuGV chez les larves infectées de *C. fumiferana* et *C. occidentalis*.

Durant la première partie de l'étude, l'observation des tissus larvaires de la tordeuse des bourgeons de l'épinette infectés par le granulovirus a permis de déceler la présence de particules virales au niveau des gonades de larves. Sur la base de cette observation, une deuxième hypothèse a été formulée, à savoir :

*L'infection par le ChfuGV peut résulter d'une transmission verticale du virus d'une génération à une autre chez C. fumiferana.*

Un protocole d'infection sous-létale du ChfuGV chez des larves de *C. fumiferana* a été établi de façon à obtenir des insectes adultes porteurs du virus. Ces insectes ont par la suite été accouplés afin d'obtenir une nouvelle génération de larves. Des coupes histologiques suivies d'approches en biologie moléculaire ont été employées afin de vérifier la possibilité d'une transmission verticale du ChfuGV. Ces analyses ont été réalisées sur les mâles et les femelles survivantes, ainsi que sur les ovaires et les œufs des femelles survivantes et les larves.

## **Chapitre 3**

### **Matériel et Méthodes**

#### **3.1 Insectes**

Dans le cadre de l'étude, deux espèces d'insectes ont été utilisées et élevées, soit *C. fumiferana* et *C. occidentalis*. Pour les deux espèces, les jeunes larves ont été fournies par l'Unité de production des insectes du Service canadien des forêts à Sault-Sainte-Marie. À la réception des larves, les insectes étaient transférés dans des godets contenant de nourriture artificielle (McMorran, 1965) et ces derniers étaient placés dans une chambre environnementale (Growth Cabinet, Sanyo, USA) à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , une humidité relative de 60 % et un cycle de lumière 14:10 h.

#### **3.2 Production des baculovirus et purification de l'ADN génomique**

L'absence de lignée cellulaire permissive pour la production du ChfuGV implique qu'elle doit se faire *in vivo* dans des larves de *C. fumiferana*. Afin d'uniformiser la production du ChfuGV et du CfMNPV, les larves du 4<sup>ème</sup> stade larvaire de la tordeuse des bourgeons de l'épinette ont été infectées selon la technique décrite par Forté *et al.* (1999).

##### **3.2.1 Production et purification des baculovirus**

Pour chaque virus, la surface de la nourriture artificielle de différents godets a été inoculée avec 75  $\mu\text{l}$  d'une suspension mère du virus ayant une concentration de  $1 \times 10^{11}$  corps d'inclusion/ml. Par la suite, des larves au 4<sup>e</sup> stade ont été transférées sur ces godets afin qu'elles s'infectent après l'ingestion de la diète artificielle inoculée. Les contenants ont été placés dans une chambre environnementale à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , une humidité relative de 60 % et un cycle de lumière 14:10 h durant 12 jours. Les

larves infectées ont ensuite été recueillies et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la purification virale.

La purification des virus a été réalisée selon la technique de Tompkins (1991). Les larves infectées ont été homogénéisées (Omni-Mixer 17150, Dupont Instruments, EU) dans un volume égal d'une solution de SDS 1 % et le broyat a été filtré à travers trois épaisseurs d'étamine afin de retirer les débris d'insectes. Les débris larvaires résiduels ont été éliminés par centrifugation à  $300 \times g$  durant 5 min. Le surnageant a été soumis à une nouvelle centrifugation à  $10\,000 \times g$  durant 25 min, afin de précipiter les particules virales et les cellules infectées dans le culot. Ce dernier a été remis en suspension dans un volume minimal d'une solution de NaCl 0,5M et incubé durant 30 min à la température de la pièce pour permettre la lyse des cellules infectées. Par la suite, le lysat a été soumis deux fois à une centrifugation à  $10\,000 \times g$  durant 10 min et le culot, contenant les particules virales, a été remis en suspension dans l'eau distillée stérile.

Les particules virales de chaque virus ont été purifiées à l'aide d'un gradient discontinu de glycérol (Sigma, Canada) de 100 % à 60 % v/v pour le ChfuGV et de 65 % à 40 % v/v pour le CfMNPV. Les solutions de glycérol avaient préalablement été filtrées avec un filtre de  $0,22 \mu\text{m}$  (Millex<sup>®</sup>-GP, Millipore, Canada) afin de réduire les risques de contamination. Les gradients ont été soumis à une ultracentrifugation à  $19\,000 \times g$  durant 45 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après la centrifugation, les fractions contenant les différents virus, la fraction 70 % pour le granulovirus et la fraction 40% pour le nucléopolyédrovirus, ont été récupérées et lavées dans de l'eau distillée stérile avant une centrifugation à  $10\,000 \times g$  durant 10 min à  $5^{\circ}\text{C}$ . Cette opération de lavage a été répétée trois fois. Après une centrifugation finale à  $12\,000 \times g$  durant 15 min à la température de la pièce, les

particules virales obtenues ont été suspendues dans 500µl d'eau distillée stérile. Les suspensions mères du ChfuGV et du CfMNPV ainsi obtenues ont été conservées à 4°C jusqu'à leur usage ultérieur. L'intégrité des particules virales purifiées et la quantité de virus obtenue ont été vérifiées au microscope électronique.

### **3.2.2 Analyse par microscopie électronique**

Le décompte des particules virales et l'intégrité des particules virales purifiées ont été réalisés en microscopie électronique en utilisant la méthode de coloration négative par l'acide phosphotungstique (Alain *et al.* 1989). Ainsi pour chaque virus, un volume de 100 µl d'une suspension virale a été diluée 1/100 avec de l'eau distillée. De ce volume, 100 µl ont été prélevés et placés dans un tube. Un volume égal d'une suspension de billes de latex en polystyrène (S130-3 Polystyren Latex, Agar Scientific, Royaume-Uni) d'une concentration de  $3,51 \times 10^8$  billes/ml a été ajouté au tube. La suspension contenant les virus et les billes de latex a été fixée sur une grille de cuivre (Mecala, Canada) suite à une centrifugation à 50 000 x g durant 5 min. Suite à trois lavages avec de l'eau distillée stérile, la grille a été asséchée et colorée à l'acide phosphotungstique (PTA) à 3 % (pH 6,0) durant 1 min. La grille était par la suite lavée à l'eau distillée et séchée délicatement sur un papier buvard avant l'observation au microscope électronique (Philips Electronics Industries Ltd., modèle EM 300, Pays-Bas) à une magnification de 13 000x. Le décompte de virus a été déduit à partir du dénombrement des sphères de latex (Alain *et al.* 1989).

### 3.2.3 Extraction et purification de l'ADN des baculovirus

L'extraction et la purification de l'ADN chez le ChfuGV et le CfMNPV passent par deux étapes. Une première qui consiste à libérer les nucléocapsides des corps d'inclusion et une deuxième ciblant l'extraction et la purification des ADN.

#### 3.2.3.1 Isolement des nucléocapsides enveloppées des baculovirus

Pour les deux baculovirus, les nucléocapsides ont été isolées suite à un traitement alcalin permettant la dissolution du corps d'inclusion et une centrifugation sur gradient de saccharose. Pour ce faire, 100 µl de la suspension du granulovirus ou du nucléopolyédrovirus préalablement purifiée ont été soumis à une centrifugation à 10 000 x g durant 5 min. Après avoir éliminé le surnageant, le culot a été homogénéisé dans 500 µl d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M (pH 10,5). Suite à une incubation de 30 min à la température de la pièce, le mélange a été centrifugé à 6 000 x g pendant 10 min. Le surnageant contenant les nucléocapsides détachées de leur corps d'inclusion a été récupéré et le culot a été soumis à un second traitement avec la solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M (pH 10,5). Les deux fractions de surnageant obtenues ont été combinées et déposées sur un gradient de saccharose discontinu de 50 % à 10 % et le tout a été centrifugé à 25 000 x g durant 1 h à 4 °c. Après avoir éliminé le surnageant, 200 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) (pH 7,0) a été ajouté au culot et le tout conservé à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN viral.

#### 3.2.3.2 Extraction et purification de l'ADN viral

L'extraction de l'ADN viral a été réalisée en soumettant les nucléocapsides purifiées à un traitement à la protéinase K (250 µg/ml) dans un tampon TKS (tampon TE pH 7,4 et 0,5 % de SDS) pendant 60 min à 37°C afin de digérer les nucléocapsides.

L'ADN a été extrait en ajoutant un volume égal de phénol saturé dans un tampon TE (pH 7,4) durant 5 min à 5°C. Le mélange a par la suite été soumis à une centrifugation à 10 000 x g durant 5 min. La phase aqueuse contenant l'ADN a été récupérée et soumise de nouveau à un traitement au phénol. L'ADN viral a été purifié par quatre extractions successives avec un volume de phénol : chloroforme : isoamyl (24 : 1 : 1), et deux extractions avec un volume de chloroforme : isoamyl (24 : 1). L'ADN extrait a été précipité en présence de 2,5 ml d'éthanol 100 % glacial et 0,1 ml de CH<sub>3</sub>COONa 3 M (pH 5,2) à -20°C pendant 18 h. La sédimentation de l'ADN a été réalisée par centrifugation à 16 000 x g durant 25 min. L'ADN a été lavé dans 1 ml d'éthanol 70 %. Finalement, l'ADN des baculovirus a été centrifugé à 16 000 x g durant 10 min avant d'être resuspendu dans 30 µl de tampon TE (pH 4,0) puis conservé à -20°C. La pureté et la quantité d'ADN viral ont été vérifiées en mesurant la densité optique ainsi que par électrophorèse sur gel d'agarose.

La quantification de l'ADN viral extrait a été vérifiée par densité optique. Pour ce faire, un aliquote de l'ADN purifié a été dilué dans l'eau distillée stérile dans un rapport 1 :200. La densité optique de l'ADN dilué a par la suite été mesurée à une longueur d'onde de 260 nanomètres (nm) à l'aide d'un spectrophotomètre (Genequant, Pharmacia Biotech). Une unité de densité optique à 260nm (DO<sub>260</sub>) équivaut à 50 microgrammes (µg) d'ADN par ml.

$$\text{Formule: } \mu\text{g ADN}/\mu\text{L} = \text{DO}_{260} \times 50 \times \text{dilution}/1000$$

L'intégrité des extraits d'ADN obtenus ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose de 0,8 % (p/v) dans un tampon TAE (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH

8,3). Les échantillons de l'ADN viral purifié et le marqueur de poids moléculaire de 1 kbp (Invitrogen Corporation, Canada) ont été dilués dans un tampon de bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), de xylène-cyanol 0,25 % (p/v) et de glycérol 30 % (p/v). Un volume de 5 µl de chaque dilution a été déposé individuellement dans un puits d'un gel d'agarose placé dans un appareil d'électrophorèse (Horizon™ 11.14 BRL, Life Technologie Inc., EU) rempli d'un tampon TAE. Un courant continu de 100 V a été appliqué durant 30 min afin de permettre la migration de l'ADN. Après cette période, le gel d'agarose a été retiré de l'appareil et placé dans un bain de bromure d'éthidium de 10 µg/ml et les bandes ont été visualisées en les soumettant aux rayons ultra-violet d'un transilluminateur (Bio-Rad, Canada).

### 3.3 *Évaluation de l'efficacité des baculovirus*

Afin de vérifier l'efficacité insecticide des différents baculovirus chez les larves de *C. fumiferana* et *C. occidentalis*, différents paramètres ont été mesurés et comparés. Ainsi, à l'aide d'épreuve biologique, la dose létale causant 50 % de mortalité dans la population (DL<sub>50</sub>) et le temps moyen de survie (TMS) ont été évalués pour le ChfugV et le CfMNPV chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette et la tordeuse occidentale de l'épinette. Les épreuves biologiques ont été réalisées en forçant l'ingestion, par les insectes, de doses spécifiques de chaque virus par la technique de la micropastille développée par Kaupp et Ebling (1990) et utilisée par Forté *et al.* (1999) chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

Des cohortes de larves du 4<sup>e</sup> stade fraîchement muées ont été laissées à jeun durant 24 h avant d'être infectées avec les différents virus. Les larves ont été transférées individuellement dans des tubes de centrifuge de 1,9 ml qui contenaient une micropastille

de 3 µg de nourriture artificielle. Chaque pastille était couverte de 2 µl d'une suspension virale correspondant à des doses de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  ou de  $1 \times 10^9$  particules virales/larve. Pour le ChfuGV et le CfMNPV, chaque dose a été préparée, en prélevant une quantité précise de virus de la suspension mère et en le diluant dans un volume de saccharose afin d'obtenir une concentration de 25 µM. Le saccharose est un stimulant alimentaire reconnu chez les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Guertin et Albert, 1992). Pour chaque virus et chaque espèce d'insectes, une cohorte de 60 larves a été soumise à chaque dilution virale. Pour chaque espèce d'insectes, une cohorte témoin a été soumise à 2 µl d'une solution de saccharose à 25 µM. Chaque expérience a été réalisée en triplicata, ce qui correspond à 180 larves par dose et par espèces d'insectes, pour un total de 1 920 larves.

Après avoir transféré les larves dans les tubes de 1,9 ml contenant les différentes doses de virus, les tubes étaient placés dans une chambre environnementale à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , une humidité relative de 60 % et un cycle de lumière 14:10 h durant 24 h. Après cette période, seules les larves ayant consommé la totalité de la micropastille ont été considérées dans la poursuite des épreuves biologiques. Après l'inoculation avec le virus, les larves ont été suppléées avec la nourriture artificielle libre de virus et elles ont été placées dans une chambre environnementale aux mêmes conditions. Au cours de la période d'incubation, de la nourriture artificielle fraîche a été ajoutée au 6<sup>e</sup> jour.

La mortalité des larves a été compilée quotidiennement jusqu'au 7<sup>e</sup> jour pour le CfMNPV et jusqu'au 12<sup>e</sup> jour pour le ChfuGV. Ces périodes correspondent à une mortalité de 100 % des larves dans un des traitements. Pour chaque virus et chaque



espèce, les valeurs estimées de la  $DL_{50}$  ont été calculées à l'aide d'une analyse PROBIT (SAS, 2002) de la version 9,1 du logiciel SAS (SAS Institute Inc., EU).

Le temps moyen de survie (TMS) des larves de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis* soumises aux différents virus a été calculé en se basant sur les observations obtenues avec une dose de  $1 \times 10^5$  granules/insecte pour le ChfuGV et  $1 \times 10^3$  corps d'inclusion pour le CfMNPV. Ainsi, pour le ChfuGV et le CfMNPV, le TMS a été estimé à l'aide de la procédure LIFETEST (SAS, 2002). Une comparaison entre le TMS des larves d'une même espèce soumises aux deux baculovirus a été réalisée par une analyse statistique de Wilcoxon sur les valeurs de rang (SAS, 2002).

### **3.4 Histopathologie**

Afin de suivre les altérations histopathologiques associées aux différents baculovirus, 2 cohortes de 25 larves de *C. fumiferana* et deux cohortes de 25 larves de *C. occidentalis* ont été infectées soit avec une dose de ChfuGV de  $1 \times 10^5$  granules/larve ou de  $1 \times 10^3$  corps d'inclusion/larve pour le CfMNPV. Ces doses correspondent à celles obtenues lors des épreuves biologiques préalables. Une cohorte de 25 larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et une cohorte de 25 larves de la tordeuse occidentale de l'épinette n'ayant pas été soumises aux préparations virales ont aussi été suivies comme témoins. Sur une base chronologique (0, 24, 72, 168 et 232 h suivant l'inoculation), cinq larves de chaque cohorte ont été recueillies aléatoirement afin de les soumettre à une étude histopathologique.

### **3.4.1 Préparation des coupes**

Les larves ont été anesthésiées en plaçant leur tête sur la glace sèche. Une fois anesthésiés, les insectes étaient décapités et les corps (thorax et abdomen) étaient placés individuellement dans le fixateur de Bouin pour une période de 48 h à 4°C. Chaque corps a subi un processus de déshydratation par des passages successifs dans une série décroissante d'alcools, d'alcool-toluène et de toluène. Les larves ont par la suite été imprégnées d'une résine Paraplast (EMS).

Les larves déshydratées et imprégnées de paraffine ont été enrobées dans un bloc de paraffine. Plus précisément, les insectes ont été placés dans un moule rigide où la paraffine liquide a été préalablement coulée à l'aide d'un distributeur de paraffine liquide à la température de 60°C (Dispensing Console, Tissus Tek, EU). Les moules contenant la paraffine et les insectes ont été refroidis sur une plaque réfrigérante (Cryoconsole, Tissus Tek, EU) et maintenus à une température de 4°C. Les larves incluses dans les blocs de paraffine ont été démoulées et coupées à une épaisseur de 4 microns à l'aide d'un microtome (Jung Biocut 2035). Ces coupes ont été déposées sur des lames histologiques (Fisher Scientifics, Canada) et incubées à 60°C dans une étuve pendant au moins 48 heures.

### **3.4.2 Coloration d'Azan**

Un traitement des coupes histologiques à l'aide de la coloration d'Azan qui est spécifique aux virus inclus (Hamm, 1966) a été réalisé afin de révéler la présence des baculovirus dans les tissus des insectes infectés. Pour ce faire, les échantillons larvaires enrobés de paraffine, coupés à une épaisseur de 4 µm, ont été placés sur des lames histologiques, où ils ont subi un traitement thermique à 60°C durant 48 h afin de les

libérer de la paraffine. Le processus a été complété en soumettant les lames à trois bains successifs de 10 min dans du toluène, suivi d'une hydratation des coupes par une succession décroissante de bains d'alcool (éthanol 100 %, 95 %, 70 % et 50 %). Après un bain final de 5 min dans l'eau distillée, les coupes ont été incubées dans une solution d'acide acétique 50 % (v/v). Les coupes ont alors subi deux étapes de lavage avec de l'eau distillée, chacune d'une durée de 5 min. Elles ont été colorées avec une solution d'azocarmine 0,1 % durant 5 min, suivi de deux lavages de 2 minutes chacun. Ensuite, une immersion rapide de 30 secondes dans une solution aniline bleue alcoolique de 1 % a été réalisée, suivie d'un lavage rapide à l'eau. Le contraste de la coloration a été effectué par l'ajout du colorant vert-rapide durant 15 min. L'excès du colorant a été enlevé par des rinçages rapides avec l'eau. Finalement, les lames ont été soumises à une série de bains d'alcools (50 %, 70 %, 95 % et 100 %) afin d'hydrater les coupes et les préparer pour le passage au toluène et le montage final dans une solution Permound (EMS). Les tissus colorés ont été observés au microscope (Nikon modèle E800) et des photos ont été prises aux différents intervalles aux fins de comparaison.

### **3.5 *Détection des baculovirus par hybridation in situ et immunohistochimie***

Suite à l'observation d'altérations histopathologiques chez les larves infectées par le ChfūGV et le CfMNPV, il était important de démontrer que ces virus étaient responsables et associées aux modifications observées des tissus larvaires. Pour ce faire, la technique d'hybridation *in situ* a été utilisée. Cette approche permet la détection de la présence de l'acide nucléique virale dans les cellules hôte en utilisant une sonde complémentaire des acides nucléiques marquée par la digoxigénine (Ausubel, 1989; Poulos *et al*, 1994). Des sondes complémentaires au gène de la granuline et au gène de la

p10 du ChfuGV et du gène de la polyédrine du CfMNPV ont été construites. Suite à la réaction d'hybridation, l'ajout d'un anticorps anti-digoxigénine couplé à l'enzyme phosphatase alcaline et au substrat NBT plus BCIP (Roche Diagnostic, Canada) a permis la détection des gènes d'intérêts. Afin de valider la réaction d'hybridation, les sondes marquées ont été testées sur un extrait d'ADN total du ChfuGV et du CfMNPV.

### ***3.5.1 Production des sondes marquées à la digoxigénine***

Comme indiqué précédemment, deux gènes d'intérêt, le gène de la granuline et le gène de la p10 du ChfuGV et indirectement le gène de la polyédrine du CfMNPV, ont été choisis afin de démontrer la présence des particules virales au sein des tissus infectés. Dans le cas de la granuline, la séquence choisie pour l'amplification du gène se situe au milieu du gène de la granuline du ChfuGV et correspond à une séquence attendue de 376 nucléotides. Les amorces utilisées sont celles définies par Vincent (2000) avec l'amorce sens 5'GCGGAAAGGAATTCCTTCGCG3' (GRAFO) et l'amorce anti-sens 5'GGCGGAAGTGGTTCACATATAC3' (GRARE).

Dans le cas du gène de la protéine p10 du ChfuGV, le dessin des amorces utilisées pour le marquage est basé sur les travaux de Jean (2003) qui a identifié le gène de la protéine p10 pour la première fois chez les granulovirus. Ainsi, les amorces choisies pour amplifier le fragment du gène codant pour la protéine P10 étaient l'amorce sens 5'CGCATGCGCATGTCTAAACCGAGTATT3' (p10FW) et l'amorce anti-sens 5'GTCTGATATAAAGTAAGATTCGAA3' (p10RII).

La détection indirecte de la protéine majeure des nucléopolyédrovirus, la polyédrine, a été réalisée en utilisant les amorces sens et anti-sens qui codaient pour le

gène de la granuline. Une analyse des séquences des ses amorces, vis-à-vis le gène de la polyédrine, nous a permis d'identifier un niveau d'homologie acceptable pour leur utilisation comme marqueur de la polyédrine.

Pour chaque gène sélectionné, une réaction d'amplification a été réalisée afin de fabriquer des étalons internes permettant la détection des gènes d'intérêt. L'amplification des sondes marquées a été réalisée en utilisant 10 ng d'ADN viral purifié, l'ADN du ChfuGV pour le gène de la granuline et le gène p10, dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant du tampon 10X (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM), un mélange de dNTPs marqués (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à la digoxigénine (Roche Diagnostic, Canada) à une concentration de 100 µM de chaque dNTP, les amorces sens et anti-sens du gène d'intérêt à une concentration de 40 p-moles chacune, et une unité de *Expand<sup>TM</sup> High Fidelity* (Roche Diagnostics, Canada). La réaction d'amplification de la sonde marquée par PCR a été effectuée dans un thermocycleur programmable (PE 9600, Perkins Elmer, Canada) selon les paramètres suivants : dénaturation de l'ADN pendant quinze secondes à 94°C, appariement des amorces à l'ADN dénaturé pendant 30 secondes à 55°C et extension des amorces pendant 30 secondes à 72°C. Ce cycle a été répété 35 fois et a été suivi d'une étape d'extension de 10 minutes à 72°C qui a permis d'obtenir des copies de pleine longueur. Pour confirmer que les fragments obtenus étaient bien ceux des gènes de la granuline et de la p10 chez le granulovirus, les produits du PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % comme décrit à la section 4.2.3.2.

### 3.5.2 *Hybridation in situ*

La technique d'hybridation *in situ* a été utilisée afin de révéler la présence du génome viral dans les cellules des insectes infectés à partir des sondes des gènes marqués à la digoxigénine: granuline et p10 chez le ChfuGV.

Des coupes d'insectes sains et infectés préparées selon l'approche décrite à la section 4.4.1, ont été déparaffinées à l'aide de trois incubations de 15 min dans le toluène (Sigma, Canada). Les tissus ont ainsi pu être hydratés en plongeant deux fois, pendant 10 min, les lames dans un bain d'éthanol 100 % suivi d'une série de bains dans une succession décroissante d'éthanol 90 % (v/v), 80 % (v/v), 50 % (v/v) et d'eau distillée stérile durant 5 min. Un volume de 50 µl de protéinase K (Sigma, Canada) d'une concentration de 10 ng/ml a été ajouté sur les tissus et le tout a été recouvert d'une lamelle de verre (Fisher Scientifics, Canada). Les lames ont été incubées pendant 10 min dans un incubateur à 37°C afin de permettre l'activité enzymatique. Après cette incubation, les lamelles ont été délicatement retirées des lames et les coupes tissulaires ont été stabilisées par un traitement de 10 min à 4°C dans une solution de formaldéhyde 4 % (v/v). Trois lavages dans le PBS 1X pendant 5 min et un lavage dans l'eau distillée pendant une minute ont suivi le temps de fixation. Les tissus ont été traités avec 100 µl de triéthanolamine (TEA) 0,1 M, puis recouvert d'une nouvelle lamelle de verre avant d'être incubés 5 min à température de la pièce. Cette étape permet d'éliminer les charges négatives présentes sur les tissus ce qui favorise la formation de liens entre la sonde marquée et l'ADN ciblé. Les lames ont été lavées 5 min dans le SSC 2X (NaCl 0,3 M et citrate de sodium 0,03 M) et les tissus ont été déshydratés en immergeant les lames dans

une succession de bains d'éthanol 50 % (v/v), 80 % (v/v) et 90 % (v/v) pendant 30 sec et dans l'éthanol 100 % durant 1 min.

Les tissus et la sonde ont été dénaturés à 95°C pendant 5 min. La dénaturation des tissus a été réalisée dans un thermocycleur Perkin Elmer 9600 en déposant les lames sur la plaque chauffante recouverte d'un papier d'aluminium permettant une distribution uniforme de la chaleur. Pour sa part, la dénaturation de la sonde a été effectuée dans un bain d'eau bouillante pendant 5 min. Suite à la dénaturation, les lames et la sonde ont été déposées sur la glace pendant 5 min. Un volume de 50 µl de la sonde à une concentration de 1 ng/µl a été déposé sur les tissus qui ont été recouverts d'une lamelle de verre. Les lames ont été placées dans un incubateur contenant 50 % (v/v) de formamide pendant 3 h à 42°C. Après avoir retiré les lamelles, les tissus ont été soumis à une série de bains dans des tampons SSC 2X, de SSC 1X (NaCl 0,15 M et citrate de sodium 0,015 M) et de SSC 0,5X (NaCl 0,075 M et citrate de sodium 0,0015 M) durant 10 min chacun, pour ensuite être transférés pour 1 h dans un bain de tampon SSC 0,5X à 42°C et finalement dans un bain de tampon SSC 0,5X à la température de la pièce pendant 5 min. Tous les lavages ont été effectués à la même vitesse sur une plaque agitatrice placée à l'intérieur de l'incubateur. Les lames ont ensuite été rincées dans le tampon SSC 1X pendant 5 min. Un volume de 100 µl d'une solution de blocage 1 % (Roche Diagnostic, Canada) a été déposé sur les tissus pour ensuite être recouverts d'une lamelle de verre avant d'être incubés dans le tampon 1 (Roche Diagnostic, Canada) pendant 1 h à 37°C, suivi d'un lavage de 5 min. Un volume de 50 µl d'anticorps anti-digoxigénine (Roche Diagnostic, Canada) dilué 1/500 dans la solution de blocage 1 % a été déposé sur les tissus qui ont été recouverts d'une lamelle de verre et incubés toute la nuit à 4°C. Les lames ont été lavées

à deux reprises dans un tampon SSC 1X pendant 10 min et rincées dans le tampon SSC 0,5X durant 5 min. Pour révéler l'hybridation entre la sonde marquée et l'ADN viral, 100 µl d'une solution chromogène, contenant 4,5 µl de NBT (Roche Diagnostic, Canada), 3,5 µl de BCIP (Roche Diagnostic, Canada) et 992 µl d'eau distillée stérile, ont été déposés sur les tissus et recouverts d'une lamelle de verre. Les lames ont été incubées 18 h à la température de la pièce et à la noirceur. Les lames ont été observées au microscope optique afin de vérifier le signal découlant de la réaction d'hybridation. Des photomicrographies ont été prises à l'aide d'un photomicroscope (E800, Nikon, Canada) équipé d'une caméra numérique.

### **3.5.3 Immunohistochimie**

Une approche d'immunohistochimie a aussi été utilisée pour confirmer la présence des particules virales dans les coupes histologiques des insectes. Ainsi, un suivi de l'expression de certaines protéines virales a été réalisé. Des coupes de 4 µm de larves infectées et de larves témoins récoltées sept jours après l'inoculation ont été soumises à l'étude d'immunohistochimie. Les coupes déparaffinées étaient, dans un premier temps, soumises à une hydratation dans une solution de PBS (solution saline tamponnée) durant 5 min et par la suite incubées dans une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3 % durant 5 min. Les lames ont été placées dans un bain contenant une solution de PBS contenant du BSA (albumine du sérum bovin) à 5 % durant 30 min afin de bloquer les sites non spécifiques. Dans le cas des larves infectées par le ChfuGV, les coupes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec des anticorps polyclonaux dirigés contre la granuline ou dirigés contre la protéine p10 du ChfuGV. Les anticorps polyclonaux ont été préalablement dilués dans un rapport de 1:500 dans une solution de PBS contenant du BAS à 1 %. Les lames ont par la suite



été placées en présence d'anticorps de chèvre anti-IgG-biotine de souris durant 1 h. Après quatre lavages dans une solution de blocage de PBS contenant du BSA à 5 %, les coupes furent incubées avec le conjuguât ExtrAvidine peroxydase (Calbiochem, EU) afin d'accroître la résolution du signal de la réaction. La détection a été effectuée avec l'ajout de la solution diaminobenzidine utilisé comme un donneur des électrons et les résultats ont été documentés au photomicroscope (E800, Nikon, Canada) équipé d'une caméra numérique.

### **3.6 Protocole suivi pour la démonstration de la transmission verticale**

#### **3.6.1 Infections sous-létales**

Des cohortes de cinq larves du 4<sup>e</sup> stade de *C. fumiferana* ont été élevées sur nourriture artificielle dont la surface avait été inoculée avec 75 µl d'une solution de  $1 \times 10^3$  granules de ChfugV correspondant à une concentration sous-létale. Après 24 h, les larves infectées ont été transférées dans de nouveaux godets contenant de la nourriture artificielle sans virus et placées en chambre environnementale à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , une humidité relative de 60 % et une photopériode de 16:10 h (clarté : noirceur). Les larves ont été observées tous les jours jusqu'à leur mue en chrysalide (environ 12 jours). Les chrysalides ont été récoltées et leur sexe a été déterminé sur les bases du nombre de segments abdominaux (4 pour les femelles et 5 pour les mâles). Les chrysalides ont été placées au frais afin de permettre la synchronisation de l'émergence des adultes et par conséquent l'accouplement.

L'accouplement a été réalisé en isolant les femelles et les mâles, dans un ratio de 1:2, dans des petits contenants de plastique recouverts d'une mousseline et dans lesquels des bandelettes de papier parafilm avaient été déposées comme substrat de ponte. Les

cages placées avec une moustiquaire en chambre environnementale à une température de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , une humidité relative de 60 % et une photopériode de 16:10 h (clarté : noirceur). Après la ponte, les œufs déposés sur des morceaux de papier parafilm ont été récupérés et décontaminés dans une solution hypochlorite de sodium 10 %. La solution a été filtrée et le filtre contenant les œufs a été rincé avec de l'eau distillée stérile. Le filtre a, par la suite, été séché et les œufs ont été dénombrés avant d'être placés dans un sac de plastique dans une chambre environnementale à une température de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , une humidité relative de 60 % et une photopériode de 16:10 h (clarté : noirceur). Après une période d'environ 10 jours, l'éclosion de certains œufs a été observée. La viabilité des œufs a été estimée à moins de 5 %. Parallèlement, des groupes témoins ont été établis et les larves ont eu une croissance, accouplement et ponte des œufs normaux.

Pour cette expérience, différents stades de développement des insectes ont été considérés, soit : des larves du 4<sup>e</sup> stade ayant été infectées avec une concentration sous-létale, des femelles adultes survivantes à l'infection sous-létale, des œufs issus de l'accouplement des mâles et des femelles soumis au virus et, finalement, les larves de 1<sup>er</sup> stade provenant de ces accouplements. De plus, des analyses des ovaires des femelles survivantes ont été effectuées par coloration Azan et par hybridation *in situ* en microscopie confocale. Des échantillons ont été récoltés et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant différentes étapes du protocole pour des analyses postérieures par PCR.

### **3.6.2 Détection par PCR de l'ADN viral du ChfuvGV**

L'ADN des échantillons récoltés a été purifié par la technique phénol-chloroforme, telle que décrite à la section 4.2.3.2. La présence de particules virales

associées au ChfuGV a été détectée par amplification par PCR en présence des amorces du gène de la protéine P10.

Pour la réaction de la polymérase en chaîne, 50 ng de l'ADN extrait des insectes infectés ont été utilisés dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant du tampon 10X (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM), un mélange de dNTPs à une concentration de 100 η-moles de chaque dNTP, les amorces sens et anti-sens du gène de la P10 à une concentration de 40 ρ-moles chacune et 2 unités de l'enzyme Taq polymérase (Sigma). La réaction d'amplification par PCR a été effectuée dans un thermocycleur programmable Perkins Elmer 9600. Les paramètres expérimentaux au cours du cycle d'amplification ont été choisis comme suit : dénaturation de l'ADN matrice pendant quinze secondes à 94°C, appariement des amorces à l'ADN dénaturé pendant 30 secondes à 55°C et extension des amorces, pendant 30 secondes à 72°C. Ce cycle a été répété 35 fois et suivi d'une étape d'extension de 10 minutes à 72°C qui a permis d'obtenir des copies de pleine longueur. Les produits du PCR pour chaque échantillon ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %, comme décrit à la section 3.2.3.2.

#### 3.6.2.1 Hybridation *in situ* des ovaires infectés

Des ovaires des femelles adultes ont été récoltés après la ponte des œufs et ont été traités selon le protocole pour l'hybridation *in situ* décrit à la section 5.4.3.2. Les femelles adultes ont été anesthésiées par compression du thorax pendant 20 secondes sur de la glace sèche. À l'aide d'une loupe binoculaire, les femelles étaient alors placées et immobilisées dorsoventralement à l'aide d'aiguilles de tungstène sur une plaque de dissection entomologique. Afin d'exposer les ovaires, une première incision transversale

a été pratiquée à la hauteur du dernier segment abdominale. Une seconde incision longitudinale a été réalisée à partir du milieu de l'incision transversale en direction du thorax exposant ainsi les ovaires. Les ovaires ont été prélevés et rincés avec une solution saline tamponnée. Ils ont ensuite été fixés avec paraformaldéhyde 4 % avant d'être transférés dans un flacon qui contenait le même fixateur et maintenus à 4°C durant 24 h.

Des essais d'hybridation de coupes paraffinées d'ovaires ont été tentés sans succès, puisque les ovaires ne restaient pas sur les lames après le traitement. Par la suite, une technique d'hybridation des ovaires non paraffinés a été utilisée. Dans ce cas, seule l'étape finale de révélation a été changée en utilisant des anticorps anti-digoxigénine couplés à la fluorescéine (Roche Diagnostic, Canada) et les analyses ont été effectuées par microscopie confocale.

#### 3.6.2.2 Coloration Azan des ovaires infectés et des larves F1

Des ovaires de femelles adultes infectées et non infectées ont été récoltés après la ponte des œufs et ont été soumis à la coloration Azan pour la détection du virus. La procédure utilisée était la même que celle décrite à la section 3.4.2. Des ovarioles montrant un développement des follicules ont ainsi pu être suivies et ont permis de montrer la présence du granulovirus. Des coupes des larves F1 au 2<sup>e</sup> stade ont été colorés par Azan. Malheureusement les tentatives d'hybridation *in situ* dans ces coupes ont été infructueuses, étant donné la fragilité des tissus larvaires à ce stade.

## Chapitre 4

### Résultats

#### 4.1 Épreuves biologiques

Dans le but de documenter les variations du titre insecticide du ChfuGV et du CfMNPV chez les larves de *C. fumiferana* et *C. occidentalis*, des épreuves biologiques ont été réalisées. Les résultats montrent que le ChfuGV a un titre insecticide plus important chez les larves de 4<sup>e</sup> stade de *C. fumiferana*, avec une DL<sub>50</sub> de  $4 \times 10^5$  granules/larve, que chez les larves de *C. occidentalis* chez lesquelles une DL<sub>50</sub> de  $1.02 \times 10^8$  granules/larve a été obtenue (tableau 1). Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre le titre insecticide du CfMNPV chez les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette ( $4.0 \times 10^3$  corps d'inclusion/larve) et celles de la tordeuse occidentale de l'épinette ( $4.2 \times 10^3$  corps d'inclusion/larve) (tableau 2).

Au niveau du taux moyen de survie, il existe une différence significative du taux moyen de survie entre les larves de *C. fumiferana* ( $8,1975 \pm 0,2667$  j) et les larves de *C. occidentalis* ( $11,8941 \pm 0,2147$  j) soumises au ChfuGV (test d'homogénéité;  $p < 0,001$  pour le test de Wilcoxon) (tableau 3). Ces résultats viennent supporter les différences observées au niveau des DL<sub>50</sub> du granulovirus chez les deux espèces d'insectes. Par contre, dans le cas du CfMNPV, aucune différence significative n'a été trouvée entre le taux moyen de survie des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et celles de la tordeuse occidentale de l'épinette (test d'homogénéité;  $p = 0,3813$  pour test de Wilcoxon) avec respectivement  $7,7821 \pm 0,1523$  j et  $7,8794 \pm 0,1800$  j.

Tableau 1- Estimation de la dose létale (DL) chez les larves du 4<sup>e</sup> stade de *C. fumiferana* et *C. occidentalis* soumises à différentes concentrations du ChfuGV

	<i>C. fumiferana</i>			<i>C. occidentalis</i>		
	Granules	Intervalle de confiance <sup>1</sup>		Granules	Intervalle de confiance	
		Inférieur	supérieur		inférieur	Supérieur
DL <sub>10</sub> <sup>2</sup>	0.8X10 <sup>4</sup>	1.7X10 <sup>3</sup>	2.3X10 <sup>4</sup>	5.7X10 <sup>6</sup>	1.5X10 <sup>5</sup>	3.1X10 <sup>7</sup>
DL <sub>50</sub> <sup>3</sup>	4X10 <sup>5</sup>	3.8X10 <sup>3</sup>	5.5X10 <sup>6</sup>	1.02X10 <sup>8</sup>	3.2X10 <sup>7</sup>	4.2X10 <sup>9</sup>
DL <sub>90</sub> <sup>4</sup>	8.8X10 <sup>5</sup>	8.2X10 <sup>4</sup>	9.6X10 <sup>5</sup>	9.0X10 <sup>10</sup>	5.0X10 <sup>10</sup>	2.1X10 <sup>12</sup>

<sup>1</sup> Intervalle de confiance 95%

<sup>2</sup> Dose létale provoquant 10% de la mortalité chez les larves

<sup>3</sup> Dose létale provoquant 50% de la mortalité chez les larves

<sup>4</sup> Dose létale provoquant 90% de la mortalité chez les larves

Tableau 2- Estimation de la dose létale (DL) chez les larves du 4<sup>e</sup> stade de *C. fumiferana* et *C. occidentalis* soumises à différentes concentrations du CfMNPV

	<i>C. fumiferana</i>			<i>C. occidentalis</i>		
	Corps d'inclusion	Intervalle de confiance <sup>1</sup>		Corps d'inclusion	Intervalle de confiance	
		Inférieur	supérieur		inférieur	Supérieur
DL <sub>10</sub> <sup>2</sup>	1.2X10 <sup>2</sup>	2.5X10 <sup>-1</sup>	1.8X10 <sup>2</sup>	1.3X10 <sup>2</sup>	1.6 X10 <sup>-5</sup>	3.0X10 <sup>3</sup>
DL <sub>50</sub> <sup>3</sup>	4.0X10 <sup>3</sup>	3.7X10 <sup>2</sup>	4.7X10 <sup>4</sup>	4.2X10 <sup>3</sup>	1.2X10 <sup>2</sup>	5.4X10 <sup>4</sup>
DL <sub>90</sub> <sup>4</sup>	1.8X 10 <sup>7</sup>	6.4X10 <sup>6</sup>	2.5X10 <sup>7</sup>	1.8X10 <sup>7</sup>	9.0X10 <sup>4</sup>	1.8X10 <sup>10</sup>

<sup>1</sup> Intervalle de confiance 95%

<sup>2</sup> Dose létale provoquant 10% de la mortalité chez les larves

<sup>3</sup> Dose létale provoquant 50% de la mortalité chez les larves

<sup>4</sup> Dose létale provoquant 90% de la mortalité chez les larves

Tableau 3 - Moyenne du temps de survie - MTS (jours) s'écoulant avant la mortalité des larves infectées de deux espèces par le ChfuGV ( $1 \times 10^5$  granules/larve) et le CfMNPV ( $1 \times 10^3$  corps d'inclusion/larve).

Espèces	ChfuGV	CfMNPV
<i>C. fumiferana</i>	8,1975 ± 0,2667	7,7821 ± 0,1523
<i>C. occidentalis</i>	11,8941 ± 0,2147	7,8794 ± 0,1800



## 4.2 *Étude histopathologique*

### 4.2.1 **Anatomie interne des larves de *C. fumiferana* au 4<sup>e</sup> stade**

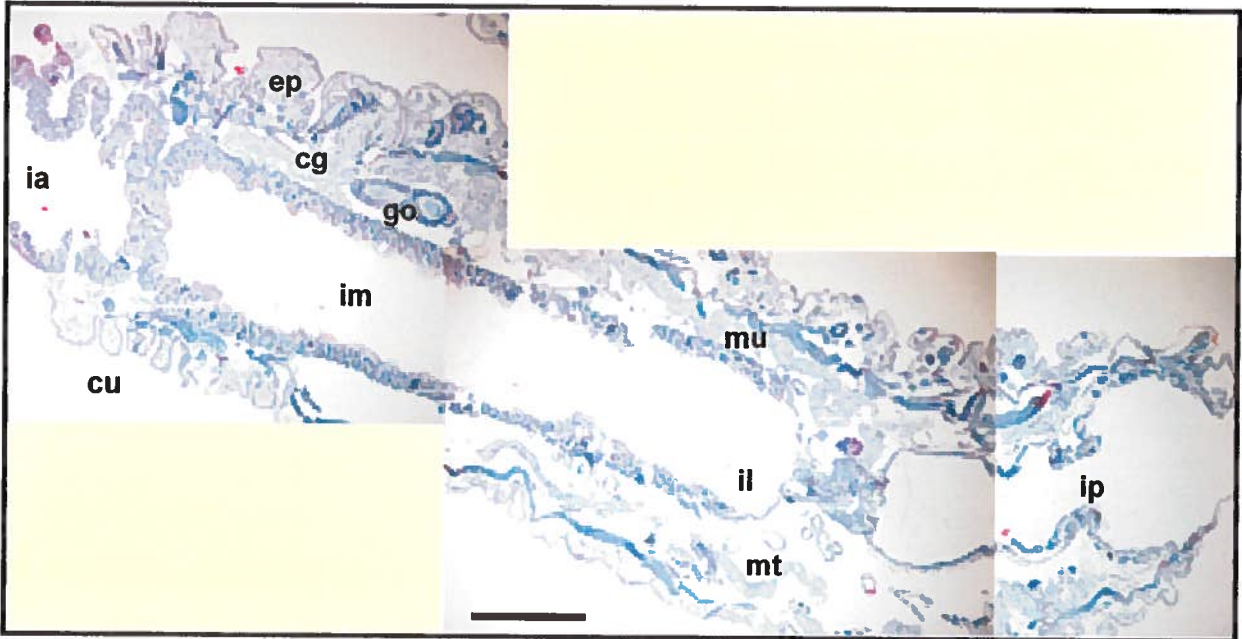
Des coupes de 4 µm de larves de *C. fumiferana* ont été colorées par la technique d'Azan (figure 1). Au 4<sup>e</sup> stade, les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette mesurent environ 5 cm et elles ont un corps cylindrique recouvert d'une cuticule. La cuticule et l'épiderme forment l'exosquelette des larves, des chrysalides et des adultes. La cuticule est d'origine épidermique et est formée de cellules colonnaires. Sous l'épiderme, on retrouve les corps gras périphériques qui forment une couche entre l'épiderme et les muscles. Plus profondément, on retrouve les corps gras intérieurs qui sont localisés près du tube digestif et sur toute la longueur du corps de la larve. Le tube digestif est formé par l'intestin antérieur qui est d'origine ectodermique, l'intestin moyen qui est d'origine endodermique, l'iléon qui est une région intermédiaire entre l'intestin moyen et l'intestin postérieur et qui joue un rôle important dans l'absorption des éléments nutritifs, et, finalement, l'intestin postérieur qui est aussi d'origine ectodermique. On remarque la présence des gonades au niveau du 5<sup>e</sup> segment du corps de l'insecte.

### 4.2.2 *Infection par le granulovirus*

#### 4.2.2.1 Infection des larves de *C. fumiferana* par le ChfuGV

La figure 2 présente les résultats des coupes histologiques de larves du 4<sup>e</sup> stade de *C. fumiferana* saines (photographies de gauche) et soumises à une DL<sub>50</sub> (4 X 10<sup>5</sup> granules/larve) du ChfuGV (photographies de droite). La figure 2A correspond aux tissus sains de larves non infectées 24 h après le début de l'expérience. On remarque que l'épiderme est formé d'une seule couche de cellules colonnaires, qui recouvre la

Figure 1. Anatomie interne d'une larve saine de *C. fumiferana* au 4<sup>ème</sup> stade en coupe transversale colorée par Azan. Montage des micrographies prises en photomicroscopie (Nikon E-800, 100X): **mt** - matrice trachéale; **cg** - corps gras; **im** - intestin moyen; **ia** - intestin antérieur; **ip** - intestin postérieur; **il** - iléon, **ep** - épiderme; **cu** - cuticule; **mu** - muscle; **go** - gonades.

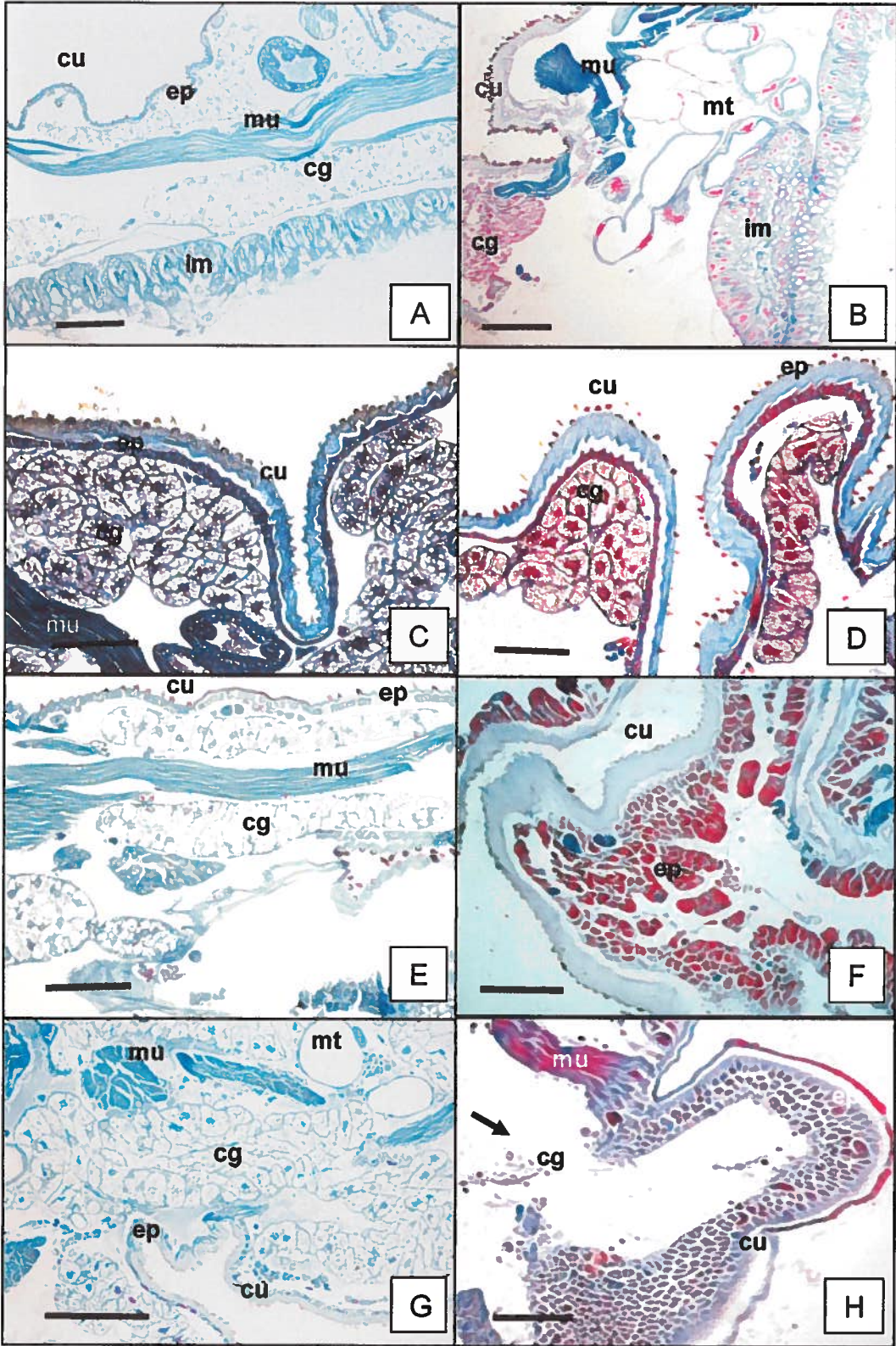


cuticule formée principalement de chitine. Au niveau de l'haemocèle, on trouve les corps gras périphériques, les muscles et plus profondément les corps gras intérieurs. Les corps gras sont des agglomérats des cellules adipeuses enveloppées par une lamelle basale. On remarque aussi la couche épithéliale de l'intestin moyen formée par les cellules colonnaires et les cellules en gobelets qui sont enveloppées par une lamelle basale et par les corps gras intérieurs. Par contre, pour la même période, les larves infectées par le granulovirus montrent une coloration rouge au niveau des cellules de l'intestin moyen, des cellules de la matrice trachéale et des corps gras intérieurs (figure 2B). Cette couleur rouge correspond à la fixation de la coloration d'Azan aux corps d'inclusion des particules virales.

Soixante-douze heures suivant l'inoculation par le ChfuGV, les insectes infectés révèlent la présence de virus au niveau des corps gras périphériques (figure 2D). On remarque aussi une généralisation de l'infection au niveau de l'épiderme ce qui n'est pas le cas des larves saines (figure 2C). En effet, on remarque que les structures internes des insectes non infectés conservent le même aspect morphologique décrit au début de l'expérience.

Après 168 h (7 jours), l'épiderme des insectes est fortement infecté et il y a une prolifération intense des cellules colonnaires (figure 2F). Cette prolifération caractérise les infections par les baculovirus. Ainsi, on remarque un épaissement de l'épiderme et la présence du virus dans l'ensemble des cellules des insectes.

Figure 2. Étude histopathologique des larves de *C. fumiferana* soumises au ChfuGV à une concentration de  $10^5$  granules/larve. Altérations de l'organisation des tissus larvaires en fonction du temps d'infection. Les photographies de la colonne de gauche correspondent à des larves saines, tandis que celles de la colonne droite correspondent à des larves infectées par le ChfuGV. A-B : 24h barre :  $10\mu\text{m}$ , C-D : 72h barre :  $10\mu\text{m}$ , E-F : 168h barre :  $10\mu\text{m}$  et G-H : 232h barre :  $10\mu\text{m}$ . **mt** - matrice trachéale; **cg** - corps gras; **im** - intestin moyen; **ep** - épiderme; **cu** - cuticule; **mu** - muscle.



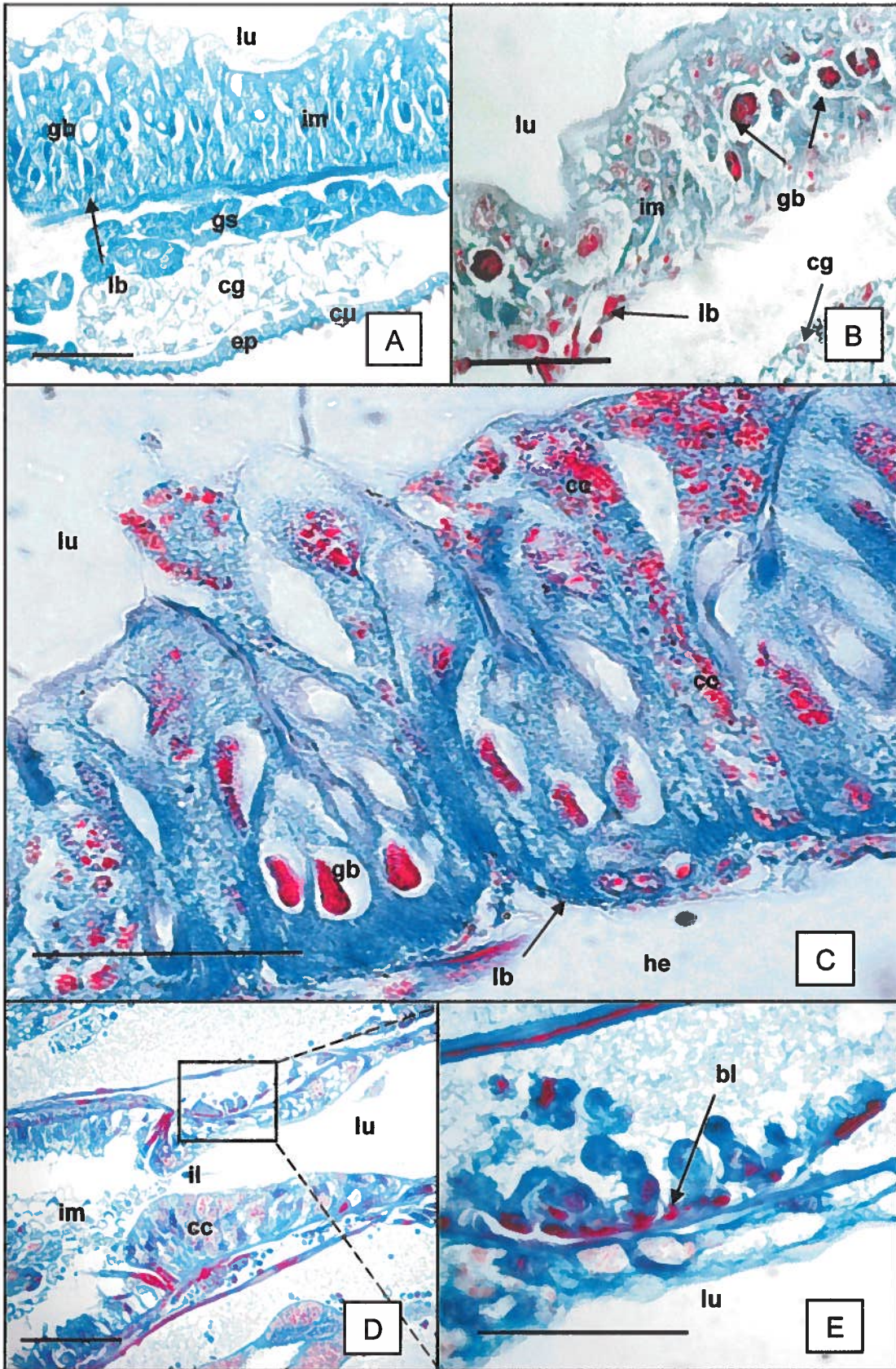
Pour sa part, aucun changement n'est observé chez les larves saines tant au niveau de l'épiderme qui est formé d'une seule couche de cellules, qu'au niveau des autres tissus qui ne présentent aucune altération notable (figure 2E).

Finalement, on observe une intense stratification des couches cellulaires de l'épiderme 232 h (12 jours) suivant l'inoculation des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette infectées par le ChfuGV (figure 2H). L'épaisseur de l'épiderme peut être évaluée comme dix fois celle de l'épiderme des insectes sains (figure 2G). La majorité des tissus sont colorés en rouge indiquant la présence abondante de virus. Normalement, les virus se retrouvent au niveau du cytoplasme où ils seront libérés par lyse cellulaire. Ainsi, on remarque que les corps gras sont déjà en phase de dégénération, et on observe un important processus d'amincissement de l'épaisseur de la cuticule (figure 2H).

La figure 3 présente les changements importants observés au niveau de l'intestin moyen des larves de *C. fumiferana* infectées par le ChfuGV. La figure 3A montre une coupe d'une larve saine où l'on peut observer la couche épithéliale et la lamelle basale colorées en bleu. Après 72 h, on observe, chez les larves infectées, que les noyaux des cellules épithéliales et la lamelle basale prennent une coloration de rouge indiquant la présence de virus (figure 3B). L'observation de la couleur rouge au niveau de la lamelle basale vient supporter l'hypothèse que les granulovirus utilisent cette structure pour atteindre d'autres tissus larvaires. Une magnification de 800X montre en détail les cellules épithéliales infectées par les granules (figure 3C). On observe la présence de virus au niveau du cytoplasme des cellules colonnaires, à la hauteur de la lamelle basale et aussi dans les cavités des cellules gobelets.

Figure 3. Détail des altérations morphologiques au niveau de l'intestin moyen chez les larves de *C. fumiferana* infectées par le ChfúGV. A – larve saine 72h Barre : 10µm , B – larve infectée après 72h Barre : 10µm, C – détail de l'épithélium intestinal des larves infectés après 168h Barre : 100µm, D – région de l'iléon après 168h Barre : 10µm , E- Détail de la lamelle basale de la région de l'iléon, Barre : 100µm; **cg** – corps gras; **im** - intestin moyen; **il** – iléon; **ep** – épiderme; **cu** – cuticule; **mu** – muscle; **lb** – lamelle basale; **cc**- cellules colonnaires; **gb** – cellules gobelets; **lu** – lumen.



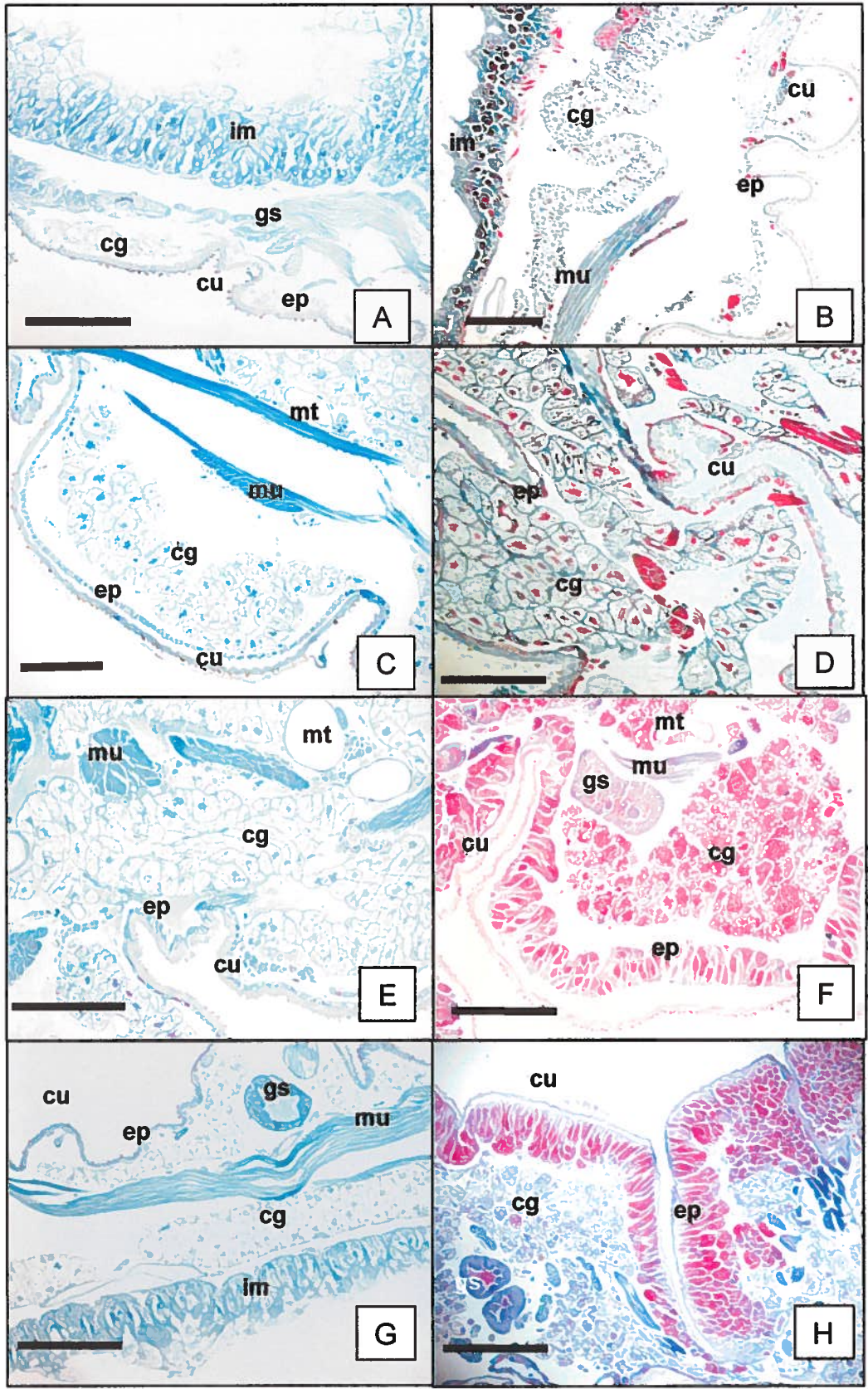


Pour sa part, la figure 3D montre la région de l'iléon d'une larve infectée par le ChfuGV à 168 h. On peut observer le développement d'une prolifération importante des cellules infectées dans cette région. Finalement, à une plus importante magnification, on observe une concentration élevée d'hémocytes infectés par le virus (figure 3E).

#### 4.2.2.2 Infection des larves de *C. occidentalis* par le ChfuGV

La figure 4 montre les résultats de l'infection des larves du 4<sup>e</sup> stade de *C. occidentalis* par le ChfuGV. Sur une base chronologique, les photographies de gauche sont celles de larves saines, tandis que celles de droite proviennent de larves infectées. La figure 4A montre une coupe d'une larve saine 24 h après le début de l'expérience. Pour la même période, la coloration rouge observée sur la figure 4B indique qu'il y a établissement d'une infection virale dans l'intestin moyen, la lamelle basale et les corps gras intérieurs des larves infectées. En comparant les résultats obtenus avec *C. fumiferana* pour la même période, on observe que l'infection est moins sévère chez les larves de la tordeuse occidentale de l'épinette. Les photographies 4C et 4D montrent les différences entre les larves non infectées et infectées 72 h après le début de l'expérience. Dans le cas des larves infectées, on observe la présence de virus au niveau des corps gras périphériques et de l'épiderme. Mais de façon générale, les tissus larvaires de *C. occidentalis* sont moins affectés que ceux de la tordeuse des bourgeons de l'épinette pour la même période (figure 2D). Après 168 h, on observe peu de changement dans la structure des tissus des larves non infectées (figure 4E), on note que l'épiderme est formé

Figure 4. Étude histopathologique de l'infection du ChfuGV en larves de *C. occidentalis* soumises à une concentration de  $10^5$  granules/larve. Colonne gauche : larve non infectée A -24h Barre :  $10\mu\text{m}$  , C - 72h Barre :  $10\mu\text{m}$  , E - 168h Barre :  $10\mu\text{m}$  et G - 232h Barre :  $10\mu\text{m}$ , colonne droite : larve infectée par le ChfuGV B -24h Barre :  $10\mu\text{m}$ , D - 72h Barre :  $10\mu\text{m}$ , F - 168h Barre : et H - 232h Barre:  $10\mu\text{m}$  . **mt** - matrice trachéale; **cg** - corps gras; **im** - intestin moyen; **ep** - épiderme; **cu** - cuticule; **mu** - muscle, **gs** - gland de soie.



d'une seule couche des cellules. Par contre, chez les larves de *C. occidentalis* inoculées avec le ChfuGV, on remarque une hypertrophie des cellules infectées de l'épiderme et des corps gras (figure 4F). Cependant, pour la même période, la stratification de l'épiderme observée chez *C. fumiferana* (figure 2F) n'est pas présente chez la tordeuse occidentale de l'épinette. Finalement, on observe que l'épiderme et les corps gras des larves de *C. occidentalis* sont fortement infectés après 232 h. Cette infection se caractérise par l'hypertrophie remarquable des cellules infectées, surtout au niveau de l'épiderme. En général, les altérations histologiques retrouvées chez *C. occidentalis* sont beaucoup moins importantes que dans le cas de *C. fumiferana*.

Malgré une proximité phylogénétique entre les deux espèces d'insectes, les résultats histologiques et des épreuves biologiques indiquent une plus grande spécificité du ChfuGV pour les larves de *C. fumiferana*. Ainsi, l'infection du ChfuGV chez *C. fumiferana* est plus sévère dans les tissus comme les corps gras, l'épiderme et la matrice trachéale (figure 5D, F, H) que chez les larves de *C. occidentalis* (figure 5C, E, G). La comparaison des altérations histopathologiques observées chez les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et la tordeuse occidentale de l'épinette infectées par le ChfuGV est résumée au tableau 4. Une différence significative dans l'infection des deux espèces est la présence d'une stratification rapide et très prononcée de l'épiderme chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Chez la tordeuse occidentale de l'épinette, les cellules de l'épiderme subissent une hypertrophie et le phénomène de stratification s'installe seulement après le 7<sup>e</sup> jour. L'infection des corps gras est beaucoup plus

Figure 5. Comparaison des altérations morphologiques suite à l'infection du ChfuGV en différents tissus chez les larves de *C. fumiferana* et *C. occidentalis* au 7<sup>ème</sup> jour, colonne gauche : *C. occidentalis*, colonne droite: *C. fumiferana*. A-B larve saine Barre : , C-D matrice trachéale Barre : 10µm, E-F corps gras Barre : 10µm, G-H épiderme Barre : 10µm. **mt** - matrice trachéale; **cg** – corps gras; **ll** – lobule lipidique; **ep** – épiderme; **cu** – cuticule; **nu** – noyau.

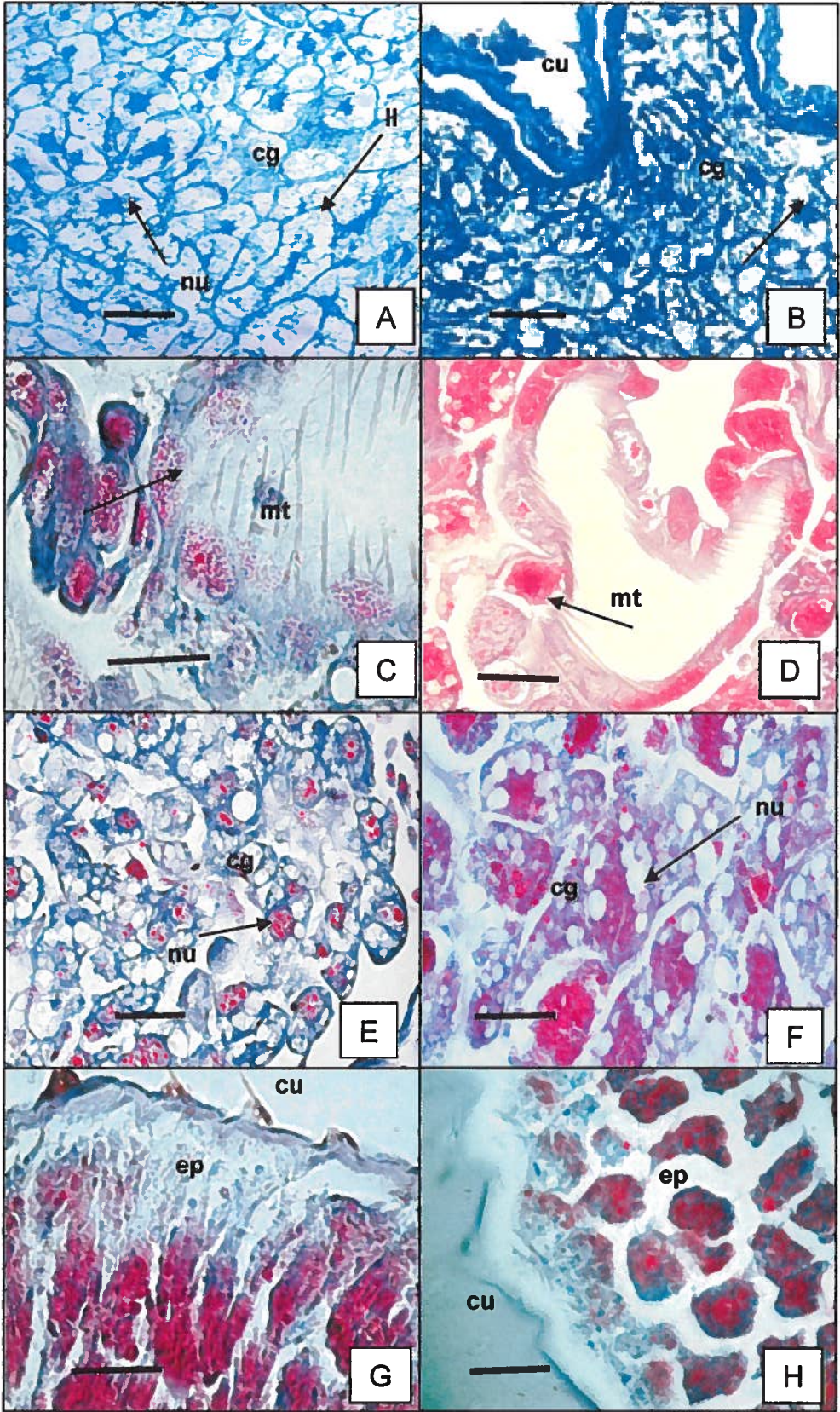


Tableau 4 – Comparaison de l’histopathologie de l’infection de ChfuGV chez les larves au 4<sup>ème</sup> stade de deux espèces, *C. fumiferana* et *C. occidentalis* en différents tissus au 7<sup>e</sup> jour (168h) après inoculation.

Altération	<i>C. fumiferana</i>	<i>C. occidentalis</i>
Prolifération cellulaire/iléon	+++	-
Cellules de la matrice trachéale	+	+
Hypertrophie des cellules du corps gras	+++	++
Hypertrophie des cellules épidermales	++	+++
Stratification de l’épiderme	+++	+
Amincissement de la cuticule	+++	+



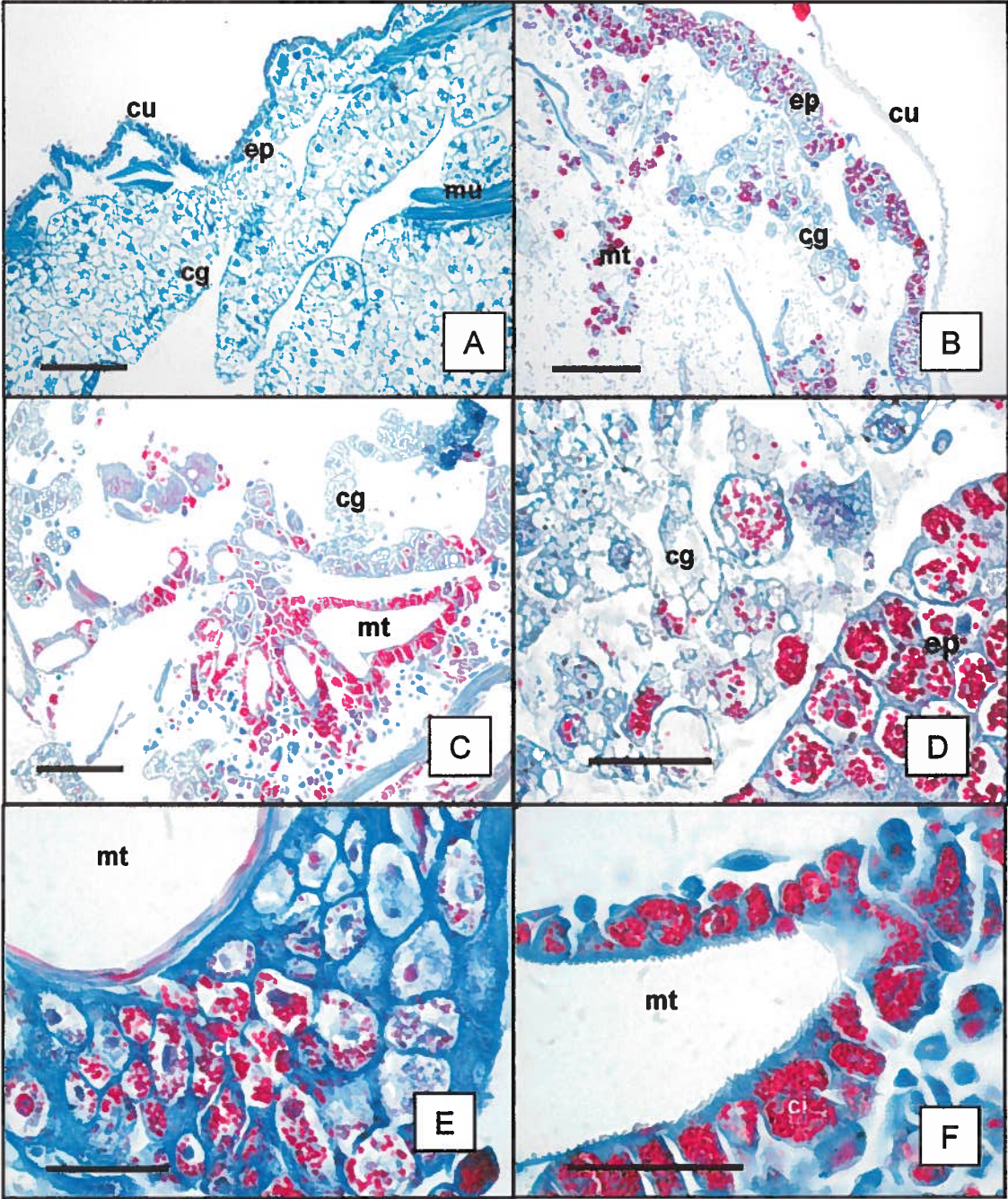
virulente et sévère chez les larves de *C. fumiferana* comparativement à celles de *C. occidentalis*. Après 168 h, les cellules adipeuses des larves infectées de *C. fumiferana* présentaient une hypertrophie du cytoplasme et après 232 h on observe une désorganisation des tissus résultant de la lyse cellulaire. Chez *C. occidentalis*, les cellules des corps gras présentaient, au 7<sup>e</sup> jour une infection importante de leurs noyaux, mais aucune hypertrophie des cytoplasmes n'était observée. Au niveau de l'intestin moyen, la présence du virus chez les larves de *C. fumiferana* a déclenché une réaction localisée de prolifération cellulaire dans l'iléon. Ce phénomène n'a jamais été observé chez les larves de *C. occidentalis*. De plus, on observe un amincissement plus important de l'épaisseur de la cuticule après 168 h, ce qui a été observé chez les larves de *C. occidentalis* seulement après 12 jours. Finalement, les matrices trachéales des deux espèces ont été infectées par le granulovirus. Cependant, la cinétique de l'infection dans ces tissus est beaucoup plus lente puisque la présence de virus n'est confirmée, par hybridation *in situ*, que seulement après 7 jours chez les deux espèces d'insectes.

### **4.2.3 Infection par le nucléopolyédrovirus**

#### **4.2.3.1 Infection des larves de *C. fumiferana* par le CfMNPV**

La figure 6 montre l'histopathologie de l'infection par le CfMNPV avec le DL<sub>50</sub> (10<sup>3</sup>CI/larve) chez les larves de *C. fumiferana*. La coupe d'une larve saine de *C. fumiferana*, récoltée 24 h après le début de l'expérience, montre l'intestin moyen, les corps gras et l'épiderme colorés en bleu et on observe aucune anomalie dans les tissus (figure 6A). Par contre, après 72h, on note la présence de particules virales chez les larves soumises au CfMNPV (figure 6B). Ainsi, les corps gras, l'épiderme et la matrice trachéale sont infectés.

Figure 6. Histopathologie des principaux tissus des larves de *C. fumiferana* infectées après 72h et au 7<sup>e</sup> Jour (168h) par le CfMNPV. A – Larve saine Barre : 100µm B - Matrice trachéale, corps gras et épiderme infectés Barre : 100µm , C – matrice trachéale hautement infectée Barre : 100µm D – Détail de l'épiderme et corps gras infectés, E – Détail des cellules de la matrice trachéale et des corps d'inclusion (en rouge) Barre : 100µm, F- Détail des cellules du corps gras et de l'épiderme en lise cellulaire causée par la réplication virale (en rouge – corps d'inclusion) Barre : 100µm. **mt** - matrice trachéale; **ci** – cellule infectée, **cg** – corps gras; **ep** – épiderme; **cu** – cuticule; **mu** – muscle.



Après 168 h (7 jours), l'infection est disséminée aux principaux tissus larvaires et la matrice trachéale présente une formidable charge virale (figure 6C, D). La matrice trachéale a une épaisseur plus importante comparativement à celle d'une larve saine (figure 6A). Cette augmentation est normalement associée à une prolifération intense des cellules infectées suggérant qu'il s'agit d'un site propice à la multiplication du virus. Au niveau des cellules des corps gras et de l'épiderme, on note un processus de vacuolisation cellulaire prononcée qui n'a pas été observé chez l'infection par le ChfuGV

La figure 7 montre, comme dans le cas du granulovirus, que la lamelle basale est utilisée par le nucléopolyédrovirus pour atteindre l'hémocèle et les autres tissus des larves. La figure 7A montre une coupe d'une larve infectée par le CfMNPV 24 h après infection. On observe la présence du virus dans l'intestin moyen et la matrice trachéale. Aussi, on peut observer le passage des particules virales par la lamelle basale de l'intestin moyen après 72 h suivant l'inoculation (figure 7C). Le patron d'infection de la membrane basale des larves de *C. fumiferana* infecté par le CfMNPV ressemble grandement à celui observé lors des infections par le ChfuGV (figure 7C, D). Par contre, la cinétique de l'infection est bien plus rapide chez le CfMNPV.

#### 4.2.3.2 Infection des larves de *C. occidentalis* par le CfMNPV

L'histopathologie de l'infection des larves de *C. occidentalis* soumises au CfMNPV a aussi été suivie (figure 8). Les altérations des tissus de larves de la tordeuse occidentale de l'épinette infectées par le nucléopolyédrovirus présentent de grandes similitudes avec celles observées chez *C. fumiferana* (figure 8A, B). La matrice trachéale est le tissu le plus infecté et le processus de dissémination virale semble suivre le même

Figure 7. Détail de l'intestin moyen d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le CfMNPV et par le ChfuGV au 7<sup>e</sup> jour d'infection, A- CfMNPV dans l'intestin moyen Barre : 10µm, B – ChfuGV dans l'intestin moyen Barre : 10µm, C- détail des cellules de l'intestin moyen infectées et le passage de particules virales de CfMNPV par la lamelle basale Barre : 10µm, D – Détail des cellules de l'intestin moyen infectées et le passage de particules virales de ChfuGV par la lamelle basale. Barre : 10µm, **cg** – corps gras; **im** - intestin moyen; **cc** – cellules colonnaires; **il** – iléon; **lb**- lamelle basale; **he**- haemocoel; **mu** – muscle.

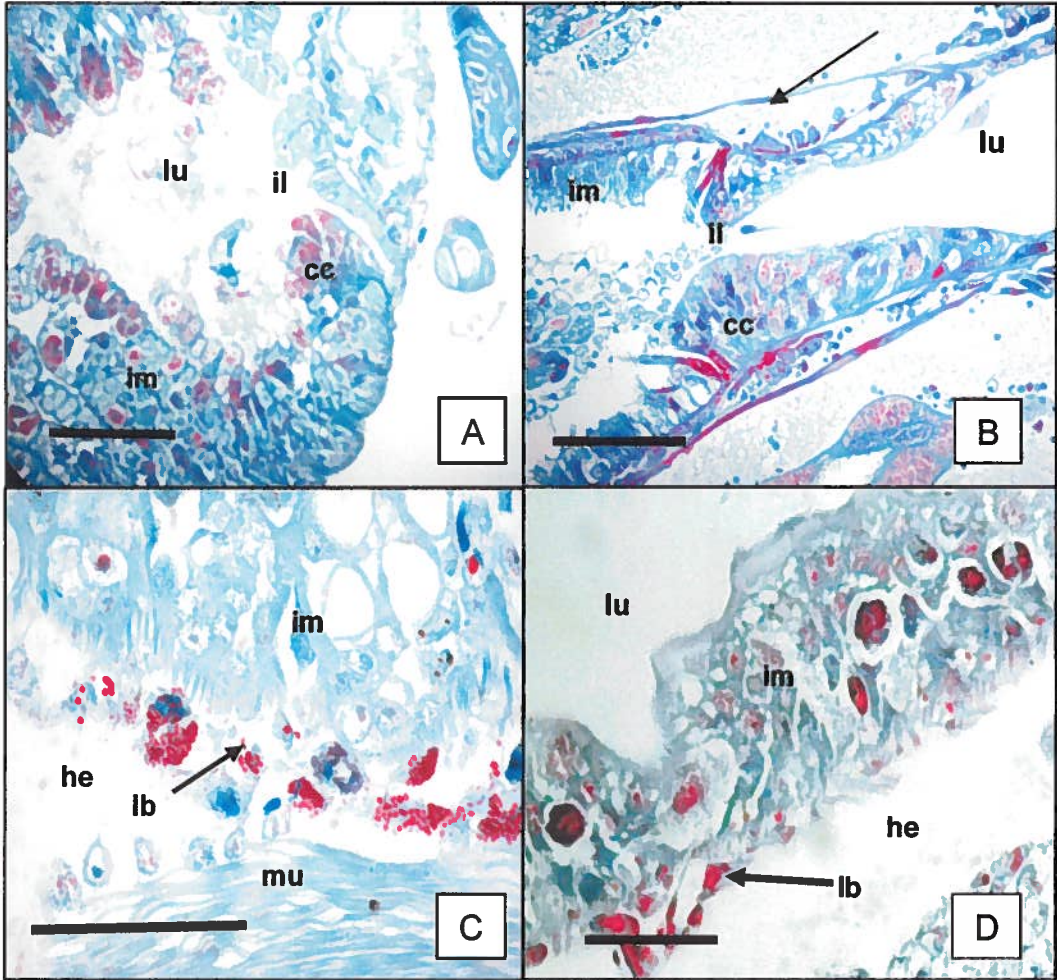
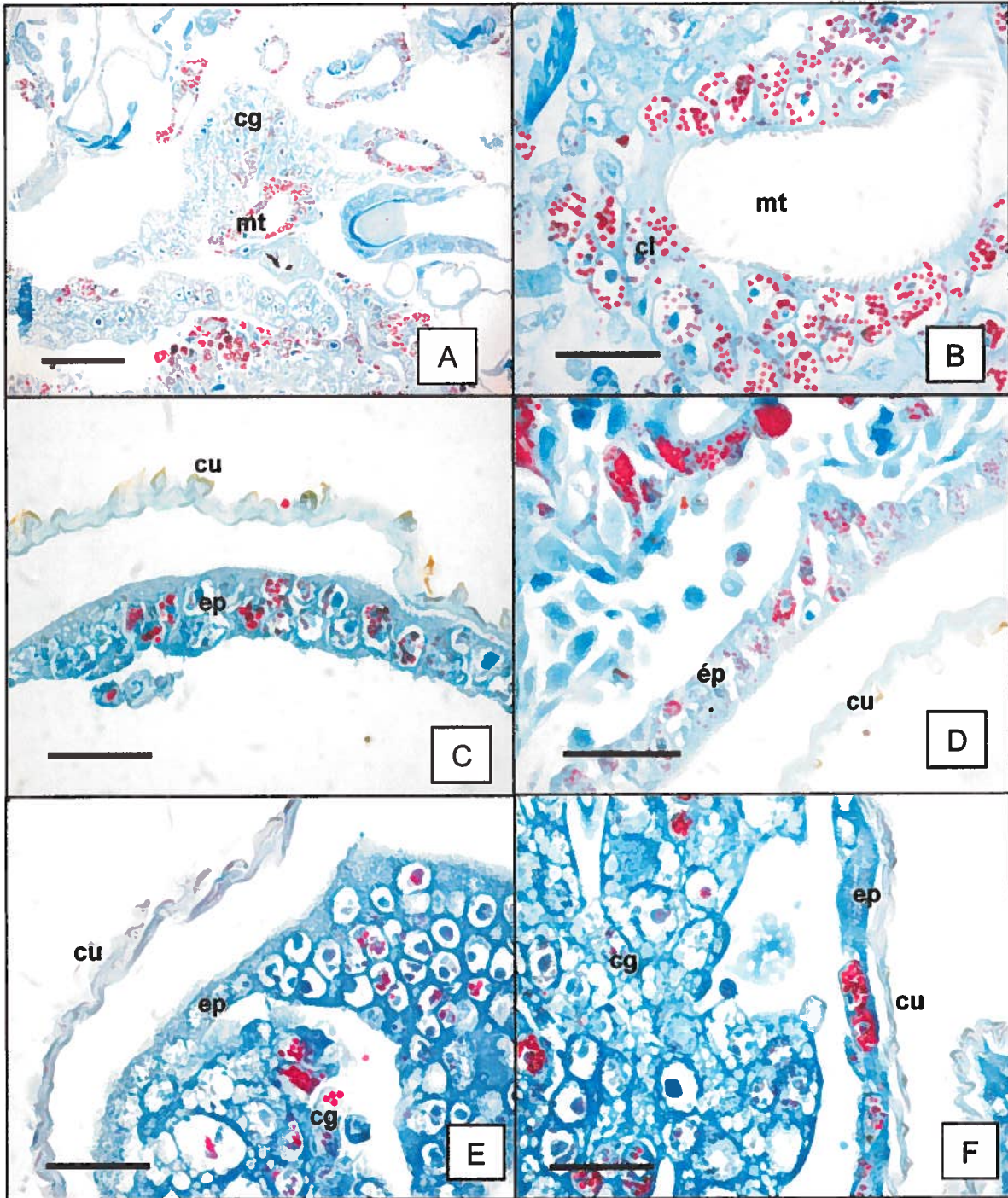


Figure 8. Histopathologie de des principaux tissus des larves de *C. occidentalis* infectées au 7<sup>ème</sup> Jour (168h) par le CfMNPV. A – Matrice trachéale et corps gras infectés Barre : 10µm, B – Détail des cellules de la matrice trachéale intensivement infectées Barre : 10µm, C – Épiderme infectée Barre : 10µm , D – Cellules du corps gras en lise cellulaire causée par la réplication virale (en rouge – corps d’inclusion) Barre : 10µm, E- Cellules de l’épiderme en processus de lyse (corps d’inclusion en rouge) Barre : 10µm. **mt** - matrice trachéale; **cg** – corps gras; **ep** – épiderme; **cu** – cuticule.





patron que dans le cas de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (figure 8E, F). De façon générale et sur une base chronologique, les tissus larvaires de *C. occidentalis* semblent moins endommagés que ceux de *C. fumiferana*.

#### **4.2.4 Confirmation de la présence du granulovirus par hybridation *in situ* et immunohistochimie**

Afin de confirmer la présence du ChfuGV et du CfMNPV dans des tissus montrant des altérations, une technique d'hybridation *in situ* et une technique d'immunohistochimie ont été utilisées. Ainsi, la présence de l'ADN viral a été démontrée par hybridation *in situ* et la présence des protéines majeures des baculovirus a été détectée par l'immunohistochimie.

##### **4.2.4.1 Hybridation *in situ***

L'extraction de l'ADN total du ChfuGV a été démontrée en gel d'agarose à la figure 9. La quantité de l'ADN extrait a été mesurée par densitométrie optique et selon la formule décrite à la section 3.2.3.2 le résultat obtenu a été de 376µg/ml.

Afin de permettre la détection de l'ADN du ChfuGV, des sondes marquées à la digoxigénine ont été fabriquées en ciblant le gène de la granuline et le gène de la protéine p10. Dans le cas de la granuline, les produits de PCR montrent une bande correspondant à un fragment attendu d'ADN d'environ 800pb associé au gène de la granuline (figure 10). Les résultats de la fabrication des sondes permettant la détection d'un fragment attendu d'environ 500pb du gène codant pour la protéine P10 sont présentés à la figure 11.

Figure 9. Gel d'agarose 0,8% coloré avec bromure d'éthidium, réalisé avec l'ADN total extrait du ChfuGV et du CfMNPV

Puis 1, 2, 3 et 4 - ADN total du ChfuGV  
Puis 5, 6, 7 et 8 - ADN total du CfMNPV  
Puis 9 - Marqueur de 1kb

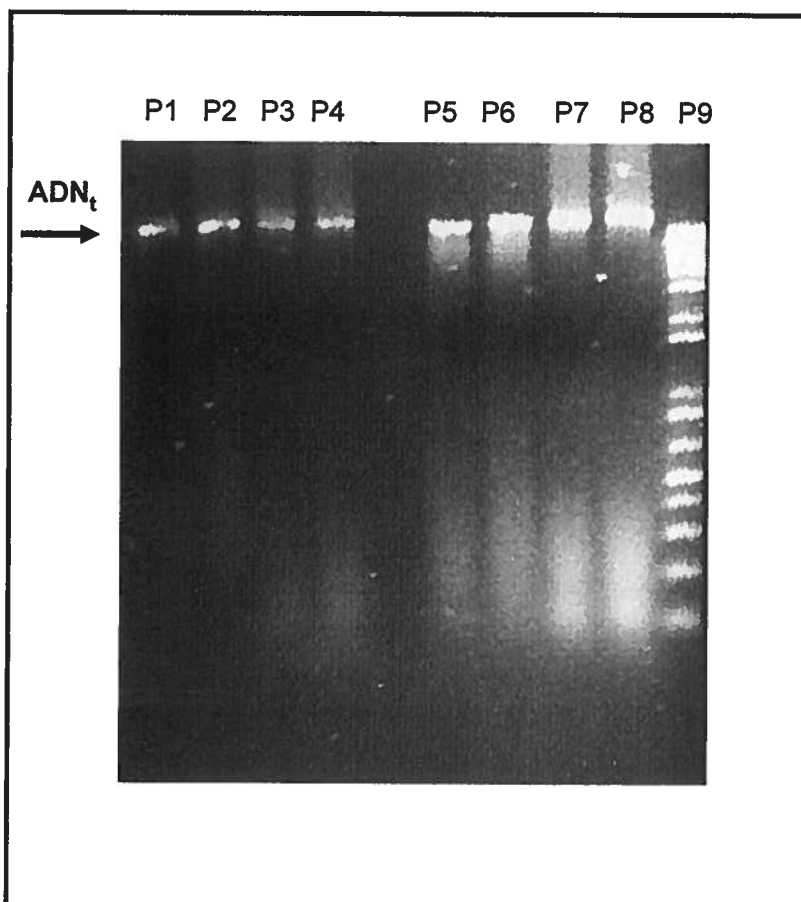


Figure 10. Gel d'agarose 0,8% coloré avec bromure d'éthidium réalisé avec les produits du PCR d'amplification de la sonde du gène de la granuline marquée à la digoxigénine.

Puis 1 – produit de PCR dilué 1/50

Puis 2 - Marqueur de 1 kb.

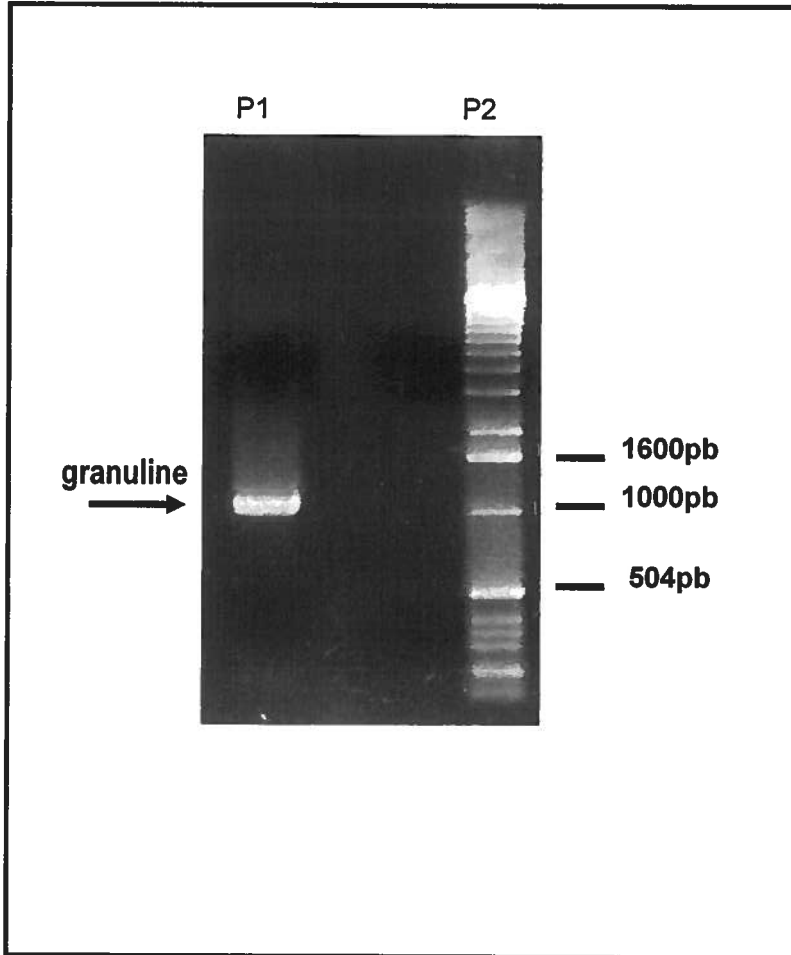


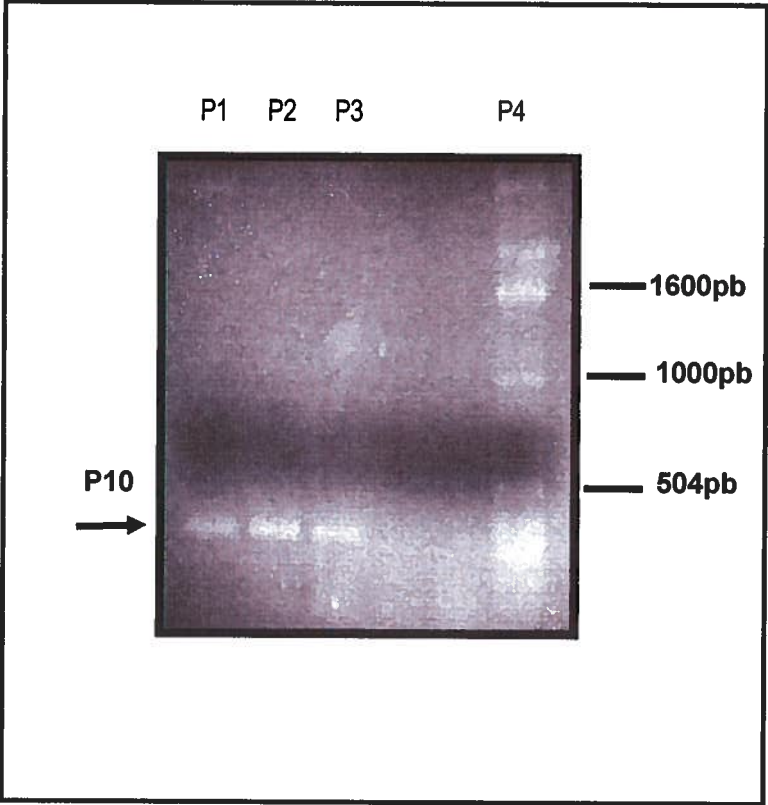
Figure 11. Gel d'agarose 0,8% coloré avec bromure d'éthidium, réalisé avec les produits du PCR d'amplification de la sonde du gène p10 marquée à la digoxigénine.

Puis1- Produit du PCR dilué 1/5000

Puis 2 – Produit du PCR dilué 1/500

Puis 3 – Produit du PCR dilué 1/50

Puis 4 - Marqueur de 1 kb



La figure 12 et 13 montre les résultats de l'hybridation *in situ* permettant la détection de l'ADN viral du ChfuGV chez les larves infectées de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis* respectivement, à partir de la sonde moléculaire ciblant les gènes de la granuline et de la protéine P10. Après 7 jours, on observe une forte réaction positive à la sonde du gène p10 dans la région de l'iléon intestinal de *C. fumiferana* à la figure 12B, ensuite, on remarque la présence de l'ADN viral du granulovirus au niveau de l'épiderme (figure 12C) et au niveau des corps gras (figure 12D) en réaction positive à la sonde de la granuline. La figure 13 montre une réaction positive à la sonde de la p10 dans l'épiderme des larves infectées de *C. occidentalis* (figure 13B) et la figure 13 C montre les corps gras des larves infectées de *C. occidentalis* positifs à la sonde de la granuline. Les figures 12A et 13A sont des larves saines des deux espèces. Ces résultats suggèrent que les altérations histologiques observées suite à l'infection des larves des deux espèces sont associées à la présence et la prolifération du virus dans les tissus larvaires. Ce gène a été récemment identifié et caractérisé par Jean (Mémoire de Maîtrise, 2003). Le gène codant pour la protéine P10 chez le ChfuGV est retrouvé seulement chez cette espèce. Il ne présente aucune similarité avec les autres gènes codant pour la P10 d'autres virus de la famille Baculoviridae. Cette particularité fait de lui un gène très intéressant comme outil de recherche. On peut voir que les cellules prolifèrent et qu'elles sont infectées par les granules.

La technique d'hybridation *in situ* est très connue et utilisée pour la détection des acides nucléiques, et cette méthode est très précise. Dans le cas des baculovirus, les résultats d'hybridation ont été un peu moins évident, parce que la présence d'un



Figure 12. Hybridation *in situ* réalisée avec la sonde complémentaire au gène de la P10 et de la granuline marquée par la molécule digoxigénine chez les larves infectées par ChfuGV (*C. fumiferana*), A – larve saine Barre : 10µm.; B– région de l'iléon d'une larve infectée en réaction positive à la sonde de la P10 Barre :10µm , C- épiderme des larves infectées Barre 10µm (granuline) , D- corps gras des larves infectées (granuline) Barre : 50µm. **cg** – corps gras; **im** - intestin moyen; **ep** – épiderme; **cu** – cuticule; **mu** – muscle.

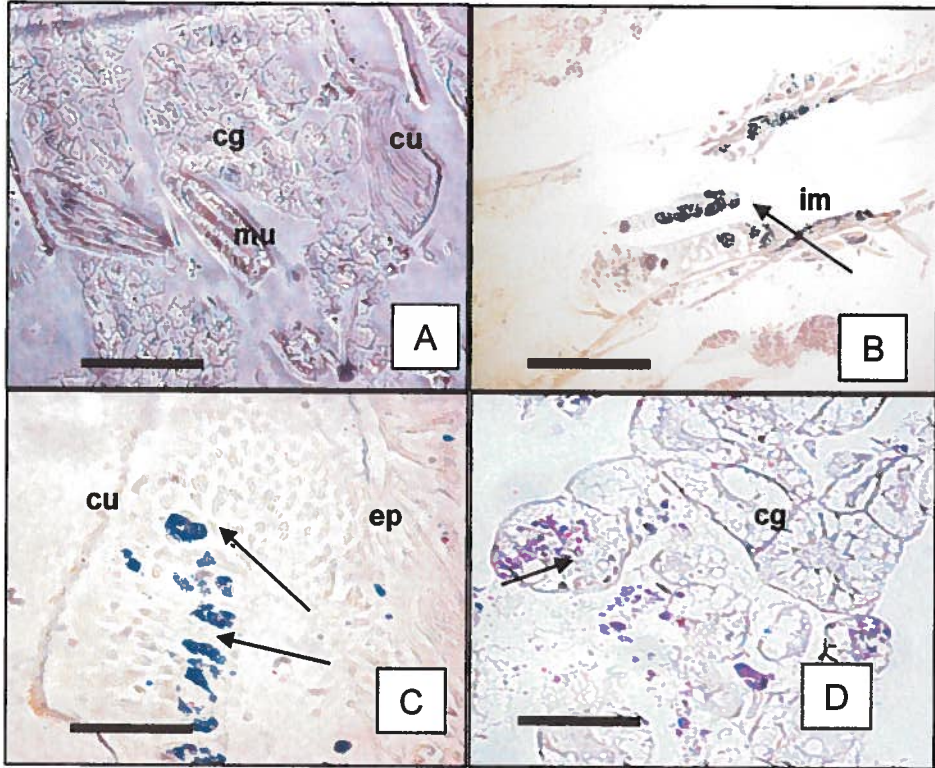
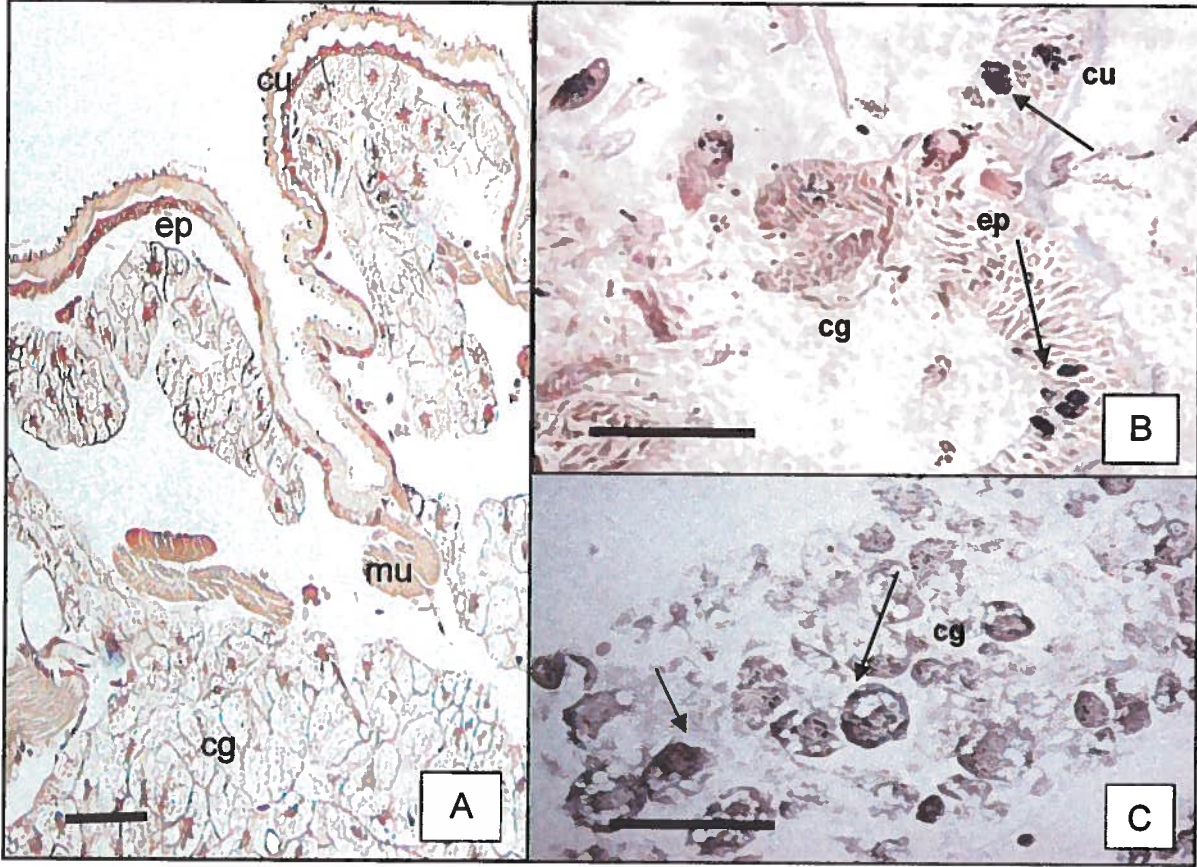


Figure 13. Hybridation *in situ* réalisée avec la sonde complémentaire au gène de la granuline et de la protéine p10 marquée par la molécule digoxigénine en larves de *C. occidentalis* infectées par le ChfuGV. A – larve saine Barre : 10µm, B – épiderme des larves infectées Barre : 100µm, C- corps gras des larves infectées Barre : 100µm; **cg** – corps gras; **ep** – épiderme; **cu** – cuticule; **mu** – muscle.



corps d'inclusion, malgré le traitement des coupes avec l'enzyme protéinase K, a bloqué l'accès de la sonde d'ADN.

Dans le cadre de la détection des protéines principales, la figure 14 montre les résultats positifs à la présence de la protéine granuline qui ont été révélés par la technique de l'immunopéroxydase. L'épiderme et le corps gras des larves appartenant aux deux espèces étudiées (figure 14C, E – *C. fumiferana*; 14D, F - *C. occidentalis*) ont démontré des groupes cellulaires colorés en brun, ce que n'était pas observé chez les larves saines traitées de la même façon (figure 14A, B).

#### 4.2.4.2 Hybridation *in situ* chez CfMNPV

Comme dans le cas du ChfuGV, la technique d'hybridation *in situ* a été utilisée pour démontrer la présence du CfMNPV dans les tissus infectés de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de la tordeuse occidentale de l'épinette. La figure 15 montre les résultats de l'hybridation *in situ* avec des sondes marquées à la digoxigénine complémentaire au gène de la granuline du ChfuGV. Les résultats indiquent, indirectement qu'il y a présence du gène de la polyédrine au niveau de la matrice trachéale, des corps gras et de l'épiderme des larves infectées de *C. fumiferana* (figure 15A) et de *C. occidentalis* (figure 15B). Par contre, aucune hybridation n'a été observée entre la sonde marquée du gène de la P10 du ChfuGV et les tissus infectés par le CfMNPV chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette (figure 16A, 16C) et la tordeuse occidentale de l'épinette (figure 16B, 16D). Ce résultat confirme l'observation de Jean (2003) qui indiquait que le gène p10 du ChfuGV ne présentait aucune homologie avec le gène p10 du CfMNPV.

Figure 14. Réaction positive à l'immunopéroxydase accouplée à des anticorps anti-granuline au niveau du corps gras et épiderme chez les larves de *C. fumiferana* (à gauche) et *C. occidentalis* (à droite). A, B – larves saines Barre : 10µm, C, D – épiderme d'une larve infectées après 168h (7J) Barre : 10µm, E, F – corps gras d'une larve infectée après 168h (7J) Barre : 10µm. **mt** - matrice trachéale; **cg** – corps gras; **ep** – épiderme; **cu** – cuticule; **mu** – muscle; **gs** – gland de soie.

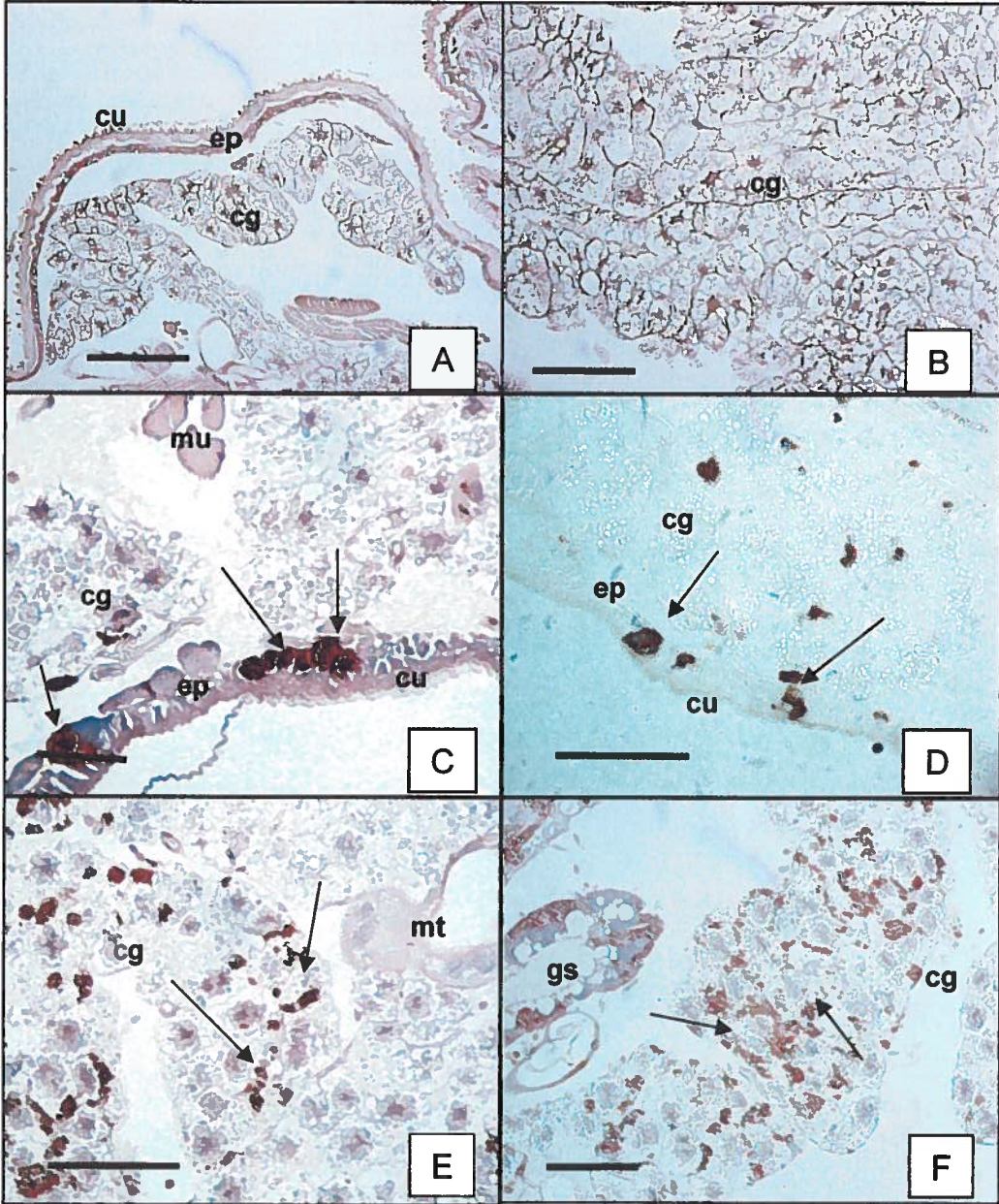


Figure15. Détection indirecte du CfMNPV chez les larves infectées par le CfMNPV en utilisant la sonde du gène de la granuline de ChfuGV. A- *C. fumiferana* Barre : 10µm, B – *C. occidentalis* Barre : 100µm. (flèches = réaction positive) **mt** - matrice trachéale; **cg** – corps gras; **im** - intestin moyen; **ep** – épiderme; **cu** – cuticule; **mu** – muscle.



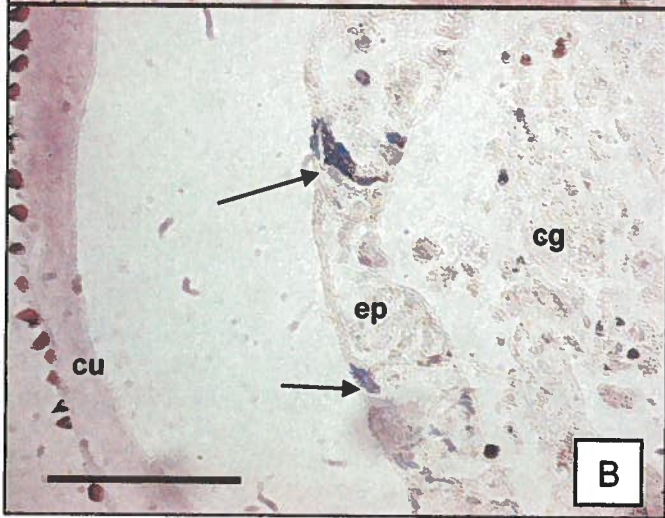
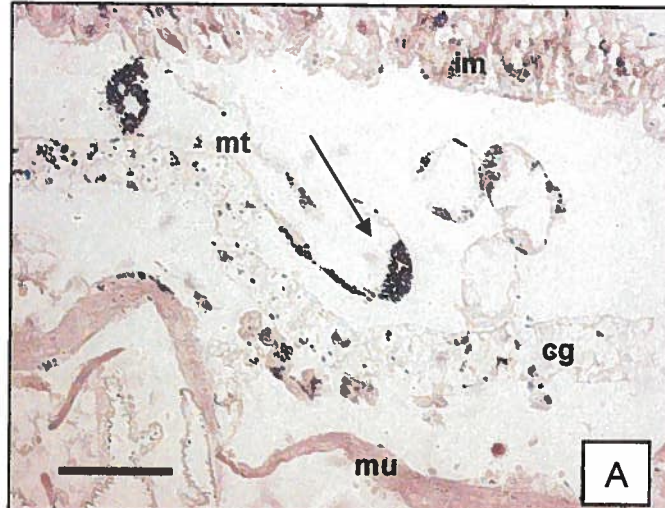
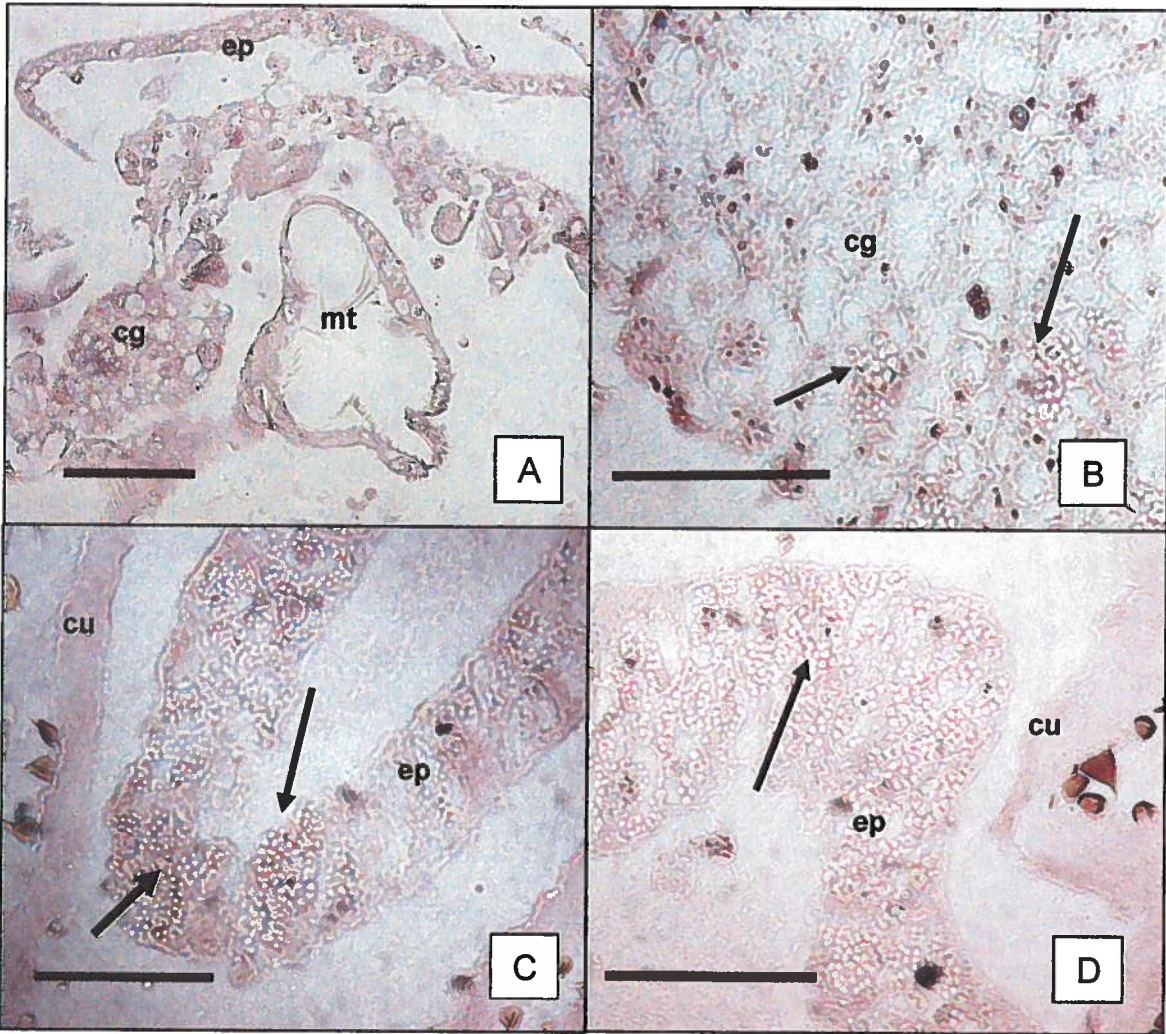


Figure 16. Hybridation *in situ* réalisée avec une sonde complémentaire au gène de la P10 marquée à la digoxigénine chez les larves infectées par le CfMNPV. Colonne gauche: *C. fumiferana*, colonne droite : *C. occidentalis*. Les deux espèces ont été infectées avec CfMNPV. A – larve saine barre : 50µm, B – épiderme d'une larve infectée Barre : 100µm, C- D épiderme des larves infectées Barre : 100µm, **cg** – corps gras; **ep** – épiderme; **cu** – cuticule; **mu** – muscle, flèches = corps d'inclusion.



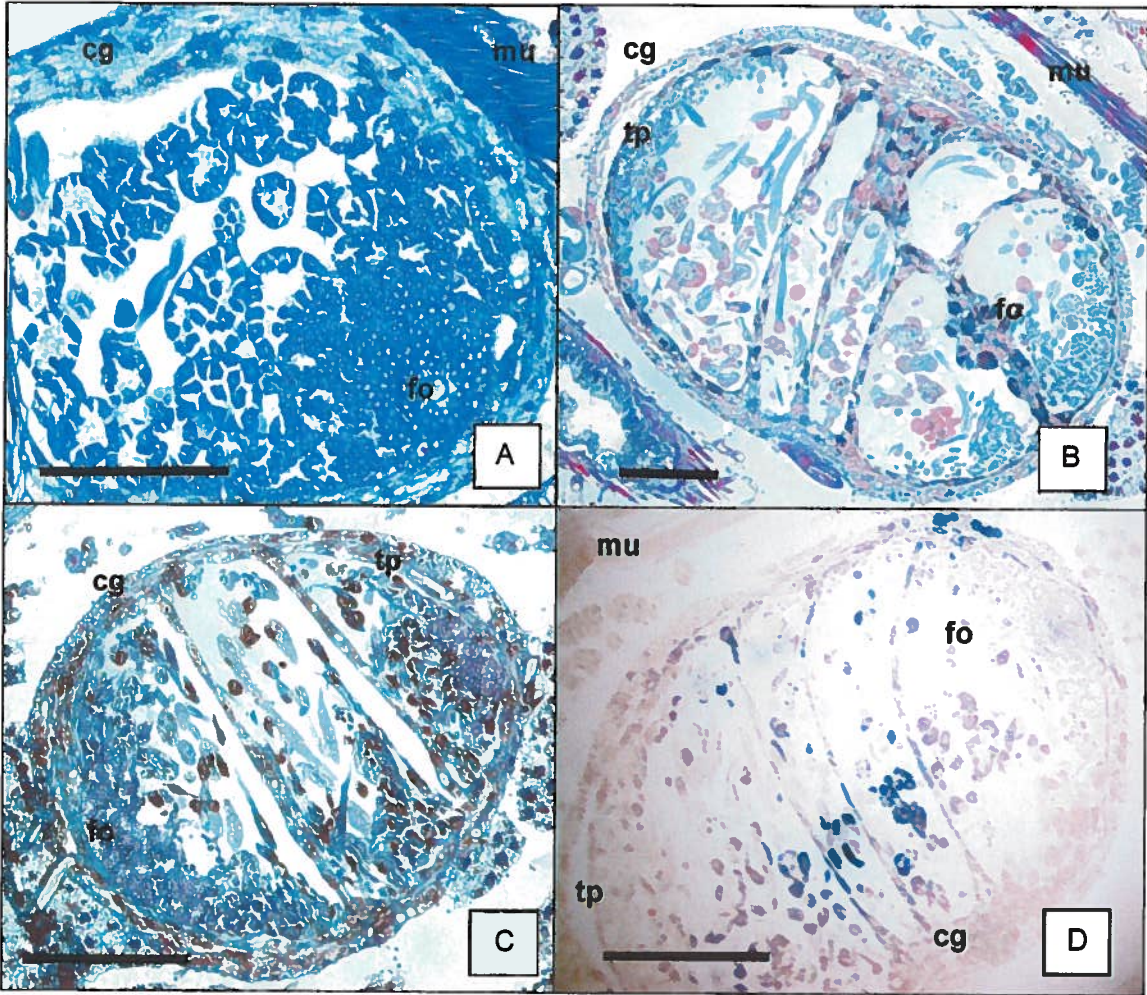
### 4.3 *Transmission verticale*

En se basant sur les observations des coupes histologiques, nous avons voulu vérifier l'hypothèse d'une transmission verticale du ChfuGV chez *C. fumiferana*. La figure 17 montre une coupe d'une larve saine de *C. fumiferana* colorée à l'Azan. Les gonades sont colorées en bleu (figure 17A). On note la présence des follicules, des cellules germinatives, la division des ovarioles, la tunique *proprea* qui enveloppe les gonades et les corps gras qui se retrouvent autour des gonades. Chez les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette infectées par le ChfuGV, on remarque plusieurs régions qui sont colorées en rouge, notamment les corps gras qui enveloppent les gonades, la tunique *proprea*, des régions proches aux ovarioles et aussi les follicules (figure 17B). Alors, pour confirmer qu'il s'agissait vraiment de la présence du ChfuGV on a procédé à l'application d'un protocole d'immunohistochimie pour détecter la présence de la protéine granuline, protéine majoritaire chez les granulo virus. Les lames ont été colorées à l'Azan. Le résultat positif obtenu est montré à la figure 17C, et aussi on peut observer la persistance de la coloration rouge chez les cellules germinatives. Comme l'objectif premier a été la démonstration de la présence virale, on a procédé à l'application de la technique de l'hybridation *in situ*. L'hybridation a été faite avec une sonde complémentaire au gène de la granuline marquée à la Digoxigénine. Les coupes ont subi plusieurs traitements et incubations et après on a pu observer les résultats positifs présentés à la figure 17D.

#### 4.3.1 *Obtention des insectes adultes de C. fumiferana infectées sous-létalement*

À partir des ces résultats, on a mis en place un protocole d'infection sous-létale des larves au 4<sup>e</sup> stade de *C. fumiferana* en ayant comme objectif l'observation des

Figure 17. Gonades de larves au 4<sup>e</sup> stade de *C. fumiferana* infectés par ChfuGV. A-larve saine colorée par Azan Barre : 10µm, B-larve infecté par le ChfuGV colorée par Azan Barre : 10µm. C - Réaction d'immunopéroxydase positive à la présence de la protéine granuline en larve infectée par ChfuGV après 168h (contraste -Azan) Barre : 10µm, D - Hybridation *in situ* positive à la présence du gène de la granuline en larve infectée par le ChfuGV (168h p.i.) Barre : 10µm. **fo** – follicule; **tp** – tunique *proprea*; **cg** – corps gras; **mu** - muscle.



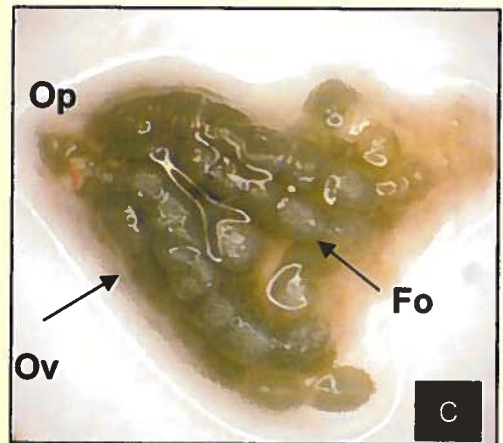
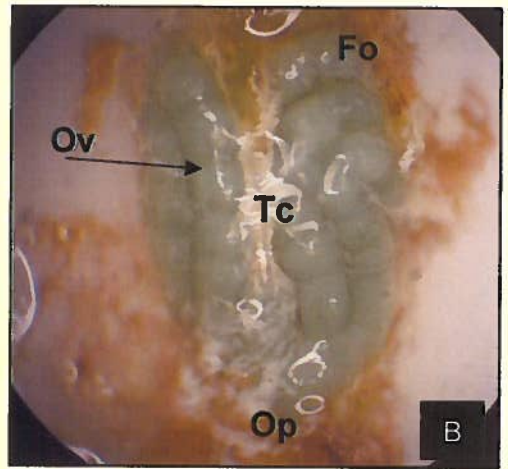
femelles adultes survivantes à l'infection et de leur progéniture. Le dosage sous-létal utilisé a été  $10^2$  granules/godet sur trois groupes de 60 larves de *C. fumiferana* au 4<sup>e</sup> stade. Les larves ont été placées en chambre environnementale, et des échantillons ont été récoltés à chaque étape de leur développement et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour des analyses postérieures : larve saine, larve infectée après 168h (7J), femelle, œufs, larves F<sub>1</sub>. À mesure que les larves sont devenues chrysalides, elles ont été séparées et gardées à  $4^{\circ}\text{C}$  afin de synchroniser l'émergence des adultes. Les adultes ont été accouplés en chambre environnementale à l'humidité relative de 80 % en proportion de 3 mâles/1 femelle. Les œufs ont été récoltés sur des bandes de plastique stériles et ont été rincés en solution d'hypochlorite de sodium 2 %. Après ils ont été placés de nouveau dans la chambre et après environ 7 jours il y a eu lieu l'éclosion des larves F<sub>1</sub>. La proportion des larves F<sub>1</sub> survivantes a été d'environ 5 % en regardant le groupe contrôle non infecté, ce qui peut être considéré comme un effet prédictible à une infection sous-létale.

#### **4.3.2 Système reproducteur de la femelle de *C. fumiferana***

La figure 18 montre l'anatomie externe d'un ovaire d'une femelle de *C. fumiferana* et ses principales régions. Ainsi, la figure 18 A montre une femelle adulte et ses segments abdominaux, la figure 18 B montre l'ovaire et ses quatre ovarioles entourés des trachéides et des corps gras dans la cavité de l'haemocèle après l'enlèvement des segments extérieurs. À la figure 18 C on observe les quatre ovarioles, follicules, l'oviducte médian, et l'oviducte postérieur.

Figure 18. Dissection des femelles de *C. fumiferana*: A- Femelle avant dissection (6,5X); B- Anatomie externe de l'ovaire (10X); C- Détail de l'ovaire (16X). **Ov** – ovarioles; **Fo** – follicules; **Op** - oviducte postérieur; **Tc** - trachéides.





### 4.3.3 Analyse des échantillons récoltés

La figure 19 montre un gel d'agarose avec les résultats de la détection du ChfuGV chez les échantillons récoltés à chaque étape de la procédure. Les échantillons ont été soumis à un PCR où le gène ciblé a été le gène de la P10. Ce gène a été choisi parce qu'il s'agit d'un gène particulier au ChfuGV. Les échantillons récoltés ont été positifs à la présence virale, sauf le témoin non infecté. La présence virale dans les larves F1 et aussi dans les œufs sont des indications qu'une transmission transovarienne peut avoir lieu.

#### 4.3.3.1 Femelles sous-létalement infectées avec le ChfuGV

Parallèlement, des ovaires de femelles adultes infectées et non infectées ont été récoltés et soumis à la coloration d'Azan pour histologie classique et à l'hybridation *in situ* par microscopie confocale. La figure 20 montre le résultat positif à l'hybridation *in situ* chez l'ovaire d'une femelle survivante à l'infection sous-létale avec la sonde de la granuline accouplée à la digoxigénine, révélée à l'aide de la fluorescéine. On peut observer que les trachéides entourant l'ovaire sont positives à la granuline.

La Figure 21 montre les coupes d'ovaires colorés par Azan. La figure 21 A montre un follicule non infecté en développement; dans le cas de la figure 21 B on observe la présence de coloration rouge dans la paroi d'un follicule infecté en développement, et aussi dans la figure 21 C, on observe un follicule infecté en fin de développement, où on peut observer le chorion qui se détache, et une coloration rouge qu'entoure la masse du vitellus de l'œuf.

Figure 19. Détection du granulovirus par la technique de PCR chez des insectes infectés avec un dosage sous-létale en utilisant les amorces spécifiques pour le gène p10. Puis 1- marqueur 1 kb; Puis 2 - Larve saine; Puis 3- Larve infectée sous-létalement (7J); Puis 4- Femelle adulte infectée; Puis 5- œufs; Puis 6-œufs; Puis 7- Larve F1, Puis 8 – Larve F1.

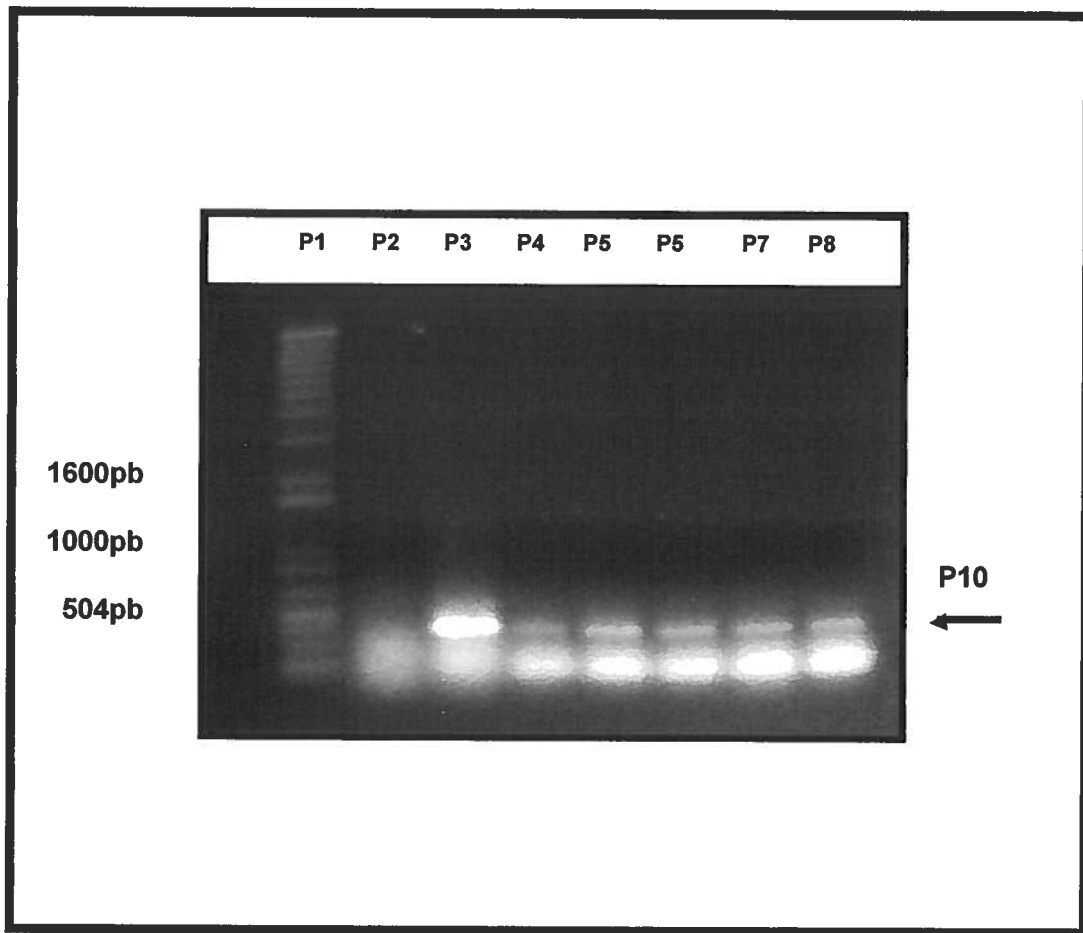


Figure 20. Réaction d'hybridation *in situ* avec une sonde du gène de la granuline marquée à la digoxigénine et révélée par la fluorescéine au niveau de l'ovaire d'une femelle de *C. fumiferana* survivante à une infection sous-létale du ChfuGV: **tc** – trachéides; **cg** - corps gras; **mu** – muscle; **mt** – matrice trachéale (200X).

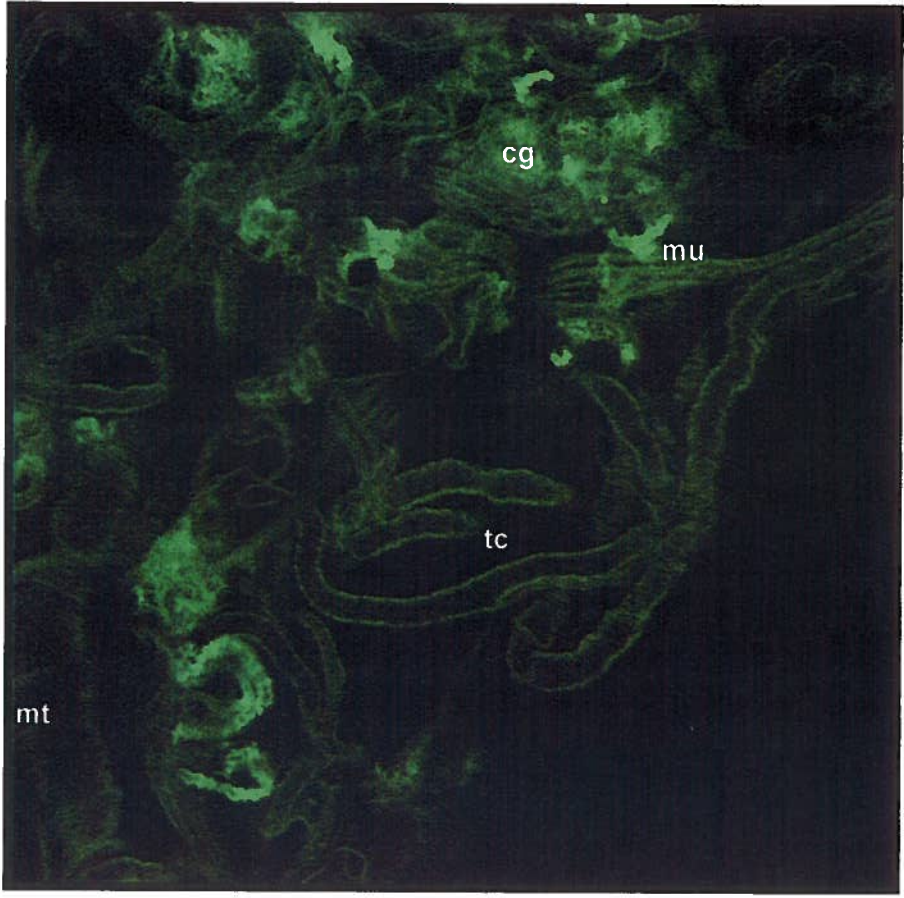
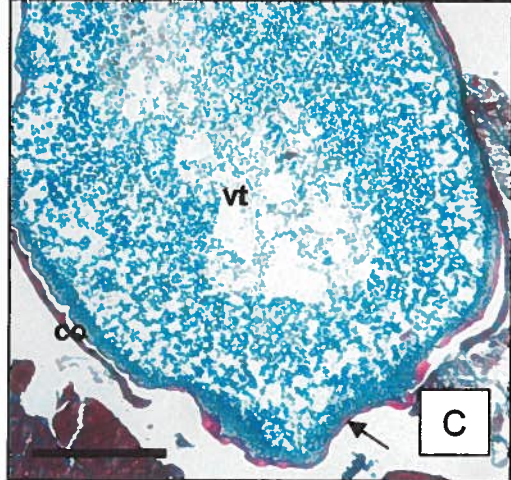
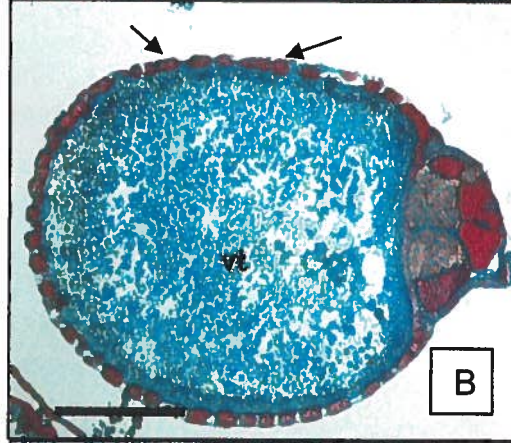
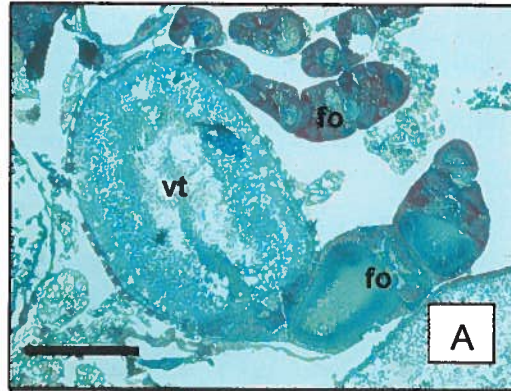


Figure 21. Développement des ovarioles des femelles de *C. fumiferana* saines et infectées par une dose sous-létale de ChfuGV: A- ovariole avec des follicules en développement normale chez une femelle saine de *C. fumiferana* Barre : 10µm, B – follicule en développement d’une femelle sous-létalement infectée par le ChfuGV Barre 50µm., C – Fin du développement d’un follicule ovarien d’une femelle de *C. fumiferana* survivante à l’infection sous-létale du ChfuGV Barre : 50µm. Colorés par Azan. **fo** – follicule; **vt** – vitellus; **co** – chorion; flèches – présence des particules virales.

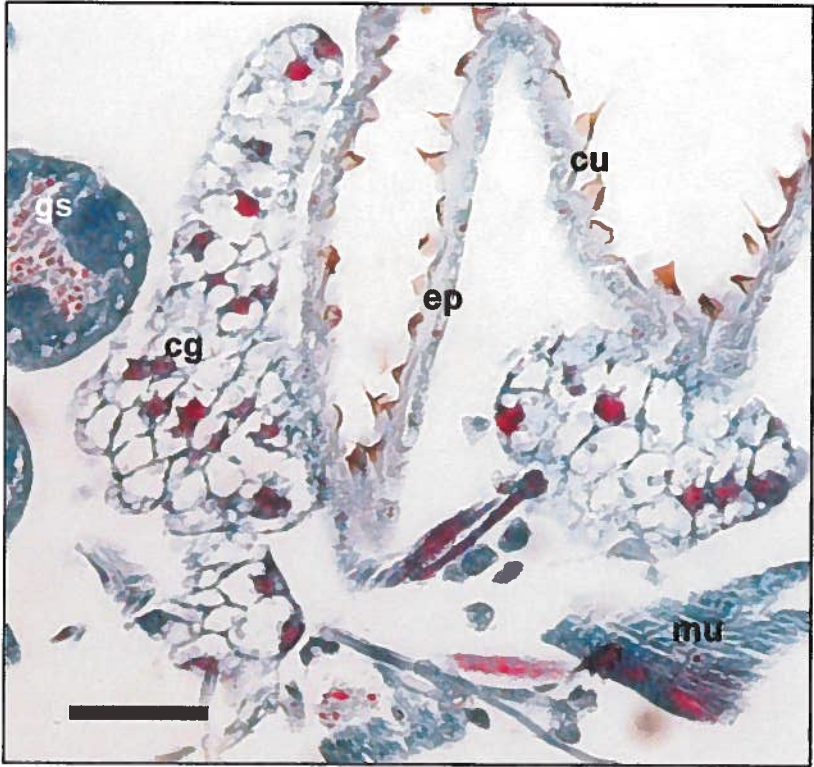




#### **4.3.3.2 -Détection de la présence du ChfuGV chez les larves F1.**

La ponte des œufs des femelles infectées a été rincée en hypochlorite de sodium 2%, et après, incubée en chambre environnementale dans les conditions décrites à la session 3.1. Les larves survivantes ont été placées en contenants avec la diète artificielle, jusqu'au deuxième stade larvaire. Après la première mue, elles ont été mortes. Les échantillons ont été analysés par coloration d'Azan et la présence des particules virales dans le corps gras et épiderme des larves a été confirmé (figure 22).

Figure 22. Observation de la présence des particules virales dans les tissus d'une larve F1 provenant de l'accouplement des adultes de *C. fumiferana* survivantes à l'infection sous-létale du ChfuGV dans les corps gras et l'épiderme (Azan). Barre : 10µm. **cg** – corps gras; **ep** – épiderme; **gs** – gland de soie; **cu** – cuticule; **mu** - muscle.





## Chapitre 5

### *Discussion*

Dans les années 1950, la tordeuse des bourgeons de l'épinette et la tordeuse occidentale de l'épinette étaient considérées comme une espèce unique et qui était séparée par les Montagnes Rocheuses (Fellin, 1985). Aujourd'hui, les deux espèces sont reconnues être indépendantes l'une de l'autre, mais conservent un lien phylogénétique très proche (Powell, 1983). Au Canada, les deux espèces de tordeuses, *C. fumiferana* et *C. occidentalis*, sont des espèces qui affectent les peuplements de conifères. Les résultats de l'efficacité des formulations expérimentales à base de baculovirus utilisées lors d'essais en milieu naturel, contre différentes populations de *Choristoneura* montrent de grandes variabilités. Des données établies en laboratoire avec le ChfuGV et le CfMNPV montrent une virulence qui est difficile de corréler avec résultats obtenus en milieu naturel (Otvos *et al.* 1989; Ebling, 2004).

Nos résultats de laboratoire confirment l'efficacité insecticide du ChfuGV et du CfMNPV et rapportent des particularités intrinsèques quant à leur pathogénicité contre les larves de *C. fumiferana* et *C. occidentalis* (tableau 1). Ainsi, aucune différence n'a été observée entre la DL<sub>50</sub> du CfMNPV chez les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de la tordeuse occidentale de l'épinette. Les valeurs obtenues étaient comparables à celles observées par Kaupp et Ebling (1990). Par contre au niveau du ChfuGV, l'analyse comparative de l'infection du ChfuGV chez les deux espèces de tordeuses a démontré que le *C. occidentalis* est moins susceptible au granulovirus. Ce résultat est certainement une indication du caractère hôte-spécifique de ce dernier pour

son hôte principal qu'est *C. fumiferana*, et ce, malgré la proximité phylogénétique entre les deux espèces. Ainsi, sur la base des estimations des DL<sub>50</sub> des deux espèces, on observe que le ChfuGV est 1000 fois plus infectieux chez les larves de *C. fumiferana* que chez les larves de *C. occidentalis*. Ce résultat est d'autant plus significatif si l'on regarde le temps moyen de survie (TMS) qui est de 8 jours chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de plus de 11 jours chez la tordeuse occidentale de l'épinette. En analysant les données relatives aux doses létales, on remarque moins de variations dans les résultats observés chez le *C. fumiferana* que chez *C. occidentalis*. Ces écarts plus importants dans la réponse des larves de la tordeuse occidentale de l'épinette sont peut-être une indication d'une irrégularité symptomatique au niveau de leur susceptibilité au ChfuGV.

Les principaux tissus larvaires infectés par le ChfuGV ont été l'intestin moyen, la matrice trachéale, le corps gras et l'épiderme. Les muscles et les gonades sont aussi infectés, mais de façon moins importante. Ce tropisme cellulaire correspond au syndrome de type 2 chez les granulovirus puisqu'il se caractérise par une infection polyorganotropique similaire à celle observée chez le granulovirus de *Epinotia aporema* *EpapGV* (Goldeberg *et al.* 2002). Le syndrome de type 2 est associé à une infection plus sévère que le syndrome de type 1 des granulovirus et s'apparente à l'infection observée des nucléopolyédrovirus (Federici, 1990,1997).

La dissémination des particules virales du ChfuGV de l'intestin moyen en direction de l'haemocèle et des corps gras semble préconiser l'utilisation de l'espace intercellulaire de la lamelle basale, tandis qu'elle emprunte la voie de l'hémolymphe pour infecter la matrice trachéale. Comme l'indiquaient Hess et Falcon (1987), nos résultats supportent l'hypothèse voulant que la lamelle basale des cellules, qui s'alignent à

l'haemocèle, fonctionne comme une barrière empêchant la libération des virus dans la cavité de l'insecte. Il s'agit d'un mécanisme de défense qui est un obstacle important à la dissémination virale.

L'altération morphologique, démontrée au niveau de l'iléon des larves de *C. fumiferana* infectées au 7<sup>e</sup> jour par le ChfuGV (figure 3D, E) et qui n'a pas été observée chez les larves de *C. occidentalis*, fournit des indications permettant de comprendre la pathogénicité plus importante du ChfuGV envers les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. En effet, ce processus de prolifération cellulaire observé dans l'épithélium intestinal des larves de *C. fumiferana* est peut-être relié à la spécificité hôte-pathogène. Ce phénomène a déjà été décrit chez certaines espèces d'insectes infectées par un granulovirus (Granados, 1980). Ainsi, le ChfuGV étant moins spécifique aux larves de *C. occidentalis* expliquerait l'absence de prolifération cellulaire au niveau de l'iléon. Il s'agit certainement d'une piste à explorer afin de vérifier si, dans le cas des infections par des granulovirus, cette prolifération ne serait pas un indicateur de la spécificité du virus envers les espèces d'insectes.

De l'autre côté, l'infection par le CfMNPV n'a pas mis en évidence des différences significatives de son niveau d'efficacité chez les deux espèces (tableau 2). Il en va de même avec le taux moyen de survie qui est similaire chez les larves de *C. fumiferana* et celles de *C. occidentalis* (tableau 3). Ebling (2004) a observé une performance légèrement plus importante du CfMNPV à provoquer une mortalité larvaire chez *C. occidentalis*. Bien qu'il n'y ait pas de différence significative, cette tendance a aussi été observée lors de notre étude.

En comparant l'infection par le CfMNPV chez les deux espèces de tordeuses, on remarque qu'il y a une prolifération importante du virus dans la matrice trachéale des larves. On peut aussi affirmer, que le CfMNPV présente un tropisme élevé pour la matrice trachéale qu'il utilise comme voie de dissémination. Nos observations ont démontré que le CfMNPV se multiplie davantage dans la matrice trachéale des larves de *C. fumiferana* que dans celle de *C. occidentalis*. Ainsi, on a pu observer la présence de particules virale 48 heures suivant l'inoculation. Par contre, dans le cas du ChfuGV on observe aussi une infection au niveau de la matrice trachéale larvaire. Cependant, le virus est détecté plus tardivement, soit environ 7 jours après l'inoculation. Ces observations suggèrent que le CfMNPV cible la matrice trachéale et que ce tissu joue un rôle majeur dans la prolifération virale dans l'organisme. Ce processus de prolifération fait du nucléopolyédrovirus un pathogène très efficace et virulent. Le nucléopolyédrovirus d'*Autographa californica* (AcMNPV) présente aussi un tropisme élevé en regard de sa prolifération dans la matrice trachéale. Une hypothèse établie suggère que ce tropisme reconnu chez le nucléopolyédrovirus pourrait avoir une corrélation étroite avec leur efficacité insecticide (Engelhard *et al.* 1994).

Les expériences pour la détection des gènes viraux de la granuline et de la p10 par hybridation *in situ* ont confirmé la présence virale dans les tissus étudiés. Le gène de la granuline a été détecté présent dans l'épiderme, les corps gras et les gonades les deux espèces infectées par le ChfuGV. La réaction d'immunopéroxydase a aussi confirmé la présence de la protéine granuline dans ces tissus. Au niveau du gène de la protéine P10, il a aussi été détecté au niveau de l'intestin moyen et des gonades chez les larves de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis* infectées par le ChfuGV. Pour sa part, le CfMNPV a été



déte t  de façon indirecte par l'hybridation *in situ*. La réaction d'hybridation de la sonde granuline a permis une réaction positive au gène de la polyédrine du CfMNPV. Ainsi, le virus a été d ete t  dans la matrice trachéale, les corps gras et l'épiderme des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de la tordeuse occidentale de l'épinette infect es par le CfMNPV. Afin de vérifier que la réaction d'hybridation n'était pas caus e par la présence du granulovirus, une seconde hybridation avec, cette fois, le gène p10 spécifique au ChfuGV a été r ealis e et aucune hybridation n'a été enregistr e dans les tissus infectés par le CfMNPV. Le gène p10 du ChfuGV ne présente aucune homologie avec d'autres gènes p10 des baculovirus connus des lépidoptères (Jean, 2003; Escasa *et al.* 2006).

Au niveau de la transmission du ChfuGV chez l'esp e *C. fumiferana*, nous avons d emontr e pour la première fois que le granulovirus avait la capacité de se transmettre de façon verticale. Différents spécimens ayant survécu à une infection sous-létale ont été soumis à des analyses afin de confirmer la présence du virus par PCR et par coloration Azan. Ainsi, nous avons pu constater la présence de virus au niveau des femelles infect es, des œufs de femelles infect es et des larves ayant  merg e de ces œufs. Ces résultats confirment la transmission verticale du ChfuGV chez la tordeuse des bourgeons de l' pinette.

La transmission verticale chez les baculovirus a été largement discut e par Kukan (1999). De façon tangible, il y a évidence d'une transmission verticale chez les nucléopolyédrovirus. Ce n'est que par déduction, que cette capacité a aussi été attribu e au granulovirus. Cependant, à ce jour, aucune évidence d'une telle transmission n'avait été document e. Nos résultats confirment la transmission verticale du ChfuGV chez

*C. fumiferana* et ajoutent de nouvelles perspectives dans la façon d'établir des mesures ou des stratégies de lutte biologique. De plus, cette observation donne un regard différent aux infections non présumées du ChfuGV dans les populations de tordeuse des bourgeons de l'épinette étudiées lors des essais des années 1970 et 1980 (Hodgkinson *et al.*, 1979, Cunningham, 1985). Le phénomène de la transmission verticale difficilement détectable, a certainement joué un rôle important dans la capacité d'obtenir des données fiables sur l'efficacité insecticide des baculovirus lors des essais de terrain.

## *Chapitre 6*

### *Conclusion*

Nos résultats confirment l'efficacité insecticide du ChfuGV et du CfMNPV pour contrôler les populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de la tordeuse occidentale de l'épinette, en conditions de laboratoire. Ils supportent le maintien des efforts de recherche afin de développer des formulations efficaces pouvant être utilisées sur le terrain. En considérant les propriétés intrinsèques des baculovirus, notamment au niveau de leur spécificité à l'hôte, leur innocuité envers l'environnement et leur stabilité en milieu naturel, ils offrent une opportunité de diversifier les outils d'intervention puisqu'ils peuvent facilement être intégrés dans les régies de lutte.

Au niveau de l'analyse comparative de l'infection par le ChfuGV chez les deux espèces de tordeuses, on a pu démontrer une variation dans la susceptibilité des larves de *C. fumiferana* et de celles de *C. occidentalis*. La susceptibilité plus importante des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette suggère qu'il y a une spécificité accrue du granulovirus pour cet insecte que pour les larves de la tordeuse occidentale de l'épinette, et ce, malgré la proximité phylogénétique des deux espèces. Chez les deux espèces, le tropisme cellulaire du ChfuGV correspond au syndrome du GV type 2 où l'infection est polyorganotropique. Il s'agit d'une maladie qui ressemble grandement aux infections de type 1 observées chez les nucléopolyédrovirus.

Parmi les différences observées lors de l'infection des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de la tordeuse occidentale de l'épinette avec le granulovirus, l'absence de prolifération cellulaire dans l'épithélium intestinal de larves de *C.*

*occidentalis* et clairement observée chez les larves de *C. fumiferana* suggère que ce phénomène est probablement relié à la spécificité du virus pour ce dernier hôte comme le suggère les données des essais biologiques.

Dans le cas du CfMNPV, les observations, tant au niveau des essais biologiques que l'observation des altérations morphologiques, suggèrent que le nucléopolyédrovirus est, en général, moins spécifique. En effet, aucune différence significative n'a été enregistrée lors des épreuves biologiques des deux espèces soumises au CfMNPV. En est de même pour l'étude comparative des modifications histopathologiques suite à l'inoculation par le virus qui montre peu de variation dans le patron d'infection du nucléopolyédrovirus chez les larves de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis*. Il est intéressant de noter que la quantité de virus requis pour entraîner 50 % de mortalité dans les populations de larves des deux espèces est nettement plus faible dans le cas du nucléopolyédrovirus que dans le cas du granulovirus. Par contre, comme le soulignait Forté *et al* (1999), il faut considérer que l'organisation du CfMNPV est caractérisée par la présence de plusieurs virions par corps d'inclusion, tandis que le granulovirus n'en contient qu'un seul par corps d'inclusion. Sur cette base, il devient difficile de comparer, avec précision, l'efficacité des virions des deux baculovirus.

L'observation des infections par le CfMNPV chez les deux espèces de tordeuses a révélé une formidable prolifération des particules virales dans la matrice trachéale des larves. Ce phénomène résulte probablement d'un tropisme élevé du virus pour la matrice trachéale. Le virus semble utiliser la matrice trachéale comme voie de dissémination. Ce tropisme explique peut-être aussi l'efficacité accrue du CfMNPV, avec un titre insecticide plus important que le ChfuGV, contre les larves des deux espèces de tordeuses.

L'utilisation des sondes spécifiques aux gènes de la granuline et de la protéine p10 s'est avérée très utile pour démontrer que les altérations histopathologiques détectées par coloration d'Azan étaient bien liées à la présence du ChfuGV chez les larves de *C. fumiferana* et de *C. occidentalis*. Il en est de même de la réaction à l'immunopéroxydase qui a aussi confirmé la présence des particules virales au sein des tissus infectés. Dans le cas du CfMNPV, l'hybridation *in situ* des tissus de la matrice trachéale, des corps gras et de l'épiderme a permis de démontrer la présence du virus chez les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de la tordeuse occidentale de l'épinette infectées par le nucléopolyédrovirus. L'absence de réaction avec le gène de la protéine p10 est une indication que l'infection résulte d'une infection par le nucléopolyédrovirus et non d'une contamination croisée par le CfMNPV.

Finalement, le point majeur de la recherche a certainement été la démonstration pour la première fois de la transmission verticale transovarienne du ChfuGV chez l'espèce *C. fumiferana*. Ce résultat est un élément important qui ouvre des perspectives de recherche sur son impact dans la dynamique des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette en situation endémique et épidémique. De plus, il s'agit d'une découverte importante qui peut avoir des impacts sur l'évaluation à moyen et long terme des applications des granulovirus pour lutter contre les populations de *C. fumiferana*. Son impact dans les variations de l'efficacité des baculovirus observées dans le passé peut être une explication dans cette capacité du granulovirus à se transmettre d'une génération à l'autre.

## ***Chapitre 7***

### ***Bibliographie***

- Adams, R.J. and Bonami, R.J. 1991. Atlas of Invertebrate Viruses, chapter7. CRC Press Inc. Boca Raton, p.87-204
- Alain, R., Berthiaume, L. and Trudel, M. 1989. Microscopie électronique. In P.Payment & M.Trudel (eds) Manuel de techniques virologiques. Presses de l'Université du Québec. Sillery, p.107-119.
- Anderson R.M., May R.M. 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. Phil. Trans. Roy. Soc. London, Series B, 291: 451-524
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA et Strulie, K.1989. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons Inc. New York. 1354p.
- Bah A., Bergeron, J., Arella M., Lucarotti, C.J & Guertin, C., 1997. Identification and sequence analyses of the granulin gene of *C. fumiferana* granulovirus. Archives of Virology, 142: 1577-1584.
- Bergold, G.H. 1948. Uber die Kapselvirus-Krankheit. Z. Naturforsch. 3b: 338-342
- Bergold, G.H.1949. The polyhedral disease of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clem. For. Insect. Invest. Bi-mon. Prog. Rep. 5(3):2.
- Bird, F.T. 1959. Polyedrosis and granulosis causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* J. Invert Pathol. 1: 406-430.

- Blais, J.R. 1985. The ecology of the eastern spruce budworm: a review and discussion. C.J. Sanders, R.W. Stark, E.J. Mullins & J. Murphy (Eds.), Recent Advances in Spruce Budworms Research. CANUSA. Ottawa, p: 49-59.
- Blissard, G.W and Rohrman, G.F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Annu. Rev. Entomol. 35: 127-155.
- BNDF, 1997. Base Nationale de données sur les Forêts. Abrégé de statistiques forestières canadiennes. Conseil canadien des ministres de forets. Ottawa.
- Boots M., Norman R. 2000. Sublethal infection and the population dynamics of host-microparasite interactions. J. of Animal ecology, 69: 517-524.
- Borror, D.J., DeLong, D.M. and Triplehorn, C.A.1981. An Introduction to the Study of Insects. 5<sup>a</sup> edition, Saunders College Publishing. Montreal. pp.827
- Brewer, M.J. and Tumble, J.T. 1989. Field monitoring for insecticide resistance in beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 82: 1520-1526.
- Brookes, M.H., Colbert, J.J., Mitchell, R.G., and Stark, R.W. (Editors). 1987. Western spruce budworm. USDA For. Serv. Tech. Bull. 1694p.
- Burden, J.P., Griffiths, C.M., Cory, J.S., Smith, P. and Sait, S.M. 2002. Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. Mol. Ecology 11: 547 555.
- Castrovillo, P.J. 1982. Interspecific and intraspecific genetic comparisons of North American spruce budworms (*Choristoneura* ssp.), PhD dissertation, University of Idaho, Moscow.

- Chapman, R.F., 1998. The Insects: Structure and Function, Fourth ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 38–68.
- Comptois, B. 1988. Notions d'entomologie forestière. Modulo Éditeur. Mont-Royal. 214p.
- Cory J.S., Hails R.S., Sait S.M. 1997. Baculovirus ecology. In: The Baculoviruses (ed. Miller LK), pp. 301-339. Plenum Press, New York.
- Cunningham, J.C. 1982. Field trials with baculoviruses: Control of forest insect pests. In E. Kurstak (Ed), Microbial and viral pesticides: 335-384.
- Cunningham, J. C., Kaupp, W.J and McPhee, J.R. 1983. A comparison - of the pathogenicity of two baculoviruses to the spruce budworm and the western spruce budworm. Can. For. Serv. Res. Notes 3: 9-10.
- Cunningham, J.C., Kaupp, W.J and McPhee, J.R. and Shepherd, R.F. 1983a. Ground sprays trials with two baculoviruses on western spruce budworm. Can. For. Serv. Res. Notes 3(2): 10-11.
- Cunningham, J.C. and Howse, G.W. 1984. *Choristoneura fumiferana* (Clemens) spruce budworm (Lepidoptera – Tortricidae), B. Viruses: application and assessment. pp. 248-259, in Kelleher, J.S., and M.A. Hulme (Eds), Biological Control Programmes against Insects and Weeds in Canada 1969-1980. Commonw. Agric Bureaux, Slough, U.K.
- Cunningham, J.C. 1985. Biorationals for Control of Spruce Budworms. Sanders, C.J., Starks R.W., Mullins E.J. and Murphy, J. (Eds), Recent Advances in Spruce



- Budworm Research. Proceedings of the CANUSA Spruce budworm. Research Symposium. Minister of Supply and Services Canada. Ottawa. pp. 320- 349.
- D'Amico V., Elkinton J.S., Dwyer G., Burand J.1996. Virus transmission in the gypsy moths is not a simple mass action process. Ecology, 77: 201-206.
- Dang, P.T. 1992. Morphological study of male genitalia with phylogenetic inference of *Choristoneura* Lederer (Lepidoptera: Tortricidae). The Can. Entomol.124: 7-48.
- Eaton, J.L. 1987. Lepidopteran Anatomy. Wiley-Interscience Series. In Insect Morphology, Chap. 9 (Ed.) John Wiley & Sons pp. 202-210.
- Ebling, P.M.; Kaupp W.J. 1997. Pathogenicity of a nuclear polyhedrosis virus to forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* (Hubner) (Lepidoptera – Lasiocampidae). The Can. Entomol. 129: 195-6.
- Ebling, P. 2004. Comparative activity of *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus propagated in different hosts. Pest Manag Sci. Jul; 60(7):631-8.
- Engelhard, E.K, Kam-Morgan L.N, Washburn, J.O, and Volkman L.E, 1994. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nucleopolyhedrosis. Proc Natl Acad Sci USA. Apr 12; 91(8): 3224-7.
- Escasa R.S, Lauzon, A M H, Mathur A. C., Krell P. J. and Arif B M. 2006. Sequence analysis of the *Choristoneura occidentalis* granulovirus genome. J. Gen. Virol. 87: 1917-1933.

- Federici, B.A. and Stern, V.M. 1990. Replication and occlusion of a granulovirus in larval and adult midgut epithelium of the grapeleaf skeletonizer, *Harrisina brillians*. J. Invert. Pathol. 56: 401-414.
- Federici, B.A. 1993. Viral pathobiology in relation to insect control. Beckage, N.E., Thompson, S.N ET Federici, B.A. (Eds) Parasites and Pathogens of Insects, vol.2: Pathogens chapter 4. Academic Press, inc. pp.81-101.
- Federici, B.A. 1997. Baculovirus Pathogenesis. In "The Baculoviruses" (L. K. Miller, Ed.), pp. 33-59. Plenum Press, New York.
- Fellin, D.G. 1980. A review of some interactions between harvesting, residus management, fire, and forest insects and diseases. In environmental consequences of timber harvesting in Rocky Mountain coniferous forests, Symposium proceedings. General Technical Report, INT-90 US. Department of Agriculture. Can. For. Serv.
- Fellin, D.G. 1985. Recent advances in spruce budworms research: Proceedings of the CANUSA Spruce Budworms Research Symposium, Bangor, Maine, September 16-20, 1984 / editors, C.J. Sanders ... [et al.]. Ottawa, Ont.: CANUSA, p. 116-117.
- Fellin, D.G. and Dewey, J.E. 1982. Forest insect & disease leaflet - U.S. Department of Agriculture Forest Service. For Insect Dis Leaflet. U S D A For Serv . Nov. (53) 9p.
- Fields, B.N. *et al.* 1996. Fields Virology. Chapter 18: Insect Viruses. Miller, K.L. 3ed. (B.N.Fields, D.M.Knipe, P.M.Howley, *et al.*) Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.

- Flipsen, J.T.M., Van Lent J.W.M., Goldback, R.W and Vlask, J.M. 1993. Expression of Polyhedrin and p10 in the Midgut of AcMNPV-Infected *Spodoptera exigua* Larvae: An Immunoelectron Microscopic Investigation. J. Invert. Pathol. 61: 17-23.
- Flipsen, J.T.M, Martens, J.W.M, Van Oers, J.M, Vlask, J.M. and Van Lent, J.W.M. 1995. Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. Virology 208: 328-335.
- Forté, A.J. and Guertin, C. 1999. Pathogenicity of a granulovirus towards *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera- Tortricidae). The Canadian Entomologist 131: 725-727.
- Forté, A.J. 1999. Relations tritrophiques entre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*), son alimentation et un granulovirus (ChfuGV). Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître en Sciences. IAF-INRS. 120p.
- Fuxa, R.J. and Richter, A.R. 1991. Selection for an increased rate of vertical transmission of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera – Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. Environ. Entomol. 20: 603-609.
- Fuxa J.R., Weidner E.H. et Ritcher A.R.1992. Polyhedra without virions in a vertically transmitted nuclear polyhedrosis virus. J. Invert. Pathol. 60: 53-58.
- Goldberg, A.V.; Romanowski, V.; Federici, B.A and Sciocco de Cap, A. 2002. Effects of the Epap Granulovirus on its host *Epinotia aporema* (Lepidoptera – Tortricidae). J. Invert. Pathol. 80: 148-159.
- Goulson D., Cory J.S. 1995. Sublethal effects of baculovirus in the cabbage moth, *Mamestra brassicae*. Biological Control, 5: 362-367.

- Granados, R.R. 1980. Infectivity and Mode of Action of Baculoviruses. Biotech. and Bioengineering vol. XXII, pp. 377-1405
- Granados R.R. and Lawler, K.A. 1981. In vivo Pathway of *Autographa californica* Baculovirus invasion and Infection. Virology. 108: 297-308.
- Granados, R.R. and Wilson, P. 1986. Polyhedrosis viruses in Cell Cultures. Virology. pp. 472-476.
- Guertin C. and Albert P. J., 1992. Feeding preferences and feeding rates of two instars of spruce budworm (Lepidoptera : Tortricidae) in response to pure sucrose and sugar extracts of white spruce. For. Entomol. 85: 2317- 2322.
- Hale, W.G. and Margham J. P.1988. « Collins Reference Dictionary: Biology » Collins, Glasgow.
- Hamm, J. 1966. A modified Azan technique for inclusion body viruses. J. Invert. Pathol. 8: 125-126.
- Harris, J.W.E., R.I. Alfaro, A.F. Dawson, and R.G. Brown. 1985. The western spruce budworm in British Columbia, 1909 –1983. Can. For. Serv. Pac. For. Cent. Inf. Rep. BC-X-257. 32 pp.
- Harvey, G.T. 1985. The taxonomy of the coniferophagous Choristoneura (Lepidoptera: Tortricidae): A Review. Sanders, C.J., Starks R.W., Mullins E.J. and Murphy, J. (Eds), Recent Advances in Spruce Budworm Research. Proceedings of the CANUSA Spruce budworm. Research Symposium. Minister of Supply and Services Canada. Ottawa. pp.16-48.

- Hayakawa, T. 2000. Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses. Virology. 278: 1-12.
- Hess, R.T. and Falcon, L. A. 1987. Temporal events in the invasion of the codling moth *Cydia pomonella*, by a granulosis virus: an electron microscopy study. J. Invert. Pathol. 50: 85-105.
- Hodgkinson, R. S., Finnis M., Shepherd R. F. and Cunningham J.C. 1979. Aerial application of nuclear polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* against western spruce budworm. B. C. Min. For. Can. For. Serv. Joint. Rep. 10. 19p.
- Howard, C.R. 1986. The biology of hepadnaviruses. J. Gen.Virol. 67: 1215-1235.
- Hughes, D.S., Possee, R.D., King, L. A.1993. Activation and detection of a latent baculovirus resembling *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus in *M. brassicae* insects. Virology. 194: 608-615.
- Hughes, D.S.; Possee, R.D.; King, L.A. 1997. Evidence for the presence of a low level, persistent baculovirus infection of *Mamestra brassicae* insects. J. Gen. Virol. 78: 1801-1805.
- Humason, G.L. 1979. Animal Tissues Techniques. 4ed. Chapter 10. (Ed) W.H. Freeman. San Francisco.
- Jean, M. 2003. Identification et caractérisation du gène p10 et de la protéine P10 du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) : production d'anticorps anti-P10 par immunisation classique et par immunisation génétique. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître en Sciences. IAF-INRS.

- Kaupp, W.J. and Ebling, P.M.1990. Reponse of third, fourth, fifth, and sixth-instars spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem) larvae to nuclear polyhedrosis virus. The Canadian Entomologist 122: 1037-8.
- Keddie, A.B., Aponte, G.W., Volkman L.E. 1989. The Pathway of Infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. Science. 243: 1728-1730.
- Khurad, A. M., Mahulikar, A., Rathod, M. K., Rai, M. M., Kanginakudru, S. and Nagaraju, J. 2004. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Invert. Pathol. 87: 8-15.
- Kukan, B. 1999. Minireview: Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. J. Invert. Pathol. 74: 103-111.
- Leysi, D.J., Rohrmann, G.F., Nesson, M., and Beaudreau, G.S. 1986. Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the p10 gene region of *Orgyia pseudotugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. Virology 52: 280-288.
- Li, S.Y. and Otvos, L.S. 1999. Differential mortality between male and female *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera – Tortricidae) larvae exposed to a baculovirus with or without optical brighteners. The Can. Entomol. 131: 65 – 70.
- Lyon, R. L., Richmond, C. E., Robertson, J. L., Lucas, B. A. 1972. Rearing diapause and diapause-free Western spruce budworm (*C. occidentalis*) (Lepidoptera: Tortricidae) on an artificial diet. Can. Entomol. 104: 417-426.
- Martineau, R. 1985. Insectes nuisibles des forêts de l'est du Canada. Éd : Marcel Broquet LaPrairie, Qc. 283 p

- Mattson, W.J., Simmons, G.A. and Witter, J.A. 1988. The spruce budworm in eastern North America. Berryman, A.A. (Ed), Dynamics of Forest Insect Populations. Plenum Publishing Corporation. pp. 309-330.
- McLean, D.A. 1985. Effects of Spruce Budworm Outbreaks on Forest Growth and Yield. Recent Advances in Spruce Budworms Research. CANUSA Symposium.
- McMorran, A. 1965. A synthetic diet for the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* Clem. (Lepidoptera: Tortricidae). The Can. Entomol. 97: 58-62.
- Melamed-Madjar V., Raccah, B. 1979. The transstadial and vertical transmission of a granulovirus from the corn borer *Sesamia nonagroides*. J. Invert. Pathol. 33 : 259-264.
- Mellerik, D. M. and Fraser, N. W. 1987. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: Evidence supporting an episomal state. Virology. 158: 265-275.
- Miller, L. K. 1996. Insect Viruses. Fields Virology (Chapter 18). 3<sup>a</sup>.ed (B.N.Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley *et al.* Ed) Lippincott- Raven Publishers- Philadelphia, pp. 533-558.
- Moreau, G., Lucarotti, C. J., Kettela, E. G., Thurston, G. S., Holmes, S., Weaver, C. A. A., Levin, D. B., Morin. 2005. Aerial application of nucleopolyhedrovirus induces decline in increasing and peaking populations of *Neodiprion abietis*. Atlantic Can. For. Serv. Rep.
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Ann. Rev. Entomol. 44: 257-289.
- Myers J.H., Malakar R., Cory J.S. 2000. Sublethal nucleopolyhedrovirus infection effects

- on female pupal weight, egg mass size and vertical transmission in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). Environ. Entomol. 29: 1268-1272.
- Otvos, I. S., Cunningham, J. C. and Kaupp, W. J. 1989. Aerial application of two baculoviruses against the western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* Freeman (Lepidoptera- Tortricidae), in British Columbia. The Can. Entomol. 121: 209-217.
- Otvos, L. S. and Duan, L. 2001. Influence of larval age and virus concentration on mortality and sublethal effects of a nucleopolyhedrovirus on the western spruce budworm (Lepidoptera – Tortricidae). Environ. Entomol. 30 (1): 136 – 146.
- Paillot, A. 1926. Sur une nouvelle maladie du noyau ou grasserie des chenilles de *Pieris brassicae* et un nouveau groupe de microorganismes parasites. Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences, 182: 180-182.
- Poulos, B.T., Mari, J, Bonami, J.R., Redman, R. et Lightner, D.V. 1994. Use of non-radioactively labelled probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization on fixed tissue. Journal of Virological Methods 49: 187-194.
- Powell, J.A. 1983. Tortricidae. In R.W. Hodges, T. Dominick, D.R. Davis, D.C. Ferguson, J.G. Franclemont, E.G. Monroe and J.A. Powell, Eds. Check list of the Lepidoptera of North America north of Mexico. E.W. Classey Ltd. and the Wedge Entomological research Foundation, London. 284p
- Rashidan, K. and Guertin, C. 2004. Granulovirus. Encyclopedia of Entomology. Ed.
- Rhodes, D.J. 1996. Economics of baculovirus. Insect cell production systems. Cytotechnology. 20: 291- 29.
- Rohrmann, G.F. 1986. Polyhedrin structure. J. Virology. 67: 1499-1513.



- Rose, S.H.; Lindquist, O.H. 1994. Insectes des épinettes, du sapin et de la pruche de l'est du Canada. Ressour. Nat. Can., Serv. Can. For. et Groupe Communication Canada Ottawa, Ont. 159 p.
- Rothman L. D., Myers J. H., 1996. Debilitating effects of viral disease on the host Lepidoptera. J. Invert. Pathol. 67: 1-10.
- Rowe, J.S.1972. Forest Regions of Canada. Can. For. Serv., Ottawa. Publ.n°1300.172p.
- Russel, D.L. and Consigli, R.A. 1986. Two-dimensional polyacrylamide gel analysis of *Plodia interpunctella* granulosis virus. Journal of Virology 60: 82-89.
- Ryan, B.C. 1983. Seventh Conference Fire and Forest Meteorology, Ft. Collins, sponsored by the American Meteorological Society and the Society of American Foresters. Boston : American Meteorological Society, p. 13-17
- Sakar, G. & Bolander, M. E. The looped oligo method for generating reference molecules for quantitative PCR. Biotechniques. 17: 864-866.
- Sanders, C. J., Stark, R.W., Mullins, E.J., Murphy, J. 1985. Recent advances in spruce budworms research. Proceedings of the CANUSA spruce budworms research symposium. Sept. 16-20, Bangor, Maine.Canadian Forestry Service, United States Department of Agriculture, Forest Service. 527 p.
- SAS Institute, 2002. SAS user's guide: Statistics Institute, Cary, N.C.
- Sciocco-Cap, A., Parola, A. D, Goldeberg, A.V, Ghiringhelli, P. D and Romanowsky, V. 2001. Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wal. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. Applied and Environ. Microbiol. Aug, pp. 3702-3706.
- Shapiro, M and Evans H. 1997.Viruses. In Manual of Techniques in Insect Pathology

Chapter II pp. 17-53. (Ed.L.Lacey)

- Shepherd, R. F. and Cunningham, J. C. 1984. *Choristoneura occidentalis* Freeman, western spruce budworm (Lepidoptera – Tortricidae). pp. 277-279 in Khelleher, J. S. and M. A. Hulme (Eds), Biological control programmes against insects and weeds in Canada 1969-1980. Commonw.Agric Bureaux, Slough, U.K.
- Shepherd, R. F., Cunningham, J. C. and Otvos, I. S. 1995. Western spruce budworm *Choristoneura occidentalis*, pp. 119-121. In J.A. Armstrong and W.G.H. Ives (ed), Forest insect pest in Canada. Nat. Res. Can., Can. For. Serv., Science and Sustainable Development Directorate. Ottawa. Ontario. Canada.
- Smith, O. J., Hughes, K. M., Dunn, P. H. and Hall, I. M. 1956. A granulosis virus disease of the western grapeleaf skeletonizer and its transmission. Can. Entomol. 88: 507 - 515.
- Steinhaus, E. A. 1949. Principles of insect pathology. McGraw Hill Book. Co. Inc., Toronto. 757p. Steinhaus, E. A., 1963. Insect pathology advanced treatise. Academic Press. New York, vol. 1: 661p, vol.2: 689p.
- Stehr, G. 1967. On coniferophagous species of *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae) in North America. II. Geographic distribution in accordance with forest regions. Can. Entomol. 99: 456-463.
- Stoltz, D.B.1973. The structure of icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. An alternative model. J. Ultrastruct. Res. 43: 58-74.
- Summers, M. D. 1971. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication process during infection of the midgut cells of *Trichoplusia*

- ni. J. Ultrastr. Res. 35: 606-625.
- Swaine, J. M.; Craighead, F. C. 1924. Studies on the spruce budworm (*Cacoecia fumiferana* Clem.). Part I. A general account of the outbreaks, injury and associated insects. Can. Dep. Agric, Ottawa, Ont. Tech. Bull. 37 (n.s), pp 3-27.
- Tanada, Y. and Hess R. T. 1984. The cytopathology of baculovirus infections in insects. King, R. C. ET Akai, H. (Eds), Insect Ultrastructure. vol.2. Plenum. New-York . pp. 517-555.
- Tanada, Y and Hess, R.T. 1991. Baculoviridae. Granulosis viruses. Dans J.R. Adams& J.R. Bonami (Eds), Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press Inc. Boca Raton pp. 227-257.
- Thompkins, G. J. 1991. Purification of invertebrate viruses. Adams, J. R. and Bonomi, J. R. (Eds) Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press. Library of Congress, Boston. pp. 31-38.
- Van Frankenhuyzen K, Nystrom, C. and Dedes, J. 2000. Mortality, Feeding inhibition, and recovery of spruce budworm (Lepidoptera-Tortricidae) larvae following aerial application of a high potency formulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurtaki. The Can. Entomol. 132: 505 -518.
- Vans Oers, M. M., Vlak, J. M., Voorma, H.O. and Thomas, A. M. 1999. Role of the 3' untranslated region of the baculovirus p10 mRNA in high-level expression of foreign genes. J. Gen. Virol., vol. 80 : 2253-2262.
- Vincent, P. 2000. Quantification par PCR Quantitatif compétitif et Détection par Hybridation *in situ* du ChfuGV chez les larves de *Choristoneura fumiferana*

(Lepidoptera – Tortricidae). Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître en Sciences. IAF - INRS.

Wahsburn, J. O., Kirkpatrick, B. A. and Volkman, L. E. 1995. Comparative pathogenesis of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. Virology. 209: 561-568.

Washburn, J. O., Kirkpatrick, B. A., Haas-Stapleton, E. J. and Volkman, L.E. 1998. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. Biol. Control 11: 58-69.

Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan F. F., Beckage N. E. and Volkman, L. E. 2000. Co-infection of *Manduca sexta* with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. J. Insect Physiol. 46: 179- 190.

Washburn, J. O., Chan, E. Y., Volkman, L. E., Aumiller, J. J. and Jarvis, D. L. 2003. Early synthesis of budded virus envelope fusion protein GP64 enhances *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus virulence in orally infected *Heliothis virescens*. J. Virol. 77: 280-290.

Wood, C. S., G.A. Van Sickle, and L.M. Humble. 1987. Forest insect and disease conditions, British Columbia and Yukon, 1987. Can. For. Serv. Pac. For. Centr. Inf. Rep. BC-X-296, 40pp.

Zhang, J-H., Washburn, J. O., Jarvis, D. L. and Volkman, L. E. 2004. *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus early GP64 synthesis mitigates developmental resistance in orally infected noctuid hosts. J. Gen. Virol. 85: 833-842.