

Université du Québec
INRS - Institut Armand-Frappier

Le rôle du cholestérol dans l'infection de cultures cellulaires d'insectes par un baculovirus

Par
Sonia Deschênes

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

Jury d'évaluation :

Président du jury
et examinateur interne

Dr Peter Tijssen, INRS-IAF

Examineur externe

Dr Claude Gicquaud,
Département de chimie et biologie,
Université du Québec à Trois-Rivières

Directeur de recherche

Dr Serge Belloncik, INRS-IAF

RÉSUMÉ

Les baculovirus sont d'un grand intérêt pour la production de bioinsecticides ainsi que pour la synthèse de protéines recombinantes par les cellules d'insectes. Les cellules d'insectes, contrairement à celles des mammifères, ont la particularité d'être auxotrophes aux stérols, c'est-à-dire qu'elles doivent acquérir ces derniers à partir du milieu de culture puisqu'elles sont incapables de les synthétiser. Malgré ce fait, plusieurs lignées cellulaires d'insectes ont été adaptées à des milieux sans ajout lipidique et la lignée cellulaire de *Spodoptera frugiperda* a été adaptée, dans notre laboratoire, au milieu Mitsunashi-Maramorosch N°8 sans sérum (Sf9 MM8-SF). Bien que ces cellules conservent un excellent taux de croissance, les virus des polyédroses nucléaires (NPV) ne peuvent s'y multiplier. Le sérum de veau fœtal (SVF) a longtemps permis d'y remédier. Par contre, de nombreux désavantages liés à son utilisation ont conduit à privilégier l'ajout de lipides commerciaux. Cependant, des anomalies morphologiques ont été notées chez les NPV produits chez les cellules cultivées en présence d'un mélange lipidique commercial. D'autre part, un ajout de cholestérol seul à une concentration de 20 µg/ml s'est avéré suffisant pour obtenir une infection virale normale et complète.

Tout en démontrant que l'ajout de cholestérol comme seule source lipidique était suffisant à une infection normale et complète, le présent travail a été dirigé vers l'importance et le rôle du cholestérol dans l'infection de cellules d'insectes par un baculovirus. L'utilisation d'un marqueur spécifique au cholestérol, le filipin, a permis de démontrer par cytométrie en flux, ainsi que par microscopie à fluorescence, que le cholestérol, ajouté aux cellules, s'insère dans la membrane plasmique et que celui-ci se concentre en agrégats à la surface cellulaire, ce qui pourrait représenter des micro-domaines « rafts ». L'ajout de cholestérol au moment de l'infection, et demeurant en contact avec les cellules au cours de l'infection, est amplement suffisant à une infection virale complète. L'ajout continu de cholestérol au fil des passages ne s'est pas avéré

avantageux. Ceci représente donc une diminution des coûts dans la production de baculovirus à grande échelle.

Puisque l'ensemble de nos résultats ont clairement démontré l'importance du cholestérol dans l'infection baculovirale, nos travaux ont porté, par la suite, sur le rôle du cholestérol dans cette infection. Nous avons démontré que le cholestérol occupe un rôle, directement ou indirectement, au cours des premières étapes de l'interaction entre le virus et la cellule, possiblement au niveau de l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires et/ou au cours de la fusion des membranes. Des expériences menées à l'aide de la transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN d'AcMNPV ont permis de démontrer que le cholestérol ne semblerait pas jouer de rôle dans la réplication ni dans la synthèse de nouveaux virus ou de la libération de virus infectieux des cellules. En effet, les virus produits par les cellules Sf9 MM8-SF suite à une transfection en absence de cholestérol se sont avérés infectieux autant *in vitro*, chez les cellules Sf9 maintenues en présence de sérum de veau foetal (SVF), qu'*in vivo*, chez les larves de *Galleria mellonella*.

Ces résultats ont permis de démontrer toute l'importance du cholestérol dans l'infection baculovirale et ont conduit à une meilleure compréhension de son rôle.



Sonia Deschênes



Dr Serge Bellonck, Directeur de recherche

*À mes parents,
Gabriel et Thérèse*

REMERCIEMENTS

Je désire, tout d'abord, remercier mon directeur de recherche, le Dr Serge Belloncik, pour m'avoir permis de compléter mes études graduées dans son laboratoire ainsi que de m'avoir guidée et encadrée dans la réalisation de mon projet de maîtrise.

Merci infiniment au Dr Peter Tijssen pour avoir accepté de faire la lecture de ce mémoire et de m'avoir donné de judicieux conseils.

Un remerciement tout spécial est adressé à madame Monique Couillard, technicienne de laboratoire, pour son support technique, sa disponibilité et ses encouragements constants. Mille mercis!

Je remercie également monsieur Robert Alain (M.Sc.) et mesdames Nicole Mayeu et Louise Nadon pour leur aide fort appréciée en microscopie électronique.

Je tiens à remercier monsieur Marcel Desrosiers sans qui les travaux en cytofluorométrie n'auraient pu être réalisés. Son expérience incontestée m'a été des plus précieuses.

Merci à mes amis et à la communauté étudiante de l'Institut Armand-Frappier qui ont fait en sorte de rendre mon passage en ces murs des plus agréables.

Je souhaite remercier de tout cœur mon partenaire de vie, Mohamed El-Far, pour sa patience, ses encouragements (Oh, combien précieux!) et sa présence. Un merci tout particulier pour l'aide inestimable apportée au cours de la rédaction de ce mémoire.

Enfin, je désirerais remercier les personnes qui ont toujours été présentes à mes côtés, soient mes parents, Gabriel et Thérèse, ainsi que ma sœur Isabelle pour leur amour et leur soutien. De simples mots ne pourront jamais exprimer toute ma gratitude à leur égard.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES	xii
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	2
1. LES VIRUS DES POLYÉDROSES NUCLÉAIRES (NPV)	3
1.1. Classification et structure	3
1.2. Le cycle viral en système cellulaire (<i>In vitro</i>)	9
1.2.1. La primo-infection	9
1.2.2. L'amplification virale	10
1.3. La glycoprotéine gp64	13
1.3.1. Généralités	13
1.3.2. Rôle dans l'attachement du virus à la cellule hôte	14
1.3.3. Rôle dans la fusion endosomiale	14
1.3.4. Rôle dans l'amplification virale	15
2. LES CULTURES CELLULAIRES D'INSECTES	16
2.1. Importance des cultures cellulaires d'insectes dans la production de baculovirus	16
2.2. Les lignées cellulaires avec sérum de veau foetal (SVF)	18
2.3. Les lignées cellulaires sans sérum de veau foetal (SVF)	18
2.3.1. Les milieux de culture définis	19
2.3.2. Les milieux de culture semi-définis	19
2.3.3. Les milieux de culture semi-définis MM-SF (milieu Mitsuhashi-Maramorosch sans sérum)	20
3. LE RÔLE DES LIPIDES	21
3.1. Le rôle des lipides dans la cellule	21
3.2. Le rôle des lipides dans l'infection virale	24
3.2.1. Les virus non enveloppés	24
3.2.2. Les virus enveloppés	24
3.2.2.1. Les baculovirus	25
3.2.2.2. Le Semliki Forest Virus (SFV)	26
3.2.2.3. Le Sindbis Virus (SIN)	29
3.2.2.4. Le virus de l'immunodéficience humaine	30

3.2.2.5. Le virus de l'hépatite murine (MHV)	30
3.2.2.6. Le virus African Swine Fever Virus	30
3.2.2.7. Le virus Sendai	31
3.2.2.8. Le virus de l'Influenza.....	31
3.2.2.9. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV)	32
MATÉRIEL ET MÉTHODES	33
1. LIGNÉES CELLULAIRES	34
1.1. Origine	34
1.2. Maintien des cellules	34
1.2.1. Cellules en feuillets	34
1.2.2. Cellules en suspension	37
2. INFECTIONS VIRALES <i>IN VITRO</i>	37
2.1. Préparation des inoculums viraux	37
2.1.1. Le virus AcMNPV	37
2.1.2. Le virus recombinant AcLuci	40
2.1.3. Titrage	40
2.2. Infections virales	41
2.3. Analyses de l'infection virale	42
2.3.1. AcMNPV	42
2.3.2. AcLuci	43
2.3.3. Microscopie électronique	44
3. MISE EN ÉVIDENCE DU CHOLESTÉROL PAR FLUORESCENCE	44
3.1. Cytométrie en flux	44
3.2. Microscopie à fluorescence	45
4. EFFETS DES LIPIDES SUR L'INFECTION VIRALE	45
4.1. Élimination des lipides du milieu de culture	45
4.2. Addition de lipides au milieu de culture	46
4.2.1. Addition de cholestérol	46
4.2.2. Addition d'un mélange de lipides commercial	47
5. INFECTION VIRALE SANS AJOUT DE CHOLESTÉROL	47
5.1. Entrée du virus entier	47
5.2. Transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN viral	50
5.2.1. Production de l'ADN d'AcMNPV	50
5.2.1.1. Élevage de <i>Galleria mellonella</i>	50
5.2.1.2. Infection de larves de <i>Galleria mellonella</i> par le virus AcMNPV	50
5.2.1.3. Purification des polyèdres	51
5.2.1.4. Extraction de l'ADN	52
5.2.2. Transfection	53
5.2.3. Libération de virus nouvellement synthétisés	53
5.2.4. Blocage de la réinfection	54

RÉSULTATS	56
1. Effet de la décroissance du milieu de culture en sérum de veau foetal (SVF) sur l'infection virale <i>in vitro</i>	57
2. Détection du cholestérol chez les cellules Sf9 et Sf9 MM8-SF	60
3. Infection de cellules Sf9 MM8-SF par le virus AcMNPV avec ou sans addition de cholestérol	70
4. Infection virale chez les cellules Sf9 MM8-SF additionnées de cholestérol versus les cellules Sf9 maintenues dans le milieu Grace enrichi de 10% de SVF	73
5. Cinétique de l'infection virale lors de passages répétés de cellules Sf9 MM8-SF dans le milieu MM8-SF enrichi de lipides	73
5.1. Addition de cholestérol au milieu MM8-SF	73
5.2. Impact de l'addition d'un mélange lipidique commercial sur l'infektivité virale	76
6. Effet d'une mise en contact préliminaire de cellules Sf9 MM8-SF avec le cholestérol sur l'infection virale	77
7. Effet de l'ajout du cholestérol à des temps post-infection variables sur l'infection virale	77
8. Étude du rôle du cholestérol dans l'infection virale	82
8.1. Entrée du virus entier	82
8.2. Transfection en absence de cholestérol	82
8.2.1. Initiation de l'infection	82
8.2.2. Libération de virus par bourgeonnement	86
8.2.3. Propagation de l'infection virale	89
DISCUSSION	95
CONCLUSION	110
BIBLIOGRAPHIE	112
ANNEXES	128

LISTE DES FIGURES

Figure 1	: Localisation des éléments structuraux des NPV	6
Figure 2	: Cycle viral des NPV <i>in vitro</i>	11
Figure 3	: Fermenteur (Bellco) de 100 ml utilisé pour la culture de cellules en suspension	38
Figure 4	: Infection de cellules Sf9 en cours d'adaptation au milieu MM8-SF par le virus AcMNPV et AcLuci à une MOI de 0,1	58
Figure 5	: Effet à long terme de l'élimination du SVF sur l'infectivité du virus AcMNPV	61
Figure 6	: Détection du cholestérol à la membrane cellulaire des cellules Sf9 et Sf9 MM8-SF par un marquage au filipin.....	63
Figure 7	: Détection par cytométrie en flux de cholestérol à la surface de cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans le milieu MM8 enrichi de 20 µg/ml de cholestérol (Marquage par le filipin)	66
Figure 8	: Détection par microscopie à fluorescence de cholestérol à la surface de cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans le milieu MM8 enrichi de 20 µg/ml de cholestérol (Marquage par le filipin)	68
Figure 9	: Infection de cellules Sf9 MM8-SF avec ou sans addition de cholestérol	71
Figure 10	: Effet de l'adaptation de cellules Sf9 au milieu MM8-SF additionné de cholestérol sur l'infection virale	74
Figure 11	: Effet, sur l'infection virale, d'une mise en contact préliminaire du cholestérol avec des cellules Sf9 MM8-SF	78
Figure 12	: Effet de l'ajout de cholestérol à différents temps post-infection sur l'infection de cellules Sf9 MM8-SF par le virus AcMNPV.....	80

Figure 13	: Observation en microscopie électronique de l'entrée du virus AcMNPV chez des cellules Sf9 MM8-SF	83
Figure 14	: Transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN d'AcMNPV en absence de cholestérol	87
Figure 15	: Diagnostic de l'infectiosité du virus, produit par transfection en absence de cholestérol chez les cellules Sf9 MM8-SF, chez les larves de <i>Galleria mellonella</i> (Coloration au Giemsa)	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Composition du milieu de culture Mitsubishi-Maramorosch sans sérum (MM8-SF)	35
Tableau II	: Composition du supplément lipidique commercial (SIGMA, #L-5146)	48
Tableau III	: Amplification virale en absence de cholestérol	93

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES

AcLuci	: virus recombinant (hybride d'AcMNPV et de BmMNPV) contenant le gène de la luciférase
AcMNPV	: Autographa californica multicapsid nuclear polyhedrosis virus
ADN	: acide désoxyribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
BmMNPV	: Bombyx mori multicapsid nuclear polyhedrosis virus
°C	: degré Celcius
cc	: centimètre cube
chol	: cholestérol
cm	: centimètre
cm ²	: centimètre carré
CPM	: compte de photons simples émis par minute
Da / kDa	: Dalton / kilo Dalton
DICT ₅₀	: dose infectieuse en culture de tissu provoquant 50% d'effets cytopathiques
E1	: protéine péplomère responsable de la fusion des virus SFV et SIN
F25	: flacon de culture de 25 cm ²
g	: gramme
GmMNPV	: Galleria mellonella multicapsid nuclear polyhedrosis virus
gp	: glycoprotéine
gp64	: glycoprotéine de 64 kDa d'AcMNPV
GV	: granulovirus
h	: heure
L	: litre
M	: molaire
mg	: milligramme
min	: minute
ml	: millilitre
mM	: millimolaire
MM8-SF	: milieu de culture Mitsuhashi-Maramorosch N°8 sans sérum
MNPV	: multicapsid nuclear polyhedrosis virus
MOI	: « multiplicity of infection » (multiplicité d'infection)
N	: normal
nb	: nombre
nm	: nanomètre
NPV	: <i>Nucleopolyhedrovirus</i>
pb / kpb	: paire de bases / kilo paires de bases
PBS	: tampon phosphate salin
pH	: potentiel hydrogène
p.i.	: post-infection
SDS	: dodécylsulfate de sodium
Sf9	: lignée cellulaire de <i>Spodoptera frugiperda</i> clone 9

Sf9 MM8-SF	: lignée cellulaire de <i>Spodoptera frugiperda</i> adaptée au milieu Mitsunashi-Maramorosch sans sérum
SFV	: Semliki Forest Virus
SIN	: Sindbis Virus
<i>srf-3'</i>	: virus mutant de SFV pouvant se multiplier en absence de cholestérol
SVF	: sérum de veau foetal
tr / min	: tour par minute
µg	: microgramme
µl	: microlitre
µm	: micromètre
UV	: ultraviolet
VEC	: virus extracellulaire
VI	: virus inclus
VSV	: virus de la stomatite vésiculaire

INTRODUCTION

Les baculovirus sont largement étudiés dû au fait qu'ils représentent un excellent bioinsecticide. De plus, ces virus sont utilisés en tant que vecteur d'expression virale pour la production de protéines recombinantes. Plusieurs études relatives à l'optimisation de la multiplication de ce virus en cultures cellulaires ont été réalisées.

Ces dernières années, plusieurs lignées cellulaires ont été adaptées à des milieux sans sérum de veau foetal (SVF). Cependant, pour assurer la croissance cellulaire et la réplication de baculovirus, des suppléments lipidiques ont été ajoutés à ces milieux de culture.

Dans notre laboratoire, la lignée Sf9 (*Spodoptera frugiperda* clone 9) a été adaptée au milieu MM8-SF qui ne contient aucun apport lipidique. La lignée résultante, Sf9 MM8-SF, qui a été maintenue sur plus de 600 passages jusqu'à ce jour, conserve une excellente viabilité et un niveau de croissance tout à fait comparable aux cellules originales. Par contre, le milieu demande un supplément lipidique afin de permettre la multiplication baculovirale. Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont démontré que parmi les lipides ajoutés, le cholestérol est le seul qui assure la réplication complète du baculovirus.

Suite à ces observations, il est donc maintenant important d'identifier les étapes du cycle viral du baculovirus qui dépendent du cholestérol, notamment l'internalisation et la sortie du virus sachant que le cholestérol est contenu principalement dans les membranes cellulaires. Cette étude revêt une importance dans le domaine industriel afin de diminuer les coûts de production, car les suppléments lipidiques ajoutés aux milieux de culture sont très dispendieux. Ainsi, en approfondissant nos connaissances quant au rôle qu'occupe le cholestérol dans le cycle viral, il sera possible de cibler le moment opportun pour l'ajout du stérol et ainsi, en éliminer l'utilisation excessive.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. LES VIRUS DES POLYÉDROSES NUCLÉAIRES (NPV)

1.1. Classification et structure

Les virus des polyédroses nucléaires sont des virus d'invertébrés appartenant à la famille *Baculoviridae*. Le terme baculo provient du latin *baculum* qui signifie bâtonnet et qui fait référence à la morphologie de la nucléocapside de ces virus. Cette famille renferme deux genres, soient les *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) et les *Granulovirus* (GV) responsables respectivement des polyédroses nucléaires et des granuloses. Les virus de ces deux genres se distinguent par la nature du corps d'inclusion entourant les virus et produit par ces derniers à l'intérieur des cellules infectées. Ainsi, les virus responsables des polyédroses nucléaires sont englobés dans des corps d'inclusion de 0,15 à 15 µm de taille, qui contiennent plusieurs virions et qui sont constitués de polyédrine, alors que les corps d'inclusion de forme ovicylindrique présents chez les virus responsables des granuloses sont de plus petite taille (0,3 X 0,5 µm) et sont composés de granuline. Encore une fois, ces appellations reposent sur une racine latine dont *polyhedro* signifie polyèdre, qui est la forme générale observée pour les corps d'inclusion des NPV et *granulo* qui fait référence à l'apparence granulaire et de petite taille que l'on peut observer lors d'une infection par le GV. Contrairement aux GV, où l'on observe une seule nucléocapside englobée dans le corps d'inclusion (très rarement deux ou plus), les NPV présentent deux formes distinctes d'inclusion. Tout d'abord, on retrouve des nucléocapsides enveloppées individuellement, mais contenues en plusieurs copies à l'intérieur d'un polyèdre (« *single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus* », SNPV) ou plusieurs nucléocapsides (de une à sept) par enveloppe et encore une fois présentes en plusieurs copies dans le corps d'inclusion (« *multiple-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus* », MNPV) (Summers, 1977; Rohrmann, 1992).

Il est à noter que, jusqu'à récemment, la famille des *Baculoviridae* était divisée en deux sous-familles, les *Eubaculovirinae* qui regroupaient les NPV et les GV, et les *Nudibaculovirinae* qui se différenciaient par l'absence de corps

d'inclusion et des différences au niveau morphologique. Bien que certains chercheurs soutiennent toujours ce regroupement (Burand, 1999), le Comité International de la Taxonomie des Virus (ICTV) a récemment revu la classification des baculovirus et a adopté la conservation des deux seuls genres cités précédemment (NPV et GV) et a éliminé les virus non inclus, *Oryctes rhinoceros* (OrV) et *Heliothis zea* (HzV-1), de cette famille. Ces deux virus demeurent, jusqu'à ce jour, non classifiés (Murphy *et al.*, 1995).

De récentes recherches suggèrent que les NPV peuvent être divisés en deux groupes selon leur protéine de fusion. Cette protéine, présente dans l'enveloppe virale, est responsable de la fusion entre l'enveloppe du virus et la membrane cellulaire suite à l'endocytose afin de libérer les nucléocapsides dans le cytoplasme. En effet, certains utilisent des protéines relatives à la glycoprotéine gp64 (*Autographa californica* MNPV) alors que d'autres fusionnent grâce à des protéines relatives à la LD130 (*Lymantria dispar* MNPV), ces dernières étant appelées les protéines baculovirales F (fusion). Les virus fusionnant à l'aide de protéines F ne possèdent pas le gène codant pour la gp64. Cependant, les virus utilisant la gp64 comme protéine de fusion, possèdent également le gène codant pour la protéine F même si celle-ci ne joue pas de rôle dans la fusion de ces virus; elle occuperait, par contre, d'autres fonctions. Ainsi, il a été suggéré que la gp64 aurait été incorporée récemment dans le génome des baculovirus remplaçant la fonction de fusion des protéines F (Pearson et Rohrmann, 2002).

À l'origine, les baculovirus ont été isolés de lépidoptères. Bien que cette famille d'insectes demeure le principal hôte de ces virus et le seul pour les GV, il a été rapporté des cas de NPV chez les hyménoptères, diptères, coléoptères, neuroptères, thysanoures et trichoptères ainsi que chez des crustacés de l'ordre des décapodes (crevette) (Murphy *et al.*, 1995).

Les différents baculovirus sont nommés d'après l'insecte chez lequel ils ont été isolés pour la première fois. Ainsi, le virus *Autographa californica* MNPV a été originellement isolé à partir de l'insecte *Autographa californica*. La première lettre du genre et de l'espèce s'intègrent donc dans la nomenclature utilisée pour nommer ce virus de façon abrégée, AcMNPV. Cependant, la découverte constante de nouveaux virus appartenant à la famille des *Baculoviridae* a conduit à la nécessité d'utiliser les deux premières lettres du genre et de l'espèce afin de couvrir l'éventail de ces virus (par ex. *Lymantria dispar* NPV, *Lydi*NPV) (Murphy *et al.*, 1995).

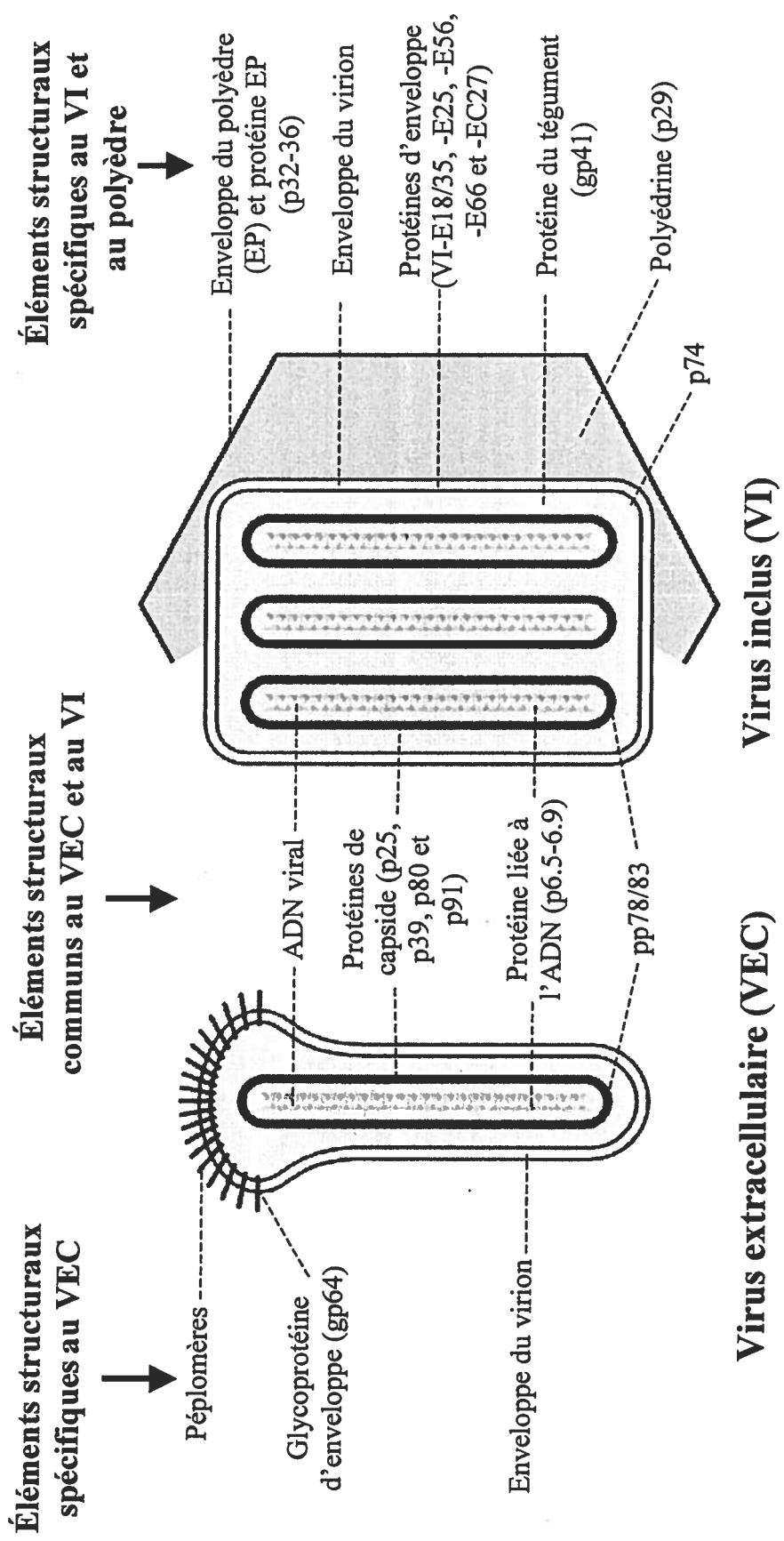
Les NPV ont la particularité de se présenter sous deux formes distinctes, soit inclus à l'intérieur des polyèdres (VI), soit non inclus, que l'on appelle également les virus extracellulaires (VEC). Malgré le fait qu'il existe de grandes similitudes entre ces deux formes, il n'en demeure pas moins que les différences structurales observées entre elles jouent un grand rôle dans l'infection des cellules hôtes.

La nucléocapside

La nucléocapside des NPV renferme un ADN circulaire surenroulé double brin de 88 à 160 kpb (Rohrmann, 1986). Cet ADN de grande taille est condensé à l'intérieur de la nucléocapside par une protéine riche en argine et en sérine/thréonine (p6.9 chez AcMNPV) (Figure 1). La composition particulière de cette protéine lui permet de se lier aux groupements phosphates de l'ADN avec une grande affinité (Pearson *et al.*, 1988). À la surface de la capsid, on retrouve une protéine p39 qui est distribuée uniformément et qui ferait partie de la structure de la capsid et non d'une structure spécialisée de celle-ci. On retrouve aussi la p25 (ou p24), une protéine de 25 kD (ou de 24 kD) qui est également distribuée dans toute la capsid des virus inclus seulement (Goh, 1993; Wolgamot *et al.*, 1993). Différentes protéines sont liées à la nucléocapside des VEC et des VI telles que la protéine p80 (Lu et Carstens, 1992) et la p91. La

Figure 1 : Localisation des éléments structuraux des NPV

(Adapté à partir de Blissard et Rohrmann (1990) par Jean-François
Michaud (2001))



pp78/83 est une phosphoprotéine associée à la structure terminale des nucléocapsides matures (Vialard et Richardson, 1993). Enfin, la gp41 (protéine du tégument) se situe entre l'enveloppe et la nucléocapside des VI (Braunagel et Summers, 1994).

L'enveloppe des virus extracellulaires et des virus inclus provient de source différente. L'enveloppe des virus extracellulaires est obtenue par bourgeonnement de ces derniers à la membrane plasmique de la cellule, alors que dans le cas des virus inclus, elle est synthétisée à l'intérieur du noyau. Cette différenciation conduit à une spécialisation de chacun. Ainsi, l'enveloppe des virus extracellulaires intervient dans les interactions entre les cellules et avec les cellules de l'hémolymphe larvaire alors que celle des virions inclus interagit avec la polyédrine et occupe un rôle dans l'infection des cellules épithéliales de l'intestin moyen de l'insecte (Blissard et Rohrmann, 1989). L'enveloppe des virus extracellulaires possède des péplomères à l'une de ses extrémités qui sont acquis lorsque le virion bourgeonne à la membrane plasmique. La principale protéine constituante de ces péplomères est la gp64 qui est une glycoprotéine codée par le virus. Cette glycoprotéine joue un grand rôle dans la propagation et l'amplification virale (Volkman *et al.*, 1984; Blissard et Rohrmann, 1989). Les différentes fonctions de la gp64 seront décrites en détails dans une section ultérieure.

Le corps d'inclusion

Le corps d'inclusion, constitué majoritairement de polyédrine (28 à 30 kDa), est très important afin de stabiliser et de protéger le virus dans l'environnement lui permettant une viabilité prolongée. Lorsqu'ingéré par les larves, le polyèdre est dissous par le pH alcalin de l'intestin moyen afin d'en libérer les virions qui peuvent ensuite pénétrer les cellules de l'intestin et initier l'infection. La polyédrine est hyper-exprimée par un gène tardif. Cette masse protéique est surplombée d'une structure ayant la morphologie d'une membrane

qui pourrait dériver de la membrane cellulaire (Rohrmann, 1986; Blissard et Rohrmann, 1990). Cette enveloppe dense en électrons, appelée PE, « polyhedron membrane » ou « polyhedron calyx » (Rohrmann, 1992), qui contient une protéine PE de 32-36 kDa, est essentielle à la stabilité du polyèdre (Russell et Rohrmann, 1990) (Figure 1). La p10, qui est une protéine hyper-exprimée, associée aux polyèdres, forme une structure fibrillaire à l'intérieur du noyau et du cytoplasme des cellules infectées (Quant-Russell *et al.*, 1987; Rohrmann, 1992). La p10 joue un rôle dans l'assemblage de la PE avec les polyèdres (Russell, Pearson et Rohrmann, 1991; Gross, Russell et Rohrmann, 1994). De plus, une protéine qui est exprimée à de faibles concentrations tard dans l'infection, la p74, serait associée aux virions inclus et est nécessaire à l'infection lorsque les polyèdres sont ingérés par les larves (Rohrmann, 1992). Finalement, une série de protéines structurales est retrouvée exclusivement dans l'enveloppe des virus inclus, soient VI-E118/35, VI-E25, VI-E56 et VI-E66 (Braunagel *et al.*, 1996; Hong, Braunagel et Summers, 1994).

1.2. Le cycle viral en système cellulaire (*In vitro*)

1.2.1. La primo-infection

Parmi tous les *baculoviridae*, les virus appartenant au genre NPV sont ceux qui se répliquent le plus aisément en culture cellulaire. Plusieurs facteurs influencent l'infection virale tels que la température, le pH, la composition ionique et de nutriments du milieu de culture, la multiplicité d'infection (MOI), le type de cellule, la densité cellulaire et le niveau de division cellulaire (Volkman et Knudson, 1988). Il est important de noter que les virions libérés de corps d'inclusion ne peuvent mener à l'infection en culture cellulaire dû à l'absence de gp64 sur leur membrane. Ainsi, seuls les virus extracellulaires sont infectieux *in vitro*, alors qu'*in vivo*, les 2 formes sont infectieuses. C'est à l'aide de la microscopie électronique que la plupart des études concernant les premières étapes de l'infection virale ont été réalisées, c'est-à-dire l'attachement à la cellule hôte, la pénétration et la décapsidation (Volkman et Knudson, 1988). Deux

théories ont longtemps coexisté concernant l'entrée du virus à l'intérieur de la cellule. La première soutenait que le virus entrait par viropexis (un phénomène similaire à la pinocytose). Cette option était d'ailleurs privilégiée à la seconde qui proposait que le virus fusionnerait à la membrane cellulaire. Finalement, l'endocytose a été acceptée comme processus d'entrée du virus (Volkman et Goldsmith, 1985) (Figure 2). Ainsi, faisant suite à l'endocytose, le virus fusionne à la membrane endosomiale de façon dépendante du pH, suite à une acidification de l'endosome. Ensuite, il y a libération de la nucléocapside dans le milieu cytoplasmique (Volkman et Goldsmith, 1985). L'entrée de l'ADN à l'intérieur du noyau demeure controversée. Certaines études prétendent que la nucléocapside s'attacherait aux pores nucléaires et pénétrerait entièrement à l'intérieur du noyau, alors que certains soutiennent plutôt que l'ADN serait libéré dans le noyau par les pores, mais que la nucléocapside demeurerait à l'extérieur. Quoiqu'il en soit, l'attachement viral se produirait en seulement 5 à 10 minutes d'exposition aux cellules hôtes, la pénétration et la décapsidation se produiraient en 3 heures (Volkman et Knudson, 1988). Une fois l'assemblage de l'ADN et de la nucléocapside réalisé, le virion migre jusqu'à la membrane cellulaire où il acquiert son enveloppe avec insertion de péplomères à cet endroit y compris la gp64 qui servira lors de l'infection secondaire de cellules. Quant à ce qui a trait aux virus inclus, leur enveloppe sera synthétisée à l'intérieur du noyau où ils seront englobés de polyédrique donnant lieu à des corps d'inclusion complets. Ces polyèdres seront ensuite libérés suite à la lyse de la cellule.

1.2.2. L'amplification virale

Les virus extracellulaires sont responsables de l'amplification de l'infection virale dans un feuillet cellulaire et dans la larve (Figure 2). Donc, suite à leur bourgeonnement à la membrane plasmique de la cellule hôte, et ayant ainsi acquis la gp64, les virus extracellulaires iront se lier aux autres cellules via leur gp64 pour ensuite pénétrer à l'intérieur de celles-ci par endocytose et un cycle en

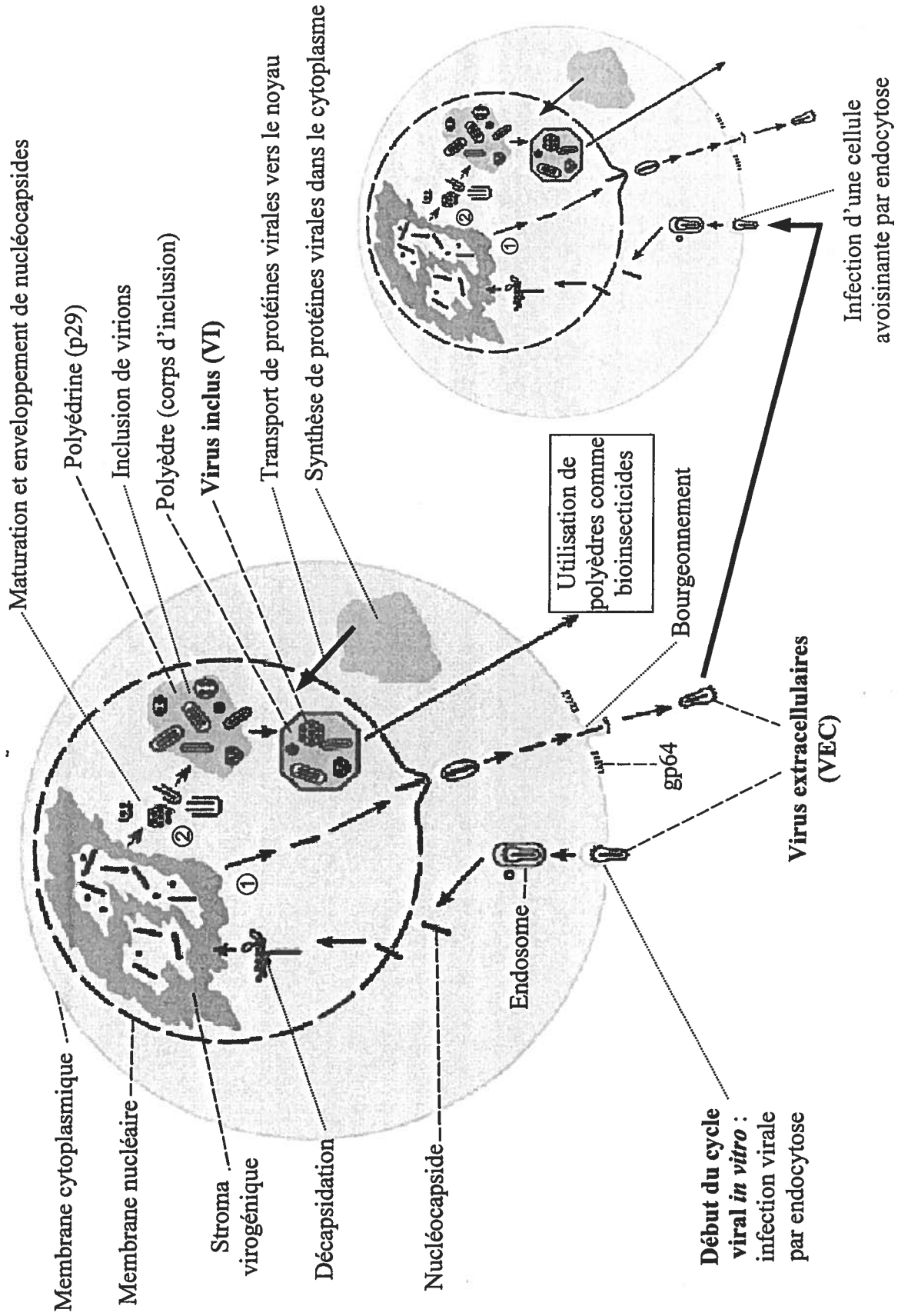
Figure 2 : Cycle viral des NPV *in vitro*

- ① Formation de virus extracellulaires (VEC)
- ② Formation de virus inclus (VI)

..... : Étape du cycle viral

----- : Structure cellulaire ou virale

(Adapté à partir de Blissard et Rohrmann (1990) par Jean-François Michaud (2001))



Maturation et enveloppement de nucléocapsides

Membrane cytoplasmique

Membrane nucléaire

Stroma virogénique

Décapsidation

Nucléocapside

Endosome

Début du cycle viral *in vitro* : infection virale par endocytose

Virus extracellulaires (VEC)

Infection d'une cellule avoisinante par endocytose

Utilisation de polyèdres comme bioinsecticides

Bourgeoisement

gp64

Polyédrique (p29)

Inclusion de virions

Polyèdre (corps d'inclusion)

Virus inclus (VI)

Transport de protéines virales vers le noyau

Synthèse de protéines virales dans le cytoplasme

tout point similaire à la primo-infection s'ensuivra. Ce cycle se répètera jusqu'à l'infection du tapis cellulaire en entier.

1.3. La glycoprotéine gp64

1.3.1. Généralités

Des études ont démontré que seuls les virus extracellulaires possèdent la glycoprotéine gp64 à leur surface, les virions inclus en étant dépourvus (Volkman *et al.*, 1984; Blissard et Rohrmann, 1989). La gp64 est codée par le génome viral et la forme trimérique est transportée vers la membrane plasmique de la cellule suite à sa synthèse, tandis que la forme monomérique est dégradée. La gp64 est ensuite acquise par le virus lorsque celui-ci bourgeonne à la membrane cellulaire. L'observation par microscopie électronique a permis de constater que cette gp se retrouve sur l'ensemble de l'enveloppe des virus, mais elle est concentrée à une seule extrémité de celle-ci, parmi les péplomères, qui correspond en fait au point de bourgeonnement des virions à la membrane plasmique (Volkman *et al.*, 1984). Les études de neutralisation ont aussi prouvé que la gp64 occupe un rôle dans l'infection virale.

La transcription de la gp64 est régulée par le gène *gp64 efp* sous le contrôle de promoteurs précoces et tardifs, ce qui explique la présence de la gp64 chez les cellules infectées du début jusqu'à la fin de l'infection. Cet homo-oligomère phosphorylé, acylé et glycosylé est lié de façon covalente par des ponts disulfures (Oomens, Monsma et Blissard, 1995). De façon plus détaillée, la structure prédite de cette protéine est composée d'un signal peptidique N-terminal de 20 acides aminés hydrophobes, d'un large ectodomaine de 462 acides aminés qui est présent à la surface du virus aussi bien que de la cellule infectée, d'un domaine transmembranaire hydrophobe de 23 résidus et d'une courte queue cytoplasmique hydrophile de 7 acides aminés (Oomens et Blissard, 1999).

Un immunobuvardage de type Western et des observations en immunofluorescence ont permis de quantifier et de suivre la progression de la gp64 à l'intérieur de la cellule infectée. Ainsi, à 6 h p.i., on observe des taches diffuses à l'intérieur du cytoplasme et à la membrane plasmique. C'est entre 18 et 24 h p.i. que la gp64 atteint son maximum d'intensité à la périphérie des cellules (Blissard et Rohmann, 1989).

1.3.2. Rôle dans l'attachement du virus à la cellule hôte

Puisque la gp64 est la protéine majeure de l'enveloppe des NPV, son implication dans l'attachement viral aux récepteurs de la cellule hôte a été envisagée. L'utilisation d'une glycoprotéine gp64 soluble (GP64sol) comme compétiteur aux virus a permis de confirmer cette hypothèse. Ainsi, la gp64 est une protéine responsable de l'attachement, cependant seule la forme trimérique de cette molécule peut accomplir ce rôle suggérant que les ponts disulfures sont importants afin de maintenir une structure adéquate pour qu'il y ait reconnaissance des récepteurs cellulaires (Hefferon *et al.*, 1999).

1.3.3. Rôle dans la fusion endosomiale

Faisant suite à ces recherches, il a été démontré que la forme trimérique de la gp64 est responsable de la fusion du baculovirus à l'intérieur de l'endosome suite à l'endocytose (Markocic *et al.*, 1998). En effet, l'utilisation d'un plasmide codant pour la gp64 sous un fort promoteur eucaryotique, jumelé à des variations de pH de la culture cellulaire transfectée, a démontré, qu'à un pH faible (pH 5.0 pour 4 h), la gp64 entraîne la fusion des membranes en formant un syncytium de façon dépendante du pH (Blissard et Wenz, 1992).

1.3.4. Rôle dans l'amplification virale

La construction d'un recombinant de AcMNPV, dont a été délété le gène codant pour la gp64 (vAc^{64Z}) et inséré la séquence codante du gène *LacZ*, a permis de déterminer que la gp64 est essentielle dans le transfert, en culture cellulaire, du virus de cellule en cellule. En effet, la transfection de cellules permissives par ce virus recombinant a permis un premier cycle d'infection, c'est-à-dire qu'il y a eu réplication du virus chez les cellules transfectées, mais aucune propagation de l'infection virale à d'autres cellules n'a été observée. Les virus, ainsi produits, restant prisonniers à l'intérieur de la cellule. Des larves ont également été infectées *per os* par les polyèdres obtenus suite à une transfection à l'aide du recombinant vAc^{64Z}. Encore une fois, une primo-infection était visible par l'infection de quelques cellules de l'intestin moyen, ce qui indique que les virions inclus ne nécessitent pas la présence de la gp64 pour être infectieux. Cependant, aucune propagation du virus n'a été observée, confirmant l'hypothèse que la gp64 est primordiale à la propagation virale de cellule en cellule et pour qu'il y ait amplification virale (Monsma, Oomens et Blissard, 1996). Suite à cette étude, deux hypothèses ont été soulevées; soit que la libération de virus bourgeonnant à la membrane cellulaire est impossible en absence de gp64 ou que les virus ainsi produits ne sont pas infectieux. Des études subséquentes ont démontré que la gp64 joue un rôle très important dans le bourgeonnement des virions à la membrane plasmique de la cellule infectée et que l'amplification défectueuse observée précédemment à l'aide du recombinant vAc^{64Z} était due à une lacune dans le bourgeonnement des virions en absence de gp64. Cependant, une production virale équivalente à environ 2% de ce que l'on retrouve avec le virus AcMNPV de type sauvage indique que la gp64 n'est pas la seule protéine responsable du bourgeonnement, mais qu'elle est du moins très importante dans ce processus (Oomens et Blissard, 1999).

Il a été proposé que le bourgeonnement des virions était dû à l'interaction des domaines cytoplasmiques des protéines de l'enveloppe ou de la capsid

virale, des délétions ont été effectuées dans les séquences codantes pour la structure de la gp64 afin d'établir le rôle que celle-ci pouvait avoir dans le bourgeonnement chez le virus AcMNPV. Ainsi, la délétion des 7 acides aminés de la queue cytoplasmique a démontré que cette structure n'est pas essentielle pour la production de virus infectieux, mais qu'elle est importante dans le bourgeonnement viral puisqu'on dénote une réduction de 50 à 63% de la production virale lorsque cette séquence est délétée comparativement au type sauvage. De plus, la queue cytoplasmique de la gp64 serait importante dans l'incorporation de la gp64 chez la nouvelle production virale. Cependant, la délétion de 11 à 14 acides aminés de la partie C-terminale, incluant la queue cytoplasmique et une partie du domaine transmembranaire, a un impact beaucoup plus grand, diminuant jusqu'à 98% la production virale. Cette délétion entraîne une plus faible proportion de la glycoprotéine présente à la surface cellulaire (Oomens et Blissard, 1999).

2. LES CULTURES CELLULAIRES D'INSECTES

2.1. Importance des cultures cellulaires d'insectes dans la production de baculovirus

Depuis plus de quatre décennies, les bioinsecticides ont émergé comme d'importantes nouvelles armes dans le contrôle des insectes ravageurs, aussi bien dans le domaine agricole que forestier. Les baculovirus sont utilisés principalement comme insecticides viraux dû à leur spécificité, à leur grande étendue parmi les insectes ravageurs d'importance économique, à leur virulence et à leur sécurité envers les espèces non ciblées. Cependant, afin d'être concurrentiels économiquement aux insecticides chimiques, ces bioinsecticides doivent être produits à l'échelle industrielle de façon efficace et économique sous des conditions contrôlées. Les cultures cellulaires d'insectes prennent donc toute leur importance (Agathos, 1991). Ainsi, il est possible de sélectionner des clones permettant une grande susceptibilité aux virus et éviter la présence de protéines d'insectes allergènes à l'homme, de cuticules d'insectes et des contaminations

microbiennes qui peuvent être présentes lorsque le virus est produit chez la larve (*in vivo*) (Weiss et Vaughn, 1986).

En plus de leur intérêt dans le contrôle d'insectes nuisibles, les baculovirus ont la particularité de posséder deux gènes hyper-exprimés soient ceux codant pour la polyédrine et la p10. De ce fait, les baculovirus sont très intéressants dans la production de protéines recombinantes d'intérêt biologique et médical, en substituant les gènes d'intérêt aux gènes ci-haut mentionnés (Luckow et Summers, 1988; Miller, 1988).

Le baculovirus le plus étudié est *Autographa californica* MNPV qui a d'ailleurs été complètement séquencé par Ayres *et al.* (1994).

Dès les années 60, plusieurs chercheurs ont tenté d'établir différentes lignées cellulaires dans le but de supporter la réplication de baculovirus. Bien que les premières cellules cultivées *in vitro* ne pouvaient subsister après un certain nombre de passages, différentes lignées cellulaires ont pu être établies par la suite. À ce sujet, on retrouve par exemple une lignée cellulaire provenant de tissus ovariens de *Trichoplusia ni* qui a été établie en 1970 par Hink et qui permet la production du virus *Trichoplusia ni* MNPV (TnMNPV) (Hink, 1970) et une lignée de *Spodoptera frugiperda* qui peut supporter la réplication de *Spodoptera frugiperda* MNPV (SfMNPV) (Goodwin *et al.*, 1970).

Les éléments de base requis pour les milieux de culture de lignées cellulaires de lépidoptères sont des sels inorganiques, des acides aminés, des vitamines, des carbohydrates, des hydrolysats protéiniques et un ajout de 5-20% de sérum de veau foetal (SVF) (Röder, 1982).

2.2. Les lignées cellulaires avec sérum de veau foetal (SVF)

Les premiers milieux de culture utilisés pour le maintien de lignées cellulaires comportaient, pour la plupart, du sérum de veau foetal (Grace, 1962). Quoique subvenant bien aux besoins cellulaires et à la production virale, le sérum de veau comporte cependant de nombreux désavantages tels qu'une possible toxicité envers les cellules. Il peut être aussi la source de contamination par des mycoplasmes (Miltener, 1983) et il représente un coût important. Ainsi, lorsqu'ajouté à une concentration de 10%, il représente plus de 90% des coûts de la fabrication du milieu (Claus *et al.*, 1993). C'est pourquoi plusieurs études ont été réalisées par la suite afin d'éviter l'utilisation du SVF dans les milieux de culture.

2.3. Les lignées cellulaires sans sérum de veau foetal (SVF)

À la fin des années 70, les premières lignées cellulaires d'eucaryotes adaptées à un milieu sans sérum de veau foetal ont été établies. L'analyse de la composition lipidique de lignées de *Mamestra brassicae* (lépidoptère), de *Aedes albopictus* (diptère) et de *Sarcophaga peregrina* (diptère) a démontré que ces cellules ne contenaient pas de stérol, ce qui confirmait le fait que les cellules d'insectes ne produisaient pas leurs propres stérols et que celles-ci ne nécessitaient pas de stérol pour leur croissance. Cependant, ces cellules dépourvues de stérol sont moins tolérantes aux basses températures, ce qui indique que les stérols jouent un rôle dans la résistance au froid par leur structure et leur fonction dans les membranes cellulaires (Mitsuhashi, Nakasone et Horie, 1983).

Différents types de milieux de culture sans sérum existent soit définis ou semi-définis.

2.3.1. Les milieux de culture définis

Les milieux de culture définis ne contiennent que des éléments chimiques bien définis et aucun composé biologique n'y est ajouté. Parmi ces milieux, on retrouve celui de Wilkie *et al.* qui peut soutenir quelques lignées cellulaires dont celle de *Spodoptera frugiperda* et permet la réplication de NPV (Wilkie, Stockdale et Pirt, 1980).

2.3.2. Les milieux de culture semi-définis

Cependant, la plupart des milieux sans sérum sont semi-définis, c'est-à-dire qu'ils contiennent des éléments chimiques définis ainsi que certains composés biologiques. C'est à cette catégorie qu'appartiennent les différents milieux servant au maintien des lignées cellulaires discutées ci-dessous.

Différentes études ont été réalisées afin d'optimiser la production de baculovirus en absence de sérum. En 1977, la lignée cellulaire TN-368 de la fausse-arpenreuse du chou (« cabbage looper ») maintenue depuis son établissement en 1968 dans le milieu Grace enrichi d'extrait de levure (« yeastolate »), de lactalbumine et de 8% de SVF a été adaptée à un milieu sans sérum enrichi de yeastolate, de lactalbumine et de bactotryptose (Hink, Strauss et Lynn, 1977).

En 1978, Goodwin a démontré que l'ajout de supplément lipidique commercial (oléate méthyle, acétate α -tocophérol, cholestérol et Tween-80) au milieu de culture sans sérum était essentiel à la réplication de baculovirus. De plus, l'ajout seulement de glycérol conduisait à une incorporation très rare des virions à l'intérieur des polyèdres et les virus extracellulaires apparaissaient anormaux en microscopie électronique (Goodwin et Adams, 1978). Plus tard, Goodwin remplaça le supplément lipidique commercial par des fractions liposomiales (cholestérol, L- α -phosphatidylcholine et acétate DL- α -tocophérol).

Ce mélange a permis la réplication de baculovirus infectieux chez la larve sur plus de 5 passages (Goodwin et Adams, 1980a). Goodwin a confirmé que plusieurs suppléments lipidiques tels que des stérols, des phospholipides polyinsaturés ou des acides gras insaturés, peuvent stimuler la croissance de lignées cellulaires d'insectes et la réplication virale en absence de SVF (Goodwin, 1990).

En 1982, Röder a adapté une lignée cellulaire de *Spodoptera frugiperda* au milieu TC10 non enrichi de sérum, mais auquel on a ajouté une émulsion de jaune d'œufs à une concentration de 1%. Ce milieu a permis la croissance cellulaire et la réplication du virus *Autographa californica* MNPV, et ce, sans effet sur la morphologie et la virulence des polyèdres produits (Röder, 1982).

2.3.3. Les milieux de culture semi-définis MM-SF (milieu Mitsuhashi-Maramorosch sans sérum)

Le milieu MM-SF (milieu Mitsuhashi-Maramorosch sans sérum) semble être le plus simple à préparer et il est très économique. Ce milieu ne nécessite aucun supplément lipidique afin de stimuler la croissance cellulaire, contrairement à la plupart des milieux de culture (Mitsuhashi et Goodwin, 1989). Ce milieu semi-défini a été développé à partir du milieu MM de Mitsuhashi et Maramorosch d'où le SVF a été éliminé (Mitsuhashi, 1982).

Mitsuhashi a, par la suite, tenté de réduire davantage les coûts liés à la conception du milieu en utilisant de l'eau de mer au lieu d'un mélange de sels inorganiques et le sucrose comme seul carbohydrate. Ce milieu autoclavable nommé MTCM-1601 satisfait aux exigences d'au moins 8 lignées cellulaires de lépidoptères et de diptères (Mitsuhashi, 1989).

Le milieu sans sérum de Mitsuhashi et Maramorosch a été modifié par la suite par Koike et Sato (1988) en omettant le carbonate de sodium hydrogène et

le phosphate monosodique afin d'éviter la précipitation lors de l'autoclavage du milieu. La concentration d'hydrolysate de lactalbumine a également été doublée. Les différents milieux ainsi conçus, nommés N°8, N°10 et N°15 peuvent supporter la croissance de 9 lignées cellulaires de lépidoptères, et ce, autant en flacon de culture qu'en suspension (Koike et Sato, 1988; Agathos, 1991).

La lignée cellulaire de *Spodoptera frugiperda* clone 9 (Sf9) a été isolée à partir de la lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21 (Vaughn *et al.*, 1977) et est habituellement cultivée dans un milieu enrichi de 10% de SVF. Cette lignée a été adaptée au milieu MM8-SF dans notre laboratoire (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Les cellules ainsi adaptées, Sf9 MM8-SF, y croissent efficacement. Bien que la réplication des virus des polyédroses cytoplasmiques s'y répliquent sans problème, la réplication des NPV nécessite l'ajout de cholestérol à une concentration de 20 µg/ml. Ce point sera discuté plus en détails dans la partie traitant du rôle des lipides dans la réplication virale.

3. LE RÔLE DES LIPIDES

3.1. Le rôle des lipides dans la cellule

Les lipides sont retrouvés principalement dans les membranes des cellules, et ce, autant chez les vertébrés que chez les invertébrés. Leur fonction majeure consiste au maintien de la structure de la cellule. La double couche lipidique entourant la cellule, composée en grande majorité de phospholipides, sert de barrière relativement imperméable au passage de la plupart des molécules hydrosolubles. Les principaux phospholipides retrouvés chez les cellules de mammifères sont la phosphatidylcholine, la sphingomyéline, la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine. Les queues des phospholipides sont constituées d'acides gras saturés et insaturés qui influencent la fluidité membranaire. La membrane est également composée de stérols (cholestérol) et de glycolipides. Chez les cellules eucaryotes, le cholestérol peut représenter près de 50% des lipides membranaires. Les molécules de

cholestérol s'intercalent entre les phospholipides en dirigeant leur groupement polaire dans la même direction que les phospholipides et immobilisent en partie les chaînes hydrocarbonées phospholipidiques rendant, de ce fait, la double couche lipidique moins déformable et diminuant la perméabilité aux petites molécules hydrosolubles. Pour ce qui est des glycolipides, ils se retrouvent exclusivement du côté non cytoplasmique de la double couche lipidique et représentent environ 5% des molécules lipidiques membranaires (Alberts *et al.*, 1995). Leur position leur confère un rôle important dans l'interaction de la cellule avec son environnement et permet aux cellules de communiquer entre elles (de Kruijff, 1987; Alberts *et al.*, 1995).

La forme des membranes est influencée non seulement par les protéines, mais également par les lipides. La forme des lipides membranaires est déterminante dans la courbure de la membrane. Les lipides de forme conique favorisent une courbure négative comme celle retrouvée chez le feuillet interne d'une membrane alors que lipides de forme conique inversée, de courbure positive, caractérisent le feuillet externe. Les lysophospholipides font partie du premier groupe, alors que les acides gras insaturés et l'acide oléique font partie du second. Ces différentes formes lipidiques affectent de façon critique la fusion membranaire de façon positive et négative respectivement (Schmidt *et al.*, 1999). Cette caractéristique occupe donc un rôle important dans l'infection virale comme il sera discuté ultérieurement.

Comparativement aux mammifères, les insectes sont auxotrophes pour les stérols, ce qui signifie qu'ils doivent les acquérir de leur diète (Clayton, 1964; Nes et McKean, 1977; Mitsuhashi, Nakasone et Horie, 1983). Pour la plupart d'entre eux, les phytostérols ingérés seront convertis en cholestérol (Clayton, 1964; Svoboda *et al.*, 1975). La composition lipidique de plusieurs lignées cellulaires a été analysée (Townsend, Jenkin et Yang, 1972; Luukkonen, Brummer-Korvenkontio et Renkonen, 1973; Yang *et al.*, 1976; Silberkang *et al.*, 1983; Yeh, Bajpai et Sun, 1997), dont celle de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) qui est très

utilisée pour la production de baculovirus et de protéines recombinantes. Cette dernière étude a démontré que les membranes plasmiques de cellules Sf9 contenaient dix fois moins de cholestérol que les membranes plasmiques isolées de cellules de mammifères (Marheineke *et al.*, 1998). De plus, il est possible de maintenir des cultures de cellules d'insectes dans du milieu non enrichi en cholestérol alors que l'extraction de plus de 70% de cholestérol des cellules de mammifères est toxique pour celles-ci (Keller et Simons, 1998). Contrairement aux cellules de mammifères, les cellules d'insectes ne nécessitent pas de supplément de lipides pour leur croissance.

Ces dernières années, plusieurs recherches se sont tournées vers la présence de micro-domaines lipidiques, communément appelés « rafts », dans les membranes de vertébrés. En effet, les lipides contenus dans les membranes de cellules de mammifères ne sont pas homogènes. Ainsi, des micro-domaines lipidiques se forment quand une phase riche en sphingolipides et en cholestérol se sépare de la phase riche en phospholipides qui constitue le reste de la membrane. Le cholestérol a une interaction préférentielle avec les sphingolipides, car ceux-ci ont une température de fusion plus élevée que les phospholipides (Rietveld *et al.*, 1999). Les membranes comportant ces domaines sont appelées « detergent-resistant membranes (DRM) » dû à leur résistance relative à la solubilisation par le Triton X-100 ou le Triton X-114 à 4°C (Rietveld *et al.*, 1999; Ahn, Gibbons et Kielian, 2002). Chez les vertébrés, la formation de ces micro-domaines joue un rôle important dans la sortie de protéines polarisées et dans les signaux de transduction. Des études réalisées sur les membranes de la drosophile ont démontré que celles-ci contenaient également des micro-domaines lipidiques qui ressemblent à ceux retrouvés chez les mammifères quant à leur composition lipidique et protéinique. Ainsi, la présence de ces micro-domaines est également observée chez les insectes et pourraient avoir un rôle similaire (Rietveld *et al.*, 1999).

Le cholestérol peut se lier aux protéines de surface et avoir un effet dans leur changement de conformation (Mutara *et al.*, 1995). La fonction de liaison à des ligands de certaines protéines réceptrices est également fortement dépendante du niveau de cholestérol dans les membranes. Le cholestérol module la fonction des récepteurs soit en changeant la fluidité membranaire et/ou par une interaction moléculaire spécifique entre la protéine et le cholestérol (Gimpl, Burger et Fahrenholz, 1997).

3.2. Le rôle des lipides dans l'infection virale

3.2.1. Les virus non enveloppés

Des expériences menées par Belloncik, Akoury et Cheroutre (1997) ont montré que la réplication d'un virus responsable d'une polyédrose cytoplasmique chez des cellules maintenues dans un milieu sans ajout lipidique n'était pas affectée. D'autre part, chez les rotavirus (famille *Reoviridae*), les lipides semblent jouer un grand rôle dans l'infectivité du virus. En effet, l'inhibition des glycolipides chez les cellules de mammifères MA104 entraîne l'inhibition de l'infection. De plus, lorsque ces cellules sont dépourvues de cholestérol, l'infectivité du virus diminue de plus de 90%. Bien que l'infectivité virale est fortement diminuée, l'attachement du virus est tout de même possible, ce qui porte à croire que les récepteurs membranaires du virus doivent être inclus dans des micro-domaines « rafts » afin de permettre l'infection complète (Guerrero *et al.*, 2000).

3.2.2. Les virus enveloppés

La majorité des virus enveloppés ont la particularité d'induire la fusion des membranes dans leur stratégie d'infection, soit avec la surface des membranes cellulaires ou dans les vésicules faisant partie de l'endocytose. L'implication des lipides dans l'infection et la pathogénèse a été suggérée suite à des études démontrant qu'une augmentation en acides gras saturés entraînait une

susceptibilité plus grande à la fusion des virus aux cellules hôtes (Roos *et al.*, 1990).

3.2.2.1. Les baculovirus

Très peu d'études ont été réalisées jusqu'à ce jour sur le rôle des lipides dans l'infection des baculovirus. Dès le début des années 80, il a été suggéré que la présence de stérols et de lipides dans le milieu de culture était importante pour l'assemblage viral des NPV (Volkman et Knudson, 1988). Il a été constaté que la réplication de baculovirus ne pouvait avoir lieu que dans un milieu de culture enrichi de lipides (Goodwin et Adams, 1980b).

Des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré que les lipides, et en particulier le cholestérol, jouent un rôle dans la synthèse de virus extracellulaires et de leur membrane et également dans l'intégration des virions à l'intérieur des polyèdres. En effet, l'infection par le virus *Galleria mellonella* multicapsid nuclear polyhedrosis virus (GmMNPV) d'une lignée cellulaire de *Spodoptera fugiperda* (Sf9) adaptée au milieu Mitsunashi-Maramorosch, qui est un milieu non enrichi de sérum (cellules Sf9 MM8-SF), a permis de constater que l'ajout d'une concentration de 2 µg/ml de cholestérol permet une synthèse normale des polyèdres, mais c'est à une concentration optimale de 20 µg/ml de cholestérol que l'on obtient une production virale équivalente à ce que l'on retrouve chez les cellules Sf9 maintenues dans un milieu additionné de 10% de SVF. Cependant, l'ajout seul d'un supplément lipidique commercial ne permet qu'un faible niveau de réplication et les polyèdres et virions qu'en résultent comportent des anomalies dans leur formation. De plus, il est intéressant de noter qu'une infection en présence de 4,5 µg/ml de cholestérol permet une réplication supérieure à ce que l'on retrouve en présence d'un supplément lipidique commercial qui contient également 4,5 µg/ml de cholestérol. Ainsi, il a été suggéré que certaines composantes du supplément lipidique commercial

pourraient compétitionner avec le cholestérol (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997).

À cet effet, différents lipides ont également été étudiés quant à leur impact sur l'infection par les baculovirus. L'ajout de lysophospholipides de façon exogène ou la production de ceux-ci *in situ* par un traitement des membranes cellulaires par la phospholipase A2 inhibe, de façon réversible, la formation de syncytium et diminue l'infection par les baculovirus. Par contre, les acides oléique et arachidonique augmentent la fusion cellulaire. Il a donc été démontré que les lysophospholipides ayant une forme conique inversée inhibent la fusion des membranes, alors que les acides gras cis-insaturés de forme conique avantagent la fusion. On dénote donc que différents lipides peuvent avoir un effet antagoniste. La composition lipidique des membranes aurait donc un effet sur les processus dépendants du pH conduisant au changement de conformation de la protéine de fusion (Chernomordik *et al.*, 1995).

Il a été démontré également, par des analyses enzymatiques et chimiques des mécanismes d'infection des baculovirus, que les phospholipides sont impliqués dans la liaison et la pénétration du virus dans les cellules d'insectes. Plus particulièrement, le phosphatidylinositol et l'acide phosphatidique pourraient jouer un grand rôle dans l'infection virale (Tani *et al.*, 2001).

3.2.2.2. Le Semliki Forest Virus (SFV)

Le Semliki Forest Virus (SFV) représente un prototype très étudié chez les virus infectant les cellules par endocytose. Le SFV fait partie de la famille des Alphavirus. Ce petit virus de forme icosaèdre est un virus à ARN simple brin positif enveloppé. La fusion de ce virus à l'intérieur de l'endosome est dépendante d'un pH acide qui entraîne un changement de conformation chez les protéines péplomères responsables de la fusion. Ces péplomères hétérotrimériques sont en fait constitués de deux polypeptides

transmembranaires, E1 et E2 ainsi que d'un polypeptide périphérique, E3 (Kielian et Jungerwirth, 1990). E1 étant reconnu comme seul responsable de l'activité de fusion du virus (Nieva *et al.*, 1994).

Des études réalisées chez des cellules dépourvues de cholestérol ont démontré que le SFV pouvait se lier à la membrane, internaliser la cellule hôte et qu'il y avait une acidification normale de l'endosome. Cependant, la fusion a été bloquée de même que la réplication (Phalen et Kielian, 1991). Les cellules ainsi dépourvues de cholestérol se sont révélées 2000 fois moins permissives à l'infection virale que les cellules maintenues en présence de cholestérol. Cependant, le contact de ces cellules avec le cholestérol pendant une nuit a suffi à redistribuer adéquatement celui-ci dans la membrane plasmique de la cellule et ainsi, à rétablir l'infection virale. Ces études suggèrent que la fusion du virus à l'intérieur de l'endosome est dépendante de la quantité de cholestérol contenue dans la membrane de la cellule hôte (Marquardt, Phalen et Kielian, 1993).

Il a été démontré, que suite à un changement de conformation des polyprotéines E1 et E2, lorsque mises en présence d'un pH acide, E1 est dépendante du cholestérol pour accomplir son rôle dans la fusion (Kielian et Jungerwirth, 1990). Plus spécifiquement, le changement de conformation de E1 serait dépendant du cholestérol (Chatterjee, Vashishtha et Kielian, 2000).

L'analyse d'un mutant pouvant se répliquer en absence de cholestérol, *srf-3'* (sterol requirement in function), a permis de déterminer que cette capacité de réplication a été acquise par la simple mutation de P226→S à l'intérieur de E1 (Vashishtha *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 1999; Lu, Cassese et Kielian, 1999), mais à l'extérieur du peptide de fusion (Ahn, Gibbons et Kielian, 2002). Ainsi, cet acide aminé serait responsable de la dépendance du virus au cholestérol.

Des études effectuées à l'aide de liposomes ont démontré que la fusion est absolument dépendante de la présence de cholestérol à l'intérieur de la

membrane cible (White et Helenius, 1980; Kielian et Jungerwirth, 1990). Le ratio de 0,5 stérols / phospholipides permet un maximum de fusion (Marquardt, Phalen et Kielian, 1993; Kielian *et al.*, 2000). Des études effectuées avec des analogues du cholestérol ont démontré que ceux-ci ne sont pas critiques à la fusion (Kielian et Helenius, 1984). Cependant, les stérols contenant un groupement 3 β -hydroxyl, une structure plane et une chaîne aliphatique en C-17 peuvent remplacer le cholestérol (Kielian et Jungerwirth, 1990; Marquardt, Phalen et Kielian, 1993; Corver *et al.*, 1995; Kielian *et al.*, 2000).

Bien que le cholestérol soit essentiel à la liaison du virus à l'endosome dans des conditions dépendantes du pH, les sphingolipides contenus dans la membrane de la cellule hôte agiraient en tant que cofacteurs du cholestérol afin de compléter la fusion des membranes (Nieva *et al.*, 1994; Corver *et al.*, 1995). Cette notion de cofacteur provient du fait qu'une concentration aussi faible que 1-2 mole % de sphingomyéline est suffisante à la fusion. La phosphatidylcholine agirait également en tant que cofacteur (Nieva *et al.*, 1994). Il n'en demeure pas moins que le céramide semble être le sphingolipide minimalement requis afin de permettre le processus de fusion du SFV. Ce processus de fusion entre la protéine virale et la forme *D-erythro* des sphingolipides se déroule de façon stéréospécifique (Moesby *et al.*, 1995). Le double lien 4,5-*trans* carbone-carbone retrouvé dans ces sphingolipides serait également critique (Corver *et al.*, 1995).

De plus, il a été démontré que le cholestérol est également important dans la sortie du virus de la cellule hôte. Il a été proposé que le cholestérol serait nécessaire à l'assemblage trimérique des péplomères (Marquardt, Phalen et Kielian, 1993). Également, chez des cellules dépourvues de cholestérol, l'inhibition de la sortie virale, due à une défaillance dans le bourgeonnement des nouveaux virions, a fortement été associée à une dégradation des protéines péplomères à l'intérieur de la cellule tout au cours de l'infection virale (Lu et Kielian, 2000).

Des études récentes ont démontré que le peptide de fusion de E1 est fortement associé aux domaines « rafts » composés de cholestérol et de sphingolipides. Les « rafts » sont le centre de plusieurs recherches récentes chez différents virus tels que le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) (Nguyen et Hildreth, 2000; Rousso *et al.*, 2000) et des virus appartenant à la famille de l'influenza chez lesquels ces domaines sont responsables du bourgeonnement viral (Scheiffele *et al.*, 1999).

3.2.2.3. Le Sindbis Virus (SIN)

Tout comme le Semliki Forest virus, le Sindbis Virus (SIN) appartient à la famille des Alphavirus. Il est donc également enveloppé et pénètre dans la cellule hôte par endocytose. La sortie de nouveaux virus s'effectue par bourgeonnement de ceux-ci à la membrane plasmique (Lu, Cassese et Kielian, 1999).

Le SGM, qui est un mutant du SIN et qui contient la séquence en acides aminés de E1 (le polypeptide responsable de la fusion) de *srf-3'* en position 224 à 235, a démontré une augmentation de 100 fois de l'infection et de 250 de la fusion de cellules dépourvues de cholestérol comparativement au virus Sindbis de type sauvage. Il a donc été démontré que, tout comme c'est le cas chez le Semliki Forest Virus, le Sindbis virus est dépendant du cholestérol pour son entrée et sa sortie et la dépendance au cholestérol de ces deux virus réside dans la région 226 du polypeptide E1. Il a également été suggéré que le rôle du cholestérol serait probablement d'induire et de maintenir la conformation optimale de E1 nécessaire à la fusion et à la sortie du virus de la cellule hôte (Lu, Cassese et Kielian, 1999).

Des études consistant à mettre le virus SIN en contact avec des liposomes contenant différentes combinaisons de lipides ont permis d'appuyer le fait que la présence de cholestérol et de sphingolipides dans la membrane cible est essentielle à la fusion virale. De plus, tout comme il a été observé chez le virus

SFV (Nieva *et al.*, 1994; Corver *et al.*, 1995), le cholestérol est impliqué dans la liaison du virus à un pH acide alors que les sphingolipides servent à catalyser la fusion en tant que telle (Smit, Bittman et Wilschut, 1999).

3.2.2.4. Le virus de l'immunodéficience humaine

Des traitements du virus de l'immunodéficience humaine avec, soient des liposomes pauvres en cholestérol, des drogues se liant au cholestérol ou de la chaleur augmentent tous la fluidité de la membrane du virus et diminuent l'infectiosité virale. De plus, il est suggéré que le cholestérol pourrait avoir un rôle dans la fusion virale via la protéine de fusion gp41. D'autres lipides tels que le glycosphingolipide, le galactosylcéramide (GalCer), le lactosylcéramide, le glucosylcéramide et le sulfate galactocérobroside peuvent se lier à la gp120 et diminuer son efficacité et sa stabilité. Ainsi, ces résultats indiquent que différentes composantes lipidiques de la membrane de la cellule hôte jouent un rôle dans le cycle viral du virus de l'immunodéficience humaine (Kielian *et al.*, 2000).

3.2.2.5. Le virus de l'hépatite murine (MHV)

L'état de persistance ou de latence du coronavirus responsable de l'hépatite murine serait influencé par la quantité de cholestérol contenu dans les membranes plasmiques de la cellule infectée. Une augmentation de cholestérol dans ces membranes augmente la fusion entre les cellules infectées et non infectées. Il a été démontré que le cholestérol a un impact sur l'attachement du virus, de la fusion virale et de la fusion entre les cellules (Kielian *et al.*, 2000).

3.2.2.6. Le virus African Swine Fever Virus

L'endocytose et la fusion virale dépendante du pH seraient à la base de l'infection des cellules par le virus African swine Fever virus, tout comme il a

précédemment été décrit pour le Semliki Forest virus. Lorsque la synthèse du cholestérol cellulaire est inhibée par la cérulénine, W-7 et la micozanole, la production de virus chute de 50%. Des résultats similaires sont observés lorsqu'on élimine le sérum de 50% chez des cellules Véro servant à l'infection. Dans ce cas, la pénétration du virus à l'intérieur du cytoplasme est grandement diminuée. Tout comme dans le cas du Semliki Forest Virus, le groupement 3 β -hydroxyl pourrait être important pour les stérols requis dans l'infection virale (Kielian *et al.*, 2000).

3.2.2.7. Le virus Sendai

Plusieurs études suggèrent que le cholestérol serait requis dans la fusion du virus Sendai. La concentration optimale de cholestérol de la membrane est de 0,3-0,4 fraction molaire, ce qui est similaire à ce que l'on retrouve chez le Semliki Forest Virus (White et Helenius, 1980). Le peptide de fusion serait impliqué dans la liaison au cholestérol. C'est la structure en anneau trans A/B qui serait requise chez les stérols permettant la fusion (Kielian *et al.*, 2000).

3.2.2.8. Le virus de l'Influenza

Comme il a été mentionné précédemment, la formation de domaines lipidiques « rafts » est responsable du bourgeonnement de virus appartenant à la famille de l'influenza (Scheiffele *et al.*, 1999). Plus précisément, le cholestérol agit dans la sortie de protéines à la membrane apicale et de la sécrétion de glycoprotéines (gp-80) (Keller et Simons, 1998). Ainsi, les domaines lipidiques jouent un grand rôle dans le transport via la membrane. Il a été démontré également que l'hémagglutinine (HA), une protéine membranaire du virus de l'influenza, est associée aux domaines lipidiques et est hautement dépendante du cholestérol (Scheiffele *et al.*, 1997).

3.2.2.9. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV)

Bien que le VSV entre dans les cellules par endocytose (Matlin *et al.*, 1982) et fusionne par la suite de façon dépendante du pH tout comme le baculovirus (White, Matlin et Helenius, 1981), il a été rapporté que le mécanisme de fusion du VSV est indépendant du cholestérol (Eidelman *et al.*, 1984; Cleverley, Geller et Lenard, 1997; Kielian *et al.*, 2000). En effet, l'utilisation, entre autres, d'un virus recombinant exprimant la glycoprotéine G, responsable de la fusion du VSV, a permis la formation de syncytium chez des cellules dépourvues de cholestérol (High Five CF) ce qui indique que le cholestérol n'est pas requis dans la fusion du VSV. De plus, ces cellules dépourvues de cholestérol permettent l'infection par le VSV sauvage tout comme les cellules High Five, mais le nombre de centres infectieux est légèrement diminué, d'environ 3,5 fois chez les cellules sans cholestérol. Ainsi, bien que non essentiel dans la fusion du VSV, le cholestérol semblerait jouer un rôle dans une ou plusieurs des premières étapes d'interaction entre le virus et la cellule afin d'augmenter l'infection virale (Cleverley, Geller et Lenard, 1997).

À la suite de ces observations, il est clair que les lipides, et en particulier le cholestérol, jouent un rôle important dans le cycle viral des virus enveloppés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. LIGNÉES CELLULAIRES

1.1. Origine

Deux lignées cellulaires d'insectes ont été utilisées. La première est la lignée Sf9 qui provient du clone 9 de la lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21 (Vaughn *et al.*, 1977). Cette lignée est maintenue dans le milieu Grace (Grace, 1962) enrichi de 10% de SVF, 2% de lactalbumine 1X et 2% d'extrait de levure (« yeastolate ») 1X (Annexe I).

La deuxième lignée cellulaire utilisée est la lignée Sf9 MM8-SF. Cette lignée est en fait la lignée Sf9 qui a été adaptée, dans notre laboratoire, au milieu MM8-SF (Mitsubishi-Maramorosch N°8 serum free) qui est un milieu simple auquel aucun supplément lipidique ou sérum de veau fœtal n'a été ajouté (Tableau I et Annexe II) (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Cette lignée cellulaire a été maintenue sur plus de 600 passages jusqu'à ce jour.

1.2. Maintien des cellules

1.2.1. Cellules en feuillets

Les cellules ont été maintenues en feuillets dans des boîtes de culture de 25 cm² (F25) de Corning. À chaque 7 jours, les cellules ayant atteint la confluence cellulaire ont été passées dans un nouveau contenant à une densité de 2×10^5 cellules/ml. Il s'agissait de resuspendre ces cellules à l'aide d'un jet de milieu de culture, d'effectuer un décompte cellulaire et de resuspendre le tout dans 5 ml de milieu frais. Le décompte cellulaire a été effectué comme suit : 0,1 ml de bleu de trypan (Gibco BRL, #15250-061) a été ajouté à 0,4 ml de cellules et ensuite le décompte a été réalisé à l'aide d'un hémacymètre. Les cellules contenues dans la chambre centrale ont été dénombrées, et ce, en duplicata.

**Tableau I : Composition du milieu de culture Mitsuhashi-Maramorosch
sans sérum (MM8-SF)**

Composantes	Concentration
NaCl	7,0 g/L
KCl	0,2 g/L
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,1 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2 g/L
D - (+) - glucose anhydre	4,0 g/L
Lactalbumine hydrolysate	6,5 g/L
Yeastolate	5,0 g/L
Pluronique F-68, 10%	15 ml/L

Formule utilisée pour le compte des cellules :

$$\left[(\text{nb. cellules dans } 1^{\text{ième}} \text{ chambre} + \text{nb. cellules dans } 2^{\text{ième}} \text{ chambre}) / 2 \times 10^4 \times 5/4 \right]$$

où 10^4 représente le facteur de multiplication nécessaire afin de porter le volume de la chambre centrale à 1 ml et $5/4$ représente le facteur de dilution des cellules dans le bleu de trypan.

1.2.2. Cellules en suspension

Les cellules ont également été maintenues en suspension dans des fermenteurs de 100 ml de Bellco à une température de 28°C (Figure 3). Dans ces fermenteurs, une tige magnétique placée à l'intérieur est responsable de maintenir les cellules en suspension lorsque le fermenteur est déposé sur une plaque magnétique (Bellco Biotechnology) à une vitesse de rotation de 70 tr/min. Un ajout de pluronique F-68 (Sigma, #P-5556) à une concentration finale de 0,15% a été effectué afin de protéger les cellules des dommages pouvant survenir durant l'agitation. Tout comme pour les cellules maintenues en feuillets, les cellules ont été passées chaque 7 jours dans un nouveau fermenteur à une densité de 2×10^5 cellules/ml. Pour ce faire, 0,4 ml est retiré du fermenteur pour le décompte cellulaire et les cellules sont resuspendues dans 100 ml de nouveau milieu à la densité ci-haut mentionnée. Le décompte cellulaire s'est effectué selon la formule mentionnée à la section 1.2.1.

2. INFECTIONS VIRALES IN VITRO

2.1. Préparation des inoculums viraux

2.1.1. Le virus AcMNPV

Le baculovirus principalement utilisé au cours de nos expérimentations est l'Autographa californica multicapsid nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV). Ce virus a été produit en fermenteur à partir d'un inoculum d'une production précédente. Ainsi, des cellules Sf9 ont été mises en suspension à une densité de 2×10^5 cellules/ml à raison de 100 ml par fermenteur. L'infection virale a eu

Figure 3 : Fermenteur (Bellco) de 100 ml utilisé pour la culture de cellules en suspension



lieu lorsque ces cellules ont atteint leur phase exponentielle de croissance, en l'occurrence après 2 à 3 jours de culture. Le virus a été ajouté à une multiplicité d'infection (MOI) de 1. La MOI représente le nombre d'unités infectieuses de virus par cellule vivante. Suite à une incubation d'environ 7 jours à 28°C, le contenu du fermenteur a été centrifugé pendant 10 minutes à une vitesse de 1000 tr/min (IEC Clinical Centrifuge) afin de ne conserver que le surnageant représentant notre inoculum viral. Ce dernier a alors été titré pour obtenir la concentration qui résulte, lors d'une inoculation, en culture cellulaire, à la dose infectieuse provoquant 50% d'effets cytopathiques (DICT₅₀/ml) comme détaillé un peu plus loin.

2.1.2. Le virus recombinant AcLuci

Le virus recombinant AcLuci nous a été gracieusement fourni par le Dr Hajime Mori de l'Institut de Technologie de Kyoto au Japon. Ce virus est en fait un hybride d'AcMNPV et de BmMNPV, auquel on a remplacé une partie du gène codant pour la polyédrine par le cadre de lecture ouvert du gène de la luciférase de la luciole (Mori *et al.*, 1992). L'expression de la luciférase se retrouve donc sous le contrôle du promoteur fort du gène de la polyédrine.

2.1.3. Titrage

Pour ce faire, 125 µl de cellules Sf9 ont été répartis dans les cupules d'un plateau 96 puits (Costar, 3595) à une densité de 1×10^5 cellules/ml. À ces cellules ont été ajoutés 25 µl du surnageant infectieux à des dilutions de 10^{-1} à 10^{-11} (8 puits/dilution). Suite à une incubation de 7 jours à une température de 28°C, une observation au microscope photonique a servi à déterminer la dose infectieuse. Dans le cas d'AcMNPV, la présence de polyèdres dans les cellules témoignait de la virulence du virus. Donc, l'observation d'une seule cellule infectée par puits confirmait que celui-ci était positif. Cependant, chez les cellules infectées par AcLuci, ce critère simple de sélection ne pouvait pas être utilisé. Il

nous a alors fallu observer la présence de cellules d'apparence atrophiée qui correspondait aux effets cytopathiques causés par le virus. Ensuite, le titre a été calculé par la méthode de Kärber (1931).

2.2. Infections virales

Selon les expériences réalisées, nous avons travaillé avec des MOI précises afin de standardiser les expérimentations. Un simple calcul, selon la distribution de Poisson, à partir du titre viral (1 DICT₅₀/ml = 0,69 unités infectieuses/ml), nous a permis de déterminer la dilution de l'inoculum viral nécessaire à l'atteinte de la MOI convoitée.

Les infections par le virus AcMNPV et le virus recombinant AcLuci ont été effectuées de la même façon. De plus, l'infection de cellules Sf9 ou Sf9 MM8-SF se déroulait également selon la même méthode à l'exception près que l'ajout de 20 µg/ml de cholestérol (à partir d'une solution fraîchement préparée de 0,02 g de cholestérol (Sigma, # C-2044) dilué dans 1 ml d'éthanol 100%) est obligatoire dans le cas des cellules Sf9 MM8-SF afin qu'il y ait infection virale.

Pour procéder à l'infection, deux techniques ont été employées dépendant des expériences :

Dans le premier cas, des cellules ont étéensemencées à une densité de 2×10^5 cellules/ml pour un volume total de 5 ml dans des boîtes de 25 cm². Le virus, dilué dans 1 ml de milieu de culture à la MOI désirée, a ensuite été ajouté aux cellules et incubé à 28°C pour une période de 5 à 7 jours.

Dans le deuxième cas, les cellules ont étéensemencées dans un flacon de culture comme précédemment sauf qu'elles ont été placées à 28°C pendant toute une nuit pour permettre aux cellules d'adhérer à la boîte. Le lendemain, le milieu de culture a été retiré et remplacé par 1 ml de dilution virale. Le flacon a,

par la suite, été déposé sur un plateau basculant à un rythme d'approximativement 5 bascules complètes par minute, pendant 1 à 2 heures, afin de permettre aux cellules d'internaliser le virus. Après cette incubation, le milieu contenant l'inoculum viral a été rejeté et les cellules ont été lavées 3 fois avec du milieu de culture frais. Par la suite, 5 ml de nouveau milieu ont été ajoutés et les cellules ont alors été incubées à 28°C pour une période de 5 à 7 jours.

2.3. Analyses de l'infection virale

2.3.1. AcMNPV

Afin de déterminer l'infection virale de cellules infectées par AcMNPV, une première observation au microscope photonique a servi à confirmer ou infirmer l'infection virale par la présence de polyèdres dans les cellules. Cette observation ainsi qu'une coloration par le bleu de trypan telle que mentionnée à la section 1.2.1., nous a permis de déterminer le nombre de cellules mortes et vivantes, infectées ou non.

Le comptage des polyèdres a également été effectué. Pour ce faire, les cellules infectées ont été décollées de la boîte à l'aide d'un grattoir à cellules (Costar) pour être recueillies et centrifugées deux minutes à une vitesse de 1000 tr/min (IEC Clinical Centrifuge). Le culot, resuspendu dans 1 ml de PBS 1X (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Gibco BRL, #14190-144), a été gardé à 4°C jusqu'au moment du décompte. Les polyèdres étant contenus dans le noyau cellulaire, il est donc important de faire une lyse cellulaire afin de les libérer. Nous avons utilisé un dénaturant qui donne une suspension polyédrique nette et sans débris. Les membranes cellulaires ont été lysées par du SDS 10% (Gibco BRL, #15553-035) puis laissé en contact pendant environ 15 minutes à température ambiante. Le lysat a ensuite été déposé sur un hémacymètre et les polyèdres ont été comptés dans la grande chambre centrale à l'aide d'un microscope photonique à 450X. L'exercice s'est fait en duplicata et la moyenne a été

calculée. Un simple calcul a permis, par la suite, de convertir ce résultat en nombre de polyèdres observés par millilitre. Conséquemment, puisque le contenu de chacun des flacons de 25 cm² (F25) a été concentré dans 1 ml, ce dernier résultat représente également le nombre de polyèdres par F25. Les résultats obtenus sont donc exprimés par F25 ce qui correspond à une densité cellulaire de 1 X 10⁶ cellules/F25 au moment de l'infection.

Formule utilisée pour le compte des polyèdres :

$$\left[(\text{nb. polyèdres dans } 1^{\text{ième}} \text{ chambre} + \text{nb. polyèdres dans } 2^{\text{ième}} \text{ chambre}) / 2 \times 10^4 \times \text{dil.} \right]$$

où 10⁴ représente le facteur de multiplication nécessaire afin de porter le volume de la chambre centrale à 1 ml et « dil. » représente le facteur de dilution de la suspension.

2.3.2. AcLuci

L'analyse de l'infection de cellules par le virus AcLuci est basée sur l'activité de la luciférase. En effet, l'infection de cellules par ce virus recombinant entraîne la production de luciférase qui, lorsque mise en contact avec son substrat, produit une scintillation détectable par un luminomètre. Le kit utilisé pour ce dosage provient de Boehringer Mannheim (#1669893). Ainsi, 7 jours après l'infection par AcLuci, les cellules ont été récoltées, centrifugées 2 minutes à 10 000 tr/min (IEC Clinical Centrifuge), lavées une fois avec 1 ml de PBS 1X et recentrifugées. Ces cellules ont alors été incubées 15 minutes avec 100 µl de tampon de lyse 1X (provenant du kit Boehringer Mannheim) à température ambiante. Suite à cette lyse, l'échantillon a été centrifugé 35 secondes à 13 000 tr/min (Biofuge 13, Baxter Canlab) et le surnageant prélevé. Celui-ci a été immédiatement congelé à -20°C. Lors de la décongélation du surnageant, des dilutions décimales en série ont été réalisées dans du tampon de lyse. Tout juste avant la prise de lecture au luminomètre, 10 µl des dilutions virales ont été mélangés à 25 µl de substrat de la luciférase (D(-)-Luciférine, [D(-)-2-(6-hydroxy-2'-benzothiazolyl)-Δ²-thiazolin-acide carbonique] dans un tampon tricine). L'activité de la luciférase a alors été mesurée avec un luminomètre (Tri-

Carb 2200CA de Packard, Canberra) pendant une minute. La scintillation a été mesurée en CPM (compte de photons simples émis par minute).

2.3.3. Microscopie électronique

Les cellules ont été recueillies, lavées 1 fois dans du PBS 1X et centrifugées 5 minutes à 3000 tr/min dans une centrifugeuse à micro-tubes (Biofuge 13, Baxter Canlab). Les culots cellulaires ont ensuite été fixés 1 heure dans un tampon de fixation (glutaraldéhyde 2,5% dilué dans du tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2) et lavés à 3 reprises dans du tampon cacodylate contenant 3% de saccharose. Les échantillons ainsi fixés ont pu être conservés à 4°C durant plusieurs mois. Les échantillons ont ensuite été fixés pendant 2 heures à 21°C dans un tampon collidine contenant 1,33% de tétr oxyde d'osmium (OsO_4) et ont été progressivement déshydratés dans 25%, 50%, 75%, 95% et 100% d'acétone. Les échantillons ont été imprégnés dans un mélange d'acétone et de résine SPURR pendant une nuit et dans de la résine SPURR pure pendant 3 heures. Ils ont ensuite été incubés 24 heures à 60°C afin de permettre la polymérisation de la résine. Enfin, les blocs de résine ainsi formés ont été coupés en couches ultra-fines à l'aide d'un couteau en diamant. Ces coupes ont été déposées sur une grille en cuivre et ont été colorées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb. Finalement, ces grilles ont été observées au microscope électronique à transmission Philips 300 ou Hitashi 200.

3. MISE EN ÉVIDENCE DU CHOLESTÉROL PAR FLUORESCENCE

3.1. Cytométrie en flux

Afin de détecter et de comparer la quantité de cholestérol chez les cellules Sf9 MM8-SF avec ou sans ajout de 20 $\mu\text{g/ml}$ de cholestérol, le cholestérol a été marqué par le filipin (Sigma, #F-9765) et l'intensité de fluorescence a été détectée par cytométrie en flux.

Les cellules ont été récoltées après 1, 3 et 5 jours de croissance dans des plateaux de 6 puits, lavées dans du PBS 1X et fixées avec une solution de fixation (PBS 1X et formaldéhyde 1%) pendant 1 heure à température ambiante. Suite à un second lavage avec du PBS 1X, les cellules ont été colorées par une solution de filipin pendant 1 heure à la température ambiante. Cette solution devait être préparée fraîche à chaque utilisation en dissolvant 2,5 mg de filipin dans 1 ml de formaldéhyde 37% et finalement diluée 50X dans du PBS 1X. Ensuite, 4 lavages avec le PBS 1X ont été réalisés. Ces échantillons ainsi colorés ont pu être conservés à 4°C pendant 48 heures.

Enfin, la fluorescence des cellules due à la coloration du cholestérol par le filipin (excitable à 350 nm) a été analysée par le cytomètre en flux EPICS ELITE ESP. 10^4 événements ont été comptabilisés.

3.2. Microscopie à fluorescence

Les cellules (Sf9 et Sf9 MM8-SF) préparées pour la microscopie à fluorescence ont été fixées avec une solution de fixation (PBS 1X et formaldéhyde 0,5%) pendant 1 heure et colorées par le filipin de la même façon que pour la cytométrie en flux sauf que ces cellules ont été cultivées en tubes Leighton et que la fixation et la coloration se sont faites à l'intérieur de ce même tube. Les lamelles ont par la suite été extirpées du tube pour être montées sur une lame à l'aide d'une solution composée de 90% de glycérol (Sigma, #G-5150) (dilué dans le PBS 1X). L'observation de ces lames s'est faite sous un filtre UV à l'aide d'un microscope à fluorescence Nikon, Eclipse E800.

4. EFFETS DES LIPIDES SUR L'INFECTION VIRALE

4.1. Élimination des lipides du milieu de culture

Afin d'étudier l'effet des lipides sur l'infection virale, nous avons adapté des cellules Sf9 maintenues dans le milieu Grace enrichi de 10% de SVF au

milieu Mitsuhashi-Maramorosch N°8 sans sérum, MM8-SF. Au départ, les cellules ont dû être adaptées graduellement au milieu sans sérum afin d'éviter le choc causé par cette privation en lipides. C'est donc en les passant dans $\frac{3}{4}$ Grace + 10% SVF et $\frac{1}{4}$ MM8-SF, $\frac{1}{2}$ Grace + 10% SVF et $\frac{1}{2}$ MM8-SF, et ce, jusqu'à l'obtention de 100% de MM8-SF que l'on a pu arriver à établir un nouveau passage 1 de cellules Sf9 MM8-SF. À partir de ce passage et pour les passages subséquents, un flacon de culture (F25 de Corning) a été infecté par les virus AcMNPV et AcLuci à des MOI de 0,1. Sept jours post-infection, les cellules ont été recueillies et nous avons procédé au comptage des polyèdres et à la mesure de l'activité de la luciférase.

4.2. Addition de lipides au milieu de culture

4.2.1. Addition de cholestérol

Il s'agissait d'ajouter du cholestérol à une concentration de 20 µg/ml au milieu MM8-SF. Les cellules ont donc été passées chaque semaine dans du milieu additionné de cholestérol. À chaque passage, un flacon de culture a été infecté par le virus AcMNPV à une MOI de 0,3 afin de vérifier si le maintien des cellules Sf9 MM8-SF (passage 617) dans un milieu additionné de cholestérol est préférable à l'ajout ponctuel de cholestérol au moment de l'infection. Après 6 jours de culture, les cellules ont été recueillies et nous avons procédé au dénombrement des polyèdres.

De plus, une expérience visant à vérifier s'il y a inactivation du cholestérol en fonction du temps a été réalisée. Des cellules Sf9 MM8-SF (1×10^6 cellules/F25) ont été infectées par le virus AcMNPV à une MOI de 1 en présence de milieu de culture MM8-SF additionné de cholestérol ayant subi des traitements différents. Le premier traitement consistait à ajouter du milieu MM8-SF frais ainsi que 20 µg/ml de cholestérol frais aux cellules. Dans le second traitement, du milieu MM8-SF additionné de cholestérol, ayant préalablement été mis en contact avec des cellules saines pour une période de 3 jours, a été ajouté

aux cellules. Finalement, dans le dernier traitement, du milieu MM8-SF qui a aussi été mis en contact avec des cellules saines pendant une période de 3 jours a été ajouté aux cellules, cependant, le cholestérol ajouté a été fraîchement préparé.

4.2.2. Addition d'un mélange de lipides commercial

Tout comme avec les cellules auxquelles a été ajouté du cholestérol, les cellules Sf9 MM8-SF (passage 639) ont été passées tous les 7 jours dans du milieu MM8-SF additionné de 0,45% d'un supplément de lipides commercial (Lipid Mixture (1000X), Sigma, # L-5146) ce qui correspond à une concentration finale de 20 µg/ml de cholestérol contenu dans le supplément lipidique (Tableau II). Cette concentration a été fixée dans le but de pouvoir comparer la production virale en présence de cholestérol seul (20 µg/ml) et en présence de cholestérol et de différents lipides contenus dans le supplément lipidique commercial.

Ainsi, un flacon de culture a été infecté par le virus AcMNPV à une MOI de 0,3 à chacun des passages. Le nombre de polyèdres a été mesuré 6 jours post-infection.

5. INFECTION VIRALE SANS AJOUT DE CHOLESTÉROL

5.1. Entrée du virus entier

Afin de vérifier si le virus peut pénétrer les cellules en absence de cholestérol, nous avons préparé des coupes de cellules Sf9 MM8-SF infectées par le virus AcMNPV à une MOI de 1 avec ou sans ajout de 20 µg/ml de cholestérol. Les coupes ont été préparées 2 heures p.i. selon la technique présentée à la section 2.3.3. et observées au microscope électronique.

**Tableau II : Composition du supplément lipidique commercial
(SIGMA, #L- 5146)**

Composantes	Concentration
Cholestérol	4,5 g/L
Acides gras de foie de morue (methyl esters)	10 g/L
Polyoxyéthylènesorbitan monooléate	25 g/L
D- α -tocophérol acétate	2,0 g/L

5.2. Transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN viral

Dans le but de vérifier si la synthèse de nouveaux virus était possible en absence de cholestérol, nous avons utilisé la transfection afin d'outrepasser les premières étapes d'interaction du virus avec la cellule.

5.2.1. Production de l'ADN d'AcMNPV

5.2.1.1. Élevage de *Galleria mellonella*

Les larves de *Galleria mellonella* ont été placées dans des boîtes de plastique d'environ 30 cm de diamètre avec une ouverture grillagée dans le couvercle afin de permettre une bonne circulation d'air. Des boulettes de nourriture artificielle (Annexe III) nécessaire à leurs besoins nutritionnels ont été ajoutées à ces boîtes qui ont été placées dans un incubateur Conviron à environ 28°C. Après quelques semaines, et plusieurs stades larvaires, les larves se sont transformées en chrysalide pour ensuite devenir papillons. Ces derniers ont alors été transférés dans un autre contenant où il y a eu fécondation et ponte des œufs. Ces œufs, présents en lisière à la jonction du contenant et du couvercle, ont été transférés dans une nouvelle boîte où on a pu observer le déroulement d'un nouveau cycle larvaire.

5.2.1.2. Infection de larves de *Galleria mellonella* par le virus AcMNPV

Bien qu'une infection *per os*, c'est-à-dire par ingestion de polyèdres présents dans la nourriture, permette l'infection et la production de polyèdres, l'injection de virus extracellulaires a été privilégiée. Cette dernière méthode permet une infection virale plus rapide et efficace. Environ une centaine de larves saines du 4^e stade ont été injectées avec l'inoculum pur d'AcMNPV. L'injection de l'équivalent d'une goutte d'inoculum à l'aide d'une seringue de 1 cc et d'une aiguille de 30G½ (Becton Dickinson, #305106) a été faite entre les deux avant-dernières pattes de la larve. Ces larves infectées ont alors été gardées dans un

second Conviron pour une période d'environ 7 jours afin de permettre à l'infection de se généraliser à l'ensemble de la larve. Ensuite, les larves mortes, suite à la propagation de l'infection, ont été récoltées et conservées à -20°C jusqu'au moment de la purification des polyèdres. Afin de vérifier l'infection chez les larves, quelques-unes ont été colorées par la technique de Buffalo Black. Quelques larves ont été broyées individuellement à l'aide d'un broyeur manuel Kontes (Fisher Scientific, #K749520-0000) et une goutte de ce broyat a été étendue sur une lame. Après séchage, les frottis ont été recouverts d'une solution de Naphtol Blue Black (Naphtol Blue Black 0,1%, méthanol 50%, acide acétique glacial, 30%, dans de l'eau distillée) et cette coloration a été effectuée à environ 55°C pendant 5 minutes. Les lames ont par la suite été lavées abondamment à l'eau et séchées puis observées au microscope optique à 1000X, à l'huile à immersion. Une larve infectée est facilement identifiable grâce à la coloration bleu foncé que prennent les polyèdres. Dans certains cas, nous avons également utilisé la coloration Giemsa, qui colore le matériel nucléaire en rouge et le matériel cytoplasmique en bleu, mais qui ne colore pas les structures protéiques aussi denses que les polyèdres. Les cellules ont alors été fixées 10 minutes dans du méthanol 100%, séchées et colorées pendant 15 minutes dans du Giemsa (Fisher Scientific, #SG28-500) dilué 1/15 avec de l'eau. Après lavage à l'eau distillée et séchage, les échantillons ont été observés au microscope optique à 1000X, à l'huile à immersion.

5.2.1.3. Purification des polyèdres

Les larves infectées ont été broyées dans 40 ml de PBS 1X à l'aide d'un homogénéisateur (Dupont Instruments Sorvall Omni-Mixer) à une vitesse d'environ 3000 tr/min. Le broyat résultant a alors été filtré sur 4 couches de coton fromage et par la suite sur une couche mince de ouate de coton. Ensuite, 1 ml de pénicilline-streptomycine (Gibco BRL, #15140-148) a été ajouté au filtrat dépourvu de débris larvaires afin de prévenir la prolifération bactérienne et celui-ci a été conservé pour un certain temps à -20°C .

Afin de purifier les polyèdres de ce filtrat, celui-ci a été centrifugé 30 minutes à 4°C à 7000 tr/min (Sorvall Instruments, Du Pont, modèle RC5C) à l'aide du rotor SS-34 (Du Pont Instruments, Sorvall) pour ensuite être lavé 3 fois dans 10 ml de PBS 1X. Le culot obtenu a ensuite été resuspendu dans environ 7 ml de PBS 1X avant d'être déposé sur un gradient de sucrose de 30 à 80%, préparé la veille et conservé à 4°C afin de former un gradient continu.

Bien que la centrifugation de ce gradient de sucrose devrait mener à l'observation d'une bande contenant les polyèdres à une concentration de sucrose de 60 à 70%, c'est plutôt dans le culot que les polyèdres ont été obtenus suite à une centrifugation de 2 heures à une vitesse de 25 000 tr/min dans une ultracentrifugeuse (Beckman, modèle L3-50) à l'aide du rotor SW 28 de Beckman. Ainsi, le culot a été récupéré et resuspendu dans un volume de PBS 1X et conservé à 4°C jusqu'au moment de l'extraction de l'ADN.

5.2.1.4. Extraction de l'ADN

Après purification, les polyèdres contenus dans le culot ont par la suite été lavés 2 fois dans 3 volumes de PBS 1X, entrecoupés de centrifugation à 7000 tr/min pendant 10 minutes afin d'éliminer le sucrose contenu dans l'échantillon. Ensuite, les polyèdres ont été dissous par une incubation de 15 minutes à la température ambiante dans 600 µl de tampon carbonate ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$) 0,1 M, pH 10,8. Afin d'éliminer les protéines ainsi dissoutes et la plupart des autres protéines, qu'elles soient d'origine cellulaire, virale ou bactérienne, nous avons ajouté 1% du dénaturant SDS et 2 mg/ml de protéinase K et nous avons incubé le tout à 56°C pendant 3 heures. L'extraction de l'ADN en tant que telle s'est déroulée par 2 passages sur phénol saturé, 1 passage sur phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) et 2 lavages par le chloroforme. Après avoir retiré le chloroforme, nous avons ajouté 1/10 d'acétate d'ammonium (NH_4OAc) 3M et avons complété avec de l'éthanol 100% pour ensuite placer les échantillons à -20°C pendant 16 heures afin de précipiter l'ADN.

Finalement, l'ADN a été lavé à l'éthanol 70% avant d'être séché et resuspendu dans de l'eau. L'ADN résultant a été incubé toute une nuit à 37°C afin de permettre sa dissolution. La concentration de l'ADN et sa pureté ont été établies par une lecture de densité optique à 260 nm/280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Pharmacia Biotech, GeneQuant, RNA/DNA Calculator). Les différents aliquots ont été conservés à -20°C.

5.2.2. Transfection

Les cellules Sf9 ou Sf9 MM8-SF utilisées lors de la transfection ont étéensemencées à une densité de 2×10^5 cellules/ml, dans 5 ml de milieu de culture, la veille de la transfection pour les laisser adhérer à la boîte (F25 de Corning).

Le lendemain, 35 µg de lipofectine (Gibco BRL) ont été dilués dans 200 µl du milieu approprié aux lignées cellulaires utilisées et 2 à 6 µg d'ADN d'AcMNPV ont également été dilués dans 200 µl de milieu de culture. Les deux dilutions ainsi préparées ont été mélangées et incubées 15 minutes à la température ambiante afin de permettre à l'ADN d'être intégré à l'intérieur des liposomes. Ce mélange a ensuite été ajouté aux cellules dans 3 ml de milieu. Une incubation de 4 heures à 28°C a suivi permettant l'entrée de l'ADN à l'intérieur des cellules. Une incubation trop longue étant toxique pour les cellules. Suite à cette incubation, les cellules ont été lavées 3 fois avec du milieu de culture et les cellules ont été incubées de 7 à 9 jours à 28°C dans 5 ml de milieu.

5.2.3. Libération de virus nouvellement synthétisés

Afin de déterminer si la libération de virus nouvellement synthétisés est possible en absence de cholestérol, nous avons procédé à une transfection de cellules Sf9 MM8-SF en absence de cholestérol. Le surnageant a été recueilli 7 jours suivant la transfection et a servi à inoculer des cellules Sf9 et Sf9 MM8-SF

maintenues respectivement dans le milieu Grace enrichi de 10% de SVF et le milieu MM8-SF additionné de 20 µg/ml de cholestérol. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 2×10^5 cellules/ml, et ce, à raison de 5 ml/F25.

Par la suite, de façon plus précise, nous avons titré les surnageants de transfections de cellules Sf9 MM8-SF réalisées en présence et en absence de cholestérol. Les surnageants recueillis 3 et 8 jours post-transfection ont été titrés. Ces titrages ont été effectués tel que décrit à la section 2.1.3. sur des cellules Sf9 MM8-SF additionnées de cholestérol à une concentration de 20 µg/ml.

Faisant suite à ces titrages, la présence de virus infectieux provenant de cellules transfectées en absence de cholestérol a été vérifiée *in vivo*, c'est-à-dire chez les larves de *Galleria mellonella*. L'injection de l'équivalent d'une goutte de surnageant à l'aide d'une seringue de 1 cc et d'une aiguille de 30G½ (Becton Dickinson, #305106) a été faite entre les deux avant-dernières pattes de la larve. Ces larves infectées ont alors été gardées pour une période d'une dizaine de jours dans un Conviron à 28°C. Ensuite, les larves ont été broyées et la présence de polyèdres chez celles-ci a été vérifiée par une coloration au Giemsa telle que décrite à la section 5.2.1.2.

5.2.4. Blocage de la réinfection

Dans le but de vérifier si le cholestérol joue un rôle dans la propagation de l'infection virale de cellules en cellules, la transfection de cellules Sf9 MM8-SF avec de l'ADN du virus AcMNPV en absence et en présence de cholestérol a été réalisée. 1% de sérum de cobaye contenant des anticorps polyclonaux dirigés contre les NPV (immunisation de cobayes réalisés par Jean-François Michaud (2001) avec des antigènes produits *in vitro*) a été ajouté aux cellules additionnées de cholestérol, après une incubation de 4 heures avec la lipofectine, pour neutraliser les virus extracellulaires libérés par les cellules transfectées et ainsi empêcher la propagation de l'infection. L'observation du nombre de cellules

infectées dans les deux cas, soit chez les cellules Sf9 MM8-SF transfectées avec ou sans cholestérol, a permis de déterminer si le cholestérol joue un rôle dans la propagation de l'infection virale.

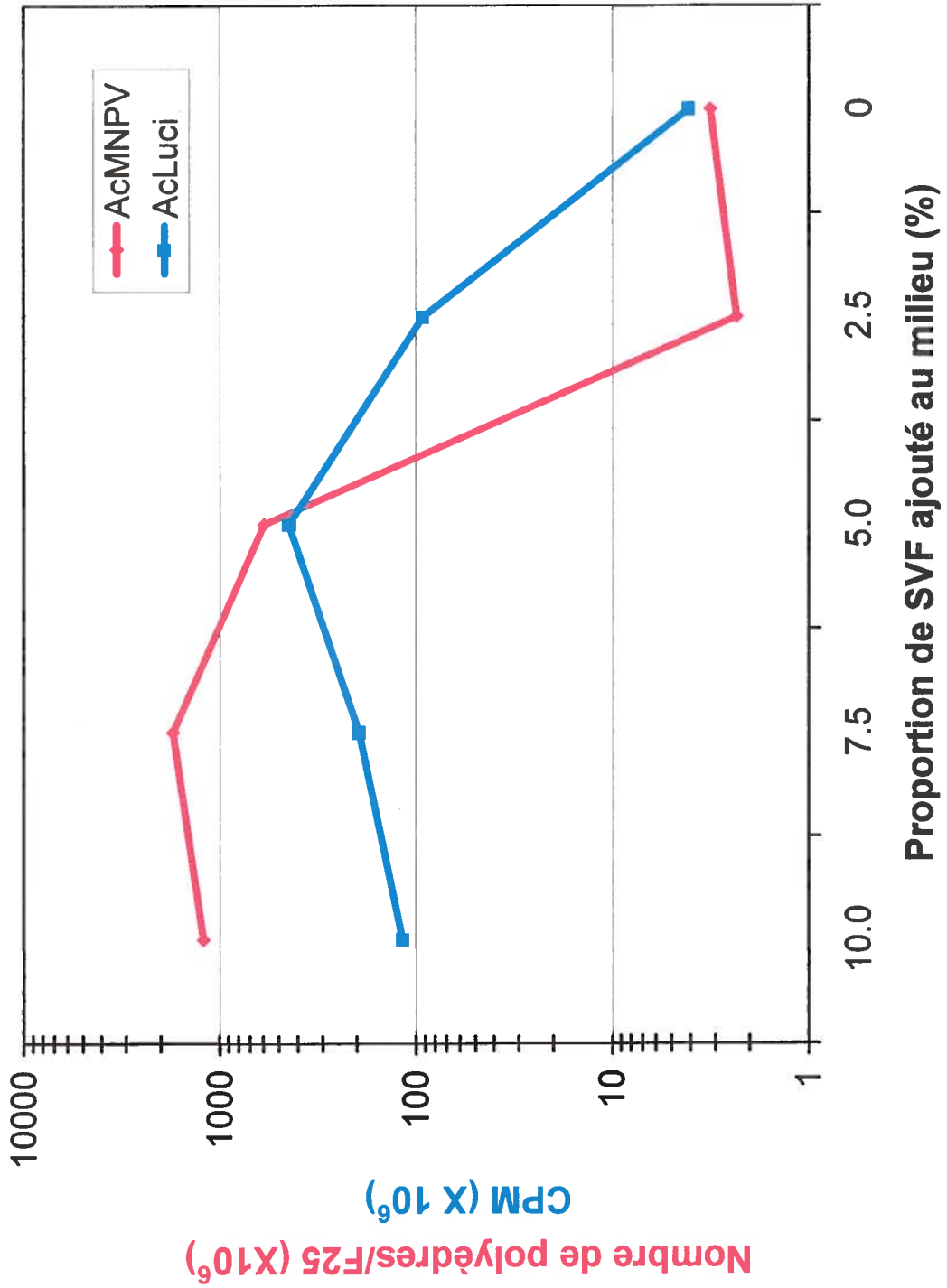
RÉSULTATS

1. Effet de la décroissance du milieu de culture en sérum de veau foetal (SVF) sur l'infection virale *in vitro*

Il a été démontré par Belloncik *et al.* (1997) que le milieu MM8-SF, sans ajout de supplément lipidique, peut remplacer le milieu Grace enrichi de SVF pour la croissance des cellules de *Spodoptera frugiperda*. Bien que, dans ces cellules, la réplication de certains virus tels que les virus responsables des polyédroses cytoplasmiques (CPV) ne soit pas affectée (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997), la réplication complète des virus des polyédroses nucléaires (NPV) nécessite l'ajout de lipides (Goodwin et Adams, 1980b; Volkman et Knudson, 1988; Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Les travaux traitant de l'importance des lipides dans l'infection virale réalisés par Belloncik, Akoury et Cheroutre (1997) ont été effectués à l'aide de cellules adaptées au milieu MM8-SF sur plus de 250 passages. Ainsi, une lacune subsistait concernant l'infection virale au cours de l'adaptation de ces cellules et lors des premiers passages sans SVF. Nous avons donc entrepris de suivre cette adaptation et voir l'effet de celle-ci sur l'infection virale. Pour ce faire, nous avons adapté la lignée cellulaire Sf9, maintenue dans le milieu Grace enrichi de 10% de SVF au milieu de culture MM8 sans sérum de veau et sans ajout de supplément lipidique commercial (MM8-SF). Les infections réalisées par le virus AcMNPV à une MOI de 0,1 effectuées au cours de cette adaptation ont été évaluées 7 jours post-infection (Figure 4). Les résultats démontrent que la production de polyèdres décroît au fur et à mesure que la quantité de SVF contenue dans le milieu de culture diminue. La première infection a été effectuée lors d'un apport de 10% de SVF, ce qui correspond à la quantité habituelle de SVF ajoutée au milieu de culture pour assurer le maintien des cellules Sf9. Cette quantité de SVF ajoutée a permis une réplication virale normale du virus AcMNPV que l'on a quantifiée par le décompte de polyèdres se chiffrant à $1,22 \times 10^9$ polyèdres par boîte de culture (F25) (soit 1×10^6 cellules au moment de l'infection) pour ensuite chuter à $3,17 \times 10^6$ polyèdres/F25, donc une diminution de 99,74%, lorsqu'aucun apport en SVF et

Figure 4 : Infection de cellules Sf9 en cours d'adaptation au milieu MM8-SF par les virus AcMNPV et AcLuci à une MOI de 0,1

Observations 7 jours post-infection. Les cellules infectées par AcLuci ont été lavées dans le PBS 1X et resuspendues dans 100 µl de tampon de lyse. 10 µl du surnageant de cette suspension a été mélangé à 25 µl de substrat de la luciférase. L'activité de la luciférase a été mesurée par un luminomètre pendant une minute. La scintillation est exprimée par le compte de photons simples émis par minute (CPM).



en lipide n'a été fait. Au cours de cette adaptation, on observe qu'une diminution marquée du nombre de polyèdres survient principalement entre un apport de 5% et de 2,5% de SVF au milieu de culture.

Une diminution du taux d'infection virale chez les cellules Sf9 en cours d'adaptation au milieu MM8-SF a également été observée par la quantification de l'activité de la luciférase lors de l'utilisation du virus recombinant AcLuci (mêmes conditions expérimentales) (Figure 4). La valeur d'activité luciférase obtenue est passée de $1,17 \times 10^8$ CPM à $4,07 \times 10^6$ CPM, donc un déclin de 96,52% de l'activité luciférase, conséquence de la diminution de SVF de 10 à 0% dans le milieu.

Par la suite, nous avons évalué l'infection virale par le virus AcMNPV chez les cellules ainsi adaptées à des passages subséquents dans un milieu complètement dépourvu de SVF. Au cours des premiers passages sans ajout de SVF, on constate que l'infection diminue rapidement soit de $3,17 \times 10^6$ polyèdres/F25 au premier passage pour en arriver à 5×10^4 polyèdres/F25 au troisième passage, ce qui représente une décroissance de près de 98,43%. À chacun des passages subséquents, aucune infection virale, déterminée par l'absence de polyèdre, n'a été détectée (Figure 5).

2. Détection du cholestérol chez les cellules Sf9 et Sf9 MM8-SF

Le traitement de cellules Sf9 et Sf9 MM8-SF (passage 591) par le filipin, un marqueur spécifique du cholestérol, a permis de vérifier la présence ou l'absence de cholestérol chez ces cellules. L'observation des cellules en microscopie à fluorescence sous une lumière UV a démontré que les membranes des cellules Sf9 MM8-SF ne contenaient pas de cholestérol, ou du moins en quantité non détectable (Figure 6A), alors que ces mêmes cellules, cultivées 7 jours dans du milieu MM8-SF enrichi de 20 µg/ml de cholestérol, ont une fluorescence similaire à celle observée chez les cellules Sf9 cultivées en

Figure 5 : Effet à long terme de l'élimination du SVF sur l'infectivité du virus AcMNPV

Infection à une MOI de 1.

Observations réalisées 7 jours post-infection.

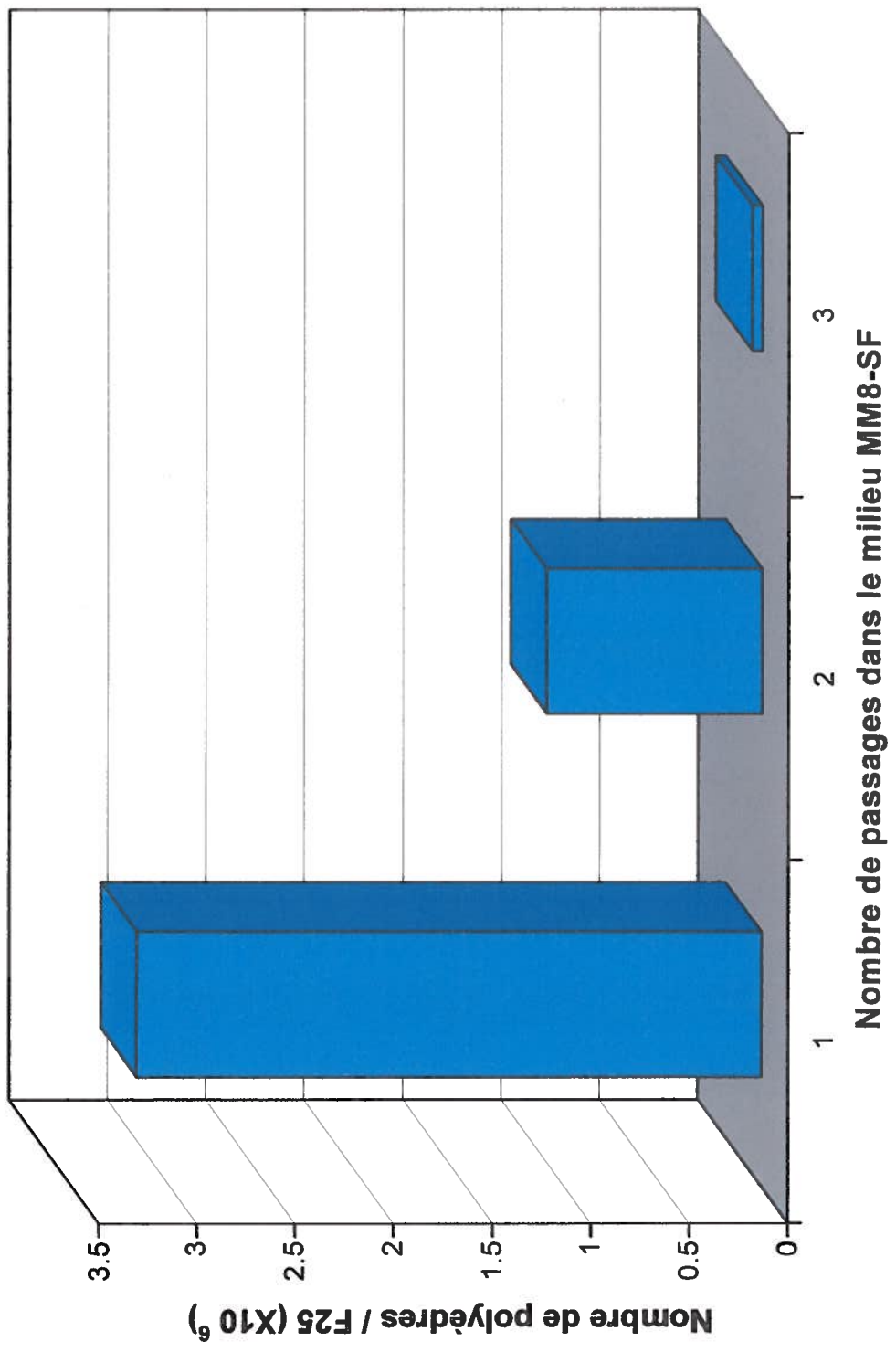


Figure 6 : Détection du cholestérol à la membrane cellulaire des cellules Sf9 et Sf9 MM8-SF par un marquage au filipin

Observations en microscopie à fluorescence sous une lumière UV.

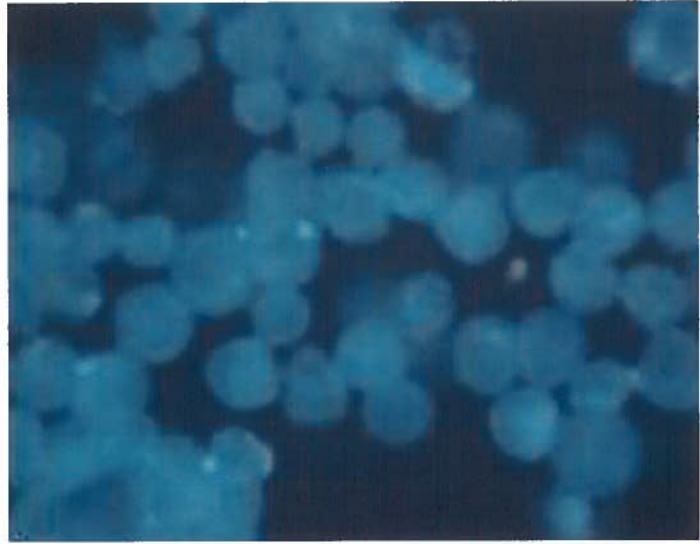
A : Cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans le milieu MM8-SF

B : Cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans le milieu MM8-SF
additionné de 20 µg/ml de cholestérol

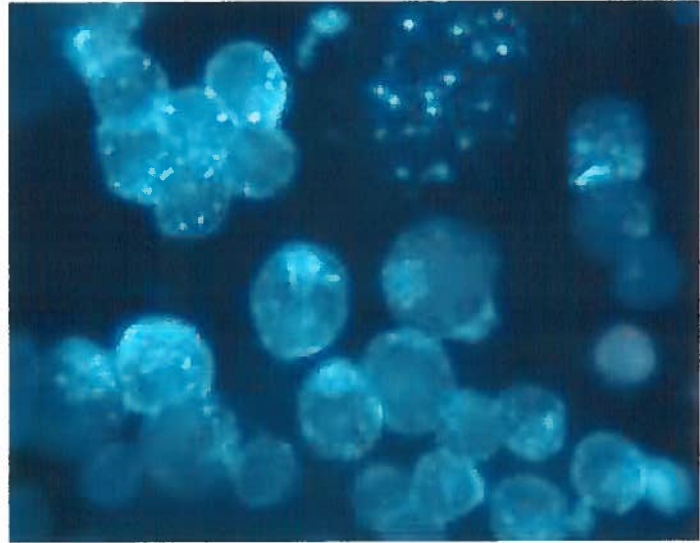
C : Cellules Sf9 maintenues dans le milieu Grace additionné de
10% de SVF

Grossissement : 400X

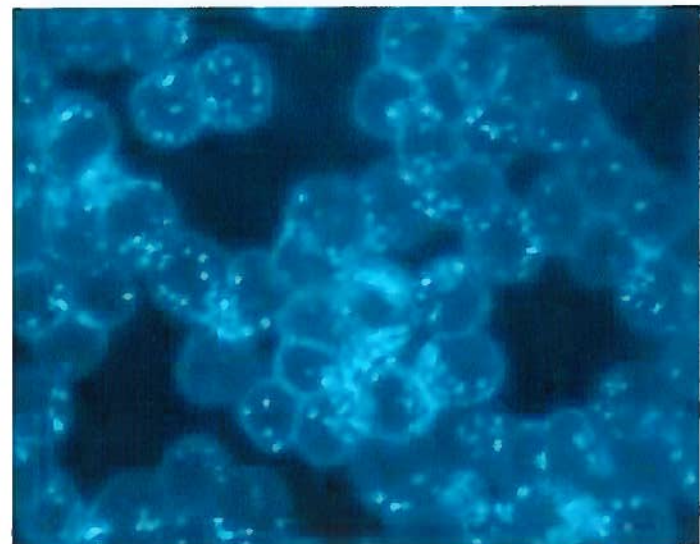
A



B



C



présence de 10% de SVF (Figures 6B et 6C). Cependant, le cholestérol ajouté aux cellules Sf9 MM8-SF est distribué de façon moins uniforme sur la membrane et est plutôt concentré à différentes régions de la membrane cellulaire.

Afin de déterminer si le cholestérol adhère aux cellules en fonction du temps, nous avons analysé, par cytométrie en flux, des cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans le milieu MM8-SF additionné de 20 µg/ml de cholestérol marqué par le filipin. Les cellules ont été analysées à différents temps suite à l'ajout de cholestérol. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 7. Sur chacun des graphiques, le pic représente la fluorescence des cellules analysées. Un déplacement de ce pic est observable entre les cellules maintenues en absence (Figures 7A et 7B) et en présence de cholestérol (Figures 7C, 7D et 7E). Les cellules maintenues en présence de cholestérol pendant 1, 3 ou 5 jours ont le même niveau de fluorescence, soit au moins 10 fois plus que les cellules témoin, ce qui indique qu'une quantité similaire de cholestérol est adsorbée à ces cellules quelque soit le temps d'incubation.

Dans le but de vérifier la distribution du cholestérol sur la membrane cellulaire, les cellules Sf9 MM8-SF maintenues en présence de cholestérol, en fonction du temps, ont également été observées en microscopie à fluorescence (Figure 8). Tout comme pour la cytométrie en flux, le cholestérol a été marqué par le filipin. Aucune fluorescence n'a été observée chez les cellules maintenues en absence de cholestérol (Figure 8A). Cependant, chez les cellules ayant été mises en contact avec 20 µg/ml de cholestérol pendant une journée, on détecte clairement la présence de ce dernier à la surface cellulaire (Figure 8B). À chacun des temps subséquents, soit 3, 5 et 7 jours, le cholestérol a été détecté sur les membranes cellulaires, et ce, de façon de plus en plus concentré (Figures 8C, 8D et 8E). En effet, la présence de cholestérol dispersé sur la surface cellulaire est principalement observée chez les cellules ayant été maintenues en présence de cholestérol pendant une journée seulement alors que des agrégats semblent

Figure 7 : Détection par cytométrie en flux du cholestérol à la surface de cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans le milieu MM8-SF enrichi de 20 µg/ml de cholestérol (Marquage par le filipin)

A : Cellules maintenues en absence de cholestérol et non marquées

B : Cellules maintenues en absence de cholestérol et marquées par le filipin

C : Cellules maintenues 1 jour en présence de cholestérol et marquées par le filipin

D : Cellules maintenues 3 jours en présence de cholestérol et marquées par le filipin

E : Cellules maintenues 5 jours en présence de cholestérol et marquées par le filipin

Les graphiques représentent le nombre de cellules comptées (count) ayant une intensité de fluorescence donnée captée par l'appareil.

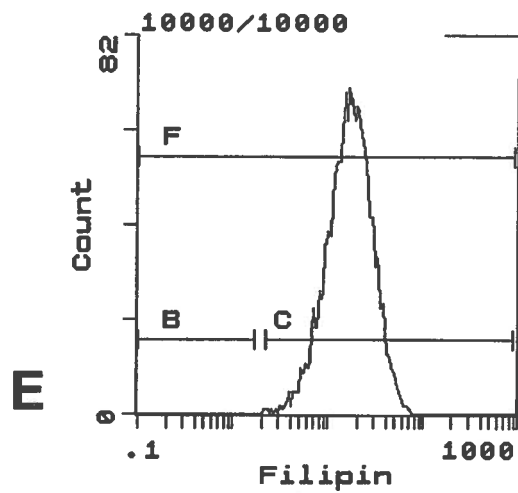
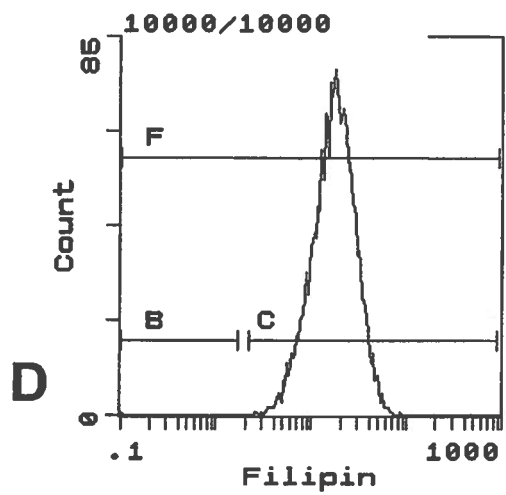
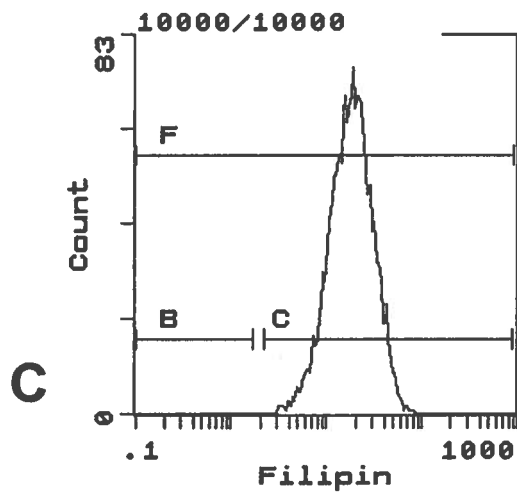
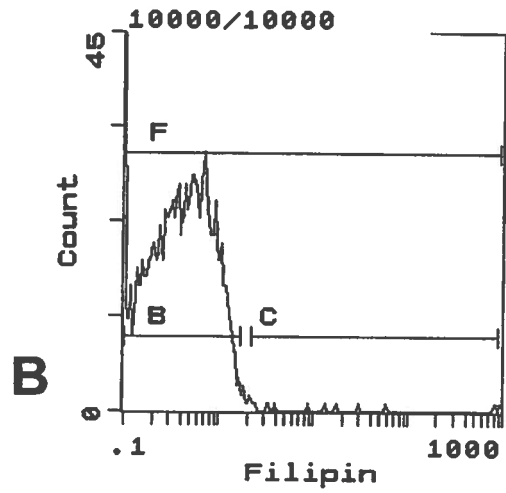
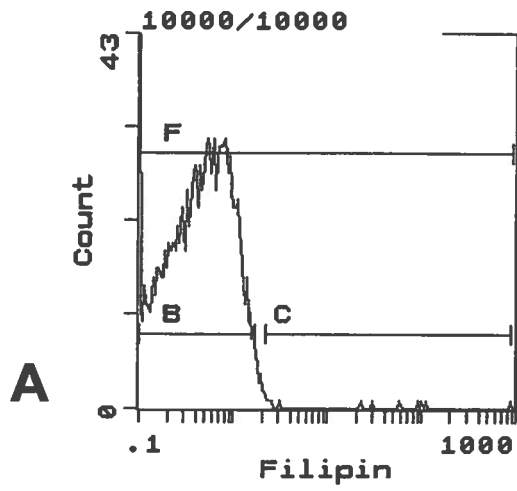


Figure 8 : Détection par microscopie à fluorescence de cholestérol à la surface de cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans le milieu MM8-SF enrichi de 20 µg/ml de cholestérol (Marquage par le filipin)

A : Cellules maintenues en absence de cholestérol et marquées par le filipin

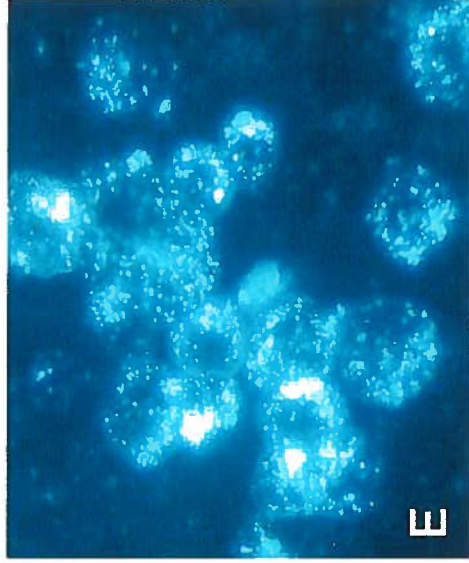
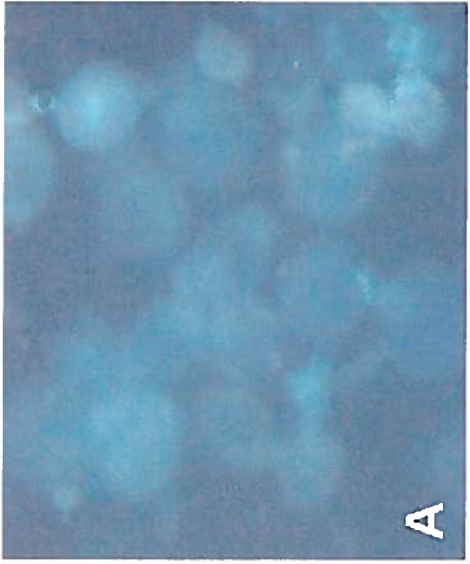
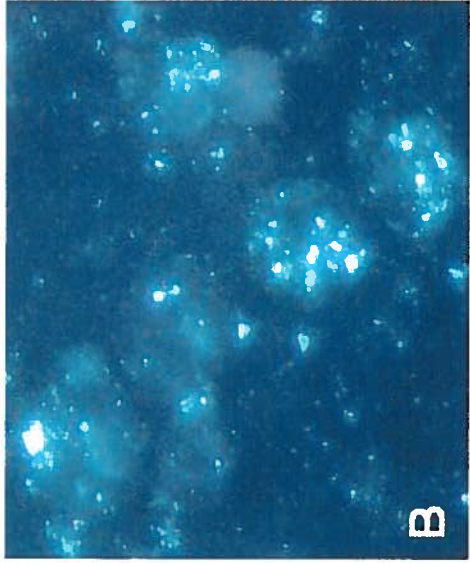
B : Cellules maintenues 1 jour en présence de cholestérol et marquées par le filipin

C : Cellules maintenues 3 jours en présence de cholestérol et marquées par le filipin

D : Cellules maintenues 5 jours en présence de cholestérol et marquées par le filipin

E : Cellules maintenues 7 jours en présence de cholestérol et marquées par le filipin

Observations à 400 X



se former avec le temps, ce qui pourrait être des micro-domaines « rafts » riches en cholestérol.

3. Infection de cellules Sf9 MM8-SF par le virus AcMNPV avec ou sans addition de cholestérol

Belloncik, Akoury et Cheroutre (1997) ont démontré que l'ajout de cholestérol, à une concentration de 20 µg/ml, comme seule source de lipides, est suffisant pour l'obtention d'une réplication complète du virus *Galleria mellonella* MNPV (GmMNPV) chez les cellules Sf9 MM8-SF. Nous avons donc vérifié l'effet du cholestérol dans notre système d'étude, soit chez les cellules Sf9 MM8-SF infectées par le virus *Autographa californica* MNPV (AcMNPV). Cette infection, réalisée à une multiplicité d'infection (MOI) de 1, sans ajout de cholestérol, a permis d'observer, en microscopie photonique, 6 jours post-infection, qu'aucune production virale n'est possible dans un tel système (basée sur l'observation de polyèdres chez les cellules) (Figure 9A). Cependant, lorsque le milieu est additionné de 20 µg/ml de cholestérol de façon ponctuelle (c'est-à-dire que le cholestérol est ajouté qu'au moment de l'infection et demeure dans le milieu au cours de l'incubation), on observe une infection virale de l'ordre de 85% (Figure 9B).

D'autre part, lorsque les cellules, sans addition de cholestérol, ont été infectées à une MOI de 300, qui est une multiplicité d'infection très élevée, moins de 1% d'infection, quantifiable par la présence de polyèdres dans les cellules infectées, a été observé comparativement à 60% lorsque 20 µg/ml de cholestérol a été ajouté à ces cellules (Figures 9C et 9D).

Figure 9 : Infection de cellules Sf9 MM8-SF avec ou sans addition de cholestérol

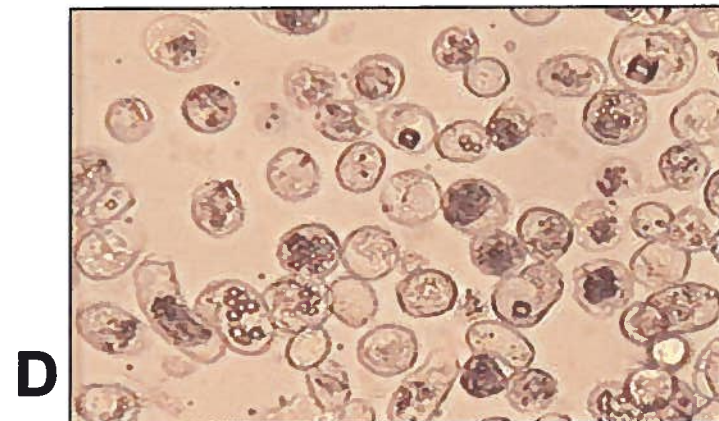
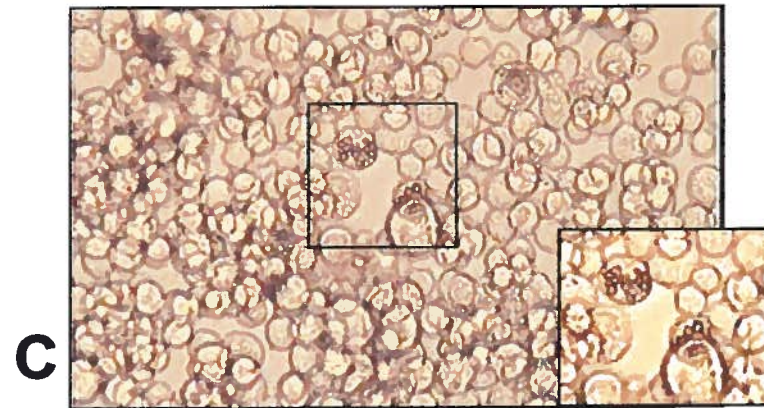
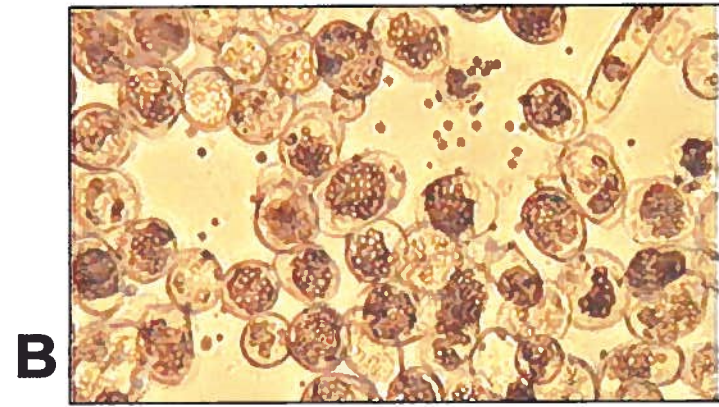
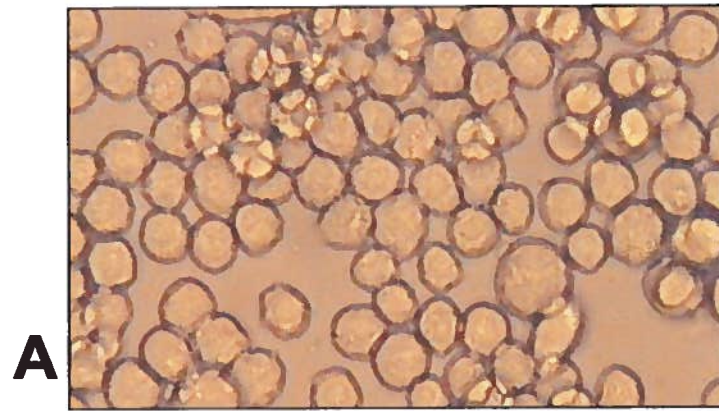
Observations 6 jours post-infection.

A : AcMNPV MOI de 1 sans addition de cholestérol

B : AcMNPV MOI de 1 avec addition de cholestérol (20 µg/ml)

C : AcMNPV MOI de 300 sans addition de cholestérol

D : AcMNPV MOI de 300 avec addition de cholestérol (20 µg/ml)



4. Infection virale chez les cellules Sf9 MM8-SF additionnées de cholestérol versus les cellules Sf9 maintenues dans le milieu Grace enrichi de 10% de SVF

Nous avons comparé le taux d'infection virale obtenue chez les cellules Sf9 MM8-SF additionnées ponctuellement de 20 µg/ml de cholestérol à celle obtenue dans le système classique soit chez les cellules Sf9 enrichies de 10% de SVF afin de déterminer quel système est préférable pour la production en masse de polyèdres. Les cellules ont été mises en contact avec le virus AcMNPV à une MOI de 0,3 pendant 2 heures sur plateau basculant pour ensuite être lavées, resuspendues dans du milieu frais et incubées 6 jours en présence de cholestérol ou de 10% de SVF. La quantité de polyèdres produits chez les cellules Sf9 MM8-SF additionnées de 20 µg/ml de cholestérol est de $9,6 \pm 0,7 \times 10^7$ /F25 alors qu'elle n'est que de $3,1 \pm 0,4 \times 10^7$ /F25 chez les cellules Sf9 enrichies de 10% de SVF, soit environ trois fois moins.

5. Cinétique de l'infection virale lors de passages répétés de cellules Sf9 MM8-SF dans le milieu MM8-SF enrichi de lipides

5.1. Addition de cholestérol au milieu MM8-SF

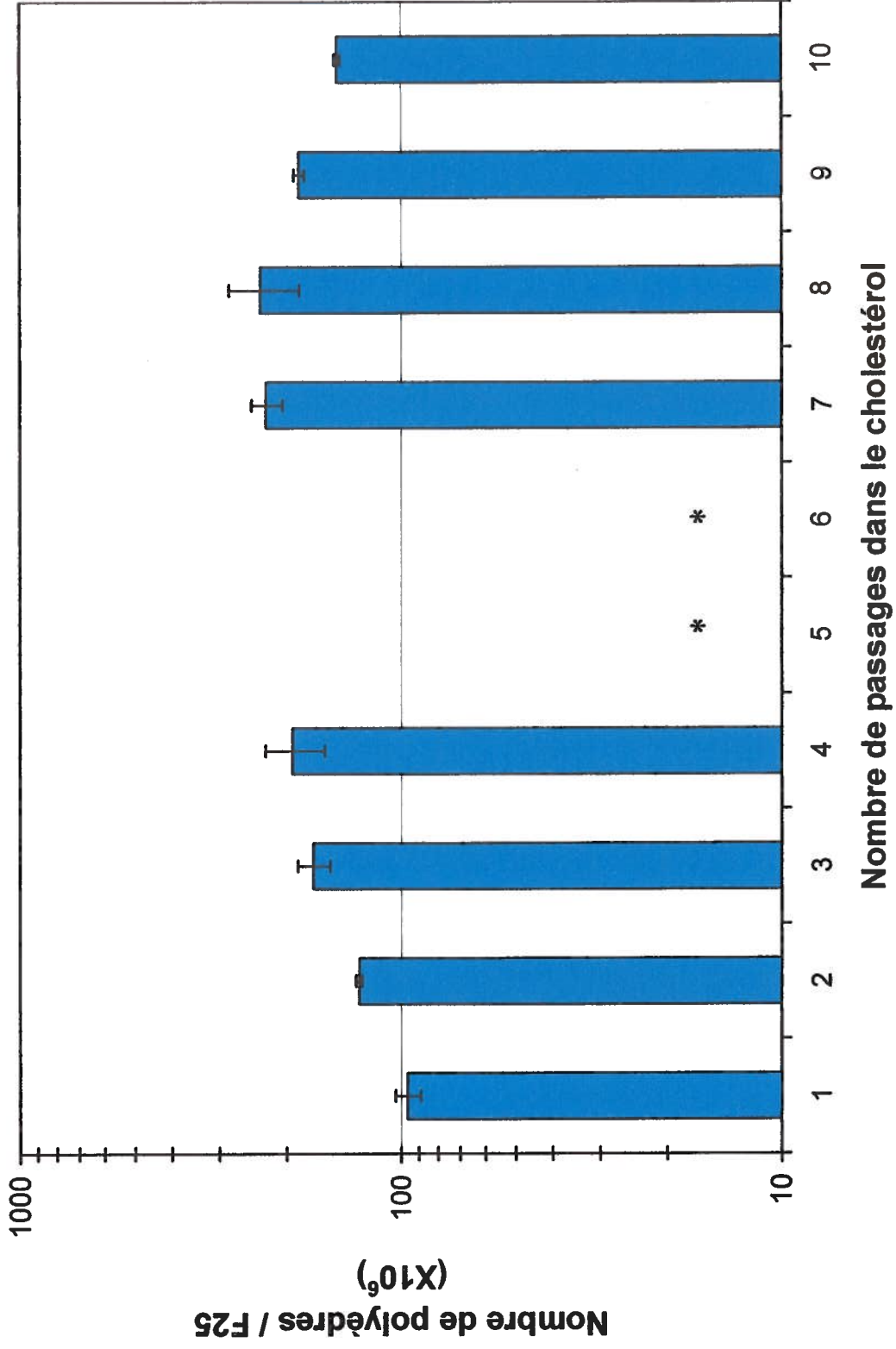
Le travail précédent a démontré que l'ajout ponctuel de cholestérol est suffisant pour permettre une infection virale normale et même supérieure à ce que l'on observe dans le système classique. Cependant, nous avons voulu savoir si le fait de maintenir les cellules Sf9 MM8-SF en présence continue de cholestérol pouvait améliorer l'infection virale et atteindre une production virale encore plus élevée. En infectant les cellules des passages 1 à 10 par le virus AcMNPV à une MOI de 0,3, on constate que la production de polyèdres augmente continuellement du 1^{er} au 8^e passage, soit de $9,6 \pm 0,7 \times 10^7$ à $2,34 \pm 0,5 \times 10^8$ polyèdres/F25, ce qui représente une augmentation de plus du double (Figure 10). Ensuite, on observe une certaine régression de l'infection. Les

Figure 10 : Effet de l'adaptation de cellules Sf9 au milieu MM8-SF additionné de cholestérol sur l'infection virale

Infections réalisées par le virus AcMNPV à une MOI de 0,3.
Observations 6 jours post-infection.

Les données correspondent à la moyenne de 3 mesures.

* Les cultures des passages 5 et 6 n'ont pas été infectées par le virus AcMNPV.



passages 5 et 6 sont absents du graphique puisque ces cellules n'ont pas été infectées dû à une mauvaise condition cellulaire au cours de ces passages.

5.2. Impact de l'addition d'un mélange lipidique commercial sur l'infectivité virale

Après avoir comparé l'infection virale obtenue en présence de cholestérol au système classique qui contient du sérum de veau fœtal, nous avons vérifié si le cholestérol permettait une infection plus efficace que lorsque l'infection est faite dans un milieu de culture auquel on ajoute un supplément lipidique commercial (voir la section 4.2.2. du matériel et méthodes). Cette expérience avait été réalisée auparavant dans notre laboratoire, mais aucune donnée concernant les premiers passages dans ce milieu n'avait été obtenue.

Les infections par le virus AcMNPV ont été réalisées dans les mêmes conditions que lors des infections des cellules Sf9 MM8-SF additionnées de cholestérol, soit à une MOI de 0,3 et les lectures ont été faites 6 jours post-infection. Les cellules correspondant aux passages 1, 9 et 294 dans le milieu MM8-SF additionné de lipides commerciaux ont été infectées. Les résultats démontrent que le nombre de polyèdres produit par flacon de culture est très similaire pour les passages 1 et 9, soit de $9,85 \pm 0,5 \times 10^7$ et de $1,02 \pm 0,1 \times 10^8$ respectivement. Cependant, une diminution considérable de la production de polyèdres est observée suite à 294 passages dans le milieu additionné de lipides commerciaux. En effet, le nombre de polyèdres par F25 chute à $5,63 \pm 1,9 \times 10^7$, soit près de la moitié de la production initiale. Brièvement, si l'on compare la production de polyèdres obtenue dans un tel système et celle obtenue en présence de cholestérol seul, on constate que ces deux systèmes entraînent une production équivalente en terme de quantité de polyèdres. Ce dernier point sera davantage analysé dans la discussion.

6. Effet d'une mise en contact préliminaire de cellules Sf9 MM8-SF avec le cholestérol sur l'infection virale

Afin d'optimiser l'infection réalisée en présence de cholestérol comme seule source lipidique, nous avons vérifié si ce composé conserve son efficacité lorsqu'il est mis en présence de cellules non infectées pendant quelques jours avant l'infection. Dans le cadre de cette expérience, l'infection de cellules Sf9 MM8-SF s'est avérée optimale ($1,08 \pm 0,03 \times 10^8$ à $1,21 \pm 0,13 \times 10^8$ polyèdres/F25) lorsque l'on a ajouté du cholestérol fraîchement préparé au milieu de culture MM8-SF, soit du milieu frais ou ayant été en contact avec des cellules non infectées pour une période de 3 jours (Figure 11). D'autre part, le niveau d'infection a diminué de plus de 40% ($6,68 \pm 0,69 \times 10^7$ polyèdres/F25) lorsque l'on a utilisé un milieu de culture additionné de cholestérol, mais qui a préalablement été mis en contact avec des cellules non infectées pendant 3 jours. La qualité du milieu de culture ne serait pas responsable de cette diminution de l'infection puisque, lors d'un apport de cholestérol frais, dans un milieu ayant été mis en contact préliminairement avec les cellules ou non, un taux d'infection comparable est observé.

7. Effet de l'ajout du cholestérol à des temps post-infection variables sur l'infection virale

Ayant démontré que l'ajout de cholestérol à un milieu de culture en même temps que le virus était suffisant pour une infection virale optimale, nous nous sommes intéressés à déterminer si cet ajout de cholestérol pouvait être fait plus tard que l'ajout du virus. Les résultats obtenus démontrent que bien que le cholestérol demeure dans le milieu moins longtemps, on observe une augmentation du nombre de polyèdres de plus de 3 à 5 fois si le milieu était enrichi en cholestérol 18, 24, 48 ou 72 heures après l'ajout du virus, comparativement à un ajout de cholestérol au moment de l'infection (Figure 12).

Figure 11 : Effet, sur l'infection virale, d'une mise en contact préliminaire du cholestérol avec des cellules Sf9 MM8-SF

Virus utilisé : AcMNPV à une MOI de 1.

Infection de cellules Sf9 MM8-SF fraîches par AcMNPV en présence de :

- Milieu MM8-SF frais et 20 $\mu\text{g/ml}$ de cholestérol frais
- Milieu MM8-SF mis 3 jours en présence de cellules et 20 $\mu\text{g/ml}$ de cholestérol frais
- Milieu MM8-SF et 20 $\mu\text{g/ml}$ de cholestérol mis en présence de cellules pendant 3 jours

Les données correspondent à la moyenne de 3 expériences.

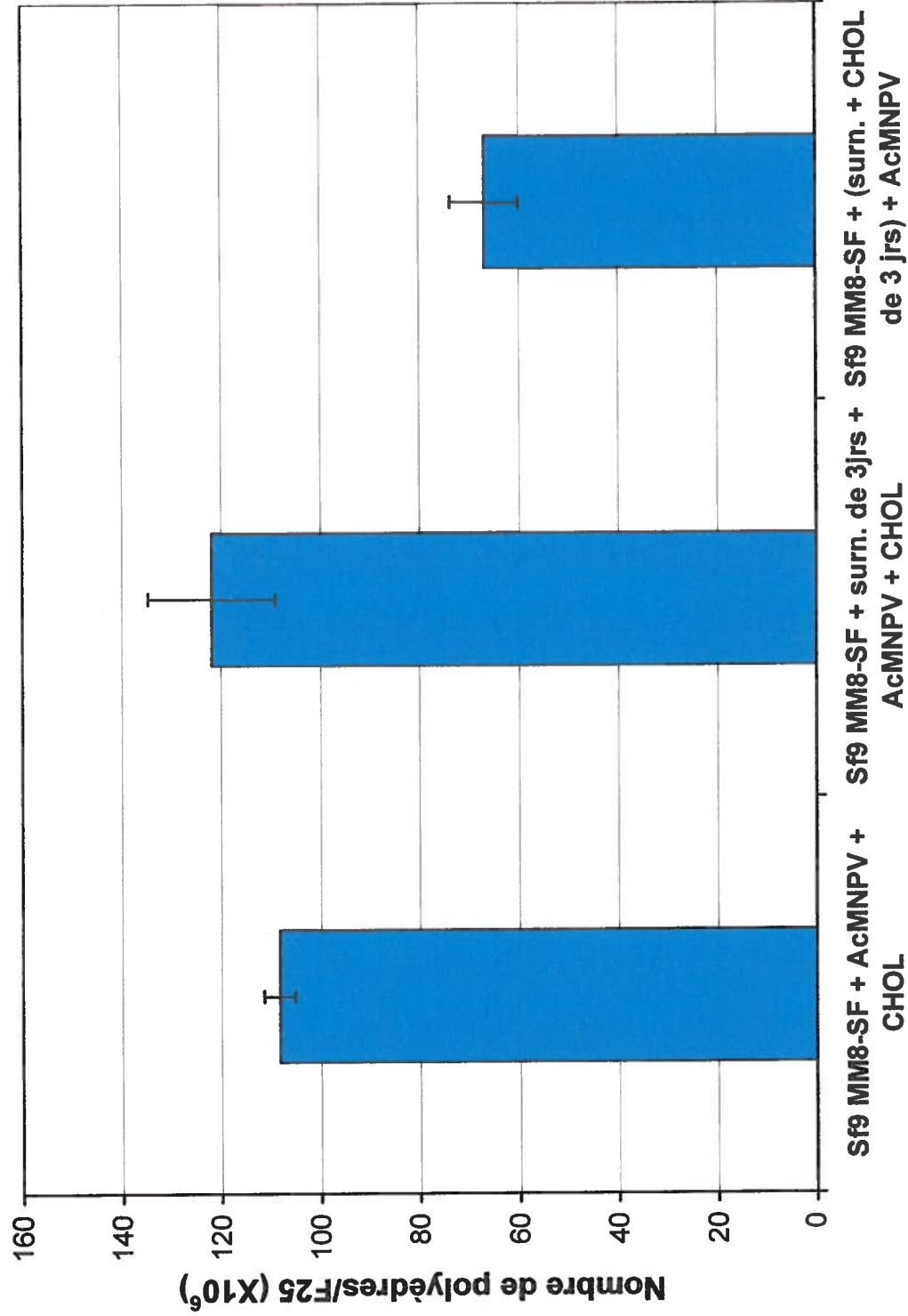
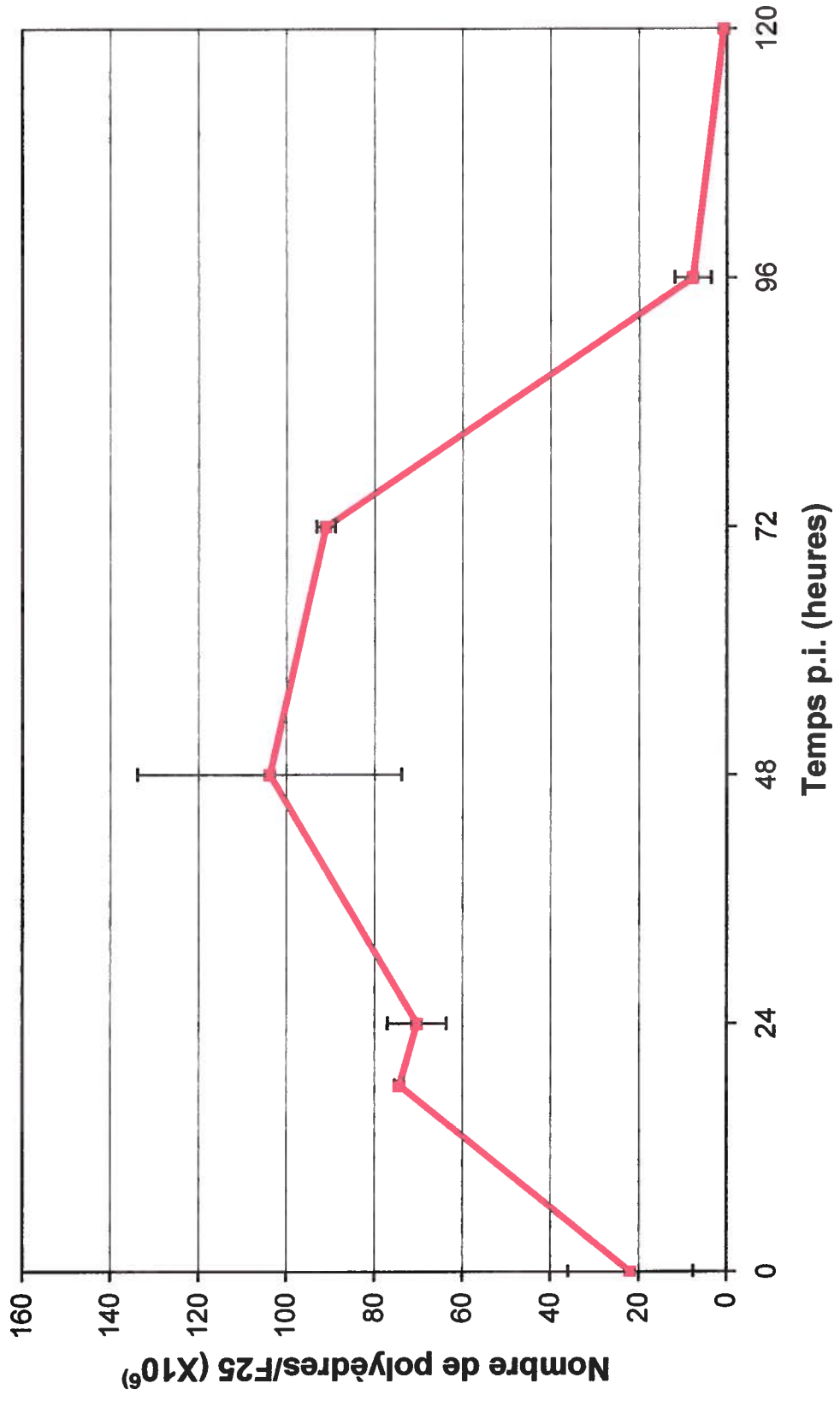


Figure 12 : Effet de l'ajout de cholestérol à différents temps post-infection sur l'infection de cellules Sf9 MM8-SF par le virus AcMNPV

Infections réalisées à une MOI de 1.

Observations 6 jours post-infection.

Les données correspondent à la moyenne de 3 mesures.



8. Étude du rôle du cholestérol dans l'infection virale

Le cholestérol joue un rôle primordial dans l'infection virale puisqu'en son absence, aucune infection virale n'est observable en microscopie photonique en comparaison à une infection dite normale lorsque celui-ci est ajouté à une concentration de 20 µg/ml. Nous avons donc voulu avoir plus de précisions quant au rôle du cholestérol dans l'infection par un baculovirus. Nous avons séparé le cycle viral en trois grandes étapes, soit l'entrée du virus, la synthèse de nouveaux virus, et finalement la libération du virus de la cellule hôte. Par la suite, nous avons examiné la propagation de l'infection virale. Chacune de ces étapes du cycle viral n'a pu être étudiée en détail faute de temps, elles ont plutôt été observées dans leur ensemble.

8.1. Entrée du virus entier

Afin de vérifier si le virus peut entrer dans la cellule sans ajout de cholestérol, nous avons procédé à l'observation, en microscopie électronique, de coupes de cellules Sf9 MM8-SF, infectées par le virus AcMNPV, fixées 2 heures p.i. Les résultats de ces observations démontrent une absence de virus chez les cellules infectées sans addition de cholestérol (Figure 13A). Par contre, l'attachement de virus à la membrane cellulaire a été mis en évidence chez les cellules infectées avec addition de cholestérol (Figure 13B).

8.2. Transfection en absence de cholestérol

8.2.1. Initiation de l'infection

Afin d'étudier les étapes subséquentes à l'entrée du virus, nous avons utilisé la technique de transfection puisque la production virale suite à une infection est impossible en absence de cholestérol et nous devons donc outrepasser les premières étapes d'interaction du virus avec la cellule. De plus, plusieurs indices, provenant de la littérature, suggèrent que le virus, en absence

Figure 13 : Observation en microscopie électronique de l'entrée du virus AcMNPV chez des cellules Sf9 MM8-SF

Cellules Sf9 MM8-Sf infectées par AcMNPV à une MOI de 1.
Observations 2 heures p.i.

A : En absence de cholestérol

Barre : 1 μ m

B : En présence de cholestérol (20 μ g/ml)

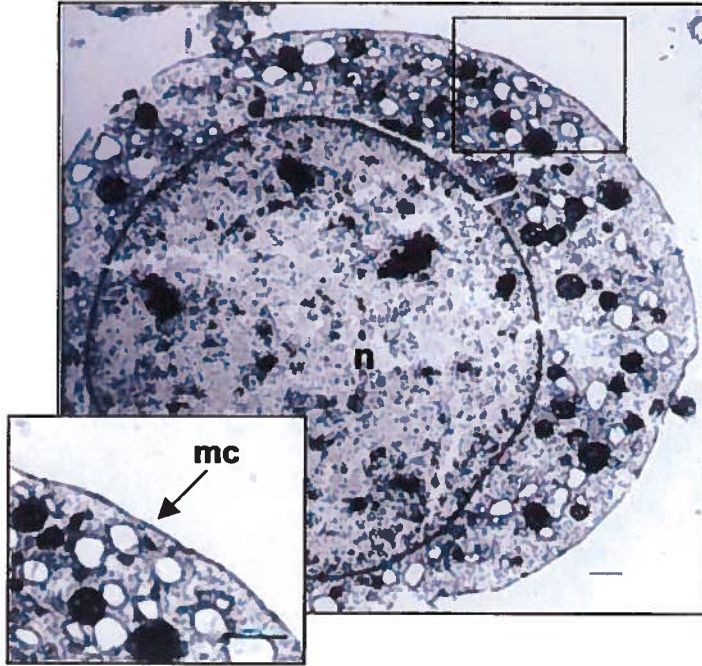
Barre : 100 nm

mc : membrane cellulaire

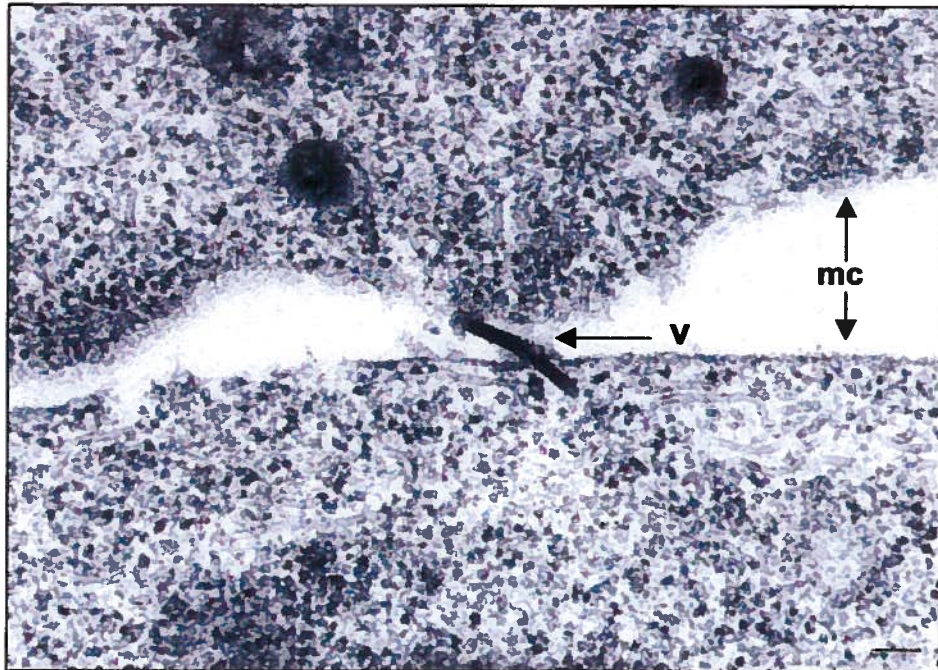
n : noyau

v : virus

A



B



de cholestérol, est bloqué aux premières étapes de l'infection. Nous avons donc livré, par transfection, l'ADN du virus aux cellules dépourvues de cholestérol.

Nous avons tout d'abord déterminé quelle méthode de transfection était la plus appropriée à notre étude. Ainsi, les premiers essais ont été réalisés à l'aide du phosphate de calcium afin d'éliminer tout doute de contamination possible par les lipides formant les liposomes habituellement utilisés dans les techniques de transfection. Cependant, cette technique a été abandonnée puisque le taux de transfection obtenu en présence de cholestérol était très faible et qu'on notait une forte toxicité pour les cellules. Beaucoup plus efficace et moins toxique, la transfection à l'aide de la lipofectine a été privilégiée.

Nous devons aussi confirmer que la lipofectine, qui est un lipide, ne pouvait pas remplacer le cholestérol et permettre l'infection virale. Nous avons procédé à une infection virale par le virus AcMNPV à une MOI de 1, en ajoutant, comme seule source lipidique, 35 µg de lipofectine. Aucune infection virale n'a alors été observée ce qui confirme que la lipofectine seule n'est pas en mesure de remédier à une absence de lipides dans le milieu de culture.

Avant d'entreprendre les expériences, nous avons tout d'abord fixé les différents paramètres de la transfection, c'est-à-dire les quantités d'ADN et de lipofectine requises ainsi que le temps d'incubation nécessaire afin de permettre l'incorporation de l'ADN viral dans la cellule. Ainsi, la quantité d'ADN et de lipofectine qui permettent le maximum de transfection ont été établies; 6 µg d'ADN et 35 µg de lipofectine, et ce, pour 1×10^6 cellules dans 3 ml de milieu de culture. Le temps d'incubation du complexe liposome-ADN avec les cellules a été fixé à 4 heures. Un temps plus prolongé ne permet pas un meilleur taux de transfection et entraîne de la toxicité envers les cellules. À ce sujet, il est à noter que les cellules Sf9 MM8-SF sont beaucoup plus sensibles à la lipofectine que les cellules Sf9. Un temps d'incubation de 4 heures permet de garder l'intégrité des deux lignées cellulaires, alors qu'une incubation de 16 heures (soit toute une

nuits), n'affecte pas l'état des cellules Sf9. Par contre, près de 40% des cellules Sf9 MM8-SF sont détruites.

Nous avons donc pu étudier, par transfection à l'aide de la lipofectine, la réplication virale en absence de cholestérol chez les cellules Sf9 MM8-SF. Dans un tel système, les résultats obtenus indiquent la présence de polyèdres dans les cellules transfectées, mais dans une faible proportion, soit environ une centaine de cellules contenant des polyèdres par boîte, et ce, même après 9 jours d'infection (Figure 14). Cependant, une même transfection réalisée chez des cellules Sf9 MM8-SF, auxquelles on a ajouté du cholestérol, mène à un pourcentage d'infection de 60% à 80%. Cependant, puisque le nombre de cellules transfectées en absence de cholestérol n'était que d'une centaine de cellules par boîte, aucune précision quant à la réplication virale n'a pu être apportée dû à la difficulté d'obtenir des coupes de cellules transfectées pouvant être observées à la microscopie électronique.

8.2.2. Libération de virus par bourgeonnement

En tout premier lieu, nous avons pensé à une accumulation possible de virions libres à l'intérieur des cellules transfectées en absence de cholestérol. Cependant, l'observation, 3 jours post-transfection, de coupes de cellules Sf9 MM8-SF transfectées avec l'ADN d'AcMNPV en absence de cholestérol par microscopie électronique ne nous a pas permis d'observer l'accumulation de virus à l'intérieur des cellules. Cette observation nous a conduits à deux hypothèses : Premièrement, il se pourrait que la synthèse de virions destinés à être libérés est impossible en absence de cholestérol.

Deuxièmement, il pourrait y avoir production de virus et bourgeonnement de ceux-ci à l'extérieur des cellules transfectées sans qu'ils soient en mesure de se propager de cellule en cellule. Afin de vérifier s'il y a libération de virus à l'extérieur des cellules transfectées, nous avons procédé à l'infection de cellules

Figure 14 : Transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN d'AcMNPV en absence de cholestérol

A : Cellules Sf9 MM8-SF saines

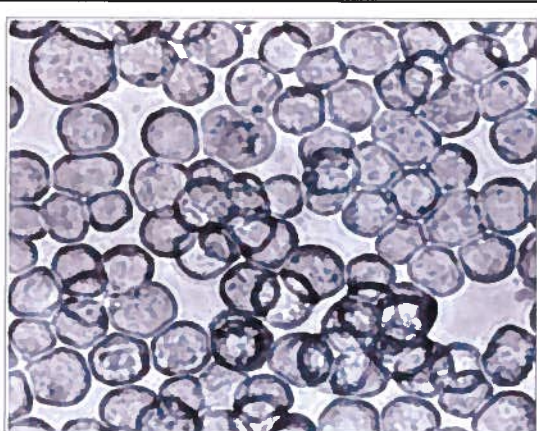
B : Cellules Sf9 MM8-SF transfectées par l'ADN d'AcMNPV en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de cholestérol

C : Cellules Sf9 MM8-SF transfectées par l'ADN d'AcMNPV en absence de cholestérol

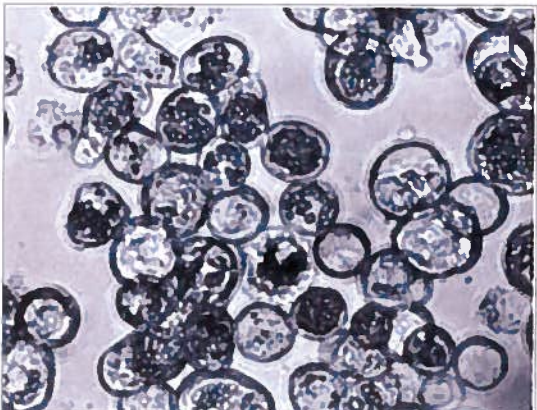
CI : cellules infectées

Grossissement : 250X

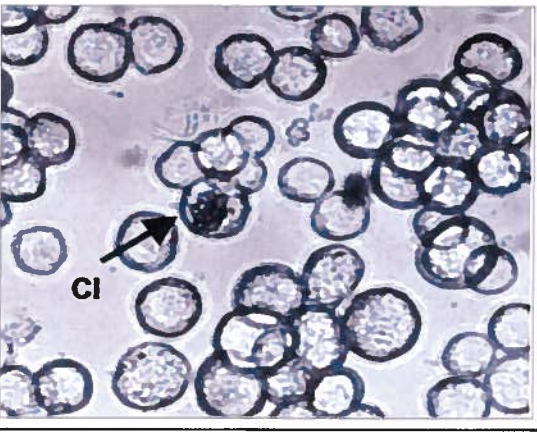
A



B



C



Sf9 additionnées de SVF ainsi que de cellules Sf9 MM8-SF en présence et en absence de cholestérol, par le surnageant d'une transfection réalisée en absence de cholestérol. Ces infections ont engendré une infection de l'ordre de 20%, 25% et de 0% observable par la présence de polyèdres.

Nous avons titré, ensuite, de façon plus précise, le surnageant d'une transfection en absence de cholestérol ainsi que celui d'une transfection en présence de cholestérol à deux temps post-transfection. Les résultats indiquent que les virus extracellulaires sont détectables dans le milieu de culture, et ce, dans les deux types de transfection, 3 jours après cette transfection. Il y a une augmentation hautement significative du titre viral du surnageant d'une transfection réalisée en présence de cholestérol de $10^{1.6}$ DICT₅₀/ml, 3 jours post-transfection, à $10^{7.1}$ DICT₅₀/ml, 8 jours post-transfection. D'autre part, le titre viral du surnageant d'une transfection en absence de cholestérol est demeuré à peu près constant du 3^e au 8^e jour post-transfection à environ 10^2 DITC₅₀/ml.

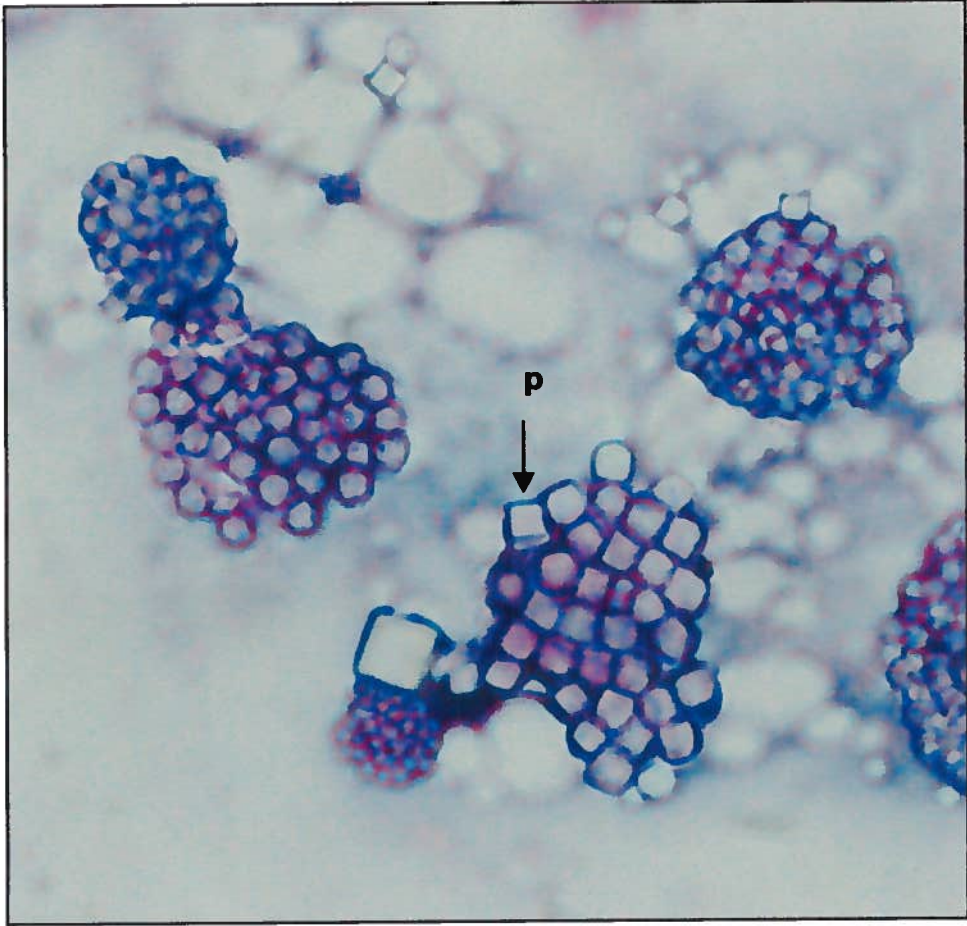
Les virus résultants d'une transfection en absence de cholestérol sont infectieux en culture cellulaire lorsque l'on ajoute du cholestérol ou du SVF. Nous avons donc vérifié si ces derniers étaient également infectieux *in vivo*, pour des larves de *Galleria mellonella*. Les résultats se sont avérés positifs puisque la présence de polyèdres a été détectée dans le broyat de larves inoculées par injection (Figure 15). Les virus produits par transfection s'avèrent donc infectieux, mais ne peuvent pas infecter d'autres cellules en absence de cholestérol.

8.2.3. Propagation de l'infection virale

Des tests ont été effectués afin de déterminer si le cholestérol jouait un rôle dans la propagation et l'amplification de l'infection virale d'un tapis cellulaire. À cet effet, un sérum neutralisant l'infectivité du AcMNPV *in vitro* a été ajouté, 4 heures post-transfection, au milieu de culture des cellules Sf9 MM8-SF transfectées par l'ADN du virus AcMNPV en présence de cholestérol. Le but de

Figure 15 : Diagnostic de l'infectiosité du virus, produit par transfection en absence de cholestérol chez les cellules Sf9 MM8-SF, chez les larves de *Galleria mellonella* (Coloration au Giemsa)

p : polyèdre



l'ajout de ce sérum était de neutraliser les virus libérés des cellules transfectées suite au premier cycle d'infection du tapis cellulaire. Moins de 1% (environ 100 cellules infectées) des cellules ont été infectées en présence de l'anti-sérum neutralisant, tandis que 50% des cellules ont été infectées en son absence (Tableau III). Une transfection de cellules Sf9 MM8-SF réalisée en absence de cholestérol et de l'anti-sérum neutralisant a résulté, comme dans le cas d'ajout de cholestérol et d'anti-sérum, en une infection de moins de 1%, correspondant toujours à environ une centaine de cellules contenant des polyèdres par boîte.

Tableau III : Amplification virale en absence de cholestérol

Pourcentage d'infection suite à :

- Une transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN d'AcMNPV en présence de cholestérol
- Une transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN d'AcMNPV en absence de cholestérol
- Une transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN d'AcMNPV en présence de cholestérol et d'un anti-NPV (1/100)

Transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN d'AcMNPV

+ cholestérol

50 % d'infection

- cholestérol

< 1% d'infection

**+ cholestérol + 1/100 sérum
de cobaye (anti-NPV)**

< 1% d'infection

DISCUSSION

L'utilisation des baculovirus comme vecteur pour la synthèse de protéines recombinantes fait que le monde scientifique porte un intérêt accru dans l'optimisation des milieux de culture d'insectes utilisés pour cette production virale.

Bien qu'elles soient auxotrophes aux stérols, c'est-à-dire qu'elles ne produisent pas leurs propres stérols, certaines lignées cellulaires d'insectes ont été adaptées à des milieux sans lipide, telle que la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF (lignée de *Spodoptera frugiperda* adaptée au milieu Mitsunashi-Maramorosch sans ajout de sérum de veau fœtal) établie dans notre laboratoire. Ces cellules permettent la réplique de certains virus tels que les virus responsables des polyédroses cytoplasmiques (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Cependant, les baculovirus (virus enveloppés) nécessitent l'apport de lipides dans le milieu de culture afin d'assurer leur multiplication (Nes et McKean, 1977; Goodwin et Adams, 1980b; Mitsunashi, Nakasone et Horie, 1983; Volkman et Knudson, 1988; Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Quoique l'ajout de sérum de veau fœtal a permis le maintien de lignées cellulaires d'insectes pendant plusieurs années, car il contient les lipides, vitamines, facteurs de croissance et autres composés biologiques essentiels, l'utilisation de sérum de veau fœtal n'est pas idéal en raison des coûts élevés (Claus *et al.*, 1993), des risques de contamination par des mycoplasmes et de toxicité envers les cellules d'insectes (Miltenburger, 1983).

L'apport de suppléments lipidiques commerciaux à des milieux de culture modifiés permet d'éviter l'utilisation de sérum de veau fœtal. Cependant, des anomalies morphologiques de la membrane des virus inclus et de l'inclusion des virions dans les polyèdres ont été notés chez les virus responsables des polyédroses nucléaires (NPV) produits chez les cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans le milieu MM8-SF additionné de lipides commerciaux (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997).

Dans le cadre de ce travail, toujours dans l'optique d'améliorer les milieux de culture utilisés pour la production de baculovirus, nous avons étudié l'ajout de cholestérol comme seule source de lipides. Le cholestérol a l'avantage d'être simple à utiliser et d'être peu dispendieux tout en étant pur.

Tout d'abord, nous devons souligner que, dans le cadre des travaux de notre laboratoire, nous sommes parvenus à cultiver des cellules d'insectes en absence totale de SVF ou de supplément lipidique. En effet, les cellules Sf9 adaptées au milieu MM8 sans sérum et sans apport lipidique de quelque nature que ce soit, ont été maintenues sur plus de 600 passages jusqu'à ce jour tout en conservant leur intégrité et un excellent taux de croissance. Cleverley, Geller et Lenard (1997) ont montré que des cellules d'insectes (High Five) maintenues dans un milieu sans cholestérol gardent leur intégrité. L'étude de quelques-unes de leurs organelles a prouvé que celles-ci n'étaient pas affectées et étaient toujours fonctionnelles comme le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi puisque la synthèse de protéines et l'acheminement de celles-ci à la membrane plasmique, à partir d'un virus recombinant, étaient toujours possibles.

L'infection de cellules de Sf9 en cours d'adaptation au milieu MM8-SF a contribué à démontrer l'importance des lipides dans l'infection baculovirale. En effet, l'étude de l'infection baculovirale de cellules Sf9 MM8-SF avait été réalisée dans des cellules complètement adaptées, soit à environ 250 passages dans le milieu MM8 sans ajout de sérum (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Par contre, aucune observation n'avait été faite lors de l'adaptation en tant que telle. Au cours de nos travaux, l'infection de ces cellules par le virus sauvage AcMNPV et le virus recombinant AcLuci (virus hybride entre l'AcMNPV et le BmMNPV sauvages, mais dont une partie du gène codant pour la polyédrine a été remplacée par le gène de la luciférase de luciole) ont tous deux reflété la même tendance. En effet, une corrélation est observée entre une baisse de la quantité de SVF ajouté au milieu de culture et l'infection virale. Ainsi, un ou plusieurs composés biologiques contenus dans le SVF sont importants à la production de

virus infectieux, car bien que le milieu MM8-SF permette la croissance cellulaire de façon normale, les NPV ne peuvent s'y multiplier. C'est ainsi, qu'après seulement 3 passages dans le milieu MM8-SF, la production de polyèdres est très faible et complètement nulle dans les passages successifs. Chez les cellules High Five, Cleverley, Geller et Lenard (1997) ont démontré que lorsque maintenues dans un milieu en absence de cholestérol, les cellules ne présentaient plus de cholestérol détectable après le 4^e passage dans ce milieu. Lu, Xiong et Silver (2002) ont également observé que, après 3 passages en absence de SVF, les cellules d'insectes C6/36 ne présentaient plus de cholestérol dans leurs membranes. En sachant que la présence de lipides est primordiale à la production virale (Goodwin et Adams, 1980b; Volkman et Knudson, 1988), ces observations suggèrent que le cholestérol serait le principal responsable de l'infection virale puisque celui-ci ne peut plus être détecté au passage où nous n'obtenons plus de production virale.

À la lumière de ce résultat et sachant que les cellules d'insectes sont auxotrophes aux stérols, notre attention s'est dirigée vers l'importance du cholestérol dans l'infection baculovirale car, le cholestérol est le stérol le plus abondant dans les membranes des cellules eucaryotes (Alberts *et al.*, 1995). De plus, de nombreuses études réalisées chez le Semliki Forest Virus (virus enveloppé) ont montré la grande importance du cholestérol dans l'infection virale (White et Helenius, 1980; Kielian et Jungerwirth, 1990; Phalen et Kielian, 1991; Marquardt, Phalen et Kielian, 1993; Chatterjee, Vashishtha et Kielian, 2000). L'observation préliminaire en microscopie à fluorescence de cellules Sf9 MM8-SF colorées par une molécule fluorescente ayant une forte affinité pour le cholestérol, le filipin, a permis de conclure que ces cellules sont dépourvues en cholestérol, ce qui pourrait être la cause de l'absence d'infection virale chez ces cellules.

L'infection de cellules Sf9 MM8-SF par le virus AcMNPV, à une MOI de 1, a permis de constater que l'infection par ce virus est indétectable (par la

présence de polyèdres) sans addition de cholestérol. Cependant, l'ajout de cholestérol seul à une concentration de 20 µg/ml est suffisant pour permettre une infection virale complète et normale, comme cela avait été montré pour le virus GmMNPV (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Des expériences réalisées précédemment dans notre laboratoire ont établi la concentration optimale de cholestérol à 20 µg/ml, car de plus fortes concentrations de cholestérol est toxique pour les cellules. Ces résultats établissent de façon évidente le rôle fondamental du cholestérol dans l'infection virale. Tout comme il a été mentionné lors d'un ajout de SVF et d'albumine de sérum bovin (BSA) (Maranga, Coroadinha et Carrondo, 2002), le cholestérol pourrait faciliter l'infection virale en formant une sorte de couche à la surface cellulaire qui diminue les liaisons non spécifiques et qui favorise l'attachement des virus à des récepteurs cellulaires.

D'autre part, l'infection de cellules Sf9 MM8-SF par le virus AcMNPV à une MOI de 300, a conduit à l'observation de polyèdres dans les cellules infectées. Cette observation nous a tout d'abord suggéré qu'une forte multiplicité d'infection pourrait contrecarrer le besoin de cholestérol dans l'infection baculovirale. Cependant, l'infection observée dans un tel système était très limitée et aucune amplification virale n'a été observée. Une telle infection pourrait plutôt être due à la présence de contaminant lipidique dans l'inoculum viral puisque le virus utilisé lors des expériences a été produit dans un système enrichi de 10% de SVF. En effet, plus on augmente la MOI, plus on augmente le volume de l'inoculum viral et, en conséquence, le contaminant de sérum de veau fœtal. Une très faible quantité de cholestérol serait donc en mesure de permettre l'infection virale. Par contre, elle ne permettrait qu'une primo-infection, c'est-à-dire que les traces de cholestérol attachées aux cellules permettraient aux virus de pénétrer dans les cellules ayant incorporé le cholestérol, cependant, il ne pourrait pas y avoir amplification de l'infection puisque trop peu de cellules auraient incorporé du cholestérol. L'infection virale obtenue, suite à une infection à une MOI très élevée, soit de 300, mais en présence d'une dose de cholestérol, a conduit à un pourcentage d'infection de 60% comparativement à un

pourcentage atteignant 85% à une MOI de 1. Cette diminution du niveau d'infection serait attribuable à une saturation de la surface cellulaire par les virus. En effet, Wickham *et al.* (1990) ont proposé que l'attachement des baculovirus aux récepteurs cellulaires impliquait des liens multivalents et que des liaisons non spécifiques étaient également possibles. Ainsi, lorsque le ratio particules virales / cellules devient trop élevé, la surface cellulaire pourrait devenir saturée avant que les récepteurs soient liés à leur ligand.

Des analyses en cytométrie en flux ont démontré que le cholestérol s'incorpore dans les membranes des cellules Sf9 MM8-SF additionnées en cholestérol. Nous avons observé que la quantité de cholestérol à la surface des cellules était la même chez des cellules ayant été en contact avec le cholestérol pendant 1, 3 ou 5 jours. Cependant, il a été démontré, par observation en microscopie à fluorescence, que la localisation et la répartition du cholestérol chez ces cellules variaient avec le temps. En effet, le cholestérol semble plutôt dispersé sur la membrane plasmique des cellules après seulement une journée de contact avec celles-ci, alors qu'il est distribué non uniformément lorsque celui-ci demeure en présence de cellules durant une période plus prolongée. Nous avons également noté que, pour une même période d'incubation, le cholestérol est distribué sur la membrane plasmique sous forme plus agrégée qu'à la surface de cellules Sf9 maintenues dans 10% de SVF. Cette distribution du cholestérol suggère qu'il y a formation de micro-domaines « rafts ». La présence de cholestérol dans les membranes plasmiques des cellules n'est pas surprenante puisqu'on estime que 80 à 90% du cholestérol présent dans les cellules est localisé dans la membrane plasmique (Lange, 1991).

Une expérience qui consiste à infecter des cellules Sf9 MM8-SF en présence d'un milieu enrichi de cholestérol, qui avait préalablement été mis en contact avec des cellules pendant 3 jours, nous indique que le taux d'infection diminue de moitié comparativement à une infection de cellules en présence de cholestérol frais. Puisque nos résultats ont clairement montré que les cellules

captent le cholestérol du milieu afin de l'incorporer dans leurs membranes, il est fort probable que les cellules intègrent une partie du cholestérol contenu dans le milieu pendant les 3 jours, ce qui fait qu'il reste moins de cholestérol dans le surnageant qui a servi de milieu pour l'infection virale. La diminution de l'infection virale ne serait pas due à une dégradation du cholestérol, mais plutôt à son incorporation par les cellules préliminairement mises en contact avec le cholestérol.

Le cholestérol comme seule source de lipide permet la multiplication baculovirale. De plus, la comparaison du niveau d'infection obtenu dans un tel système comparé au système classique, soit dans le milieu Grace additionné de 10% de SVF, a montré une production de polyèdres trois fois plus élevée. Cependant, la comparaison de cette infection réalisée en présence de cholestérol à une infection de cellules maintenues dans le milieu MM8-SF auquel a été ajouté un supplément lipidique commercial, qui contient une quantité de cholestérol de l'ordre de 20 µg/ml, indique une production de polyèdres équivalente dans les deux cas. Par contre, afin de quantifier cette infection, nous nous sommes basés uniquement sur la quantité de polyèdres produits. Bien que le nombre de polyèdres synthétisés dans les deux cas peut sembler le même, il n'en demeure pas moins que la production virale peut être très différente d'un système à l'autre. En effet, puisque les polyèdres produits en présence de cholestérol se sont avérés infectieux et normaux, ils pourraient représenter plus de virus comparativement aux polyèdres parfois vides retrouvés lors d'une infection en présence de supplément lipidique commercial (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Ce phénomène pourrait s'expliquer par un effet antagoniste des différents lipides en fonction de leur forme. Il a été montré que les lipides de forme conique facilitent la fusion des membranes alors que les lipides de forme inverse l'inhibent (Chernomordik *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1999). Ainsi, une combinaison de plusieurs lipides peut avoir un effet négatif sur l'infection virale. Par contre, ce phénomène ne peut pas se produire lors de l'ajout de cholestérol seul (Chernomordik *et al.*, 1995).

Récemment, des études menées par Maranga, Coroadinha et Carrondo (2002) ont identifié l'albumine de sérum bovin (BSA) comme étant le facteur principal responsable de l'augmentation de l'infection par le baculovirus. Leurs travaux ont démontré que le niveau d'infection de cellules de *Spodoptera frugiperda* (cellules Sf21) par un baculovirus recombinant exprimant le gène *LacZ* était supérieur lors d'un ajout de BSA seul au milieu de culture que lors d'un ajout de 10% de SVF. L'albumine agirait en enrobant la cellule ce qui favorise les liaisons spécifiques des virus aux récepteurs. Selon les résultats obtenus dans notre travail, il est évident que l'albumine n'est pas le seul facteur responsable de l'augmentation de l'infection virale. Il serait par contre intéressant de comparer le niveau d'infection obtenu en présence d'albumine ou de cholestérol avec la combinaison des deux.

Bien que l'ajout de cholestérol de façon ponctuelle au moment de l'infection soit suffisant pour permettre l'infection virale, l'infection a également été réalisée chez des cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans le cholestérol pendant quelques passages afin de vérifier si le fait de maintenir ces cellules dans le cholestérol permettait un taux d'infection plus élevé. Une faible augmentation de l'infection a été observée au cours des 8 premiers passages suivie d'une diminution. Cette augmentation de l'infection virale pourrait être explicable par une accumulation de cholestérol à la membrane plasmique des cellules ce qui favorise l'infection virale. En effet, en utilisant le filipin, nos résultats ont montré que le cholestérol s'incorpore dans la membrane des cellules. Il est donc logique d'en déduire que si l'on ajoute du cholestérol sur plusieurs passages, la quantité de cholestérol incorporée dans la membrane plasmique de la cellule sera augmentée ce qui favorisera l'infection virale. Il a d'ailleurs été rapporté par Gimpl, Burger et Fahrenholz (1997) que l'efficacité de la liaison de ligands de certaines protéines réceptrices dépendant de la teneur des membranes en cholestérol. Ainsi, la liaison de virus aux récepteurs cellulaires serait avantagée par une plus grande proportion de cholestérol dans la membrane plasmique. Cependant, des observations réalisées antérieurement

dans notre laboratoire ont montré qu'un excès de cholestérol entraîne des effets toxiques pour les cellules. Des conclusions similaires ont également été obtenues avec des cellules de mammifères (Tabas, 1997). Il est donc fort probable qu'un ajout continu de cholestérol devienne néfaste pour les cellules et, par conséquent, pour l'infection virale, ce qui expliquerait pourquoi une diminution de l'infection est observée après 8 passages en présence de cholestérol. L'ajout ponctuel de cholestérol serait donc suffisant pour permettre l'infection virale ce qui diminuerait les coûts du maintien des cellules utilisées pour la production de virus.

Tout comme il a été précédemment observé lors d'une infection en présence de cholestérol, les cellules Sf9 MM8-SF maintenues dans un milieu enrichi par un mélange lipidique commercial ne démontre aucun avantage à être continuellement maintenues dans de telles conditions. En effet, un ajout ponctuel de lipides entraîne une production virale comparable à celle obtenue lors d'une infection effectuée suite à 9 passages dans ces lipides.

Il ne faisait plus aucun doute que le cholestérol est impliqué dans l'infection baculovirale, cependant, son rôle et son site d'action demeuraient inconnus. Nous nous sommes plus particulièrement penchés sur les 3 grandes étapes du cycle viral, soient l'entrée du virus, la synthèse et la sortie des virus des cellules. Faisant suite à ce cycle viral, l'amplification de l'infection, a également été mise sous observation.

Afin de vérifier si le virus peut entrer dans la cellule en absence de cholestérol, nous avons observé par microscopie électronique de cellules Sf9 MM8-SF infectées par le virus AcMNPV. Cependant, aucun virus n'a pu être observé. En accord avec la littérature, cette observation suggère que l'entrée du virus en absence de cholestérol n'est pas possible. Plusieurs études réalisées chez des virus enveloppés ont attribué un rôle majeur au cholestérol pour la pénétration du virus. En effet, dans le cas du SFV, le changement de

conformation de la protéine de fusion E1 ne peut avoir lieu en absence de cholestérol et ainsi la fusion du virus à l'endosome est bloquée (White et Helenius, 1980; Kielian et Jungerwirth, 1990; Phalen et Kielian, 1991; Marquardt, Phalen et Kielian, 1993; Chatterjee, Vanishishtha et Kielian, 2000). Des observations similaires ont été faites chez le Sindbis Virus (SIN) (Lu, Cassese et Kielian, 1999). De plus, l'attachement et la fusion du virus responsable de l'hépatite murine (MHV) serait également en étroite relation avec la présence de cholestérol dans les membranes (Kielian *et al.*, 2000).

La transfection, comme technique destinée à outrepasser les premières interactions du virus avec la cellule, a permis d'observer si la libération de virus infectieux et la propagation de l'infection virale étaient possibles en absence de cholestérol.

Ainsi, la transfection de cellules Sf9 MM8-SF par l'ADN du virus AcMNPV en absence totale de cholestérol a permis de démontrer que la formation de polyèdres, l'assemblage viral et la synthèse de corps d'inclusion complets soient possibles. Le cholestérol ne semblerait donc pas jouer de rôle dans la transcription et la traduction de protéines virales puisque la présence de polyèdres a été détectée dans le noyau des cellules transfectées. Donc, le cholestérol serait essentiel lors des premiers stades de l'infection virale. De plus, la réplication virale a été confirmée par la présence de virus extracellulaires dans le surnageant lors d'une transfection réalisée en absence de cholestérol. Les nouveaux virus produits dans de telles conditions ont été inoculés *in vivo*, c'est-à-dire chez la larve de *Galleria mellonella* et ont conduit à une infection, ce qui indique que les virus produits en absence de cholestérol demeurent infectieux. La même observation a été faite lorsque l'on a procédé à une infection *in vitro*, soit en culture cellulaire de Sf9 maintenues dans le milieu Grace enrichi de 10% de SVF ou chez les cellules Sf9 MM8-SF additionnées de cholestérol. La sortie virale est donc possible en absence de cholestérol. Ces virus extracellulaires, produits suite à une transfection en absence de cholestérol, ne permettent

cependant pas une infection de cellules dépourvues de cholestérol. Ces résultats diffèrent de ce qui a été rapporté chez d'autres virus enveloppés tels que le Semliki Forest Virus (Marquardt, Phalen et Kielian, 1993; Lu et Kielian, 2000) et le Sindbis Virus (SIN) (Lu, Cassese et Kielian, 1999) chez qui le cholestérol est très important dans la sortie du virus. Chez le SFV, l'impossibilité du bourgeonnement de nouveaux virus serait associée à une dégradation des protéines péplomères au cours de l'infection, alors que chez le SIN, le cholestérol agirait en maintenant une conformation adéquate de la protéine de fusion E1.

Il est donc clair que l'assemblage de nouveaux virions infectieux, la formation de polyèdres et la sortie virale de la cellule infectée est possible en absence de cholestérol. Cependant, l'infection d'autres cellules n'est pas possible dans un tel système. Ceci suggère que les premières étapes d'interaction entre le virus et la cellule seraient les seules possiblement dépendantes du cholestérol.

Afin de démontrer cette dépendance, une expérience de neutralisation a été réalisée. Lorsqu'un sérum neutralisant contenant des anticorps anti-NPV est ajouté au milieu de culture lors d'une transfection de cellules Sf9 MM8-SF additionnées de cholestérol, on constate que le taux d'infection obtenu est inférieur à 1%. Il est par contre de 50% lors d'une transfection en absence d'anticorps. L'infection obtenue suite à la neutralisation correspond à une primo-infection puisque les nouveaux virus produits sont neutralisés dès leur sortie de la cellule hôte et ne peuvent infecter les cellules voisines et donc mener à l'amplification de l'infection virale. Il est donc fort intéressant de constater que, lorsque réalisée dans les mêmes conditions, la transfection de cellules Sf9 MM8-SF en absence de cholestérol conduit également à un taux d'infection inférieur à 1%. Ceci nous démontre qu'en absence de cholestérol la production virale obtenue suite à une transfection se résume à une primo-infection, ainsi le virus est incapable d'infecter de nouvelles cellules et de permettre l'amplification comme le confirme un titrage des virus extracellulaires produits.

En effet, suite à la transfection en absence de cholestérol et à la première synthèse de nouveaux virus, le titrage des virus retrouvés dans le surnageant demeure le même, et ce, même suite à plusieurs jours post-transfection comparativement à une augmentation marquée lorsque la transfection a été réalisée en présence de cholestérol. Ceci indique que la sortie de virus est possible en absence de cholestérol, par contre, il est impossible pour les nouveaux virus extracellulaires d'infecter les cellules environnantes, c'est-à-dire d'infecter des cellules en absence de cholestérol et de permettre la propagation de l'infection. D'ailleurs, Marquardt, Phalen et Kielian (1993) ont démontré que des cellules dépourvues de cholestérol sont 2000 fois moins permissives au virus SFV que les cellules maintenues en présence de cholestérol.

Nos résultats permettent d'expliquer ceux d'une expérience réalisée afin de vérifier si l'ajout du cholestérol post-infection pouvait faciliter l'infection virale. Nous avons donc ajouté le cholestérol à des temps post-infection variables. Les résultats nous indiquent une augmentation de 3 à 5 fois du nombre de polyèdres synthétisés en un temps plus court lorsque le cholestérol est ajouté 18, 24, 48 ou 72 heures après l'ajout du virus. C'est-à-dire que bien que le cholestérol soit demeuré moins longtemps dans le milieu, plus de polyèdres ont été synthétisés, comparativement à un ajout de cholestérol au moment de l'infection. Le maximum est atteint lorsque le cholestérol est ajouté 48 heures post-infection. Puisque les cellules se multiplient dans le temps, ce résultat serait explicable dû au fait qu'il y a évidemment moins de cellules au temps zéro donc moins de cellules disponibles pour l'infection virale. Par la suite, le nombre de cellules augmente et atteignent la phase exponentielle de croissance qui est la plus favorable à l'infection virale. Ayant démontré que le virus ne peut entrer dans les cellules en absence de cholestérol, le virus demeurerait donc dans le surnageant jusqu'au moment de l'ajout du cholestérol. Ainsi, lorsque le cholestérol est ajouté, plus de cellules sont disponibles pour le virus ce qui permet une plus grande amplification virale. Il serait donc plus avantageux, pour un même nombre de cellules inoculées au départ, d'ajouter le cholestérol 48 heures post-infection.

Plusieurs données précédentes ont attiré notre attention plus particulièrement sur la gp64. Afin de préciser les interactions possibles entre la gp64 et le cholestérol, plusieurs expériences ont été faites afin de déterminer si la gp64 est synthétisée et acheminée à la membrane plasmique de la cellule en absence de cholestérol. Malheureusement, les analyses en cytométrie, immunobuvardage, immunomarquage à l'or colloïdal et immunoperoxydase n'ont pas donné de résultat puisque l'anticorps dirigé contre la gp64 qui nous a été fourni ne semblait pas reconnaître cette glycoprotéine, et ce, même à des dilutions très faibles.

Étant donné le manque de résultats concernant la gp64, seules des hypothèses basées sur la littérature peuvent être exposées ici.

Ainsi, puisque la littérature rapporte que la gp64 est essentielle au bourgeonnement des nouveaux virions et de leur infectiosité (Monsma, Oomens et Blissard, 1996), il semblerait que, lors de nos expériences, la gp64 soit synthétisée en absence de cholestérol puisqu'il y a sortie de nouveaux virus infectieux après une transfection en absence de cholestérol. En plus de permettre la sortie virale, la gp64 serait impliquée dans l'attachement des virus aux récepteurs de la cellule hôte et à la fusion endosomiale (Blissard et Wenz, 1992; Markocic *et al.*, 1998; Hefferon *et al.*, 1999). Puisque les virus se sont avérés infectieux dans un milieu contenant du cholestérol, il faut en déduire que les virus ont acquis la gp64. Cependant, ces virus ne sont pas en mesure d'infecter les cellules environnantes lorsqu'ils sont dans un milieu sans cholestérol ce qui suggère fortement que la gp64 interagirait avec le cholestérol au cours des premières étapes de l'infection virale, et en conséquence, de l'amplification virale.

Comme discuté précédemment, nos travaux ont démontré que le cholestérol s'insère dans les membranes des cellules. Le microscopie à fluorescence a permis de déterminer que le cholestérol, ajouté aux cellules, est

distribué de moins en moins uniformément sur la membrane plasmique plus le temps de contact est prolongé. Cette observation suggère que le cholestérol formerait des micro-domaines « rafts » à la surface des cellules. Il a, en effet, été démontré qu'il y a présence de « rafts » chez les cellules d'insectes (Rietveld *et al.*, 1999). Puisque les cellules d'insectes survivent en absence de cholestérol, il se pourrait que les micro-domaines « rafts » ne soient pas essentiels à ces cellules et qu'elles possèderaient des structures alternatives en absence de cholestérol (Lu, Xiong et Silver, 2002). Le cholestérol s'insérerait dans les membranes cellulaires pour former des sites riches en cholestérol et en sphingolipides (Simons et Ikonen, 2000). Ces micro-domaines pourraient jouer un rôle déterminant dans l'infection virale en agissant de façon directe ou indirecte. Des études effectuées avec le HIV-1 ont démontré que la liaison de la gp120-CD4 menait en une redistribution des micro-domaines « rafts » et que le cholestérol contenu dans les « rafts » était essentiel au recrutement de la glycoprotéine permettant la fusion virale (Mañes *et al.*, 2000). Il a également été démontré que le peptide de fusion du polypeptide E1 du SFV est fortement associé aux micro-domaines « rafts » composés de cholestérol et de sphingolipides (Ahn, Gibbons et Kielian, 2002). Ainsi, la présence de cholestérol dans la membrane plasmique de la cellule hôte, formant potentiellement des micro-domaines « rafts », pourrait être essentiel au recrutement des récepteurs cellulaires qui permettent la reconnaissance du virus et ainsi, l'attachement viral. D'autre part, puisque le cholestérol peut avoir un effet sur le changement de conformation des protéines de surface (Mutara *et al.*, 1995), le cholestérol pourrait agir directement en induisant la conformation adéquate du récepteur cellulaire pour qu'il y ait attachement du virus ou qu'il y ait fusion.

Nos travaux ont donc permis d'établir que le cholestérol seul est suffisant à l'atteinte d'une infection baculovirale normale et complète en s'insérant dans les membranes de la cellule. Ce cholestérol occuperait un rôle direct ou indirect dans l'attachement du virus à la cellule hôte et/ou à la fusion endosomiale. Par

contre, le cholestérol ne semblerait pas jouer de rôle dans la synthèse des virus et dans la sortie virale.

Plusieurs hypothèses quant au mode d'action du cholestérol lors des premières interactions du virus avec la cellule ont été émises. Le cholestérol, étant responsable de la fluidité membranaire, pourrait agir en augmentant la rigidité des membranes ou en modifiant la courbure membranaire (Chernomordik *et al.*, 1995). La formation de micro-domaines « rafts » pourrait avoir une grande importance en concentrant les récepteurs cellulaires et en recrutant les protéines de signalisation (Schmidt *et al.*, 1999). Il a d'ailleurs été démontré que la liaison du virus à son récepteur est fortement dépendante de la quantité de cholestérol contenu dans les membranes cellulaires (Gimpl, Burger et Fahrenholz, 1997). Le cholestérol pourrait aussi agir directement avec les récepteurs cellulaires en modifiant leur conformation (Mutara *et al.*, 1995).

Finalement, puisque le cholestérol entre dans la formation des micro-domaines « rafts » et que ces derniers ont très peu été étudiés chez les cellules d'insectes, il serait intéressant de vérifier si le cholestérol, ajouté aux cellules adaptées à l'absence de lipide, entraîne la formation de « rafts ». Des extractions, à l'aide de Triton X-100 à 4°C, jumelées à des expériences de flottaison sur gradients pourraient permettre d'isoler les membranes contenant ces micro-domaines si tel est le cas.

CONCLUSION

Notre système cellulaire dépourvu de sérum de veau fœtal (Sf9 MM8-SF), maintenu sur plus de 600 passages, permet de supporter la réplication des NPV par simple ajout de cholestérol. Nos travaux ont démontré que le cholestérol s'insère dans les membranes des cellules et forme des agrégats dans la membrane plasmique qui ont l'apparence de micro-domaines « rafts ». Cet ajout de cholestérol permet une production virale plus efficace que l'ajout de sérum de veau fœtal ou de suppléments lipidiques commerciaux qui sont couramment utilisés pour la production de virus en système cellulaire. Ce résultat ouvre la porte à l'utilisation à grande échelle du cholestérol pour la production de bioinsecticides ou de protéines recombinantes dans les cellules d'insectes puisque le cholestérol a l'avantage d'être peu coûteux, simple d'utilisation, tout en étant pur. De plus, nous avons démontré qu'un simple ajout ponctuel de cholestérol est suffisant pour obtenir une infection virale optimale. Le maintien constant des cellules Sf9 MM8-SF dans le cholestérol ne semble apporter aucun autre avantage. Ce dernier point permet d'envisager une méthode plus économique.

Nos travaux ont démontré que le cholestérol serait impliqué dans les premières interactions du virus avec la cellule. La présence de cholestérol dans les membranes pourrait jouer un rôle dans le changement de conformation des récepteurs cellulaires, ou dans leur recrutement, permettant l'attachement du virus à la cellule. Le cholestérol pourrait aussi être essentiel à la fusion des membranes virales et cellulaires. Le cholestérol n'occuperait pas de rôle dans la réplication du virus, dans la synthèse de nouveaux virus ainsi que dans leur sortie de la cellule hôte, puisqu'il y a présence de virus infectieux produits dans notre système cellulaire en absence de tout supplément lipidique, par transfection. L'amplification de l'infection nécessite, par contre, un ajout de cholestérol confirmant que celui-ci est nécessaire pour les premières étapes d'interaction du virus avec la cellule.

Ces données ont permis de mieux cibler le rôle du cholestérol dans l'infection virale et de démontrer son importance. Des études concernant la relation du cholestérol avec la gp64, qui est la glycoprotéine principalement responsable de l'attachement du virus à la cellule et de la fusion membranaire, devrait faire suite à ces travaux puisque les résultats obtenus au cours de ce projet, ainsi que la littérature, suggère fortement une interaction de ces deux molécules.

De plus, l'insertion du cholestérol dans les membranes semble former des micro-domaines « rafts ». Il serait important de confirmer cette hypothèse puisque cette structure membranaire joue un rôle dans le recrutement des récepteurs cellulaires et pourrait occuper un rôle majeur dans l'infection baculovirale.

BIBLIOGRAPHIE

AGATHOS, S.N. 1991. «Mass Production of Viral Insecticides». In K. Maramorosch (Ed.). Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors. CRC Press, London, 1991, p. 217-235.

AHN, A., R.J. Schoepp, D. Sternberg et M. Kielian. 1999. «Growth and Stability of a Cholesterol-Independent Semliki Forest Virus Mutant in Mosquitoes». Virology, vol. 262, p. 452-456.

AHN, A., D.L. Gibbons et M. Kielian. 2002. «The Fusion Peptide of Semliki Forest Virus Associates with Sterol-Rich Membrane Domains». Journal of Virology, vol. 76, no.7, p.3267-3275.

ALBERTS, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J.D. Watson. 1995. Biologie moléculaire de la cellule, troisième édition, Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1294 pages.

AYRES, M.D., S.C. Howard, J. Kuzio, M. Lopez-Ferber et R.D. Possee. 1994. «The complete DNA Sequence of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus». Virology, vol. 202, p. 586-605.

BELLONCIK, S., W.E. Akoury et M. Cheroutre. 1997. «Importance of Cholesterol for Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) Replication in Cell Cultures Adapted to Serum-Free Medium». In K. Maramorosch et J. Mitsuhashi (Ed.) Invertebrate cell culture: Novel directions and biotechnology applications. Science Publishers Inc., p. 141-147.

BLISSARD, G.W. et G.F. Rohrmann. 1989. «Location, Sequence, Transcriptional Mapping, and Temporal Expression of the gp64 Envelope Glycoprotein Gene of the *Orgyia pseudotsugata* Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus». Virology, vol. 170, p. 537-555.

BLISSARD, G.W. et G.F. Rohrmann. 1990. «Baculovirus Diversity And Molecular Biology». Annu. Rev. Entomol., vol. 35, p. 127-155.

BLISSARD, G.W. et J.R. Wenz. 1992. « Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion». Journal of Virology, vol. 66, no. 11, p. 6829-6835.

BRAUNAGEL, S.C. et M.D. Summers. 1994. «*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, PDV, and ECV Viral Envelopes and Nucleocapsids : Structural Proteins, Antigens, Lipid and Fatty Acid Profiles». Virology, vol. 202, p. 315-328.

BRAUNAGEL, S.C., D.M. Elton, H. Ma et M.D. Summers. 1996. «Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope : ODV-E56». Virology, vol. 217, no. 1, p. 97-110.

BURAND, J.P. 1999. «Nonoccluded baculoviruses». In A. Granoff et R.G. Webster (Eds.). Encyclopedia of Virology. Second Edition, vol. 2. San Diego, California : Academic Press Limited, p. 1031-1034.

CHATTERJEE, P.K., M. Vashishtha et M. Kielian. 2000. «Biochemical Consequences of a Mutation That Controls the Cholesterol Dependence of Semliki Forest Virus Fusion». Journal of Virology, vol. 74, no. 4, p. 1623-1631.

CHERNOMORDIK, L., E. Leikina, M.-S. Cho et J. Zimmerberg. 1995. «Control of Baculovirus gp64-Induced Syncytium Formation by Membrane Lipid Composition». Journal of Virology, vol. 69, no. 5, p. 3049-3058.

CLAUS, J.D., G.E. Remondetto, S.A. Guerrero, A.M. Demonte, M. Murguía et A.J. Marcipar. 1993. «*Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus replication in serum-free and serum-reduced insect cell cultures». Journal of Biotechnology, vol. 31, p. 1-15.

CLEVERLEY, D.Z., H.M. Geller et J. Lenard. 1997. «Characterization of Cholesterol-Free Insect Cells Infectible by Baculoviruses: Effects of Cholesterol on VSV Fusion and Infectivity and on Cytotoxicity Induced by Influenza M2 Protein». Experimental Cell Research, vol. 233, p. 288-296.

CLAYTON, R.B. 1964. «The utilization of sterols by insects». J. Lipid Res., vol. 5, p. 3-19.

CORVER, J., L. Moesby, R.K. Erukulla, K.C. Reddy, R. Bittman et J. Wilschut. 1995. « Sphingolipid-Dependent Fusion of Semliki Forest Virus with Cholesterol-Containing Liposomes Requires both the 3-Hydroxyl Group and the Double Bond of the Sphingolipid Backbone ». Journal of Virology, vol. 69, no. 5, p. 3220-3223.

DE KRUIJFF, B. 1987. «Polymorphic Regulation of Membrane Lipid Composition». Nature, vol. 329, p. 587-588.

EIDELMAN, O., R. Schlegel, T.S. Tralka et R. Blumenthal. 1984. «pH-dependent fusion induced by Vesicular Stomatitis virus glycoprotein reconstituted into phospholipid vesicles». J. Biol. Chem., vol. 259, p. 4622-4628.

GIMPL, G., K. Burger et F. Fahrenholz. 1997. «Cholesterol as Modulator of Receptor Function». Biochemistry, vol. 36, p. 10959-10974.

GOH, D.K.S. 1993. «Identification and immunocharacterization of a 25K structural protein in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV)». Virus Research, vol. 28, p. 141-152.

GOODWIN, R.H., J.L. Vaughn, J.R. Adams et S.J. Louloudes. 1970. «Replication of a nuclear polyhedrosis virus in an established insect cell line». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 16, no. 2, p. 284-288.

GOODWIN, R.H. et J.R. Adams. 1978. «Serum Free Media for Nutritional Analysis and Viral Replication in Lepidopteran Insect Cells». In Vitro, vol. 14, p. 351.

GOODWIN, R.H. et J.R. Adams. 1980a. «Liposome Incorporation of Factors Permitting Serial Passage Of Insect Viruses in Lepidopteran Cells Grown in Serum-Free Medium». In Vitro, vol. 16, p. 222.

GOODWIN, R.H. et J.R. Adams. 1980b. «Nutrient factors influencing viral replication in serum-free insect cell line culture». In Invertebrate System in Vitro, E. Kurstak, K. Maramorosch et D. Dubendorfer (Eds) Elsevier / North Holland Biomed. Press, Amsterdam, p. 493-509.

GOODWIN, R.H. 1990. «Lipid Cell Culture Supplements». Nature, vol. 347, p. 209-210.

GRACE T.D.C. 1962. «Establishment of Four Strains of Cells from Insect Tissues Grown *In Vitro*». Nature, vol. 195, 788-789.

GROSS, C.H., R.L. Russell et G.F. Rohrmann. 1994. «*Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes : analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure». Journal of General Virology, vol. 75, p. 115-1123.

GUERRERO, C.A., S. Zárate, G. Corkidi, S. López et C.F. Arias. 2000. «Biochemical Characterization of Rotavirus Receptors in MA104 Cells». Journal of Virology, vol. 74, no. 20, p. 9362-9371.

HEFFERON, K.L., A.G.P. Oomens, S.A. Monsma, C.M. Finnerty et G.W. Blissard. 1999. «Host Cell Receptor Binding by Baculovirus GP64 and Kinetics of Virion Entry». Virology, vol. 258, p. 455-468.

HINK, W.F. 1970. «Established Insect Cell Line from the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*». Nature, vol. 226, p.466-467.

HINK, W.F., E.M. Strauss et D.E. Lynn. 1977. «Growth of TN-368 Insect Cell in Serum-Free Media». In Vitro, vol.13, p. 177.

HONG, T., S.C. Braunagel et M.D. Summers. 1994. «Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66 : a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus». Virology, vol. 204, no. 1, p. 210-222.

KÄRBER, G. 1931. «Bertrag zur Kollecven Behandlung Pharmakologischer Reihenversuch». Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., vol. 162, p. 480-483.

KELLER, P. et K. Simons. 1998. «Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin». J. Cell Biol., vol. 140, p. 1357-1367.

KIELIAN, M. et A. Helenius. 1984. «Role of cholesterol in fusion of Semliki Forest virus with membranes». Journal of Virology, vol. 52, no. 1, p. 281-283.

KIELIAN M. et S. Jungerwirth. 1990. «Mechanisms of Enveloped Virus Entry into Cells». Mol. Biol. Med., vol. 7, p. 17-31.

KIELIAN, M., P.K. Chatterjee, D.L. Gibbons et Y.E. Lu. 2000. In Hiderson et Fuller (Ed.). Subcellular Biochemistry, volume 34 : Fusion of Biological Membranes and Related Problems. Chapter 11 : Specific Roles for Lipids in Virus Fusion and Exit. Examples from the Alphaviruses. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, p. 409-455.

KOIKE, M. et K. Sato. 1988. «Culture of Insect Cell Lines Originated from *Mamestra brassicae* with Autoclaved Serum-Free Medium». In Y. Kuroda, E. Kurstak et K. Maramorosch (Eds.). Invertebrate and fish tissue culture. New York : Springer-Verlag, p. 7-10.

LANGE, Y. 1991. «Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts». J. Lipid Res., vol. 32, no. 2, p. 329-339.

LU, A et E.B. Carstens. 1992. «Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p80 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus : a homologue of the *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus capsid-associated gene». Virology, vol. 190, no. 1, p. 201-209.

LU, Y.E., T. Cassese et M. Kielian. 1999. «The Cholesterol Requirement for Sindbis Virus Entry and Exit and Characterization of a Spike Protein Region Involved in Cholesterol Dependence». Journal of virology, vol. 73, no. 5, p. 4272-4278.

LU, Y.E. et M. Kielian. 2000. «Semliki Forest Virus Budding : Assay, Mechanisms, and Cholesterol Requirement». Journal of Virology, vol. 74, no. 17, p. 7708-7719.

LU, X., Y. Xiong et J. Silver. 2002. « Asymmetric Requirement for Cholesterol in Receptor-Bearing but Not Envelope-Bearing Membranes for Fusion Mediated by Ecotropic Murine Leukemia Virus». Journal of Virology, vol. 76, no. 13, p. 6701-6709.

LUCKOW, V.A. et M.D. Summers. 1988. «Trends in the Development of Baculovirus Expression Vectors». BIO/TECHNOLOGY, vol. 6, p. 47-55.

LUUKKONEN, A., M. Brummer-Korvenkontio et O. Renkonen, 1973. «Lipids Cultured Mosquito Cells (*Aedes albopictus*). Comparaison with Cultures Mammalian Fibroblasts (BHK 21 Cells)». Biochimica et Biophysica Acta, vol. 326, p. 256-261.

MAÑES, S., G. del Real, R.A. Lacalle, P. Lucas, C. Gómez-Moutón, S. Sánchez-Palomino, R. Delgado, J. Alcamí, E. Mira et C. Martínez-A. 2000. « Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection ». EMBO, vol. 1, no. 2, p. 190-196.

MARANGA, L., A.S. Coroadinha et M.J. Carrondo. 2002. «Insect cell culture medium supplementation with fetal bovine serum and bovine serum albumin: effects on baculovirus adsorption and infection kinetics». Biotechnol. Prog., vol.18, no. 4, p. 855-61.

MARKOVIC, I., H. Pulyaeva, A. Sokoloff et L.V. Chernomordik. 1998. «Membrane Fusion Mediated by Baculovirus gp64 Involves Assembly of Stable gp64 Trimers into Multiprotein Aggregates». J. Cell Biol., vol. 143, no. 5, p. 1155-1166.

MARHEINEKE, K., S. Grünwald, W. Christie et H. Reiländer. 1998. «Lipid Composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection». FEBS Letters, vol. 441, p. 49-52.

MARQUARDT, M.T., T. Phalen et M. Kielian. 1993. «Cholesterol Is Required in the Exit Pathway of Semliki Forest Virus». The Journal of Cell Biology, vol. 123, no. 1, p.57-65.

MATLIN, K. S., H. Reggio, A. Helenius et K. Simons. 1982. « Pathway of Vesicular Stomatitis virus entry leading to infection ». J. Mol. Biol., vol. 156, p. 609-631.

MICHAUD, Jean-François. 2001. « Réplication de baculovirus sauvage et recombinant dans un système cellulaire en absence de sérum de veau foetal (SVF) ». Mémoire de maîtrise, Québec, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, 168p.

MILLER, L.K. 1988. «Baculoviruses as Gene Expression Vectors». Ann. Rev. Microbiol., vol. 42, p. 177-199.

MILTENBURGER, H.G., 1983. «Investigations on the Cultivation of Insect Cell Lines in Serum-Free Media». In Hormonally Defined Media; A Tool in Cell Biology Lectures and Posters presented at the First European Conference on Serum-free Cell Culture. Heidelberg, October 7-9, 1982, pp 455. Eds. : G. Fisher et R.J. Wieser. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

MITSUHASHI, J. 1982. «Continuous Cultures of Insect Cell Lines in Media Free of Sera». Appl. Entomol. Zool., vol. 17, p. 575-581.

MITSUHASHI, J., S. Nakasone et Y. Horie. 1983. «Sterol-Free Eukaryotic Cells from Continuous Cell Lines of Insects». Cell Biology International Reports, vol. 7, no.12, p. 1057-1062.

MITSUHASHI, J. 1989. «Simplified Medium (MTCM-1601) for Insect Cell Lines». Journal of Tissue Culture Methods, vol. 12, no. 3, p. 21-22.

MITSUHASHI, J. et R.H. Goodwin. 1989. «The serum-free culture of insect cells *in vitro*». In J. Mitsuhashi (Ed.). Invertebrate cell system applications. Volume I. Boca Raton, Florida : CRC Press, p. 31-43.

MOESBY, L., J. Corver, R.K. Erukulla, R. Bittman et J. Wilschut. 1995. « Sphingolipids Activate Membrane Fusion of Semliki Forest Virus in a Stereospecific Manner ». Biochemistry, vol. 34, no. 33, p.10319-10324.

MONSMA, S.A., A.G.P. Oomens et G.W. Blissard. 1996. « The GP64 Envelope Fusion Protein Is an Essential Baculovirus Protein Required for Cell-to-Cell Transmission of Infection». Journal of Virology, vol. 70, no. 7, p. 4607-4616.

MORI, H., H. Nakazawa, N. Shirai, N. Shibata, M. Sumida et F. Matsubara. 1992. «Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range». Journal of General Virology, vol. 73, p. 1877-1880.

MURPHY, F.A., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo et M.D. Summers (Eds.). 1995. Virus Taxonomy : Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology / Supplement 10. Wien, New York : Springer-Verlag.

MUTARA, M., J. Peränen, R. Schreiner, F. Wieland, T.V. Kurzchalia et K. Simons. 1995. «VIP21 / caveolin is a cholesterol-binding protein». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, p. 10339-10343.

NES, W.R. et M.L. McKean. 1977. «Occurrence, physiology, and ecology of sterols». In W.R. Nes et M.L. McKean (Éd.). Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids. University Park Press, Baltimore, MD. P. 411-533.

NGUYEN, D.H. et J.E.K. Hildreth. 2000. «Evidence for Budding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Selectively from Glycolipid-Enriched Membrane Lipid Rafts». Journal of Virology, vol. 74, no. 7, p. 3264-3272.

NIEVA, J.L., R. Bron, J. Corver et J. Wilschut. 1994. «Membrane fusion of Semliki Forest virus requires sphingolipids in the target membrane». The EMBO Journal, vol. 13, no. 12, p. 2797-2804.

OOMENS, A.G.P., S.A. Monsma et G.W. Blissard. 1995. «The baculovirus GP64 envelope fusion protein: synthesis, oligomerization, and processing». Virology, vol.1, no.2, p. 592-603.

OOMENS, A.G.P. et G.W. Blissard. 1999. «Requirement for GP64 to Drive Efficient Budding of *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus». Virology, vol. 254, p. 297-314.

PEARSON, M.N., R.L.Q. Russell, G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1988. «p39, a Major Baculovirus Structural Protein : Immunocytochemical Characterization and Genetic Location». Virology, vol. 167, p. 407-413.

PEARSON M.N. et G.F. Rohrmann. 2002. «Transfer, Incorporation, and Substitution of Envelope Fusion Proteins among Members of the *Baculoviridae*, *Orthomyxoviridae*, and *Metaviridae* (Insect Retrovirus) Families». Journal of Virology, vol. 76, no.11, p. 5301-5304.

PHALEN, T. et M. Kielian. 1991. «Cholesterol Is Required for Infection by Semliki Forest Virus». Journal of Cell Biology, vol. 112, no. 4, p. 615-623.

QUANT-RUSSELL, R.L., M.N. Pearson, G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1987. «Characterization of Baculovirus p10 Synthesis Using Monoclonal Antibodies». Virology, vol. 160, p. 9-19.

RIETVELD, A., S. Neutz, K. Simons et S. Eaton. 1999. «Association of Sterol- and Glycosylphosphatidylinositol-linked Proteins with *Drosophila* Raft Lipid Microdomains». The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 17, p. 12049-12054.

RÖDER, A. 1982. «Development of a Serum-Free Medium for Cultivation of Insect Cells». Naturwissenschaften, vol. 69, p. 92-93.

ROHRMANN, G.F. 1986. «Review article : Polyhedrin Structure». Journal General of Virology, vol. 67, p. 1499-1513.

ROHRMANN, G.F. 1992. «Review article : Baculovirus Structural Proteins». Journal General of Virology, vol. 73, p. 749-761.

ROOS, D.S., C.S. Duchala, C.B. Stephensen, K.V. Holmes et P.W. Choppin. 1990. «Control of Virus-Induced Cell Fusion by Host Cell Lipid Composition». Virology, vol. 175, p. 345-357.

ROUSSO, I., M.B. Mixon, B.K. Chen et P.S. Kim. 2000. «Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 97, no. 25, p. 13523-13525.

RUSSELL, R.L. et G.F. Rohrmann. 1990. «A Baculovirus Polyhedron Envelope Protein : Immunogold Localization in Infected Cells and Mature Polyhedra». Virology, vol. 174, p. 177-184.

RUSSELL, R.L.Q., M.N. Pearson et G.F. Rohrmann. 1991. «Immunoelectron microscopic examination of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cells : time course and localization of major polyhedron-associated proteins». Journal of General Virology, vol. 72, p. 275-283.

SCHEIFFELE, P, M.G. Roth et K. Simons. 1997. «Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain». EMBO Journal, vol. 16, no. 18, p. 5501-5508.

SCHEIFFELE, P., A. Rietveld, T. Wilk et K. Simons. 1999. «Influenza Viruses Select Ordered Lipid Domains during Budding from the Plasma Membrane». J. Biol. Chem., vol. 274, no. 4, p.2038-2044.

SCHMIDT, A., M. Wolde, C. Thiele, W. Fest, H. Kratzin, A.V. Podtelejnikov, W. Witke, W.B. Huttner et H.-D. Söling. 1999. «Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid». Nature, vol. 401, p. 133-141.

SILBERKANG, M., C.M. Havel, D.S. Friend, B.J. McCarthy et J.A. Watson. 1983. «Isoprene Synthesis in Isolated Embryonic *Drosophila* Cells». J. Biol. Chem., vol. 258, no. 13, p.8503-8511.

SIMONS K. et E. Ikonen. 2000. «How Cells Handle Cholesterol». Science, vol. 290, p. 1721-1726.

SMIT, J.M, R. Bittman et J. Wilschut. 1999. «Low-pH-dependent Fusion of Sindbis Virus with Receptor-Free Cholesterol- and Sphingolipid - Containing Liposomes». Journal of Virology, vol. 73, no.10, p. 8476-8484.

SUMMERS, M.D. 1977. Baculoviruses (Baculoviridae). The Atlas of Insects and Plant Viruses Including Mycoplasma Viruses and Viroids. Academic Press Inc. p. 3-27.

SVOBODA, J.A., J.N. Kaplanis, W.E. Robbins et M.J. Thompson. 1975. «Recent Developments in Insect Steroid Metabolism». Annu. Rev. Entomol., vol. 20, p. 205-220. Review.

TABAS, I. 1997. «Free cholesterol-induced cytotoxicity. A possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions». Trends Cardiovasc. Med., vol. 7, p. 256-263.

TANI, H, M. Nishijima, H. Ushijima, T. Miyamura et Y. Matsuura. 2001. «Characterization of Cell-Surface Determinants Important for Baculovirus Infection». Virology, vol. 279, p. 343-353.

TOWNSEND, D., H.M. Jenkin et T.K. Yang. 1972. «Lipid Analysis of *Aedes aegypti* Cells Cultivated *In Vitro*». Biochimica et Biophysica Acta, vol. 260, p. 20-25.

VASHISHTHA, M., T. Phalen, M.T. Marquardt, J.S. Ryu et A.C. Hg. 1998. «A Single Point Mutation Controls the Cholesterol Dependence of Semliki Forest Virus Entry and Exit». The Journal of Cell Biology, vol. 140, no. 1, p. 91-99.

VAUGHN, J.L., R.H. Goodwin, G.J. Tompkins et P. McCawley. 1977. «The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera;Noctuidae) ». In Vitro, vol. 13, no. 4, p. 213-217.

VIALARD, J.E. et C.D. Richardson. 1993. «The 1,629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein». Journal of Virology, vol. 67, no. 10, p. 5859-5866.

VOLKMAN, L.E., P.A. Goldsmith, R.T. Hess et P. Faulkner. 1984. «Neutralization of Budded *Autographa californica* NPV by a Monoclonal Antibody : Identification of the Target Antigen». Virology, vol. 133, p. 354-362.

VOLKMAN, L.E. et P.A. Goldsmith. 1985. «Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody : inhibition of entry by absorptive endocytosis». Virology, vol. 143, p. 185-195.

VOLKMAN, L.E. et D.L. Knudson. 1988. «*In Vitro* Replication of Baculoviruses.» In A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. M.D. Summers et G.E. Smith (Eds.). Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no. 1555, chapitre 5, p.109-127.

WEISS, S.A. et J.L. Vaughn. 1986. «Cell culture methods for large-scale propagation of baculoviruses». In The biology of Babuloviruses, vol. II Practical Application for Insect Control. Granados et Federici, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., p. 63-87.

WHITE, J. et A. Helenius. 1980. «pH-dependent fusion between the Semliki Forest virus membrane and liposomes». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 77, no. 6, p. 3273-3277.

WHITE, J., K. Matlin et A. Helenius. 1981. «Cell fusion by Semliki Forest, influenza, and vesicular stomatitis viruses». The Journal of Cell Biology, vol. 89, no. 3, p. 674-679.

WICKHAM, T.J., R.R. Granados, H.A. Wood, D.A. Hammer et M.L. Shuler. 1990. «General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces». Biophys. J. , vol. 58, no. 6, p. 1501-1516.

WILKIE, G.E.I., H. Stockdale et S.V. Pirt. 1980. «Chemically-Defined Media for Production of Insect Cells and Viruses *In Vitro*». Dev. Biol. Stand., vol. 46, p.29-37.

WOLGAMOT, G.M., C.H. Gross, R.L. Russell et G.F. Rohrmann. 1993. «Immunocytochemical characterization of p24, a baculovirus capsid-associated protein». Journal of General Virology, vol. 74, no. 1, p. 103-107.

YANG, T.K., E. McMeans, L.E. Anderson et H.M. Jenkin. 1976. «Neutral Lipid Composition of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* Cells at Two Phases of Growth». Lipids, vol. 11, no. 1, p.21-27.

YEH, L.H.P., R.K. Bajpai et G.Y. Sun. 1997. «Membrane Lipid Metabolism and Phospholipase Activity in Insect *Spodoptera frugiperda* 9 Ovarian Cells». Lipids, vol. 32, no. 5, p. 481-487.

ANNEXE I

Milieu Grace + 10% SVF

(Pour 500 ml)

Mélanger les solutions suivantes :

- 500 ml de milieu Grace pour la culture de cellules d'insectes, Sigma, #G-8142;
- 10 ml de lactalbumine hydrolysate 1X (0,033 g au total) préparé à partir du lactalbumine hydrolysate en poudre, Sigma, #L-9010;
- 50 ml de sérum de veau foetal (SVF), Gibco BRL, #16140-071;
- 5 ml de L-glutamine 200 mM (2 mM final), Gibco BRL, #25030-149;
- 1 ml de pénicilline-streptomycine 10 000 µg/ml (20 µg/ml final), Gibco BRL, #15140-148.

Ajuster le pH à 6,18 - 6,20 à l'aide de NaOH 1N ou de HCl 1N.

Conserver à 4°C.

ANNEXE II

Milieu de culture MM8-SF

(Pour 1L)

Dissoudre les composés suivants dans 916 ml d'eau déionisée :

- 7 g de chlorure de sodium (NaCl), Fisher Scientific, #S271-1;
- 0,2 g de chlorure de potassium (KCl), Sigma, #P-4504;
- 0,1 g de chlorure de magnésium ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Fisher Scientific, #M33-500;
- 0,2 g de chlorure de calcium dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Fisher Scientific, #C79-500;
- 4 g de D-(+)-glucose anhydre, Sigma, #G-7021.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes et laisser refroidir.

Ajouter stérilement les composantes suivantes :

- 39,04 ml de lactalbumine hydrolysate 50X (6,5 g au total) préparé dans de l'eau à partir du lactalbumine hydrolysate en poudre, Sigma, #L-9010;
- 30,03 ml de solution yeastolate 50X (5 g au total), Gibco BRL, #18190-041;
- 15 ml de pluronique F-68 10% (0,15% final), Sigma, #P-5556.

Ajouter 2 ml de pénicilline-streptomycine 10 000 µg/ml (20 µg/ml final), Gibco BRL, #15140-148.

Ajuster le pH à 6,18 – 6,20 à l'aide de NaOH 1N ou de HCl 1N.

Conserver à 4°C.

ANNEXE III

Diète artificielle d'élevage de larves de *Galleria mellonella*

- Faire gonfler 50 g de levure sèche active de Lalman dans 400 ml d'eau à 40 - 43°C.
- Faire fondre 900 g de miel au four micro-ondes.
- Y ajouter 880 g de glycérol, Sigma, #G-5150.
- Ajouter à la levure gonflée, tout en mélangeant :
 - 1100 g de Pablum pour bébé (céréales mélangées);
 - 250 g de farine de maïs.
- Mélanger en alternance un peu d'ingrédients secs (levure, Pablum, farine de maïs) à un peu de mélange miel-glycérol.
- Bien pétrir et façonner de petites boules de diète d'environ 4 cm de diamètre.
- Envelopper de papier d'aluminium et congeler à -20°C.
- Décongeler et réfrigérer quelques jours ou heures avant utilisation.

ANNEXE IV

Liste des produits non détaillés dans le chapitre : matériel et méthodes

Microscopie électronique :

- Glutaraldéhyde 2,5% de Mecalab, #1156
- Tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2, d'Electron Microscopy Science, #12300
- Sucrose de BDH, #ACS888
- Tétroxyde d'osmium (OsO_4) de Mecalab, #1615
- Tampon collidine de M.E.C.A., #2015
- Résine SPURR de Mecalab, #3165
- Acétate d'uranyl d'Electron Microscopy Science, #22400
- Citrate de plomb de LADD Research, #23603

Dissolution de polyèdres :

- Carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) de Sigma, #S-2127
- Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) de Sigma, #S-5761

Coloration Buffalo Black :

- Naphtol Blue Black en poudre de Sigma, #N-3393
- Méthanol 100%
- Acide acétique glacial de Fisher Scientific, #A38S-225

