

Université du Québec  
**Institut national de la recherche scientifique**  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Identification et caractérisation du gène p10 et de la protéine P10 du granulo­virus  
de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) : Production d'anticorps anti-P10 par  
immunisation classique et par immunisation génétique**

Par  
**Myriam Jean**

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

Jury d'évaluation

Dr Maximilien Arella , président du jury et examinateur interne  
Dr Clément Couture, examinateur externe  
Dr Claude Guertin, directeur de recherche  
Dr Abderrazzak Merzouki, codirecteur de recherche

Septembre 2003

© droits réservés de Myriam Jean, 2003

*À mon papa, à ma maman,  
à mon frère,  
à ma nièce Mikayla*

## Résumé

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens), est un insecte ravageur des forêts de conifères en Amérique du Nord. En période épidémique, cet insecte entraîne d'importantes pertes économiques dans le domaine forestier. Dans le but de diversifier les outils disponibles dans la lutte biologique contre cet insecte, notre laboratoire envisage dans un projet d'envergure l'utilisation, comme biopesticide, d'un baculovirus appelé le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV).

La protéine P10 est une protéine majeure des baculovirus qui semble jouer un rôle dans la pathogenèse associée à l'infection aux baculovirus. Dans ce projet de recherche, nous avons montré la présence du gène codant pour la protéine P10 chez le génome du ChfuGV. Le gène p10 localisé sur le brin antisens du génome viral est juste en aval, mais dans le sens opposé, du gène p74.

L'analyse de la séquence nucléotidique et de la séquence déduite en acides aminés du gène p10 nous a permis de confirmer l'identité de ce dernier. Cette identification a été réalisée grâce à la présence et à la disposition particulière, dans la région N terminale, de résidus amino-acides hydrophobes (motif hepta) qui sont impliqués dans la formation d'une structure fonctionnelle en superhélice caractérisant les protéines P10 des baculovirus. Les études comparatives des séquences en acides aminés des protéines P10 de différents baculovirus suggèrent des homologues fonctionnelles de ce domaine.

L'utilisation des systèmes d'expression procaryote (pQE32) nous ont permis de produire la protéine recombinante P 10 dans des cellules bactériennes *E. Coli* M15 (Rep4) à des concentrations atteignant 1,2 mg/L de culture. La protéine P10 a été purifiée par chromatographie d'affinité et utilisée dans les expériences d'immunisation classique de souris Balb/c pour la production des anticorps polyclonaux anti-P10. La spécificité de ces anticorps a été confirmée par immunobuvardage de type Western en utilisant la protéine recombinante P10 comme antigène.

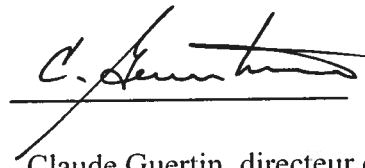
L'étude de la cinétique de production des anticorps anti-p10, à l'aide d'un test ELISA, a montré que les premiers anticorps apparaissent après la première dose de rappel, vers le 20e jour suivant l'immunisation initiale. Cette production d'anticorps a continué d'augmenter jusqu'au jour 50 (après la 3e dose de rappel) avec un titre s'approchant du  $10^6$ .

L'utilisation du système d'expression eucaryote pcDNA3, exprimant la protéine P10, pour l'immunisation génétique de souris Balb/c avait pour but initial l'exploration d'une avenue plus conviviale et moins coûteuse pour la production des anticorps anti-p10. En effet, l'immunisation des souris avec l'ADN nu (plasmide pcDNA3/p10) s'est avérée très efficace avec des titres d'anticorps dépassant les  $10^4$ . Ce titre d'anticorps anti-p10 obtenu par immunisation génétique est relativement élevé, en particulier si l'on tient compte du fait, de l'absence assurée de protéines bactériennes contaminantes.

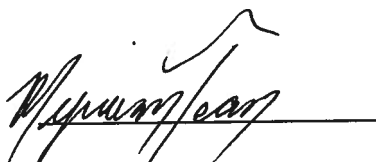
Les expériences d'immunisation nous ont également permis d'évaluer le potentiel immuno-adjuvant de l'IL-2. Contrairement à nos attentes, l'IL-2 a eu un effet inhibiteur ou ralentissant sur la production des anticorps anti-p10 lors de l'immunisation classique (protéine p10 recombinante) et lors de l'immunisation génétique (plasmide pcDNA 3/p10). Des investigations plus poussées sont nécessaires pour comprendre et expliquer la logique de ces événements.

Ce projet de recherche nous a permis de comparer la cinétique de production d'anticorps par immunisation génétique et immunisation classique. La cinétique de production d'anticorps anti-P10 est plus lente dans le cas de l'immunisation génétique (49e jour). Les premiers anticorps anti-p10 apparaissent vers le 20e jour suivant l'immunisation initiale classique. La production d'anticorps est plus faible avec l'immunisation génétique, avec des titres d'anticorps de l'ordre de  $10^4$  comparés à des titres de l'ordre de  $10^6$  avec l'immunisation classique. Il faut cependant noter qu'il y a une production variable d'anticorps (de nulle à très élevée) entre les différents individus d'un même groupe d'animaux lors de l'immunisation génétique. Ceci est probablement dû à une transfection inconstante et/ou à un échec du plasmide et des cellules transfectées à

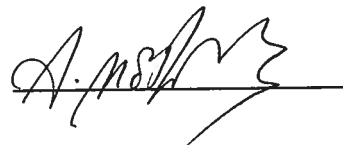
diriger la transcription et la production de la protéine recombinante P10. Il serait donc nécessaire de développer des techniques qui vont nous permettre de nous assurer d'une transfection constante et efficace permettant une production de la protéine recombinante par les cellules transfectées.



Claude Guertin, directeur de recherche



Myriam Jean, étudiante



Abderrazzak Merzouki, codirecteur de recherche

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur et mon co-directeur de projet, Dr Claude Guertin et Dr Abderrazzak Merzouki qui m'ont appris énormément et m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'aimerais également adresser mes remerciements à Monsieur Marc Henrichon, Mc.s, technicien du laboratoire du Dr Abderrazzak Merzouki avec qui j'ai eu de nombreuses discussions scientifiques qui m'ont été très profitables.

De même je voudrais exprimer toute ma gratitude à ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux de maîtrise et à la rédaction de mon mémoire.

J'aimerais remercier la Fondation Armand-Frappier pour son soutien financier et je tiens à souligner que cette recherche a été rendue possible grâce à une subvention du Ministère des ressources naturelles (0316-240S) octroyée au Dr Claude Guertin.

Finalement je voudrais exprimer toute ma reconnaissance envers mes parents, ma famille et mes amis pour leur soutien, leur encouragement et leur confiance.

## Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Introduction.....	16
Revue bibliographique.....	5
1. La tordeuse des bourgeons de l'épinette.....	6
2. Le granulovirus (GV).....	7
2.1 Classification.....	7
2.2 Morphologie et ultrastructure.....	10
2.3 Génome du granulovirus.....	11
2.4 Expression des gènes.....	11
2.5 Protéines virales.....	12
2.5.1 Protéines associées au corps d'inclusion des GV.....	12
2.5.2 Protéines associées à la nucléocapside enveloppée.....	13
2.6 Réplication du granulovirus.....	14
2.6.1 La réplication in vitro des granulovirus.....	14
2.6.2 La réplication in vivo des granulovirus.....	15
3. La protéine P10 des baculovirus.....	16
3.1 Les gènes codant pour la protéine P10.....	17
3.2 Transcription de la p10.....	18
3.3 Rôle de la protéine P10.....	19
3.4 Les domaines de la protéine p10.....	20
3.5 Production d'anticorps anti-P10 monoclonaux.....	21
4. Système d'expression.....	21
4.1 Système d'expression procaryotique.....	22
4.1.1 Bactéries.....	22
4.2 Système d'expression eucaryotique.....	23
4.2.1 Levures.....	23

4.2.2 Cellules d'insectes.....	24
4.2.3 Cellule de mammifères.....	24
5. Immunisation génétique.....	25
5.1 Historique.....	25
5.2 Mécanismes de la stimulation de la réponse immunitaire.....	26
5.2.1 La transfection directe des cellules présentatrices d'antigène .....	27
5.2.2 Induction directe par les cellules somatiques.....	27
5.2.3 Induction croisée .....	28
5.3 Facteurs modulant la réponse immunitaire .....	28
5.3.1 Le vecteur d'expression .....	28
5.3.2 Contribution des motifs immunostimulateurs cytosine-phosphate-guanine ....	29
5.4 Méthode et voies d'immunisation.....	30
5.5 Adjuvant génétique .....	30
5.5.1 Les cytokines.....	30
5.6 Comparaison entre les vaccins génétiques et traditionnels .....	33
But et objectifs .....	36
Matériel et méthodes .....	38
1. Identification du gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV.....	39
1.1 Production et purification du ChfuGV.....	39
1.2 Analyse par microscopie électronique du ChfuGV purifié.....	40
1.3 Isolation des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV.....	40
1.4 Extraction et purification de l'ADN viral du ChfuGV.....	41
1.5 Repêchage du gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV.....	42
2. Système d'expression procaryotique.....	43
2.1 Clonage du gène codant pour la protéine P10.....	43
2.1.1 Amplification par PCR du gène codant pour la protéine P10.....	43
2.1.2 Clonage du fragment d'ADN codant pour la protéine p10 dans le vecteur pCR®2.1 .....	44
2.1.3 Sous clonage du fragment du gène codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pQE32.....	48
2.2 Expression de la protéine recombinante P10 dans un système d'expression procaryotique.....	53
2.2.1 Transformation des cellules bactériennes E.coli M15(pREP4) par le plasmide recombinant pQE32/p10 .....	53
2.2.2 Cinétique d'expression de la protéine recombinante P10 par les bactéries E. coli M15 (pREP4) .....	54
2.3 Purification de la protéine recombinante P10 .....	55
2.3.1 Purification de la protéine recombinante P10 par chromatographie d'affinité	55



2.3.2	Concentration de la protéine p10 recombinante.....	58
2.3.3	Quantification de la protéine recombinante P10.....	60
3.	Système d'expression eucaryotique .....	60
3.1	Clonage du gène codant pour la protéine P10.....	61
3.1.1	Amplification par PCR du gène codant pour la protéine P10.....	61
3.1.2	Clonage du fragment codant pour la protéine p10 dans le vecteur pCR®2.1..	62
3.1.3	Sous clonage du fragment codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pcDNA3 .....	62
4.	Préparation des ADN plasmidiques à injecter aux souris Balb/c.....	66
4.1	Production en maxipréparation des plasmides recombinants pcDNA3/p10, pcDNA3, PQE32 et pcDNA3/IL-2 .....	67
4.2	Digestion des plasmides pcDNA3/p10, pcDNA3, pQE32 et pcDNA/IL-2 .....	68
5.	Immunsation des souris Balb/c .....	68
5.1	Protocole d'immunsation .....	68
5.2	Calendrier d'immunsation et prélèvements sanguins .....	69
6.	Caractérisation des anticorps anti-P10 produit par la réponse humorale.....	69
6.2	Analyse de la cinétique, de taux de production et du titre d'anticorps anti-P10 par des tests ELISA .....	71
	Résultats .....	73
1.	Identification et caractérisation du gène codant pour la protéine P10 .....	74
1.1	Séquence nucléotidique du gène codant pour la protéine P10.....	74
1.2	Séquence en acides aminés de la protéine p10.....	74
1.3	Comparaison de la protéine p10 du ChfuGV avec celles d'autres baculovirus.....	81
2.	Expression de la protéine P10 dans un système d'expression procaryotique .....	81
2.1	Clonage du fragment amplifié par PCR et contenant le gène p10 dans le plasmide pCR®2.1 et dans le vecteur d'expression pQE32.....	81
2.2	Expression de la protéine recombinant P10 dans les cellules bactériennes E.coli M15 (pREP4) .....	83
2.3.	Purification de la protéine recombinante P10 .....	88
2.3.1	Purification en conditions natives .....	88
2.3.2	Concentration et quantification de la protéine P10 recombinante purifiée.....	93
3.	Expression de la protéine P10 dans un système d'expression eucaryotique.....	93
3.1.	Clonage du fragment d'ADN amplifié contenant le gène p10 dans le plasmide pCR®2.1 et dans le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3 .....	98
4.1	Plasmides recombinants pcDNA3/p10, pcDNA3/IL2 et les plasmides pcDNA3 et pQE32 utilisés lors des expériences d'immunsation.....	99

4.2 Analyse de la spécificité des anticorps anti-P10 par immunobuvardage de type Western.....	99
4.3 Évaluation de la réponse humorale anti-P10 par ELISA .....	104
4.4 Cinétique de production des anticorps anti-P10.....	104
4.5 Évaluation des titres des anticorps anti-P10.....	120
Discussion .....	124
Conclusion.....	134
Références .....	137

## Liste des figures

Figure 1 : Le granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i> .....	8
Figure 2 : Clonage du gène p10 dans le vecteur d'expression pQE32 (Qiagen) afin d'exprimer la protéine P10 dans un système procaryote.....	49
Figure 3 : Liaison entre la queue de six résidus histidines de la protéine recombinante et l'ion de nickel de la matrice Ni-NTA.....	56
Figure 4 : Clonage du gène p10 dans le vecteur d'expression pcDNA3 (Invitrogen) afin d'exprimer la protéine P10 dans un système eucaryote.....	63
Figure 5 : Séquence nucléotidique du gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV.....	75
Figure 6 : Séquence de 104 acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV.....	77
Figure 7 : La probabilité de la présence d'un domaine en superhélice « coiled coils » dans la séquence en acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV.....	79
Figure 8 : Profil électrophorétique du fragment d'ADN de 545 pb amplifié par PCR contenant le gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV.....	84
Figure 9 : Profils électrophorétiques des plasmides recombinants contenant le gène codant pour la P10, après la digestion avec les endonucléases <i>Sph</i> I et <i>Hind</i> III .....	86
Figure 10 : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine recombinante P10 par les cellules bactériennes <i>E. Coli</i> M15 [(pREP4) (pQE32)] à différents temps d'induction par l'IPTG.....	89
Figure 11 : Analyse par SDS-PAGE de la protéine P10 purifiée par chromatographie d'affinité à partir des cultures de bactéries <i>E. coli</i> M15 [(pREP4) (pQE32/ 10)].....	91

Figure 12 : Analyse par SDS-PAGE des protéines purifiées par chromatographie d'affinité à partir des cultures de bactéries <i>E. coli</i> M15 (pREP4) transformée par le plasmide pQE32.....	94
Figure 13 : Analyse par SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western, après concentration par ultrafiltration, de la protéine recombinante P10 et des protéines bactériennes purifiées par chromatographie.....	96
..	
Figure 14 : Profil électrophorétique des plasmides recombinants pcDNA3/p10, pcDNA3/IL-2 et des plasmides pcDNA3 et pQE32.....	100
Figure 15 : Analyse par immunobuvardage de type Western de la spécificité des anticorps anti-P10 produits par immunisation classique et génétique.....	102
Figure 16 : Évaluation, par ELISA, de la réponse en anticorps suite à différentes immunisations.....	105
Figure 17 : Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à l'injection du plasmide pcDNA3 avec l'adjuvant de Freund.....	107
Figure 18 : Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/p10 sans adjuvant.....	109
Figure 19 : Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/p10 avec l'adjuvant de Freund.....	111
Figure 20 : Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à la co-injection des plasmides recombinant pcDNA3/p10 et pcDNA3/IL-2.....	113
Figure 21 : Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à l'injection de la protéine P10 recombinante avec l'adjuvant de Freund.....	115
Figure 22: Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à la co-injection de la protéine P10 recombinante et le plasmide recombinant pcDNA3/IL-2 .....	117
Figure 23 : Titre des anticorps anti-P10 dans les sérums prélevés à différents temps et en fonction des types d'immunisations.....	121

## Liste des tableaux

Tableau I : Injections des groupes de souris.....	70
Tableau II : Homologie relative entre les différentes séquences en acides aminés des protéines P10 des baculovirus.....	82

## Liste des abréviations

a.a : acide aminé

A : base déoxyadénine

AcMNPV : Multinucléopolyédrovirus d'*Autographa californica*

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

$\alpha$  : alpha

$\beta$  : bêta

BmNPV, nucléopolyédrovirus du *Bombyx mori*

$\mu$ g : microgramme

$\mu$ l microlitre

BSA : albumine sérique bovine

C : base déoxycytosine

CfNPV, nucléopolyédrovirus du *Choristoneura fumiferana*

ChfuGV : granulovirus de *Choristoneura fumiferana*

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CpGV : granulovirus du *Cyndia Pomonella*

CTL : lymphocytes T-cytotoxiques

DO : densité optique

E. Coli : *Escherichia coli*

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

ELISA : « enzyme linked immunosorbent assay »

G : base déoxyguanine

g : gramme

GP : glycoprotéine

GV : granulovirus

HaNPV : nucléopolyédrovirus du *Helicoverpa armigera*

HcNPV : nucléopolyédrovirus du *Hyphantria cunea*

IgG : immunoglobuline Gamma  
IL-2 : interleukine-2  
kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
kg: kilogramme  
LdNPV : nucléopolyédrovirus du *Lymantria dispar* L  
M: Molaire  
mg: milligramme  
ml : millilitre  
mM : millimolaire  
NK : cellules tueuses naturelles  
nm : nanomètre  
NPV : nucléopolyédrovirus  
OpNPV : nucléopolyédrovirus du *Orgyia pseudotsugata*  
Pb: paires de base  
PBS : solution saline phoshatée  
PCR : réaction en chaîne de polymérisation  
PnNPV : nucléopolyédrovirus du *Perina nuda*  
PVDF : difluorure de polyvinylidène  
PxGV : granulovirus du *Plutella xylostella*  
p/v : poids par volume  
SDS : sodium dodecyl sulfate  
SDS-PAGE: électrophorèse sur gel de polyacrylamide en presence de sodium dodecyl sulfate  
SeNPV : nucléopolyédrovirus du *Spodoptera exigua*  
SINPV : nucléopolyédrovirus du *Spodoptera litura*  
T : base désoxythymidine  
TAE : Tris acétate EDTA  
TE : Tris-HCL EDTA  
TnNPV : nucléopolyédrovirus du *Trichoplusia ni*  
UV : ultraviolet

# **Introduction**



La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens), est un insecte ravageur de plusieurs espèces de conifères au Québec. Les dommages causés aux forêts par les épidémies récurrentes de la tordeuse des bourgeons de l'épinette entraînent chaque année des pertes de plusieurs millions de dollars à l'industrie forestière canadienne (Service canadien des forêts, 2000). Pour contrer le problème, plusieurs méthodes chimiques et biologiques de lutte des populations ont été utilisées. Par contre, la réticence face à l'utilisation de pesticides chimiques et la persistance du problème des insectes ravageurs ont mené à la recherche de nouveaux outils pouvant contrôler de façon efficace et sécuritaire les populations de la tordeuse.

L'utilisation d'entomopathogènes dans la lutte contre les insectes nuisibles constitue une alternative prometteuse aux insecticides chimiques. Les baculovirus sont considérés comme des candidats de choix dans ce domaine, notamment en ce qui concerne leur aptitude à infecter spécifiquement des espèces d'insectes principalement ceux de l'ordre des lépidoptères. Le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) se présente comme une alternative intéressante pouvant minimiser les dégâts causés par la tordeuse des bourgeons de l'épinette tout en accordant une protection à la biomasse foliaire (Forté *et al.*, 1999; Guertin, 1995). Le ChfuGV possède plusieurs avantages comme biopesticide dont la production simple et facile, l'activité biologique stable et la grande spécificité pour l'espèce d'insecte visée.

Malgré les essais démontrant l'efficacité du ChfuGV comme biopesticide, plusieurs études doivent être réalisées avant son application à grande échelle dans la nature. Entre autres, et afin de mieux comprendre et caractériser la pathogenèse associée à l'infection au ChfuGV, notre laboratoire a entrepris un projet d'envergure visant l'étude du génome et du protéome de ce virus. Plus spécifiquement ce projet de recherche consiste en l'étude d'une protéine du ChfuGV appelée protéine P10.

La protéine P10 est une protéine majeure des baculovirus exprimée au stade très tardif du cycle d'infection (Smith, Vlak et Summer, 1983; Rohel, Cochran, Faulkner et 1983). Cette protéine, étudiée chez d'autres baculovirus du genre nucléopolyédrovirus (NPV), est impliquée dans la formation de structures fibreuses dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées (Croizier, Gonnet et Devauchelle, 1987) et semble jouer un rôle dans la morphogenèse de l'enveloppe du corps d'inclusion du virus (Vlak *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1989; Wilson et Price, 1988) et dans le relâchement des particules virales hors des cellules infectées (Williams *et al.*, 1989). Jusqu'à présent, la présence de la protéine P10, dans les cellules infectées par les baculovirus du genre granulovirus (GV), n'a pas encore été confirmée. Toutefois, des ORF homologues à des ORF codant pour la protéine P10 ont été identifiés chez certains granulovirus.

Étant donné le rôle important de la protéine P10 dans la morphogenèse du virus et dans son cycle d'infection, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la protéine P10 est aussi produite par le ChfuGV. Ainsi le but de notre travail était d'identifier le gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV afin de pouvoir le cloner et le séquencer. La caractérisation de la séquence nucléotidique devait nous apporter la preuve, et ce pour la première fois, de l'identité du gène codant pour la protéine P10 chez le ChfuGV. La réalisation de cet exercice d'identification était un pré requis au sous-clonage du gène codant pour la P10 dans des vecteurs d'expression procaryotes et eucaryotes dans le but de produire des anticorps polyclonaux anti-P10 spécifiques. Ces anticorps anti-P10 serviront dans des projets, actuellement en cours dans nos laboratoires, visant la caractérisation immunobiologique de la P10 en utilisant entre autres des coupes de tissus de larves à différents stades de l'infection. Cette caractérisation permettra de confirmer la localisation et le devenir de la P10 dans les différents tissus larvaires au cours de cycle d'infection. Ces études élucideront le rôle de la protéine P10 dans la pathogenèse associée à l'infection au ChfuGV.

En conclusion, nous avons confirmé la véracité de notre hypothèse de départ quant à la présence du gène codant pour la protéine P10 chez le génome du ChfuGV. La caractérisation de la séquence nucléotidique du gène p10 prouve sans le moindre doute

l'identité du dit gène. L'expression de la protéine recombinante P10 dans un système procaryote (pQE 32) et dans système eucaryote (pcDNA 3) nous a permis de produire chez les souris Balb/c des anticorps polyclonaux anti-P10 spécifiques suite à une immunisation classique (p10 recombinante) et à une immunisation génétique (ADN nu : pcDNA3/p10).

# **Revue Bibliographique**

## 1. La tordeuse des bourgeons de l'épinette

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, nommée *Choristoneura fumiferana* [Clem.], est l'insecte le plus destructeur des peuplements de conifères de l'Amérique du Nord. Ces principaux hôtes sont l'épinette blanche [*Picea glauca* (Moench) Voss], l'épinette rouge [*Acer rubrum* (L)], l'épinette noire [*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.] et le sapin baumier [*Abies balsamea* L)] (Bonneau *et al.*, n.m). Par contre en période épidémique, cet insecte peut élargir son spectre d'hôtes et s'attaquer à d'autres espèces de conifères. L'insecte se nourrit des nouvelles pousses et des aiguilles des conifères ce qui cause une diminution du feuillage des conifères et entraîne la réduction de leurs sites de réactions biochimiques essentiels à la photosynthèse et à la production d'hormone de croissance. L'insecte inhibe donc certaines fonctions vitales de leurs hôtes. Il en résulte un ralentissement de la croissance et une augmentation de la mortalité des conifères.

Le cycle de vie de la tordeuse des bourgeons de l'épinette se déroule en une année. Il compte un stade oeuf, six stades larvaires, un stade chrysalide et un stade papillon. Les jeunes larves tissent, aux nouvelles pousses, une sorte d'abri formé de leurs déjections et de débris d'aiguilles entremêlés de fils de soie. Les larves se nourrissent des nouvelles pousses jusqu'à leur sixième et dernier stade larvaire. Les larves des cinquièmes et sixièmes stades larvaires sont responsables de plus de 85 % de la défoliation (Bonneau *et al.*, n.m).

Lorsque les populations de la tordeuse des bourgeons d'épinette augmentent de façon considérable elles peuvent atteindre un niveau épidémique et causer des dommages importants aux forêts. L'épidémie qui a sévit au Québec entre 1974 et 1988 a dévasté plus de 55 000 0000 ha de forêt détruisant entre 139 et 238 millions m<sup>3</sup> d'épinettes et de sapins [*Abies balsamea* (L.) Mill.] soit l'équivalent de dix années de coupe forestière (Blais, 1983). Il a été démontré par des analyses dendrochronologiques, portant sur la réduction de la largeur des cernes engendrée par la défoliation, que les populations de l'insecte ont

atteint des niveaux épidémiques régulièrement depuis au moins 300 ans (Blais, 1983, Krause, 1997, Morin et Laprise, 1990).

Le contrôle des épidémies des populations de la tordeuse des bourgeons d'épinette est primordial pour éviter les dommages aux forêts ainsi que les pertes économiques résultantes. Présentement, le *Bacillus thuringiensis* est l'agent biologique le plus couramment utilisé pour contrôler les populations de la tordeuse. D'autres agents biologiques, tel que le baculovirus, ont été étudiés dans le but de diversifier les outils disponibles pour la lutte contre les épidémies de tordeuse. Les baculovirus ont l'avantage d'être présent naturellement dans l'environnement et d'être généralement spécifique à leurs hôtes. Le ChfuGV est un baculovirus qui a été isolé à partir des larves de la tordeuse des bourgeons d'épinette (Bird, 1959) (Figure 1). Des études ont démontré clairement l'efficacité du ChfuGV dans le contrôle des populations de la tordeuse (Forté et Guertin, 1999).

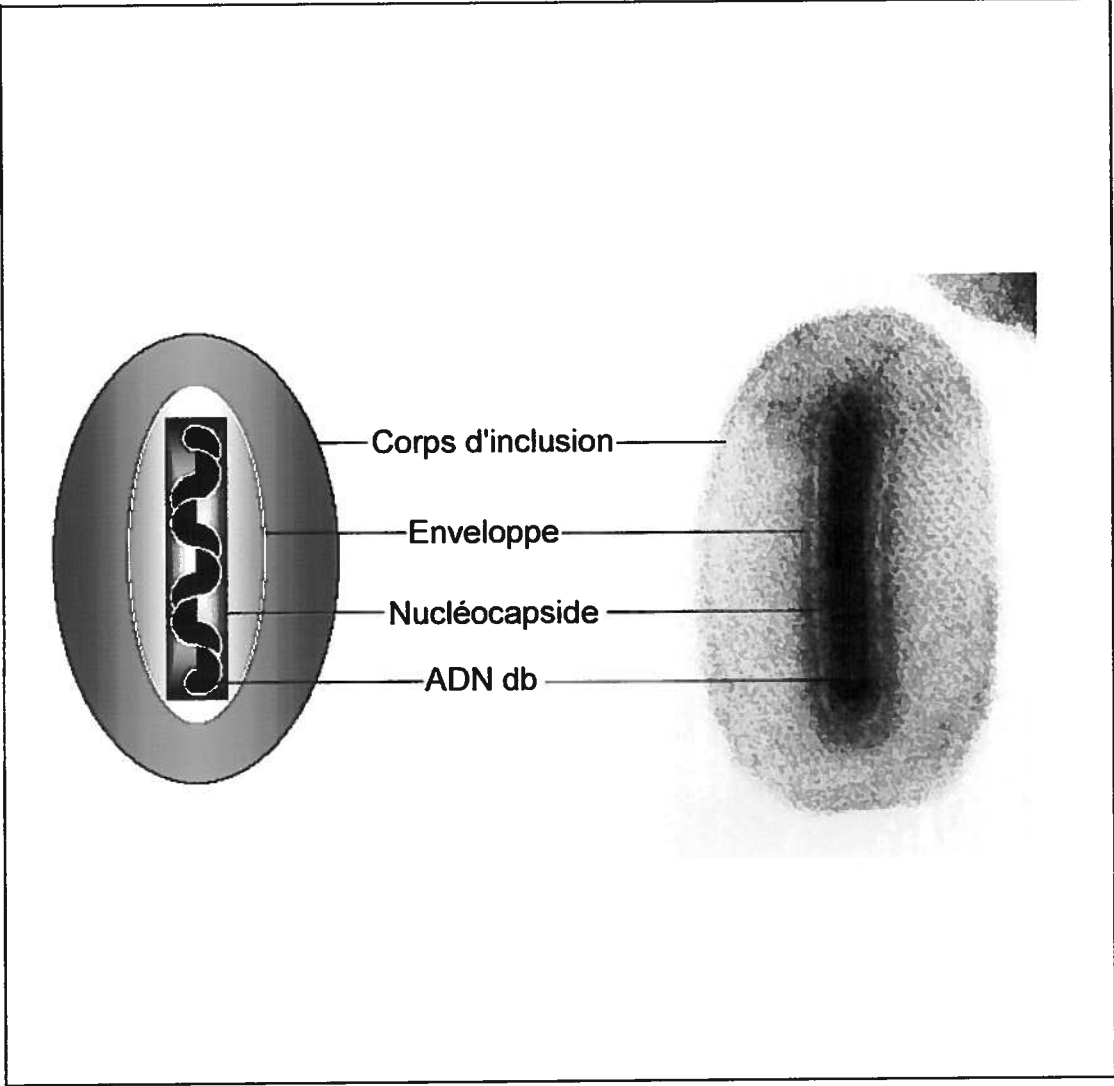
## **2. Le granulovirus (GV)**

### **2.1 Classification**

La famille baculoviridea se divise en deux genres, soit les granulovirus (GV) et les nucléopolyédrovirus (NPV) (Volkman et Blissard, 1995). Le genre d'un baculovirus est déterminé selon sa morphologie. Les GV sont formés d'un corps d'inclusion contenant un seul et parfois deux virions. Le corps d'inclusion des GV a un diamètre de 0,25 à 0,5  $\mu\text{m}$  et est formé principalement de la protéine appelée granuline (Summers et Smith, 1978; Tweeten, Bulla et Consigli, 1981; Rohrmann, 1992). Les GV infectent exclusivement les insectes lépidoptères. Les NPV sont entourés d'une matrice protéique, nommé le corps d'inclusion, qui a une forme de polyèdre de 1 à 15  $\mu\text{m}$  de diamètre (Rohrman, 1992). Le corps d'inclusion des polyèdres est composé en majeure partie d'une protéine appelée polyédrine. Un seul ou plusieurs virions (jusqu'à 100 virions) sont contenus à l'intérieur du corps d'inclusion (Hayakawa *et al.*, 2000). Les NPV se divisent en deux sous-groupes, soit les nucleopolyédrovirus multiples (MNPV) qui ont des nucléocapsides enveloppées en groupe, et les nucleopolyédrovirus simples (SNPV) qui ont des nucléocapsides enveloppées individuellement (Hayakawa *et al.*, 2000). La

**Figure 1 : Le granulovirus de *Choristoneura fumiferana***

Schémas et photographie (prise en microscopie électronique à un agrandissement de 200 000 x ), du granulovirus de *Choristoneura fumiferana*





majorité des nucléopolyédrovirus infectent les insectes de l'ordre des lépidoptères mais certains infectent aussi l'ordre des hyménoptères, des diptères, des coléoptères et des trichoptères (Tanada et Hess, 1991 ).

La propagation des baculovirus du genre NPV est facilitée par la disponibilité de système de culture cellulaire permissif. Étant donné la difficulté à développer un tel système pour la propagation des GV, la majorité des études biologiques, biochimiques et génétiques portent sur le genre NPV. Le NPV d'*Autographia californica* est l'un des baculovirus le plus étudié. Les GV et les NPV sont identifiés selon leur hôte spécifique. Par exemple, le multinucléopolyédrovirus infectant l'*Autographa californica* se nomme AcMNPV et le granulovirus infectant le *Choristoneura fumiferana* est nommé le ChfuGV.

## 2.2 Morphologie et ultrastructure

Les GV sont de forme ovocylindrique de 300 à 500 nm de longueur par 150 à 350 nm de largeur (Tweeten, Bulla et Consigli, 1981). Le corps d'inclusion, formé de la protéine granuline, entoure la nucléocapside enveloppée du virion. Le corps d'inclusion stabilise les virons et permet de les garder viables dans l'environnement durant de longue période. Le corps d'inclusion est entouré d'une enveloppe nommée le calice. Le calice, formé de protéines et de carbohydrates, scelle et fortifie le corps d'inclusion ( Minion, Coons et Broome 1979; Whitt et Manning, 1988).

Les nucléocapsides enveloppés ont une forme en bâtonnet de 260 à 360 nm de longueur et de 30 à 60 nm de largeur (Tweeten, Bulla et Consigli, 1981). Des études de diffraction et des observations en microscopie électronique ont démontré que la nucléocapside est composée de sous-unités protéiques (Beaton et Filshie, 1976; Burley *et al.*, 1982). Ces sous-unités forment des anneaux entassés et parallèles à l'axe de la nucléocapside (Burley *et al.*, 1982). Les nucléocapsides sont enveloppées d'une couche de lipoprotéine (Kelly, 1982). Les GV et les SNPV ont une seule nucléocapside par enveloppe, tandis que les MNPV peuvent en compter jusqu'à huit (Hayakawa *et al.*, 2000).

### 2.3 Génome du granulovirus

Le génome des GV est formé d'une molécule d'ADN bicaténaire et circulaire (Blissard, 1996). Les molécules d'ADN des GV sont principalement sous la forme circulaire relâchée mais une portion (de 21 à 24%) est sous forme superhéliçoïde (Tweeten, Bulla et Consigli, 1977). Le nombre de paires de base composant le génome des baculovirus varie de 80 à 180 Kb (Blissard, 1996).

Le génome du MNPV d'*Autographa californica* a été le premier des baculovirus à être séquencé complètement (Ayles *et al.*, 1994). Depuis, les génomes de plusieurs autres nucléopolyédrovirus ont été complètement ou partiellement séquencés. Seulement trois granulovirus, ont leur génome complètement séquencé, il s'agit des granulovirus de *Cyndia pomonella* (CpGV) (Luque *et al.*, 2001), de *Xestia c-nigrum* (XcGV) (Hayakawa *et al.*, 1999) et de *Plutella xylostella* (PxGV) (Hashimoto *et al.*, 2000). L'analyse de ces séquences a permis d'identifier entre 120 et 181 cadres de lecture ouverts (ORF). Jusqu'à 82% de ces gènes prédits sont homologues aux gènes préalablement identifiés chez d'autres baculovirus (Luque *et al.*, 2001). Les génomes du CpGV, du PxGV et du XcGV ont un ordre et une orientation des gènes très conservés (Luque *et al.*, 2001).

### 2.4 Expression des gènes

L'expression des gènes des baculovirus est régulée selon un modèle temporel en cascade. Ainsi, chaque étape est dépendante de l'événement précédent. Les gènes des baculovirus sont exprimés en quatre étapes.

Les gènes immédiats précoces (gènes  $\alpha$ ) et les gènes précoces (gènes  $\beta$ ) sont exprimés avant la réplication de l'ADN viral (Kool et Vlak, 1993). Ces gènes possèdent une région promotrice caractérisée par une séquence TATA (boîte TATA) et par un motif d'initiation de la transcription (CAGT) (Hoopes et Rohrmann, 1991) et ils sont transcrits par l'ARN polymérase II de la cellule hôte (Fuchs, Woods, Weaver, 1983; Hun et Weaver, 1990). L'expression de ces gènes est essentielle à la synthèse de l'ADN viral et à la transcription des gènes exprimés tardivement.

Les gènes tardifs (gènes  $\gamma$ ) et les gènes très tardifs (gènes  $\delta$ ) sont exprimés suite à la réplication de l'ADN. Ces gènes sont transcrits par ARN polymérase résistante à l' $\alpha$ -amanitine (Gruha, Buller et Weaver, 1981; Hung and Weaver, 1990) qui reconnaît la séquence promotrice A/TTAAG (Rohrmann, 1986; Rankin, Ooi et Miller, 1988; Ooi, Rankin et Miller, 1989). Les gènes tardifs sont activés avant les gènes très tardifs et sont transcrits en une courte période de temps (entre 12 et 24 heures post-infection). Les gènes tardifs codent pour des protéines structurales et permettent l'expression des gènes très tardifs (Kool et Vlak, 1993). L'expression des gènes très tardifs débute environ 48 heures post-infection et demeure active jusqu'à la mort cellulaire, ce qui entraîne une accumulation des produits de l'expression de ces gènes. Les gènes codant pour les protéines tel que la granuline et la protéine P10 font parti de cette classe de gènes très tardifs.

## **2.5 Protéines virales**

### **2.5.1 Protéines associées au corps d'inclusion des GV**

Le corps d'inclusion des GV est composé d'une matrice protéique nommée granuline (Tanada et Hess, 1993). La granuline est une phosphoprotéine non glycosylée (Summers et Egawa, 1973) formée de sous-unités protéiques de 26 à 28 kDa et est similaire à la polyédrine, la protéine majeure du corps d'inclusion des NPV (Summers et Smith, 1976, Tanada et Hess, 1993). La comparaison de la séquence en acides aminés de la granuline du ChfugV avec celles des granulovirus de *Trichoplusia ni* (TnGV), *Pieris brassicae* (PbGV) et *Cryptophlebia leucotreta* (ClGV) montre une homologie variant de 84,2 à 88,3% (Bah *et al.*, 1997). Blissard *et al* (1996) ont rapporté la présence d'une deuxième protéine du corps d'inclusion. Cette protéine nommée facilitant « *enhancin* » aiderait l'infection en favorisant la protéolyse de la membrane péritrophique qui recouvre l'intestin de l'insecte.

### 2.5.2 Protéines associées à la nucléocapside enveloppée

La nucléocapside des baculovirus a une forme de bâtonnet et est composée de deux principales protéines, soit la protéine P39 et la protéine P6.9 (Tanada et Hess, 1991). Des expériences d'immunobuvardage et d'immunoprécipitation ont démontré la présence d'une protéine structurale majeure de 39 kDa, la protéine P39, à la surface de la nucléocapside des virus (Pearson *et al.*, 1988, Thiem et Miller, 1989). La protéine P39 exprimée tardivement lors de l'infection pourrait être impliquée dans le déplacement de la nucléocapside du cytoplasme vers le noyau de la cellule d'insecte infectée (Pearson *et al.*, 1988). La seconde protéine composant la nucléocapside est appelée protéine P6.9. Cette protéine est basique riche en arginine, de faible poids moléculaire et fortement associée avec l'ADN du baculovirus (Tweeten, Bulla et Consigli, 1980). Ainsi, la protéine P6.9 jouerait un rôle semblable à celui des histones et des protamines qui permettent le repliement de l'ADN en neutralisant les charges positives de l'ADN (Tweeten, Bulla et Consigli, 1980; Wilson *et al.*, 1987). La phosphorylation de la protéine P6.9 serait responsable du relâchement de l'ADN viral dans la cellule infectée (Miller, Adang et Bowne, 1983; Wilson and Consigli, 1985).

Plusieurs autres protéines sont associées à la nucléocapside enveloppée des GV. On a rapporté que les granulovirus, tel que le granulovirus de *Plodia interpunctella* (PiG), et de *Trichoplusia ni* (TnGV) ont entre 9 à 20 protéines associées à la nucléocapside enveloppée (Tweeten, Bulla et Consigli, 1980; Brown, Bud et Kelly, 1977; Yamamoto et Tanada, 1979). La surface du corps cylindre de la nucléocapside est formée, en outre, de la protéine P24. Cette protéine mineure de 24 kDa est exprimée durant la phase tardive de l'infection (Wolgamot *et al.*, 1993). La phosphoprotéine P78/83 riche en proline est une autre protéine de la nucléocapside plutôt associée à ses extrémités (Vialard, Arif et Richardson, 1995).

La protéine P74 est une protéine de l'enveloppe des virions inclus (OV) qui est essentielle lors de l'infection de la larve par ingestion (Kuzio, Jaques et Faulkner, 1989; Faulkner, Kuzio et William, 1997). La protéine P74 étant exposée à la surface du virion,

elle serait responsable de l'attachement et/ou de la fusion du virion aux cellules de l'intestin moyen (Faulkner, Kuzio et William, 1997). Les protéines P25, ODV-E66 et l'ODV-E56 sont d'autres protéines associées à l'enveloppe des virus inclus (Braunagel et Summer, 1994; Hong et Braunagel, 1994; Kuzio, Jaques et Faulkner, 1989).

La protéine GP64 est une glycoprotéine acquise par le virion non inclus (BV) lors de son bourgeonnement à la surface de la cellule infectée (Volkman et Golosmith, 1984; Volkman, 1986). Des études chez le NPV d'*Autographa californica* (AcMNPV) ont démontrées que la protéine GP64 est impliquée dans l'entrée, par endocytose, du virus dans la cellule hôte et ainsi augmente la virulence du virus lors d'infection par ingestion (Washburn *et al.*, 2003). Malgré le rôle important de cette protéine dans l'infection, le gènes codant pour une protéine homologue à la protéine GP64 n'a été identifié dans les génomes entièrement séquencés des granulovirus de *Xestia c-nigrum* (XcGV), *Plutella xylostella* (PxGV) et *Cydia pomonella* (CpGV) (Hayakawa *et al.*, 1999, Hashimoto *et al.*, 2000, Luque *et al.*, 2001). La protéine GP64 est aussi absente du génome de certains nucléopolyédrovirus (e.g. LdMNPV, SeMNPV) (Hashimoto *et al.*, 2000).

## **2.6 Réplication du granulovirus**

### **2.6.1 La réplication *in vitro* des granulovirus**

La réplication *in vitro* des GV montre un faible taux de réussite comparativement aux NPV. Cette contrainte, limite l'étude biologique, biochimique et génétique des GV. Vago et Bergoin rapportent pour la première fois en 1969 la réplication *in vitro* du GV de *Pieris brassicae* dans une lignée cellulaire de *Lymantria dispar* (Vago et Bergoin, 1969 dans Tanada et Hess, 1993). Par la suite, les GV de *Cydia pomonella* et de *Trichoplusia ni* ont été propagés dans une lignée cellulaire semblable (Naser *et al.*, 1984; Miltenburger *et al.*, 1984 dans Tanada et Hess, 1993).

## **2.6.2 La réplication *in vivo* des granulovirus**

Les baculovirus ont un cycle d'infection biphasique impliquant l'action de deux différents phénotypes de virions. La phase primaire est caractérisée par le phénotype du virus bourgeonnant (BV) qui est responsable de la propagation de l'infection au niveau des cellules de l'insecte (Rohmann, 1992). La phase tardive se distingue par le phénotype du virus inclus (OV) pourvu d'un corps d'inclusion et responsable de la propagation verticale (Rohmann, 1992).

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

Les insectes sont infectés en se nourrissant du feuillage contaminé par le virus (Blissard et Rohrmann, 1990). Une fois ingéré, le virus se dirige vers l'intestin moyen de l'insecte. Les conditions alcalines de l'intestin (pH entre 9,5 et 11,5) provoquent la solubilisation du corps d'inclusion du virus et permettent la libération des nucléocapsides enveloppées (Kelly, 1982). Les cellules épithéliales de l'intestin sont les premières cellules susceptibles à l'infection par les nucléocapsides enveloppées (Summer, 1971). D'ailleurs, la présence de sites de liaisons spécifiques au virus a été révélée au niveau des bordures en brosse des cellules de l'intestin (Horton et Burand, 1993). Après adsorption du virus à la surface des cellules, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire permettant ainsi l'entrée de la nucléocapside dans le cytoplasme (Granados, 1978, Summers 1971). La nucléocapside est ensuite transportée vers le noyau grâce à un mécanisme impliquant les microtubules de la cellule (Summer, 1971; Granados, 1978). Le génome viral atteint le noyau cellulaire (1 à 4 heures post-infection) via les pores nucléaires, laissant ainsi la nucléocapside vide dans le cytoplasme (Summer, 1971; Granados et Lawler, 1981). Il s'en suit, une phase d'éclipse de 12 à 16 heures caractérisée par la formation d'un stroma virogène à l'intérieur du noyau qui est le site de la synthèse de l'ADN, de la transcription et de l'assemblage d'une nouvelle génération de nucléocapsides (Summer, 1971, Tweeten, Bulla et Consigli, 1981).

L'enveloppe de la nucléocapside est acquise soit; i) lors de son bourgeonnement au niveau de la membrane intracytoplasmique (Tanada et Leutenegger, 1970); ii) lors de

son bourgeonnement au niveau de la membrane basale (Robertson, Harrap et Longworth, 1974); ou iii) directement au niveau de la membrane nucléaire (Tweeten, Bulla et Consigli, 1981).

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

La phase secondaire de l'infection du ChfuvGV s'amorce par la libération des virus bourgeonnants (BV) dans l'hémolymphe. Les BV libérés infectent d'autres cellules susceptibles tels que les cellules du corps gras, de la matrice trachéale, de l'épithélium, et des hémocytes (Blissard et Rohrmann, 1990). Les BV entrent dans les cellules par viropexie et fusion (Tanada et Hess, 1991). L'entrée du virus dans la cellule cause une hypertrophie du noyau, une redistribution de la chromatine en périphérie de la membrane nucléaire et la formation de stroma virogène (Tweeten, Bulla et Consigli, 1981). Les nucléocapsides générées lors de la réplication virale peuvent acquérir l'un des deux phénotypes (BV ou OV). Ainsi, si elles acquièrent une enveloppe et un corps d'inclusion à l'intérieur même du noyau infecté, le virus sera du phénotype OV. L'enveloppe de l'OV est une membrane composée d'un bicouche lipidique formée par une invagination de la membrane nucléaire des cellules infectées (Hong et Braunagel, 1994). La formation et l'accumulation d'OV à l'intérieur des cellules infectées sont suivies de la lyse cellulaire, de la mort de l'insecte, de la liquéfaction de l'insecte et de la dissémination du virus dans l'environnement.

## **3. La protéine P10 des baculovirus**

Le principal effet cytopathique, observé au stade très tardif de l'infection des baculovirus, est la formation de structures fibreuses dans le cytoplasme et le noyau des cellules infectées. Des études utilisant les techniques d'immunofluorescences et de marquages par immuno-or ont montrées la présence de la protéine P10 au niveau de ces structures fibreuses dans les cellules infectées par AcMNPV, OpNPV et SeNPV (Croizier, Gonnet et Devauchelle, 1987; Quant-Russell *et al.*, 1987; Van Der Wilk, Van Lent et Vlak, 1987 et Van Oers, Flipsen et Reusken 1994). Adang et Miller (1982) ont été les premiers à observer la protéine P10 de l'AcMNPV suite à une analyse sur gel de polyacrylamide. Le nom de la protéine P10 vient de son poids moléculaire de 10 kDa.

### 3.1 Les gènes codant pour la protéine P10

Les gènes codant pour la protéine P10 ont été rapportés chez plusieurs NPV dont AcMNPV, BmNPV, CfNPV, EpNPV, HaNPV, HcNPV, LdNPV, OpNPV, PnNPV, SeNPV, SINPV et TnNPV ( Kuzio *et al.*, 1984; Leisy *et al.*, 1986; Zuidema *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1995; Van Oers *et al.*, 1998; Fielding et Davidson, 2000; Chen *et al.*, 2001; Razuck *et al.*, 2002). Dans le génome des virus NPV, le gène codant pour la protéine P10 est souvent colinéaire aux gènes codant pour les protéines P26 et P74 ( Lui *et al.*, 1986; Bicknell *et al.*, 1987 Kuzio, Jaques et Faulkern, 1989; Hill *et al.*, 1993; Zuidema *et al.*, 1993; Van Oers *et al.*, 1998; Razuck *et al.*, 2001).

Parmi les virus GV séquencés, on rapporte la présence de gènes codants pour des protéines homologues à la protéine P10 des virus NPV. Le génome du granulovirus de *Xestia c-nigrum* (XcGV) possède trois ORF (Xc5, Xc19 et Xc83) qui ont des séquences en acides nucléiques divergentes de celles des gènes codant pour la protéine P10 mais qui code pour des motifs semblables aux motifs caractéristiques des protéines P10. Ces ORF, coderaient donc pour des protéines fonctionnelles homologues aux protéines P10 des baculovirus (Hayakawa *et al.*, 1999). Le génome du granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) possède aussi deux ORF (Cp22, Cp62) qui coderaient pour des protéines ayant des fonctions homologues aux protéines P10 (Luque *et al.*, 2001). Le génome du granulovirus de *Plutella xylostella* (PxGV), possède deux ORF (Px21 et Px50) qui coderaient aussi pour des protéines homologues à la protéine P10 et un ORF (Px2) qui présente des similitudes significatives avec le gène codant pour la protéine P10 du NPV de *Spodoptera litura* (SINPV) ( Hashimoto *et al.*, 2000).

Les séquences en acides nucléiques des gènes codants pour les protéines P10 varient beaucoup entre les différents baculovirus. Ainsi, les séquences déduites en acides aminés des protéines P10, à partir des séquences en acides nucléiques, montrent une faible homologie variant généralement entre 50% à 65% parmi les baculovirus (Van Oers, 1997; Wilson *et al.*, 1995; Van Oers and Vlak, 1997).



### 3.2 Transcription de la p10

À la phase très tardive du cycle d'infection, le gène de la protéine P10 est transcrit par l'ARN polymérase résistante à  $\alpha$ -amanitine (Grula, Buller et Weaver, 1981; Fuchs, Woods et Weaver, 1993) à partir d'une séquence promotrice A/GTAAG caractéristique des gènes tardifs et très tardifs (Leisy *et al.*, 1986; Kuzio, Jaques et Faulkern, 1989; Rankin, Ladin et Weaver, 1986; Zuidema *et al.*, 1993). Plusieurs facteurs, tels que le facteur d'expression tardif *lef2* du virus *Bombix mori* (BMNPV) (Sriam et Gopinathan, 1998) et le facteur très tardif (VLF-1) du virus AcMNPV (Yang et Miller, 1999), sont impliqués dans la transcription et l'hyperexpression du gène de la protéine P10.

Le gène codant pour la protéine P10 est transcrit en une succession de différents ARNm se chevauchant et possédant des régions 5' ou 3' communes (Friesen et Miller, 1985; Leisy *et al.*, 1986; Faktor *et al.*, 1997; Van Oers *et al.*, 1999). La transcription du gène de la protéine P10 en ARNm possédant des régions 3' communes est contrôlée par un mécanisme d'interférence transcriptionnel. Ainsi, la transcription du gène de la protéine P10 à partir d'une séquence promotrice empêcherait l'initiation de la transcription à partir d'une autre séquence promotrice située plus en aval (Friesen and Miller, 1985). Ces différents transcrits, synthétisés de façon successive, prolongeraient l'expression de la protéine P10. Le gène de la protéine P10 peut aussi être transcrit en différenciant ARNm possédant des régions 5' communes. Ces transcrits résultent de la présence de plusieurs motifs (AATAAA), correspondant à des signaux de polyadénylation dans la région 3' non traduite (3'UTR) du gène codant pour la protéine P10 (Birnstiel, Busslinger et Strub, 1985). Les travaux de Van Oers *et al.* (1999) ont montré que la mutation d'un motif utilisé comme signal de polyadénylation mène à l'utilisation d'un motif alternatif. Ce mécanisme permet de maintenir une forte expression de la protéine P10.

### 3.3 Rôle de la protéine P10

La protéine P10 joue un rôle dans la morphogenèse de l'enveloppe du corps d'inclusion, une structure de carbohydrates et de protéines qui scelle le corps d'inclusion (Williams *et al.*, 1989; Gross, Russel et Rohrmann, 1994). En effet, selon des observations en microscopie électronique, les structures fibreuses de la protéine P10 sont associées avec des composés électrodenses, ces derniers sont des précurseurs de l'enveloppe des corps d'inclusion des virus (Wilson et Price, 1988). Des tests de mutations ont confirmé que la protéine P10 interagit avec les composés électrodenses pour permettre l'assemblage de l'enveloppe du corps d'inclusion (Vlak *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1996). De plus, Williams *et al.* (1989) ont montré que les virus codant pour une protéine P10 mutante possèdent une enveloppe du corps d'inclusion plus faiblement liée à la particule virale. Une enveloppe faiblement liée à la particule virale fragilise la structure du virus et par conséquent diminue la stabilité du virus dans l'environnement.

Williams *et al.* (1989) et Van Oers *et al.* (1993) ont montré par des tests de mutations que la protéine P10 est impliquée dans la désintégration nucléaire et dans le relâchement des virus inclus (OV) hors des cellules infectées. En effet, l'accumulation de la protéine P10 en structures fibreuses et des particules virales incluses, dans le cytoplasme et le noyau des cellules, exerce une pression suffisamment grande pour permettre la lyse cellulaire et le relâchement des particules virales incluses.

Thomas *et al.* (1998) ont montré, par délétion du gène codant pour la protéine P10 d'AcMNPV, que la protéine P10 est impliquée aussi dans le relâchement de la protéine chitinase des cellules infectées. La protéine chitinase, codée par le gène *ChiA* du virus, permet la digestion de la cuticule de l'insecte et la liquéfaction de l'insecte (Hawtin *et al.*, 1997). Cette liquéfaction permet la libération des particules virales dans l'environnement et la transmission verticale du virus dans la population d'insectes hôtes.

### 3.4 Les domaines de la protéine p10

L'analyse des séquences en acides aminées des protéines P10 des baculovirus montre la présence de trois principaux domaines; un domaine en superhélice « *coiled-coils* », un domaine riche en proline et un domaine riche en acides aminés basiques. Chacun de ces domaines possède une fonction et une structure caractéristique.

Le domaine en superhélice a été observé dans la région N-terminale de la protéine P10 des baculovirus, dont les NPV de *Choristoneura fumiferana* (CfMNPV) (Wilson, *et al.*, 1995), d'*Autographa californica* (AcMNPV) (Kuzio *et al.*, 1984), de *Bombyx mori* (BmNPV) (Zhang, Wu *et Li*, 1995 *dans* Van Oers, 1997) et d'*Orgyia pseudotsugata* (OpNPV) (Leisy *et al.*, 1986). Les domaines en superhélice sont caractérisés par un motif répété de sept acides aminés (hepta). La première et la quatrième positions de chacun de ces heptas sont occupées par des acides aminés hydrophobes (e.g. leucine, isoleucine et valine) (Lupas *et al.*, 1991; Cohen and Parry, 1990). La position régulière de ces acides aminés hydrophobes permet la formation d'une hélice  $\alpha$  amphipatique, où les acides aminés hydrophobes sont situés tous du même côté de l'hélice. Ainsi, deux à quatre des hélices  $\alpha$  amphipatiques se regroupent et forment une structure en superhélice (Cohen and Parry, 1990). Le domaine en superhélice permet ainsi l'interaction des protéines P10 en agrégat, il est donc impliqué dans l'organisation supramoléculaire de la protéine P10 (Aloui-Ismaili et Richardson, 1998).

En C-terminal du domaine en superhélice se trouve un domaine riche en proline. La séquence en acides aminés de ce domaine est composée de plusieurs résidus de prolines et de résidus chargés négativement (e.g. glutamate et aspartate). La séquence en acides aminés de ce domaine varie entre les différents baculovirus. Toutefois on observe la présence d'un ou plusieurs motifs [(G/A/VL/I) P (D/E/N) (V/L/I/P) P] (Van Oers, 1997). Finalement, Van Oers *et al.* (1993) ont montré que le domaine riche en proline de la protéine P10 du virus AcMNPV est responsable de la désintégration nucléaire.

Le domaine riche en acides aminés basiques se trouve dans la région C-terminale de la protéine P10. Van Oers *et al.* (1993) indiquent que la mutation de ce domaine mène à la formation d'une protéine P10 ayant une structure granuleuse. Ainsi, le domaine riche en acides aminés basique est nécessaire à l'alignement des protéines P10 en une structure fibreuse (Van Oers *et al.*, 1993).

### **3.5 Production d'anticorps anti-P10 monoclonaux**

Plusieurs études de la protéine P10, tel que des études immunohistochimiques, requièrent des anticorps spécifiques à cette protéine. Quant-Russell *et al.* (1987) ont réussi à produire des cellules hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine P10 d'OpMNPV. Pour ce faire, des cellules de la rate de souris Balb/c injectées avec le virion d'OpMNPV ont été fusionnées avec des cellules myélomes Sp2/0. Des tests ELISA ont permis d'identifier les cellules produisant des anticorps pouvant se lier aux protéines du virion sans réagir avec la polyédrine, le principal composant du virion. Ces cellules furent clonées et les surnageants de ces lignées cellulaires ont été utilisés lors de test d'immunobuvardage de type Western. Les surnageants contenant des anticorps spécifiques à la protéine P10, ont été utilisés pour cribler une banque d'expression  $\lambda$  gt11 conçu à partir de l'ADN génomique d'OpNPV. Les auteurs ont démontré que les clones criblés comportaient effectivement la séquence du gène de la protéine P10.

### **4. Système d'expression**

L'expression et la purification d'une protéine recombinante permet la production et l'étude d'une protéine d'intérêt. La production en grande quantité de protéines recombinantes représente un grand intérêt dans l'industrie pharmaceutique et biotechnologique. En plus, de son intérêt économique, la production de protéines recombinantes permet l'avancement de nombreuses recherches fondamentales. Itakura *et al.* (1977) ont exprimé pour la première fois une protéine recombinante. Le gène de la somatostatine, un peptide neurotransmetteur, avait été cloné dans un vecteur plasmidique puis avait été exprimé directement dans *E.coli* (Itakura *et al.*, 1977). Peu de temps après,

devenue le premier médicament recombinant autorisé (Watson *et al.*, 1994). La production de protéines recombinantes nécessite plusieurs étapes : 1) le clonage du gène dans un vecteur plasmidique; 2) l'introduction du plasmide dans une cellule hôte; et 3) la purification de la protéine recombinante. Une grande variété de systèmes d'expression a été développée en laboratoire. Il est possible de diviser les systèmes d'expression en deux catégories : les systèmes d'expression procaryotiques impliquant, par exemple, les bactéries *E.coli* et *Bacillus subtilis* et les systèmes d'expression eucaryotiques impliquant, notamment, les levures et les cellules de mammifères et d'insectes. Le système d'expression doit être choisi en fonction de l'application prévue pour la protéine recombinante.

#### **4.1 Système d'expression procaryotique**

##### **4.1.1 Bactéries**

L'expression d'une protéine recombinante dans un système procaryotique est simple, rapide, peu coûteuse et offre, dans plusieurs cas, un bon rendement. Le plasmide recombinant est incorporé au niveau de la cellule hôte par une simple transformation. Le principal inconvénient de ce système est la possibilité d'un repliement incorrect acquis par la protéine recombinante produite. Une protéine insoluble ou inactive peut résulter d'un mauvais repliement. De plus, la protéine recombinante peut être toxique et causer la mort des bactéries hôtes avant l'atteinte d'une production suffisante de la protéine d'intérêt. Dans ce système, les protéines recombinantes peuvent aussi être dégradées par les protéases produites par la cellule hôte. Un autre inconvénient majeur à l'utilisation de ce système est l'inaptitude des cellules procaryotes à effectuer des modifications post-traductionnelles. Plusieurs scientifiques se sont intéressés au système procaryotique pour exprimer certaines protéines d'intérêt. Par exemple, la région codant pour la protéine gag du virus de l'immunodéficience bovine (BIV) a été clonée dans le vecteur d'expression pQE32 et fortement exprimée dans *E. coli* (Zheng *et al.* 2000).

Une des problématiques liée à l'utilisation de systèmes d'expression procaryotique, réside dans la purification de la protéine recombinante. Par des techniques de recombinaison d'ADN, il est possible de contourner cette difficulté en fusionnant à la

séquence protéique, un marqueur possédant une affinité spécifique. La protéine recombinante peut ainsi être purifiée par l'utilisation d'une chromatographie d'affinité.

Certains vecteurs, tel que le pQE32 de Qiagen, permettent l'expression directe d'une protéine liée à une queue formée de six résidus histidines (6 x His). Les biomolécules possédant ce type de queue ont la propriété de se lier à une matrice de nickel-nitrilotriacétique (Ni-NTA). L'acide nitriloacétique (NTA) est un chélateur pouvant se lier à quatre des six sites de liaison de l'ion de nickel. La matrice NTA est donc plus stable que d'autres matrices, notamment celle utilisant le chélateur iminodiacetic (IDA). En effet, ce dernier ne possède que trois liaisons avec l'ion nickel. Janknecht *et al.* (1991) ont démontré l'efficacité de la chromatographie Ni-NTA en purifiant à 95% un facteur de réponse du sérum humain « *SRF* » lié à une queue de 6x His (Janknecht *et al.*, 1991). Le principe de la purification par chromatographie Ni-NTA consiste à lier la protéine 6xHis à la matrice et à éliminer les protéines contaminantes par une série de lavages. La protéine d'intérêt est éluée soit par la présence d'une forte concentration d'imidazole, un homologue de l'histidine (condition native) ou par la présence d'une solution à pH acide (condition dénaturante) permettant ainsi de briser le lien protéine-matrice.

## **4.2 Système d'expression eucaryotique**

### **4.2.1 Levures**

Les modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation et la phosphorylation, de la protéine recombinante peuvent être effectuées dans un système d'expression utilisant les levures. Ce système eucaryotique permet un rendement de production élevé, jusqu'à 30% de la masse totale des protéines de la levure (Anonyme, 2001., Watson *et al.*, 1994). Il est aussi possible de faciliter la purification de la protéine par l'ajout d'un signal de sécrétion. Ainsi, la protéine est sécrétée hors de la cellule hôte puis est récupérée dans le milieu de culture de la levure. Par contre, en utilisant ce système, les protéases de la levure peuvent nuire à la production de la protéine recombinante. Les plasmides recombinants sont introduits dans les cellules hôtes par des techniques de transformation ou d'électroporation (Watson *et al.*, 1994).

#### 4.2.2 Cellules d'insectes

Il est possible de produire des protéines recombinantes dans des cellules d'insectes comme celles des lignées cellulaires du *Drosophila melanogaster* (Kirkpatrick et Shatzman, 1999). Les vecteurs de baculovirus, grâce à leur capacité à infecter des cellules d'insectes, sont fréquemment utilisés comme système d'expression (Miller, 1988). Le procédé consiste à co-transfecter les cellules d'insecte, tel que les cellules d'*Autographia californica*, par le baculovirus et le plasmide recombinant codant pour la protéine d'intérêt. Le gène codant pour cette protéine recombinante est inséré dans le génome viral par une recombinaison homologue. La protéine est ensuite exprimée par l'utilisation de la machinerie de la cellule hôte. Les promoteurs de la polyédrine et de la protéine P10 sont souvent utilisés dans ce système pour permettre la production en grande quantité de la protéine recombinante (Smith, Vlak et Summer, 1983; Gonnet et Devauchelle, 1987). Les cellules d'insectes peuvent exprimer une variété de protéines (e.g les protéines cytoplasmiques, nucléaires membranaires et secrétées), elles effectuent les modifications post-transcriptionnelles et peuvent sécréter la protéine produite (Anonyme, 2001).

#### 4.2.3 Cellule de mammifères

La production de protéine recombinante dans des lignées cellulaires de mammifères est le système d'expression le plus utilisé dans la production d'une protéine provenant de vertébrés. En effet, ce système permet toutes les modifications transcriptionnelles requises puisqu'il reconnaît les signaux de synthèse, de maturation moléculaire et de sécrétion de la protéine recombinante. Par contre, le rendement de ce système demeure relativement faible malgré plusieurs améliorations apportées au vecteur d'expression. Une approche plus récente consiste à insérer directement le plasmide recombinant *in vivo* dans les cellules de mammifères. Gordon et Ruddle (1980, 1981) ont été les premiers à introduire, par micro-injection, de l'ADN dans le génome des souris et à produire une progéniture transgénique. Depuis, plusieurs animaux (e.g cochon, vache, mouton, chèvre) ont été utilisés pour la production de protéines recombinantes. Plusieurs

protéines recombinantes humaines ont été exprimées en grande quantité (jusqu'à 35mg/ml) dans le lait d'animaux transgéniques (Meade, *et al.* 1999).

## 5. Immunisation génétique

L'immunisation génétique est le terme utilisé pour décrire le procédé d'une transfection *in vivo* par lequel un organisme reçoit l'injection de plasmides à ADN codant pour une ou des protéine(s) et développe une réponse immunitaire contre cette ou ces protéine(s) (Kucerova, 1998).

### 5.1 Historique

L'un des développements le plus récent et intéressant au niveau de la vaccination est la production de vaccins à ADN. Ces vaccins consistent à l'introduction d'un fragment d'ADN étranger à l'intérieur des cellules animales. En 1960, l'inoculation épithémique d'acides nucléiques purifiés du papillovirus du lapin induisait la formation de papillomes sur la peau des lapins (Ito, 1960 dans Ramsay, Ramshaw et Ada, 1997). En 1983, d'autres expériences ont permis d'observer que l'injection du gène *v-src* du virus du sarcome de Rous induisait la formation de tumeurs chez les poulets (Fung *et al.*, 1983)

Le concept du vaccin à ADN a été décrit pour la première fois en 1990 par Wolff *et al.* Les auteurs ont démontré que l'injection des vecteurs à ADN et à ARN dans les muscles de souris *in vivo* menait à l'expression des gènes rapporteurs clonés et à une activité biologique des enzymes exprimées allant jusqu'à 60 jours suivant l'injection (Wolff *et al.*, 1990). Tang, De Vit et Johnston (1992) ont démontré que l'injection par un canon à gène « *gene gun* » d'un vaccin à ADN suscitait une réponse immunitaire. En effet, l'introduction d'un gène codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH) au niveau des cellules épithémiales de la souris avait permis la production d'anticorps anti-hGH et cette réponse était amplifiée par des immunisations subséquentes. Ces résultats suggèrent que l'immunisation génétique puisse être une méthode de production d'anticorps plus simple que les techniques de vaccination traditionnelles permettant ainsi une économie de temps et d'effort. En 1993, des travaux ont rapporté que l'injection



directe d'ADN codant pour la nucléoprotéine (NP) du virus de l'influenza A/PR/8/34 menait à la production d'anticorps, au recrutement des lymphocytes T cytotoxiques et auxiliaires, et à l'induction de la mémoire immunobiologique chez la souris (Ulmer *et al.*, 1993; Mor, 1998). Quelques mois plus tard, il a été démontré que l'injection d'un vaccin à ADN codant pour l'hémagglutine H7 pouvait protéger le poulet contre le virus létal de l'influenza H7N7 (Robinson, Hunt et Webster, 1993). Plusieurs expériences ont révélé que les vaccins à ADN suscitent des réponses immunitaires contre une variété d'autres pathogènes tel que l'herpes virus du bovin, le virus de la rage, le virus de l'hépatite B et C humain, le virus de la leucémie bovine, le virus de la leucémie des cellules T humaines de type I (HTVL-1), le virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1) chez une variété de système animal incluant les souris, les rats, les lapins, les vaches et les primates non-humain tels que les macaques et les chimpanzés (Kucerova, 1998). L'essai *in vivo* chez la souris d'un vaccin à ADN contenant le gène d'une glycoprotéine fortement immunogène du virus de la pseudo-rage montra une forte induction d'anticorps à long terme, jusqu'à un an suivant la dernière injection (Ho *et al.*, 1998). Le vaccin amorce-et-dose-rappel « *prime-boost* » est une nouvelle stratégie qui implique l'utilisation de vaccins à ADN pour démarrer une réponse immunitaire suivit de l'utilisation de vecteurs viraux atténués (e.g poxivirus du volaille (FPV)) pour amplifier la réponse. Cette stratégie augmente de façon importante le niveau des cellules T CD4+ et CD8+ et ainsi génère une immunité cellulaire contre une variété d'antigène ( Ramshaw et Ramsay, 2000)

## 5.2 Mécanismes de la stimulation de la réponse immunitaire

La première étape de l'immunisation génétique est l'entrée de l'ADN plasmidique contenant le gène codant pour une protéine d'intérêt à l'intérieur des cellules eucaryotes. Le promoteur fort eucaryotique présent au niveau du plasmide ainsi que la machinerie de la cellule hôte permettent la transcription de l'ADN en ARN messenger puis la traduction de l'ARN messenger en protéine qui correspond à l'antigène contre lequel des anticorps seront produits.

L'un des aspects le plus intrigant du vaccin à ADN est le mécanisme par lequel l'antigène subit une maturation moléculaire et est présenté au système pour susciter une

réponse immunitaire. Au moins trois mécanismes sont possibles : une transfection directe des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles (e.g cellules dendritiques (CD), macrophages, cellules de Langerhans), une induction directe par les cellules somatiques (myocytes, keratinocytes ou cellules exprimant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II-négatif), ou induction croisée par laquelle l'ADN plasmidique transfecte une cellule somatique et/ou une cellule présentatrice d'antigène professionnelle, et où la protéine sécrétée est récupérée par une autre cellule présentatrice d'antigène professionnelle (Gurunathan, Klinman et Seder, 2000).

### **5.2.1 La transfection directe des cellules présentatrices d'antigène**

Il a été démontré que l'injection de l'ADN plasmidique mène à la transfection de cellules présentatrices d'antigène dérivées de la moelle osseuse. Des études ont montré que les cellules dendritiques transfectées jouent particulièrement un rôle important dans l'induction de la réponse immunitaire lors d'une vaccination ADN. Ces cellules expriment fortement les molécules du CMH de classe I et II ainsi que les molécules co-stimulatrices B7-1 et B7-2. Grâce à ces caractéristiques, les cellules dendritiques activent fortement les cellules T naïves, mémoires et effectives (Kuby, 1997).

### **5.2.2 Induction directe par les cellules somatiques**

Il a été proposé que suite à une injection intramusculaire, l'ADN plasmidique subit une endocytose par les myocytes localisés au site d'injection (Ulmer *et al.*, 1996 dans Mor G., 1998). Des expériences ont démontré qu'une injection intramusculaire d'ADN plasmidique entraîne l'expression des protéines à l'intérieur des cellules musculaires et induit fortement les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (Wolf *et al.*, 1990) (Ulmer *et al.*, 1993). Les cellules musculaires semblent donc impliquées dans l'induction de la réponse immunitaire. Par contre, le rôle exact de ces cellules demeure ambigu puisqu'elles expriment les molécules du CMH de classe I sans exprimer les molécules requises pour l'induction des cellules T (e.g CD80 et CD86). Des études suggèrent que les cellules musculaires ne puissent, à elles seules, induire une réponse immunitaire (Agadjanyan *et al.*, 1999). En effet, il a été démontré que l'ablation immédiate du muscle, suite à l'injection intramusculaire d'un vaccin à ADN, n'altère pas la réponse immunitaire

subséquente (Torres *et al.*, 1997). Lors d'injections cutanées, les kératinocytes et les cellules de Langerhans sont les principales cellules transfectées ( Raz *et al.*, 1994). Contrairement aux muscles, l'enlèvement de la peau inoculée empêche le développement d'une réponse immunitaire. Il est donc possible que les cellules somatiques servent principalement de réservoir exprimant l'antigène et qu'une induction croisée soit essentielle à l'induction d'une réponse immunitaire.

### **5.2.3 Induction croisée**

Lors de l'induction croisée, les cellules somatiques ou cellules présentatrices d'antigènes transfectées génèrent une protéine qui est transférée à une autre cellule présentatrice d'antigène professionnelle (Gurunathan, Klinman et Seder, 2000). En effet, la protéine exprimée à l'intérieur d'une cellule somatique ou d'une cellule présentatrice d'antigène peut être sécrétée ou libérée suite à une apoptose ou une nécrose de la cellule (Gurunathan, Klinman et Seder, 2000). Les cellules présentatrices d'antigène professionnelles récupèrent ainsi la protéine par phagocytose ou endocytose et migrent vers les ganglions lymphatiques (Ramsay, Ramshaw et Ada, 1997). La protéine est alors présentée aux cellules lymphocytes B et T puis une réponse immunitaire est déclenchée.

## **5.3 Facteurs modulant la réponse immunitaire**

Plusieurs facteurs influencent la réponse immunitaire induite par la vaccination à ADN. Le vecteur d'expression et les motifs immunostimulateurs jouent un rôle particulièrement important dans l'aspect immunogène de ces vaccins (Gurunathan, Klinman et Seder, 2000).

### **5.3.1 Le vecteur d'expression**

Lors de vaccination à ADN, le vecteur d'expression sert de véhicule pour transporter le gène étranger à l'intérieur d'une cellule eucaryote. Certains éléments requis dans la construction du vecteur ont une influence directe sur la réplication et transcription du gène et l'expression de la protéine. Le vecteur doit nécessairement posséder une origine de réplication permettant la croissance dans les cellules bactériennes et la

préparation de grande quantité d'ADN plasmidique recombinant. L'origine de réplication ColEI de *E.coli* est fréquemment utilisée parce qu'elle permet la réplication du plasmide en un grand nombre de copies. Un gène de résistance à un antibiotique (e.g kanamycine, ampicilline) est requis pour permettre la sélection des bactéries transformées lors de la culture bactérienne. Un fort promoteur est aussi essentiel pour permettre une expression de la protéine à l'intérieur des cellules eucaryotes. Ainsi, les promoteurs viraux du cytomégalo virus (CMV) (Boshart *et al.*, 1985) et du virus simien 40 (SV40) (Moriceau *et al.*, 1981) sont fréquemment utilisés. Finalement, une séquence de polyadénylation comme celle de l'hormone de croissance du bovin ou du virus simien 40 est requise pour stabiliser l'ARN messager transcrit.

### **5.3.2 Contribution des motifs immunostimulateurs cytosine-phosphate-guanine**

L'ADN plasmidique ne sert pas uniquement de vecteur mais aussi d'adjuvant dans le procédé de l'immunisation génétique. En effet, des motifs CpG présents dans la séquence du plasmide utilisé comme vaccin à ADN peuvent influencer la réponse immunitaire (Krieg *et al.*, 1998). Les motifs immunostimulateurs CpG sont des nucléotides cytosine-phosphate-guanine non méthylés et encadrés de deux purines en 5' et de deux pyrimidines en 3'(Krieg *et al.*, 1995). Ces motifs sont 20 fois plus communs dans l'ADN des bactéries que des mammifères (Krieg *et al.*, 1995).

Les motifs CpG stimulent directement la prolifération des lymphocytes B et activent leur sécrétion d'anticorps (Krieg *et al.*, 1995). De plus, ils stimulent la production d'une série de cytokines telles que l'interleukine 6 (IL-6), interleukine 12 (IL-12), l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ), l'interféron alpha (INF $\alpha$ ) et le facteur de tumeur nécrosée alpha (FTN- $\alpha$ ) (Klinman *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996). Par la suite, une réaction en chaîne se déclenche qui amorce ainsi la réponse du système immunitaire. Par exemple, les motifs CpG stimulent les cellules présentatrices d'antigène à produire des cytokines et ces cytokines induiront à leur tour les cellules tueuses naturelles « *NK cells* » à produire l'INF- $\gamma$  (Cowdery *et al.*, 1996).

## 5.4 Méthode et voies d'immunisation

L'immunisation génétique peut être accomplie par deux techniques fondamentalement différentes. La première approche consiste à injecter l'ADN plasmidique purifié et suspendu dans une solution saline à différents sites dans les tissus. La voie la plus commune est l'injection intramusculaire au niveau des quadriceps antérieurs. L'ADN plasmidique peut être administré en utilisant un canon à gène « *gene gun* » d'abord décrit par Sanford *et al.* en 1987. Cet appareil crée des ondes de choc permettant le bombardement des cellules à transfecter par des micro-projectiles enrobés d'ADN plasmidique. De cette façon la profondeur à laquelle les micro-projectiles pénètrent et la quantité d'ADN injecté peuvent être réglées (Mor, 1998). Les micro-projectiles fréquemment utilisés sont des particules d'or de 1 à 3 µm de diamètre (Ramsay, Ramshaw et Ada, 1997). Le canon à gène semble une méthode plus efficace puisque une faible quantité d'ADN (40 ng) est requise pour susciter une réponse immunitaire comparativement aux injections intramusculaires (10-400 µg) (Mor, 1998). Des études suggèrent que l'immunisation génétique par voie intramusculaire suscite principalement une réponse Th1 alors que l'immunisation génétique par l'utilisation du canon à gène suscite principalement la réponse Th2 (Feltquate *et al.*, 1997).

## 5.5 Adjuvant génétique

### 5.5.1 Les cytokines

L'interaction des cellules lymphatiques, des cellules inflammatoires et des cellules hématopoïétiques est contrôlée par un groupe de protéines et de glycoprotéines de faibles poids moléculaires qui sont nommées les cytokines (Kuby, 1997). Les cytokines agissent comme des messagers intracellulaires dans la réponse immunitaire (Pasquini *et al.*, 1997). Les cytokines Th1 (e.g., IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 et TNF- $\alpha$ ) stimulent les cellules macrophages et les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et peuvent avoir un effet direct sur la réplication virale alors que les cytokines Th2 (e.g., IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10) agissent surtout sur les lymphocytes B (Pasquini *et al.*, 1997).

Les cytokines ont donc un potentiel intéressant comme adjuvant biologique capable de moduler la réponse immunitaire. Il a été démontré que l'injection d'un gène de

cytokine mène à son expression puis à son action biologique caractéristique *in vivo* (Raz *et al.*, 1993). Plusieurs études ont démontré que la co-injection de plasmide codant pour des cytokines résulte en la stimulation de la réponse humorale et cellulaire induite par l'antigène (Raz *et al.*, 1993, Kim *et al.*, 1997, Xiang, 1995).

#### **5.5.1.1 Cytokine induisant une réponse de type 1 (Th1)**

L'administration du vaccin à ADN avec un plasmide codant pour les cytokines IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-15 et IL-18 montre qu'il y a une tendance à induire une réponse de type 1 (Scheerlinck, 2001).

L'interleukine-2 (IL-2) a été la première cytokine utilisée comme adjuvant biologique. Des expériences ont montré que l'injection de plasmide codant pour cette cytokine permet d'augmenter systématiquement la production d'anticorps spécifiques, ainsi que le niveau d'IgG total dans le plasma (Raz *et al.*, 1993) en plus de produire une réaction inflammatoire d'hypersensibilité retardée qui s'observe normalement suite au contact de l'antigène avec les cellules T<sub>H1</sub> activées (Raz *et al.*, 1993). Ainsi, l'injection du gène de l'IL-2 a reproduit les fonctions principales de l'IL-2 dans la réponse immunitaire des cellules T dépendantes. En effet, la molécule IL-2 est reconnue pour activer les cellules T et induire la prolifération et la différenciation des cellules T naïves en cellules T mémoires ou effectives (Kuby, 1997). D'autre part, l'injection intramusculaire simultanée du gène TGF- $\beta$ 1, une cytokine antagoniste (Walh, Francis-McCartey et Mergenhausen, 1989), inhibe les effets immunostimulants humoraux et cellulaires produit par l'action du gène de l'IL-2 (Raz *et al.*, 1993).

D'autres études ont démontré que chez la souris, la co-injection du gène IL-12 avec le vaccin à ADN contre HIV-1 a pour effet de diminuer de la réponse humorale spécifique, la stimulation significative de la prolifération des de cellules T<sub>H1</sub> Ag-spécifiques et d'augmenter significativement la réponse spécifique de lymphocytes T cytotoxiques ( Kim, *et al.*, 1997). L'IL-12 est une molécule hétérodimérique produite principalement par les phagocytes. Cette cytokine induit la production d'IFN- $\gamma$  par les macrophages et les cellules tueuses naturelles et provoque le développement d'une

réponse de type Th1 (Trinchieri, 1995, Halpern, Kurlander et Pisetsky, 1996). De plus, la transfection des cellules épidermiques par le gène de l'IL-12 permet la régression de tumeurs murines (Rakhmilevich, Turner et Ford, 1996).

### **5.5.1.2 Cytokines induisant une réponse de type 2 (Th2)**

L'administration du vaccin à ADN avec un plasmide codant pour les cytokines (e.g IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13) montre qu'il y a une tendance à induire une réponse de type 2 (Th2). En effet, ces plasmides causent une augmentation des anticorps IgG1, des anticorps totaux et du ratio anticorps IgG1/IgG2a (Scheerlinck, 2001). À l'exception de l'IL-6, la réponse des cellules lymphocytes T cytotoxiques et la réaction d'hypersensibilité retardée diminuent ou demeurent inchangées lors de l'utilisation de cytokines Th2 comme adjuvant (Scheerlinck, 2001).

### **5.5.1.3 Cytokines pro-inflamatoire**

Le GM-CSF « *Granulocyte-macrophages colony-stimulating* » est une cytokine qui stimule et recrute les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (Morrisey *et al.*, 1987; Caux *et al.*, 1992; Tao et Levy, 1993). Des expériences démontrent que la co-injection d'un vecteur codant pour une glycoprotéine du virus de la rage et d'un vecteur codant pour le gène de la cytokine GM-CSF, augmente la réponse cellulaire B et T<sub>H1</sub> contre le virus de rage comparativement à l'injection du vecteur codant pour la glycoprotéine seul (Xiang et Ertl, 1995). Kim *et al.* (1997) ont aussi démontré que la co-injection d'un vecteur codant pour les protéines gag et pol du virus HIV-1 et d'un vecteur codant pour la GM-CSF résulte en l'augmentation de la réponse humorale spécifique par rapport à l'injection du vaccin HIV-1 seul. Le moment choisi pour injecter le gène codant pour la GM-CFS par rapport au gène codant pour l'antigène influence la réponse immunitaire. En effet, l'injection du plasmide codant pour la GM-CSF trois jours avant le vaccin à ADN contre le HIV-1 accroît essentiellement la réponse Th2 alors que l'injection du plasmide codant pour la GM-CSF trois jour suivant la vaccination ADN induit principalement une réponse Th1 (Kusakabe *et al.*, 2000). Par contre, Barouch *et al.* (1998) ont observé une réponse humorale plus importante lorsque le GM-CSF est injecté après ou simultanément avec le vaccin ADN HIV-1. Finalement, l'injection de gènes

codant pour des cytokines tel que l'IL-2, IL-6, IL-12 le TNF $\alpha$ , et l'IFN $\gamma$  permet la réduction de la croissance de tumeurs cancéreuses (Sun *et al.*, 1994, Irvine et al., 1996, Rakhmilevich *et al.*, 1996). Les cytokines peuvent donc avoir un effet thérapeutique dans le traitement de certains cancers.

#### **5.5.1.4 Chimiokines et molécules costimulatrices**

Les chimiokines sont un groupe de cytokines jouant un rôle important dans la réponse inflammatoire (Kuby, 1997). De façon générale, les chimiokines augmentent le ratio anticorps/ IgG et augmentent la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (Scheerlinck, 2001). La co-injection de vaccin à ADN avec des molécules costimulatrices CD86 (B7-2) accroît la réponse des cellules T auxiliaires et cytotoxiques, alors que la co-injection de CD80 (B7-1) augmente cette réponse mais plus faiblement (Scheerlinck, 2001).

### **5.6 Comparaison entre les vaccins génétiques et traditionnels**

Les vaccins à ADN ont de nombreux avantages comparativement aux vaccins traditionnels impliquant l'injection de protéines recombinantes, d'antigènes purifiés ou de microorganismes inactivés ou infectieux. La construction et la préparation du plasmide ADN devant être injecté sont plus simples et moins coûteuses que la préparation, l'expression et la purification de protéines recombinantes (Kucerova, 1998). Lors de l'injection du vaccin à ADN, le plasmide codant pour l'antigène sert aussi de vecteur pour transporter le gène *in vivo*. Il est aussi facile de modifier les gènes de la cassette d'expression par le retrait ou l'ajout de séquences possédant un rôle particulier (e.g domaine transmembranaires, séquences signales) (Babiuk, 1999). Il est même possible de construire des vecteurs dicistroniques ou multicistroniques pour exprimer plus d'un gène à l'intérieur d'une même cellule ( Kim *et al.*, 1997; Wild *et al.*, 1998).

Les vaccins à ADN permettent aussi la synthèse, dans l'hôte, d'un antigène purifié ayant une conformation native. La conformation est importante puisque les interactions entre les cellules du système immunitaire et l'antigène sont fortement dépendantes des



structures tridimensionnelles (Mor, 1998). La conformation native favorise aussi la production d'anticorps capables de neutraliser l'antigène (Kucerova, 1998). De plus, la synthèse d'un antigène purifié est plus facilement obtenue en utilisant un vaccin à ADN qu'un vaccin traditionnel. Dans ce dernier cas les antigènes sont souvent contaminés par d'autres protéines ou microorganismes. De plus, les vaccins à ADN sont reconnus pour être chimiquement et biologiquement plus stables que les vaccins traditionnels (Pasquini *et al.*, 1997). Ils sont résistants aux températures extrêmes, se conservent bien et par conséquent leur manipulation demande moins de précaution (Kucerova, 1998).

Enfin, l'un des avantages les plus importants des vaccins à ADN est leur capacité à induire une réponse humorale et cellulaire alors que la plupart des vaccins traditionnels induisent uniquement une réponse humorale (Mor, 1998).

Par contre, les vaccins à ADN posent certaines inquiétudes. Tout d'abord, leur injection répétée pourrait mener à la formation d'anticorps anti-ADN qui résulterait en une auto-immunité (Mor, 1998). Ce phénomène pourrait être influencé par la présence des motifs immunostimulateurs provenant de l'ADN bactérien (Kucerova, 1998). De plus, les myocytes capturant le plasmide et exprimant l'antigène pourraient potentiellement devenir des cibles pour les cellules T et mener à une auto-immunité des myocytes (Mor, 1998).

Des expériences ont démontré que l'utilisation de vaccin à ADN chez le nouveau-né entraîne le développement d'une tolérance à l'antigène, alors qu'aucune tolérance n'a été observée suite à l'administration de protéines exogènes (Mor *et al.*, 1996). Le système immunitaire immature du nouveau-né reconnaît la protéine du vaccin à ADN présente à l'intérieur des cellules comme une protéine du soi ce qui expliquerait le développement de la tolérance (Mor, 1998). D'autres expériences viennent contredire ces résultats. Bot *et al.* (1996) et Wang *et al.* (1997) ont effectivement observé, chez le nouveau-né, une réponse spécifique des cellules T et B contre l'antigène codé par un vaccin à ADN.

L'intégration du plasmide ADN à l'intérieur du génome de l'hôte pourrait activer des oncogènes et/ou inactiver les gènes supprimant les tumeurs ce qui entraînerait une augmentation de tumeurs malignes (Gurunathan, Klinman et Seder, 2000). Bien que ce phénomène n'ait pas été observé, il demeure une préoccupation associée à l'emploi des vaccins à ADN.

# **But et Objectifs**

Notre projet de recherche s'insère dans un projet d'envergure en cours dans nos laboratoires. Ce projet consiste en fait à l'étude du génome et du protéome du granulovirus de *Choristoneura fumiferana*, un candidat potentiel comme biopesticide pour le contrôle des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Plus précisément, nous nous occuperons à caractériser une protéine virale, la P10 ainsi que le gène codant pour cette protéine. La protéine P10 semble jouer, chez d'autres baculovirus, un rôle dans la morphogenèse de l'enveloppe du corps d'inclusion ainsi qu'un rôle dans le relâchement des particules virales à partir des cellules infectées.

Pour atteindre notre but, nous nous sommes fixés les **objectifs** suivants :

- 1) Identifier le gène p10 sur le génome viral, le cloner et le séquencer.
- 2) Analyser les séquences nucléotidiques et les séquences déduites en acides aminés pour s'assurer de l'identité du gène p10.
- 3) Produire la protéine recombinante P10 et produire des anticorps polyclonaux anti-P10 spécifiques. Pour ce faire nous allons,
  - i) Cloner le gène p10 dans un vecteur procaryote (pQE32), exprimer la protéine P10 dans des bactéries *E.Coli* M15(Rep4) et la purifier par chromatographie d'affinité. La protéine recombinante P10 servira à immuniser les souris Balb/c pour la production d'anticorps.
  - ii) Cloner le gène p10 dans un vecteur d'expression eucaryote (pcDNA3), ce vecteur sera utilisé lors des immunisations génétiques pour la production d'anticorps anti-P10.
- 4) Caractériser les anticorps anti-P10 produits pour i) leur spécificité par immunobuvardage de type Western et ii) leur cinétique, leur taux de production et leur titre par ELISA.

A travers ces objectifs, nous aurons la possibilité d'évaluer le potentiel immuno-adjuvant de l'IL-2 et de comparer le pouvoir de production des anticorps anti-P10, par les souris Balb/c, suite à l'immunisation génétique (ADN nu) par rapport à l'immunisation classique (protéine recombinante P10)

# **Matériel et Méthodes**

## 1. Identification du gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV

Le premier objectif du projet étant d'identifier et d'isoler le gène codant pour la protéine P10 dans le génome du granulovirus *de Choristoneura fumiferana* (ChfuGV), nous avons du produire et purifier le virus puis purifier son ADN génomique.

### 1.1 Production et purification du ChfuGV

Le ChfuGV a été produit *in vivo* dans les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Service Canadien des forêts de Sault-Sainte-Marie) selon la technique décrite par Forté *et al.* (1999). À l'origine, le ChfuGV a été isolé par notre laboratoire dans les larves infectées récoltées dans la région de Bonaventure en Gaspésie. Les larves ont été élevées sur de la nourriture artificielle (Grisdale et Wilson, 1993) en chambre environnementale sous des conditions constantes à une température de 25°C, une photopériode de 14:10 heures (jour: nuit) et une humidité relative de 50%. Au quatrième stade larvaire de l'insecte, un volume de 75 µl d'une suspension de ChfuGV de  $4 \times 10^6$  particules virales/ml a été étalé sur le milieu nutritif ayant une surface approximative de 78 mm<sup>2</sup>. Après 10 jours de culture en présence du ChfuGV, les larves mortes ou présentant des signes d'infection par le virus tel qu'un flétrissement, une liquéfaction ou un changement de la coloration du corps de la larve, ont été recueillies et conservées à – 20°C.

La purification du virus a été effectuée selon la technique décrite par Tomkins (1991). Les larves infectées de la tordeuse ont été homogénéisées (Omni-Mixer 17150, (Du Pont Instruments, USA) dans une solution de SDS 1% et le broyat a été filtré à travers trois épaisseurs de coton à fromage afin de retirer les débris d'insectes. Les débris résiduels ont été éliminés par centrifugation à 300 ×g pendant 5 minutes. Le surnageant récupéré a été soumis à une centrifugation à 10 000 ×g pendant 25 minutes pour récupérer le ChfuGV et les cellules infectées par le ChfuGV. Le culot a été remis en suspension dans une solution de NaCl 0,5 M et incubé 30 minutes à la température de la pièce pour permettre la lyse des cellules infectées. Par la suite, le lysat a été centrifugé deux fois à 10 000 ×g pendant 10 minutes et le culot, contenant les particules virales, a été remis en suspension dans de l'eau distillée stérile.

Les granulovirus ont été purifiés par ultracentrifugation sur un gradient de glycérol. Pour ce faire, la suspension de granulovirus a été déposée sur un gradient discontinu de glycérol (100% à 60% (v/v)) (Sigma, Canada) puis a été ultracentrifugée à 19 000 ×g pendant 45 minutes. La force centrifuge a permis la migration des granulovirus à travers le gradient de glycérol selon leur densité. Après l'ultracentrifugation, la fraction contenant le virus a été récupérée, lavée trois fois dans l'eau stérile distillée puis centrifugée à 10 000 ×g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot contenant le ChfuGV purifié a été conservé à -20°C.

## **1.2 Analyse par microscopie électronique du ChfuGV purifié**

L'examen du ChfuGV au microscope électronique a permis de vérifier l'intégrité des granulovirus purifiés et de leur dénombrement. Un volume de 100 µl de la suspension de granulovirus purifié diluée 1/2000 a été mélangé à 100 µl d'une suspension de billes de latex à  $3,51 \times 10^8$  billes/ml « S-130-3 polystyrene latex » (Agar Scientif, Royaume-Uni). Le mélange a été transféré dans un tube Beckman dans lequel une grille de cuivre (MECALAB, Canada) pour microscopie électronique a été ajoutée. Les billes de latex et les particules virales ont été fixées à la surface de la grille de cuivre suite à centrifugation à 50 000 ×g pendant 5 minutes. Les grilles ont été rincées avec l'eau distillée puis ont été séchées délicatement sur un papier buvard. Les grilles ont, par la suite, été colorées par l'ajout d'acide phosphotungstique (PTA) à 3% (pH6,0), séchées sur papier buvard puis ont été observées au microscope électronique (EM 300, Philips Electronics Industries Ltd., Eindhoven, Pays-Bas) à un grossissement de 13 000 X.

## **1.3 Isolation des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV**

Les nucléocapsides des granulovirus ont été isolées par à un traitement alcalin, suivi d'une ultracentrifugation sur un gradient de saccharose. Tout d'abord, la suspension de granulovirus purifiées a été centrifugée à 10 000 ×g pendant 5 minutes et le culot obtenu a été resuspendu dans 500 µl d'une solution de carbonate de sodium à 0,5 M (pH 10.5) afin de dissoudre les corps d'inclusion et de libérer les nucléocapsides enveloppées

des granulovirus. Le mélange a été incubé pendant 30 minutes puis a été centrifugé à 6 000 ×g pendant 10 minutes. Le surnageant, contenant les nucléocapsides enveloppées détachées de leur corps d'inclusions, a été récupéré et traité une seconde fois au carbonate de sodium. Les surnageants obtenus, suite aux deux traitements alcalins, ont été additionnés et déposés sur un gradient de saccharose discontinu de 10% à 50% (v/v). Les tubes ont été soumis à une ultracentrifugation à 25 000 ×g pendant 60 minutes à 4°C et les fractions contenant les nucléocapsides enveloppées ont été récupérées puis lavées dans l'eau distillée avant d'être ultracentrifugées à 25 000 ×g pendant 60 minutes à 4°C. Le culot contenant les nucléocapsides enveloppées purifiées, a été resuspendu dans 200 µl de tampon TE (pH7) (Tris-HCl, 0,01 M et EDTA, 0,001M) et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour la purification d'ADN.

#### **1.4 Extraction et purification de l'ADN viral du ChfuGV**

Les nucléocapsides enveloppées ont été digérées par une incubation de 60 minutes à 37°C en présence de la protéine K (250 µg/ml dans un tampon TKS (tampon TE pH7,4, et 0,5% de SDS). L'extraction de l'ADN viral a été effectuée en incubant la suspension des nucléocapsides digérées dans un volume de phénol saturé, avec le tampon TE (pH 7,4), pendant 5 minutes à 4°C. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 10 000 ×g pendant 5 minutes et la phase aqueuse contenant l'ADN virale a été récupérée. Les mêmes étapes d'extraction ont été répétées une seconde fois avec 1 volume de phénol saturé, 4 fois avec 1 volume de phénol : chloroforme : isoamyl (25 : 24 : 1), puis 2 fois avec 1 volume de chloroforme : isoamyl (24 : 1). L'ADN du granulovirus a été précipité en présence de 2,5 de volume d'éthanol 100% froid et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) pendant 18 heures à -20°C. L'ADN a été sédimenté par centrifugation à 16 000 ×g pendant 25 minutes puis lavé dans 1 ml d'éthanol à 70%. Ensuite, l'ADN a été centrifugé à 16 000 ×g pendant 10 minutes, resuspendu dans 30 µl de TE pH 7,4 puis conservé à -20°C. La pureté et la quantité d'ADN virale ont été vérifiées par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 260 nm et de 280 nm et par une analyse électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) .



Toutes les expériences d'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose ont été réalisées sur gel d'agarose à 0,8% (p/v). Les échantillons d'ADN viral à analyser ainsi que le marqueur de poids moléculaire de 1 Kb (Invitrogen Corporation) ont été dilués dans le tampon de charge (0,25% (p/v) de bleu de bromophénol, 0,25% (p/v) de Xylène-Cyanol et 30% (v/v) de Glycérol). Un volume de 5 µl des échantillons a été chargé dans les puits d'un gel d'agarose disposé dans une cellule électrophorétique horizontale (Horizon™ 11.14 BRL, Life Technologie inc.). Après une électrophorèse de 30 minutes dans un tampon TAE sous voltage constant de 100 V, le gel a été coloré au bromure d'éthidium 10 µg/ml. Les bandes d'ADN ont été visualisées, sous les rayons UV d'un transilluminateur (Bio-Rad, Canada). La longueur des fragments d'ADN a été déterminée en comparant leur distance de migration sur le gel avec celles des fragments du marqueur de poids moléculaire de 1 Kb.

### **1.5 Repêchage du gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV**

C'est par la technique de marche sur l'ADN «*cross walking*» que le gène codant pour la protéine P10 a été repêché en aval du gène codant pour la protéine P74, un gène identifié et associé au clone pBamHG de la banque génomique du ChfuGV (Merzouki, 1989). Il a été observé chez les baculovirus que les gènes codant pour les protéines P74 et P10 étaient souvent juxtaposés (Lui *et al.*, 1986; Bicknell *et al.*, 1987; Kuzio *et al.*, 1989, Hill *et al.*, 1993; Zuidema *et al.*, 1993; Van Oers *et al.*, 1998; Razuck *et al.*, 2001). L'extension d'une amorce complémentaire à la région 3' du gène codant pour la protéine P74, un gène plus conservé chez les baculovirus, a donc permis de retrouver un cadre de lecture correspondant au gène codant pour la protéine P10. Le séquençage de la région en 3' du gène codant pour la protéine P74 a été réalisé par le service de séquençage DNA Land Mark de Saint-Jean sur le Richelieu, Canada. La séquence du cadre de lecture du gène de la protéine P10 a été analysée en utilisant les bases de données du programme Fasta3 (EMBL-EBI European Bioinformatics Institute). L'alignement de la séquence déduite en acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV avec celles d'autres baculovirus a été réalisé à l'aide du programme «Multiple Sequence Alignment» (Corpet, 1988). La probabilité de retrouver une structure en superhélice «*coiled-coil*» dans la protéine P10 du ChfuGV a été calculée par la méthode de Lupas *et al.* (1991) en utilisant un cadre de

lecture de 28 acides aminés. Cette méthode consistait à comparer la séquence en acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV avec celles des protéines contenant une structure en superhélice (e.g. Tropomyosines, myosines, kératines).

## **2. Système d'expression procaryotique**

L'identification et l'analyse du gène codant pour la protéine P10 nous a permis d'entamer notre prochain objectif soit l'expression de la protéine P10 dans un système procaryotique. L'utilisation d'un système procaryotique pour exprimer la protéine recombinante P10 implique trois étapes principales : le clonage du gène codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pQE32 (Qiagen, Canada), l'expression de la protéine recombinante P10 dans les cellules bactériennes *E.coli* M15 (pREP4) et la purification de la protéine recombinante P10 par chromatographie d'affinité. Nous avons choisi un système d'expression procaryotique pour exprimer la protéine P10 du ChfuGV car il s'agit d'un système simple et peu coûteux comparativement au système eucaryotique impliquant l'utilisation de cellules de levures ou d'insectes. De plus, le système d'expression procaryotique offre généralement un rendement supérieur à celui du système d'expression eucaryotique utilisant les cellules de mammifères.

### **2.1 Clonage du gène codant pour la protéine P10**

#### **2.1.1 Amplification par PCR du gène codant pour la protéine P10**

Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier le gène codant pour la protéine P10 ont été choisies en se basant sur la séquence obtenue suite au repêchage du gène codant pour la protéine P10. L'amorce sens (p10FW) était composée de 27 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5' CGC ATG CGC ATG TCT AAA CCG AGT ATT 3') était identique à la séquence en 5' du gène codant pour la protéine P10. Des nucléotides, correspondant au site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction *SphI*, ont été ajoutés en amont de l'amorce sens. Pour sa part, l'amorce anti-sens (p10RII) était composée de 25 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5'GTG TGA TAT AAA GTA AGA TTC GAA 3') était identique à la séquence située 230 nucléotides en aval du gène codant pour la protéine P10. Des nucléotides, correspondant au site de

restriction reconnu par l'enzyme de restriction *HindIII*, ont été ajoutés en aval de l'amorce anti-sens.

L'ajout des sites de restrictions des enzymes *SphI* et *HindIII* a permis le clonage du gène codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pQE32 (Qiagen, Canada) après son clivage par les mêmes enzymes de restriction (*SphI* et *HindIII*). Les amorces utilisées pour amplifier le gène codant pour la protéine P10 ont été synthétisées à l'INRS-Institut Armand-Frappier au service de synthèse des oligonucléotides.

Pour la réaction d'amplification, 50 ng d'ADN viral matrice a été utilisé dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant du tampon (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM), un mélange de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à une concentration de 100 µM de chaque dNTP, les amorces p10F et p10RII à une concentration de 40 picomoles chacune, et 1,5 unité de l'enzyme Taq polymérase (Stratagen). La réaction d'amplification par PCR a été effectuée dans un thermocycleur programmable de AB Applied Biosystems (Gene AmPCRsystem 9700). Les paramètres expérimentaux au cours du cycle d'amplification ont été choisis comme suit : dénaturation de l'ADN matrice pendant 15 secondes à 94°C, appariement des amorces à l'ADN matrice dénaturé pendant 30 secondes à 52°C et extension, par la Taq polymérase, des amorces pendant 30 secondes à 72°C. Ce cycle a été répété 35 fois et suivi d'une étape d'extension de 10 minutes à 72°C qui a permis d'obtenir des amplicons de pleine longueur. Les fragments d'ADN amplifiés par PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

### **2.1.2 Clonage du fragment d'ADN codant pour la protéine p10 dans le vecteur pCR®2.1**

Le fragment d'ADN amplifié a été cloné dans le vecteur de clonage pCR®2.1 (Invitrogen Corporation), en utilisant le système de clonage TA cloning®Kit d'Invitrogen Corporation. Ce système est basé sur la capacité de l'ADN polymérase Taq à ajouter de simples déoxydésoxynosines (A) aux extrémités 3' de toutes les molécules doubles brins. Ces A-dépassant sont utilisés pour insérer le fragment amplifié dans le vecteur pCR®2.1 dont

les extrémités 3' T-dépassant sont utilisées comme site d'insertion. Le fragment amplifié a été cloné dans le vecteur pCR®2.1 afin de conserver sa stabilité et son intégrité et de faciliter son sous-clonage dans un vecteur d'expression pQE32.

Le produit PCR a été purifié en utilisant un filtre microcon®PCR (Millipore, Canada). Le produit PCR, placé dans un filtre, a été filtré suite à une centrifugation à 1 000 ×g pendant 15 minutes. Le produit PCR purifié a été récupéré en ajoutant 20 µl d'eau stérile sur le filtre et en centrifugeant le filtre à 1 000 ×g pendant 2 minutes en position inversée dans un tube collecteur. Le fragment d'ADN purifié a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

L'amplicon a été cloné dans le vecteur de cloange pCR®2.1 (Invitrogen Corporation) à l'aide de l'enzyme T4 ADN ligase qui forme des liaisons phosphodiester entre les extrémités 3'OH et les extrémités 5'phosphate de deux nucléotides. Ainsi, 10 ng d'ADN amplifié et 50 ng d'ADN plasmidique ont été mélangés en présence de tampon de ligation (Tris-HCl 6 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 6 mM, NaCl 5 mM, BSA (1mg/ml), β-mercaptoéthanol 7 mM, l'ATP 0,1 mM, DDT 2 mM, spermidine 1 mM) et en présence de 4 unités de l'enzyme T4 DNA ligase dans un volume final de 10 µl. Le mélange a été incubé pendant 18 heures dans un bain à 14°C afin de permettre la ligation de l'amplicon et du vecteur pCR®2.1. Le produit de ligation a été ensuite conservé à 4°C jusqu'à l'étape de la transformation des cellules bactériennes compétentes.

#### **2.1.2.1 Transformation des cellules bactériennes *E.coli* (INVαF')**

La réaction de transformation des cellules bactériennes *E.coli* INVαF' compétentes a été réalisée en utilisant le système «TA cloning®Kit» d'Invitrogen Corporation. Ainsi, 50 µl de bactéries *E.coli* INVαF' compétentes «One Shot™» (Invitrogen Corporation) 2 µl du produit de ligation ont été incubés pendant 30 minutes sur glace puis soumis à un choc thermique pendant 30 secondes à 42°C pour permettre la pénétration de l'ADN dans les bactéries. La régénération des parois bactériennes s'est faite durant une incubation de 60 minutes à 37°C avec agitation (150 rpm) dans 250 µl de

milieu SOC (2,0% p/v tryptone, 0,5% p/v extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 20 mM glucose). Après ce temps de récupération, des volumes de 20 µl, 50 µl et 150 µl de la suspension de bactéries transformées ont été étalés sur une gélose L-B Luria-Broth (1% (p/v) bactro-tryptone, 0,5% (p/v) d'extrait de levure, 1% (p/v) NaCl, 1,5% (p/v) d'agar) contenant 100 µg/ml d'antibiotique ampicilline et 40 mg/ml du substrat de sélection colorimétrique bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) (Invitrogen Corporation). Les gélouses ont été, par la suite, incubées en position inversée pendant 18 heures à 37°C à l'abri de la lumière avant le début de la sélection des colonies recombinantes.

### 2.1.2.2 Sélection des colonies recombinantes et purification de l'ADN plasmidique

Le vecteur pCR®2.1 possède comme marqueur de sélection, le gène de résistance à l'ampicilline. Ainsi, seules les bactéries ayant incorporées le plasmide pCR®2.1 peuvent croître sur un milieu contenant l'ampicilline. La sélection des clones recombinants est basée sur la couleur des colonies (blanches/bleues) découlant de la présence ou non de l'enzyme β-galactosidase fonctionnelle. En fait, la souche bactérienne utilisée possède une mutation au niveau du gène lacZ, elle synthétise donc une β-galactosidase inactive dépourvue de la séquence du peptide α. La séquence du gène LacZ α, présente sur le plasmide pCR®2.1, code pour le peptide α et permet l'α-complémentation (Ullman *et al.*, 1967) de la β-galactosidase. L'activité de la β-galactosidase rétablit par α-complémentation peut être facilement visualisée *in vivo* par un test colorimétrique, en utilisant le X-gal comme substrat. Ainsi les bactéries ayant incorporées le pCR®2.1 peuvent cliver le substrat X-gal par l'activité de la β-galactosidase et produire un produit bleu (colonie bleue). L'insertion d'un fragment d'ADN dans le vecteur pCR®2.1 interrompt le cadre de lecture du gène codant pour le peptide α, empêche l'α-complémentation et prohibe la dégradation du substrat X-gal (colonie blanche).

Ainsi, des colonies bactériennes recombinantes ont été collectées etensemencées dans 3 ml de milieu de culture bactérien LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Après

une incubation de 18 heures à 37°C, 1,5 ml de chaque culture bactérienne a été utilisé pour l'extraction de l'ADN plasmidique en utilisant le système « QIA prep® Miniprep » de Qiagen. Les volumes prélevés de chaque culture bactérienne ont été centrifugés à 13 000 ×g pendant 1 minute. Les surnageants ont été éliminés et les culots bactériens ont été resuspendus dans 250 µl de tampon de suspension (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8,0)) contenant 0,1 mg/ml de ribonucléase A. Les parois bactériennes ont été digérées avec 250 µl de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1% SDS (p/V) durant 5 minutes à température de la pièce. Les lysats bactériens ont été par la suite neutralisés avec 350 µl de tampon de neutralisation (3 M acétate de potassium (pH 5,5)). Après une centrifugation à 10 000 ×g pendant 10 minutes pour précipiter l'ADN génomique, les débris cellulaires et le SDS, les surnageants ont été transférés sur des filtres composés d'une membrane de gel-Silice (Qiagen). Les filtres ont été insérés dans un tube collecteur puis centrifugé à 10 000 ×g pendant 1 minute. Ils ont été ensuite lavés deux fois en ajoutant 750 µl de solution de lavage (75% éthanol) suivit d'une centrifugation à 10 000 ×g pendant 1 minute. L'ADN plasmidique a été élué du filtre en ajoutant 50 µl d'eau puis récupéré suite à une centrifugation de 1 minute à 10 000 ×g.

La présence du gène codant pour la protéine P10 à l'intérieur des plasmides recombinants a été confirmée par une double digestion de l'ADN plasmidique par les enzymes de restriction *HindIII* et *SphI* (Invitrogen Corporation). Pour ce faire, 3 µl (0,2 µg) d'ADN plasmidique purifié a été incubé en présence de 10 unités de l'enzyme de restriction *SphI* et de tampon de digestion « react®6 » (5 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl, 5 mM KCl) (Invitrogen Corporation) dans un volume total de 15 µl, pendant 60 minutes à 37°C. La deuxième digestion a été entamée en ajoutant, au produit de la première digestion, 10 unités de l'enzyme de restriction *HindIII* et 2 µl de tampon de digestion 10× « react®2 » (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen Corporation) de façon à obtenir un volume final de 20 µl puis en incubant à 37°C pendant 90 minutes. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

### **2.1.3 Sous clonage du fragment du gène codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pQE32**

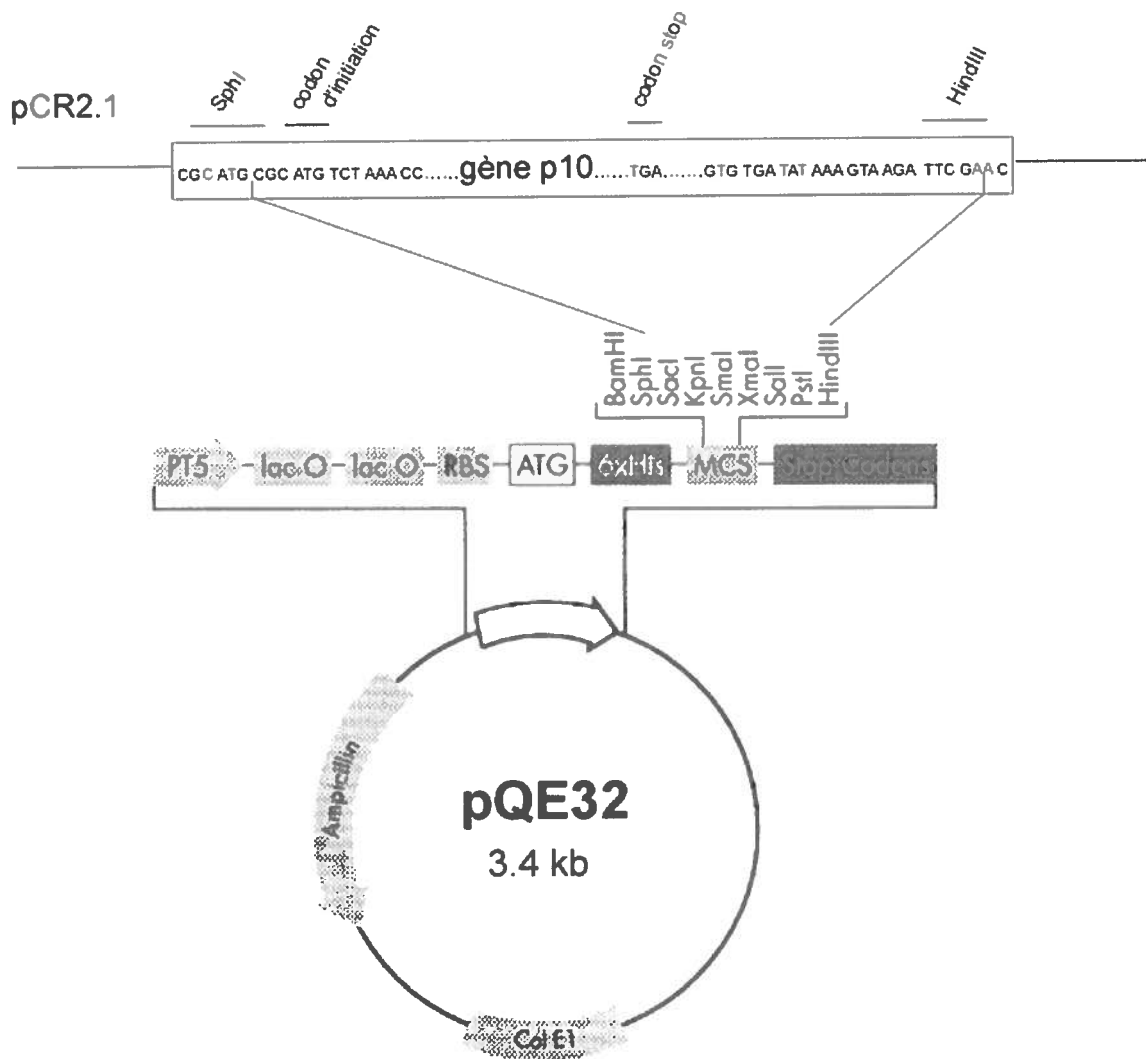
Le fragment d'ADN codant pour la protéine P10 a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pQE32 (Qiagen) (Figure 2). Ce vecteur d'expression possède, en amont de son site de clonage multiple, une séquence d'ADN codant pour six résidus histidines. Ces six résidus histidines permettent la détection de la protéine recombinante par immunobuvardage de type western et facilite la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité (NI-NTA). L'expression du gène inséré au site de clonage multiple du vecteur d'expression pQE32 est régulée par la protéine répressive lac codée par le plasmide (pREP4) de la bactérie *E.coli* M15. Cette protéine répressive empêche la transcription de gène codant pour la protéine recombinante en se liant à la séquence « opéron lac/ promoteur » du vecteur d'expression pQE32. L'expression de la protéine recombinante est induite par l'ajout d'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) qui inactive la protéine répressive lac.

#### **2.1.3.1 Digestion du fragment ADN codant pour la protéine P10 et du vecteur d'expression pQE32**

Le vecteur recombinant pCR®2.1 a été digéré en utilisant les sites de reconnaissances des endonucléases de restriction *SphI* et *HindIII* situés respectivement en amont et en aval du fragment cloné. La digestion a été réalisée en incubant 1  $\mu$ g du vecteur recombinant pCR®2.1 en présence de 20 unités de l'endonucléase *SphI*, dans un volume total de 15  $\mu$ l de tampon « react®6 » (5 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl, 5 mM KCl) (Invitrogen Corporation) pendant 2 heures à 37°C. Ensuite, l'endonucléase *SphI* a été inactivée en incubant le produit de digestion pendant 10 minutes à 54°C. La deuxième digestion a été amorcée en ajoutant, au produit de la première digestion, 20 unités de l'endonucléase *HindIII* et 2  $\mu$ l de tampon de digestion 10 $\times$  « react®2 » (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen Corporation) de façon à obtenir un volume total de 20  $\mu$ l puis en incubant 2 heures à 37°C. De la même façon, 500 ng du vecteur d'expression pQE32 ont également été digérés par les

**Figure 2 : Clonage du gène p10 dans le vecteur d'expression pQE32 (Qiagen) afin d'exprimer la protéine P10 dans un système procaryote.**





Promoteur T5/ opérateur lac: a. a. 7-87  
 Site d'initiation de la transcription T5: a. a. 61  
 Séquence codant pour les 6 résidus histidines: a. a. 127-144  
 Site de clonage multiple: a. a. 146-193  
 Site de terminaison de la transcription de Lambda to: a. a. 209-303  
 Site de terminaison de la transcription de rrnB T1: a. a. 1065-1163  
 Origine de réplcation COIE1: a. a. 1639  
 Séquence codant pour la β-lactamase: a. a. 3257-2397

endonucléases *sphI* et *HindIII*. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.

### **2.1.3.2 Extraction du fragment d'ADN codant pour la protéine p10 et du vecteur d'expression pQE32 à partir du gel d'agarose**

Suite à la migration sur gel d'agarose des produits de digestion, les bandes d'ADN d'intérêts, correspondant au vecteur d'expression pQE32 (4 500 pb) et au fragment d'ADN codant pour la protéine P10 (545 pb), ont été séparément récupérées à partir gel d'agarose en utilisant le système «Sephaglas<sup>TM</sup> BandPrep » (Amersham Pharmacia Biotech inc., Canada). Les gels d'agarose contenant l'ADN d'intérêt ont été dissous par une incubation avec 250 µl de tampon contenant de l'iodure de sodium (Amersham Pharmacia Biotech inc.), pendant 10 minutes à 60°C. L'ADN du gel d'agarose dissous a été incubé en présence 5 µl d'une solution de billes de Sephaglas BP (20% (p/v) Sephaglas, 0,15% Kathon<sup>TM</sup> CG/ICP Biocide) (Amersham Pharmacia Biotech inc.) pendant 5 minutes à température de la pièce en mélangeant toutes les minutes. L'ADN lié aux billes de Sephaglas a été centrifugé deux fois pendant 30 secondes à 13 000 ×g et lavé trois fois dans le tampon de lavage (20 mM Tris-HCl (pH8,0), 1 mM EDTA et 0,1 mM NaCl, 70% éthanol) (Amersham Pharmacia Biotech inc.). L'ADN a été élué des billes de Sephaglas en incubant le mélange pendant 5 minutes à température de la pièce en présence de 10 µl de tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl (pH8,0), 1 mM EDTA) (Amersham Pharmacia Biotech inc.). L'ADN a été récupéré en centrifugeant la suspension à 13 000 ×g pendant 30 secondes et en prélevant le surnageant. Les ADN, correspondant au vecteur d'expression pQE32 et au fragment codant pour la protéine P10, extraits du gel ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose de 0,8%.

### **2.1.3.3 Clonage du gène codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pQE32**

L'ADN codant pour la protéine P10 a été cloné dans le vecteur d'expression pQE32. La réaction de ligation a été effectuée en incubant 50 ng du vecteur pQE32, 150 ng du fragment codant pour la protéine P10 et 4 unités de l'enzyme T4 ADN ligase dans

10 µl de tampon de ligation (6 mM Tris-HCl (pH7,5), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl, 0.1mg BSA, 7 mM β-mercaptoéthanol, 0,1 mM ATP, 2 mM DDT, 1 mM spermidine) pendant 18 heures à 14°C. Le produit de ligation a été utilisé, par la suite, pour transformer les cellules bactériennes TOP 10 F' compétentes (Invitrogen Corporation) tel que décrit dans la section 2.1.2.1 de ce chapitre. Les cellules bactériennes transformées ont été étalées sur une gélose LB agar contenant 100 µg /ml d'ampicilline.

#### **2.1.3.4 Sélection des colonies recombinantes contenant le plasmide pQE32/p10.**

Seules les bactéries transformées peuvent croître sur la gélose LB contenant de l'ampicilline, et ce grâce au gène de résistance à l'ampicilline du vecteur pQE32. Ainsi, des colonies bactériennes recombinantes ont été recueillies etensemencées dans 3ml de milieu de culture bactérien LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Après une incubation de 18 heures à 37°C, 1,5 ml de chaque culture bactérienne a été utilisé pour l'extraction de l'ADN plasmidique en utilisant le système « QIA prep<sup>®</sup> Miniprep » de Qiagen. La présence du gène codant pour la protéine P10 à l'intérieur du vecteur d'expression pQE32 a été confirmé par une double digestion de l'ADN plasmidique par les endonucléases de restriction *SphI* et *HindIII*, suivi d'une analyse des produits de digestion par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

Afin de s'assurer de l'intégrité et de la séquence et du cadre de lecture du gène p10, des plasmides recombinants ont été séquencés par la technique de Sanger (Sanger *et al*, 1977) (service de séquençage du laboratoire de l'INRS-Institut Armand-Frappier). Le séquençage a nécessité l'utilisation d'une amorce sens (5' CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG 3') et anti-sens (GTT CTG AGG TCA TTA CTG G 3') complémentaires aux séquences situées respectivement en amont et en aval du site de clonage multiple du vecteur d'expression pQE32. L'analyse des séquences en acides nucléiques générées a été réalisée en utilisant le logiciel « Gene Work 2.5 » (Intelligenetics Inc., USA).

## **2.2 Expression de la protéine recombinante P10 dans un système d'expression procaryotique**

Le gène codant pour la protéine P10 cloné dans le vecteur d'expression pQE32 a été exprimé en utilisant le système « QIAexpress Expression » de Qiagen. Ce système a permis l'expression de la protéine recombinante P10 dans les cellules bactériennes *E. coli* M15 (pREP4). Le plasmide (pREP4) des cellules bactériennes contient, en outre, le gène de résistance à la kanamycine et le gène codant pour la protéine répressive lac, une protéine qui contrôle l'expression de la protéine recombinante. L'expression de la protéine recombinante dans les cellules bactériennes *E. coli* M15 (pREP4) est induite par l'ajout d'IPTG qui inactive la protéine répressive lac.

### **2.2.1 Transformation des cellules bactériennes E.coli M15(pREP4) par le plasmide recombinant pQE32/p10**

Dans la réaction de transformation, 1 µg du plasmide recombinant pQE32/p10 et 1 µg du plasmide pQE32 ont été incubés séparément en présence des cellules bactériennes *E. coli* M15 (pREP4) dans un bain de glace pendant 20 minutes. Pour permettre la pénétration de l'ADN dans les bactéries, la mixture ADN-bactéries a été soumise à un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes, puis transférée immédiatement sur glace. La régénération des parois bactériennes s'est faite durant une incubation de 60 minutes à 37°C avec agitation (150 rpm) en présence de 500 µl de PSI (milieu LB, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCL). Après ce temps de récupération, les bactéries transformées ont été étalées sur une gélose agar 2XYT (1,6% (p/v) tryptone, 1,0% (p/v) extrait de levure, 10 mM NaCl, (pH 7,0)) contenant 25 µg/ml de kanamycine et 100 µg/ml d'ampicilline puis incubées pendant 18 heures à 37°C en position inversée.

### 2.2.2 Cinétique d'expression de la protéine recombinante P10 par les bactéries *E. coli* M15 (pREP4)

Seules les bactéries transformées peuvent croître sur la gélose 2XYT contenant de l'ampicilline et de la kanamycine, et ce grâce aux vecteurs pQE32 et pREP4 qui contiennent respectivement le gène de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. Ainsi, une colonie recombinante a été repiquée dans un volume de 3 ml de milieu liquide 2XYT contenant 25 µg/ml de kanamycine et 100 µg/ml d'ampicilline puis a été incubée 18 heures à 37°C sous agitation constante à 200 rpm. Ensuite, 0,5 ml de chacune des ces cultures bactériennes a été ensemencé dans 10 ml de milieu liquide 2XYT contenant 25 µg/ml de kanamycine et 100 µg/ml d'ampicilline puis a été incubé à 37°C sous agitation constante jusqu'à ce que les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance. La phase exponentielle de croissance a été déterminée par la mesure de la densité optique (0,5-0,7) de la culture bactérienne à une longueur d'onde de 600 nm. L'expression de la protéine recombinante P10 par les bactéries *E. coli* M15 (pREP4) en phase de croissance exponentielle, a été induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Au temps 1, 2, 3, 5, 7 et 9 heures suivant l'induction, 1ml de culture bactérienne induite a été prélevé et centrifugé à 13 000 ×g pendant 1 minute. Les culots bactériens ont été conservés à -70°C jusqu'à leur analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Les protéines contenues dans le culot bactérien ont été dissociées et dénaturées par ébullition pendant 5 minutes dans le tampon électrophorèse réducteur 1× (2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glycérol, 35 mM β-mercaptoéthanol, 625 mM Tris-HCl (pH 6,8)). Un volume de 15 µl des échantillons a été chargé sur le gel de polyacrylamide 15% disposé dans une cellule électrophorétique « Mini-Protean ® II Dual Slab Electrophoresis » (Bio-Rad) contenant du tampon SDS (0,1% (p/v) SDS, 0,192 M glycine, 0,0025 M Tris (pH 8,3)). Après une électrophorèse de 45 minutes sous un voltage constant de 100 V, le gel a été coloré dans une solution de bleu de coomassie ( 0,4% (p/v) de bleu de coomassie R-250 (Bio-Rad) 40% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique) pendant 30 minutes puis

décoloré dans une solution de décoloration (40% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique) pendant 4 heures.

## **2.3 Purification de la protéine recombinante P10**

### **2.3.1 Purification de la protéine recombinante P10 par chromatographie d'affinité**

La protéine recombinante P10, liée à une queue de six résidus histidines, a été purifiée en condition native par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel et d'acide nitrilotriacétique (Ni-NTA). L'acide nitrilotriacétique (NTA) de la colonne Ni-NTA se lie à quatre des six sites de liaison de l'ion nickel laissant ainsi deux sites disponibles pour la liaison de la queue de six résidus histidines de la protéine recombinante (Figure 3). En présence d'une concentration croissante d'imidazole, un composé homologue à l'histidine, la compétition pour la liaison aux ions de nickel augmente entre l'imidazole et l'histidine. Ainsi, une forte concentration d'imidazole permet la dissociation de la queue de six résidus histidines et l'élution de la protéine recombinante de la colonne Ni-NTA.

Afin de favoriser l'expression de la protéine P10, un volume de 500ml de cellules bactériennes recombinantes *E.coli* M15 [(pREP4)(pQE32/p10)] ont été induite avec de l'IPTG 1 mM pendant 9 heures. Ensuite, les bactéries ont été centrifugées à 4 000 ×g pendant 20 minutes à 4°C. La lyse des bactéries recombinantes a été effectuée en les incubant en présence de lysozyme (1mg/ml) dans 30 ml de tampon de lyse (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM imidazole (pH 8,0)) pendant 30 minutes sur glace, puis en les soniquant « 550 Sonic Dismembrator » (Fisher, Canada) 6 × 20 secondes. Pour éviter de surchauffer les protéines bactériennes, une pause de 20 secondes a été effectuée sur la glace entre chacune des sonications. Afin d'éliminer les protéines bactériennes non solubles, le lysat bactérien a été centrifugé à 10 000 ×g pendant 25 minutes à 4°C. Le culot obtenu et un prélèvement de 200 µl du surnageant ont été conservés à 4°C pour des analyses ultérieures. Le surnageant, contenant la protéine recombinante P10 soluble a été incubé en présence de 0,5% de matrice Ni-NTA dans un volume final de 50 ml à 4°C pendant 4 heures sous une agitation constante de 200 rpm. Suite à la liaison de la protéine

**Figure 3 : Liaison entre la queue de six résidus histidines de la protéine recombinante et l'ion de nickel de la de colonne de purification Ni-NTA (Qiaexpressionist handbook, 2001).**





recombinante aux ions de nickel, la matrice a été coulée dans une colonne de 5 ml (Qiagen) qui a été fixée à la verticale à une température de 4°C. L'excédent de la colonne a été récolté puis les protéines contaminantes ont été éliminées par une série de quatre lavages de 3 ml de tampon de lavage (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole (pH 8,0)). La protéine recombinante P10 a été éluée de la matrice Ni-NTA par l'ajout de huit fois 0,5 ml de tampon d'éluion (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole (pH 8,0)). Les échantillons récoltés lors des différentes étapes de la purification de la protéine recombinante P10 ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) de 15%.

Afin de s'assurer que la protéine purifiée par chromatographie d'affinité soit la protéine recombinante P10 et non une protéine d'origine bactérienne, toutes les manipulations de purification décrites dans cette section ont été répétées une seconde fois en utilisant une culture de cellules bactériennes *E.coli* M15 (pREP4) contenant le plasmide pQE32. L'incubation des protéines du lysat bactérien *E.coli* M15 [(pREP4) (pQE32)] avec la matrice Ni-NTA a été effectuée sous agitation constante plus faible que précédemment, soit 150 rpm, afin de maximiser les liaisons entre les protéines bactériennes et les ions de nickel de la matrice.

### **2.3.2 Concentration de la protéine p10 recombinante**

La protéine recombinante P10 purifiée par chromatographie d'affinité a été concentrée par ultrafiltration des fractions recueillies lors de l'éluion. Ainsi, les fractions de l'éluion contenant la protéine recombinante P10 ont été additionnées et transférées sur un filtre de cellulose de 10 kDa de porosité « Centricon® Plus-20 » (Millipore, canada) dans 19 ml de tampon PBS 10 mM, (pH 7,2). Le filtre pourvu d'un tube collecteur a été centrifugé à 4 000 ×g pendant 25 minutes à 4°C puis le filtrat, contenant l'imidazole et les protéines contaminantes de poids moléculaire inférieur à 10 kDa, a été éliminé. La protéine recombinante P10 a été récupérée en centrifugeant le filtre en position inversée, placé dans un nouveau tube collecteur, à 1 000 ×g pendant 2 minutes à 4°C. L'échantillon contenant la protéine recombinante P10 a été conservé à -70°C.

Les protéines d'origine bactérienne *E.coli* M15 [(pREP4) (pQE32)] récoltées dans les fractions de l'élution de la chromatographie d'affinité ont été aussi concentrées par ultrafiltration tel que décrite au paragraphe précédent.

La protéine recombinante P10 et les protéines d'origine bactérienne ont été séparées par électrophorèse sur deux gels identiques de polyacrylamides (SDS-PAGE) de 15%. Après électrophorèse, les protéines du premier gel de polyacrylamide ont été colorées au bleu de coomassie et les protéines du second gel de polyacrylamide ont été transférées sur une membrane PVDF afin d'être analysées par immunobuvardage de type Western selon la technique de Burnette, (1981).

Suite au transfert des protéines, les sites libres de la membrane PVDF ont été bloqués dans une solution contenant 2% (p/v) BSA pendant 1 heure à 37°C. Ensuite la membrane a été incubée pendant 1 heure à température de la pièce en présence de l'anticorps monoclonal anti-histidine de souris « Penta-His TM Antibody » (Qiagen) (0,1 µg/ml). Cet anticorps a été utilisé parce qu'il reconnaît la queue de six résidus histidines de la protéine recombinante. La membrane a été lavée trois fois pendant 10 minutes avec le tampon de lavage contenant le Tween-20 à 0,05% (v/v) et 50 mM Tris-HCl, (pH 7,5) et ensuite incubée pendant 1 heure à température de la pièce en présence de l'anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de souris et conjugué à la biotine (CALBIOCHEM® , Biosciences Inc., Canada) dilué 1 : 250. La membrane a été lavée puis incubée 30 minutes à température de la pièce dans une solution contenant le complexe streptavidine-peroxidase (CALBIOCHEM® , Biosciences Inc.) dilué 1: 250. La membrane a été lavée puis a été incubée 10 minutes à température de la pièce dans une solution révélatrice 3-3' diamino benzidine hypochloride (DAB susbrate, CALBIOCHEM® , Biosciences Inc.)

### 2.3.3 Quantification de la protéine recombinante P10

La protéine recombinante P10 concentrée a été quantifiée par la technique de Bradford (1976). Le standard de protéine albumine provenant de sérum de bovin lyophilisé « Assay Standard II, » (Bio-Rad) a été dilué dans un tampon PBS de façon à obtenir six concentrations différentes (1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,03 mg/ml). Ensuite, des dilutions (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 et 1 : 6) de la protéine recombinante P10 ont été préparées dans un tampon PBS. Dans les puits d'un plateau de 96 puits « NUNC<sup>TM</sup> Brand Products, » (Nalge Nunc International, Denmark), 10 µl de chacune des différentes dilutions du standard et de la protéine recombinante P10 ont été transférés puis 200 µl du colorant réactif « Dye reagent » (Bio-Rad) préalablement dilué (1 partie du réactif avec 4 parties d'eau distillée) ont été ajoutés dans chacun des puits. Après une incubation de 5 minutes, la densité optique de chacun des puits a été mesurée à une longueur d'onde de 620 nm à l'aide du « *Digiscan microplate* » et du « *Digiwin Software, version 3.1* » (ASYS Hitech GnbH, source Phonenix Biotech corp., Canada). La densité optique des différentes dilutions du standard a permis d'établir une courbe standard qui a été utilisée pour déterminer la concentration de l'échantillon de la protéine recombinante P10.

### 3. Système d'expression eucaryotique

L'expression de la protéine P10 dans un système procaryotique étant réalisée nous avons pu entamer notre prochain objectif soit l'expression de la protéine P10 dans un système d'expression eucaryotique. L'expression de la protéine P10 dans un système eucaryotique consiste à cloner le gène codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3 (Invitrogen Corporation) et à incorporer le vecteur recombinant dans les cellules de souris Balb/c. Nous avons choisi ce système d'expression eucaryotique car l'étape de la purification de la protéine n'étant pas requise, il s'agit d'un système plus simple, plus rapide et moins coûteux que le système d'expression procaryotique déjà expérimenté. De plus, ce système eucaryotique permet les modifications post-transcriptionnelles de la protéine recombinante.

### **3.1 Clonage du gène codant pour la protéine P10**

L'étape de clonage est indispensable pour la réalisation d'un système d'expression eucaryotique. Cette étape comprend des manipulations similaires à celles exécutées lors des étapes de clonages nécessaires à la mise au point d'un système d'expression procaryotique.

#### **3.1.1 Amplification par PCR du gène codant pour la protéine P10**

Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier le gène codant pour la protéine P10 ont été choisies en se basant sur la séquence obtenue suite au repêchage du gène codant pour la protéine P10. L'amorce sens (FWpCDNA) était composée de 23 acides nucléiques et la séquence de ces nucléotides (5' G AAG CTT ACC ATG TCT AAA CCG A 3') était identique aux 13 premiers nucléotides du gène codant pour la protéine P10. Des nucléotides, correspondant au site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction *HindIII*, et à la séquence de Kozak (ACC) (Kozak, 1987) ont été ajoutés en amont de l'amorce sens. L'amorce anti-sens (RVpcDNA) était composée de 23 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5' C TCT AGA TAC AGC TAT ACA CTT A 3') était identique à la séquence retrouvée à la fin du cadre de lecture ouvert du gène codant pour la protéine P10. Le codon stop a été modifié par substitution et des nucléotides, correspondant au site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction *XbaI*, ont été ajoutés en aval de l'amorce anti-sens.

Les sites de restriction des enzymes *HindIII* et *XbaI* ont été ajoutés pour permettre le clonage du gène codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pcDNA3 (Invitrogen Corporation) après le clivage de ce dernier par les mêmes enzymes de restrictions (*SphI* et *HindIII*). Les amorces utilisées pour amplifier le gène codant pour la protéine P10 ont été synthétisées à l'INRS-Institut Armand-Frappier au service de synthèse des oligonucléotides.

La réaction d'amplification du gène codant pour la protéine P10 a été réalisée en utilisant les amorces FWpCDNA et RVpcDNA et en suivant la procédure d'amplification

par PCR décrite à la section 2.1.1 de ce chapitre. Les fragments d'ADN amplifiés par PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

### **3.1.2 Clonage du fragment codant pour la protéine p10 dans le vecteur pCR®2.1**

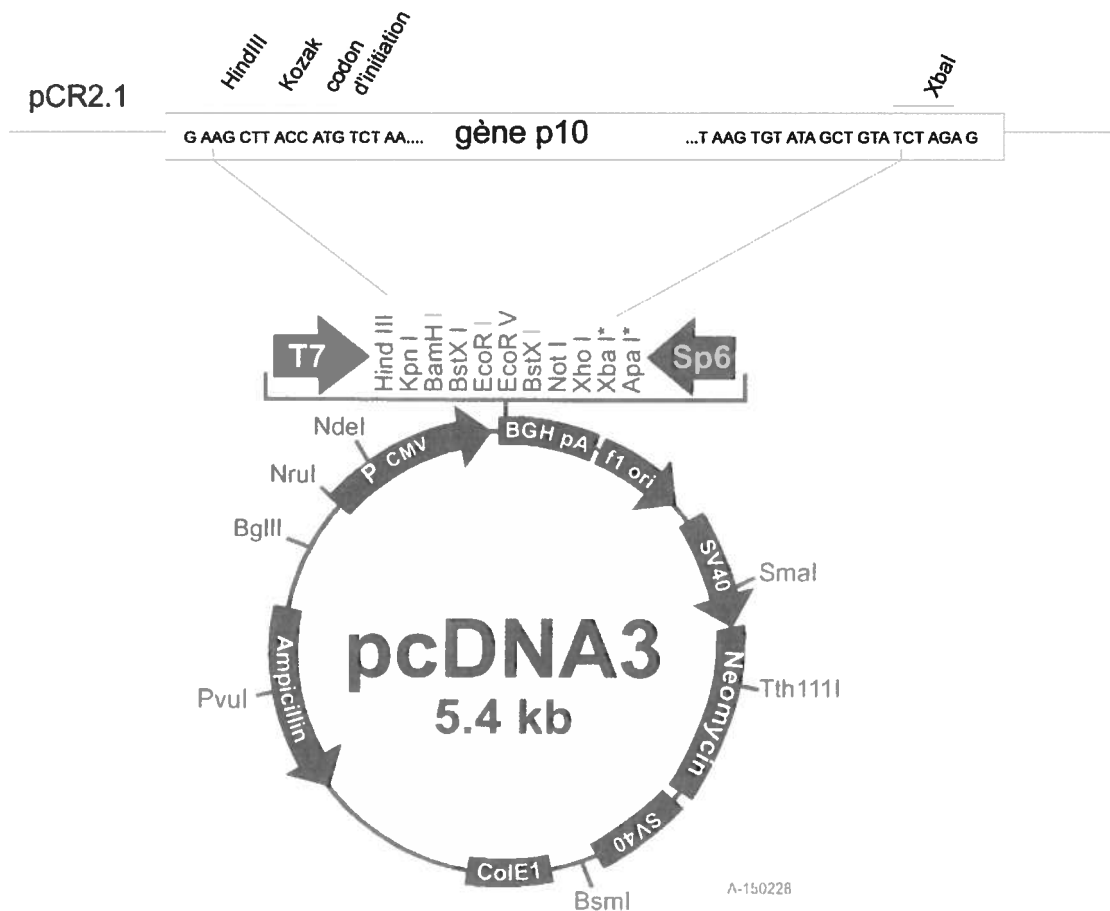
Le fragment amplifié a été cloné dans le vecteur pCR®2.1 en utilisant le système « TA Cloning®Kit »(Invitrogen Corporation) afin de conserver sa stabilité et son intégrité et de faciliter son sous-clonage dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3. Ainsi fragment amplifié a été purifié et cloné dans le vecteur pCR®2.1 tel que décrit dans les sections 2.1.2 de ce chapitre.

Les cellules bactériennes compétentes *E.coli* (INVαF') ont été transformées par choc thermique avec le plasmide recombinant pcDNA3/p10. La sélection des bactéries recombinantes a été effectuée par une extraction plasmidique suivit d'une digestion des plasmides par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I. Pour ce faire, 0,2 µg d'ADN plasmidique a été incubé en présence de 10 unités des enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I dans 20 µl d'un tampon de digestion « Reac®2 » ( 5 mM Tris- HCl (pH 8), 1 mM MgCl<sub>2</sub>) pendant 90 minutes à 37°C.

### **3.1.3 Sous clonage du fragment codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pcDNA3**

Le fragment d'ADN codant pour la protéine P10, inséré au niveau du pCR®2.1, a été sous cloné dans le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3 (Invitrogen Corporation) (Figure 4). Ce vecteur d'expression est pourvu d'une origine de croissance ColE1 qui lui permet de se répliquer en nombreuses copies dans les bactéries *E.Coli*. La transcription du gène d'intérêt, inséré dans le site de clonage multiple du vecteur, est assurée par la présence d'un promoteur du cytomégalo virus humain (CMV) à haut niveau transcriptionnel. De plus, une séquence de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGH) située en aval du site de clonage multiple stabilise les ARNm transcrits. Le

**Figure 4 : Clonage du gène p10 dans le vecteur d'expression pcDNA3 (Invitrogen Inc.) afin d'exprimer la protéine P10 dans un système eucaryote.**



- Promoteur CMV: a. a 209-863
- Promoteur T7: a. a 864-882
- Site de clonage multiple: a.a 889-994
- Promoteur Sp6: a. a 999-1016
- Queue polyadénylation du BGH : a. a 1018-1249
- Promoteur SV40: a.a 1790-2115
- Origine de répliation SV40: a. a 1984-2069
- ORF Néomycine: a. a. 2151-2945
- Queue polyadénylation du SV40: a. a. 3000-3372
- Origine de répliation ColE1: a. a. 3632-4305
- Séquence codant pour la  $\beta$ -lactamase: a. a. 4450-5310

vecteur possède aussi le gène de la  $\beta$ -lactamase (gène de résistance à l'ampicilline) qui est utilisé comme marqueur de sélection.

### **3.1.3.1. Digestion et purification du fragment ADN codant pour la protéine P10 et du vecteur d'expression pcDNA3**

Le plasmide recombinant PCR@2.1/p10 (1  $\mu$ g) et le vecteur d'expression pcDNA3 (1  $\mu$ g) ont été digérés aux sites de reconnaissances des endonucléases de restriction *Hind*III et *Xba*I situés respectivement en amont et en aval du fragment codant pour la protéine P10. Suite à la migration sur gel d'agarose des produits de la digestion, les bandes d'ADN correspondant au vecteur d'expression pcDNA3 (5 400 pb) et au fragment codant pour la protéine P10 (319 pb) ont été séparément excisées et extraites du gel d'agarose en utilisant le système sephaglas<sup>TM</sup> BandPrep de Amersham tel que décrit à la section 2.1.3.2 de ce chapitre.

### **3.1.3.2 Clonage du fragment d'ADN dans le vecteur d'expression pcDNA3 et transformation des cellules bactériennes *E. coli* XL1-Blue**

La réaction de ligation a été effectuée en incubant 30 ng du vecteur pcDNA3, 80 ng du fragment codant pour la protéine P10 et 4 unités T4 ADN ligase dans 10  $\mu$ l de tampon de ligation (6 mM Tris-HCl PH 7,5, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NsCl, 0.1 mg BSA, 7 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,1 mM ATP, 2 mM DDT, 1 mM spermidine) pendant 18 heures à 14°C.

Le produit de ligation a été utilisé pour transformer les cellules bactériennes *E. coli* XL1-Blue compétentes par choc thermique selon la technique décrite à la section 2.1.2.1 de ce chapitre. Les cellules bactériennes *E. coli* XL1-Blue compétentes ont été choisies préférentiellement aux cellules bactériennes INV $\alpha$ F' pour permettre une plus grande réplication du plasmide recombinant. Les cellules bactériennes transformées ont étéensemencées sur une gélose LB agar contenant de l'ampicilline (100  $\mu$ g/ml).



### **3.1.3.3 Sélection des bactéries XL1-Blue recombinantes**

Seules les bactéries transformées peuvent croître sur une gélose LB contenant de l'ampicilline, et ce grâce au gène de résistance à l'ampicilline du vecteur pcDNA3. Des colonies recombinantes ont été ensemencées dans 3ml de milieu LB liquide contenant 100 µg/ml d'ampicilline puis incubées à 37°C pendant 18 heures. Les plasmides recombinants ont été extraits des bactéries en utilisant le système « mini prep® » de Qiagen. La présence du gène codant pour la protéine P10 à l'intérieur des plasmides recombinants a été confirmée par une double digestion de l'ADN plasmidique par les endonucléases de restriction *HindIII* et *XbaI*. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.

Des plasmides recombinants ont été séquencés par la technique de Sanger (Sanger, 1977) (service de séquençage du laboratoire de l'INRS-Institut Armand-Frappier) pour s'assurer de la séquence et du cadre de lecture du gène p10. Le séquençage a nécessité l'utilisation d'une amorce sens (amorce universelle T7) et une amorce anti-sens (amorce universelle Sp6) complémentaire aux séquences situées en amont et en aval du site de clonage multiple du vecteur d'expression pcDNA3. L'analyse des séquences générées a été réalisée en utilisant le logiciel « Gene Work 2.5 » (Intelligenetics, USA).

## **4. Préparation des ADN plasmidiques à injecter aux souris Balb/c**

Afin de produire des anticorps anti-P10 par immunisation génétique nous avons dû d'abord produire une grande quantité des plasmides pcDNA3/p10, pcDNA3/IL-2 (fourni par le laboratoire du Dr H.Ertl de l'institut Wistar de Philadelphie), pcDNA3 (Invitrogen Corporation), et pQE32 (Qiagen). Le plasmide recombinant pcDNA3/p10 a été utilisé pour permettre l'expression de la protéine recombinante P10 dans les cellules des souris et pour produire des anticorps contre cette protéine recombinante P10. Le plasmide pcDNA3/IL-2 a été utilisé comme immuno-adjuvant afin d'augmenter la réponse immunitaire contre la protéine recombinante P10. Les plasmides pcDNA3 et

pQE32 (témoins négatifs) ont été utilisés afin de s'assurer de l'absence d'une production anticorps anti-P10 chez les souris injectées avec ces vecteurs.

#### **4.1 Production en maxipréparation des plasmides recombinants pcDNA3/p10, pcDNA3, PQE32 et pcDNA3/IL-2**

En vue des expériences impliquant l'injection de plasmides recombinants dans des cellules eucaryotes des souris Balb/c, la production à grande échelle des plasmides recombinants pcDNA3/p10 et pCDNA3/IL-2 et des plasmides pcDNA3 et pQE32 a été réalisée à l'aide du système « QIAGEN® Plasmid Purification Handbook » de Qiagen.

Des colonies bactériennes *E.coli* XL1-Blue contenant chacun des plasmides recombinants ont étéensemencées dans 3ml de milieu LB liquide contenant 100 µg/ml d'ampicilline puis ont été incubées à 37°C sous agitation pendant 8 heures. Un volume de 1 ml a étéensemencé dans 600 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline puis a été incubé 12 heures à 37°C. La culture bactérienne a été divisée en 3 fractions de 200 ml puis a été centrifugée à 6 000 ×g pendant 15 minutes à 4°C. Chacun des culots bactériens ont été délicatement resuspendu dans 10 ml du tampon de suspension (50 mM Tris-HCl, (pH 8,0), 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, 100 µg/ml de RNase A). Les parois bactériennes ont été digérées avec 10 ml de tampon de lyse ( 200 mM NaOH, 1% (p/v) SDS) pendant 5 minutes. Les lysats bactériens ont été neutralisés suite à une incubation de 20 minutes sur glace avec 10 ml de tampon de neutralisation ( acétate de potassium 3 M, (pH 5,5)). L'ADN génomique, les protéines, les débris cellulaires et le SDS ont été sédimentés suite à une centrifugation de 20 000 ×g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été centrifugé une seconde fois puis appliqué sur une colonne de résine « QIAGEN-tip 500 » (Qiagen) préalablement équilibrée avec un tampon à pH neutre (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, (pH 7,0), 15% (v/v) isopropanol). La colonne a été lavée par l'ajout de deux fois 30 ml de tampon de lavage (NaCl 1 M, MOPS 50 mM (pH 7,0), 15% (v/v) isopropanol). Ensuite, l'ADN plasmidique a été élué de la colonne par l'ajout de 15 ml de tampon d'éluion (1,4 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15% (v/v) isopropanol) puis précipité par l'addition de 10,5 ml d'isopropanol à température de la pièce suivit d'une centrifugation à 20 000 ×g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot d'ADN plasmidique obtenu a été lavé avec

5 ml d'éthanol 70% et centrifugé à 20 000 ×g pendant 10 minutes. Le culot, contenant l'ADN plasmidique a été resuspendu dans un volume de 200 µl d'eau distillée.

La quantité et la pureté de l'ADN plasmidique extrait lors de la production en maxipréparation ont été estimées en mesurant de la densité optique des échantillons d'ADN à des longueurs d'ondes de 260 nm et 280 nm. La concentration finale des ADN plasmidiques a été ajustée à 2 mg/ml avec du tampon PBS.

#### **4.2 Digestion des plasmides pcDNA3/p10, pcDNA3, pQE32 et pcDNA/IL-2**

La présence du gène codant pour la protéine P10 à l'intérieur du plasmide recombinant pcDNA3/p10 a été confirmée par une double digestion de l'ADN plasmidique par les endonucléases de restriction *HindIII* et *XbaI*. La présence du gène codant pour la cytokine IL-2 à l'intérieur du plasmide recombinant pcDNA3/IL-2 a été confirmée par la digestion de l'ADN plasmidique par l'endonucléase de restriction *BamHI* de façon à libérer le gène codant pour IL-2. L'ADN des plasmides pcDNA3 et pQE32 a été digéré par l'endonucléase de restriction *HindIII* afin de confirmer la taille des vecteurs et l'absence d'insert. Les produits de la digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.

### **5. Immunisation des souris Balb/c**

L'immunisation classique (injection de la protéine recombinante P10) et génétique (injection du plasmide recombinant pcDNA3/p10) des souris nous permettront d'atteindre un important objectif de notre projet, soit la production d'anticorps anti-P10.

#### **5.1 Protocole d'immunisation**

Les expériences d'immunisations ont été réalisées chez 30 souris femelles Balb/c âgés de 4 à 6 semaines réparties en 8 groupes de quatre souris (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, CA). Le premier groupe de souris a été injecté avec de la solution saline PBS et avec l'adjuvant de Freund. Les souris des deuxième et troisième groupes ont été injectées avec l'adjuvant de Freund et respectivement avec 50

µg du plasmide pQE32 et 50 µg du plasmide pcDNA3. Les souris du quatrième groupe ont été injectées avec 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/p10 sans adjuvant. Les souris du cinquième groupe ont été injectées avec 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/p10 avec l'adjuvant de Freund. Les souris du sixième groupe ont été injectées avec 50 µg du plasmide recombinant pcDNA/p10 et 50 µg du plasmide recombinant pcDNA3/IL-2. Les souris du septième et huitième groupes ont été injectées respectivement avec 10 µg de la protéine recombinante P10 avec l'adjuvant de Freund et avec 10 µg de la protéine recombinante P10 et 50 µg du plasmide recombinant pcDNA3/IL-2. À l'exception des souris des groupes 4, 6 et 8 toutes ont été injectées avec l'adjuvant complet de Freund lors de la première injection et avec l'adjuvant incomplet de Freund lors des doses de rappel. Le tableau 1 résume le protocole d'immunisation des souris Balb/c

## **5.2 Calendrier d'immunisation et prélèvements sanguins**

Toutes les souris ont été injectées six fois au niveau du quadriceps caudal des pattes postérieures à l'aide d'une aiguille 26G aux jours 0, 7, 14, 35, 49 et 63. Les souris ont été anesthésiées par inhalation de méthoxyflurane avant de leur prélever du sang au niveau de la veine retro-orbital de l'œil aux jours 0, 7, 35, 49. Aucun prélèvement n'a été réalisé le jour 63 pour éviter des blessures aux animaux causées par des prélèvements trop fréquents. Au jour 77, le sang a été prélevé suite à une ponction cardiaque. Les échantillons sanguins prélevés ont été centrifugés à 2 000 ×g pendant 15 minutes et les sérums, formant la couche supérieure, ont été prélevés et conservés à -70°C jusqu'à leurs analyses.

## **6. Caractérisation des anticorps anti-P10 produit par la réponse humorale**

Notre dernier objectif étant de caractériser les anticorps anti-P10 produits, nous avons donc étudié leur spécificité par immunobuvardage de type Western ainsi que leur cinétique, leur taux de production et leur titre par des tests ELISA mis au point dans notre laboratoire.

**Tableau I : Immunisation des groupes de souris**

Groupe	Nbr de souris	Produit injecté	Quantité injectée et voie d'inoculation	Volume final injecté/Animal
1	4	PBS + AF	i.m	0.05 ml
2	4	ADN plasmide pQE32 +AF	50 µg, i.m	0.05 ml
3	4	ADN Plasmide pcDNA3 +AF	50 µg, i.m	0.05 ml
4	4	ADN plasmide recombinant pcDNA3/ p10	50µg	0,05 ml
5	4	ADN plasmide recombinant pcDNA3/ p10 + AF	100 µg, i.m	0.05 ml
6	4	ADN plasmide recombinant pcDNA3/ p10 + pcDNA3/IL-2	100 µg, i.m	0,05 ml
7	4	Protéine recombinante P10 + AF	10µg, i.m	0.05 ml
8	4	Protéine recombinante P10 + pcDNA3/IL-2	10 µg protéine + 50 µg ADN, i.m	0.05 ml

## **6.1 Analyse de la spécificité des anticorps anti-P10 par immunobuvardage de type Western**

Le produit de l'expression de la protéine recombinante P10 a été fractionné par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 15% puis transféré sur une membrane PVDF (Nitrocellulose/Nylon) pour être utilisé comme antigène dans les expériences d'immunobuvardage Western. Brièvement, les sites de fixation non spécifiques libres sur la membrane PVDF ont été saturés en utilisant une solution contenant 2% (p/v) de BSA pendant 1 heure à 37°C. La membrane a été ensuite incubée pendant 1 heure à température de la pièce en présence de sérum (diluée 1:200) de souris immunisées avec la protéine recombinante P10, ou le plasmide pcDNA3/P10 ou le pcDNA3 (témoin négatif). La membrane a été lavée trois fois pendant 10 minutes avec le tampon de lavage contenant du Tween-20 à 0,05% (v/v) et 50 mM Tris-HCl, (pH7,5) et ensuite incubée pendant 30 minutes, à la température de la pièce, en présence de l'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgG de souris conjugué à la biotine (CALBIOCHEM® , Biosciences Inc., Canada) dilué 1:250. La membrane a été ensuite lavée puis incubée 30 minutes, à température de la pièce, dans une solution contenant le complexe streptavidine-peroxidase (CALBIOCHEM® , Biosciences Inc.) dilué 1:250. La membrane a été lavée puis incubée 10 minutes, à température de la pièce, dans une solution contenant le substrat 3-3' diamino benzidine hypochloride (DAB susbrate, CALBIOCHEM® , Biosciences Inc.)

## **6.2 Analyse de la cinétique, de taux de production et du titre d'anticorps anti-P10 par des tests ELISA**

Pour évaluer la réponse immunitaire humorale anti-P10 des souris immunisées, les sérums des souris ont été analysés par des tests ELISA. Dans des plateaux de 96 puits « NUNC™ Brand Products, » (Nalge Nunc International, Denmark), 10 ng de protéine recombinante P10 par puits ont été incubés pendant 18 heures à 4°C. Ensuite, ces puits ont été lavés en ajoutant 300 µl/puits de tampon de lavage (10mM PBS (pH 7,2), 0,05% Tween 20). Les sites libres des puits ont été saturés en ajoutant 300 µl/puits de tampon de blocage (2% BSA (p/v), 0,1% Tween 20, 10mM PBS pH7,2) et en incubant pendant 90

minutes à température de la pièce. Les puits ont été lavés avec le tampon de lavage et 100 µl/puits des sérums de souris Balb/c dilués de 1 :100 à 1 :12 800 ont été ajoutés et incubés pendant 1 heure. Les puits ont été lavés 5 fois avec 300 µl/puits de tampon de lavage, puis 100 µl/puits d'anticorps anti-IgG de souris (dilué 1 :6 400) produit dans la chèvre et couplé à la peroxidase (Calbiochem®, USA) ont été incubés pendant 1 heure. Ensuite, les puits ont été lavés 5 fois avec 300 µl de tampon de lavage et un volume de 100µl du complexe Streptavidine-peroxydase « Horse Radish Peroxidase » (Calbiochem®, USA) dilué 1 :250 a été ajouté et incubé pendant 30 minutes. Les puits ont été lavés 5 fois avec 300 µl de tampon de lavage puis la solution de substrat (0,4% (p/v) OPD, 0,012% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,05 M acid citric, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (pH 5,0)) a été ajoutée dans chacun des puits dans un volume final de 100µl. Après une incubation de 30 minutes à l'abri de la lumière, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 100 µl/puits de HCl 1 N puis les densités optiques (D.O) absorbées par chacun des puits ont été mesurées à une longueur d'onde de 450nm à l'aide d'un spectrophotomètre « Digiscan microplate » et du « Digiwin Software, version 3.1 » (ASYS Hitech Gnb4, source Phonenix Biotech corp., Canada).

# Résultats



## **1. Identification et caractérisation du gène codant pour la protéine P10**

### **1.1 Séquence nucléotidique du gène codant pour la protéine P10**

Le gène codant pour la protéine P10 a été repêché par la stratégie de juxtaposition dans la banque génomique du ChfuGV. Tout comme chez d'autres baculovirus, le gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV a été localisé en aval et en sens inverse du gène codant pour la protéine P74, une protéine ayant une séquence nucléotidique plus conservée que celle codant pour la protéine P10 parmi les différents baculovirus. À partir du gène codant pour la protéine P74 localisé sur le fragment G de la banque *BamHI*, le gène codant pour la protéine P10 a été séquencé par marche sur ce même fragment. L'analyse des séquences nucléotidiques a permis de démontrer que ce dernier gène est composé de 312 acides nucléiques, qu'il possède une séquence promotrice TAAG située à 18 acides nucléiques en amonts du site d'initiation de la traduction ainsi qu'un site de polyadénylation AATAA, caractéristique des gènes des baculovirus, situé à 288 acides nucléiques en aval du signal de terminaison (Figure 5).

### **1.2 Séquence en acides aminés de la protéine p10**

La détermination de la séquence en acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV a démontré que la protéine P10 est composée de 104 a.a. (Figure 6). L'analyse de la séquence en acides aminés de la région N-terminale de la protéine P10 révèle la présence d'un motif répété composé de sept acides aminés (motif hepta) où le premier et quatrième résidus sont hydrophobes. La probabilité de retrouver une structure en superhélice dans la région N-terminale de la protéine P10 du ChfuGV a été calculée par la méthode de Lupas (1991) (Figure 7). La méthode de Lupas permet de calculer la présence d'une structure en superhélice en compilant les acides aminés présents dans chaque motif hepta et en comparant les résultats obtenus avec ceux des séquences en acides aminés des protéines portant une structure en superhélice (e.g tropomyosine). La probabilité de la présence d'une structure en superhélice au niveau de la région N-terminale de la protéine P10 du ChfuGV (acides aminés 1 à 64) était élevée (64%) (Figure 7). Cette région serait composée de 7 motifs hepta déphasés après le 5<sup>e</sup> hepta par la présence de résidus non hydrophobes. L'analyse de la séquence en acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV a

**Figure 5 : Séquence nucléotidique du gène codant pour la protéine p10 du ChfuGV**

Les zones ombragées correspondent, dans l'ordre, au promoteur du gène codant pour la protéine P10, au site d'initiation (codon d'initiation), au site de terminaison (codon stop) et au site de polyadénylation de la protéine P10 du ChfuGV.

CCCCTTTTATNATTATTCACACCGTCCGGTGCAATATTATTCAGCTTTGATCAAACA  
CAGATATGATTAAAAAATATATTATAAGAATAAATTAAAAAAATGTCTAAACCG  
AGTATTTTAACGCAAATTCTTGACGCTGTGAATGTTGTTGACCAAAAAGTTGATG  
TTATAGACCAAAAAGTTGACAACTTGCAAACACAATTGAACAATTTTCAATTGGA  
TGACATTACTGCTCTTGTCAACGATGTCAACGAAAAAGTTACAAACATTCAAGAC  
ATGCTAACCGGCTTGGAACCCGAACCCAGAACCCGAACCCAGAACCCGAACCCAGAA  
CCCGAACCCAGAACCCGAACCCGAACCCGAACAATAAGGCGTTCTGTT  
GTAAATCTCACCATAAAAAAATAAGTGAATAGCTGTAATCAATTCACGCTGTT  
TCAAAGGAAATCGATGTTATACGCCACATATGAATGCGAACAAAACTCAATT  
TTTTTTAATATTAATAATTTTACAAATTAATCGTAGTCATTTTTGAATATATTATTT  
GTCAAATTAATAATGTACAAATGTTTGTAAATAATTTTGTACATTTTATTCACAAATA  
ATAAGTGTGATATAAAGTAAGAATTTTTTAGATTTAAAAAATTTTTGAATTATCTC  
GCACTCATCTTTAACACATGAAAGCTATATGTTTAAATAAACGGGGATGTCAAAGG  
TGTTGTGGAATTTGTTCAAGAAAAACCTGATATGCCAGTACGCATAATGGGATCA  
TTGAGTAATTTGTCGCAAGGATTTACGGATTTTCATATTCATGAATACGGTGACG  
TCAGCAACGGTTGTGTGTCTGCCGGTGAGCATCTTAATCCGTTTCATACAACTCA  
CGGTGGTCCTTTGAGTGANACGACATTTAGGTGATTTAGGAAACATTTATTCTA  
AAGGATTAACGTGATTACTAGATTTGAATCGTGGCAACATGA

**Figure 6 : Séquence de 104 acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV**

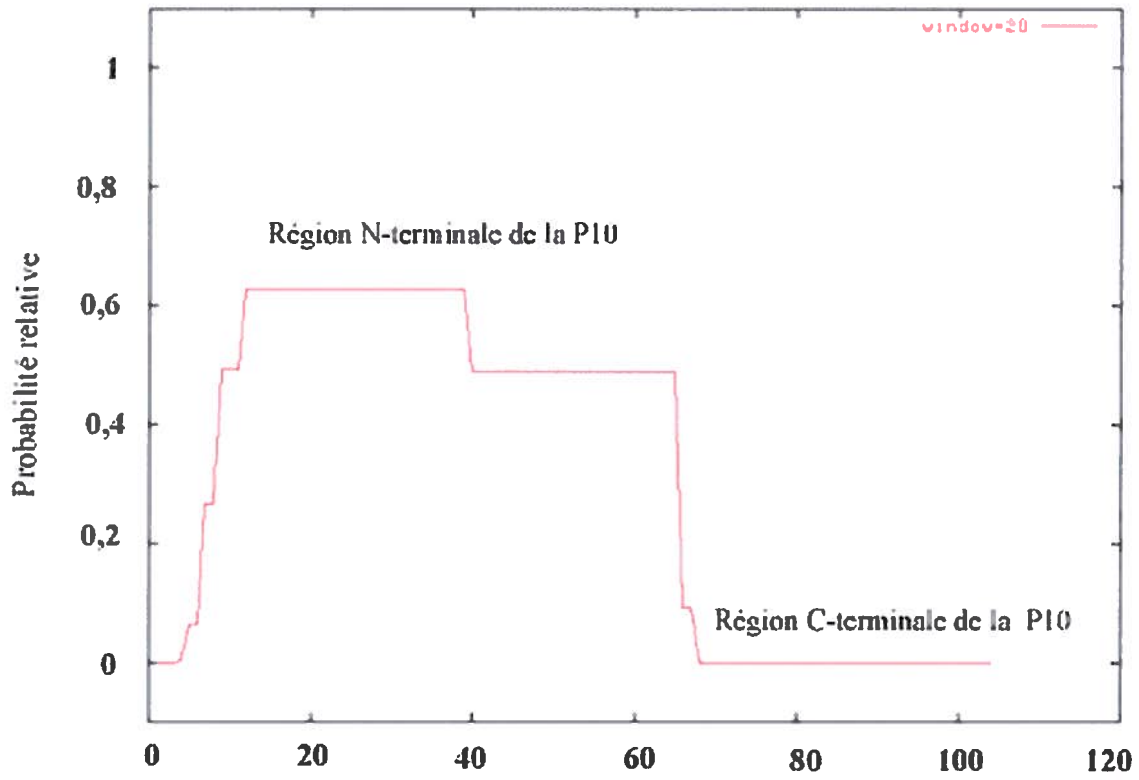
En gras, les résidus aminoacides impliqués dans la formation du domaine en superhélice « Coiled Coil » et les positions 1 et 4 occupées par des acides aminés hydrophobes. Les acides aminés soulignés forment la séquence du motif composé d'acides glutamiques et des prolines arrangés en tandem, la zone ombragée correspond à la région riche en acides aminés basiques.

1 4 1 4 1 4 1 4 1 4 1 4  
MSKPSILTQILDAVNVVDQKVDVIDQKVDNLQTQLNMFQLDDITALVNDVNE

1 4  
KVTNIQDMLTGLEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQLRRSVVKSHHKKNK

**Figure 7 : La probabilité de la présence d'un domaine en superhélice « Coiled Coil » dans la séquence en acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV**

L'axe vertical correspond à la probabilité relative entre 0 et 1 de la présence d'un domaine en superhélice. L'axe horizontal montre la position de chacun des acides aminés de la protéine P10. La prédiction, telle que décrite par Lupas *et al.*, 1991, est évaluée à l'aide d'une fenêtre de 28 résidus.



Position des acides aminés de la protéine P10 du ChfV

révélé aussi la présence d'un motif composé de 12 acides glutamiques (E) et de 12 résidus prolines (P) (acides aminés 65 à 90) arrangés en tandem. Ce motif correspondrait au domaine riche en proline déjà identifié au niveau des protéines P10 appartenant à d'autres baculovirus. Cette analyse a également montré que la région C-terminale de la protéine P10 est composée principalement d'acides aminés basiques (e.g histidine, lysine et arginine).

### **1.3 Comparaison de la protéine p10 du ChfuGV avec celles d'autres baculovirus**

La séquence en acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV a été comparée avec celles d'autre baculovirus. Les résultats de cette comparaison ont montré que la protéine P10 du ChfuGV a un faible pourcentage d'homologie avec les protéines P10 d'autres baculovirus (Tableau 2). Les séquences en acides aminés des protéines P10 des virus OpNPV et PnNPV sont celles s'approchant le plus de la protéine P10 du ChfuGV avec toutefois une homologie faible de 26,9% (Tableau 2).

## **2. Expression de la protéine P10 dans un système d'expression procaryotique**

L'expression de la protéine P10 du ChfuGV dans un système d'expression procaryotique a nécessité, le clonage du gène codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pQE32, l'expression de la protéine P10 dans les cellules bactériennes *E.coli* M15 (pREP4) et la purification de la protéine recombinante P10.

### **2.1 Clonage du fragment amplifié par PCR et contenant le gène p10 dans le plasmide pCR®2.1 et dans le vecteur d'expression pQE32**

Dans un premier temps l'amplification par PCR du fragment d'ADN correspondant au gène codant pour la protéine P10 a été effectuée à partir de l'ADN viral extrait du ChfuGV en utilisant les amorces sens et anti-sens portant respectivement les sites de reconnaissance des endonucléases de restriction *SphI* et *HindIII*. L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose, après coloration au bromure d'éthidium, du produit



Seq->	Chfug	OpNPV	ACNPV	LDNPV	SENPV	CFNPV	BMNPV	EPNPV	HASNP	HCNPV	PNNPV	SLNPV	TNSNP	PxGV;
Chfug	1.000	0.269	0.173	0.105	0.076	0.201	0.144	0.221	0.125	0.163	0.269	0.163	0.115	0.028
OpNPV	---	1.000	0.361	0.097	0.108	0.380	0.304	0.576	0.130	0.361	0.956	0.106	0.119	0.032
ACNPV	---	---	1.000	0.074	0.085	0.436	0.659	0.319	0.053	0.968	0.361	0.097	0.063	0.042
LDNPV	---	---	---	1.000	0.465	0.086	0.090	0.105	0.413	0.074	0.108	0.310	0.488	0.108
SENPV	---	---	---	---	1.000	0.147	0.090	0.136	0.420	0.095	0.119	0.310	0.511	0.125
CFNPV	---	---	---	---	---	1.000	0.432	0.388	0.080	0.425	0.369	0.067	0.088	0.036
BMNPV	---	---	---	---	---	---	1.000	0.329	0.068	0.659	0.315	0.058	0.066	0.036
EPNPV	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.103	0.319	0.543	0.077	0.111	0.035
HASNP	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.042	0.141	0.320	0.511	0.045
HCNPV	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.361	0.087	0.063	0.042
PNNPV	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.106	0.130	0.043
SLNPV	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.388	0.058
TNSNP	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.088
PxGV;	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000

**Tableau II: Homologie relative entre les différentes séquences en acides aminés des protéines P10 des baculovirus**

amplifié par PCR montre un fragment d'ADN de 545 pb qui correspondrait donc au fragment contenant le gène codant pour la protéine P10 (Figure 8).

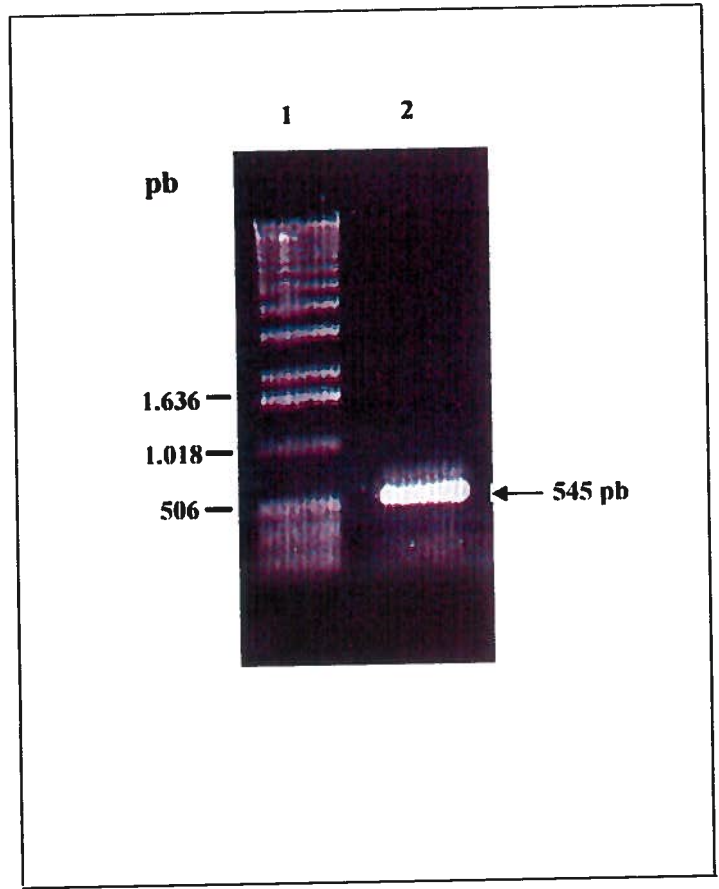
Par la suite, le fragment d'ADN amplifié a été purifié puis cloné dans le vecteur de clonage pCR®2.1 afin de conserver sa stabilité et son intégrité et de faciliter son sous clonage dans le vecteur d'expression pQE32. Un plasmide recombinant a été digéré à l'aide des enzymes de restriction *SphI* et *HindIII* puis, ainsi, l'insert libéré a été purifié à partir du gel d'agarose puis cloné dans le vecteur d'expression pQE32 digéré par les mêmes enzymes de restriction. Deux plasmides recombinants, choisis au hasard, ont été digérés par les enzymes de restrictions *SphI* et *HindIII*, et les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 9). L'analyse sur gel d'agarose montre que la digestion des deux plasmides recombinants pQE32/p10-3 et pQE32/p10-4 entraîne la libération de fragments d'ADN de 545 pb correspondant au gène codant pour la protéine P10 (Figure 9).

Le séquençage du plasmide recombinant pQE32/p10-3 a permis de confirmer que ce plasmide recombinant renferme le gène codant pour la protéine P10 du ChfuvGV. En effet, l'alignement et la comparaison de la séquence en acides nucléiques du gène inséré dans le plasmide recombinant avec celle obtenue lors du repêchage du gène codant pour la protéine P10 ont montré que les deux séquences étaient homologues à 100%. De plus, le gène codant pour la protéine P10 est dans le même cadre de lecture que le site d'initiation et l'un des sites de terminaison du vecteur d'expression pQE32. Ce plasmide a donc été utilisé pour exprimer la protéine recombinante P10 dans les cellules bactériennes *E.coli* M15 (pREP4).

## **2.2 Expression de la protéine recombinant P10 dans les cellules bactériennes *E.coli* M15 (pREP4)**

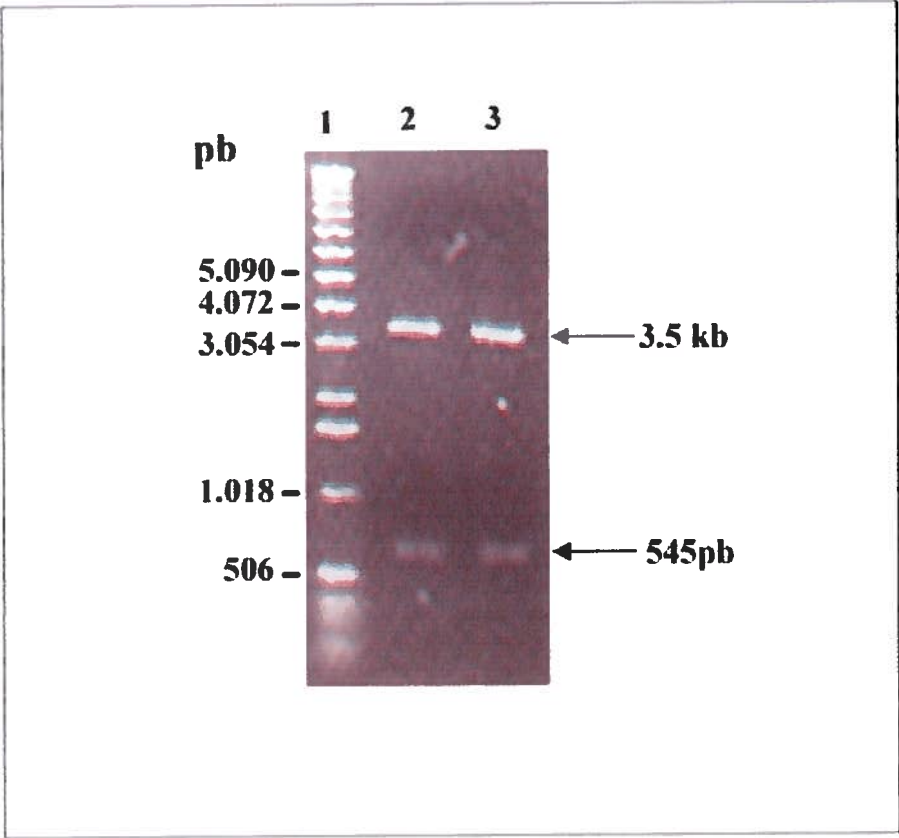
Pour exprimer la protéine P10, les bactéries *E.coli* M15 (pREP4) ont été transformées par le plasmide recombinant pQE32/p10-3. Les protéines provenant des bactéries recombinantes, prélevées à différents temps suivant l'induction de l'expression par l'IPTG, ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15% (SDS-

**Figure 8 : Profil électrophorétique du fragment d'ADN de 545 pb amplifié par PCR contenant le gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV.**



**Figure 9 : Profils électrophorétiques des plasmides recombinants contenant le gène codant pour la P10, après la digestion avec les endonucléases *SphI* et *HindIII***

La digestion des plasmides recombinants pQE32/p10 -3 et pQE32/p10-4 (Puits 2 et 3) par les endonucléases *sphI* et *HindIII* montre la présence dans ces plasmides d'un insert de 545 pb correspondant au fragment contenant le gène codant pour la protéine P10.



PAGE) puis colorées au bleu de coomassie (Figure 10). Cette analyse a montré que seule la bactérie recombinante est capable d'exprimer une protéine à 18 kDa (Figure 10, puits 5 à 9) alors que la bactérie transformée avec le vecteur d'expression seul (témoin négatif) n'exprime pas cette protéine et ce même 9 heures suivant l'induction par l'IPTG. Ce résultat montre que la protéine de 18kDa exprimée par les bactéries recombinantes correspond à la protéine recombinante P10.

## **2.3. Purification de la protéine recombinante P10**

### **2.3.1 Purification en conditions natives**

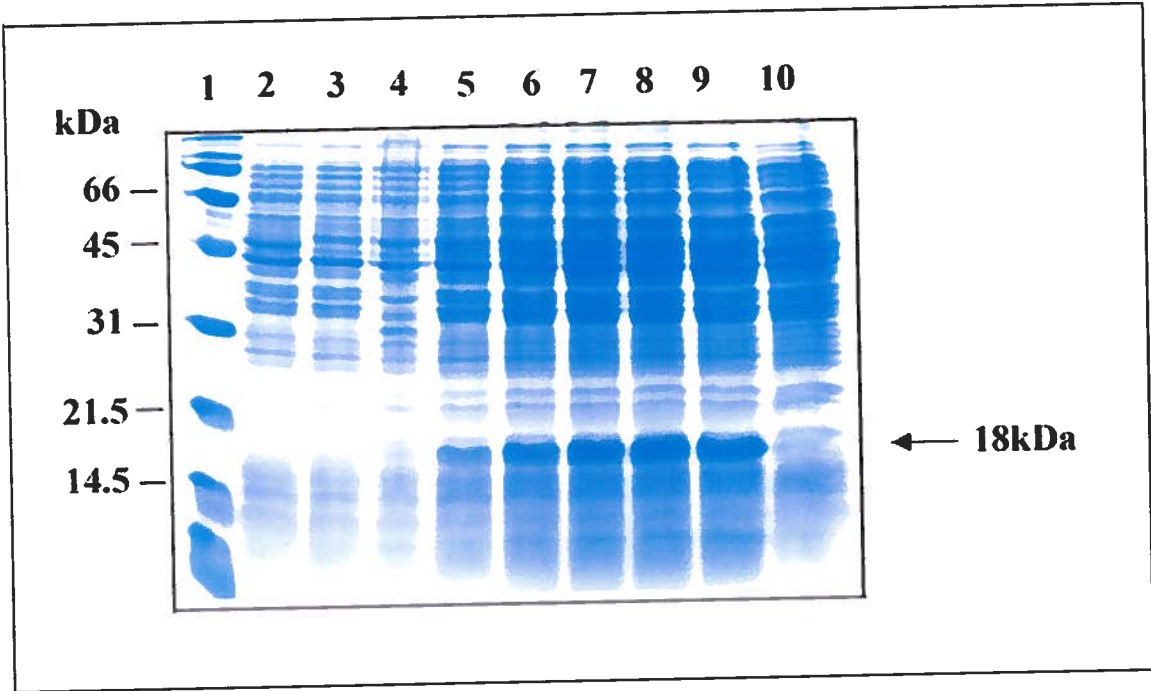
Le but de cette expérience était de purifier une quantité suffisante de la protéine recombinante P10 pour permettre l'immunisation des souris Balb/c. Les cellules bactériennes *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/ 10)] ont été induites pendant 9 heures avec de l'IPGT puis soniquées en condition native pour permettre la solubilisation de la protéine recombinante P10. Cette solubilisation devait aussi permettre la liaison de la queue de six résidus histidines de la protéine recombinante P10 à l'ion de nickel de la colonne d'affinité (Ni-NTA). Lors de la purification, les protéines recueillies dans les différentes fractions ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et colorées au bleu de coomassie (Figure 11). L'analyse par SDS-PAGE des protéines du surnageant du lysat bactérien montre la présence d'une quantité importante de la protéine recombinante P10 (Figure 11, puits 3). Alors que l'analyse par SDS-PAGE des protéines contenues dans les fractions recueillies lors des lavages de la colonne Ni-NTA révèle la présence de plusieurs protéines contaminantes. L'analyse des protéines contenues dans les fractions 2, 3, 4, 5 et 6 recueillies lors de l'élution montre la présence d'une quantité importante de protéine recombinante P10 pure (Figure 11 puits 8, 9, 10, 11 et 12)

Dans le but de s'assurer que la protéine purifiée de 18 kDa correspond à la protéine recombinante P10 et non à l'une des protéines d'origine bactériennes, les étapes de purification ont été répétées en utilisant les bactéries *E. coli* M15 (pREP4) transformées par le plasmide pQE32 (témoin négatif). L'analyse par SDS-PAGE des protéines d'origine bactérienne contenues dans les fractions recueillies lors de l'élution

**Figure 10 : Expression de la protéine recombinante P10, par les cellules bactériennes *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p10)], à différents temps d'induction par l'IPTG.**

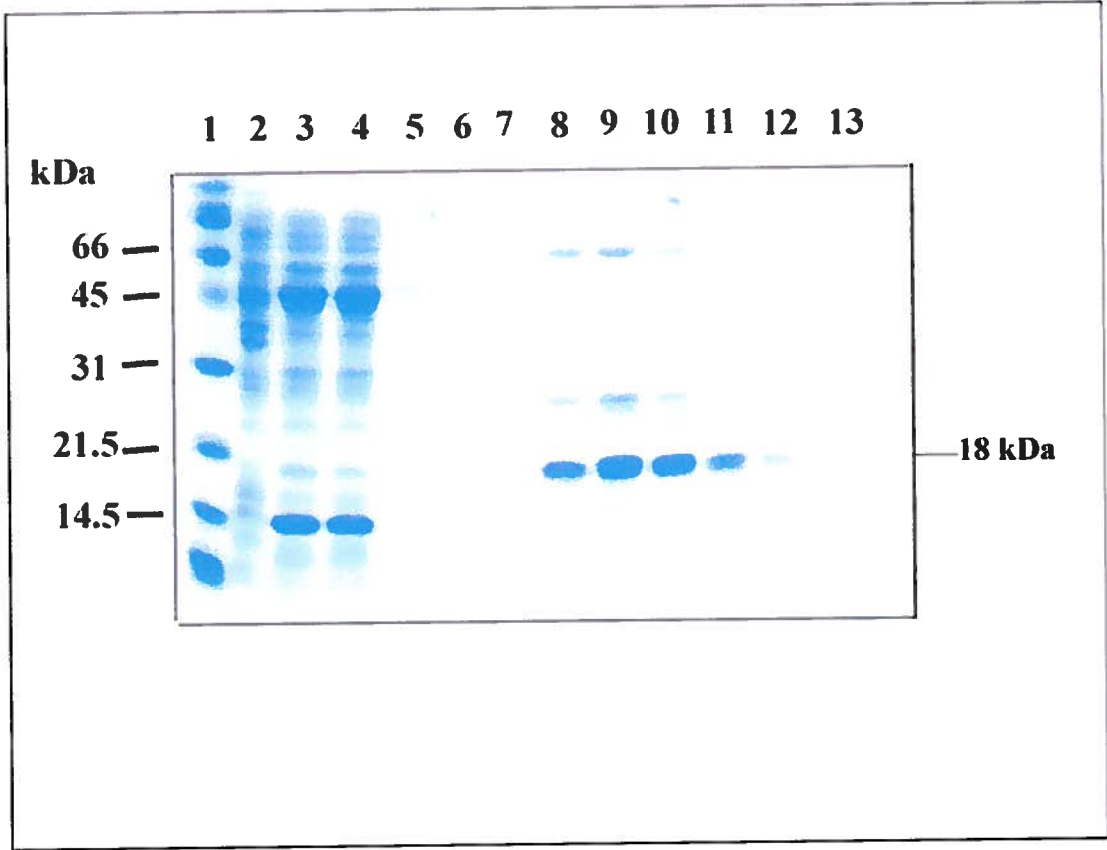
Les bactéries recombinantes *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p10)] ont été induites avec 1mM d'IPTG pendant 0, 1, 2, 3, 5, 7 et 9 heures (puits 3 à 9). Les bactéries *E. coli* M15 (pREP4) transformées avec le plasmide pQE32 seul ont également été induites avec l'IPTG pendant et 0 et 9 heures et ont été utilisées comme contrôle négatif (puits 2 et 10). Les protéines contenues dans le lysat des cellules bactériennes ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 15% (SDS-PAGE). Le gel a été coloré au bleu de coomassie pour visualiser les protéines. Cette analyse montre que les bactéries recombinantes *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p10)] expriment une protéine de 18 kDa qui n'était pas exprimée par les bactéries contrôle négatif (puits 2 et 10). La protéine de 18 kDa exprimée par les bactéries *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p10)] correspond donc à la protéine P10 du ChfuGV. Le maximum d'expression de la protéine de 18 kDa est atteint lorsque les bactéries recombinantes sont induites à l'IPTG pendant 9 heures (puits 9).





**Figure 11 : Analyse par SDS-PAGE de la protéine P10 purifiée par chromatographie d'affinité à partir des cultures de bactéries *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/ p10)].**

La protéine recombinante P10 a été purifiée à partir de lysats de bactéries recombinantes *E. coli* M15 [(pREP4) (pQE32/p10)] par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel et d'acide nitriloacétique (Ni-NTA) . Les protéines du culot et du surnageants provenant du lysat bactérien non purifié (puits 4 et 3 respectivement) ainsi que les protéines contenues dans les fractions recueillies lors des lavages de la colonne (puits 4, 5 et 6) et celles contenues dans les fractions recueillies lors de l'étape de l'élution de la protéine recombinante P10 (puits 7 à 13) ont été analysées par SDS-PAGE et visualisées après coloration du gel au bleu de coomassie. Cette analyse a démontré la présence d'une quantité importante de la protéine recombinante P10 au niveau de 18 kDa (puits 8 à 12) et la présence d'une faible quantité de protéines contaminantes d'origine bactérienne dans les fractions d'élution (puits 8 à 11).



montre la présence de quelques protéines bactériennes contaminantes mais aucune protéine de 18 kDa (Figure 12, puits 6 et 7).

### **2.3.2 Concentration et quantification de la protéine P10 recombinante purifiée**

La protéine recombinante P10 purifiée ainsi que les protéines contaminantes d'origine bactérienne ont été concentrées par ultrafiltration des fractions recueillies lors de l'élution. Les protéines ainsi concentrées ont été analysées par SDS-PAGE (Figure 13-A) et par immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la queue des six résidus histidines de la protéine recombinante P10 (Figure 13-B). L'analyse des résultats par SDS-PAGE montre que l'ultrafiltration a permis l'obtention d'une protéine recombinante P10 fortement concentrée et faiblement contaminée par une protéine d'origine bactérienne de 30 kDa. L'analyse par immunobuvardage de type Western montre que seule la protéine recombinante P10 au niveau de 18 kDa possède une queue de 6 résidus histidine pouvant lier les anticorps anti-histidines.

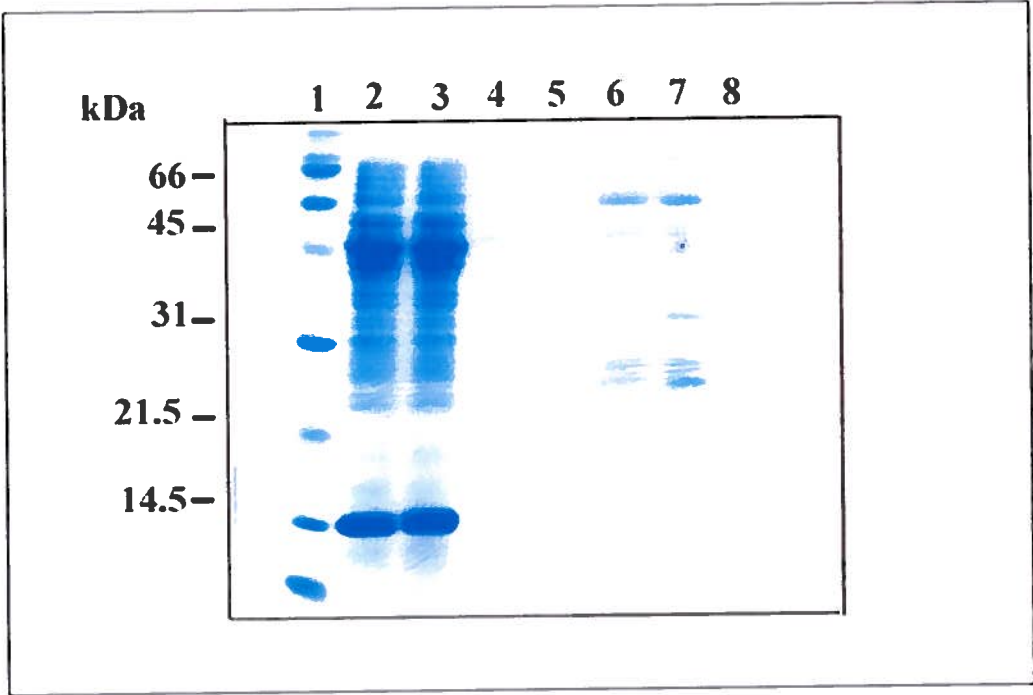
La quantification de la protéine recombinante P10 concentrée a été déterminée en utilisant le test de Bradford. Cette analyse a révélé une forte concentration en protéine dans l'échantillon avec une concentration finale d'environ 1,2 mg/L de culture. Cette quantité de protéine recombinante P10 purifiée est largement suffisante pour l'immunisation des souris afin de produire des anticorps polyclonaux anti-P10.

### **3. Expression de la protéine P10 dans un système d'expression eucaryotique**

L'expression de la protéine P10 du ChfuGV dans un système d'expression eucaryotique, basée sur le principe de la vaccination à ADN, a nécessité le clonage du gène codant pour la protéine P10 dans le vecteur d'expression pcDNA3 et l'injection intramusculaire du vecteur recombinant dans les cellules de souris. Suite à l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/p10, la protéine recombinante P10 a été directement exprimée dans les cellules de souris et a suscité une réponse immunitaire menant à la production d'anticorps anti-P10.

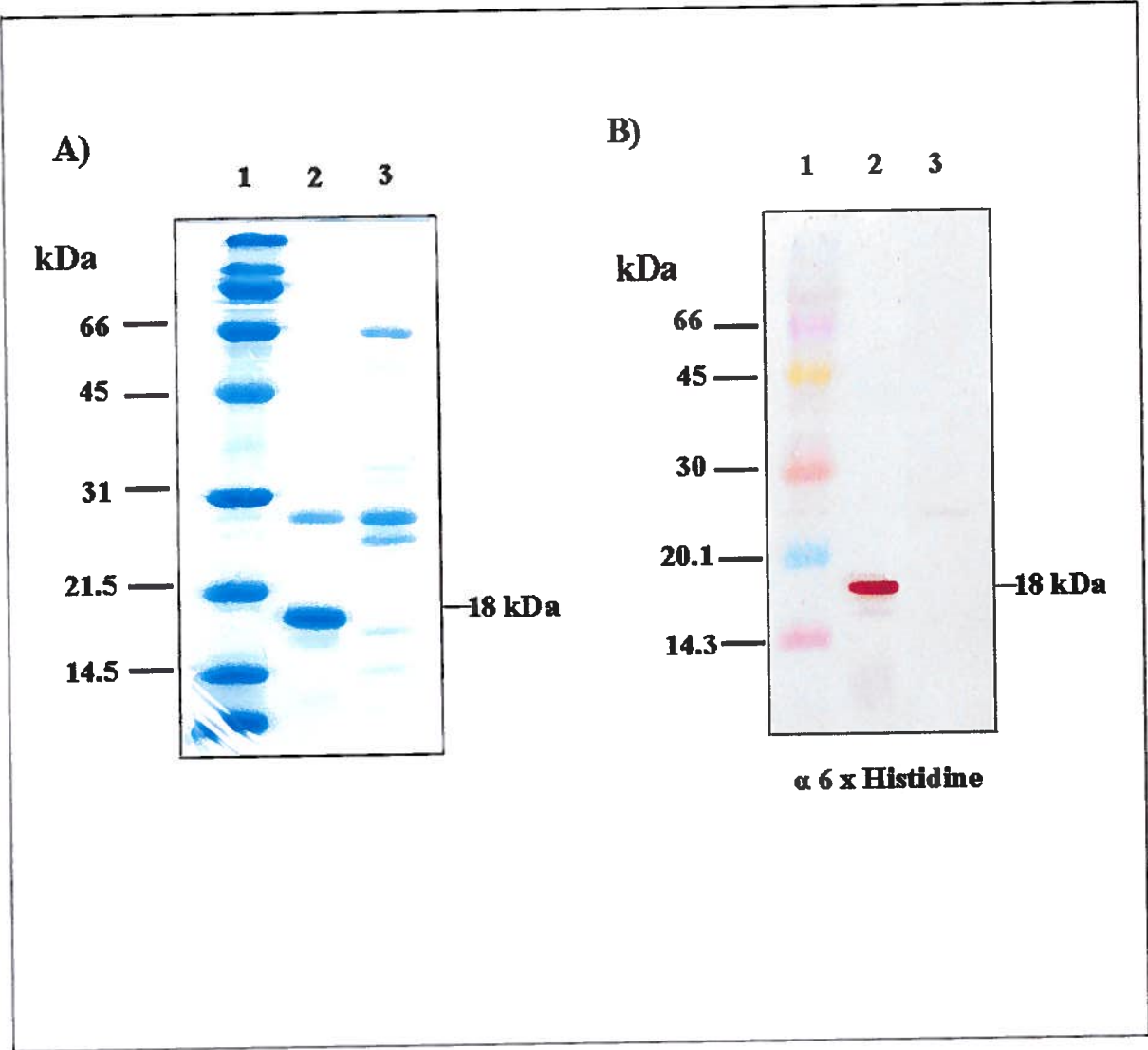
**Figure 12 : Analyse par SDS-PAGE des protéines purifiées par chromatographie d'affinité à partir des cultures de bactéries *E. coli* M15 (pREP4) transformée par le plasmide pQE32.**

Les protéines de lysats de bactéries *E. coli* M15 [(pREP4) transformées par le plasmide pQE32 ont été purifiées par chromatographie d'affinité de nickel et d'acide nitriloacétique (Ni-NTA). Les protéines des surnageants des lysats bactériens non purifiés (puits 2) ainsi que les protéines contenues dans les fractions recueillies lors des lavages de la colonne (puits 3, 4 et 5 ) et celles contenues dans les fractions recueillies lors de l'étape de l'élution (puits 6, 7 et 8) ont été analysées par SDS-PAGE et visualisées après coloration du gel au bleu de coomassie. Cette analyse a démontré la présence de protéines d'origine bactérienne capables de fixer la colonne de Nickel et ce en absence de la protéine recombinante P10 dans les fractions d'élution (puits 2 à 8).



**Figure 13 : Analyse par SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western, après concentration par ultrafiltration, de la protéine recombinante P10 et des protéines bactériennes purifiées par chromatographie**

La protéine recombinante P10 et les protéines bactériennes ont été purifiées par chromatographie et ensuite concentrées par ultrafiltration. La protéine recombinante P10 (puits 2) et les protéines contaminantes d'origine bactérienne (puits 3) ont été analysées par SDS-PAGE (figure 13-A) et par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la queue de 6 résidus histidines de la protéine recombinante P10 (figure 13-B). L'analyse des résultats par SDS-PAGE la présence d'une forte concentration de la protéine recombinante P10 purifiée mais également la présence, en plus faible quantité, d'une protéine contaminante de 30 kDa (figure 13-A, puits 2). L'analyse des résultats par SDS-PAGE montre aussi la présence de trois protéines bactériennes d'environ 66 kDa, 30 kDa et 25 kDa capables de fixer la colonne de nickel (figure 13-A, puits 3). L'analyse par immunobuvardage de type Western montre que seulement la protéine recombinante P10 est reconnue par les anticorps monoclonaux anti-histidines





### **3.1. Clonage du fragment d'ADN amplifié contenant le gène p10 dans le plasmide pCR®2.1 et dans le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3**

L'amplification par PCR du fragment d'ADN correspondant au gène codant pour la protéine P10 a été effectuée sur l'ADN viral extrait du ChfuGV en utilisant les amorces sens et anti-sens portant respectivement les sites de reconnaissances des endonucléases de restrictions *HindIII* et *XbaI*. Le fragment d'ADN amplifié par PCR est de 329 pb tel que déterminé suite à l'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose.

Le fragment d'ADN amplifié a été, par la suite, purifié et cloné dans le vecteur de clonage pCR®2.1 afin de conserver sa stabilité et son intégrité et de faciliter son sous-clonage dans le vecteur d'expression pcDNA3. Le plasmide recombinant a été par la suite digéré par les enzymes de restriction *XbaI* et *HindIII* et les produits de digestions ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. L'insert contenant les sites de restriction des enzymes *XbaI* et *HindIII* a été purifié à parti du gel d'agarose puis cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3. Les plasmides recombinants (pcDNA3/p10) ont été digérés par les enzymes de restriction *XbaI* et *HindIII* et les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette analyse a démontré que la digestion du plasmide recombinant pcDNA3/p10 entraîne la libération d'un fragment d'ADN de 329 pb qui correspond au gène codant pour la protéine P10 (Figure 14).

Un plasmide recombinant pcDNA3/p10 a été séquencé pour comparer la séquence en acides nucléiques du gène inséré avec celle obtenu lors du repêchage du gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV. Cette analyse a montré que le plasmide recombinant contenait une séquence en acides nucléiques homologue à 100 % avec celle obtenue lors du repêchage du gène codant pour la protéine P10 du ChfuGV. Ainsi, ce plasmide a été utilisé lors l'immunisation génétique.

## **4. Immunisation et évaluation de la réponse humorale**

### **4.1 Plasmides recombinants pcDNA3/p10, pcDNA3/IL2 et les plasmides pcDNA3 et pQE32 utilisés lors des expériences d'immunisation**

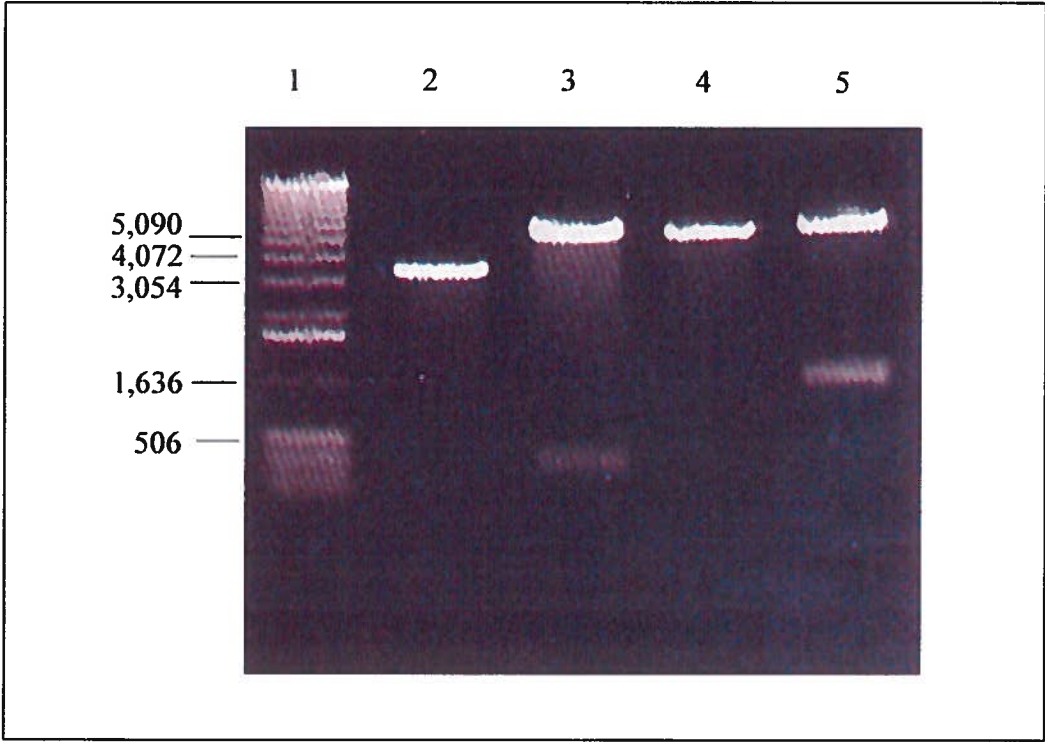
Quatre différents ADN plasmidiques ont été produits en grande quantité « maxi préparation » pour être injectés aux souris. La qualité et l'intégrité des ADN plasmidiques utilisés dans les expériences d'immunisation ont été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose. Ainsi le plasmide recombinant pcDNA3/p10 (immunisation génétique) a été injecté aux souris pour la production d'anticorps polyclonaux anti-P10 spécifiques. Le plasmide pcDNA3/IL-2 a été injecté aux souris pour permettre l'expression de IL-2 murin qui devrait servir d'immuno-adjuvant et permettre d'amplifier la réponse humorale anti-P10. Les plasmides pcDNA3 et pQE32 ont été injectés à deux groupes de souris utilisés comme témoins négatifs pour la production des anticorps anti-P10 non spécifiques (Figure 14).

### **4.2 Analyse de la spécificité des anticorps anti-P10 par immunobuvardage de type Western**

L'analyse par immunobuvardage de type Western montre clairement que l'immunisation des souris avec le plasmide pcDNA3 (contrôle négatif) ne suscite aucune production d'anticorps anti-P10 (Figure 15, puits 3). Par contre les sérums de souris immunisées avec la protéine recombinante purifiée par chromatographie d'affinité contiennent des anticorps qui reconnaissent la protéine recombinante (la bande de 18 kDa) (Figure 15, Puits 2). A noter également la détection d'une protéine de 30 kDa qui est en fait une protéine contaminante d'origine bactérienne, purifiée par chromatographie et injectée aux souris en même temps que la protéine recombinante. Les anticorps produits suite à l'immunisation génétique avec le plasmide recombinant pcDNA3/p10, et contrairement à ceux de l'immunisation classique, ne reconnaissent que la protéine recombinante, bande de 18 kDa. (Figure 15, puits 4). Ainsi les anticorps produits par immunisation génétique sont de loin plus spécifiques à la protéine P10 (bande de 18 kDa) que les anticorps produits par immunisation classique.

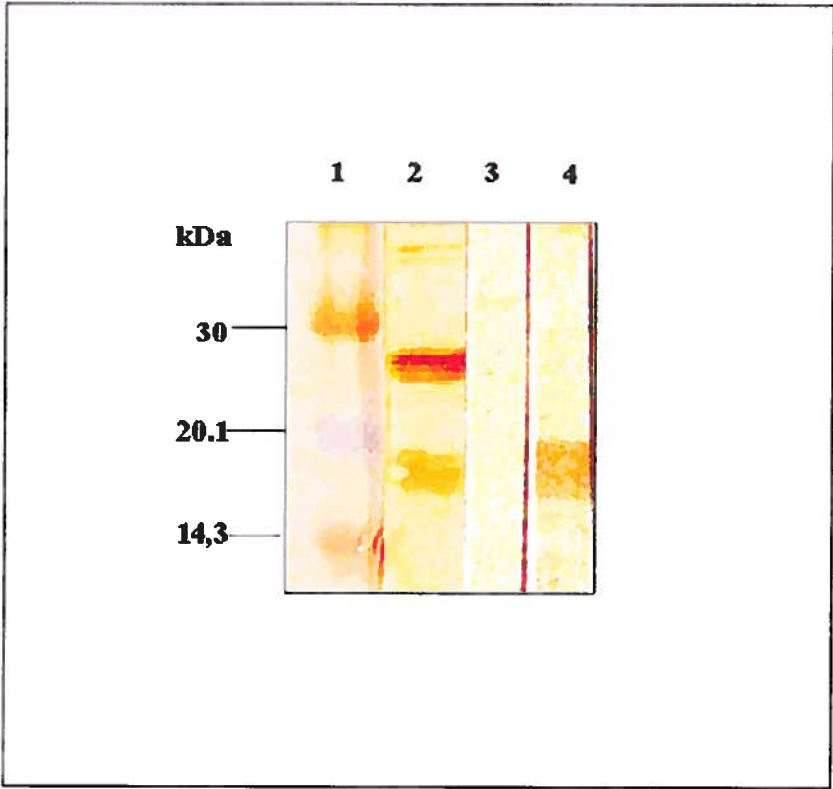
**Figure 14 : Profil électrophorétique des plasmides recombinants pcDNA3/p10, pcDNA3/IL-2 et des plasmides pcDNA3 et pQE32.**

Le plasmide pQE32 digéré par l'endonucléase *HindIII* migre à 3 400 pb (puits 2), le plasmide recombinant pcDNA3/P10 digéré par les endonucléases *HindIII* et *XbaI* libère un fragment de 329 pb correspondant au gène codant pour la protéine P10, (puits 3), le plasmide pcDNA3 digéré par *HindIII* migre à 5 400 pb (puits 4) et le plasmide pcDNA3/IL-2 digéré par l'endonucléase *BamHI* libère un fragment de 1020 pb correspondant au gène codant pour IL-2 murin (puits 5) .



**Figure 15 : Spécificité des anticorps anti-P10 produits par immunisation classique et génétique : Analyse par immunobuvardage de type Western.**

Les sérums de souris immunisées avec la protéine recombinante P10, le plasmide pcDNA ou le plasmide recombinant pcDNA3/P10 ont été utilisés dans les expériences d'immunobuvardage de type Western. La protéine recombinante P10 purifiée constitue le matériel sondé par les anticorps produits. Les sérums de souris immunisés avec la protéine recombinante contiennent des anticorps qui reconnaissent la protéine recombinante P10 (bande de 18 kDa) et une protéine contaminante d'origine bactérienne de 30 kDa (puits 2). Les anticorps présents dans les sérums de souris immunisées avec le plasmide pcDNA3 (contrôle négatif) ne reconnaissent aucune des protéines présentes sur la membrane (puits 3). Les anticorps produits suite à l'immunisation génétique avec le plasmide recombinant pcDNA3/p10 ne reconnaissent que la protéine recombinante P10 (bande de 18 KDa, puits 4).



### **4.3 Évaluation de la réponse humorale anti-P10 par ELISA**

La présence d'anticorps anti-p10 spécifiques a été vérifiée par ELISA dans les sérums des souris Balb/c immunisées. L'indice indiquant la valeur de densité optique limite (COI : *cut off index*) a été déterminé lors d'un test ELISA dit de sensibilité. Brièvement, un test ELISA a été répété 20 fois en utilisant le dernier prélèvement des sérums de souris, témoins négatifs, injectées avec le plasmide pcDNA3. La valeur de la densité optique moyenne (0,265), additionnée à la valeur de l'écart-type (0,056) multiplié par 2 a permis de déterminer à 0,378 l'indice de la valeur limite. Au-delà de cette valeur (COI = 0,378) les densités optiques sont considérées significatives.

Tel que prévu, les tests ELISA utilisant les sérums de souris, contrôles négatifs, immunisées avec une solution saline (PBS) ou avec les plasmides PQE32 et pcDNA3 ont montré des densités optiques inférieurs à celles du COI et donc non significatives (Figure 16). Ces valeurs indiquent l'absence de production d'anticorps anti-P10 dans les groupes témoins négatifs. Par contre, les tests ELISA ont clairement montré la production d'anticorps anti-P10 spécifiques par les souris immunisées avec la protéine P10 recombinante ou avec le plasmide eucaryote pcDNA3/p10 (Figure 16). A noter cependant une production d'anticorps anti-p10 suite à l'immunisation avec la protéine recombinante de loin supérieur à celle suscitée par l'immunisation génétique utilisant le plasmide pcDNA3/p10 (Figure 16).

### **4.4 Cinétique de production des anticorps anti-P10**

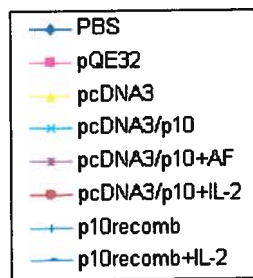
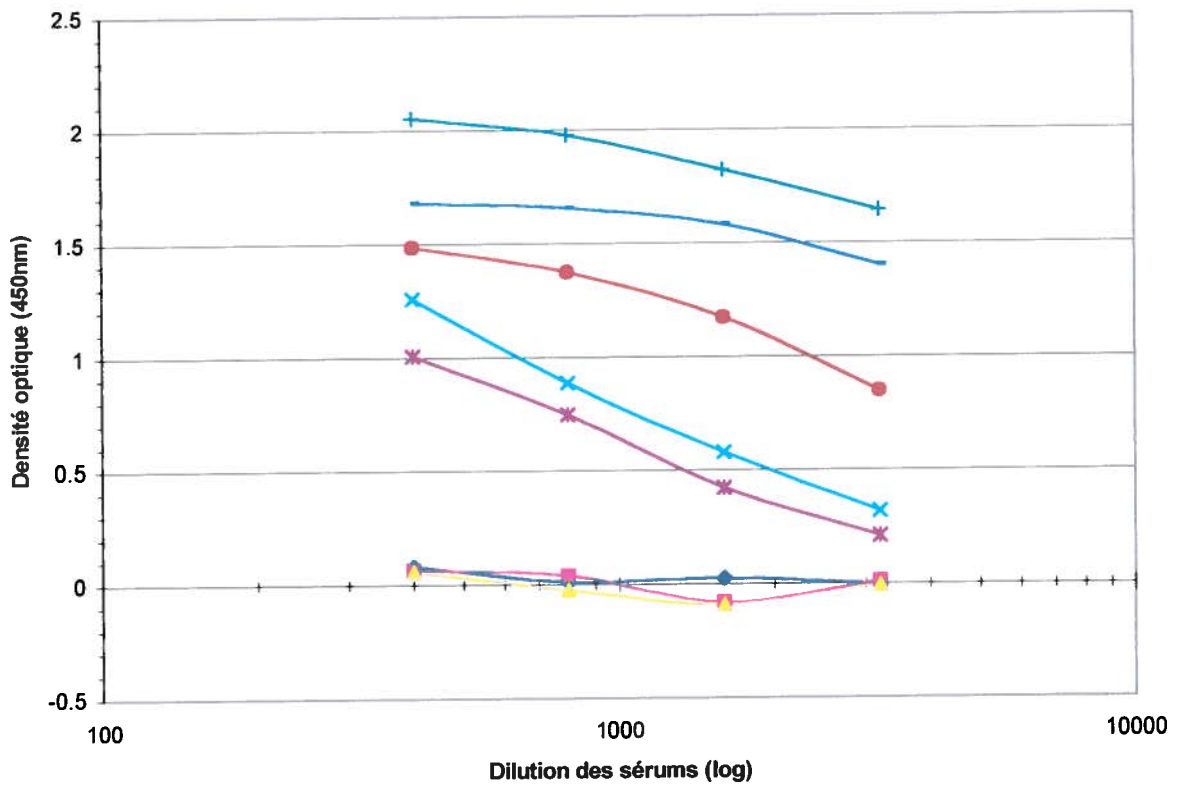
L'étude de la cinétique de production des anticorps anti-P10, nous a permis d'une part, de suivre le niveau de production des anticorps anti-P10 et d'autres part, d'évaluer le taux de production de ces anticorps suscités par l'immunisation classique et par l'immunisation génétique (Figures 17, 18, 19, 20, 21 et 22). Ainsi, nous avons pu montrer que l'utilisation de l'antigène P10 recombinante en présence de l'adjuvant de Freund suscite une réponse humorale et une augmentation significative du taux de production des anticorps anti-P10 et ce à partir de la 3<sup>ème</sup> injection (prélèvement, jour 35) (Figure 21). Fait intéressant et en comparaison à l'effet de l'adjuvant de Freund, l'utilisation de l'IL-2

**Figure 16 : Évaluation, par ELISA, de la réponse en anticorps suite à différentes immunisations.**

Les tests ELISA ont été effectués en utilisant des sérums de souris prélevés 77 jours suivant la première injection, les sérums ont été dilués 1/400, 1/800, 1/1600 et 1/3200.

PBS :	Témoin négatif
PQE32 :	Vecteur procaryote seul utilisé comme témoin négatif
PcDNA3 :	Vecteur eucaryote seul utilisé comme témoin négatif
PcDNA3/p10 :	Plasmide recombinant exprimant la protéine p10
PcDNA3/p10 + AF :	Plasmide recombinant exprimant la protéine p10 injecté avec l'adjuvant de Freund
PcDNA3/p10 + IL-2 :	Plasmide recombinant exprimant la protéine p10 co-injecté avec le plasmide recombinant exprimant l'IL-2
p10recomb :	Protéine p10 recombinante injectée avec l'adjuvant de Freund
P10recomb + IL-2 :	Protéine p10 recombinante co-injectée avec le plasmide recombinant exprimant l'IL-2

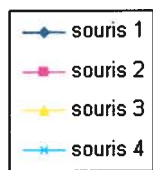
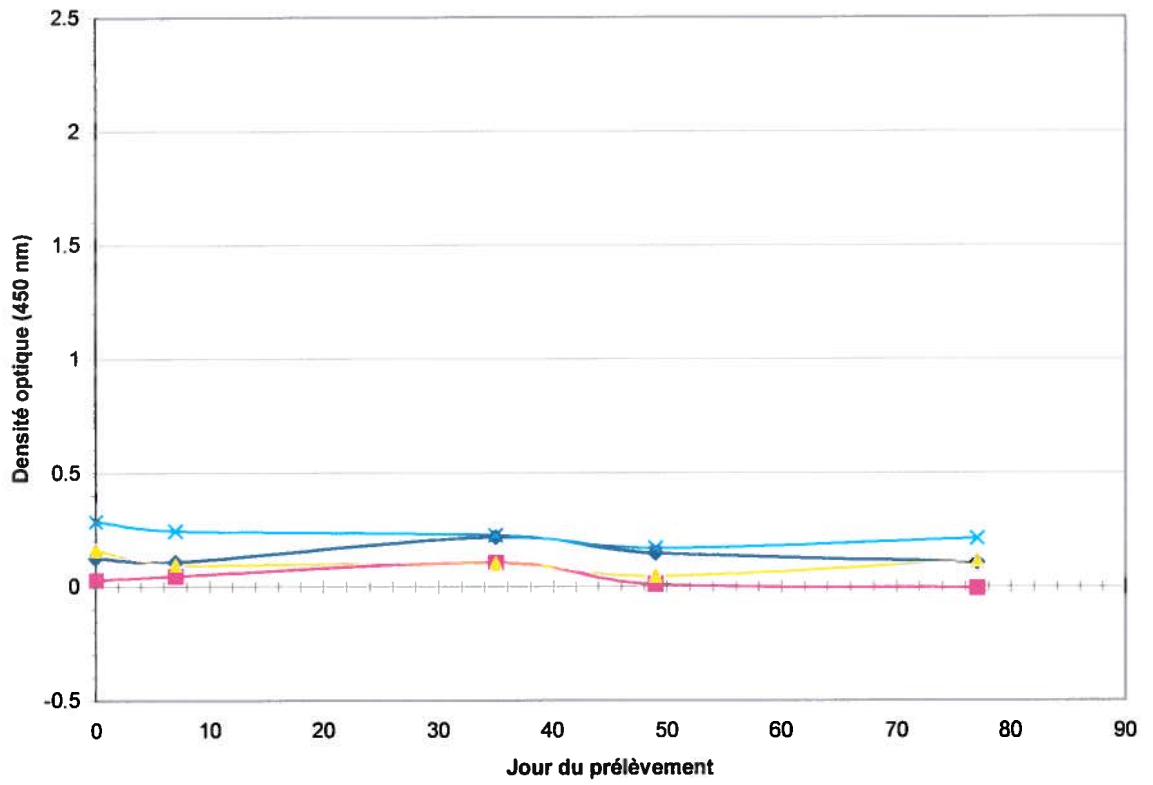




**Figure 17 : Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à l'injection du plasmide pcDNA3 avec l'adjuvant de Freund.**

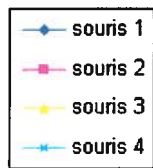
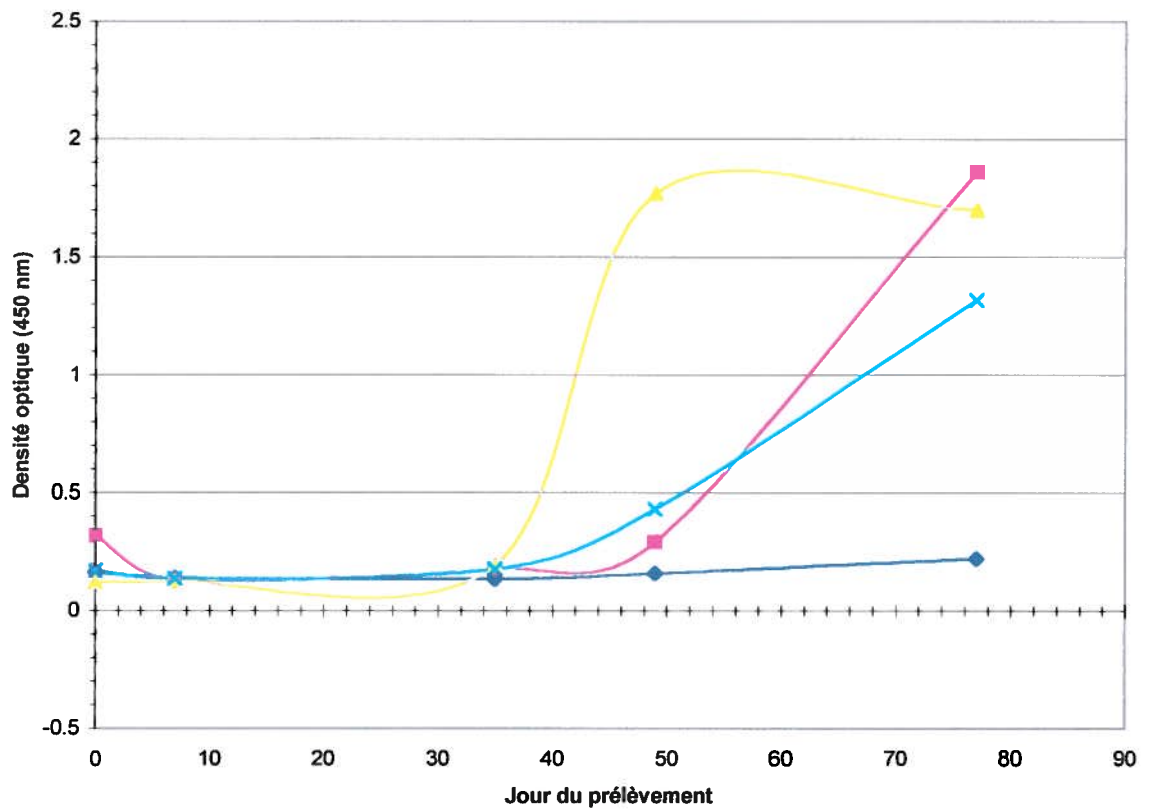
Les souris ont été injectées au jour 0 et ont reçu par la suite 5 doses de rappel (au jour 7, 14, 35, 49 et 63) Les tests ELISA ont été réalisés en utilisant des sérums de souris (dilués 1/100) prélevés au jour 0, 7, 35, 49 et

77



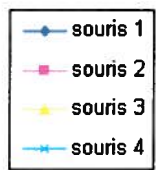
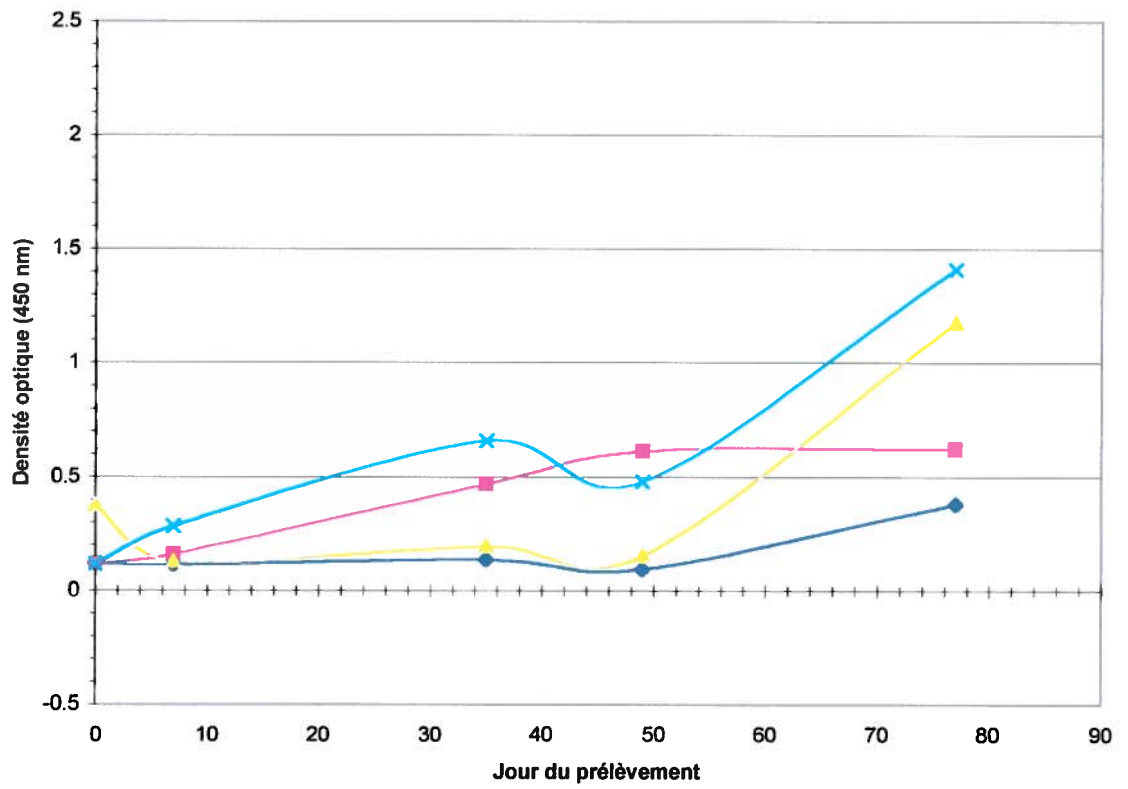
**Figure 18 : Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/p10 sans adjuvant**

Les souris ont été injectées au jour 0 et ont reçu par la suite 5 doses de rappel (au jour 7, 14, 35, 49 et 63). Les tests ELISA ont été réalisés en utilisant les sérums de souris (dilués 1/100) prélevés au jour 0, 7, 35, 49 et 77 .



**Figure 19 : Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/p10 avec l'adjuvant de Freund.**

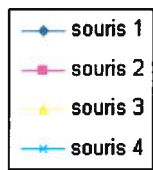
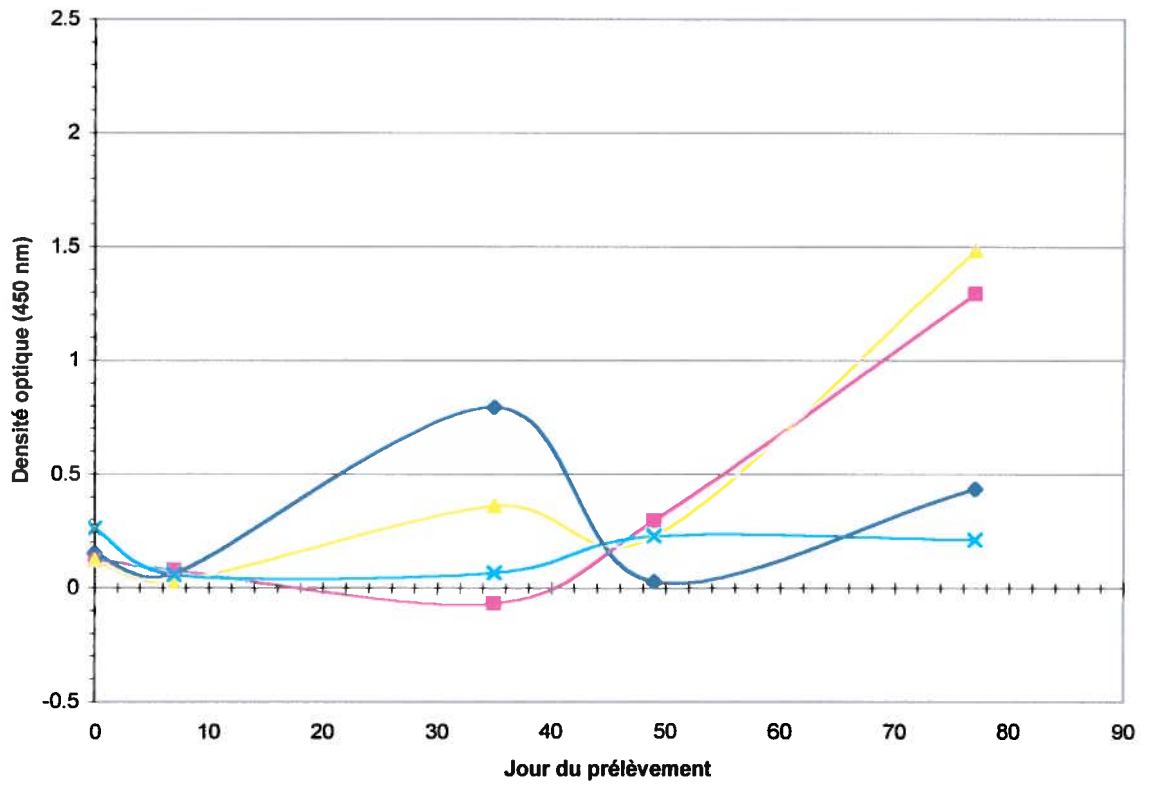
Les souris ont été injectées au jour 0 et ont reçu par la suite 5 doses de rappel (au jour 7, 14, 35, 49 et 63) Les tests ELISA ont été réalisés en utilisant des sérums de souris (dilué 1/100) prélevés au jour 0, 7, 35, 49 et 77.



**Figure 20: Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à la co-injection des plasmides recombinant pcDNA3/p10 et pcDNA3/IL-2.**

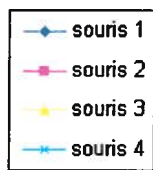
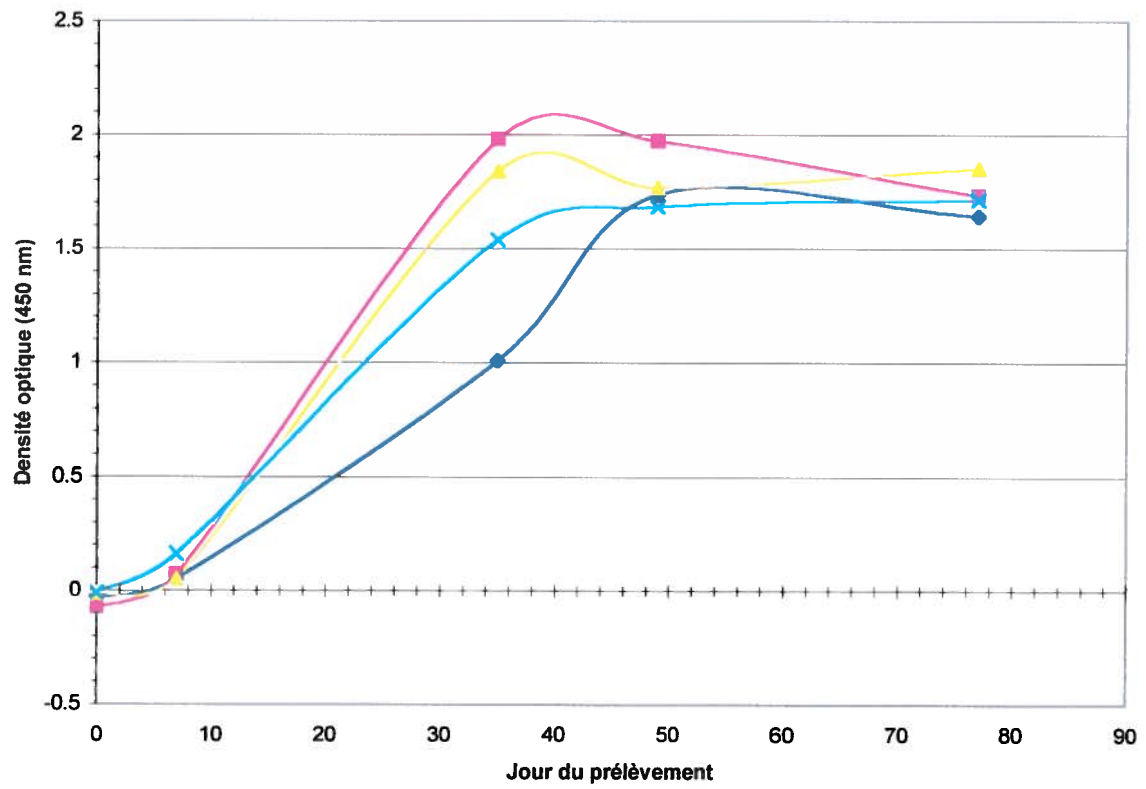
Les souris ont été injectées au jour 0 et ont reçu par la suite 5 doses de rappel (au jour 7, 14, 35, 49 et 63) Les tests ELISA ont été réalisés en utilisant des sérums de souris (dilués 1/100) prélevés au jour 0, 7, 35, 49 et 77.





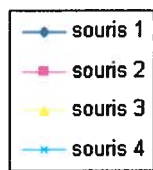
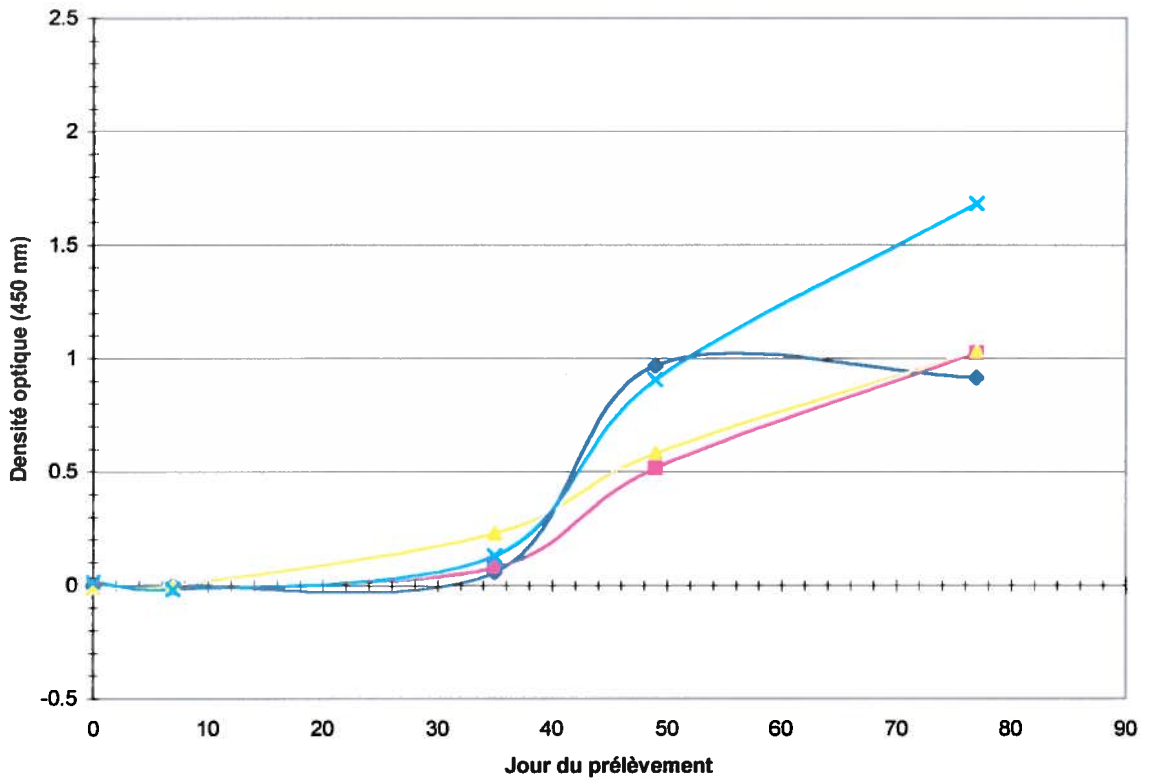
**Figure 21 : Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à l'injection de la protéine P10 recombinante avec l'adjuvant de Freund**

Les souris ont été injectées au jour 0 et ont reçu par la suite 5 doses de rappel (au jour 7, 14, 35, 49 et 63) Les tests ELISA ont été réalisés en utilisant des sérums de souris (dilués 1/3200) prélevés au jour 0, 7, 35, 49 et 77.



**Figure 22: Cinétique de production des anticorps anti-P10 suite à la co-injection de la protéine P10 recombinante et le plasmide recombinant pcDNA3/II-2**

Les souris ont été injectées au jour 0 et ont reçu par la suite 5 doses de rappel (au jour 7, 14, 35, 49 et 63) Les tests ELISA ont été réalisés en utilisant des sérums de souris (dilués 1/3200) prélevés au jour 0, 7, 35, 49 et



comme immuno-adjuvant semble plutôt ralentir le niveau de production des anticorps anti-P10 (Figure 19). Ces résultats sont à l'opposé de ce qui a été prévu étant donné la fonction stimulatrice de la cytokine IL-2 à la réponse immunitaire. Ces résultats sont également à l'opposé des résultats obtenus dans nos laboratoires lors d'expériences d'immunisations utilisant différents antigènes visant la production d'anticorps spécifiques dirigés contre la glycoprotéine gp51 du virus de la leucose bovine (BLV) (Ligondé, 2000).

L'utilisation du plasmide pcDNA3/p10 lors des immunisations génétiques a suscité une réponse humorale anti-P10 très spécifique. Par contre et en comparaison avec l'utilisation de la protéine recombinante P10 comme antigène, l'ADN nu suscite une réponse humorale tardive. En effet, un taux d'anticorps anti-P10 significatif n'a été observé qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> injections, soit les jours de prélèvements 49 et 77 (Figure 18). L'utilisation de l'adjuvant de Freund lors des immunisations avec le plasmide pcDNA3/p10 a suscité une réponse humorale anti-P10 significative chez certaines souris (souris 2 et 4) à partir du 3<sup>ème</sup> prélèvement (jour 35) (Figure 19). Cet événement demeure marginal, en particulier si l'on considère l'effet non significatif de l'adjuvant sur le taux de production des anticorps anti-P10 avec le temps suite aux 4<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> injections. L'utilisation de l'IL-2 comme immuno-adjuvant (co-injection du plasmide pcDNA/IL-2) semble avoir chez certaines souris (souris 1 et 3) un effet comparable sur le taux de production des anticorps anti-P10, que celui de l'adjuvant de Freund (Figure 20). Un effet qui demeure également marginal si l'on considère le fait que l'injection du plasmide pcDNA/IL-2 seul (sans aucun adjuvant) suscite une réponse humorale plus importante (Figure 18).

Un des faits les plus importants associés aux expériences d'immunisation génétique réside sans doute dans la présence d'une réponse humorale différentielle parmi les individus d'un même groupe de souris. Ainsi, et à titre d'exemple, les souris 2 et 3 du groupe immunisé avec le plasmide pcDNA 3/p10 (Figure 18) ont montré une production d'anticorps anti-p10 significative comparé aux individus 1 et 4 du même groupe et dont la production d'anticorps est faible (souris 4) ou quasiment nulle (souris 1) (Figure 18). L'absence de production d'anticorps anti-P10 suite à l'immunisation génétique est

probablement due à une transfection inefficace des cellules par le plasmide pcDNA3/p10 ou à un échec du plasmide et des cellules transfectées à diriger la transcription et la traduction de la protéine p10. À noter cependant que le taux de production des anticorps anti-p10 est comparable chez tous les individus des différents groupes d'animaux immunisés avec la protéine recombinante P10.

#### 4.5 Évaluation des titres des anticorps anti-P10

L'évaluation des titres des anticorps anti-P10 nous a permis de juger la valeur des antigènes utilisés lors des différentes immunisations et de comparer d'autres part l'efficacité de l'immunisation génétique par rapport à l'immunisation classique. Les titres d'anticorps ont été déterminés à partir des courbes d'absorbance obtenues suite aux différentes immunisations. Les courbes d'absorbance correspondent à la densité optique obtenue en fonction du logarithme des dilutions du sérum testé. La pente et l'ordonné à l'origine de chacune des courbes ont été calculés à l'aide du logiciel Microsoft® Excel selon la formule de la courbe de tendance logarithmique utilisée  $y = -m \ln(x) + b$ . « m » représente la pente, « b » représente l'ordonné à l'origine, « y » représente la densité optique et « x » représente la dilution du sérum. Le titre d'anticorps a été évalué en calculant la valeur de la dilution du sérum lorsque la densité optique est égale à 0,397, soit l'indice de la valeur limite déterminé lors des tests de sensibilité. Ainsi la valeur de x lorsque y est égale à 0,397 a été calculé en isolant la variable x à l'aide de la formule  $X = e^{(0,378-b)/m}$ .

Ainsi, les individus de différents groupes de souris contrôles (témoins négatifs) ont montré peu ou pas de production d'anticorps anti-P10 avec des titres ne dépassant jamais 20 (Figure 23). Des anticorps anti-P10 dont les titres s'approchent de  $10^6$  ont été observés chez les souris immunisées avec la protéine recombinante p10 en présence de l'adjuvant de Freund (Figure 23). Ces titres sont demeurés importants ( $>10^5$ ) mais moindre lorsque l'adjuvant de Freund a été remplacé par l'immuno-adjuvant IL-2 (sous forme de plasmide pcDNA/IL-2). Cette inhibition et/ou retard dans la production des anticorps anti-P10 en présence du plasmide pcDNA/IL-2 reste à élucider (Figure 23). La

**Figure 23 : Titre moyen des anticorps anti-P10 dans les sérums prélevés à différents temps et en fonction des types d'immunisations**

PBS :	Témoin négatif
PQE32 :	Vecteur procaryote seul utilisé comme témoin négatif
PcDNA3 :	Vecteur eucaryote seul utilisé comme témoin négatif
PcDNA3/p10 :	Plasmide recombinant exprimant la protéine p10
PcDNA3/p10 + AF :	Plasmide recombinant exprimant la protéine p10 injecté avec l'adjuvant de Freund
PcDNA3/p10 + IL-2 :	Plasmide recombinant exprimant la protéine p10 co-injecté avec le plasmide recombinant exprimant IL-2
p10recomb :	Protéine p10 recombinante injectée avec l'adjuvant de Freund
P10recomb + IL-2 :	Protéine p10 recombinante co-injectée avec le plasmide recombinant exprimant IL-2



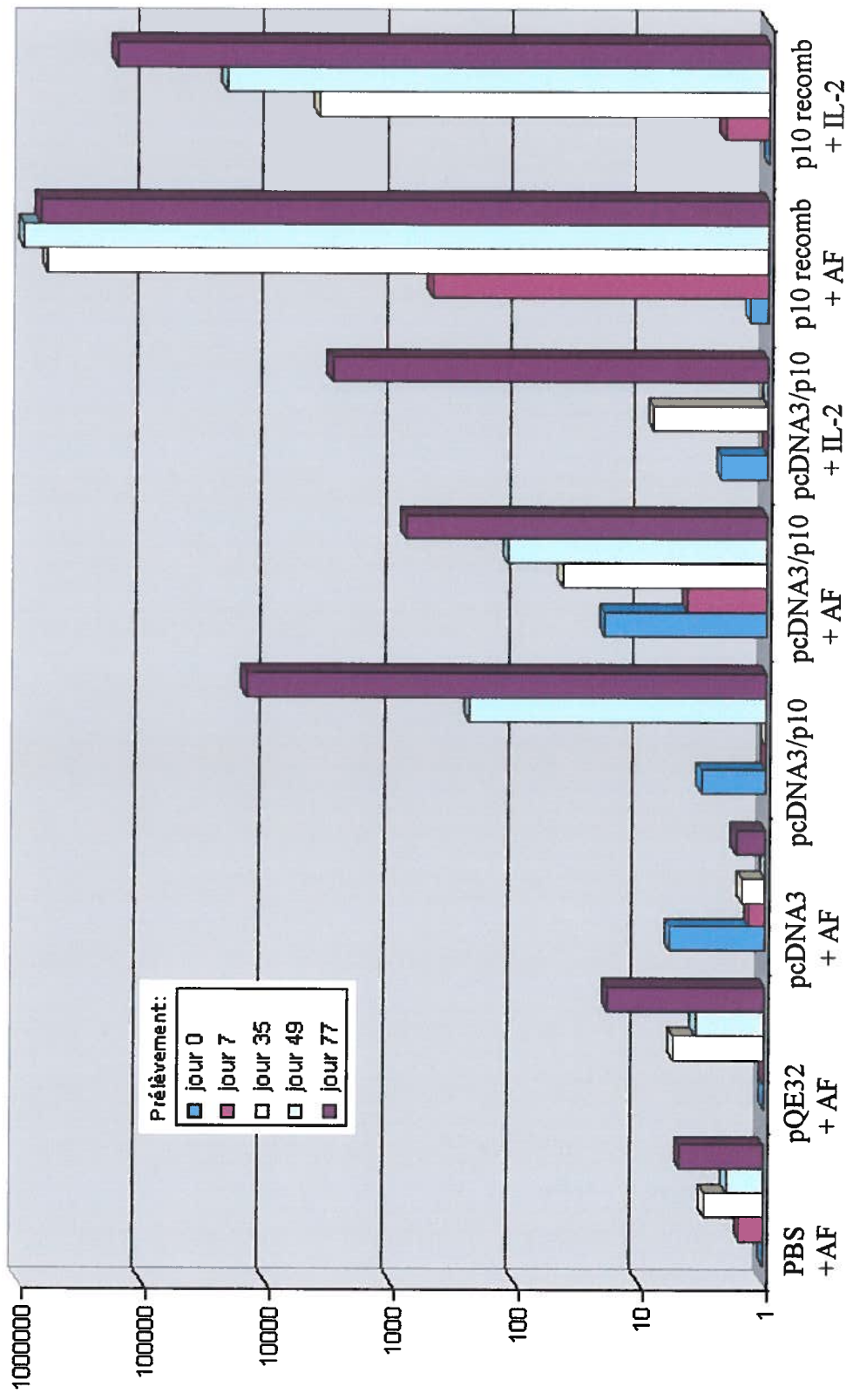


figure 23 illustre clairement l'effet inhibiteur et/ou ralentissant de l'adjuvant de Freund et de l'immuno-adjuvant IL-2.

La moyenne des titres des anticorps anti-P10 suite à l'immunisation génétique (sans adjuvants) est supérieure  $10^4$  mais demeure néanmoins très faible par rapport à celle des titres suscités par l'immunisation classique. En effet, la moyenne des titres des anticorps anti-P10 produits par immunisation classique est d'environ 65 fois supérieure à la moyenne des titres des anticorps produits par immunisation génétique. Cette différence trop importante dans les titres d'anticorps anti-P10 s'explique entre autres par une réponse immunitaire différentielle des différents individus d'un même groupe d'animaux. Ceci se reflète sur les tracés de la figure 23, vu que les titres des anticorps suscités par une immunisation représentent la moyenne des titres d'anticorps produits par chacune des souris d'un même groupe. Ainsi et dans le cas de l'immunisation génétique, nous avons à composer avec des individus dont le titre d'anticorps est très faible ou quasiment nul.

# **Discussion**

La présence du gène codant pour la protéine P10 a été confirmée sur le génome du granulovirus de *Choristoneura fumiferana*, ce qui prouve la véracité de notre hypothèse de départ. Cette identification a été rendue possible grâce à une technique de marche (séquençage) sur le fragment G de la banque génomique *BamHI*. En effet, et en se basant sur le fait que le gène p10 se juxtapose au gène p74 chez d'autres baculovirus (Liu *et al.*, 1986; Bicknell *et al.*, 1987; Kuzio *et al.*, 1989, Hill *et al.*, 1993; Zuidema *et al.*, 1993; Kaktor *et al.*, 1997; Van Oers *et al.*, 1998; Razuck *et al.*, 2001), nous avons pu confirmer la position du gène p10 en aval du gène p74 sur le brin anti-sens du génome viral.

Le génome des baculovirus code une protéine d'un poids moléculaire de 10 kDa (P10), jouant un rôle dans la pathogénèse associée à l'infection aux baculovirus (Zuidema *et al.*, 1993; Faktor, Toister-Achituv et Kamensky, 1997; Van Oers *et al.*, 1998; Fielding et Davison, 2000; Razuck *et al.*, 2002). Les analyses des séquences nucléotidiques obtenues après clonage et séquençage et les analyses des séquences en acides aminés déduites ont confirmées, sans le moindre doute, l'identité du gène p10 d'intérêt. Il s'agit en fait du gène codant pour la protéine P10 qui joue un rôle dans la morphogénèse de l'enveloppe des corps d'inclusions et dans le relâchement des particules virales à partir des cellules infectées chez d'autres baculovirus et en particulier ceux du genre nucléopolyédrovirus (NPV) (Vlak *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1989; Wilson et Price, 1988; Van Oers *et al.*, 1993). En fait, la protéine P10 serait impliquée dans la désintégration de matrice nucléaire lors de la phase tardive du cycle d'infection (Williams *et al.*, 1989). Ainsi, l'analyse des séquences du gène repêché a clairement montré des similitudes au niveau de l'organisation des structures fonctionnelles avec les gènes codant pour la protéine P10 d'autres baculovirus et en particulier ceux des NPV. Plus précisément, nous avons montré la présence au niveau de la région N-terminale de la protéine P10 d'une structure fonctionnelle en superhélice, nommé aussi « *Coiled Coil* ». La formation de cette structure est tributaire de la présence d'un motif répété composé de sept acides aminés (motif hepta) où le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>ème</sup> résidus sont hydrophobes (Lupas, 1999). L'identité de la P10 a également été confirmée par la présence, au niveau de la région C-terminale, d'un domaine riche en résidus proline et d'un domaine riche en

résidus amino-acides basiques. Ces domaines qui semblent être responsables de la désintégration de la matrice nucléaire ont été rapportés chez les NPV (Williams *et al.*, 1989).

Jusqu'à présent, la structure et la fonction de la protéine P10 ne sont toujours pas bien caractérisées chez les granulovirus et ce malgré l'intérêt porté par de nombreuses équipes de chercheurs à étudier cette protéine. Ainsi, Hashimoto *et al.* (2000) ont rapporté la présence, sur le génome du granulovirus de *Plutella xylostella*, de 3 cadres de lecture (Px2, Px21 et Px50) contenant des motifs hepta impliqués dans la formation des structures en superhélice « Coiled Coil » caractéristiques des protéines P10 des baculovirus. Cependant, les autres domaines structuraux de la P10, au niveau de la région C-terminale, sont absents. Luque *et al.* (2000) ont été capables de montrer de la présence, chez le granulovirus de *Cydia pomonella*, de deux cadres de lecture, Cp22 et Cp62, renfermant les motifs hepta pour les structures en superhélice en plus de la présence de domaines riches en résidus proline. Cependant, les cadres de lecture sont considérablement plus longs que ceux des gènes p10 caractérisés jusqu'à présent chez les NPV. Il est toutefois possible que les protéines codées par ces cadres de lecture puissent avoir une fonction dans la pathogenèse virale, analogue à celle de la protéine P10 des NPV. Hayamaka *et al.* (1999) ont réussi à montrer la présence, chez le granulovirus de *Xestia c-nigrum*, d'un cadre de lecture, Xc2 renfermant un domaine contenant la structure en superhélice mais également un domaine riche en résidus proline et un domaine riche en résidus amino-acides basiques. En plus, ce cadre de lecture code pour une protéine de 84 acides aminés, comparable aux protéines P10 des NPV étudiées qui ont entre 84 et 104 acides aminés.

Le gène de la p10 du ChfuGV est de 315 nucléotides codant pour une protéine de 104 acides aminés d'un poids moléculaire déduit de 10 kDa. La P10 de ChfuGV a un poids moléculaire déduit similaire à celui de la protéine P10 du NPV d'*Autographa californica* (AcMNPV) (Smith *et al.*, 1982; 1983). Cependant, l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) montre que notre protéine recombinante P10 à un poids moléculaire d'environ 18 kDa (Figure 10). Quant-Rusell *et*

*et al.*, 1987 ont montré, par analyse sur SDS-PAGE, que la protéine P10 d'OpMNPV a plutôt un poids moléculaire de 14 kDa. Des résultats similaires ont été obtenus après analyses par SDS-PAGE de la protéine P10 de LdMNPV (McClintock *et al.*, 1986). Il a été proposé que la variation entre le poids prédit et celui observé par SDS-PAGE soit dû à des artefacts de la migration causés par la séquence primaire de la protéine (Quant-Russel *et al.*, 1987). En effet, Carstens *et al.*, (1986) ont constaté qu'une modification de l'acide aminé proline contre la leucine, dans la séquence de la protéine P10 d'AcMNPV, mène à la réduction de 1 kDa du poids moléculaire apparent sur SDS-PAGE. Ainsi, les prolines de la séquence primaire de la protéine diminueraient la vitesse de migration de cette dernière dans le gel de polyacrylamide lors d'une électrophorèse. À partir de ces informations, les protéines P10 du ChfuGV et d'OpMNPV, composées respectivement de 7 et 5 prolines de plus que la protéine P10 d'AcMNPV, devraient montrer des poids moléculaires apparents respectifs de 17 kDa et 15 kDa. Ces poids moléculaires correspondent à ceux observés par SDS-PAGE (Quant-Rusell *et al.*, 1987). En seconde hypothèse, la séquence primaire de la protéine P10 d'OpMNPV étant celle montrant la plus grande homologie avec la protéine P10 du ChfuGV, il est possible que la protéine P10 du ChfuGV montre un poids moléculaire semblable à celui de la protéine P10 d'OpMNPV (14 kDa). Par contre, l'ajout de six résidus histidines à la protéine recombinante P10 du ChfuGV augmenterait son poids apparent à 18 kDa. Dans un autre ordre d'idée, la variation entre le poids moléculaire prédit de la protéine et celui observé lors des analyses par SDS-PAGE est peut-être dû à la présence, dans la protéine P10, de sites potentiels de glycosylation de type-O. En effet, la séquence en acides aminés de la protéine P10 du ChfuGV est riche en résidus sérine et thréonine qui peuvent porter des embranchements de sucres par O-glycosylation (Quant-Russel *et al.*, 1987). Il est donc possible que la protéine recombinante P10 du ChfuGV soit glycosylée (ou partiellement glycosylée) au niveau de ces acides aminés après traduction, ce qui expliquerait son poids moléculaire apparent de 18 kDa.

L'analyse de la séquence en acides aminés de la région N-terminale de la protéine P10 du ChfuGV a révélé la présence d'un motif de sept acides aminés caractérisé par la présence de deux acides aminés hydrophobes aux positions 1 et 4. Un tel motif est

caractéristique des domaines protéiques en superhélice décrit par Cohen et Parry (1986; 1990). La présence d'un domaine en superhélice au niveau de la région N-terminale de la protéine P10 a été confirmée par une analyse de Lupas. D'après cette analyse, il est fort probable de trouver une structure en superhélice dans la région N-terminale de la protéine P10 du ChfuGV. Ce domaine serait impliqué dans l'agrégation de la protéine. En effet, la distance régulière entre les acides aminés hydrophobes permet la formation d'hélices  $\alpha$  amphipatiques pouvant se lier les unes aux autres et former ainsi des agrégats de protéines ayant une structure en superhélice (Cohen et Parry, 1986; 1990). Le rôle de ce domaine dans l'agrégation des protéines a été mis en évidence dans les travaux de Williams *et al.*, (1989) qui ont montré que la fusion du gène Lac Z avec la séquence codant pour la région N-terminale de la protéine P10 provoque une accumulation intranucléaire de structures granuleuses. Ainsi, la protéine P10 du ChfuGV serait pourvue d'un domaine en superhélice caractéristique des protéines P10 des baculovirus et qui est essentiel à l'agrégation de la protéine.

Le domaine potentiel en superhélice de la protéine P10 du ChfuGV est suivi d'un domaine riche en proline composé de 24 acides aminés. La comparaison du domaine riche en proline de la protéine P10 du ChfuGV avec ceux d'autres baculovirus a montré la présence d'un motif d'acides aminés plus conservés chez le ChfuGV. En effet, ce motif est formé d'une répétition en tandem de 12 résidus prolins et acide glutamiques (PE), alors que chez les autres baculovirus, les résidus prolins occupent des positions plus aléatoires parmi les différents acides aminés. Cependant chez les baculovirus OpMNPV et PnNPV, les protéines P10 possèdent des domaines riches en prolins (PEPPAPAPEPELPEIPDVP) qui rappellent le motif conservé du ChfuGV contenant les résidus PE répétés en tandem. Chez les virus OpMNPV et PnNPV, ces domaines contiennent 9 résidus prolins qui occupent des positions relativement régulières fréquemment encadrés par les acides aminés alanine et acide glutamique. L'ensemble de ces données suggère que le domaine riche en proline de la protéine P10 des baculovirus ait subi une évolution conduisant à l'apparition du motif où les résidus PE sont répétés en tandem dans la protéine P10 du ChfuGV. Le domaine riche en proline ainsi évolué pourrait être important pour la virulence du virus mais ne serait pas indispensable ni pour

la réplication du virus, ni pour le processus d'infection. Un motif contenant les résidus PE répétés en tandem semblable au domaine riche en proline de la protéine P10 du ChfuGV a été identifié dans la région C-terminale des procyclines du *Trypanosoma brucei*, un protozoaire parasite infectant la mouche tsé-tsé et responsable de la maladie du sommeil chez l'humain (Roditi *et al.*, 1987). Ce motif serait essentiel pour la protection du protozoaire lors de son passage au niveau de l'intestin de l'insecte (Acosta-Serrano, 2000). Il est donc possible d'imaginer un rôle semblable pour le domaine riche en proline (PE) de la protéine P10 du ChfuGV si ce domaine est associé à la structure même du virus. Cette hypothèse est supportée par les travaux de Williams *et al.*, (1989), Gross *et al.*, (1994) et Lee *et al.*, (1996) qui ont montré que les protéines P10 des nucléopolyédrovirus d'*Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV) et d'*Autographa californica* (AcMNPV) sont impliquées dans la formation de l'enveloppe et que la protéine P10 (en totalité ou en partie). La P10 serait donc une composante de l'enveloppe du corps d'inclusion. La protéine P10 jouerait donc un rôle dans la structure du virus et pourrait protéger le virus lors de son passage dans l'intestin de l'insecte. Par ailleurs, Quant-Russel *et al.*, 1989, ont démontré que des anticorps anti-P10, produits par immunisation de souris Balb/c avec le virus OpMNPV complet, reconnaissent l'épitope correspondant au motif riche en proline de la protéine P10 prouvant ainsi que ce domaine riche en proline est une composante de l'enveloppe du corps d'inclusion. Il est donc possible que le domaine riche en proline de la protéine P10 du ChfuGV puisse constituer une composante de l'enveloppe du corps d'inclusion du virus et le protéger ainsi lors de son passage dans l'intestin de l'insecte. Le domaine riche en proline de la protéine P10 du ChfuGV pourrait jouer un second rôle important. En effet, Williams *et al.* (1988) et Van Oers *et al.* (1993) ont montré que le domaine riche en proline de la protéine P10 des baculovirus est impliqué dans la désintégration de la matrice nucléaire et dans la dissémination des virions.

La région C-terminale de la protéine P10 du ChfuGV possède un domaine riche en acides aminés hydrophiles et basiques. Sachant que ce domaine est similaire aux domaines présents dans les régions C-terminales des protéines P10 d'autres baculovirus, il est donc possible que leurs fonctions soient identiques. Javis *et al.*, (1991) ont montré que le domaine basique de la protéine P10 du baculovirus AcMNPV renferme un motif



semblable à la séquence du peptide signal (KRKK) nécessaire à la localisation nucléaire de la polyédrine. Ceci suggère que le domaine basique de la protéine P10 d'AcMNPV soit impliqué dans la localisation nucléaire de cette protéine. Cependant, Williams *et al.* et (1989), Van Oers *et al.*, (1993) ont montré que la région C-terminale de la protéine P10 du virus AcMNPV est essentielle à l'assemblage de protéines P10 sous forme d'agrégats fibreux de la protéine P10. En effet, la délétion du domaine basique de la protéine P10 du virus AcMNPV entraîne la formation d'agrégats non fibreux dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules infectées (Williams *et al.*, (1989); Van Oers *et al.*, MAR (1993), Alaoui-Ismaili et Rochardson, (1998).

L'identification d'un gène codant pour la protéine P10 sur le génome du ChfuGV est sûrement associée à l'expression de ce gène lors du cycle d'infection du virus. En effet, des structures fibreuses ont été observées dans les cellules des corps gras de l'insecte *Choristoneura fumiferana* infectées par le ChfuGV. Ces structures fibreuses s'apparentent aux structures observées dans les cellules infectées par le NPV et associées à la protéine P10 (Summer et Arnott, 1969; MacKinnon *et al.*, 1974; Chung et al., 1980; Tanada et Hess, 1984). Les structures fibreuses observées dans les cellules infectées par le ChfuGV correspondraient donc au produit de l'expression du gène codant pour la protéine P10. Pour vérifier cette hypothèse, il est important de localiser la protéine P10 sur des coupes de larves infectées par le ChfuGV en utilisant, par exemple, des anticorps anti-P10 spécifiques. Ceci correspond à la deuxième partie de ce projet de recherche où nous nous sommes occupés à produire des anticorps polyclonaux anti- P10 spécifiques qui seront utilisés dans des projets visant, entre autres, la localisation immunohistochimique de la protéine P10. Pour ce faire, la protéine P10 du ChfuGV a été exprimée en même temps, dans un système procaryote et dans un système eucaryote. La protéine P10 recombinante ainsi produite a été utilisée, respectivement pour une immunisation classique et une immunisation génétique de souris Balb/c.

L'immunisation classique, consiste en l'injection de la protéine P10 recombinante purifiée par chromatographie d'affinité aux souris Balb/c. Alors que l'immunisation génétique consiste en l'injection de l'ADN nu sous forme de plasmide, pcDNA3/p10,

capable d'exprimer la protéine P10 une fois transfecté dans des cellules eucaryotes de souris Balb/c. De la même façon, la protéine recombinante P10 produite dans un système procaryote ou produite par les cellules eucaryote de souris Balb/c est capturée, par phagocytose ou endocytose, par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) puis dégradée en peptides à l'intérieur des endosomes. Les peptides se lient aux molécules du CMH classe II spécifiques et les complexes (peptide/ CMHII) sont exportés à la surface de la membrane cellulaire. La présentation dans le contexte du CMH, des peptides dérivés de la protéine recombinante P10 aux récepteurs membranaires des cellules T auxiliaires permet l'activation des cellules B à produire des anticorps anti-P10 dirigés contre les différents déterminants antigéniques de la protéine P10.

Un test ELISA développé pour le besoin de ce projet et utilisant la protéine P10 recombinante purifiée, s'est avéré très spécifique et très efficace pour l'étude de la cinétique de production des anticorps et pour la titration des anticorps anti-P10. Ainsi, et dans le cas de l'immunisation classique, l'étude de la cinétique, a montré que les premiers anticorps anti-P10 apparaissent après la première dose de rappel soit 35 jours après l'immunisation initiale. Cette production d'anticorps a continué d'augmenter jusqu'au jour 77 avec des titres s'approchant du  $10^6$  (Figure 23). Les titres moyens des anticorps anti-P10 sont de l'ordre de  $10^4$  dans le cas de l'immunisation génétique avec l'apparition des 1<sup>ers</sup> anticorps anti-P10 au jour 49 post-immunisation (Figure 23). Ces titres d'anticorps obtenus par immunisation génétique se comparent très avantageusement aux titres obtenus par immunisation classique, en particulier si l'on tient compte du fait de l'absence assurée de protéines bactériennes contaminantes. L'absence de protéines contaminantes ne peut être assurée dans le cas de l'immunisation classique utilisant la protéine recombinante P10 produite dans des bactéries et purifiée par chromatographie d'affinité. En effet, nous avons détecté, par immunobuvardage de type Western, en plus des anticorps anti-P10, la présence dans les sérums de souris, d'anticorps dirigés contre une protéine de 30 kDa et dont l'origine ne peut être que bactérienne (Figure 15). Il faut effectivement, améliorer le système de purification sur colonne de nickel, car ce système semble fixer de façon non-spécifique, des protéines bactériennes qui ne semble pas présenter de succession de résidus histidine dans leur séquence en acides aminés. Par

contre, les anticorps produits par immunisation génétique se sont avérés très spécifiques, ne reconnaissant que la protéine recombinante P10, lors des tests d'immunobuvardage, témoignant ainsi de l'absence de tout contaminant lors des injections de souris (Figure 15). En plus l'utilisation du système d'expression eucaryote pcDNA3, exprimant la protéine P10, pour l'immunisation génétique de souris Balb/c, s'est avéré moins laborieux et moins coûteux pour la production des anticorps anti-P10. Un fait très intéressant associé aux expériences de l'immunisation génétique était celui de la production variable d'anticorps (de nulle à très élevée) par les différents individus d'un même groupe d'animaux. Ceci est probablement dû à une transfection inconstante et/ou à un échec du plasmide et des cellules transfectées à diriger la transcription et la production de la protéine recombinante P10. Il est donc nécessaire de développer des techniques et des systèmes pour s'assurer de la transfection des cellules cibles et de la production adéquate de la protéine recombinante par les cellules transfectées.

L'utilisation de l'adjuvant de Freund lors des expériences d'immunisation classique, avec la protéine P10 recombinante purifiée, a induit une production plus importante des anticorps anti-P10. En effet, l'adjuvant de Freund permet de prolonger la persistance de l'antigène dans les gouttelettes d'huile de l'adjuvant, ce qui permet à l'antigène d'être relâché lentement au niveau du site d'injection. Par ailleurs, la présence de dipeptides muramyl dérivés des membranes cellulaires de mycobactéries dans l'adjuvant de Freund complet permet l'activation des macrophages. Une fois activés, les macrophages expriment fortement les molécules du CMH classe II et les molécules B7 (Kuby, 1997). Dans notre système expérimental, un tel événement permet une présentation plus efficace des peptides dérivés de la protéine P10, permettant ainsi une activation plus importante des lymphocytes B et par conséquent une production d'anticorps anti-P10 plus élevée. Par contre, l'utilisation de l'adjuvant de Freund, dans le cas de l'immunisation génétique, a eu un effet ralentissant sur la production des anticorps anti-P10. Ceci est probablement dû au fait que les gouttelettes d'huile de l'adjuvant de Freund encapsulent les plasmides recombinants et interfèrent de ce fait avec l'incorporation de ces derniers à l'intérieur des CPA et/ou des myocytes.

Les expériences d'immunisation nous ont également permis d'évaluer le potentiel immuno-adjuvant de l'IL-2. En effet, Raz *et al.* (1993), Prayaga *et al.* (1997) ont montré que l'utilisation de l'IL-2 comme immuno-adjuvant augmente la production des IgG spécifiques à l'immunogène et renforce ainsi la réponse immunitaire humorale. Un tel événement ne s'est pas produit dans notre système expérimental. En effet, la co-injection des souris Balb/c, avec la protéine P10 et avec l'immuno-adjuvant IL-2 a eu un effet ralentissant et/ou inhibiteur sur la production des anticorps anti-P10 lors de l'immunisation classique (protéine recombinante P10) et lors de l'immunisation génétique (plasmide pcDNA 3/p10). Des investigations plus poussées sont nécessaires pour comprendre et expliquer la logique de ces événements.

En guise de conclusion à cette discussion : nous avons pu confirmer la présence du gène p10 sur le génome de ChfuGV. L'utilisation de systèmes d'expression procaryote et eucaryote s'est avéré très efficace pour la production de la protéine P10 recombinante. La protéine recombinante P10 produite par des cellules bactériennes et par des cellules eucaryotes à l'intérieur de souris a servi d'immunogène pour la production des anticorps anti-P10 spécifiques. Ces anticorps sont présentement utilisés dans notre laboratoire pour la caractérisation immunobiologique, plus poussée, de la protéine P10, et ce dans le but de confirmer son rôle exact dans la pathogenèse associée à l'infection au ChfuGV.

# **Conclusion**

Cette recherche s'insère dans un projet d'envergure en cours dans nos laboratoires et qui consiste à étudier le génome et le protéome du granulovirus de *Choristoneura fumiferana*, un candidat potentiel comme biopesticide pour le contrôle des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Plus précisément, le but du présent projet de recherche est la caractérisation chez le ChfuGV du gène p10 ainsi que la protéine P10 codée par ce dernier. La protéine P10, jamais identifiée chez le ChfuGV, joue un rôle important dans la pathogenèse associée à l'infection aux baculovirus.

Ainsi, nous avons montré, et ce pour la première fois, la présence du gène codant pour la protéine P10 chez le ChfuGV. Le gène p10, localisé sur le brin antisens du génome viral est juste en aval, dans le sens opposé, du gène p74 du ChfuGV. L'analyse de la séquence nucléotidique et de la séquence en acides aminés déduite du gène p10 a permis de confirmer l'identité de ce dernier chez le ChfuGV. Cette identité est basée principalement sur la présence de trois domaines fonctionnels caractéristiques des protéines P10 des baculovirus. Il s'agit en fait de la présence, au niveau de la région N-terminale, d'une structure fonctionnelle en superhélice « *Coiled Coil* » et de la présence au niveau de la région C-terminale d'un domaine riche en résidus proline et d'un 2<sup>ème</sup> domaine riche en résidus amino-acides basiques.

L'utilisation de systèmes d'expression procaryote et eucaryote nous a permis de produire la protéine P10 recombinante purifiée et en quantité suffisante pour les expériences d'immunisation. En effet, l'immunisation classique et génétique des souris Balb/c avec la protéine recombinante P10 a mené à la production d'anticorps polyclonaux anti-P10 spécifiques avec des titres de  $10^6$  et  $10^4$  respectivement.

Nous avons également pu évaluer, au cours de ce projet de recherche, le potentiel de l'immunisation génétique, que nous croyons moins laborieuse et moins coûteuse, pour la production des anticorps anti-P10. Ainsi, nous avons réussi à produire des anticorps anti-P10 plus spécifiques qu'avec l'immunisation classique et à moindre coût chez des souris Balb/c immunisées avec l'ADN nu (plasmide pcDNA3/p10). La moyenne des titres d'anticorps anti-P10 de l'ordre de  $10^4$  est due à un fait très intéressant, associé à

l'immunisation génétique, et qui consiste à une production variable d'anticorps (de nulle à très élevée) par les différents individus d'un même groupe d'animaux. Ceci est probablement dû à une transfection inconstante et/ou à un échec du plasmide et des cellules transfectées à diriger la transcription et la production adéquate de la protéine recombinante P10. Il serait donc nécessaire de développer des techniques qui nous permettront, lors de l'immunisation génétique, de s'assurer de l'efficacité de la transfection et de la production de l'antigène (protéine recombinante).

Fait intéressant, l'II-2 a eu un effet inhibiteur et/ou ralentissant sur la production des anticorps anti-p10 lors des immunisations classique et génétique. Des investigations plus poussées sont nécessaires pour comprendre et expliquer la logique de ces événements.

Les anticorps polyclonaux anti-P10 produits au cours de ce projet sont présentement utilisés dans nos laboratoires pour la caractérisation immunobiologique de la protéine P10 afin d'évaluer avec plus de précision son niveau d'implication dans la pathogenèse virale. Cette caractérisation de la protéine P10 pourrait grandement influencer l'avenir du ChfuGV comme biopesticide car, grâce au génie génétique, il serait possible de contrôler et améliorer la pathogénicité du virus.

# Références



- ADANG, M. J., and L.K Miller. 1982. Molecular cloning of DNA complementary to mRNA of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus : Location and gene products of RNA transcripts. J. Virol., vol. 44, p. 782-793.
- ACOSTA-SERRANO, A., Vasella, E., Liniger, M., Renggli, C. K., Brun, R., Roditi, I. And Englund, P. T. 2001. The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 98 (4), p. 1513-1518.
- AGADJANYAN, M. G., Kim, J. J., Trivedi, N., Wilson, D. M., Monzavi-Karbassi, B., Morrison, L. D., Nottingham, L. K., Dentchev, T., Tsai, A., Dang, K., Chalian, A. A., Maldonado, M. A., Williams, W. V., and Weiner, D. B. 1999. CD86 (B7-2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses *in vivo*. J Immunol., vol. 15;162(6), p. 3417-3427.
- ALAOUI-ISMAILI, M. H. and Richardson, C. 1998. Insect virus proteins (FALPE and p10) self-associate to form filament in infected cell. J. Virol., vol. 72(3), p. 2213-2223.
- ANONYME. 2001. The Qiaexpressionist. Handbook for high-level expression and purification of 6×His-tagged proteins. Fifth Edition.
- AYRES, M. D., Homard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., and Possee, R. D. 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, vol. 202, p. 586-605.
- BABIUK, L. A. 1999. Broadening the approaches to developing more effective vaccines. Vaccine, vol. 26;17(13-14), p. 1587-1595.
- BAH A, Bergeron J, Arella M, Lucarotti CJ, and Guertin C. 1997. Identification and sequence analyses of the granulin gene of *Choristoneura fumiferana* granulovirus. Arch. Virol., vol. 142(8), p. 1577-1584.
- BAROUCH, D. H., Santra, S., Steenbeke, T. D. Zheng, X. X., Perry, H. C., Davies, M. E., Freed, D. C., Craiu, A., Strom, T. B. Shiver, J. W. and Letvin, N. L. 1998. Augmentation and suppression of immune responses to an HIV-1 DNA vaccine by plasmid cytokine/Ig administration. J. Immunol., vol. 161 (4), p. 1875-1882.
- BEATON, C. D. and Filshie, B. K. 1976. Comparative ultrastructure studies of insect granulosis and nuclear polyhedrosis viruses. J. Gen. Virol. Vol. 31, p. 151.
- BICKNELL, J. N., Leisy, D. J., Rohrman, G. F., and Beaudreau G. S. 1987. Comparison of the p26 gene region of two baculoviruses. Virology, vol. 161(2), p. 589-92.

- BIRD, F. T. 1959. Polyhedrovirus and granulovirus causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens. Journal of insect Pathology, vol. 1, p. 406-430.
- BIRNSTIEL, M. L., Busslinger, M., Strub, K. 1985. Transcription termination and 3' processing. The end is in site! Cell, vol 41, p. 349-359.
- BLAIS, J. R. Trends in the frequency, extent, and severity of spruce budworm outbreaks in eastern Canada. Canadian Journal of Forest Research, vol.13, p. 539-547.
- BLISSARD, G. W., Rohrmann, G. F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Annual Review of Entomology, vol. 35, p.127-155.
- BONNEAU, G., Bordeleau, C., Boulet, B., Chabot, M., Davidson, J-G., Garneau, J., Moranville, D., et Therrien, P. n.m. Les insectes forestiers nuisibles; La tordeuse des bourgeons de l'épinette. Gouvernement du Québec, Ministère des Ressources Naturelles.
- BOSHART., M. Weber, F., Jahn, G., Dorsch- Hasler, K., Fleckenstein, B., Scaffner, W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell, vol. 41(2), p. 521-530.
- BOT, A., Bot, S., Garcia-Satre, A. and Bona, C. 1996. DNA immunization of newborn mice with a plasmid-expressing nucleoprotein of influenza virus. Viral Immunol., vol. 9, p . 207-210.
- BOYLE, M. C., Morin, M. Webster, R. G., and Robinson, H. L. 1996. Role of the different lymphoid tissues in the initiation and the maintenance of DNA-raised antibody responses to the influenza virus H1 glycoprotein. J. Virol. Vol. 70, p. 9074-9078.
- BRAUNAGEL, S. C. and Summer M. D. 1994. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV and ECV viral envelopes and nucleocapsids: Structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. Virology, vol. 202 (1), p. 315-328.
- BROWN, D. H., Bud, H. M., and Kelly, D. C. 1977. Biophysical properties of the structural components of granulosis virus isolated from the cabbage white butterfly (*Pieris brassicae*). Virology, vol. 81, p. 317-327.
- BURLEY, S. K., Miller, A., Harrap, K. A. and Kelly, D. C. 1982. Structure of the baculovirus nucleocapsid. Virology, vol. 120, p. 433-440.
- BURNETTE, W. N. 1981. Western blotting : Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A. Anal. Biochem., vol. 112, p.195-203.

- CAUX, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. and Banchereau, J. GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. Nature, vol. 360, p. 258-261.
- CHEN, X., Ijkel, W. F., Tarchini, R., Sun, X., Sandbrink, H., Wang, H., Peters, S., Zuidema, D., Lankhorst, R. K., Vlak, J. M. and Hu, Z. 2001. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. J. Gen. Virol., vol. 82(1), p. 241-57.
- CHOW, Y. H., Chiang, B. L., Lee, Y. L., Chi, W. K., Lin W. C., Chen, Y. T., and Tao, M. H. 1998. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. J. Immunol., vol. 160, p. 1320-1329.
- CHUNG, K. L., Brown, M., and Faulkner, P. 1980. Studies on the morphogenesis of the polyhedral inclusion bodies of a baculovirus *Autographa californica* NPV. J. Gen. Virol., vol. 46, p. 335-347.
- COHEN, C. and Parry, D. A. D. 1990. Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. Proteins, vol. 7(1), p. 1-15.
- CORPET, F. 1998. Multiple sequence alignment hierarchical clustering. Nucl. Acids Res., vol. 16 (22), p.10881-10890.
- COWDERY, J. S., Chace, J. H., Yi, A. K. and Krieg, A. M. 1996. Bacteria induce NK cells to produce IFN- $\gamma$  in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. J. Immunol., vol. 156, p. 4570-4575.
- CROIZIER, C., Gonnet, P., Devauchelle, G. 1987. Localisation cytotologique de la protéine non structurale p10 du baculovirus de la polyhedrose nucléaire de Lépidoptère *Galleria mellonella*. C. R. Acad. Sci. Paris, vol. 305, Série III, p. 677-681.
- DAHESHIA, M., Kuklin, N., Kanangat, S., Manickan, E., and Rouse, B. T. 1997. Suppression of ongoing ocular inflammatory disease by topical administration of plasmid DNA encoding IL-10. J. Immunol., vol. 159, p. 1945-1952.
- DECK, R. R. De Witt, C. M., Donnelly, J. J., Lui, M. A., and Ulmer, J. B. 1997. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. Vaccine, vol. 15, p. 71-78.
- FAKTOR, O., Toister-Achituv, M., Nahum, O., Kamensky, B. 1997. The p10 gene of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus: nucleotide sequence, transcriptional analysis and unique gene organization in the p10 locus. J. Gen. Virol., vol. 78 (8), p. 2110-2128.

- FAULKNER, P., Kuzio, J., William, G. V. and Wilson, J. A. 1997. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo. J. Gen. Virol., vol. 78, p. 3091-3100.
- FELQUATE, D. M., Heaney, S., Webster, R. G. and Robinson, H. L. 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun immunisation. J. Immunol., vol. 158, p. 2278-2284.
- FIELDING, B. C. and Davison, S. 2000. Identification and characterisation of the *Trichoplusia ni* single capsid nuclear polyhedrosis virus. Virus genes, vol. 20 (2), p.189-192.
- FORTÉ, A. J., and Guertin, C. 1999. Pathogenicity of granulovirus toward *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). The Canadian Entomologist, vol. 131, p. 725-727.
- FRIESEN, P. D., and Miller, L. K. 1985. Temporal regulation of baculovirus RNA: Overlapping early and late transcripts. J. Virol., vol. 54, p. 392-400.
- FUCHS, Y. L., Woods, M. S. and Weaver, R. F. 1982. Viral transcription during *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection : a novel RNA polymerase induced in infected *Spodoptera frugiperda* cells. J. Virol., vol. 48, p. 641-646.
- FUNG, Y-K. T., Crittenden, L. B., Fadly, A. M. and Kung, H-J. 1983. Tumor induction by direct injection of cloned v-src DNA into chickens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 80, p. 353-357.
- GUERTIN, C. 1995. Étude du potentiel insecticide de certains virus, du *Bacillus thuringiensis* et de certaines substances phagostimulantes contre les insectes defolians de la forêt. Ministère des ressources naturelles du Québec. Rapport sur l'avancement des travaux. Projet 10240S.
- GOEDEL, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszeski, A., Itakura, K., and Riggs, A. D. 1979. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 76(1), p. 106-110.
- GONNET, P. et Devauchelle, G. 1987. Obtention par recombinaison dans le gène du polypeptide p10 d'un baculovirus exprimant le gène de résistance à la néomycine dans les cellules d'insectes. C. R. Acad. Sci. Paris, vol. 305, série III, p. 111-114.
- GORDON, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. and Ruddle, F. H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 77, p. 7380-7384.

- GORDON, J. W. and Ruddle, F. H. 1981. Integration and stable germ-line transmission of genes injected into mouse pronuclei. Science, vol. 214, p. 1244-1246.
- GRANADOS, R. R. 1978. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cell by a baculovirus. Virology, vol. 90, p. 170-172.
- GRISDALE, D.G. et G.G. Wilson. 1993. Guidelines for rearing spruce budworm. Service Canadien des forêts. Sault-Sainte-Marie, 6 p.
- GROSS, C. H., Russel, R. L. Q., Rohrmann, G. F. 1994. *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their expression levels and role in polyhedron structure. J. Gen Virol., vol. 75, p. 1115-1123.
- GRULA, M. A., Buller, P. L. and Weaver, R. F. 1981. Alpha amantin-resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperla* cells. J. Virol., vol. 38, p. 916-921.
- GURUNATHAN, S., Klinman, D. M. and Seder, R. A. 2000. DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. Annu. Rev. Immunol., vol. 18, p. 927-974.
- HALPERN, M. D., Kurlander R. J. Pisetsky, D. S. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. Cell. Immunol., vol. 167, p. 72-78.
- HASHIMOTO, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y. and Matsumoto, T. 2000. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. Virology, vol. 275(2), p. 358-372.
- HAWTIN, R. E., Arnold, K., Ayres, M. D., Zanutto, P. M. D. A., Howard, S. C., Gooday, G. W., Chappell, L. H., Kitts, P. A., King, L. A., and Possee, R. D. 1995. Identification and preliminary characterization of chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, vol. 212, p. 613-685.
- HAYAKAWA, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S. I., Goto, C. and Maeda, S. 1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. Virology, vol. 262(2), p. 277-297.
- HESS, R. T. et Falcon, L. A. 1978. Electron microscope observations of the membrane surrounding polyhedral inclusion bodies of insects. Arch. Virol., vol. 56, p.169-176.

- HILL, J. E., Kuzio, J., Wilson, J. A., MacKinnon, E. A., and Faulkner, P. 1993. Nucleotide sequence of the p74 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. Biochim. Biophys. Acta., vol. 1172, p.187-189.
- HOOPEs, R. R. Jr., and Rohrmann G. F. 1992. In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells.Proc Natl Acad Sci U S A., vol. 15;88(10), p. 4513-4517.
- HO, T-Y., Hsiang, C-Y., Hsiang, C-H. and Chang T-J. 1998. DNA vaccination induces a long term antibody response and protective immunity against pseudorabies virus mice. Arch. Virol., vol 143, p.115-125.
- HONG, T., and Braunagel S. C. et al. 1994. Transcription, transduction and cellular localization of PDV-E66: A structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, vol. 204 (1), p. 210-222.
- HORTON, H. M. and Burand, J. P. 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. J. Virol., vol. 67 (4), p. 1860-1868.
- HUH, N. E. and Weaver, R. F. 1990. Identifying the RNA polymerase that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol., vol 71, p.195-201.
- IRVINE, K. R., Rao, J. B. Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. 1996. Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases. J. Immunol., vol. 156, p. 238-245.
- ITAKURA, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A., Heyneker, H. L., Bolivar, F. and Boyer, H. 1977. Expression in *E coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somostatin. Science, vol. 198, p. 1056-1063.
- ITO, Y. 1960. A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cottontail rabbits. Virology, vol. 12, p. 596-601.
- JANKNECHT, R., De Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A. and Stunnenberg, H.G. 1991. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p. 8972-8976.
- JARVIS, D. L., Bohlmeier, D. A., and Garcia, A. 1991. Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein. Virology, vol. 185, p. 795-810.
- KELLY, D. C. 1982. Baculovirus replication, Review article. J. Gen. Virol, vol. 63, p. 1-13.

- KIM, J. J., Ayyavoo, V., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M. A., Dang, K., Wang, B., Boye, J. D. and Weiner, D. B. 1997. *In Vivo* Engineering of cellular immune response by co-administration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. J. Immunol., vol. 158, p. 816-826.
- KIRKPATRICK, R. B. and Shatzman. 1999. Drosophila S2 System for heterologous gene expression dans Gene expression systems. Edited by Joseph M. Fernandez and James P. Hoeffler. Academic Press. Toronto, Canada
- KLINMAN, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. and Krieg, A. M. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. Proc. Natl Acad Sci USA., vol. 93, p. 2879-2883.
- KOOL, M. and Vlak, J. M. 1993. The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. Arch. Virol., vol 130(1-2), p.1-16.
- KRAUSE, C. 1995. The use of dendrochronological material from buildings to get information about past spruce budworm outbreaks. Canadian journal of forest Research, vol. 27, p. 69-75.
- KRIEG, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky G. A. and Klinman, D. M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. Nature, vol. 374, p. 546-549.
- KRIEG, A. M., Yi, A. K., Schorr, J., Davis, H. L. 1998. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. Trends in Microbiology, Vol. 6 (1), p. 23 – 27.
- KUBY, J. 1997. Immunology. Third Edition. W. H. Freeman and Compagny. New York, USA.
- KUCEROVA, L. 1998. DNA/Genetic Vaccination (minireview). Viral immunology, vol. 11 (2), p. 55-63.
- KUSACABE, K., Xin, K. Q., Katoh, H., Sumino, K., Hagiwara, E., Kawamoto, S., Okuda, K., Miyagi, Y., Aoki, I., Nishioka, K. and Klinman, D. 2000. The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific ADN vaccine. J. Immunol., vol. 164(6), p. 3102-3111.
- KUZIO, J., Rochel, D. Z., Curry, C. J., Krebs, A., Carstens, E. H., and Faulkner, P. 1984. Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, vol. 139, p. 414-418

- KUZIO, J., Jaques, R. and Faulkner, P. 1989. Identification of p74 a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. Virology, vol. **173**, p. 759-763.
- KYTE, J., and Doolittle, R. F. 1982. Hydropathicity. J. Mol. Biol., vol. 157, p. 105-132.
- LEE, S. Y., Poloumienko, A., Belfry, S. Qu, X., Chen, W., MacAfee, N., Morin, B., Lucarotti, C., and Krause, M. 1996. A common pathway for p10 and calyx proteins in progressive stages of polyhedron envelope assembly in AcMNPV-infected *Spodoptera frugiperda* larvae. Arch. Virol., vol. 141. p. 1247-1258.
- LEISY, D.J. Rohrmann, G. F., Nesson, M., and Beaudrea, G. S. 1986. Nucleotide sequencong and transcriptional mapping of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus p10 gene. Virology, vol. 163, p.157-167.
- LIGONDÉ, A. 2000. Immunisation génétique anti-BLV: Effet sur la réponse immunitaire humorale. Mémoire. INRS-Institut-Aramand-Frappier, Laval.
- LIU, A., Qin, J., Rankin, C., Hardin, S. E. and Weaver, R. F. 1986. Nucleotide sequence of a portion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome containing the *EcoRI* site-rich region (hr5) and an open reading frame just 5' of the p10 gene. J. Gen. Virol., vol. 67, p. 2565-2570.
- LUPAS, A., Van Dyke, M. and Stock, J. 1991. Predicting Coiled Coils from Protein Sequences. Science, vol. 252, p. 162-1167.
- LUQUE, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D.R. and Winstanley, D. 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. J. Gen. Virol., vol. 82 (10), p. 2531-47.
- MACKINNON, E. A., Henderson, J. F., Stoltz, D. B. and Faulkner, P. 1974. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage in vitro. J. Ultrastruct. Res., vol. 49, p. 419-435.
- MANICKAN, E., Daheshia, M., Kuklin, N., Chun, S., and Rouse, B. T. 1998. Modulation of virus-induced delayed-type hypersensibility by plasmid DNA encoding the cytokine interleukin-10. Immunology, vol. 94, p.129-134.
- MEADE, H. M., Echelard, Y., Ziomek, C. A., Young, M. W., Harvey, M., Cole, E. S., Groet, S., Smith, T. E. and Curling, J. M. 1999. Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals dans Gene expression systems. Edited by Joseph M. Fernandez and James P. Hoeffler. Academic Press. Toronto, Canada.



- MILLER, L. K., Adang, M. J. and Bowne, D. 1983. Protein kinase activity associated with the extracellular and occluded form of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol., vol. 46, p. 275-278.
- MILLER, L. K. 1988. Baculovirus for foreign gene expression in insect cells. Biotechnology, vol. 10, p. 457-465.
- MILLER, L. K. 1993. Baculoviruses: high-level expression in insect cells. Curr. Opin. Genet. Dev., vol 3(1), p. 97-101.
- MINNION, F. C., Coons, L. B. and Broome, J. R. 1979. Characterization of the polyhedral envelope of the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis virescens*. J. Invertebr. Pathol., vol. 34, p. 303-307.
- MOR, G., Yamshchikov, G., Sedegah, M., Takeno, M., Wang, R. Houghten, R. A., Hoffman, S. and Klinman, D. M. 1996. Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination of mice. J Clin Invest., vol. 98, p. 2700-2705.
- MOR G. 1998. Commentary. Plasmid DNA : A new era in vaccinology. Biochemical Pharmacology, vol. 55, p. 1151-1153.
- MORICEAU, P., Hen, R., Wasyluk, B., Everett, R., Gaub, M. P. and Chambon, P. 1981. The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. Nucleic Acids Res., vol. 25;9 (22), p. 6047-6068.
- MORIN, H., et Laprise, D. 1990. Histoire récente des épidémies de la Tordeuse des bourgeons de l'épinette au nord du Lac Saint-Jean, Québec: une analyse dendrochronologique. Can. J. Forest Res., vol. 20, p. 1-8.
- MORRISEY, P., Bressler, L., Park, L. S., Alpert, A. and Gillis, S. 1987. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments de primary antibody response by enhancing the function of antigen-presenting cells. J. Immunol., vol. 139, p. 1113-1119.
- PASQUINI, S., Xiang, Z., Wang, Y., He, Z., Deng, H., Blaszczyk-Thurin, M. and Ertl, H. C. J. 1997. Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants. Immunol. Cell Biol., vol. 75, p. 397-401.
- PEARSON, M. N., Russell, R. L., Rohrmann, G. F., and Beaudreau, G. S. 1988. P39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. Virology, vol. 167(2), p. 407-413
- OLSZEWSKI, J., and Miller L.K. 1997. A role for GP41 in budded virus production. Virology vol. 233, p. 292-301.

- Ooi, B. G., Rankin, C., and Miller, L. K. 1989. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. Journal of molecular Biology, vol. 210, p. 721-736.
- QUANT-RUSSELL, R. L., Pearson MN, Rohrmann GF, Beaudreau GS. 1987. Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. Virology, vol. 160(1), p. 9-19.
- RAKHMILEVICH, A. L., Turner, J. Ford, M. J. 1996. Gene gun-mediated skin transfection with interleukine 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. Proc. Natl Acad. Sci. USA., vol. 93, p. 6291-6296.
- RAMSAY, A. J., Ramshaw, I. A. and Ada, G. L. 1997. DNA immunization. Immunology and Cell Biology, vol. 75, p. 360-363.
- RAMSHAW, I. A. and Ramsay, A. J. 2000. The prime-boost strategy : exciting prospects for improved vaccination. Immunology, vol. 21 (4), p.163-165.
- RANKIN, C., Ladin, B. F., and Weaver, R. F. 1986. Physical mapping of temporally regulated, overlapping transcripts in the region of the 10K protein gene in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol., vol. 57, p. 18-27.
- RANKIN, C., Ooi, B. G. and Miller, L. K. 1988. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. Gene, vol.70, p. 39-49.
- RAZ, E., Watanabe, A., Baird, S., Eisenberg, R. A., Parr, T. B., Lotz, M., Kipps, T. J. and Carson, D. 1993. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, p. 4523-4527.
- RAZ, E., Carson, D.A., Parker, S.E, Parr, T.B. Abai, A.M. Aichinger G. Gromkowsi, S.H. Singh, M. Lew, D., Yankauckas, M.A., Bair S.M. and Rhodes G.H. 1994. Intradermal gene immunisation : the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to virus. Proc. Natl. Acad. USA, vol. 91, p. 9519-9523.
- RAZUCK, F. B., Ribeiro, B., Vargas, J. H., Wolff, J. L. and Ribeiro, B. M. 2002. Characterization of the p10 gene region of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. Virus genes, vol. 24(3), p. 243-247.
- ROBERTSON, J. S., Harrap, K. A., Longworth, J. F. 1974. Baculovirus morphogenesis : The acquisition of the virus envelope. J. Invert. Pathol., vol. 13, p. 248-251.
- ROBINSON, H. L., Hunt, L.A. and Webster, R. G. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a hemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine, vol. 11(9), p. 957-960.

- RODITI, I., Carrington, M. and Turner. 1987. Expression of a polypeptide containing a dipeptide repeat is confined to the insect stage of *Trypanosoma brucei*. Nature, vol. 325, p. 272-274.
- ROGY, M. A., Auffenberg, T., Espat, N. J., Philip, R., Remick, D., Wollenberg, G. K., Copelan, E. M., and Moldawer, L. L. 1995. Human tumor necrosis factor receptor (p55) and interleukin 10 gene transfer in the mouse reduces mortality to lethal endotoxemia and also attenuates local inflammatory. J. Exp. Med., vol. 181, p. 2289-2293
- ROHEL, D. Z., Cochran, M A., and Faulkner, ). 1984. Characterization of two abundant mRNAs of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus present late in infection. Virology, vol. 124, p. 357-365.
- ROHRMANN, G. F. 1986. Polyhedrin structure. J. Gen. Virol., vol. 67, p.1499-1513.
- ROHRMANN, G. F. 1992. Baculovirus structural proteins. J. Gen. Virol., vol. 73, p. 749-761.
- SANFORD J.C., Smith, F. D., Russell, R. A. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods Enzymol., vol. 217, p. 483-509.
- SATO, Y., Roman, M. Tigue, J., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Sioverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A. and Raz, E. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. Science, vol. 273, p. 352-354.
- SCHEERLINK, J-P. Y. Genetic adjuvant for DNA vaccines. Vaccine, vol. 19, p. 2647-2656.
- SERVICE CANADIEN DES FORÊTS (SCF). 2000. La tordeuse des bourgeons de l'épinette 100 ans d'expertise au SCF. Ressources naturelles Canada. Québec.
- SMITH, G., Vlaskovits, J. M. and Summers, M. D. 1983. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000-molecular-weight-protein. J. Virol., vol. 45, p. 215-225.
- SMITH, G., Summers, M. and Fraser, M. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biology, vol. 3, p. 2156-2165
- SRIAM, S., and Gopinathan, K. P. 1998. The potential role of late gene expression factor, lef2, from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus late gene transcription and DNA replication. Virology, vol. 251, p.108-122.

- SUMMER, M. D. and Arnott. 1969. Ultrastructural studies on occlusion formation and virus occlusion in nuclear polyhedrosis and granulosis-infected cells of *Trichoplusia ni*. J. Ultrastr. Res., vol. 28, p. 462-480.
- SUMMER, M. D. 1971. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. J. Ultrastr. Res., vol. 35, p. 606-625.
- SUMMERS, M.D. and Egawa. 1973. Physical and chemical properties of *Trichoplusia ni* granulosis virus granulin. J. Virol., vol. 12, p. 1092-1103.
- SUMMERS, M.D., and Smith, G. E. 1976. Comparative studies of baculovirus granulins and polyhedrins. Intervirology, vol. 6, p. 168-180.
- SUMMERS, M.D. 1977. Baculovirus (Baculoviridae). In : The atlas of plant and animal virus, Maramorosh, K (Ed), Academic Press. New York.
- SUMMER, M. D., and Smith, G. E. 1978. Baculovirus structural polypeptides. Virology, vol. 84, p. 390-402.
- SUN, W. H. Burkholder, J. K., Sun, J., Culp, J., Turner, J., Lu, X. G., Pugh, T. D., Ershler, W. B. and Yang, N-S. 1995. *In vivo* cytokine gene transfert by gene gun reduce tumor growth in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, p. 2889-2893.
- TANADA, Y, and Hess, R. T. 1984. The cytopathology of baculovirus infection in insects *dans* Ultrastructure, Édité par R. C. Kung & H. Arai. New York, Plenum Press vol. 2, p.517-556.
- TANADA, Y., Hess, R.T. 1993. DNA viral infections : Baculoviridae. Dans : Dams & J.R. Bonami (éd), Atlas of invertebrate Virus. CRC Press Inc. Boca Raton. 227-257.
- TANADA, Y., and Leutenegger, R. J. 1970. Multiplication of granulosis virus in larval midgut cells of *Trochoplusia ni* and possible pathways invasion into the hemocoel. J. Ultrastr. Res., vol. 30, p. 389-600.
- TANG, D-C., De Vit, M. and Johnston, S. A. 1992. Genetic immunisation is a simple methode for eliciting an immune response. Nature, vol. 356, p. 152-154.
- TAO, M-H. and Levy, R. 1993. Idiotypic/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. Nature, vol. 362, p. 755-758.
- THIEM, S. M. and Miller, L. K. 1989. Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrovirus. J. Virol., vol. 63, p. 2003-2018.

- THOMAS, C. J., Brown, H. L., Hawes, C. R. Lee., B. Y, Min., M-K., King, L. A. and Possee, R. D. 1998. Localisation of a baculovirus-induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum. J. Virol., vol. 72 (12), p. 10207-10212.
- TORRES, C. A., Iwasaki, A., Barder, B. H., Robinson, H. L. 1997. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. J Immunol., vol. 15;158(10), p. 4529-4532.
- TOWBIN, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci., vol 76, p. 4350-4354.
- TRINCHIERI, G. 1995. Interleukine-12 : A proinflammatory cytokine with immunoregulation fonction that brige innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu. Rev. Immunol., vol. 13, p. 251-276.
- TWEETEN, K. A., Bulla, L. A., Consigli, R. A. 1977. Spercoiled circular DNA of an insect granulovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 74, p. 3574-3578.
- TWEETEN, K. A., Bulla, L. A., and Consigli, R. A. 1980. Characterization of an extremely basic protein derived from granulovirus nucleocapsid. J. Virol., vol 33, p. 866-876.
- TWEETEN, K. A., Bulla, L. A., and Consigli, R. A. 1981. Applied and molecular aspect of insect granulosis virus. Microbiol. Rev. 3 : 379-408.
- ULLMAN A., Jacob F. et Monod J. 1967. Characterisation by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. J. M. B., vol. 24, p. 339-343.
- ULMER, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S.E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki V. J., Gromkowski S. H., Deck R. R., DeWitt, C.M., Friedman, A. Hawe L. A., Leander K. R., Marinez D, Perry HC, Shiver J. W., Montgomery D.L. and Liu M. A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science, vol. 259, p. 1745-1749.
- ULMER, J.B., Deck, R.R., Dewitt, C.M., Donnelly, J.J., Lia M.A. 1996. Generation of MCH class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells : antigen presentation by non-muscle cells. Immunology, vol. 89, p. 59-67.
- ULMER, J. B., Donnelly, J. J., Deck, R. R., DeWitt C. M. and Liu M.A. 1995. Immunization against viral proteins with naked DNA. Ann NY Acad Sci., vol. 772, p. 117-125.

- VAN DER WILK, F., Van Lent, J. W., Vlak, J. M. 1987. Immunogold detection of polyhedrin, P10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. J. Gen. Virol., vol. 68, p. 2615-2623.
- VAN OERS, M. M., Flipsen, J. T. M., Reusken, C. B. E. M., Sliwinsky, E. L., Golbach, R. W. and VLAK, J. M. 1993. Functional domains of P10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol., vol. 74, p. 563-574.
- VAN OERS, M. M., Flipsen, J. T. M., Reusken, C.B. E. M., and Vlak, J. M. 1994. Specificity of P10 function. Virology, vol. 20, p. 513-523.
- VAN OERS, M. M., and Vlak, J. M. 1997. The Baculovirus 10 kDa Protein. J. Invertebr. Pathol., vol. 70 (1), p. 1-17.
- VAN OERS, M. M., Hu, Z., Arif, B. M., Van Strien, E. A., Van Lent, J. W. M. and Vlak J. M. 1998. The single-nucleocapsid nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria* encodes a p10 protein. J. Gen. Virol., vol. 79, p. 1553-1562.
- VAN OERS, M. M., Vlak, J. M., Voorma, H. O., and Thomas, A. M. 1999. Role of the 3' untranslated region of the baculovirus p10 mRNA in high-level expression of foreign genes. J. Gen. Virol., vol. 80, p. 2253-2262.
- VIALARD, J. E., Arif, B. M. and Richardson, C. D. 1995. Introduction to the molecular biology of baculoviruses dans Methods in molecular biology, vol. 39: Baculovirus Expression protocols. C. D. Richardson. Humana Press inc. Totowa, NJ.
- VLAK, J. M., Klinkerberg, F. A., Zaal, K. J. M., Usmany, M., Klinge-Roode, E. C., Geervliet, J. B. F., Roosien, J. and Van Lent, J. W. M. 1988. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10  $\beta$ -galactosidase fusion gene. J. Gen. Virol., vol. 69, p. 765-776.
- VOLKMAN, L. E. and Golosmith, P. A. 1984. Budded *Autographa californica* NPV 64K protein. Further biochemical analysis and effects of postimmunoprecipitation sample preparation conditions. Virology, vol. 139, p. 295-302.
- VOLKMAN, L. E. 1986. The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Curr. Top. Microbiol. Immunol., vol. 131, p. 103-118.
- VOLKMAN, L. E., and Blissard, G. W. 1995. Baculoviridea: Taxonomic structure and properties of the family. In classification and nomenclature of viruses: Sixth report of the international committee for the taxonomy of viruses. Arch. Virol., vol. Supplement 10, p.104-113.

- WAHL, S. M., McCartney-Francis, N. and Mergenhagen, S. E. 1989. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-beta. Immunol Today, vol. 10, p. 258-261.
- WANG, Y., Xiang, Z., Pasquini, S. and Ertl., H. C. J. 1997. Immune response to neonatal genetic immunization. Virology, vol. 228, p. 278-284.
- WASHBURN, J. O., Chan, E. Y., Volkman, L. E., Aumiller, J. J., Jarvis, D. L. 2003. Early synthesis of budded virus envelope fusion protein GP64 enhances *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus virulence in orally infected *Heliothis virescens*. J. Virol., vol. 77(1), p. 280-90.
- WATSON, J. D., Gilamn, M., Witkowski, J., and Zoller, M.1994. ADN recombinant. 2<sup>e</sup> Édition. DeBoeck Université, Bruxelles.
- WHITT, M. A. and Manning, J. S. 1988. A phosphorylated 34 kDa protein and subpopulation of polyhedrine are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. Virology, vol. 163, p. 33-42.
- WILD, J., Gruner, B., Metzger, K., kuhrober, A., Pudollek, H. P., Hausser., H., Schirmbeck, R. and Reimann, J. 1998. Polyvalent vaccination against hepatitis B surface and core antigen using a dicistronic expression plasmid. Vaccine, vol. 16, p. 353-360.
- WILLIAMS, G. V., Rohel, D. Z. Kuzio, J., Faulkner, P. A. 1989. Cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants. J. Gen. Virol., vol. 70, p. 187-202.
- WILSON, M. E., Consigli, R.A. 1985. Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. Virology, vol. 143, p. 526-535.
- WILSON, M. E, Mainprize, T. H., Friesen, P. D. and Miller, L. K. 1987. Location, transcription and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. J. Virol., vol. 61, p. 661-666.
- WILSON, M. E., and Price, K. H. 1988. Association of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) with nuclear matrix. Virology, vol. 167, p. 233-241
- WILSON, J. A. Hill, J. E., Kuzio, J., and Faulkner, P. 1995. Sequence and transcriptional analysis of the baculovirus *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus (CfMNPV) p10 gene, Identification of coiled coil domain. J. Gen. Virol., vol. 76, p. 2923-2932.
- WHITT, M. A and Manning, J. S. 1988. A phosphorylated 34 kDa protein and subpopulation of polyhedrine are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. Virology, vol. 163, p. 33-42

- WHITFORD, M. and Faulkber, P. 1992. A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. J. Virol., vol. 66, p. 3324-3329.
- WOLFF, J. A., Malone, R. W., Williams, P., W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P. L., 1990. Direct gene transfert into mouse muscle in vivo. Science, vol. 247, p. 1465-1468.
- WOLGAMOT, G. M. Gross, C. H., Russel, R. L. Q. and Rohrmann, G. F. 1993. Immunocytochemical characterization of p24, a baculovirus capsid-associated protein. J. Gen. Virol., vol. 74, p. 103-107.
- XIANG, Z. Q., Ertl, H. C. J. 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with with plasmids expressing cytokines. Immunity, vol. 2, p. 129-135.
- YAMATOTO, T., and Tanada, Y. 1979. Comparative analysis of the enveloped virion of two granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. Virology, vol. 94, p. 71-81.
- YANG ,S. at Miller, L. K. 1999. Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factors . J. Virology, vol. 73 (4), p. 3404-3409.
- YI, A. K., Tuetken, R., Redford T., Waldschmidt, M., Kirsch, J. and Kireg, A. M. 1998. CpG motifs in bacteria DNA activate leukocytes throught he pH-depending generation of reactive oxygen species. J. Immunol., vol. 160, p. 4755-4761.
- ZHENG, L., Swanson, M., Liao, J., Wood, C., Kapil, S., Snider, R., Loughin, T. A. and Minocha, H.C. 2002. Cloning of the bovine Immunodefience virus gag gene and developement of a recombiant-protein-based enzyme-linked immunosorbent assay., vol. 7 (4), p. 557-562.
- ZUIDEMA, D., Van Oers, M. M., Van Strien, E. A., Caballero, P. C., Kolk., E-J., Goldbach, R. W., and Vlak, J. M. 1993. Nucleotide sequence and transcriptional analyses of the p10 gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol., vol. 74, p. 1017-1024.