

JOSÉE LEBLANC

**Caractérisation moléculaire des protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée
du granulovirus de *Choristoneura fumiferana***

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

Jury d'évaluation:

Lise Thibodeau, Ph.D.
Jean-Charles Côté, Ph.D.
Abderazzak Merzouki, Ph.D.
Claude Guertin, Ph.D.

25-07-2002

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Institut Armand-Frappier
Université du Québec

Table des matières

Table des matières.....	ii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Sommaire.....	1
Introduction.....	3
Revue bibliographique.....	5
1.1 Tordeuse des bourgeons de l'épinette (<i>Choristoneura fumiferana</i> Clem.).....	6
1.1.1 Généralités.....	6
1.1.2 Cycle de vie de <i>C. fumiferana</i>	6
1.1.3 Périodes épidémiques des populations de <i>C. fumiferana</i>	7
1.1.4 Prévention et contrôle des pertes de matières ligneuses.....	7
1.2 Baculovirus.....	8
1.2.1 Nucléopolyédrovirus (NPV) et Granulovirus (GV).....	8
1.2.2 Avantages des baculovirus en lutte biologique.....	9
1.3 Granulovirus.....	9
1.3.1 Morphologie et ultrastructure.....	9
1.3.2 Protéines des GV.....	10
1.3.2.1 Protéines associées au corps d'inclusion des GV.....	13
1.3.2.2 Protéines associées à la nucléocapside enveloppée des GV.....	13
1.3.3 Infection et réplication des granulovirus.....	16
1.3.3.1 Infection primaire.....	16
1.3.3.1.1 Protéines associées à la phase précoce de la réplication virale.....	16
1.3.3.1.2 Protéines associées à la phase tardive de la réplication virale.....	17
1.3.3.2 Infection secondaire.....	17
1.4 Caractérisation de la protéine p39 des nucléocapsides enveloppées des baculovirus.....	18
1.4.1 Généralités.....	18
1.4.2 Rôle de la protéine p39.....	19

	iii
1.4.3 Gène codant pour la protéine p39 des baculovirus	22
1.5 caractérisation de la protéine ODVP-6E des baculovirus.....	22
1.5.1 Rôle de la protéine ODVP-6E.....	22
1.5.2 Gène codant pour la protéine ODVP-6E	23
1.6 Hypothèse et objectifs.....	24
Approche expérimentale	25
2.1 Production du ChfuGV	26
2.2 Purification des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV.....	27
2.3 Analyses par microscopie électronique des suspensions de ChfuGV et de nucléocapsides enveloppées du ChfuGV.....	27
2.4 Analyses des protéines des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV	28
2.5 Extraction de l'ADN du ChfuGV	29
2.6 Séquençage des protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV ..	30
2.6.1 Transfert sur membrane de nitrocellulose des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV pour le séquençage peptidique de la p34	31
2.6.1.1 Séquençage de la région amino-terminale de la protéine p34	32
2.6.1.2 Séquençage de courtes régions internes de la protéine p34.....	32
2.6.2 Séquençage de courtes régions internes de la protéine p39.....	33
2.7 Amplification par PCR des gènes codant pour les protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.....	33
2.7.1 Clonage des gènes codant pour les protéines p34 et p39.....	35
2.7.1.1 Ligation des gènes codant pour les protéines p34 et p39 dans le vecteur <i>PCR@2.1</i>	35
2.7.1.2 Transformation bactérienne des produits de ligation.....	36
2.7.1.3 Sélection des colonies recombinantes.....	36
2.7.1.4 Préparation de l'ADN plasmidique des recombinants	37
2.7.1.5 Digestion enzymatique des plasmides recombinants.....	38
2.7.2 Séquençage des plasmides recombinants.....	38
2.8 Vérification de la provenance des amplicons codant pour les protéines p34 et p39 du ChfuGV.....	42

2.8.1 Extraction de l'ARN total du ChfuGV	42
2.8.2 Amplification par technique de RT-PCR des gènes codant pour une portion de la p34 et de la p39 du ChfuGV à partir de l'ARN total extrait.....	44
Résultats.....	46
3.1 Production virale et purification des nucléocapsides virales enveloppées	47
3.2 Analyse des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV	47
3.3 Extraction de l'ADN du ChfuGV	48
3.4 Caractérisation moléculaire du gène codant pour la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.....	55
3.5 Vérification de la provenance du gène amplifié codant pour une portion de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV	73
3.6 Caractérisation moléculaire de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.....	82
3.7 Vérification de la provenance du gène amplifié codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV	97
Discussion.....	103
4.1 Généralités	104
4.2 Analyses des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.....	104
4.3 Caractérisation moléculaire du gène codant pour la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.....	107
4.4 Caractérisation du gène codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV	110
Conclusion	115
Remerciements.....	120

Liste de références 121

Liste des tableaux

Tableau 1: Représentation du pourcentage d'identité entre la séquence de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV et la protéine d'enveloppe ODVP-6E de d'autres baculovirus.....	96
---	----

Liste des figures

- Figure 1: Granulovirus de *Choristoneura fumiferana*..... 11
- Figure 2: Représentation schématique de l'implication de la protéine p39 dans le processus d'attachement des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV à l'actine polymérisée dans le cytoplasme. 20
- Figure 3: Amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage des gènes codant pour les protéines p34 et p39 du ChfuGV. 39
- Figure 4-A: Microphotographie prise en microscopie électronique d'une suspension de ChfuGV produit *in vivo*. 49
- Figure 4-B: Microphotographie d'une suspension de nucléocapsides enveloppées de ChfuGV..... 49
- Figure 5: Analyse sur gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE du fractionnement des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV en conditions dénaturantes réductrices..... 51
- Figure 6: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose de l'ADN du ChfuGV..... 53
- Figure 7: Protéines totales de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV transférées sur membrane de nitrocellulose. 59
- Figure 8: Chromatographe représentant les produits de digestions tryptiques internes de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV analysés par HPLC 61
- Figure 9: Comparaison de la séquence du peptide de 18 acides aminés provenant du séquençage de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV et de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du XnGV..... 63
- Figure 10: Analyse électrophorétique sur un gel d'agarose des amplicons du gène codant pour la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée ChfuGV. ... 65
- Figure 11: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des plasmides recombinants contenant le gène codant pour une portion de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV digérés par l'endonucléase de restriction *EcoRI*. 68
- Figure 12- A: Séquence nucléotidique des clones recombinants 11 et 13 correspondant au gène codant pour une portion de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV..... 71

- Figure 12- B: Séquence peptidique partielle de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV..... 71
- Figure 13: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose de l'extraction d'ARN total provenant d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV..... 75
- Figure 14: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des amplicons correspondants à une portion du gène de la protéine p34 du ChfuGV obtenus par un RT-PCR effectué sur l'ARN total extrait d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV..... 78
- Figure 15: Analyse sur gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE du fractionnement des protéines des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV en conditions dénaturantes et non réductrices..... 84
- Figure 16: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des amplicons obtenus codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV..... 86
- Figure 17: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose du plasmide recombinant contenant le gène codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV digéré par l'endonucléase de restriction *EcoRI*..... 89
- Figure 18: Séquence nucléotidique du clone recombinant correspondant au gène codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV..... 92
- Figure 19: Séquence peptidique partielle d'une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV..... 92
- Figure 20: Comparaison de la séquence peptidique partielle de la protéine p39 du ChfuGV avec la séquence aminée de la protéine d'enveloppe ODVP-6E de CpGV, XnGV, AsGV, LdMNPV, OpMNPV, BmMNPV, CfNPV et AcMNPV. 94
- Figure 21: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des amplicons correspondants au gène codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV obtenus par RT-PCR effectué sur l'ARN total extrait d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV. 99

Liste des abréviations

AcMNPV:	nucléopolyédrovirus d' <i>Autographa californica</i>
AsGV:	granulovirus d' <i>Agrotis segetum</i>
BmMNPV:	nucléopolyédrovirus de <i>Bombyx mori</i>
BSA:	albumine de sérum bovin
BV:	virus bourgeonnant
ChfuGV:	granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
CfMNPV:	nucléopolyédrovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
CpGV:	granulovirus de <i>Cydia pomonella</i>
EGT:	ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase
FPMI:	Forest Pest Management Institute
GV:	granulovirus
HzSNPV:	nucléopolyédrovirus d' <i>Helicoverpa zea</i>
IRB:	Institut de recherche en biotechnologies
LdMNPV:	nucléopolyédrovirus de <i>Lymantria dispar</i>
NPV:	nucléopolyédrovirus
ODV:	Virus dérivant d'une inclusion
OpMNPV:	nucléopolyédrovirus d' <i>Orgyia pseudotsugata</i>
OV:	virus inclus
PiGV:	granulovirus de <i>Plodia interpunctella</i>
PTA:	acide phosphotungstique
PuGV:	granulovirus de <i>Pseudaletia unipuncta</i>
TFA:	trifluoroacétyl
XnGV:	granulovirus de <i>Xestia c-nigrum</i>

Sommaire

Le but de ce travail de recherche consistait à caractériser deux gènes codant pour les protéines structurales p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV). Les objectifs étaient de cloner et séquencer ces gènes. Dans un premier temps, le séquençage de la protéine de 34 kDa, soit la p34, du ChfuGV par le biais des digestions tryptiques internes et de l'analyse par HPLC, a permis d'obtenir une courte séquence peptidique (IFQGV) présentant un pourcentage d'identité de 100% avec une portion de la séquence aminée de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du granulovirus de *Xestia c-nigrum*. Par la suite, un fragment d'ADN correspondant au gène codant pour une portion de la p34 a été amplifié à l'aide d'amorces oligonucléotidiques dégénérées, cloné et séquencé. Le contenu en nucléotides G/C de la séquence nucléotidique obtenue (317 nucléotides) a été évalué à 48%. Un cadre de lecture ouvert de 106 acides aminés a été déduit de la séquence nucléotidique de l'amplicon. Le contenu en acides aminés hydrophobes de la séquence aminée a été évalué à 57,5% et deux cystéines pouvant être impliquées dans la stabilité de la structure tertiaire de cette protéine ont été observées. Cependant, aucune homologie concluante n'a été observée avec aucune autre séquences aminées répertoriées dans la littérature. Dans un deuxième temps, l'amplification à l'aide d'amorces oligonucléotidiques d'un fragment d'ADN correspondant au gène codant pour une portion de la protéine de 39 kDa, soit la p39, du ChfuGV, a permis d'obtenir une séquence nucléotidique de 570 nucléotides ayant un contenu en nucléotides G/C évalué à 40,5%. Un cadre de lecture ouvert de 186 acides aminés a été déduit de la séquence nucléotidique. Le contenu en acides aminés hydrophobes de la séquence aminée a été évalué à 55,5%. Un pourcentage d'homologie de 88% a été observé avec une portion de la séquence aminée de la protéine d'enveloppe ODVP-6E du granulovirus de *Cydia pomonella*. Le pourcentage d'acides aminés hydrophobes contenus dans la séquence aminée de la p39 du ChfuGV a été évalué à 50,5%.

Les connaissances obtenues lors de ce projet d'étude ont permis d'identifier et d'étudier deux gènes codant pour des protéines structurales d'un entomopathogène, le

ChfuGV, ayant un potentiel insecticide. Cette étude a ainsi permis d'améliorer nos connaissances au niveau de la biologie moléculaire de ce virus, un domaine où jusqu'à ce jour très peu d'études ont été effectuées.

Étudiant

José Leblanc

Directeur de recherche

Introduction

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (*C. fumiferana*) est le plus important ravageur forestier des peuplements de sapins baumiers et d'épinettes blanches en Amérique du Nord (Base nationale de données sur les forêts, 1996). Des études antérieures ont démontré le potentiel insecticide du ChfuGV (granulovirus de *Choristoneura fumiferana*) contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Guertin, 1995; Forté *et al.*, 1999). Cependant, peu d'études ont été effectuées au sujet de la caractérisation moléculaire de ce virus.

Ce projet de recherche s'intéresse à l'identification et à la caractérisation moléculaire des gènes codant pour les protéines structurales p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du baculovirus ChfuGV. D'une part, deux gènes codant pour deux protéines dont la masse moléculaire a été estimée à 34 kDa sont documentés dans la littérature. En effet, l'ORF891 de *C. fumiferana* et le gène Hz-1V de *Heliothis Zea* ont été partiellement caractérisés mais ne semblent pas avoir jusqu'à ce jour de fonctions connues (Guttieri et Burand, 1996; Bah *et al.*, 1999). D'autre part, la protéine de 39 kDa, la p39, des baculovirus est une protéine qui joue rôle important dans la réplication et est impliquée dans l'induction de la formation de filaments serrés d'actine qui s'étendent du cytoplasme jusqu'à la membrane nucléaire (Russell *et al.*, 1991; Charlton et Volkman, 1993). Selon Lanier et Volkman (1998), les nucléocapsides enveloppées s'attachent aux filaments d'actine et se déplacent jusqu'au noyau cellulaire par un mécanisme de translocation afin de permettre la réplication de l'ADN viral.

L'identification et la caractérisation des gènes codant pour les protéines structurales p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV permettra d'approfondir les connaissances au niveau de la biologie moléculaire du génome du ChfuGV, un entomopathogène ayant un potentiel insecticide et des granulovirus en général, un domaine où à ce jour, très peu d'études ont été effectuées.

Revue bibliographique

1.1 Tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem.)

1.1.1 Généralités

La tordeuse des bourgeons de l'épinette est le plus important ravageur des peuplements de conifères en Amérique du Nord. Une population de cet insecte peut causer des défoliations très sévères principalement au niveau des forêts de sapins baumiers (*Abies balsamea* (L. Mill)) et d'épinettes blanches (*Picea glauca* (Moench Voss)) (Comptois, 1988; Bah *et al.*, 1997; Forté *et al.*, 1999). C'est un insecte appartenant à l'ordre des Lépidoptères et à la famille des *Tortricidae* (Cunningham, 1985; Harvey, 1985; Gray *et al.*, 1998).

La distribution géographique de la tordeuse des bourgeons de l'épinette suit de près la distribution de ses hôtes préférentiels. Cet insecte est retrouvé sur un territoire très vaste qui s'étend des provinces maritimes jusqu'en Colombie Britannique (Harvey, 1985). Au Canada, les provinces les plus fortement atteintes par les épidémies de tordeuses sont le Nouveau- Brunswick, le Québec et l'Ontario (Mattson *et al.*, 1988).

1.1.2 Cycle de vie de *C. fumiferana*

La tordeuse des bourgeons de l'épinette possède un cycle de vie d'une durée d'un an (Mattson *et al.*, 1988). Ce cycle se caractérise par un stade oeuf, six stades larvaires, un stade chrysalide et un stade papillon (Bonneau *et al.*, 1999). Les papillons déposent leurs oeufs à la surface des aiguilles des sapins et des épinettes entre la mi-juillet et la mi-août (Talerico, 1984). Après l'incubation des oeufs pour une durée de 10 à 14 jours, il y a émergence des larves de premier stade. Ces larves fabriquent un abris de soie appelé *hibernaculum* (Mattson *et al.*, 1988). C'est dans cet *hibernaculum* que la larve passe l'hiver. Au printemps, les larves émergent de leur abri et débutent leur alimentation composée principalement de nouveaux bourgeons. Les larves s'alimentent ainsi jusqu'à l'atteinte du sixième stade (Nigam, 1995). C'est au début du mois de juillet que les larves se transforment en chrysalide d'où émergent les papillons (stade adulte). Les adultes ne

vivent qu'une dizaine de jours, le temps de l'accouplement et de la ponte (Bonneau *et al.*, 1999).

1.1.3 Périodes épidémiques des populations de *C. fumiferana*

Des périodes épidémiques récurrentes caractérisent les populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Au cours du 20^{ième} siècle, des infestations de la tordeuse ont été observées au Québec en 1910, 1940, 1967 et 1992 (Lachance, 1995; Gray *et al.*, 1998). Les épidémies de tordeuses sont des phénomènes naturels et cycliques qui apparaissent tous les 35 à 40 ans (Morris, 1963; Royama, 1984; Blais, 1985). Lorsque les épidémies persistent, elles entraînent la mortalité des arbres. Selon Royama (1984) et Blais (1985), les cycles épidémiques de *C. fumiferana* seraient régis par un phénomène appelé "pullulation-effondrement". Ce phénomène suggère que les peuplements d'arbres qui vieillissent deviennent plus susceptibles aux attaques de tordeuses, dû notamment à une augmentation des sources de nourriture (Morris, 1963; Blais, 1985). Ces épidémies persistent jusqu'à ce que la nourriture soit entièrement consommée, ce qui entraîne une mortalité élevée des arbres. Cependant, différents facteurs tels que le climat, les parasites, les prédateurs naturels et les maladies peuvent contribuer au déclin des populations de cet insecte (Régnière et Lysyk, 1995). Dans ce contexte, il faut considérer le rôle du granulovirus de *C. fumiferana*, le ChfuGV, dans la dynamique des populations de cet insecte, puisque c'est un entomopathogène ayant un potentiel insecticide.

1.1.4 Prévention et contrôle des pertes de matières ligneuses

Les infestations par la tordeuse des bourgeons de l'épinette causent des défoliations très sévères lors des périodes épidémiques causant ainsi de 80 à 90% de mortalité dans les peuplements de sapins (Blais, 1983). L'identification des peuplements d'arbres à risques, la modification de la composition d'un peuplement au profit d'un autre plus résistant aux différents insectes, la récupération des arbres morts et la récolte des arbres plus sensibles aux attaques d'insectes avant le début d'une épidémie constituent des moyens de contrôle mis en place afin de limiter les pertes de matières ligneuses (Bonneau *et al.*, 1999).

La pulvérisation d'insecticides constitue l'unique moyen de limiter directement les populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Kettala, 1995; Nigam, 1995). L'utilisation d'insecticides chimiques en milieu forestier étant maintenant interdite, seules des préparations de biopesticides à base de l'endotoxine du *Bacillus thuringiensis* sont utilisées dans les programmes de lutte contre les populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Les préparations de biopesticides présentent cependant certains désavantages tel que la non-spécificité (Cunningham, 1985) et l'apparition d'insectes résistants comme chez *Plodia interpunctella*, *Ephestia cautella*, *Plutella xylostella* et *Heliothis virescens* (McGaughey et Beeman, 1988; Tabashnik *et al.*, 1990; Tabashnik, 1992).

Afin de diversifier les moyens utilisés dans la lutte contre les populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, le ChfuGV. En effet, le ChfuGV est un entomopathogène baculoviral retrouvé de façon naturelle chez les populations de cet insecte qui peut être envisagé comme alternative biologique pour la lutte contre les populations de cet insecte (Guertin, 1995; Forté *et al.*, 1999).

1.2 Baculovirus

1.2.1 Nucléopolyédrovirus (NPV) et Granulovirus (GV)

Le génome des baculovirus est composé d'une molécule d'ADN bicaténaire, circulaire et torsadé dont la taille varie entre 88 et 153 kpb. Le génome est compris à l'intérieur d'une nucléocapside enveloppée qui elle-même est emprisonnée dans une matrice protéique, le corps d'inclusion, impliqué dans la protection des nucléocapsides contre les conditions environnementales (Burgess, 1977; Tanada et Hess, 1991).

Les baculovirus sont divisés en deux genres, les nucléopolyédrovirus (NPV) et les granulovirus (GV) (Kool *et al.*, 1995). Les NPV sont caractérisés par la présence de plusieurs virions à l'intérieur d'un même corps d'inclusion nommé le polyèdre (Rohrmann, 1986). Il existe chez les NPV deux sous-divisions, les SNPV qui comprennent un seul virion par corps d'inclusion et les MNPV qui comprennent plusieurs

virions par corps d'inclusion (Rohrman, 1986). Les GV ont un aspect granulaire et sont caractérisés par la présence d'un seul virion à l'intérieur d'un même corps d'inclusion nommé le granule (Kool *et al.*, 1995; Crook *et al.*, 1997).

1.2.2 Avantages des baculovirus en lutte biologique

Les baculovirus sont des virus ayant la capacité d'infecter plus de 600 espèces d'arthropodes et leur spectre d'hôtes est limité (Charlton et Volkman, 1993). En effet, chaque baculovirus n'infecte qu'un ou quelques hôtes phylogénétiquement rapprochés. Les granulovirus infectent principalement les insectes appartenant à la famille des Lépidoptères, notamment, les genres *Noctuidae* et *Tortricidae* (Tanada et Hess, 1991). La nomenclature des baculovirus est établie d'après le nom de leur hôte naturel suivi du nom de leur genre tel que ChfuGV pour le GV de *Choristoneura fumiferana* et AcMNPV pour le MNPV d'*Autographa californica* (ICTV, 1998).

Actuellement, plusieurs NPV sont homologués et utilisés comme insecticides biologiques. Ainsi, les NPV de *Heliothis zea* (HzNPV), *Lymantria dispar* (LdMNPV) et *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV) sont utilisés comme outil de contrôle biologique contre la noctuelle de la tomate ou le ver de l'épi de maïs, la spongieuse et la chenille de la houpe de Douglas (Consigli *et al.*, 1986; Kool *et al.*, 1995; Service canadien des forêts, 1998). Les GV de *Plodia interpunctella* (PiGV), de *Cydia pomonella* (CpGV) et de *Trichoplusia ni* (TnGV) sont également utilisés comme biopesticide respectivement pour le contrôle des populations larvaires de la pyrale indienne de la farine, de la carpocapse de la pomme et de la fausse arpenreuse du chou (McGaughney, 1975; Crook *et al.*, 1997; Léry, 1997 a,b).

1.3 Granulovirus

1.3.1 Morphologie et ultrastructure

Les GV sont de forme ovo-cylindrique et possèdent une taille d'environ 300 à 500 nm de longueur par 120 à 350 nm de largeur (Bergold, 1963). Le génome est composé d'une molécule d'ADN bicaténaire étroitement liée à une nucléocapside enveloppée. La

nucléocapside enveloppée mesure environ 260 à 360 nm de longueur par 30 à 60 nm de largeur (Tweeten *et al.*, 1980) (Figure 1). L'enveloppe d'origine cellulaire est composée de trois couches protéiques, de 5 à 6 nm d'épaisseur (Beaton et Filshi, 1976; Kelly 1982 et Consigli *et al.*, 1986). La nucléocapside est formée d'anneaux imbriqués qui protègent le génome viral des nucléases (Burley *et al.*, 1982).

Le processus d'infection des granulovirus est caractérisé par la présence de deux phénotypes. Le premier correspondant à un corps d'inclusion entourant la nucléocapside enveloppée (OV: virus inclus) et le second à l'absence de corps d'inclusion autour de la nucléocapside enveloppée (BV: virus bourgeonnant) (Rohrmann, 1992). Les BV sont responsables de la propagation des virions d'une cellule à l'autre à l'intérieur d'un insecte et les OV ont la capacité de résister longtemps dans l'environnement (Rohrmann, 1992).

1.3.2 Protéines des GV

Les granulovirus ont un génome dont la taille varie entre 88 et 153 kpb. Ce génome a la capacité de coder pour une centaine de protéines (Tanada et Hess, 1991). Cependant, très peu de ces protéines ont été étudiées et caractérisées à ce jour en raison de l'absence de lignées cellulaires permissives pour la réplication de la grande majorité des granulovirus (Consigli *et al.*, 1986; Dwyer et Granados, 1988; Tanada et Hess, 1991; Winstanley et Crook, 1993). Les lignées cellulaires permissives pour la réplication des GV de *Cydia pomonella* et de *Trichoplusia ni* sont disponibles (Crook *et al.*, 1997 et Léry, 1997 a,b). Toutefois, en ce qui concerne le ChfuGV, aucune lignée cellulaire permissive n'est encore connue à ce jour.

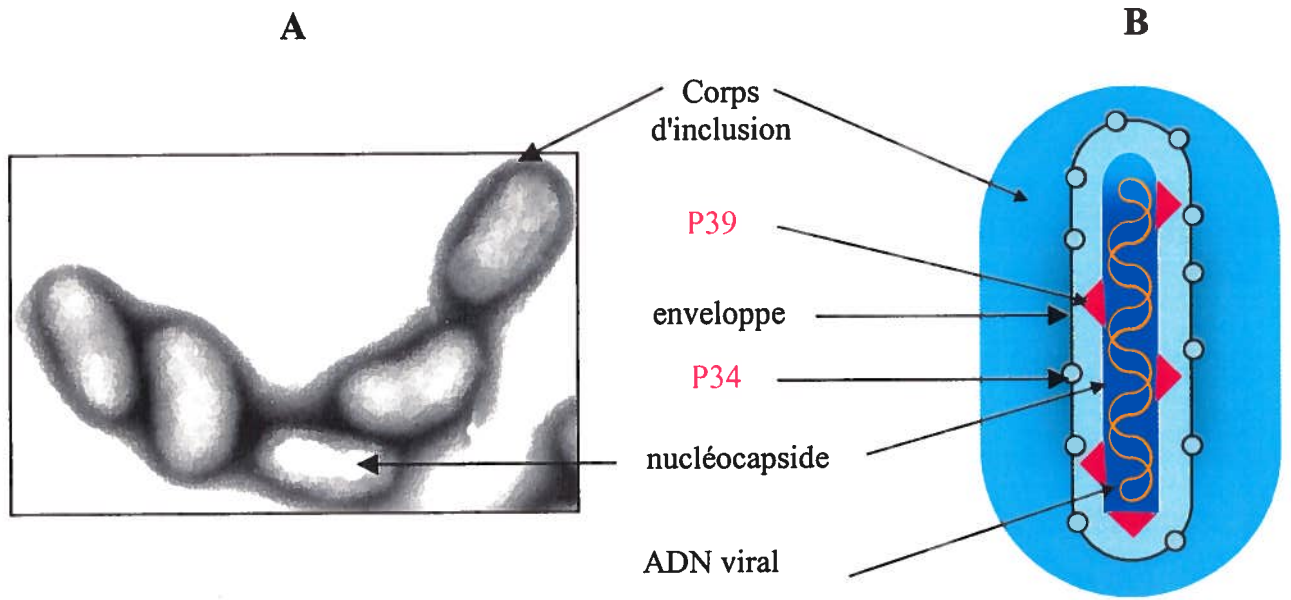
Figure 1: Granulovirus de *Choristoneura fumiferana*

A: Microphotographie d'une suspension de granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV).

Facteur d'agrandissement: 13 000X

B: Représentation schématique du ChfuGV.

Facteur d'agrandissement: 13 000X



1.3.2.1 Protéines associées au corps d'inclusion des GV

Le corps d'inclusion est une matrice protéique qui sert à stabiliser et à protéger le virion des conditions environnementales. Cette protection lui permet de maintenir son état infectieux dans l'environnement durant une période pouvant s'étendre sur plusieurs années (Akiyoshi *et al.*, 1985). La protéine majeure du corps d'inclusion est appelée granuline et est fortement exprimée de façon tardive dans le cycle de réplication viral. La protéine granuline est une phosphoglycoprotéine de 29 kDa composée de sous-unités similaire à la polyédrine retrouvée chez les NPV (Tweeten *et al.*, 1980; Akiyoshi *et al.*, 1985; Rohrmann, 1986; Tanada et Kaya, 1993; Bah *et al.*, 1997). Deux autres protéines associées au corps d'inclusion ont été identifiées: les protéases exogènes qui sont similaires aux protéases retrouvées dans l'intestin des insectes et la protéine VEF "Viral Enhancing Factor", qui est une métallo-protéine de 104 kDa retrouvée chez le TnGV (Derksen et Granados, 1988). La protéine VEF semble faciliter l'infection par les GV en provoquant la dégradation de la membrane péritrophique des insectes et le passage des virions enveloppés vers la surface des cellules de l'intestin (Derksen et Granados, 1988; Tanada et Hess, 1991; Rohrmann, 1992; Tanada et Kaya 1993; Corsaro *et al.*, 1993).

À la surface du corps d'inclusion, on retrouve une couche d'hydrates de carbone qui semble étroitement liée à la présence de la protéine tardive p10 (Van Oers *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1995; Van Oers *et al.*, 1998; Bianchi *et al.*, 2000). La p10 est responsable de l'induction de la formation des structures fibrillaires du cytoplasme et semble permettre la libération des nucléocapsides du noyau cellulaire (Russell *et al.*, 1991; Van Oers *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998). La p10 semble également jouer un rôle important dans la formation de l'enveloppe des granules. En effet, la délétion du gène codant pour la p10 affecte la formation adéquate de la couche externe de l'enveloppe du corps d'inclusion (Rohrmann, 1992).

1.3.2.2 Protéines associées à la nucléocapside enveloppée des GV

L'enveloppe de la nucléocapside est acquise soit par morphogenèse nucléaire, soit par morphogenèse cytoplasmique ou soit par bourgeonnement à travers la membrane

plasmique (Tanada et Hess, 1991). La présence de récepteurs, jusqu'à ce jour non caractérisés, à la surface de l'enveloppe des nucléocapsides permet aux nucléocapsides d'hémagglutiner avec certaines cellules telles que des érythrocyte. En effet, selon Anderson *et al.*, (1981) et Shapiro et Ignoffo (1970), l'enveloppe de la nucléocapside du PiGV et celle du HzNPV sont capables d'hémagglutiner les érythrocytes de plusieurs espèces de vertébrés (Consigli *et al.*, 1986). Les récepteurs à la surface de l'enveloppe permettent de conserver la propriété d'attachement des virions et rendent possible l'infection des cellules de l'hôte (Yamamoto et Tanada, 1979). Des analyses effectuées sur gel de polyacrylamide ont montré que les nucléocapsides enveloppées de TnGV, PiGV, PbGV et de SfGV possèdent entre 12 et 20 protéines structurales dont les poids moléculaires peuvent varier entre 12 et 160 kDa (Consigli *et al.*, 1986; Pearson *et al.*, 1988; Rohrmann, 1992; Wolgamot *et al.*, 1993). Plusieurs polypeptides ont été identifiés comme étant associés à l'enveloppe des nucléocapsides entre autre, les protéines majeures p74, p25, ODV-E56, ODV-E66, ODVP-6E, gp41 et vp17 (Yamamoto et Tanada, 1979; Russell et Rohrmann, 1993; Braunagel, 1996; Theilmann *et al.*, 1996; Olszewski et Miller, 1997).

Le gène codant pour la protéine ODVP-6E sera détaillé dans la section 1.5. La p74 est produite tardivement lors de l'infection et c'est une protéine essentielle à la formation du corps d'inclusion et à l'infection *in vivo* (Summers et Smith, 1975; Hill *et al.*, 1993; Wolgamot *et al.*, 1993; Hayakawa *et al.*, 1999). En effet, des études de mutagenèse ont démontré que la délétion du gène codant pour la protéine p74 entraîne la perte du pouvoir infectieux des virions. L'ODV-E66, l'ODV-E56 et la p25 sont des protéines d'enveloppe spécifiques qui sont retrouvées dans des structures membranaires cytoplasmiques (Braunagel *et al.*, 1996). La présence de ces trois protéines d'enveloppe dans ces structures suggère que les microvésicules intranucléaires jouent un rôle important soit comme précurseur directe ou dans l'assemblage de l'enveloppe des ODV (Braunagel *et al.*, 1996). Braunagel et ses collaborateurs (1996) ont démontré que les membranes intranucléaires sont générées par une morphogenèse membranaire de *novο* qui a lieu dans le noyau des cellules infectées. La gp41 est une protéine O-glycosylée retrouvée chez les virions inclus mais qui est absente chez les virions bourgeonnants. Bien qu'absente de ces

derniers, la gp41 est toutefois impliquée dans leur formation puisqu'elle favorise la sortie des nucléocapsides du noyau dans le but de permettre la synthèse des virions bourgeonnants (Olszewski et Miller, 1997). La vp17 a été identifiée mais ne semble pas avoir de fonction ou de rôle défini à ce jour (Braunagel *et al.*, 1996).

Certaines protéines sont associées directement à la nucléocapside des baculovirus plutôt qu'à leur enveloppe. En effet, la p87 est une protéine structurale. Cette protéine semble être une composante des nucléocapsides chez OpMNPV (Muller *et al.*, 1990). Une caractérisation immuno-histochimique a permis d'observer que la protéine p87 d'OpMNPV est exprimée tardivement dans le noyau des cellules infectées (Miller *et al.*, 1990). Un homologue protéique a également été observé chez le virus AcMNPV et chez le virus CfMNPV (Lu et Carstens, 1992; Li *et al.*, 1997). Cependant, aucun rôle majeur n'a été attribué à ce jour à la p87. La protéine p39 et la protéine p6,9 sont deux protéines majeures de la nucléocapside ayant un rôle important dans le processus de réplication virale (Burley *et al.*, 1982; Pearson *et al.*, 1988). La protéine p6,9 est une protéine basique riche en arginine étroitement liée à l'ADN dont la fonction est similaire à celle des histones (Tweeten *et al.*, 1980; Burley *et al.*, 1982; Consigli *et al.*, 1986; Funk et Consigli, 1992). Elle a une masse moléculaire d'environ 6,9 kDa (Wang *et al.*, 2001). Cette protéine est impliquée dans le repliement de l'ADN (Oppenheimer et Volkman, 1995). Le gène de cette protéine est régulé par un élément de promoteur tardif, le 5'-ATAAG-3' (Heldens *et al.*, 1998). La protéine p39 joue un rôle important au niveau de la réplication virale. En effet, la p39 est impliquée dans le déplacement de la nucléocapside enveloppée virale du cytoplasme vers la membrane nucléaire afin de permettre à l'ADN viral de pénétrer dans le noyau et de se répliquer (Charlton et Volkman, 1998). De plus amples détails sur la protéine p39 et son gène sont donnés dans la section 1.4.

1.3.3 Infection et réplication des granulovirus

1.3.3.1 Infection primaire

Le cycle de réplication des granulovirus est caractérisé par deux phases, soit la phase primaire et la phase secondaire (Consigli *et al.*, 1986). La phase primaire débute par l'ingestion des virions inclus par les insectes (Granados, 1980; Kelly, 1982). Une fois ingéré, le virus est dirigé vers l'intestin moyen où l'infection virale est initiée par la dissolution des protéines de la matrice. En effet, les conditions alcalines qui prévalent au niveau de l'intestin de l'insecte permettent la dissolution de la protéine granuline (Summers, 1971; Granados, 1980; Kelly, 1982). Une fois la granuline dissoute, les nucléocapsides enveloppées sont libérées et s'attachent aux microvillies des cellules cylindriques de l'intestin moyen de l'insecte. L'enveloppe des nucléocapsides fusionne avec la membrane de ces cellules cylindriques possiblement à l'aide de la protéine p74 (Granados, 1978; Tanada et Hess, 1984; Rohrmann, 1992). Les nucléocapsides pénètrent ensuite dans le cytoplasme des cellules hôtes et se dirigent vers le noyau à l'aide d'un système de microtubules d'actine retrouvé dans les cellules hôtes (Granados, 1980; Tanada et Hess, 1984; Consigli *et al.*, 1986; Blissard et Rohrmann, 1990; Van Loo *et al.*, 2001). Les nucléocapsides s'attachent ensuite sur les pores nucléaires permettant l'insertion de l'ADN viral dans le noyau cellulaire afin d'initier la réplication virale (Granados, 1980; Tanada et Hess, 1984; Consigli *et al.*, 1986; Tanada et Hess, 1991).

1.3.3.1.1 Protéines associées à la phase précoce de la réplication virale

Les protéines synthétisées durant la phase précoce de la réplication virale sont les protéines IE-1/1E-0, 1E-2 et PE-38, impliquées dans la régulation des gènes tardifs, l'hélicase ainsi que l'ADN polymérase virale (Guarino et Summers, 1986; Hodgeman, 1988; Ahrens et Rohrmann, 1995; Bideshi *et al.*, 1998). D'autres protéines sont associées à la phase précoce de la réplication virale tel que la protéine EGT retrouvée chez AcMNPV. Tel que démontré par O'Reilly et Miller (1989), l'EGT joue un rôle important dans le contrôle de la mue des insectes. Ils ont également montré que les protéines *lef-1* et *lef-2* de AcMNPV sont impliquées dans l'expression des gènes tardifs (Yang et Miller,

1999). Il a été démontré que les protéines p35 d'AcMNPV, Cp-*iap* de CpGV et Xn-*iap* de XnGV joueraient un rôle dans l'inhibition de l'apoptose dans les cellules infectées (Clem, 1991; Crook *et al.*, 1997 et Bideshi *et al.*, 1998).

1.3.3.1.2 Protéines associées à la phase tardive de la réplication virale

La phase tardive de la réplication virale consiste en 3 étapes: la réplication de l'ADN viral, l'expression des protéines tardives sous l'action des protéines *lef-1* et *lef-2* et l'assemblage des virions bourgeonnants (BV). L'ARN polymérase virale est responsable de la transcription des gènes tardifs (Blissard et Rohrmann, 1990; Kool *et al.*, 1995). Les protéines tardives exprimées sont principalement des protéines structurales impliquées dans l'assemblage des virions qui sont libérés par bourgeonnement. Ces protéines sont les protéines p6,9, p39 et gp64 (Burley *et al.*, 1982; Pearson *et al.*, 1988; Blissard et Rohrmann, 1990; Tanada et Hess, 1991). La protéine gp64 est une protéine glycosylée retrouvée chez les GV de *P. brassicae*, *T. ni* et *P. interpunctella*. Cette protéine est impliquée dans le processus d'entrée par attachement qui est dépendant d'un pH spécifique (Volkman *et al.*, 1984; Blissard et Rohrmann, 1989; Rohrmann, 1992; Hayakawa *et al.*, 1999; Hefferon *et al.*, 1999).

1.3.3.2 Infection secondaire

La seconde phase d'infection est initiée par les virions libérés par bourgeonnement (BV). Ces virions atteignent d'autres tissus et organes tels que la trachée, les corps gras et l'épiderme (Faulkner, 1981; Kelly, 1982; Consigli *et al.*, 1986). Les virions entrent dans les cellules cibles par endocytose (Charlton et Volkman, 1993). L'enveloppe du virion bourgeonnant fusionne avec l'endosome permettant ainsi à la nucléocapside de pénétrer dans le cytoplasme. L'ADN viral est ensuite inséré dans le noyau cellulaire, lieu de la réplication. Durant cette seconde phase de réplication, la protéine granuline, protéine majeure des corps d'inclusion, est produite en très grande quantité (Tanada et Hess, 1991). Il y a alors cristallisation de la protéine granuline autour des nucléocapsides enveloppées. Les cellules infectées remplies de granules sont lysées et la dissémination des granulovirus dans l'environnement est assurée par la forme virale incluse des virions (OV) (Consigli *et al.*, 1986).

1.4 Caractérisation de la protéine p39 des nucléocapsides enveloppées des baculovirus

1.4.1 Généralités

Des analyses d'immunobuvardage et d'immunoprécipitation utilisant des anticorps monoclonaux ont confirmé la présence d'une protéine majeure de la nucléocapside de 39 kDa (p39) (Pearson *et al.*, 1988; Thiem et Miller, 1989; Russell *et al.*, 1991). Des observations en microscopie électronique ont montré que la p39 est distribuée abondamment à la surface de la nucléocapside (Blissard *et al.*, 1989; Russell *et al.* 1991). L'étude de la cinétique d'expression a montré que la p39 est présente dans le cytoplasme 24 heures suivant l'infection de l'insecte (Pearson *et al.*, 1988; Blissard *et al.*, 1989; Bradford *et al.*, 1990; Russell *et al.*, 1991). De 36 à 48 heures suivant le début de l'infection, la p39 est détectée principalement dans le noyau (Blissard *et al.*, 1989; Russell *et al.*, 1991). La diminution de la concentration de la p39 dans le cytoplasme semble indiquer que cette protéine est synthétisée dans le cytoplasme et ensuite transportée vers le noyau (Blissard *et al.*, 1989; Russell *et al.*, 1991). La présence de la p39 a été observée chez plusieurs MNPV. Des anticorps monoclonaux dirigés contre la p39 d'OpMNPV démontrent une réaction croisée avec la p39 d'AcMNPV suggérant une similarité structurale importante (Blissard *et al.*, 1989). En effet, les p39 d'AcMNPV et d'OpMNPV ont des homologies de séquences en acides aminés se situant autour de 59%. Les séquences aminées des p39 d'AcMNPV et d'OpMNPV sont respectivement homologues à 39% et 47% avec la p39 de LdMNPV. Finalement, la comparaison des séquences aminées des p39 de BmNPV et d'OpMNPV démontre une homologie de séquence évaluée à 58% (Lu et Iatrou, 1996).

La p39 contient huit résidus cystéines fortement conservés impliquées dans la formation de ponts disulfure qui jouent un rôle majeur dans sa structure (Rohrmann, 1992; Bjornson et Rohrmann, 1992). Les séquences des p39 d'AcMNPV et d'OpMNPV présentent des séquences de 14 à 17 acides aminés ne contenant que des résidus alanine et proline. Ces séquences riches en alanine et en proline sont codées par des séquences d'ADN ayant un contenu élevé en G/C (Bjornson et Rohrmann, 1992).

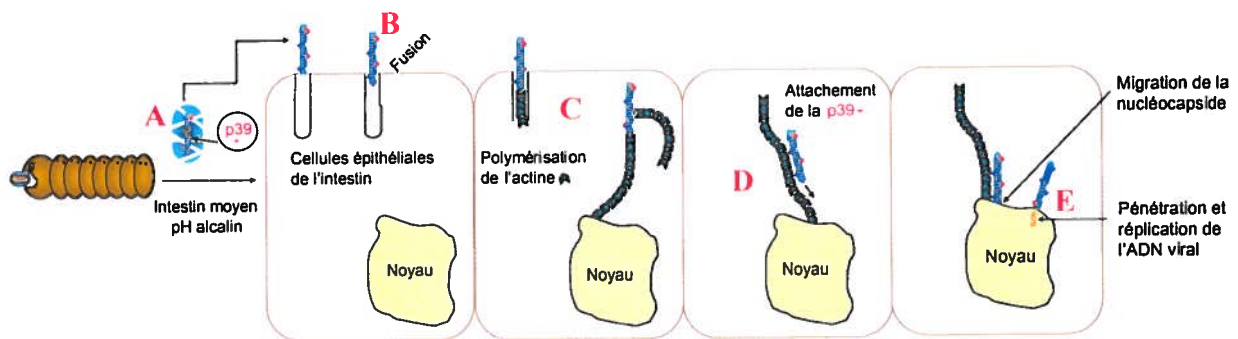
1.4.2 Rôle de la protéine p39

Le rôle de la p39 n'est pas encore bien déterminé. Cette protéine serait impliquée dans le déplacement de la nucléocapside du cytoplasme vers la membrane nucléaire afin de permettre à l'ADN viral de pénétrer dans le noyau. Lors de l'infection secondaire, le relargage des nucléocapsides virales à travers l'endosome vers le cytoplasme induit la formation de filaments serrés d'actine polymérisées (figure 2) (Charlton et Volkman, 1993; Lanier et Volkman, 1998). La quantité de microtubules d'actine formés est en corrélation avec le nombre de particules virales. Ces microtubules s'étendent du cytoplasme jusqu'à la membrane nucléaire et les nucléocapsides virales sont localisées à l'extrémité de ceux-ci. Les nucléocapsides rejoignent le noyau cellulaire via les microtubules d'actine (Lanier et Volkman, 1998).

L'activité de polymérisation de l'actine lors de l'infection virale semble associée aux nucléocapsides (Lanier *et al.*, 1996). En effet, différentes observations effectuées en microscopie électronique à fluorescence ont permis de noter qu'il y a une forte polymérisation de l'actine lorsque les nucléocapsides virales des virions bourgeonnants solubilisés sont placés en présence de la F-actine. L'actine filamenteuse (F-actine est la forme précurseur de l'actine globulaire (G-actine)) (Charlton et Volkman, 1993) (figure 2). D'autres analyses utilisant le marquage de l'actine à l'aide de la phalloïdine ont permis de montrer que l'actine associée aux nucléocapsides est de nature filamenteuse plutôt que globulaire (Lanier *et al.*, 1996). Lanier *et al.* (1996) et Lanier et Volkman (1998) ont montré que la formation des filaments d'actine requiert le relargage des nucléocapsides à partir de l'endosome. Les nucléocapsides renferment tous les facteurs nécessaires pour l'induction de la formation des filaments d'actine (Lanier *et al.*, 1996; Lanier et Volkman, 1998).

Figure 2: Représentation schématique de l'implication de la protéine p39 dans le processus d'attachement des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV à l'actine polymérisée dans le cytoplasme.

- A: Dissolution de la protéine de la matrice
- B: Fusion de l'enveloppe de la nucléocapside à la membrane cellulaire et pénétration des nucléocapsides dans le cytoplasme
- C: Polymérisation de l'actine
- D: Attachement des nucléocapsides à l'actine polymérisée dans le cytoplasme et déplacement vers le noyau cellulaire
- E: Pénétration de l'ADN viral à l'intérieur du noyau cellulaire pour la réplication



1.4.3 Gène codant pour la protéine p39 des baculovirus

Le gène codant pour la protéine p39 a été séquencé chez plusieurs NPV, notamment chez AcMNPV, OpMNPV et LdMNPV (Pearson *et al.*, 1988; Blissard *et al.*, 1989; Thiem et Miller, 1989; Bjornson et Rohrmann 1992). Cependant, seul le gène de la p39 du GV de *Xestia-c-nigrum* a été caractérisé (Hayakawa *et al.*, 1999). Il s'agit d'un ORF de 889 nucléotides codant pour une protéine de 39 kDa (Bjornson et Rohrmann, 1992; Hayakawa *et al.*, 1999). L'analyse de la séquence peptidique de la protéine p39 a mis en évidence la présence de trois répétitions Ala- Pro- Ala- Pro dont le rôle demeure inconnu à ce jour (Blissard *et al.*, 1989).

Le gène codant pour la protéine p39 d'OpMNPV et d'AcMNPV est sous le contrôle de deux promoteurs tardifs (Bradford *et al.*, 1990; Rohrmann, 1992; Olszewski et Miller, 1997). Des analyses d'extension d'amorces et de protection à la nucléase S1 effectuées par Thiem et Miller (1989) ont démontré qu'il existe au moins trois sites d'initiation pour la transcription du gène codant pour la p39. La transcription du gène de la p39 débute dans une région hautement conservée du génome des baculovirus (Bjornson et Rohrmann, 1992). Le gène de la p39 est transcrit par plusieurs ARN polymérases virales et un signal majeur d'arrêt de la transcription se situe à 1560 nucléotides du site d'initiation (Thiem et Miller, 1989; Lu et Iatrou, 1996). Deux régions riches en A/T situées en aval du gène de la p39 de *Bombyx mori* semblent être requis pour la polyadénylation des transcrits codant pour la p39 (Lu et Iatrou, 1996).

1.5 caractérisation de la protéine ODVP-6E des baculovirus

1.5.1 Rôle de la protéine ODVP-6E

L'ODVP-6E d'OpMNPV est une protéine structurale associée à l'enveloppe des virions. La taille de cette protéine correspond étroitement à la taille prédite de 40,2 kDa et le patron d'expression temporelle correspond également aux résultats des analyses d'immunobuvardage de type Northern (Theilmann *et al.*, 1996). La protéine ODVP-6E représente une composante structurale d'OpMNPV et c'est pourquoi les formes BV et

ODV d'OpMNPV ont été analysées afin de détecter la présence de cette protéine. La protéine ODVP-6E n'a pas été détectée dans la forme BV mais a été détectée dans la forme ODV. La forme ODV a été fractionnée en utilisant un traitement alcalin permettant de libérer les nucléocapsides enveloppées. Cette technique, élaborée par Gombart *et al.*, (1989), a permis de démontrer que l'ODVP-6E fractionnée prédominait avec les virions ayant subi le traitement alcalin (Theilmann *et al.*, 1996). Afin de déterminer si l'ODVP-6E est une protéine structurale associée à l'enveloppe des nucléocapsides des virions ODV ou à l'enveloppe des polyèdres, des traitements au SDS et au SDS- β -mercaptoéthanol ont été effectués sur différentes préparations virales en solution saline alcaline (DAS-P). La majorité de la protéine ODVP-6E est solubilisée par le traitement au SDS. Ceci indique que l'ODVP-6E est une protéine structurale associée à l'enveloppe des nucléocapsides des virions ODV (Theilmann *et al.*, 1996).

La protéine ODVP-6E du CpGV présente une homologie de séquence en acides aminés évaluée à 46,8% avec la séquence de la protéine ODVP-6E retrouvée chez OpMNPV (Theilmann *et al.*, 1996). La séquence aminée d'une protéine homologue à l'ODVP-6E d'OpMNPV a également été déterminée chez AcMNPV. La protéine retrouvée chez AcMNPV présente une homologie évaluée à 69,8% avec l'ODVP-6E d'OpMNPV.

La séquence peptidique de la protéine ODVP-6E démontre la présence d'un site conservé de glycosylation lié à une asparagine. La présence d'un domaine conservé riche en cystéines pourrait représenter une région qui serait requise pour des liaisons intermoléculaires et intramoléculaires dues aux ponts disulfures. La conservation des résidus cystéines dans toutes les protéines ODVP-6E démontre leur importance dans le maintien de la structure et de la fonction de la protéine ODVP-6E. Cette protéine contient deux régions hydrophobiques (Theilmann *et al.*, 1996).

1.5.2 Gène codant pour la protéine ODVP-6E

Une analyse de la séquence du CpGV démontre la présence d'un ORF codant pour une protéine ayant un poids moléculaire théorique de 38,65 kDa. En aval de cet

ORF, il existe un site d'initiation de la transcription conservé (ATAAG) d'un gène tardif, indiquant la possibilité que cet ORF soit un gène tardif et qu'il soit similaire au gène codant pour la protéine ODVP-6E d'OpMNPV. Le gène codant pour l'ODVP-6E est un gène conservé et a été caractérisé chez AcMNPV, CpGV et OpMNPV (Guarino et Summers, 1986; Crook *et al.*, 1993; Thielmann *et al.*, 1996). Des extraits d'ARN isolés d'OpMNPV ont été utilisés afin d'effectuer des analyses d'immunobuvardage de type Northon. Ces analyses ont permis d'observer que l'expression du gène codant pour la protéine ODVP-6E n'est pas détectable avant 18 heures post-infection (Thielmann *et al.*, 1996). L'expression de ce gène augmente fortement 48 heures post-infection et par la suite diminue tout en demeurant détectable jusqu'à 120 heures post-infection. Le gène codant pour la protéine ODVP-6E est donc un gène baculoviral tardif.

1.6 Hypothèse et objectifs

Il existe très peu d'informations disponibles concernant la biologie moléculaire du ChfuGV, entomopathogène qui semble prometteur comme agent de lutte biologique contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Le présent projet de recherche porte sur l'identification et la caractérisation des gènes codant pour les protéines structurales p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV. Les objectifs de ce projet de recherche consistaient à isoler (amplification et clonage) et caractériser (séquençage et analyse des séquences) les gènes codant pour les protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV. De plus, la comparaison des séquences obtenues avec les gènes codant pour les protéines p34 et p39 de d'autres baculovirus a permis d'identifier des caractéristiques importantes concernant ces gènes.

Approche expérimentale

2.1 Production du ChfuGV

La production du ChfuGV a été effectuée selon une technique décrite par Forté *et al.*, (1999). Cette technique repose sur l'infection de larves de tordeuse des bourgeons de l'épinette de deuxième stade élevées en laboratoire (Centre de Foresterie des Grands Lacs, Sault-Sainte-Marie, Forêts Canada). L'infection des larves a été effectuée par l'étalement de 50 µl d'une suspension de ChfuGV (concentration de 4×10^8 granules/ml) à la surface des cupules de plastique contenant la nourriture artificielle (Grisdale et Wilson, 1988). Les larves ont été incubées durant une période de 12 jours dans une chambre environnementale Sanyo (température de 25°C, photopériode de 14:10 heures (jour:nuit) et humidité relative de 50%). Les larves mortes et celles présentant des signes d'infection (exemple: le flétrissement et la liquéfaction du corps de la larve et un changement de la coloration du corps de la larve), ont été recueillies et conservées à -20°C.

La technique utilisée pour purifier le virus est basée sur celle élaborée par Tompkins (1991). Les larves infectées ont été broyées dans une solution de SDS 1% (Gibco BRL, Burlington, CA). Le broyat a été filtré à travers trois épaisseurs de coton fromage afin d'éliminer les débris larvaires. Suite à une incubation de 30 min à 4°C, le filtrat a été centrifugé à 300 x g durant 5 min (ultracentrifugeuse Sorvall modèle RC5C, rotor SW41 (Du Pont Instruments, Connecticut, É-U)) afin d'éliminer les débris cellulaires et larvaires en suspension. Le culot de granules viraux a été lavé trois fois dans de l'eau distillée stérile et un volume d'environ 3-5 ml a été déposé sur un gradient de glycérol discontinu (60% à 90% (v/v)) (Sigma, St-Louis, É-U). Le gradient a été centrifugé à 80 000 x g (ultracentrifugeuse Sorvall modèle RC5C, rotor SW41 (Du Pont Instruments, Connecticut, É-U)) durant 45 min. Les granules de ChfuGV ont été récupérés dans la fraction de glycérol 80%. Le glycérol résiduel a été éliminé à l'aide de trois lavages successifs dans de l'eau distillée suivi d'une centrifugation à 10 000 x g durant 30 min à 4°C. La suspension virale purifiée a été conservée à 4°C.

2.2 Purification des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV

Afin de purifier les nucléocapsides virales enveloppées, 400 µl de tampon de carbonate de sodium 0,5 M, pH 10,5 (Fisher, Montréal, CA) ont été ajoutés à 1 ml de suspension virale. Le mélange a été incubé 30 min sur la glace afin de permettre la dissolution complète de la matrice protéique et la libération des nucléocapsides enveloppées. Après une centrifugation de 10 min à 6 000 x g effectuée à l'aide de la centrifugeuse Sorvall modèle RC5C, rotor SW41 (Du Pont Instruments, Connecticut, É-U). Le surnageant a été prélevé (1 ml) et déposé sur un gradient discontinu de sucrose (10% à 50% (p/v)) préparé dans des tubes de 50 ml (Beckman, Ontario, CA). Le gradient a été centrifugé une heure à 25 000 x g (ultracentrifugeuse Sorvall, modèle RC5C, rotor SW41 (Du Pont Instruments, Connecticut, É-U)). Les nucléocapsides enveloppées ont été récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur à l'interface des couches de glycérol 20%-30%. Les nucléocapsides enveloppées ont été diluées avec 50 ml d'eau distillée et centrifugées durant une heure à 100 000 x g (ultracentrifugeuse Beckman, Model L5-50, rotor SW-41 (Beckman, Mississauga, CA)). Le culot contenant les nucléocapsides enveloppées purifiées a été resuspendu dans 20 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) pH 7,4 et conservé à -20°C.

2.3 Analyses par microscopie électronique des suspensions de ChfuGV et de nucléocapsides enveloppées du ChfuGV

La pureté des suspensions de ChfuGV et de nucléocapsides enveloppées purifiées a été évaluée par microscopie électronique (microscope électronique Phillips 300, (Perkin Elmer, Foster, CA)). Selon la technique développée par Alain *et al.*, (1989), 2 µl de la suspension virale ou de la suspension de nucléocapsides enveloppées ont été déposés durant 1 minute sur une grille recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone. La grille a été séchée à l'aide d'un papier buvard. Les particules virales et les nucléocapsides enveloppées ont été mises en évidence en déposant durant 1 minute, 2 µl de PTA 3%, pH 6,0 sur la grille. La grille a été séchée et examinée par microscopie électronique afin

d'évaluer la pureté et l'intégrité des granules viraux et des nucléocapsides enveloppées contenues dans chacune des suspensions.

2.4 Analyses des protéines des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS dans des conditions dénaturantes réductrices décrite par Laemmli (1970) a été utilisée afin d'analyser le contenu protéique des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV. Un gel de polyacrylamide de 0,5 mm d'épaisseur a été coulé entre deux plaques de verre, une première de 10,2 cm de largeur par 7,3 cm de longueur et une deuxième de dimension supérieure ayant 10,2 cm de largeur par 8,3 cm de longueur. Le gel de 12% d'acrylamide (Bio-Rad, Mississauga, CA) contenant 0,1% de SDS (p/v) (Gibco BRL, Burlington, CA) a constitué le gel de séparation et a été préparé dans un tampon Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8. Le gel de 4% d'acrylamide contenant 0,1% de SDS (p/v) a constitué le gel de concentration et a été préparé dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8.

Afin d'effectuer l'analyse du contenu protéique des nucléocapsides enveloppées, 4×10^7 nucléocapsides enveloppées (40 μ l d'une suspension de nucléocapsides enveloppées de concentration initiale de 1×10^9 nucléocapsides/ml) ont été mélangés à 40 μ l de tampon Laemmli réducteur (4X) contenant 4% de SDS (p/v), 20% de glycérol (v/v), 5% de β - mercaptoéthanol (Invitrogen, San Diego, É-U) et 0,01% de bleu de bromophénol (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U) préparé dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8. L'échantillon a été chauffé à 100°C durant 10 min afin de permettre la dénaturation complète des protéines et la rupture des ponts disulfures et a été centrifugé durant 5 min à 10 000 x g à l'aide d'une centrifugeuse de table (International Equipment Company, Massachusetts, É-U). Les protéines virales totales solubilisées ont été déposées sur le gel de polyacrylamide.

La migration a été effectuée en appliquant un courant de 200 V durant 45 min dans un tampon d'électrophorèse contenant 0,1% de SDS (p/v), 0,19 M de glycine, 0,025 M de Tris, pH 8,3. La masse moléculaire des protéines virales a été déterminée en kDa en comparant leur mobilité relative dans le gel à celle d'un mélange de protéines

dont les masses moléculaires sont connues (SDS-PAGE Molecular Weight Markers High Range, (1 mg/ml), (Gibco BRL, Burlington, CA)). Les protéines contenues dans ce marqueur sont: la myosine (200 kDa), la phosphorylase B de muscle de lapin (97,4 kDa), la BSA (albumine de sérum bovin) (66,2 kDa), l'ovalbumine d'œuf (45 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31 kDa), l'inhibiteur de trypsine de la fève de soya (21,5 kDa) ainsi que le lysozyme d'œuf (14,3 kDa).

Suite à l'électrophorèse, le gel a été coloré durant 30 min dans 100 ml d'une solution contenant 0,1% de bleu brillant de Coomassie R250 (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U), 50% de méthanol (v/v) (Fisher, Montréal, CA) et 10% d'acide acétique glacial (v/v) (Fisher, Montréal, CA). Le gel a été décoloré durant 90 min dans 100 ml d'une solution contenant 40% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial. La solution de décoloration a été renouvelée à chaque 15 min.

2.5 Extraction de l'ADN du ChfuGV

L'ADN viral a été extrait selon la technique décrite par Sambrook *et al.*, (1989). Brièvement, les nucléocapsides virales enveloppées et purifiées (300 µl d'une suspension de nucléocapsides virales de concentration de 1×10^9 nucléocapsides/ml) ont été digérées durant 2 heures avec la protéinase K (200 µg/ml) (Boehringer Mannheim, Laval, CA) en présence de SDS 1% (p/v) à 37°C. Les protéines virales digérées ont été extraites à deux reprises avec un volume égal de phénol saturé au TE, pH 7,4, (Gibco BRL, Burlington, CA), de phénol-chloroforme (1:1) (Gibco BRL, Burlington, CA) et de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) (Gibco BRL, Burlington, CA). L'ADN viral contenu dans la phase aqueuse a été précipité à l'aide de 2,5 volumes d'éthanol 100% froid et de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 (Fisher, Montréal, CA) durant 1 heure à -20°C. Une centrifugation de 20 min à 13 000 x g a été effectuée à l'aide d'une centrifugeuse de table (Equipment Company, Massachusetts, É-U) afin de récupérer l'ADN viral. Le culot d'ADN a été lavé à deux reprises avec l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 100 µl de TE, pH 7,4.

La qualité de l'ADN viral a été déterminé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (p/v). L'échantillon d'ADN du ChfuGV déposé sur le gel a été préparé à l'aide de 1 µl d'ADN viral extrait (200 ng) mélangé à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U), solution de xylène cyanol 2% (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U), Ficoll 400 96% (v/v) (Sigma, St-Louis, É-U)) et 9 µl d'eau distillée. Un marqueur de poids moléculaire, le 1 kb DNA Ladder (Gibco BRL, Burlington, CA) a été utilisé afin de déterminer la taille de l'ADN du ChfuGV. La taille des fragments d'ADN contenus dans le marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. L'échantillon de marqueur déposé sur le gel a été préparé à l'aide de 0,5 µl (50 ng) de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée qui ont été mélangés à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U), solution de xylène cyanol 2% (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U), Ficoll 400 96% (v/v) (Sigma, St-Louis, É-U)) et à 9,5 µl d'eau distillée. Les échantillons ont été déposés sur le gel d'agarose et un courant de 120 V a été appliqué durant 1 heure. Ensuite, le gel d'agarose a été coloré 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (concentration finale 0,01 mg/ml (p/v)) (Sigma, St-Louis, É-U) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA (Quantum biotechnologies, Carlsbad, CA)) dans 980 ml d'eau distillée).

2.6 Séquençage des protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

Le séquençage des acides aminés des protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV a été réalisé en utilisant deux techniques. Le séquençage de la région amino-terminale de la protéine p34 a été effectué par la technique de dégradation d'Edman en phase liquide et les séquençages de courtes régions internes de la protéine p34 et de la protéine p39 ont été réalisés à l'aide de la technique des digestions internes tryptiques (Hewick *et al.*, 1981). Les différents séquençages des acides aminés ont été réalisés par le service de séquençage de l'IRB (Montréal, CA).

2.6.1 Transfert sur membrane de nitrocellulose des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV pour le séquençage peptidique de la p34

Les protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV (4×10^7 nucléocapsides enveloppées) ont été fractionnées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose (section 2.4). Suite à l'électrophorèse, le gel a été immergé durant 5 min dans un tampon de transfert (pH 11,0) contenant 10 mM d'acide 3-cyclohexilamine 1-propanesulfonique (Sigma, St-Louis, É-U) et 10% de méthanol (Fisher, Montréal, CA), afin d'éliminer le Tris et la glycine contenus dans le gel. Une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad, Mississauga, CA) de dimensions égales à celles du gel de polyacrylamide (10,2 cm de largeur par 7,3 cm de longueur) a été immergée durant 1 minute dans du méthanol 100% puis placée dans le tampon de transfert. Le gel et la membrane ont été placés dans l'appareil de transfert, le Mini-Protean[®] II Cell (Bio-Rad, Mississauga, CA). Le tampon de transfert a été mélangé à une solution de 11,4 mg/ml d'acide thioglycolique (concentration finale 1 μ l/ml) (Sigma, St-Louis, É-U) et a constitué le contenu de la chambre supérieure de l'appareil. La chambre inférieure de l'appareil contenait uniquement le tampon de transfert. L'acide thioglycolique est un réactif qui sert à prévenir le blocage de la portion aminée de la protéine à séquencer par la présence de radicaux libres. Le transfert a été effectué durant 15 min en appliquant un courant de 100 V. Ensuite, la membrane a été lavée durant 5 min à l'eau déionisée et colorée durant 5 min dans une solution contenant 0,1% de bleu brillant de Coomassie R250 (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U) et 50% de méthanol (v/v). La membrane a été ensuite décolorée 7 min à la température de la pièce à l'aide d'une solution contenant 50% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique glacial (v/v) puis rincée 10 min à l'eau déionisée. Finalement, la membrane a été séchée à l'air ambiant sur un papier buvard et conservée à 4°C. La protéine p34 (environ 5 μ g) a été découpée de la membrane de nitrocellulose pour le séquençage de la région amino-terminale ainsi que pour le séquençage de courtes régions internes.

2.6.1.1 Séquençage de la région amino-terminale de la protéine p34

Une portion de la quantité totale de la protéine p34 contenue dans la membrane de nitrocellulose a été utilisée afin de séquencer la portion amino-terminale. La région amino-terminale de la protéine p34 a été séquencée en utilisant la technique de dégradation d'Edman en phase liquide. Cette technique consiste à envelopper la protéine à analyser dans une matrice sèche composée de sels d'ammonium polymériques quaternaires sur un disque de fibres de verre poreux. Ce disque est ensuite placé dans une petite cellule. La protéine est attachée de façon non covalente au support afin d'assurer son immobilité lors de la réaction de dégradation à l'aide de solvants liquides. La protéine a été séquencée par plusieurs cycles de dégradation d'une durée totale de 50 min (Hewick *et al.*, 1981).

2.6.1.2 Séquençage de courtes régions internes de la protéine p34

La technique des digestions internes tryptiques a été utilisée afin de déterminer les séquences en acides aminés de courtes régions internes de la protéine p34. La protéine p34 qui a été récupérée en découpant la membrane de nitrocellulose, a été éluée en submergeant la membrane dans 100 μ l d'eau distillée déionisée. La membrane a été séchée sur un papier buvard. La protéine p34 solubilisée a été déposée dans un microtube dans lequel on a ajouté 50 μ l d'une solution contenant 0,5% d'octyl- β -D glucopyranoside (v/v) (Sigma, St-Louis, CA), 10% d'acétonitril (v/v) (Sigma, St-Louis, CA), 0,1 M de Tris-HCl, pH 8,0. Le tube a été mélangé vigoureusement durant 20 secs et incubé durant 30 min à température de la pièce. Cette étape permet la réduction des groupements alkyles de la protéine. Par la suite, 0,2 μ g de trypsine (Sigma, St-Louis, CA) ont été ajoutés au tube et le mélange a été incubé durant 20 heures à 37°C. À la fin de l'incubation, le tube a été agité vigoureusement durant 10 secs, sonifié 5 min à la température de la pièce et centrifugé 2 min à 13 000 x g. Le surnageant a été conservé dans un nouveau tube et 50 μ l de tampon de digestion ont été ajoutés à ce tube. Le tube a de nouveau été mélangé durant 10 secs, sonifié 5 min et centrifugé durant 2 min à

13 000 x g. Les surnageants provenant des deux centrifugations ont été combinés. La membrane a été lavée à deux reprises avec 50 µl d'une solution contenant 25% d'acétonitrile (v/v) (Sigma, St-Louis, CA) et 0,1% de trifluoroacétyl (TFA) (v/v) (Sigma, St-Louis, CA). Chacun des lavages a été suivi d'une centrifugation de 2 min à 13 000 x g. Les surnageants ont été conservés et ajoutés aux deux précédents pour l'obtention d'un volume total de 200 µl. Le surnageant final a été analysé par HPLC (Procise model cLC 494, Applied Biosystems, Roxboro, CA). Les fractions aminées récoltées et obtenues lors de l'analyse par HPLC ont été séquencées à l'aide d'un séquenceur automatique (494 cLC Protéine Séquenceur, Applied Biosystems, Roxboro, CA).

2.6.2 Séquençage de courtes régions internes de la protéine p39

Les protéines des nucléocapsides enveloppées ont été fractionnées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (section 2.4). Suite à la l'électrophorèse, le gel a été coloré 30 min dans 100 ml d'une solution contenant 0,4% de bleu brillant de Coomassie R250 (p/v) (Sigma, St-Louis, CA), 40% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique glacial (v/v) (Fisher, Montréal, CA). Le gel a ensuite été décoloré 90 min dans 100 ml d'une solution contenant 40% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique glacial (v/v). La solution de décoloration a été renouvelée à chaque 15 min. La protéine p39 a été découpée à même le gel de polyacrylamide, éluee et soumise à une analyse utilisant les techniques de spectrophotométrie de masse (Procise model cLC 494, Applied Biosystems, Roxboro) et de dégradation d'Edman en phase liquide. Les différents séquençages ont été réalisés par le service de séquençage de l'IRB (Montréal, CA).

2.7 Amplification par PCR des gènes codant pour les protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

Dans un premier temps, les séquences peptidiques obtenues par le biais du séquençage de la protéine p34 du ChfuGV ont été comparées aux séquences protéiques d'autres baculovirus (GV et NPV) répertoriées dans la banque de données informatiques GenBank. L'alignement multiple des séquences peptidiques homologues à la p34 du ChfuGV a permis de concevoir des amorces oligonucléotidiques dégénérées. Ces amorces

ont été utilisées pour amplifier par PCR différents fragments internes du gène codant pour la protéine p34 du ChfuGV (figure 3). Dans un deuxième temps, des amorces oligonucléotidiques ont été conçues pour l'amplification du gène codant pour la p39 du ChfuGV. Ces amorces ont été élaborées à partir de régions homologues identifiées entre les séquences de toutes les protéines p39 des nucléocapsides enveloppées des différents baculovirus (GV et NPV) répertoriées dans la banque de données informatiques Genbank. C'est à l'aide de ces différentes amorces que l'amplification par PCR du gène codant pour la protéine p39 du ChfuGV a été effectuée (figure 3).

Les réactions d'amplification ont été réalisées en utilisant 100 ng d'ADN du ChfuGV dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant 5 µl de tampon réactionnel 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 et 500 mM KCl (Gibco BRL, Burlington, CA), 1,5 µl de 1,5 mM MgCl₂ (Gibco BRL, Burlington, CA), 1 µl de 0,2 mM dNTP (Gibco BRL, Burlington, CA), 0,5 µl de polymérase *Taq* (concentration finale de 1 U (Gibco BRL, Burlington, CA) et 1 µl des amorces dégénérées sens p34F5 (5'- ATC TTT CAG GGT GTG -3') et anti-sens p34R5 (5'- GGA AGA CAT GTT GGC -3') dessinées à partir de la séquence de la p39 du XnGV inversée et complémentaire pour amplifier la p34 du ChfuGV ou les amorces oligonucléotidiques dégénérées sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3') dessinées pour amplifier la p39 du ChfuGV (figure 3). Toutes ces amorces ont été ajustées à 50 pmol/µl.

Les cycles utilisés lors de l'amplification par PCR sont: dénaturation de l'ADN matrice durant 30 secs à 94°C, appariement des amorces durant 30 secs (40°C-55°C, selon les amorces utilisées) et élongation de l'ADN par la polymérase *Taq* durant 30 secs à 72°C. Une extension de 10 min à 72°C a été ajoutée à la fin des 35 cycles d'amplification afin de permettre aux amplifications déjà amorcées d'être complétées. L'appareil qui a été utilisé est le Thermocycleur 9600 (Perkin Elmer Cetus, Roxboro, CA). Les amplicons ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (p/v) et purifiés à l'aide de la trousse GeneClean (Bio-101, Carlsbad, É-U). Brièvement, les fragments d'ADN correspondants aux amplicons des gènes codant pour les protéines p34 et p39 du ChfuGV

ont été excisés du gel d'agarose. L'agarose contenant l'ADN a été pesé et dissout à 56°C en présence de trois volumes égaux (à la bande d'agarose pesée) d'une solution d'iodure de sodium (NaI, 6M). Afin de récupérer l'ADN, 5 µl de matrice composée de billes de silice ont ensuite été ajoutés aux mélanges contenant l'ADN codant pour la protéine p39 et pour la protéine p34 du ChfuGV. Suite à une incubation de 5 min à la température de la pièce, les échantillons ont été centrifugés durant 5 sec à 13 000 x g l'aide d'une centrifugeuse de table (International Equipment Company, Massachusetts, É-U). Les culots d'ADN-silice ont été lavés à trois reprises dans 500 µl de solution de lavage (20 mM NaCl; 2mM Tris-HCl; 80% éthanol pure; eau). Chacun des lavages a été suivi d'une centrifugation de 5 secs à 13 000 x g. Les ADN ont été élués de la matrice à l'aide de 10 µl d'eau distillée stérile. Les fragments d'ADN purifiés ont été quantifiés par une lecture au spectrophotomètre (GeneQuant, Pharmacia Biotech, New Jersey) à des longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm. La concentration d'ADN en µg/ml a été obtenue grâce à la formule suivante: $D.O_{260\text{ nm}} \times \text{facteur de dilution} \times 50 \mu\text{g d'ADN/ml}$.

2.7.1 Clonage des gènes codant pour les protéines p34 et p39

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR et purifiés précédemment ont été clonés dans le vecteur PCR[®]2.1 à l'aide de la trousse, TA Cloning[®] (Invitrogen, San Diego, É-U). Ce vecteur présente des bases déoxythymidines (T) aux extrémités 3'. L'appariement des bases complémentaires du vecteur et des amplicons permet un clonage rapide. En effet, la polymérase *Taq* ajoute à l'extrémité 3' des fragments d'ADN amplifiés des déoxyadénosines (A) complémentaires aux déoxythymidines (T) à l'extrémité 3' du vecteur.

2.7.1.1 Ligation des gènes codant pour les protéines p34 et p39 dans le vecteur PCR[®]2.1

Pour chacune des réactions de ligation, 1 µl d'ADN purifié (environ 50 ng) a été utilisé dans un volume réactionnel final de 10 µl comprenant 2 µl de vecteur PCR[®]2.1 (25 ng/µl), 1 µl de tampon de ligation 10X (60 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM MgCl₂, 50 mM NaCl; 1 mg/ml de BSA; 70 mM β-mercaptoéthanol; 1mM d'adénosine

triphosphate (ATP); 20 mM DDT et 10 mM de spermidine) et 1 μ l de l'enzyme ADN ligase du bactériophage T4 (8U/ μ l). Les mélanges réactionnels ont été incubés durant 18 heures à 14°C et ont ensuite été transformés dans des bactéries.

2.7.1.2 Transformation bactérienne des produits de ligation

Des bactéries chimiquement compétentes *E. coli* INV α (Invitrogen, San Diego, É-U) ont été utilisées dans les expériences de transformation bactérienne. Un volume de 2 μ l (10 ng) du produit de ligation a été mis en contact avec 50 μ l de bactéries compétentes *E. coli* INV α en présence de 2 μ l de β -mercaptoéthanol 0,5 M (Invitrogen, San Diego, É-U). Pour permettre la pénétration de l'ADN dans les bactéries, les mélanges ADN-bactéries compétentes ont été incubés durant 30 min sur glace. Les mélanges ont été soumis à un choc thermique de 30 secs à 42°C et transférés immédiatement sur la glace durant 2 min. Finalement, 250 μ l de milieu SOC (tryptone (20 g/l), extrait de levure (0,5 g/l), NaCl (0,5 g/l), solution 250 mM KCl, 2M MgCl₂, 1M MgSO₄, 1M glucose, pH 7,0) ont été ajoutés aux produits. Ces produits ont été incubés durant 1 heure à 37°C à une vitesse de rotation constante de 225 rpm afin de permettre la multiplication bactérienne.

Les bactéries transformées ont été étalées (50 μ l et 200 μ l) sur des géloses de milieu nutritif 2 x YT (1,5% d'agar (p/v), 1,6% de bacto-tryptone (p/v), 1% d'extrait de levure (p/v), 0,5% de NaCl pH 7,0 (p/v) (Difco, Montréal, CA)) contenant 50 μ g/ml de l'antibiotique kanamycine (Boehringer Mannheim, Laval, CA) et 40 mg/ml du substrat X-gal (Diagnostic Chemicals Limited, Charlottetown, CA). Les géloses ont été incubées durant 18 heures à 37°C avant la sélection des clones potentiellement recombinants.

2.7.1.3 Sélection des colonies recombinantes

Le vecteur PCR[®]2.1 contenant l'ADN des gènes d'intérêts, possède le gène de résistance à la kanamycine et permet une première sélection des colonies de bactéries recombinantes. La seconde sélection est basée sur la couleur des colonies (blanches/bleues) et repose sur la présence ou non de l'enzyme β -galactosidase fonctionnelle capable d'hydrolyser en un produit bleu, le substrat X-gal présent dans les

géloses (Cramer *et al.*, 1996). Seules les colonies de bactéries recombinantes (colonies blanches) qui ont pu croître sur les géloses en présence de kanamycine et de X-gal ont été sélectionnées et utilisées pour la préparation de l'ADN plasmidique. Les colonies sélectionnées sont celles qui ont incorporé le plasmide contenant le gène d'intérêt. Puisque ce gène d'intérêt se situe à la place du gène de la β -galactosidase et que le cadre de lecture est interrompu, le substrat X-gal contenu dans les géloses ne peut donc plus être dégradé en un produit bleu d'où la couleur blanche des colonies sélectionnées.

2.7.1.4 Préparation de l'ADN plasmidique des recombinants

L'ADN plasmidique des recombinants (colonies blanches) a été extrait par une technique de lyse alcaline à l'aide de la trousse High Pure Plasmid Isolation (Boehringer Mannheim, Laval, CA). Les colonies bactériennes recombinantes ont été repiquées dans 3 ml de milieu nutritif LB, pH 7,0 (1% tryptone (p/v), 0,5% d'extrait de levure (p/v) et 1% de NaCl (p/v) (Difco, Montréal, CA)) contenant 50 μ g/ml de kanamycine (Boehringer Mannheim, Laval, CA). Après une incubation de 18 heures à 37°C sous agitation à 250 rpm, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 12 000 x g à l'aide d'une centrifugeuse table (International Equipment Company, Massachusetts, É-U) durant 2 min. Les culots de bactéries ont été resuspendus dans 250 μ l d'une solution composée de 100 μ g/ml de RNase A, 50 mM de Tris-HCl et 10 mM d'EDTA pH 8,0. Les bactéries ont été lysées en présence de 250 μ l d'une solution de lyse (0,2 M de NaOH et 1% de SDS (p/v)). Les tubes ont été mélangés et incubés 5 min à la température de la pièce. Un volume de 350 μ l d'une solution froide contenant 4 M d'hydrochloride de guanidine et 0,5 M d'acétate de potassium pH 4,2 a été ajouté aux mélanges réactionnels. Les tubes ont été mélangés par inversion et incubés 5 min sur la glace avant d'être centrifugés durant 10 min à 13 000 x g. Les surnageants contenant l'ADN plasmidique ont été transférés dans des tubes de polypropylène contenant un filtre composé d'une résine de fibre de verre. Les tubes ont été insérés dans des tubes collecteurs de polypropylène de 2 ml et centrifugés 60 secs à 13 000 x g. La résine ayant fixé l'ADN a été lavée dans 700 μ l de solution de lavage contenant 20 mM de NaCl, 80% d'éthanol (v/v) et 2 mM de Tris-HCl pH 7,5. Les tubes ont été centrifugés durant 60 secs à 13 000 x g afin d'éliminer le tampon de lavage et centrifugé à nouveau durant 60 secs à 13 000 x g afin d'éliminer le

tampon de lavage résiduel. L'ADN purifié a été élué avec 100 µl du tampon TE (10 mM Tris-HCl et 1 mM d'EDTA pH 8,5) par une centrifugation de 30 sec à 13 000 x g. La qualité et la concentration de l'ADN extrait ont été évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (p/v).

2.7.1.5 Digestion enzymatique des plasmides recombinants

La présence des inserts d'ADN codant pour les protéines p34 et p39 du ChfuGV a été confirmée à l'aide d'une digestion de l'ADN plasmidique avec l'endonucléase *EcoRI*. Brièvement, 2 µl d'ADN plasmidique (500 ng) ont été digérés avec 10 U d'endonucléase *EcoRI* (0,5 µl) en présence de 1 µl de tampon de réaction 10 X (0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M MgCl₂, 1 M NaCl (Gibco BRL, Burlington, CA) et 6,5 µl d'eau distillée durant 1 heure à 37°C. Les produits de digestion ont été analysés sur gel d'agarose 0,8% (p/v).

2.7.2 Séquençage des plasmides recombinants

Un clone positif contenant l'insert correspondant soit au gène codant pour une portion de la p34 et au gène codant pour une portion de la p39 ont été séquencés par le service de séquençage de l'IRB (Montréal, CA). Le séquençage a été effectué sur les ADN plasmidiques purifiés précédemment à la section 2.7.1.4. La composition en nucléotides des ADN plasmidiques a été déterminée par une réaction de séquençage basée sur le marquage à la fluorescence des nucléotides à l'aide de la trousse de réaction BigDye Terminator Ready (PE Biosystems, Ontario, CA). Brièvement, la technique repose sur le marquage terminal des nucléotides à l'aide de marqueurs fluorescents. Ces marqueurs contiennent une molécule donneuse de fluoromycine liée à une molécule réceptrice de dichlororhodamine (dRhodamine). L'excitation maximale de chacun des marqueurs est due à la fluoresceine du donneur et le spectre d'émission à la dRhodamine du récepteur. Les marqueurs terminaux utilisés lors des réactions de séquençage sont: pour l'adénine, le dR6G (vert), pour la cytosine, dROX (rouge), pour la guanine, le dR110 (bleu) et pour la thymine, le dTAMRA (noir). Donc, selon l'émission de fluorescence analysée par l'ordinateur, il est possible d'obtenir la composition nucléotidique de notre échantillon.

Figure 3: Amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage des gènes codant pour les protéines p34 et p39 du ChfuGV.

Les amorces oligonucléotidiques sens et anti-sens utilisées pour l'amplification et le séquençage des gènes codant pour les protéines p34 et p39 du ChfuGV sont illustrées par des flèches noires. Les boîtes représentent la taille anticipée de chacun des fragments amplifiés. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier la p34 du ChfuGV ont été conçues à partir de la séquence de la p39 de XnGV et à partir de la séquence peptidique IFQGV obtenue lors de l'analyse par HPLC des produits des digestions tryptiques. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier la p39 du ChfuGV ont été conçues à partir de régions homologues identifiées entre toutes les p39 des nucléocapsides enveloppées des différents baculovirus (GV et NPV).

Amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification du gène codant pour la p34:

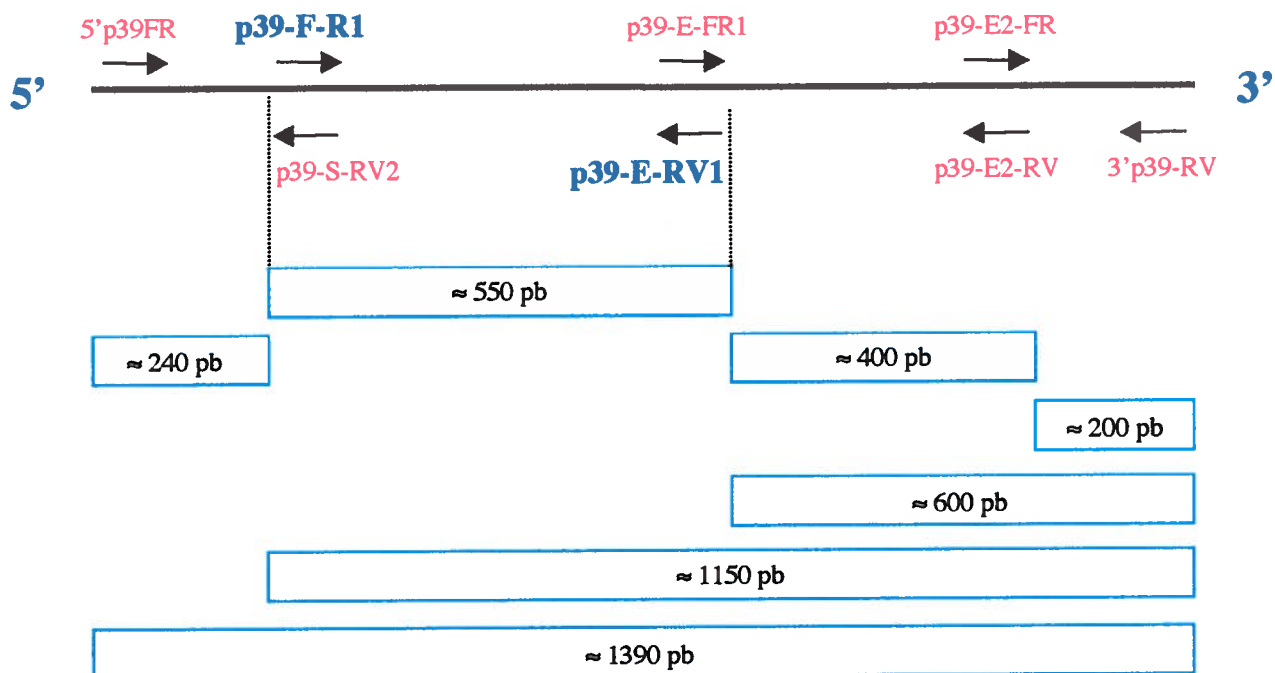
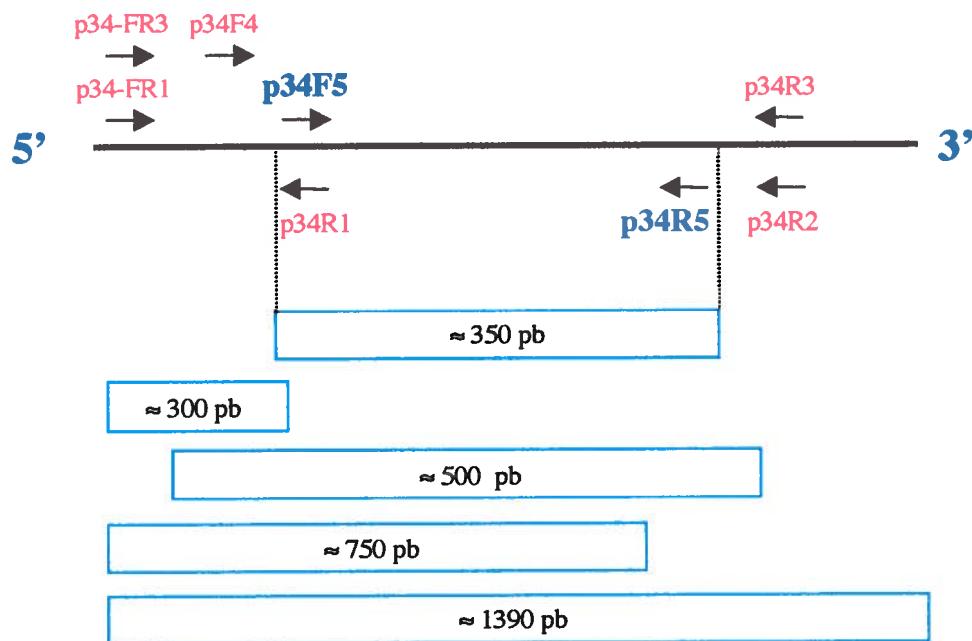
<u>Amorces</u>	<u>Séquences</u>
p34-FR3	5'-TCC GAC GAC ATT GAC GAG CAG-3'
p34-FR1	5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3'
p-34F4	5'-AA(T/C) TA(T/C) CA(T/C) AT(T/C/A) TT(T/C) CA(A/G)-3'
p34F5	5'-ATC TTT CAG GGT GTG-3'
p34R1	5'-CC(C/T/G) ACC AA(A/G) TA(T/G) ACG (T/C)TG (T/A)(T/C)G G-3'
p34R2	5'-CG(C/G/T) CA(G/C/T) CGC GGG CT(T/C) (G/T/A)(G/T)(G/C) (T/G/A)A(G/C) (T/G)A(A/T)(T/C) TAG CTG- 3'
p34R3	5'-GGC TGG TGC TCT GCG CGT TG-3'
p34R5	5'-CGG TTG TAC AGA AGG-3'

Amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification du gène codant pour la p39:

Amorces

Séquences

5'p39FR	5'-CAC CGT CTG TAA ATA GCC C-3'
p39-F-R1	5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3'
p39-E-FR1	5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3'
p39-E2-FR	5'-TGT TGG TGA TAG GC GGG-3'
p39-S-RV2	5'-GCG TCG TAA ACC CCT AAA-3'
p39-E-RV1	5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT -3'
P39-E2-RV	5'-ACA ACC ACT ATC CGC CC-3'
3'p39-RV	5'- TGA GTT GCG TGT GAA CCG-3'



2.8 Vérification de la provenance des amplicons codant pour les protéines p34 et p39 du ChfuGV

Afin de déterminer si les amplicons associés au gène des protéines p34 et p39 du ChfuGV provenaient de l'ADN viral plutôt que de l'ADN larvaire, nous avons procédé à une extraction d'ARN total du ChfuGV. L'ARN a été extrait à partir d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve infectée par le ChfuGV. Par la suite, une amplification des fragments d'ADN correspondants au gène codant pour la p34 du ChfuGV et au gène codant pour la p39 du ChfuGV a été effectuée en parallèle sur les deux larves à l'aide d'amorces spécifiques à chacun des gènes par une technique de RT-PCR.

2.8.1 Extraction de l'ARN total du ChfuGV

Afin de déterminer la provenance des amplicons, deux larves de tordeuse des bourgeons de l'épinette ont été déposées sur une diète artificielle pour une période de 7 jours (Grisdale et Wilson, 1988). La diète de la première larve ne contenait aucune suspension virale alors que la diète de la seconde larve contenait 50 µl d'une suspension de ChfuGV (concentration de 4×10^8 granules/ml). Les larves ont été incubées dans une chambre environnementale Sanyo (température de 25°C, photopériode de 14:10 heures (jour:nuit) et humidité relative de 50%). Après 7 jours d'incubation en chambre environnementale, chaque larve a été recueillie et traitée individuellement.

L'ARN total des deux larves a été séparé à l'aide du réactif Trizol (Gibco BRL, Burlington, CA). Ainsi chaque larve a été homogénéisée de façon individuelle dans 1 ml de réactif Trizol à l'aide d'un homogénéisateur électrique (Tekmar's Tissumizer[®], Ohio, É-U). Les échantillons ont ensuite été incubés durant 5 min à la température de la pièce afin de permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Suite à l'incubation, 0,2 ml de chloroforme (Fisher, Montréal, CA) ont été ajoutés aux tubes. Ces tubes ont été agités manuellement et vigoureusement durant 15 secs, incubés à la température de la pièce durant 3 min et centrifugés durant 15 min à 12 000 x g à l'aide d'une centrifugeuse de table (International Equipment Company, Massachusetts, É-U).

L'ARN total a été récupéré dans la phase supérieure. Cette phase aqueuse a été transférée dans un microtube afin de précipiter l'ARN. La précipitation a été effectuée en ajoutant 0,5 ml d'alcool isopropylique (Sigma, St-Louis, É-U) et 1/10 du volume en acétate de sodium. Les tubes ont été incubés durant 10 min à la température de la pièce et centrifugés à l'aide de la centrifugeuse de table durant 10 min à une vitesse de 12 000 x g et à une température de 4°C. Le surnageant a été éliminé et les culots d'ARN ont été lavés avec 1 ml d'éthanol 75% (v/v). Les échantillons ont été centrifugés à nouveau durant 5 min à une vitesse de 7 500 x g et à une température de 4°C. L'éthanol a été enlevé à l'aide d'une pipette et les culots d'ARN ont été séchés durant 15 min à l'air ambiant. Finalement, l'ARN a été resuspendu dans de l'eau traité au DEPC (diéthyl pyrocarbonate) (Sigma, St-Louis, É-U) ne contenant aucune RNase.

La qualité des extractions d'ARN total provenant de la larve saine et de la larve infectée par le ChfuGV a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (p/v) en appliquant un courant de 120 V durant 1 heure. L'échantillon d'ARN déposé sur le gel a été préparé à l'aide de 0,8 µl d'ARN total extrait (environ 0,8 µg) mélangé à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U), solution de xylène cyanol 2% (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U), Ficoll 400 96% (v/v) (Sigma, St-Louis, É-U)) et 9,2 µl d'eau traité au DEPC. Un marqueur de poids moléculaire, le 1 kb DNA Ladder (Gibco BRL, Burlington, CA) a été utilisé. Le poids moléculaire des fragments d'ADN contenus dans le marqueur sont; 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb). L'échantillon déposé sur le gel a été préparé à l'aide de 0,5 µl de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée (50 ng) qui ont été mélangés à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U), solution de xylène cyanol 2% (p/v) (Sigma, St-Louis, É-U), Ficoll 400 96% (v/v) (Sigma, St-Louis, É-U)) et à 9,5 µl d'eau distillée. Le gel d'agarose a été coloré 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (concentration finale 0,01 mg/ml (p/v)) (Sigma, St-Louis, É-U) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA (Quantum Biotechnologies, Carlsbad, CA)) dans 980 ml d'eau distillée.

2.8.2 Amplification par technique de RT-PCR des gènes codant pour une portion de la p34 et de la p39 du ChfuGV à partir de l'ARN total extrait

L'amplification des gènes codant pour une portion des protéines p34 et p39 du ChfuGV à partir de l'ARN total extrait a été réalisée à l'aide de la trousse de travail Thermo Script™ RT-PCR system (Gibco BRL, Burlington, CA). La première étape consiste à obtenir de l'ADNc (ADN complémentaire) du ChfuGV à partir de l'ARN total extrait de chacune des deux larves. Pour le gène de la p34, 1 µl des amorces spécifiques sens p34F5 (5'- ATC TTT CAG GGT GTG-3') et anti-sens p34R5 (5'- GGA AGA CAT GTT GGC -3') ajustées à 50 pmol/µl, 5 µl d'ARN total de larve infectée ou non infectée (environ 5 µg) et 2 µl d'eau traité au DEPC ont été mélangés dans un microtube à PCR. Pour le gène de la p39, le même mélange a été effectué en utilisant toutefois, 1 µl des amorces sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3') ajustées à la même concentration. L'ARN a été dénaturé à une température de 65°C durant 5 min suivit d'une brève incubation sur la glace. Par la suite, un mélange réactionnel a été préparé et ajouté aux tubes contenant l'ARN total dénaturé et les amorces spécifiques pour chacun des gènes. Le mélange réactionnel contenait 4 µl de tampon de synthèse d'ADNc 5X, 1 µl de 0,1 M de DTT (dithiothréitol), 1 µl de RNaseOUT (40 U/µl), 1 µl d'eau traité au DEPC, 2 µl d'un mélange de 10 mM de dNTP et 1 µl d'enzyme Thermo Script RT (15 U/µl). Une fois les mélanges complétés, les échantillons ont été transférés dans un Thermocycleur 9600 (Perkin Elmer Cetus, Roxboro, CA) durant 60 min à une température de 50°C. La réaction de conversion de l'ARN total en ADNc a été arrêtée en incubant les tubes durant 5 min à une température de 85°C. Ensuite, 1 µl de RNase H a été ajouté aux tubes afin d'éliminer l'ARN résiduel et les tubes ont été incubés durant 20 min à une température de 37°C. L'ADNc obtenu a été utilisé comme ADN matrice afin d'amplifier par PCR les gènes codant pour une portion des protéines p34 et p39 du ChfuGV provenant d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve infectée par le ChfuGV.

L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant 2 µl d'ADNc et l'ADN polymérase *Taq* haute fidélité platinum (Gibco BRL, Burlington, CA). Tout d'abord, un

mélange réactionnel a été effectué pour chacun des gènes à étudier (5 µl de tampon à PCR haute fidélité 10X, 2 µl de 50 mM MgSO₄, 1 µl de 10 mM d'un mélange de dNTP, 1 µl de 50 pmol/µl de l'amorce sens p34F5 (5'- ATC TTT CAG GGT GTG -3') et 1 µl de 50 pmol/µl de l'amorce anti-sens p34R5 (5'-CGG TTG TAC AGA AGG-3') pour la p34 ou 1 µl de 50 pmol/µl de l'amorce sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et 1 µl de 50 pmol/µl de l'amorce anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3') pour la p39, 0,2 µl de l'ADN polymérase *Taq* haute fidélité platinum, 2 µl de l'ADNc provenant de la larve saine ou de la larve infectée par le ChfuGV et 39,8 µl d'eau distillée). Le volume réactionnel final dans lequel les réactions ont été effectuées est de 50 µl. Les tubes contenant les mélanges réactionnels ont été incubés dans l'appareil à PCR (Thermocycleur 9600 (Perkin Elmer Cetus, Roxboro, CA)) à une température de 94°C durant 2 min. Ensuite, les tubes ont été soumis à un programme spécifique: dénaturation de l'ADN matrice durant 30 secs à 94 °C, appariement des amorces durant 30 secs à 55°C et élongation de l'ADN par la polymérase *Taq* durant 30 secs à 72°C. Une extension de 10 min à 72°C a été ajoutée à la fin des 35 cycles d'amplification afin de permettre aux amplifications déjà amorcées d'être complétées.

Par la suite, 10 µl de chacune des réactions d'amplification mélangés à 2 µl de tampon de chargement 6X ont été déposés sur un gel d'agarose 0,8% (p/v) dans les mêmes conditions que celles citées dans la section 2.5.

Résultats

3.1 Production virale et purification des nucléocapsides virales enveloppées

La production du ChfuGV *in vivo* a permis d'obtenir des concentrations de 10^{11} granules/ml. L'observation de cette préparation virale par microscopie électronique a permis de visualiser les granules de ChfuGV (figure 4-A). La nucléocapside contenue dans le granule est visible lorsque le corps d'inclusion est rompu ce qui permet au PTA de pénétrer à l'intérieur du granule et ainsi colorer la surface des nucléocapsides. La suspension de granules viraux a été utilisée pour la purification des nucléocapsides enveloppées.

La purification des nucléocapsides enveloppées à partir d'une suspension de 1×10^{11} granules/ml de ChfuGV a permis d'obtenir des concentrations de 1×10^9 nucléocapsides/ml. La suspension des nucléocapsides virales enveloppées a été utilisée pour l'analyse des protéines ainsi que pour l'extraction de l'ADN viral. La figure 4-B représente une préparation de nucléocapsides enveloppées de ChfuGV purifiées observée par microscopie électronique.

3.2 Analyse des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

L'analyse des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV par fractionnement sur gel de polyacrylamide (4%-12%) dans des conditions dénaturantes réductrices a montré la présence de plusieurs protéines structurales dont 6 majeures (figure 5). Le poids moléculaire de ces 6 protéines majeures a été évalué à 17, 24, 29, 34, 39 et 45 kDa. Dans des conditions de migration utilisant un tampon de chargement réducteur, les protéines de 17, 24 et 34 kDa semblent être les protéines structurales majeures des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV. En effet, on observe une concentration plus importante de ces trois protéines sur le gel de polyacrylamide. Dans la littérature, il existe chez les baculovirus, une protéine de 39 kDa, soit la p39, connue comme étant la protéine majeure des nucléocapsides enveloppées. Dans la présente analyse, la protéine de 39 kDa semble être présente sur ce gel mais pas de façon majoritaire.

3.3 Extraction de l'ADN du ChfuGV

La suspension de nucléocapsides virales enveloppées purifiée a été utilisée pour effectuer l'extraction de l'ADN du ChfuGV selon la technique décrite par Sambrook *et al.*, (1989). Ainsi, un volume de 300 μl de cette suspension de nucléocapsides enveloppées purifiées (1×10^9 granules/ml) a permis d'obtenir 40 μl d'ADN viral (200 ng/ μl) (figure 6). La pureté de l'ADN du ChfuGV extrait des nucléocapsides enveloppées a été évaluée sur gel d'agarose et une bande unique d'ADN a été observée (figure 6)

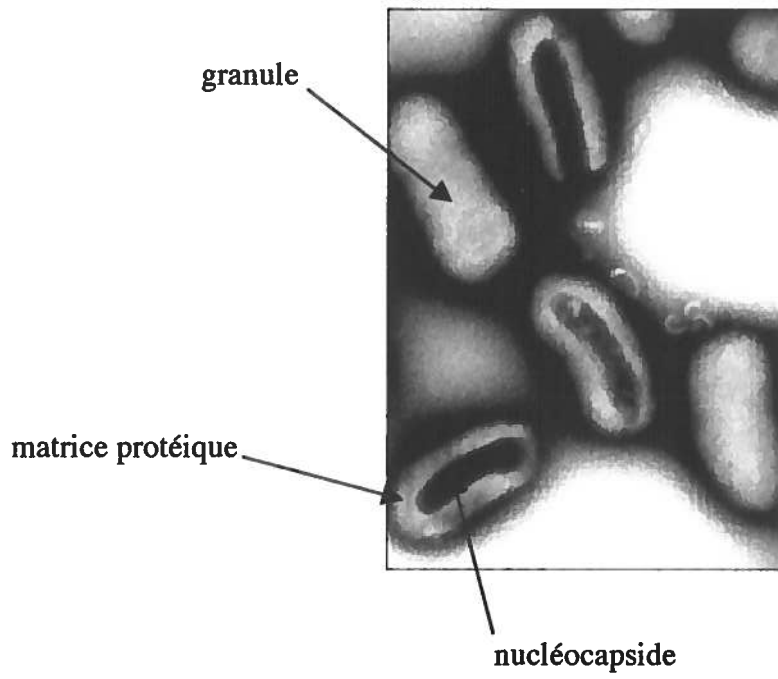
Figure 4-A: Microphotographie prise en microscopie électronique d'une suspension de ChfuGV produit *in vivo*.

L'échantillon à analyser a été préparé à l'aide de 2 μ l de la suspension virale purifiée (1×10^{11} granule/ml) qui a été déposés sur une grille recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone. Une fois la grille séchée, les particules virales ont été mises en évidence en déposant 2 μ l de PTA 3%, pH 6,0 sur la grille. La grille a été séchée et observée à l'aide d'un microscope électronique Phillips 300 à un facteur d'agrandissement de 13 000X.

Figure 4-B: Microphotographie d'une suspension de nucléocapsides enveloppées de ChfuGV.

L'échantillon à analyser a été préparé à l'aide de 2 μ l de la suspension de nucléocapsides enveloppées virales purifiées (1×10^9 nucléocapsides/ml) qui ont été déposés sur une grille recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone. Les nucléocapsides enveloppées ont été mises en évidence en déposant 2 μ l de PTA 3%, pH 6,0 sur la grille. La grille a été séchée et observée à l'aide d'un microscope électronique Phillips 300 à un facteur d'agrandissement de 13 000X.

A



B

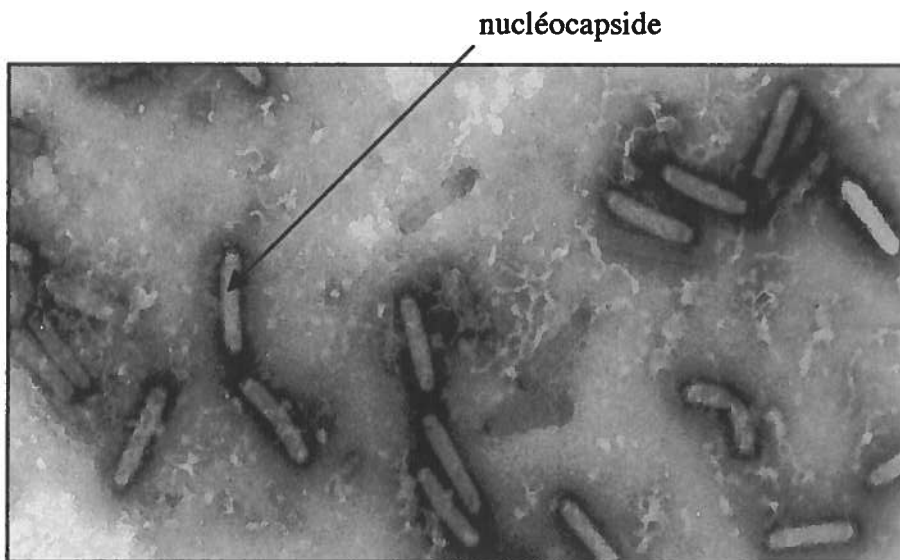


Figure 5: Analyse sur gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE du fractionnement des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV en conditions dénaturantes réductrices.

Piste 1: protéines des nucléocapsides enveloppées purifiées du ChfuGV.

Les échantillons de protéines à analyser ont été préparés à partir de 40 μ l (4×10^7 nucléocapsides enveloppées) d'une suspension de nucléocapsides enveloppées purifiées (concentration initiale de 1×10^9 nucléocapsides/ml) qui ont été mélangés à 40 μ l de tampon Laemmli (réducteur) (4X) contenant 4% de SDS (p/v), 20% de glycérol (v/v), 5% de β - mercaptoéthanol (v/v) et 0,01% de bleu de bromophénol (p/v) préparé dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8. L'échantillon a été chauffé à 100°C durant 10 min et la quantité de l'échantillon de protéines qui a été déposée sur le gel est de 20 μ l.

Pistes M: protéines du marqueur de poids moléculaire SDS-PAGE Molecular Weight Marker High Range de la compagnie Gibco BRL.

Les protéines contenues dans ce marqueur sont : (Myosine (200 kDa), phosphorylase B de muscle de lapin (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine d'œuf (45 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31 kDa), l'inhibiteur de trypsine de la fève de soya (21,5 kDa) ainsi que le lysozyme d'œuf (14,3 kDa). La quantité de ce marqueur qui a été déposée sur le gel est de 20 μ l (20 ng de chacune des protéines).

La migration a été effectuée en appliquant un courant de 200 V durant 45 min dans un tampon d'électrophorèse contenant 0,1% de SDS (p/v), 0,19 M de glycine, 0,025 M de Tris, pH 8,3. Le gel a été coloré durant 30 min dans 100 ml d'une solution contenant 0,1% de bleu brillant Coomassie R250 (p/v), 50% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique glacial (v/v). Le gel a été décoloré durant 90 min dans 100 ml d'une solution contenant 40% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique glacial (v/v).

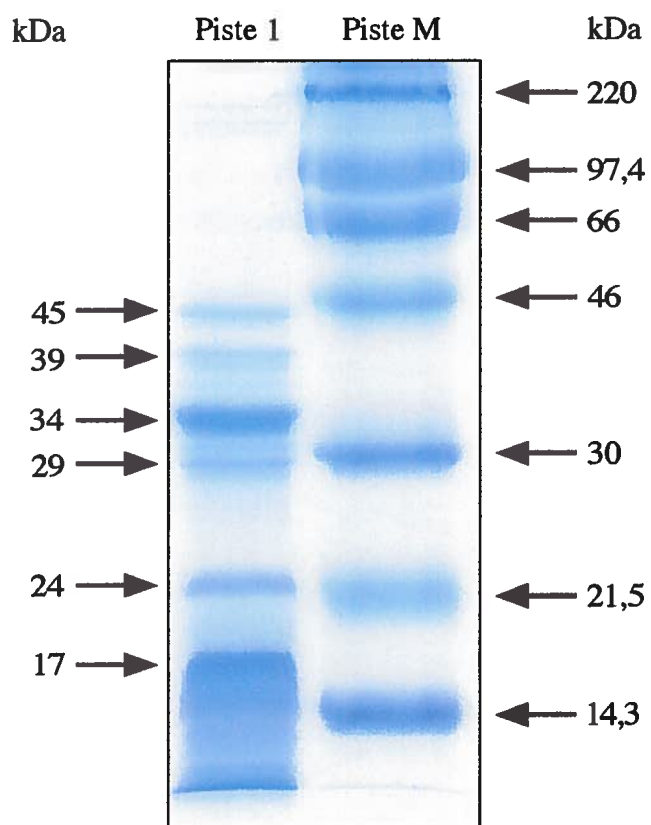


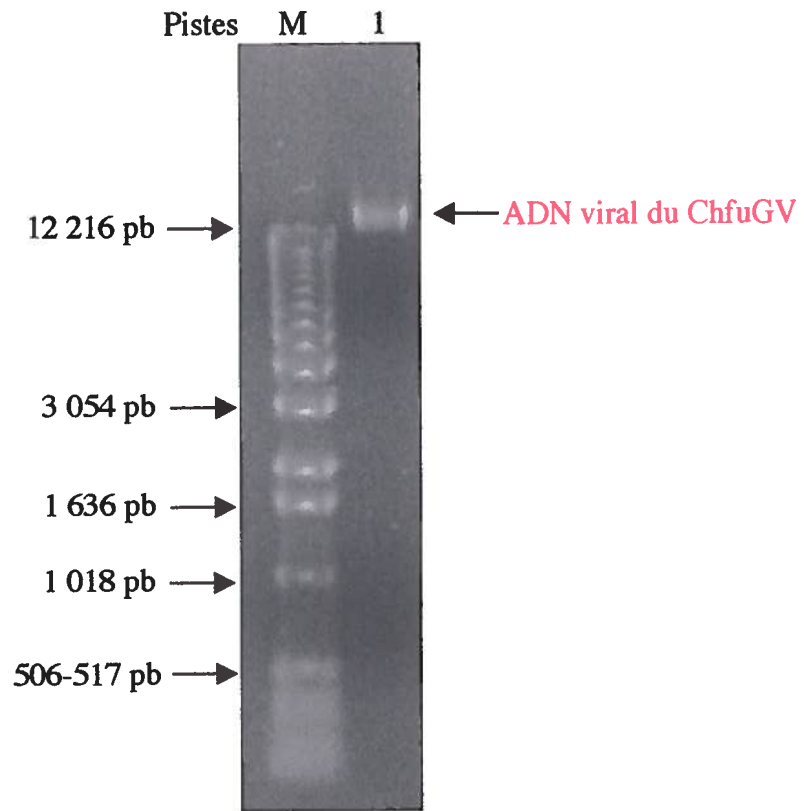
Figure 6: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose de l'ADN du ChfuGV.**Piste 1: ADN du ChfuGV**

L'ADN du ChfuGV a été extrait à partir de 300 µl d'une suspension de nucléocapsides virales enveloppées (1×10^9 nucléocapsides enveloppées/ml). L'échantillon déposé sur le gel a été préparé en mélangeant 1 µl d'ADN viral extrait (200 ng), 2 µl de tampon de chargement 6X (bleu de bromophénol 2% (p/v), xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v) (p/v)) et 9 µl d'eau distillée.

Piste M: ADN du marqueur de poids moléculaire 1 kb de la compagnie Gibco BRL.

Le marqueur utilisé est le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl). La taille des fragments d'ADN de ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb). L'échantillon déposé sur le gel (50 ng) a été préparé en mélangeant 0,5 µl de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée, 2 µl de tampon de chargement 6X (bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v) (p/v)) et 9,5 µl d'eau distillée.

La migration a été effectuée en appliquant un courant de 120 V durant 1 heure. Le gel d'agarose a été coloré 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (concentration finale 0,01 mg/ml (p/v)) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA) dans 980 ml d'eau distillée).



3.4 Caractérisation moléculaire du gène codant pour la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

Séquençage partiel de la p34 du ChfuGV: Suite à leur fractionnement sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes réductrices, les protéines des nucléocapsides virales enveloppées ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (figure 7). La protéine de 34 kDa du ChfuGV (p34) qui a été identifiée à l'aide de son poids moléculaire a été découpée de la membrane pour permettre le séquençage peptidique de la région amino-terminale et de courtes régions internes. Il n'a pas été possible d'effectuer le séquençage de la région amino-terminale de la protéine p34 par la dégradation d'Edman en phase liquide. Il semble que la technique n'a pas fonctionné dû au blocage de la région amino-terminale de la protéine p34 du ChfuGV à analyser par des radicaux libres et ce malgré l'utilisation de l'acide thioglycolique lors du transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose. C'est à l'aide des digestions tryptiques internes et de l'analyse par HPLC des produits provenant de ces digestions que plusieurs séquences d'acides aminés ont été obtenues. Les différentes fractions peptidiques qui ont été analysées et séquencées sont représentées sur le chromatographe de la figure 8. Les séquences d'acides aminés des peptides obtenues sont: ELSNYHIFQGVTDVFRND, LINR, VLPVNECTR, VATVSLPR et TALESDPRRK.

Comparaison des séquences d'acides aminés codant pour la p34 du ChfuGV avec celles des protéines des nucléocapsides enveloppées d'autres baculovirus: Chacune des séquences d'acides aminés obtenues a été comparée avec différentes séquences de protéines des nucléocapsides enveloppées des baculovirus répertoriées dans la littérature en utilisant le programme GeneWork, (Intelligenetics). À l'exception d'une seule séquence de 18 acides aminés, aucune identité ou homologie concluante n'a pu être observée avec d'autres séquences de protéines baculovirales. La séquence peptidique ELSNYHIFQGVTDVFRND provenant de la p34 du ChfuGV a été comparée à une partie de la séquence de la p39 des nucléocapsides enveloppées du granulovirus de *Xestia-c-nigrum*, le XnGV. Une attention particulière a été portée sur la séquence de la p39 du XnGV. En effet, un bloc de 5 acides aminés, IFQGV, de la séquence peptidique de 18

acides aminés de la p34 du ChfuGV a montré une identité de 100% avec une portion de la séquence peptidique de la p39 du XnGV (figure 9). Le peptide ELSNYHIFQGVTDVFRND comporte en majeure partie des acides aminés non polaires hydrophobes et neutres (figure 9). Ce peptide a été utilisé afin de concevoir des amorces oligonucléotidiques dégénérées de manière à amplifier par PCR le gène codant pour la protéine p34 du ChfuGV.

Amplification par PCR du gène codant pour la p34 du ChfuGV: La paire d'amorces dégénérées sens p34F5 (5'- ATC TTT CAG GGT GTG -3') et anti-sens p34R5 (5'- GGA AGA CAT GTT GGC -3') conçues à partir de la séquence de la p39 de XnGV inversée et complémentaire a permis l'amplification de trois fragments d'ADN provenant du gène codant pour la p34 du ChfuGV. Les amplicons obtenus ont été observés sur gel d'agarose (figure 10). Une bande majeure d'ADN a pu être observée autour de 317 pb et deux autres bandes d'ADN d'intensité plus faible à 550 pb et 1350 pb (piste 2, figure 10). Les fragments d'ADN de 550 pb et de 1350 pb ont été considérés comme des amplifications non spécifiques. Les amorces utilisées lors de cette amplification, p34F5 (5'- ATC TTT CAG GGT GTG -3') et anti-sens p34R5 (5'-GGA AGA CAT GTT GGC-3'), n'ont pas été conçues en fonction de permettre l'amplification d'un fragment de la taille de ceux de 550 pb et de 1350 pb. La présence de séquences identiques ou très similaires à celles des deux amorces utilisées (p34F5 et p34R5) qui auraient pu permettre d'amplifier les fragments de 550 pb et de 1350 pb a été vérifiée sur la séquence de la p39 du XnGV. Ces identités ou similarités n'ont pas été observées. Les seules homologies retrouvées sont celles qui permettent l'amplification d'un fragment d'ADN d'une taille de 317 pb. Cependant, il est tout de même possible que seulement de petits groupes de 3-4 nucléotides présents dans les amorces p34F5 et p34R5 se soient appariés suffisamment pour permettre l'amplification de fragments d'ADN non spécifiques tels que ceux de 550 pb et de 1350 pb. L'utilisation de toutes les autres paires d'amorces oligonucléotidiques dégénérées représentées à la figure 3 n'ont pas permis l'amplification d'autres fragments d'ADN. Des analyses plus approfondies ont été effectuées uniquement sur le fragment de 317 pb. L'amplification du gène codant pour la protéine EGT du ChfuGV a été effectuée à partir des amorces sens EXPF (5'-CCG AGG CAT ATG TTC

GTG CAA CTA ATA CTC-3' et anti-sens EXPR (5'-GTG GTG CCC GGG ATA TTT ATT ATT TCT CAA CAC-3') ajustées à 50 pmol/μl. L'amplicon obtenu possède une taille de 1344 pb et a servi de témoin positif pour les expériences d'amplification (piste 1, figure 10). L'amplification effectuée à l'aide de ces mêmes amorces mais cette fois-ci en absence d'ADN viral a servi de témoin négatif (piste 3, figure 10). Tel qu'attendu, aucun fragment d'ADN n'a été amplifié.

Clonage et séquençage d'une portion du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV: Le fragment de 317 pb correspondant au gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV a été cloné (figure 11). Deux recombinants (11 et 13) ont été séquencés afin d'obtenir la séquence nucléotidique du gène cloné. La séquence obtenue d'une longueur de 317 nucléotides, est présentée à la figure 12-A. L'amorce oligonucléotidique sens (p34F5) s'est associée à deux endroits sur l'ADN viral du ChfuGV permettant ainsi l'amplification d'un fragment de 317 pb. Cette amorce oligonucléotidique s'est liée dans le sens 5'→3' tel qu'elle a été conçue. Cependant, elle s'est également liée au brin complémentaire du fragment d'ADN amplifié environ 317 nucléotides plus loin mais cette fois-ci dans le sens inverse 3'←5'. L'amorce p34F5 est une amorce oligonucléotidique dont la séquence semble être répétitive dans le fragment d'ADN amplifié de 317 nucléotides. Il n'a pas été possible de retracer l'amorce oligonucléotidique anti-sens (p34R5) lors de l'analyse de la séquence amplifiée (figure 12-A).

Les baculovirus ont généralement un contenu élevé en nucléotides G/C (Vialard *et al.*, 1995). L'analyse du fragment amplifié a révélé un contenu en nucléotides G/C évalué à 48%. Un cadre de lecture ouvert de 106 acides aminés a été déduit de la séquence nucléotidique (figure 12-B). Le contenu de la séquence aminée obtenue se compose principalement d'acides aminés hydrophobes (57,5%). Il est possible de noter dans cette séquence, la présence de deux cystéines représentées par un C orange. Les séquences nucléotidiques et aminées du gène de 317 pb cloné correspondant à une portion de la p34 du ChfuGV ont été comparées à d'autres séquences de protéines d'autres GV ou NPV à

l'aide d'un programme informatique, le GeneWork (Intelligenetics). Aucune homologie concluante n'a été observée avec aucun gène répertorié.

Figure 7: Protéines totales de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV transférées sur membrane de nitrocellulose.

Piste 1: protéines totales de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

Les échantillons de protéines à analyser ont été préparés à partir de 40 μl (4×10^7 nucléocapsides enveloppées totales) d'une suspension de nucléocapsides enveloppées (concentration initiale de 1×10^9 nucléocapsides/ml) qui ont été mélangés à 40 μl de tampon Laemmli (réducteur) (4X) contenant 4% de SDS (p/v), 20% de glycérol (v/v), 5% de β - mercaptoéthanol (v/v) et 0,01% de bleu de bromophénol (p/v) préparé dans un tampon 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8. L'échantillon a été chauffé à 100°C durant 10 min et 20 μl ont été déposés sur le gel de polyacrylamide (4%-12%).

Pistes M: protéines du marqueur de poids moléculaire SDS-PAGE Molecular Weight Marker High Range de la compagnie Gibco BRL.

Les protéines contenues dans ce marqueur sont : (Myosine (200 kDa), phosphorylase B de muscle de lapin (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine d'œuf (45 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31 kDa), l'inhibiteur de trypsine de la fève de soya (21,5 kDa) ainsi que le lysozyme d'œuf (14,3 kDa). La quantité de marqueur de poids moléculaire qui a été déposée sur le gel de polyacrylamide est de 20 μl (20 ng de chacune des protéines).

La migration a été effectuée dans des conditions dénaturantes réductrices en appliquant un courant de 200 V durant 45 min dans un tampon d'électrophorèse contenant 0,1% de SDS (p/v), 0,19 M de glycine, 0,025 M de Tris, pH 8,3. Ensuite, les protéines contenues dans le gel ont été transférées durant 15 min à 100 V sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été colorée dans une solution contenant 0,1% de bleu brillant de Coomassie R250 (p/v), 50% de méthanol (v/v) et décolorée à l'aide d'une solution contenant 50% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique (v/v). La p34 a été identifiée par son poids moléculaire de 34 kDa

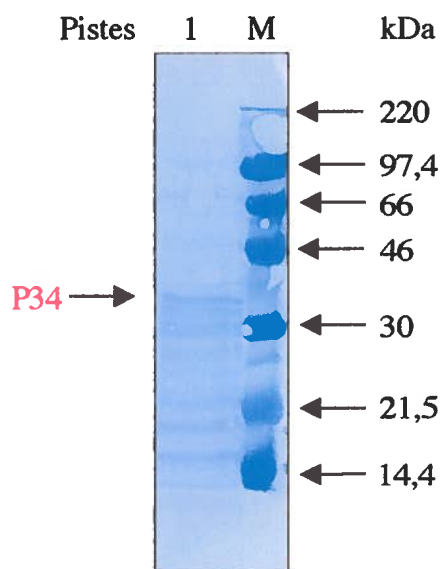


Figure 8: Chromatographe représentant les produits de digestions tryptiques internes de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV analysés par HPLC

Les flèches représentent les fractions peptidiques qui ont été analysées et séquencées à l'aide de l'appareil HPLC.

La protéine p34 a été récupérée (5 μ g) en découpant la membrane de nitrocellulose et éluée en submergeant la membrane dans 100 μ l d'eau distillée déionisée. La membrane a été séchée sur un papier buvard et la p34 solubilisée a été déposée dans un microtube et mise en présence de 50 μ l d'une solution contenant 0,5% d'octyl- β -D glucopyranoside (v/v), 10% d'acétonitrile (v/v), 0,1 M de Tris-HCl, pH 8,0. Le tube a été mélangé durant 20 secs et incubé durant 30 min à température de la pièce. Par la suite, 0,2 μ g de trypsine ont été ajoutés au tube et le mélange a été incubé durant 20 heures à 37°C. À la fin de l'incubation, le tube a été agité durant 10 secs, sonifié 5 min à la température de la pièce et centrifugé 2 min à 13 000 x g. Le surnageant a été récupéré et transféré dans un nouveau tube. La membrane a de nouveau été hydratée en ajoutant 50 μ l de tampon de digestion. Le tube a été mélangé durant 10 secs, sonifié 5 min et centrifugé 2 min à 13 000 x g. Les surnageants provenant des deux centrifugations ont été combinés. Par la suite, la membrane a été lavée à deux reprises avec 50 μ l d'une solution contenant 25% d'acétonitrile (v/v) et 0,1% de trifluoroacétyl (TFA) (v/v). Chacun des lavages a été suivi d'une centrifugation de 2 min à 13 000 x g et les surnageants ont été conservés et ajoutés aux deux précédents pour l'obtention d'un volume total de 200 μ l. Le surnageant final a été analysé par HPLC (Procise model cLc 494) et les fractions aminées récoltées ont été séquencées à l'aide d'un séquenceur automatique.

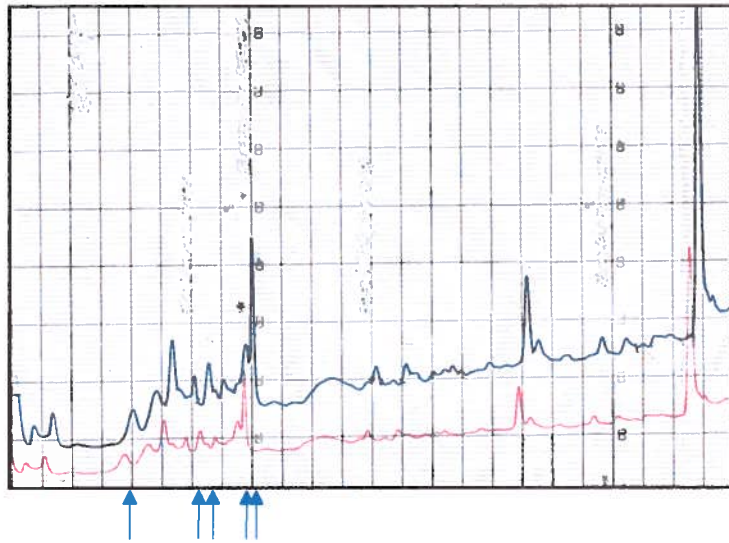


Figure 9: Comparaison de la séquence du peptide de 18 acides aminés provenant du séquençage de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV et de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du XnGV.

La comparaison de la séquence du peptide de 18 acides aminés provenant de la p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV avec une portion de la séquence de la p39 de la nucléocapside enveloppée du XnGV a été réalisée à l'aide du programme informatique GeneWork, (Intelligenetics).

Les acides aminés identifiés en bleu dans les sections ombragées sont les acides aminés identiques observés entre les deux peptides présentés.

Les acides aminés identifiés en rouge sont les acides aminés identiques mais positionnés de façon décalée.

Les acides aminés identifiés en orange sont des cystéines.

																			acides aminés
P34 du ChfuGV																			18
P39 du XnGV	N	N																	22

Note: The table above represents the visual alignment of amino acid sequences. The sequence for P34 du ChfuGV is E L S N Y H I F Q G V T D V F R N D. The sequence for P39 du XnGV is N N E L K N L C I F Q G V Q P P E F M N C G... The amino acids F, R, and N in P34 are highlighted in red. Red arrows point from these amino acids to the corresponding F, M, and N in P39. A blue box highlights the region from E to V in both sequences. Grey vertical bars highlight E, L, S, N, Y, H, I, F, Q, G, V in P34 and E, L, K, N, L, C, I, F, Q, G, V in P39.

Figure 10: Analyse électrophorétique sur un gel d'agarose des amplicons du gène codant pour la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée ChfuGV.

Piste M: ADN du marqueur de poids moléculaire 1 kb de la compagnie Gibco BRL.

Le marqueur est le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl). La taille des fragments d'ADN contenus dans ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. L'échantillon déposé sur le gel (50 ng) est composé de 0,5 µl de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée mélangés à 2 µl de tampon de chargement 6X (bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et 9,5 µl d'eau distillée.

Piste 1: contrôle positif; amplification du gène de la protéine EGT du ChfuGV.

Les amorces sens EXPF (5'-CCG AGG CAT ATG TTC GTG CAA CTA ATA CTC-3' et anti-sens EXPR (5'-GTG GTG CCC GGG ATA TTT ATT ATT TCT CAA CAC-3') ajustées à 50 pmol/µl ont été utilisées afin d'amplifier le gène de l'EGT du ChfuGV.

Piste 2: amplification du gène codant pour la p34 de la nucléocapside enveloppée du ChuGV.

Les amorces sens p34F5 (5'- ATC TTT CAG GGT GTG -3') et anti-sens p34R5 (5'-GGA AGA CAT GTT GGC-3') conçues à partir de la séquence de la p39 de XnGV ont été utilisées pour l'amplification du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV.

Piste 3: contrôle négatif; amplification en absence d'ADN gabarit.

Les amorces EXPF (5'-CCG AGG CAT ATG TTC GTG CAA CTA ATA CTC-3', EXPR (5'-GTG GTG CCC GGG ATA TTT ATT ATT TCT CAA CAC-3'), p34F5 (5'- ATC TTT CAG GGT GTG -3') et p34R5 (5'-CGG TTG TAC

AGA AGG-3') ont été utilisées en absence d'ADN viral pour valider la réaction de PCR.

Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide de l'appareil Thermocycleur 9600 (Perkin Elmer Cetus, Roxboro, CA) en utilisant 100 ng d'ADN du ChfuGV dans un volume réactionnel final de 50 μ l. Le mélange réactionnel était composé de 5 μ l de tampon réactionnel 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 et 0,5 M KCl), 1,5 μ l de 1,5 mM MgCl₂, 1 μ l de 0,2 mM dNTP, 0,5 μ l de polymérase *Taq* (concentration finale de 1 U) et 1 μ l des amorces spécifiques pour chacun des gènes préalablement ajustées à une concentration de 50 pmol/ μ l. Une quantité équivalente à 10 μ l de chacune des réactions d'amplification a été déposée sur le gel d'agarose suite à l'ajout de 2 μ l de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)). La migration a été effectuée en appliquant un courant de 120 V durant 1 heure. Le gel d'agarose a été coloré 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (concentration finale 0,01 mg/ml (p/v)) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA) dans 980 ml d'eau distillée).

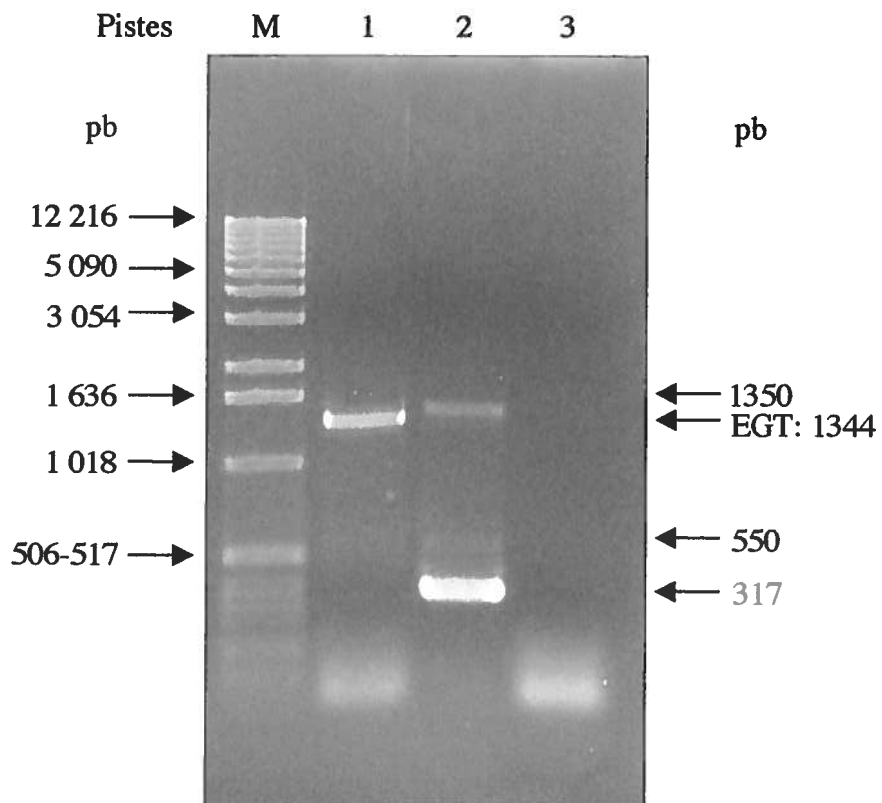


Figure 11: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des plasmides recombinants contenant le gène codant pour une portion de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV digérés par l'endonucléase de restriction *EcoRI*.

Piste M: ADN du marqueur de poids moléculaire 1 kb de la compagnie Gibco BRL.

Le marqueur est le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl) La taille des fragments d'ADN contenus dans ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. L'échantillon déposé sur le gel (50 ng) est composé de 0,5 µl de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée mélangés à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et 9,5 µl d'eau distillée.

Pistes 1-10 et 12-20: ADN plasmidique des différents clones analysés digérés avec *EcoRI*

La présence des inserts d'ADN codant pour une portion de la p34 du ChfuGV a été vérifiée à l'aide d'une digestion avec l'endonucléase *EcoRI*. La digestion de 500 ng d'ADN plasmidique (2 µl) a été effectuée à l'aide de 0,5 µl (10 U) d'endonucléase *EcoRI* en présence de 1 µl de tampon de réaction 10X (0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M MgCl₂ et 1 M NaCl) et 6,5 µl d'eau distillée durant 1 heure à 37°C. Une quantité équivalente à 2 µl, de chacun des échantillons a été déposée sur le gel d'agarose suite à l'ajout de 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et de 8 µl d'eau distillée. La migration a été effectuée en appliquant un courant de 120 V durant 1 heure. Le gel d'agarose a été coloré durant 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (concentration finale 0,01 mg/ml (p/v)) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA) dans 980 ml d'eau distillée). Les

bandes d'ADN de 317 pb observées dans les pistes 2,3,5,6,11,13 et 18 identifiées par les flèches représentent les amplicons correspondants au gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV. Les différentes bandes d'ADN se situant autour de 3 900 pb sont les différentes formes (totalement et partiellement digérées) du vecteur, le PCR[®]2.1 (Invitrogen, San Diego, É-U) contenant l'amplicon.

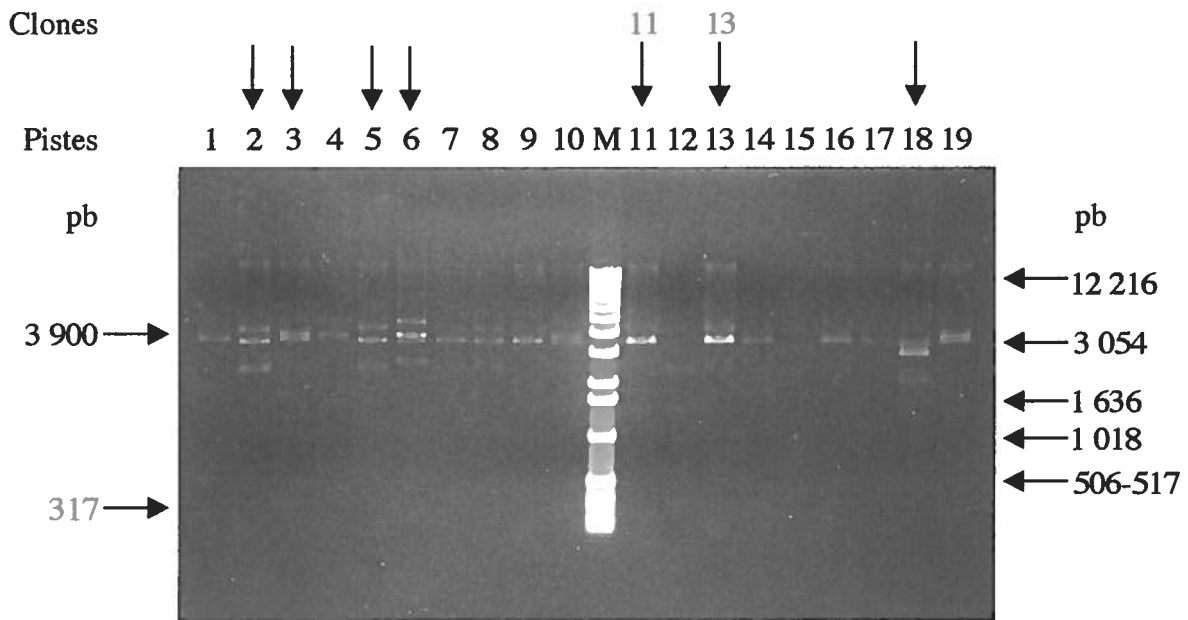


Figure 12- A: Séquence nucléotidique des clones recombinants 11 et 13 correspondant au gène codant pour une portion de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.

La composition en nucléotides de l'ADN plasmidique a été déterminée par une réaction de séquençage basée sur le marquage à la fluorescence des nucléotides à l'aide de la trousse de réaction BigDye Terminator Ready. Les marqueurs fluorescents utilisés lors des réactions de séquençage sont: le dR6G (vert) pour l'adénine, le dROX (rouge) pour la cytosine, le dR110 (bleu) pour la guanine et le dTAMRA (noir) pour la thymine. Donc, la composition nucléotidique de notre échantillon a été obtenue par la mesure de la fluorescence émise par les marqueurs. Cette fluorescence a été analysée par un ordinateur.

Les nucléotides identifiés en bleu sont les nucléotides représentant le contenu en nucléotides G/C.

Les nucléotides soulignés à chacune des extrémités de la séquence représentent les séquences des amorces utilisées afin d'amplifier le fragment d'ADN.

Figure 12- B: Séquence peptidique partielle de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.

La séquence peptidique a été déterminée à l'aide du programme informatique GeneWork (Intelligenetics). Un cadre de lecture ouvert unique a été déduit de la séquence nucléotidique de l'amplicon du gène de la p34 du ChfuGV.

Les acides aminés hydrophobes sont représentés en orangé et les acides aminés représentés en rouge sont des cystéines.

A

Amorce p34F5

(5' ATCTTTCAGGGTGTG 3')

ATCTTTCAGG GTGTGTATCC AGTACGCAGC TTGTACAATC CACCACAAC**T** 50
 TCAACAGGAA ACTCATTGGG TGGTTAGGAT ACCCATCCCA CAGCTGTGAG 100
 ATGTTGAATG CAAATCCTTC TCGGAGAATA GCATCACCTC CCCATAGCAG 150
 TGTGACCAGG TGGAACACGA CCAGCTGCCC AGACTCATTC AGCGCACTCA 200
 ACCGAGACTT CGACAGATGA AACTTCTTTG ATATTTTATC CAGGAAATAT 250
 TCCTGAAGGA TAGCATGCAT AACGACGCAA ACGAGCGAGT AGAAGAATAC 300
CGCACACCCT GAAAGAT 317

Amorce p34F5 inverse et complémentaire

(5' TAGAAAGTCCCACAC 3')

B

LSGCAVFFYS LVCVVMHAIL QEYFLDKMSK KFHLSKSRLS ALNESGQLVV 50
 FHLVTLLWGG DAILREGFAF NISQLWDGYP NHPMSFLIKL WWIVQAA YWM 100
 HTLKDK 106

3.5 Vérification de la provenance du gène amplifié codant pour une portion de la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

De manière à identifier la provenance du fragment d'ADN correspondant au gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV, une amplification de type RT-PCR a été effectuée sur l'ARN total (environ 5 µg) extrait de ce baculovirus. La première extraction d'ARN total a été réalisée sur une larve de *C. fumiferana* saine et une seconde a été effectuée sur une larve infectée par le ChfuGV (figure 13). À la figure 14, il est possible d'observer l'amplification par RT-PCR du gène codant pour une portion de la protéine p34 du ChfuGV. La piste M de la figure 14 représente l'ADN du marqueur de poids moléculaire soit le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl). La taille des fragments d'ADN contenus dans ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. Le gène de l'EGT du ChfuGV a été utilisé comme témoin positif afin de valider la réaction de RT-PCR. Ainsi, ce gène, d'une longueur totalisant 1 344 pb a été amplifié à l'aide des amorces sens EXPF (5'-CCG AGG CAT ATG TTC GTG CAA CTA ATA CTC-3') et anti-sens EXPR (5'-GTG GTG CCC GGG ATA TTT ATT ATT TCT CAA CAC-3'), (piste 1, figure 14). L'utilisation des amorces sens p34F5 (5'-ATC TTT CAG GGT GTG-3') et anti-sens p34R5 (5'-CGG TTG TAC AGA AGG-3') lors de la réaction de RT-PCR effectuée sur l'ARN total provenant d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV, a permis d'amplifier deux fragments ayant des longueurs respectives de 317 pb et 1 350 pb (piste 2, figure 14). La bande d'ADN de 317 pb semble être l'amplicon attendu soit celui correspondant au gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV. En effet, les amorces utilisées, p34F5 et p34R5, ont été conçues à partir de la séquence de la p39 du XnGV dans le but d'amplifier un fragment de gène d'une taille approximative de 317 pb. Ainsi, le fragment d'ADN de 1 350 pb semble être un amplicon non spécifique. Il est possible de noter qu'un résultat très similaire avait été obtenu lors de l'expérience d'amplification du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV. Finalement, les réactions de RT-PCR effectuées en présence d'ARN total provenant d'une larve saine de *C. fumiferana* et en absence d'ADNc, ont été utilisées comme témoin négatif. L'absence d'amplification pour ces contrôles permettait

également de valider les résultats d'amplification obtenus à l'aide de la RT-PCR (piste 3 et piste 4, figure 14)

Figure 13: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose de l'extraction d'ARN total provenant d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV.

L'extraction d'ARN total de deux larves de *C. fumiferana* a été effectuée en utilisant le réactif Trizol (Gibco BRL, Burlington, CA). Ces deux larves ont été déposées durant 7 jours sur deux cupules de diète artificielle (Grisdale et Wilson, 1988); la première diète ne contenant aucune suspension virale et la seconde, 50 µl d'une suspension de ChfuGV (concentration de 4×10^8 granules/ml). Les conditions d'élevage qui ont été utilisées sont une incubation dans une chambre environnementale Sanyo (température de 25°C, photopériode de 14:10 heures (jour:nuit) et humidité relative de 50%). L'extraction d'ARN total a été effectuée en homogénéisant individuellement les deux larves dans 1 ml de réactif Trizol. Les échantillons ont ensuite été incubés durant 5 min à la température de la pièce et 0,2 ml de chloroforme ont ensuite été ajoutés aux tubes. Ces tubes ont été agités durant 15 secs, incubés à la température de la pièce durant 3 min et centrifugés durant 15 min à 12 000 x g. L'ARN total a été récupéré dans la phase supérieure et a été précipité en ajoutant 0,5 ml d'alcool isopropylique et 1/10 du volume en acétate de sodium. Les tubes ont été incubés durant 10 min à la température de la pièce et centrifugés durant 10 min à une vitesse de 12 000 x g à une température de 4°C. Les culots d'ARN ont été lavés avec 1 ml d'éthanol 75% (v/v). Les échantillons ont été mélangés par inversement et centrifugés à nouveau durant 5 min à une vitesse de 7 500 x g et à une température de 4°C. Les culots d'ARN ont été séchés durant 15 min à l'air ambiant et l'ARN a été resuspendu dans de l'eau traité au DEPC.

Piste M: ADN du marqueur de poids moléculaire 1 kb de la compagnie Gibco BRL.

Le marqueur est le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl). La taille des fragments d'ADN contenus dans ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. L'échantillon (50 ng) déposé sur le gel est composé de 0,5 µl de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée mélangés à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution

de bleu de bromophéno1 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et 9,5 µl d'eau distillée.

Pistes 1: ARN total d'une larve saine de *C. fumiferana*.

L'échantillon d'ARN total déposé sur le gel a été préparé à l'aide de 0,8 µl d'ARN total extrait (environ 0,8 µg) mélangé à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophéno1 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et 9,2 µl d'eau traité au DEPC.

Piste 2: ARN total d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV.

L'échantillon d'ARN total déposé sur le gel a été préparé à l'aide de 0,8 µl d'ARN total extrait (environ 0,8 µg) mélangé à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophéno1 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et 9,2 µl d'eau traité au DEPC.

La migration des échantillons sur gel d'agarose 0,8% (p/v) a été effectuée en appliquant un courant de 120 V durant 1 heure. Le gel d'agarose a été coloré durant 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (concentration finale 0,01 mg/ml (p/v)) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA) dans 980 ml d'eau distillée.

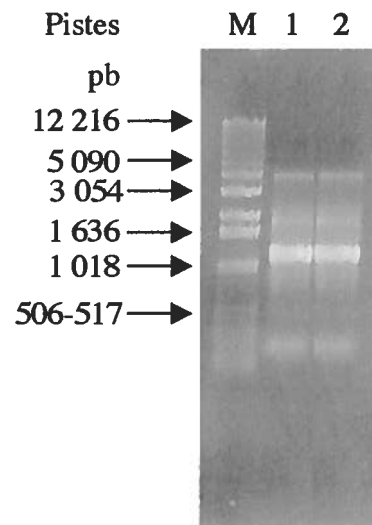


Figure 14: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des amplicons correspondants à une portion du gène de la protéine p34 du ChfuGV obtenus par un RT-PCR effectué sur l'ARN total extrait d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV.

Piste M: ADN du marqueur de poids moléculaire 1 kb de la compagnie Gibco BRL.

Le marqueur est le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl). La taille des fragments d'ADN contenus dans ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. L'échantillon (50 ng) déposé sur le gel est composé de 0,5 µl de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée mélangés à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et 9,5 µl d'eau distillée.

Pistes 1: contrôle positif; amplification du gène codant pour la protéine EGT du ChfuGV.

Les amorces sens EXPF (5'-CCG AGG CAT ATG TTC GTG CAA CTA ATA CTC-3') et anti-sens EXPR (5'-GTG GTG CCC GGG ATA TTT ATT ATT TCT CAA CAC-3') ajustées à 50 pmol/µl ont été utilisées pour l'amplification du gène de l'EGT du ChfuGV.

Piste 2: amplification du gène codant pour la p34 du ChfuGV provenant d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV.

Les amorces sens p34F5 (5'-ATC TTT CAG GGT GTG-3') et anti-sens p34R5 (5'-GGA AGA CAT GTT GGC-3') conçues à partir de la séquence de la p39 de XnGV ajustés à 50 pmol/µl ont été utilisées pour l'amplification du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV.

Piste 3: amplification du gène codant pour la p34 du ChfuGV provenant d'une larve saine de *C. fumiferana*.

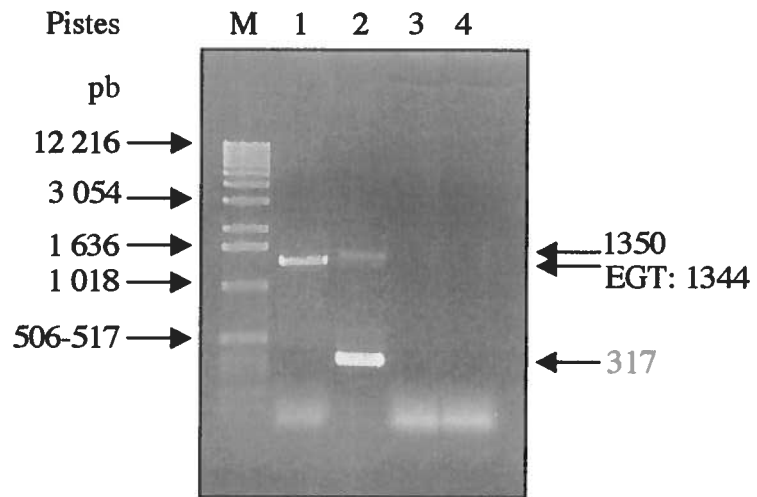
Les amorces sens p34F5 (5'-ATC TTT CAG GGT GTG-3') et anti-sens p34R5 (5'-GGA AGA CAT GTT GGC-3') conçues à partir de la séquence de la p39 de XnGV ajustés à 50 pmol/μl ont été utilisées pour l'amplification du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV.

Piste 4: contrôle négatif; amplification en absence d'ADN gabarit

Les amorces sens EXPF (5'-CCG AGG CAT ATG TTC GTG CAA CTA ATA CTC-3'), anti-sens EXPR (5'-GTG GTG CCC GGG ATA TTT ATT ATT TCT CAA CAC-3'), sens p34F5 (5'-ATC TTT CAG GGT GTG-3') et anti-sens p34R5 (5'-GGA AGA CAT GTT GGC-3') ajustés à 50 pmol/μl ont été utilisées en absence d'ADNc pour valider la réaction de RT-PCR.

Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide de l'appareil Thermocycleur 9600 en utilisant 2 μl d'ADNc obtenu par RT-PCR à partir de l'ARN total extrait soit d'une larve de *C. fumiferana* saine ou soit d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV. Pour un volume réactionnel final de 50 μl, 5 μl de tampon réactionnel à PCR haute fidélité 10X, 2 μl de 50 mM MgSO₄, 1 μl de 10 mM d'un mélange de dNTP, 1 μl de 50 pmol/μl de l'amorce sens p34F5 (5'-ATC TTT CAG GGT GTG-3'), 1 μl de 50 pmol/μl de l'amorce anti-sens p34R5 (5'-CGG TTG TAC AGA AGG-3'), 0,2 μL l'ADN polymérase *Taq* haute fidélité *platinum*, 2 μl soit de l'ADNc provenant de la larve saine ou de la larve infectée par le ChfuGV et 39,8 μl d'eau distillée ont été mélangés. La quantité des échantillons des gènes de l'EGT, des ADNc de la p34 du ChfuGV et du contrôle négatif qui a été déposée sur le gel d'agarose est de 10 μl qui ont été mélangés à 2 μl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)). La migration a été

effectuée en appliquant un courant de 120 V durant 1 heure. Le gel d'agarose a été coloré 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (concentration finale 0,01 mg/ml (p/v)) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA) dans 980 ml d'eau distillée).



3.6 Caractérisation moléculaire de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

Séquençage de la p39 du ChfuGV : Suite au fractionnement des protéines des nucléocapsides enveloppées sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes non réductrices, la protéine de 39 kDa, p39, a été identifiée et découpée du gel de polyacrylamide afin d'effectuer le séquençage aminé de courtes régions internes (figure 15). Cependant, le séquençage de la p39 à l'aide de la dégradation d'Edman en phase liquide et de la spectrophotométrie de masse n'a pas permis d'obtenir de séquences aminées. De manière à amplifier le gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV, des amorces oligonucléotidiques ont été conçues à partir de régions homologues identifiées entre les séquences de toutes les p39 des nucléocapsides enveloppées des différents baculovirus (GV et NPV) répertoriées dans la banque de données informatiques GenBank.

Amplification par PCR du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV: Parmi les différentes combinaisons d'amorces représentées à la figure 3, uniquement la paire d'amorces dégénérées sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3') a permis d'amplifier un fragment de 570 pb codant pour une portion de la p39 du ChfuGV (piste 3, figure 16). L'amplification du gène codant pour la protéine granuline du ChfuGV (800 pb) à l'aide des amorces sens 1FW (5'-ATG GGA TA(T/A) GC(G/T) GG(T/A) GT-3') et anti-sens 4RV (5'-TTA ATA (T/A)GC (G/T)GG (T/A)GT-3') a été utilisé comme témoin positif pour les expériences d'amplification (piste 1, figure 16). L'amplification effectuée à l'aide de toutes ces mêmes amorces dégénérées mais en absence d'ADN viral a servi de témoin négatif pour valider la réaction de PCR(piste 2, figure 16).

Clonage et séquençage du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV: Le fragment de 570 pb correspondant au gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV a été cloné et séquencé (figures 17 et 18). Les amorces oligonucléotidiques utilisées (sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et

anti-sens p39-E-RV1 (5'- GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3')) ont été identifiées à chacune des extrémités respectives de la séquence obtenue. Le pourcentage de nucléotides G/C de la séquence nucléotidique obtenue a été calculé à main levée et a été évalué à 40,5% ce qui est comparable au contenu en nucléotides G/C retrouvé chez les baculovirus (Vialard *et al.*, 1995). Lorsque la séquence obtenue de 570 nucléotides a été traduite en acides aminés à l'aide du programme informatique GeneWork (Intelligenetics), un seul cadre de lecture ouvert de 186 acides aminés a été identifié (figure 19). La séquence en acides aminés obtenue contient principalement des acides aminés hydrophobes (50,5%). Ce calcul a également été effectué à main levée.

Comparaison de la séquence du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV avec les séquences d'autres granulovirus: La séquence aminée déduite de la séquence nucléotidique de l'amplicon a été comparée aux séquences peptidiques répertoriées des GV et des NPV. Le plus fort pourcentage d'identité a été observé particulièrement avec la protéine ODVP-6E de trois GV et de cinq NPV (figure 20). Les pourcentages d'identité des séquences aminées qui ont été comparées sont présentés au tableau 1. Ces pourcentages ont été obtenus à l'aide des analyses effectuées par le programme informatique GeneWork (Intelligenetics). Ainsi, le fragment obtenu et séquencé correspondant à une portion de la p39 du ChfuGV montre une homologie de 88% avec la protéine d'enveloppe ODVP-6E du granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV). Les comparaisons de la séquence du fragment de la p39 du ChfuGV avec la protéine ODVP-6E des différents NPV soit OpMNPV, BmMNPV, CfMNPV et AcMNPV ont démontré en moyenne un pourcentage d'identité se situant autour de 61%. Cette moyenne a été calculée manuellement. Il est intéressant de noter que le plus fort pourcentage d'homologie entre le fragment séquencé de la p39 du ChfuGV et l'ODVP-6E a été observé chez deux granulovirus, soit entre le ChfuGV et le CpGV. Cependant, les homologies observées avec d'autres GV ont été considérées négligeables.

Figure 15: Analyse sur gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE du fractionnement des protéines des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV en conditions dénaturantes et non réductrices.

Piste M: protéines du marqueur de poids moléculaire SDS-PAGE Molecular Weight Marker High Range de la compagnie Gibco BRL.

Les protéines contenues dans ce marqueur sont : (Myosine (200 kDa), phosphorylase B de muscle de lapin (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine d'œuf (45 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31 kDa), l'inhibiteur de trypsine de la fève de soya (21,5 kDa) ainsi que le lysozyme d'œuf (14,3 kDa). La quantité de marqueur de poids moléculaire qui a été déposée sur le gel est de 20 μ l.

Pistes 1: protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

Les échantillons de protéines ont été préparés à partir de 40 μ l (4×10^7 nucléocapsides enveloppées totales) qui ont été mélangés à 40 μ l de tampon Laemmli (non réducteur) (4X) contenant 4% de SDS (p/v), 20% de glycérol (v/v) et 0,01% de bleu de bromophénol (p/v) préparé dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8. L'échantillon a été chauffé à 100°C durant 10 min et a été déposé entièrement sur le gel de polyacrylamide.

La migration a été effectuée en appliquant un courant de 200 V durant 45 min dans un tampon d'électrophorèse contenant 0,1% de SDS (p/v), 0,19 M de glycine, 0,025 M de Tris, pH 8,3. Le gel a été coloré durant 30 min dans 100 ml d'une solution contenant 0,1% de bleu brillant de Coomassie R250 (p/v), 50% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique glacial (v/v). Le gel a été décoloré durant 90 min dans 100 ml d'une solution contenant 40% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique glacial (v/v).

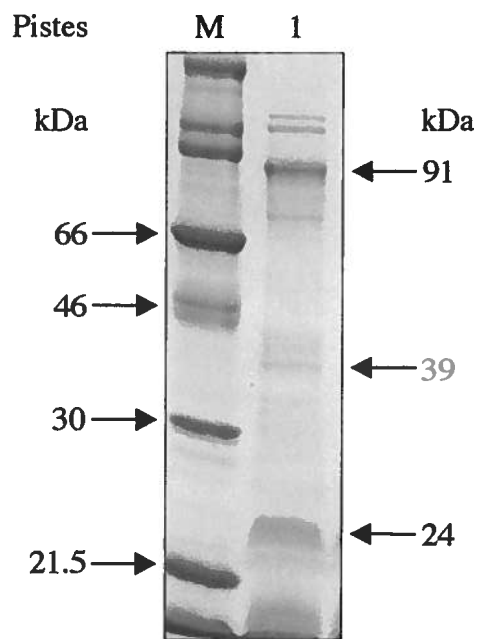


Figure 16: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des amplicons obtenus codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.

Piste M: ADN du marqueur de poids moléculaire 1 kb de la compagnie Gibco BRL.

Le marqueur utilisé est le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl). La taille des fragments d'ADN contenus dans ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. L'échantillon (50 ng) déposé sur le gel contient 0,5 µl de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée, 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et 9,5 µl d'eau distillée.

Piste 1: contrôle positif; amplification du gène de la protéine granuline du ChfuGV

Les amorces sens 1FW (5'-ATG GGA TA(T/A) GC(G/T) GG(T/A) GT-3') et anti-sens 4RV (5'-TTA ATA (T/A)GC (G/T)GG (T/A)GT-3') ajustées à 50 pmol/µl ont été utilisées pour l'amplification du gène de la granuline du ChfuGV.

Piste 2: contrôle négatif; amplification en absence d'ADN gabarit

Les amorces 1FW (5'-ATG GGA TA(T/A) GC(G/T) GG(T/A) GT-3'), 4RV (5'-TTA ATA (T/A)GC (G/T)GG (T/A)GT-3'), p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3') ont été utilisées en absence d'ADN viral pour valider la réaction de PCR.

Piste 3: amplification du gène codant pour une portion de la p39 de la nucléocapside enveloppée du ChuGV.

Les amorces dégénérées sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3') ont été conçues à partir de régions homologues identifiées entre les séquences de toutes les p39 des nucléocapsides enveloppées des différents baculovirus (GV et NPV) répertoriées dans la banque de données informatiques GenBank. Ces amorces ont été ajustées à 50 pmol/ μ l et ont été utilisées pour l'amplification du gène de la p39 du ChfuGV.

Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide de l'appareil Thermocycleur 9600 (Perkin Elmer Cetus, Roxboro, CA) en utilisant 100 ng d'ADN du ChfuGV dans un volume réactionnel final de 50 μ l. Le mélange réactionnel était composé de 5 μ l de tampon réactionnel 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 et 500 mM KCl, 1,5 μ l de 1,5 mM MgCl₂, 1 μ l de 0,2 mM dNTP, 0,5 μ l de polymérase *Taq* (concentration finale de 1 U) et 1 μ l des amorces spécifiques pour chacun des gènes préalablement ajustées à 50 pmol/ μ l. La quantité des échantillons des gènes de la granuline, du contrôle négatif et de la p39 du ChfuGV qui a été déposée sur le gel est de 10 μ l qui ont été mélangés à 2 μ l de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)). Le gel d'agarose a été coloré durant 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (solution mère de 10 mg/ml) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA) dans 980 ml d'eau distillée).

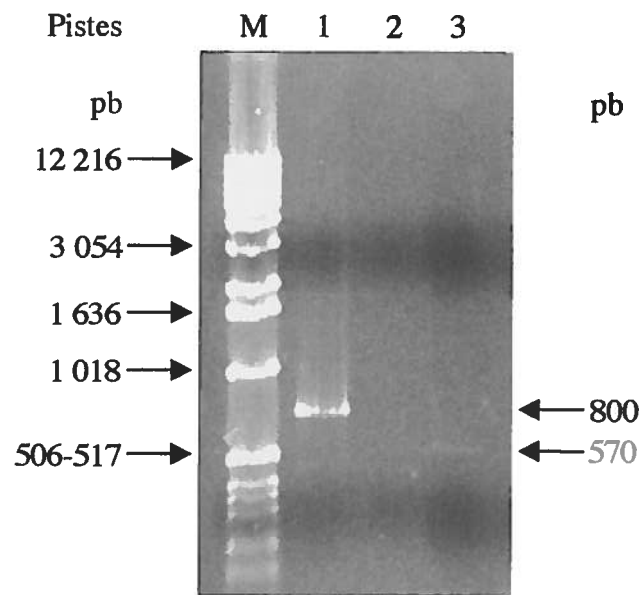


Figure 17: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose du plasmide recombinant contenant le gène codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV digéré par l'endonucléase de restriction *EcoRI*

Piste M: ADN du marqueur de poids moléculaire 1 kb de la compagnie Gibco BRL.

Le marqueur utilisé est le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl). La taille des fragments d'ADN contenus dans ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. L'échantillon (50 ng) déposé sur le gel contient 0,5 µl de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée, 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et 9,5 µl d'eau distillée.

Piste 1: ADN plasmidique du clone analysé digéré avec *EcoRI*.

La présence de l'insert d'ADN codant pour une portion de la p39 du ChfuGV a été vérifiée à l'aide d'une digestion avec l'endonucléase *EcoRI*. La digestion de 500 ng d'ADN plasmidique (2 µl) a été effectuée à l'aide de 0,5 µl (10 U) d'endonucléase *EcoRI* en présence de 1 µl de tampon de réaction 10 X (0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M MgCl₂, 1 M NaCl et 6,5 µl d'eau distillée) durant 1 heure à 37°C. La quantité de produit déposée sur le gel d'agarose est de 2 µl qui ont été mélangés à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et à 8 µl d'eau distillée. Le gel d'agarose a été coloré 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (concentration finale 0,01 mg/ml (p/v)) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA) dans 980 ml d'eau distillée).

La bande de 570 pb observée dans la piste 1 représente l'amplicon correspondant au gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV. La bande d'ADN se situant autour de 3 900 pb représente les différentes formes (totalement et partiellement digérées) du vecteur PCR[®]2.1 (Invitrogen, San Diego, É-U).

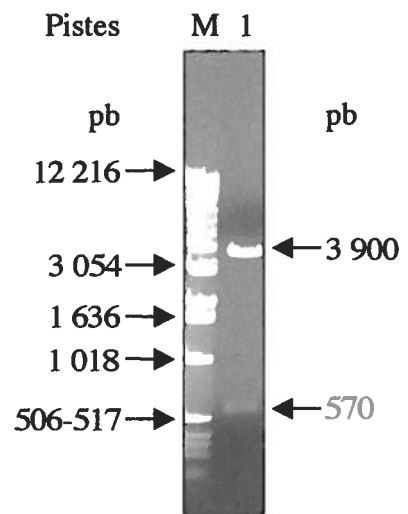


Figure 18: Séquence nucléotidique du clone recombinant correspondant au gène codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.

Les nucléotides identifiés en bleu sont les nucléotides représentant le contenu en nucléotides G/C.

Les nucléotides identifiés par le trait souligné à chacune des extrémités de la séquence représentent les séquences des amorces qui ont permis l'amplification du fragment d'ADN.

La composition nucléotidique de l'ADN a été déterminée à l'aide d'une réaction de séquençage basée sur le marquage à la fluorescence des nucléotides. La trousse de réaction BigDye Terminator Ready a été utilisée. La technique est basée sur le marquage terminal des nucléotides à l'aide de marqueurs fluorescents. Les marqueurs terminaux utilisés lors des réactions de séquençage sont: pour l'adénine, le dR6G (vert), pour la cytosine, dROX (rouge), pour la guanine, le dR110 (bleu) et pour la thymine, le dTAMRA (noir). La composition nucléotidique de l'échantillon a été obtenue par la mesure de la fluorescence qui a été émise et analysée par un ordinateur.

Figure 19: Séquence peptidique partielle d'une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.

La séquence aminée a été déduite à l'aide du programme informatique GeneWork (Intelligenetics) de la séquence nucléotidique du gène du clone recombinant.

Les acides aminés hydrophobes sont représentés en orange.

Amorce p39-F-R1
(5' TTT AGG GGT TTA CGA CGC 3')

TTTAGGGGTT TACGACGCAC TAATAAAGTA TATCCAAACA CAAACAGTTT 50
 TTTGTCTGAC CATGCGTTAT TTATTAGAAA CCAAACACCT GTAGGTTTTA 100
 ATTTAAACAA TCCTACCACA ATGGGTATTG CCGGAGGTAA TGTTACGCCG 150
 GGTTATAATA TAAACGGTAC CTTTGTTAGC AACGCCAATG TCAATTCCGT 200
 GCTTAGGAAC AACGATGTTG TTGGTATGAG GCAAATTTTT CCGGAGGCAT 250
 CCAATAATCA AATGAATGGT TTGACAACT TGAGGAGAGC CGACAATATT 300
 CCAGATTCTA CTATTCACAA TTTAAAGACA AGAAAAATA ACGTTAAACA 350
 ATCACATCCC GAAACAGTAG TTAGAGATAG AGCGGGTGTC GAAAATGCAC 400
 TAGCGCAGAA TCCGCGTTTA GGCGACTATT TAAGGGGTGC CGGATATGTG 450
 ACATTGTTG GAGTGGGTGT TTATTTAGTT ATTAATGTGC CCGATCTCGT 500
 CGGGTCAATA GTTGACGCGA TAAACCGCAC TGGTGGTAGC TGGTATTTTA 550
GAGGCAATAA TGGGGTGAT 570

Amorce p39-E-RV1 inverse et complémentaire
(3' TAG TGG GGG TAA TAA CGG 5')

FRGLRRTNKV YPNTNSFLSD HALFIRNQTP VGFNLNNPTT MGIAGGNVTP 50
 GYNINGTFVS NANVNSVLRN NDVVGMRQIF PEASNNQMNG LTNLRRADNI 100
 PDSTIHNLKT RKNVVKQSHP ETVVRDRAGV ENALAQNPRL GDYLRGAGYV 150
 TLFVGVVYLV INVADLVGSI VDAINRTGGS WYFRGNNGD 190

Figure 20: Comparaison de la séquence peptidique partielle de la protéine p39 du ChfuGV avec la séquence aminée de la protéine d'enveloppe ODVP-6E de CpGV, XnGV, AsGV, LdMNPV, OpMNPV, BmMNPV, CfNPV et AcMNPV.

Les tirets représentent les délétions d'acides aminés.

Les boîtes grises représentent les identités entre les acides aminés de la protéine ODVP-6E du CpGV et la p39 du ChfuGV.

Les comparaisons entre les différentes séquences ont été effectuées à l'aide du programme informatique GeneWork (Intelligenetics).

ChfuGV	----FRGLRR	TNKVYPNTNS	FLSDHALFIR	NQTPVGF-N-	LNNPTTMGIA	44
CpGV	M-SFFRGLRR	TNKVYNDPSG	FITDHAQLIR	NQTPAGF-N-	LNNPTTMGIA	47
XnGV	MSTFYRGLRR	TNRVYNAPSG	FIADHTQLIK	NNIPSGF-NF	LDNPTTISGP	49
AsGV	M-SFFRGLRR	TNKTYPNVNS	FISDHNNLIA	NVTPSGF-N-	LGPPSGLTLG	47
LdMNPV	M-SFFSSLRR	VNKVYPNPQ	FLAVDNLRVL	NSTPNGFQNV	FSAPSTRQIG	49
OpMNPV	M-SFFTNLRR	VNKVYPSAS	FIVDNRLLLN	TPAGFT-NV	LNVPSTRNLG	48
BmMNPV	M-SFFTNLRR	VNKLYPNQAS	FLADNTRLLT	STPAGFT-NV	LNAPSVRNLG	48
CfNPV	MSTFFTNLRR	VNKVYPNQAT	FLTDNTRLLT	TPAGFT-NV	LRAPSVRNLG	49
AcMNPV	M-SFFSNLRA	VNKLYPNQAS	FITDNTRLLT	STPAGFT-NV	LNAPSVRNIG	48
ChfuGV	GGNVTGPGYNI	-NGTFVSNAN	VNSVLRNNDV	VGMRQIFPEA	SNNQMNGLTN	93
CpGV	NGTYVPGYNI	-NGAFISNTN	VNTVLRNNDV	VGMRQLFPDA	SNNQMNGLTN	96
XnGV	NNTHIPGYGT	NNTNFTSNST	VNRVMRNDV	TGMQQLFPSA	TPGQINSLGN	99
AsGV	PNRVQPGYNI	-NNTFVPNSD	INRIMRTNPN	TGMRTLFPNA	NNSQINGLSR	96
LdMNPV	TNRFVPGYNL	PNNRFVSSD	INRVMRNDT	AGMRNIFTSA	DNSQLNSLGQ	99
OpMNPV	NGRFEPGYNL	SNNQFVSAGD	INRITRSNDV	PRIRGVFQGI	SDPQIGSLNQ	98
BmMNPV	NNRYQPGYQL	SNNRFVSTSD	INRITRNDV	PNIRNVFQGI	SDPQINSLRQ	98
CfNPV	NGRFEPGYNL	SNNQFVSAGD	INRITRGNDV	PRIRNVFQGI	SDPQIGSLNQ	99
AcMNPV	NNRFQPGYQL	SNNQFVSTSD	INRITRNDV	PNIRGVFQGI	SDPQINSLSQ	98
ChfuGV	LRRADNIPDS	TIHNLKTRKN	NVKQSHPETV	VRDRAGVENA	LAQNPRLGDY	143
CpGV	LRRADNIPDA	TLHGLQTRKN	GVKTSHPETA	VRDRVGVENA	LAQNPRLADY	146
XnGV	LRQLDNIPDA	TLNSLSTKKS	SVRANNPETA	TRTRSGVQGV	LDRHPRLNQY	149
AsGV	LRAADNIPDA	QIYGLQQRKN	SVKNSHPDLA	TRPD-----	-----	130
LdMNPV	LRRVDNIPDA	GLHAAFLRRQ	GVKSNYPSTN	TRTPGGVEGV	LATNPRLHAR	149
OpMNPV	LRRVDNVPDA	NLHVKRTRGD	AVKQSFPEVN	VRSAEGVDRA	LQQNPRLNTY	148
BmMNPV	LRRMDNVPDF	HYHTKQTRSN	AVRQNFPEVN	VRTPEGVQNA	LQQNPRLHNH	148
CfNPV	LRRADNVPDA	GLHVKRTRSD	AVKQNFPEVN	VRSAEGVDRA	LQQNPRLNTY	149
AcMNPV	LRRVDNVPDF	NYHTKQTRSN	AVKQNFPEVN	VRTPEGVQNA	LQQNPRLHSY	148
ChfuGV	LRGAGYVT--	-LFGVGVYLV	INVADLVGSI	VDAINRTGGS	WYFRGNNGGD	190
CpGV	LRGAGYVT--	-LFGVSVYLV	INVADLVSSI	VEALNRTGGS	WYYRGNNGGD	193
XnGV	LKTAGIVG--	-ISGATIIYLV	VNIADMVGS	VEAMNRTGGS	WYVQGNNGAN	196
AsGV	-----	-----	-----	-----	-----	130
LdMNPV	LNGLKSVGTA	LLIGGGVYLV	FSAATLVQDL	VSALNRVGG	YYVVGSNNGD	199
OpMNPV	LQAKAAGVG	VLLAGGAYLT	FSAATLVQDI	IRALNNTGGS	YYVRGSDGGE	198
BmMNPV	MRTLKVAGVG	ILLAGGGYLL	FTASTLVQDI	INAINRTGGS	YYVQGRNAGE	198
CfNPV	LQAKTAGVG	VLLAGGAYLT	FSAATLVQDI	IQALNNTGGS	YYVRGADGGD	199
AcMNPV	MQSLKVGGTG	ILLATGGYFL	FSAATLVQDI	INAINNTGGS	YYVQKGDAGE	198
ChfuGV	-----	-----	-----	-----	-----	190
CpGV	NFSNIDACVL	RYSRSCGM--S	LADIDEFVCE	LDPHDPNNVD	PLLSFDEARN	241
XnGV	SFSTIEGCVL	RSRSCGM--A	LDDIKDHLC-	FDPHDPTWRD	PYLTSQQLAT	243
AsGV	-----	-----	-----	-----	-----	130
LdMNPV	SSS---VCLL	THRTCQLDTS	-NLSDVSVQC	FDPLLPPDDPA	G-----QRA	239
OpMNPV	TAD---ACLL	LHRTCQDPN	MNTSEVAICA	NDPLVSNTA-	-----QLQA	238
BmMNPV	NVE---SCLL	LQRTCQDRN	LAQSDVNICS	RDPLLANDSP	L-----LTN	239
CfNPV	TAD---ACLL	LSRTCQDPN	MNTSDVVICN	HDPLIADTA-	-----QLQA	239
AcMNPV	IAE---ACLL	LQRTCQDPN	LNQSDVTICP	FDPLLPPNPP	-----ELTN	239

Tableau 1: Représentation du pourcentage d'identité entre la séquence de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV et la protéine d'enveloppe ODVP-6E de d'autres baculovirus.

La p39 du ChfuGV comparée à	Acides aminés identiques (%)
L'ODVP-6E du CpGV	88
L'ODVP-6E de OpMNPV	62
L'ODVP-6E de BmMNPV	61
L'ODVP-6E de CfNPV	59
L'ODVP-6E de AcMNPV	59

Ces pourcentages d'identité ont été obtenus par le biais d'analyses comparatives effectuées à l'aide du programme informatique GeneWork (Intelligenetics).

3.7 Vérification de la provenance du gène amplifié codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

L'extraction d'ARN total effectuée sur une larve de *C. fumiferana* saine et sur une larve infectée par le ChfuGV tel que cité à la section 2.8.1 a permis d'obtenir les quantités nécessaires (environ 5 µg) pour effectuer l'amplification par RT-PCR du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV. L'extraction d'ARN a déjà été présentée à la figure 13. À la figure 21, il est possible d'observer l'amplification par RT-PCR du gène codant pour une portion de la p39. La piste M représente l'ADN du marqueur de poids moléculaire soit le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl). La taille des fragments d'ADN contenus dans ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. La piste 1 représente le témoin positif soit l'amplicon du gène de la protéine EGT du ChfuGV qui possède une taille de 1 344 pb. Ce gène a été amplifié à l'aide des amorces sens EXPF (5'-CCG AGG CAT ATG TTC GTG CAA CTA ATA CTC-3') et anti-sens EXPR (5'-GTG GTG CCC GGG ATA TTT ATT ATT TCT CAA CAC-3'). La piste 2 de cette même figure représente l'amplicon du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV provenant du RT-PCR effectué sur la larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV. Cet amplicon a été obtenu à l'aide des amorces sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3'). Le fragment de 570 pb observé dans la piste 2 semble être l'amplicon attendu soit celui correspondant à une portion du gène codant pour la p39 du ChfuGV. En effet, les amorces utilisées, (p39-F-R1 et p39-E-RV1) ont été conçues à partir de régions homologues identifiées entre les séquences de toutes les p39 des nucléocapsides enveloppées des différents baculovirus (GV et NPV) répertoriées dans la banque de données informatiques Genbank dans le but d'amplifier un fragment d'ADN d'une taille approximative de 570 pb. La réaction de RT-PCR effectué sur l'ARN total provenant d'une larve saine de *C. fumiferana* à l'aide des amorces p39-F-R1 et p39-E-RV1, est présentée à la figure 21 dans la piste 3. Aucun amplicon n'a été observé. Finalement, l'amplification effectuée à l'aide de toutes les mêmes amorces citées dans cette section en

absence d'ADNc gabarit a servi de témoin négatif afin de valider la réaction de RT-PCR (piste 4). Aucun amplicon n'a été observé.

Figure 21: Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des amplicons correspondants au gène codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV obtenus par RT-PCR effectué sur l'ARN total extrait d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV.

Piste M: ADN du marqueur de poids moléculaire 1 kb de la compagnie Gibco BRL.

Le marqueur est le 1 kb DNA Ladder (1,0 µg/µl). La taille des fragments d'ADN contenus dans ce marqueur est: 506-517 pb, 1 018 pb, 1 636 pb, 2 036 pb, 3 054 pb, 4 072 pb, 5 090 pb, 6 018 pb, 7 126 pb, 8 144 pb, 9 162 pb, 10 180 pb, 11 198 pb, 12 216 pb. L'échantillon déposé sur le gel (50 ng) est composé de 0,5 µl de marqueur dilué 1/10 avec de l'eau distillée mélangés à 2 µl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)) et 9,5 µl d'eau distillée.

Pistes 1: contrôle positif; amplification du gène de la protéine EGT du ChfuGV.

Les amorces sens EXPF (5-CCG AGG CAT ATG TTC GTG CAA CTA ATA CTC-3') et anti-sens EXPR (5'-GTG GTG CCC GGG ATA TTT ATT ATT TCT CAA CAC-3') ajustées à 50 pmol/µl ont été utilisées pour l'amplification du gène de l'EGT du ChfuGV.

Piste 2: amplification du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV provenant d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV.

Les amorces sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3') ont été ajustées à 50 pmol/µl et ont été utilisées pour l'amplification du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV. Ces amorces ont été conçues à partir de régions homologues identifiées entre les séquences des différentes p39 baculovirus (GV et NPV) répertoriées dans la banque de données informatiques Genbank.

Piste 3: amplification d'une portion du gène codant pour la p39 du ChfuGV provenant d'une larve de *C. fumiferana* saine.

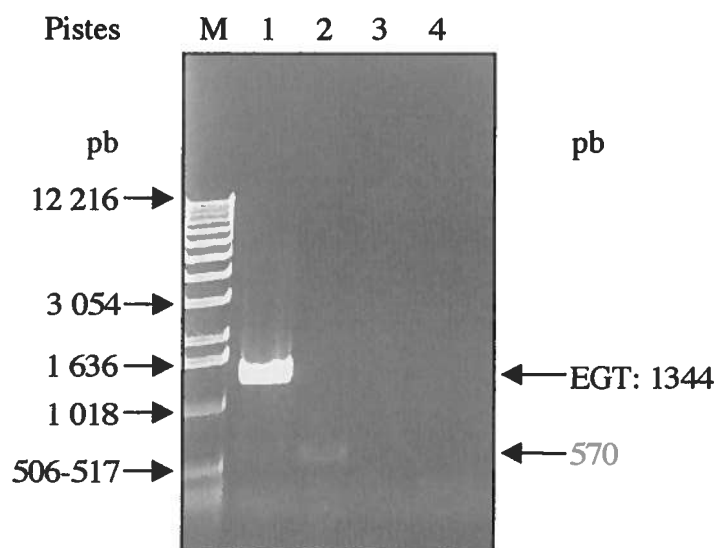
Les amorces sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3') ajustées à 50 pmol/μl ont été utilisées pour l'amplification du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV. Ces amorces ont été conçues à partir de régions homologues identifiées entre les séquences de toutes les p39 de la nucléocapside enveloppée des différents baculovirus (GV et NPV) répertoriées dans la banque de données informatiques Genbank.

Piste 4: contrôle négatif; amplification en absence d'ADN gabarit

Les amorces sens EXPF (5'-CCG AGG CAT ATG TTC GTG CAA CTA ATA CTC-3'), anti-sens EXPR (5'-GTG GTG CCC GGG ATA TTT ATT ATT TCT CAA CAC-3'), sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3') ajustés à 50 pmol/μl ont été utilisées en absence d'ADNc pour valider la réaction de RT-PCR.

Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide de l'appareil Thermocycleur 9600 en utilisant 2 μl d'ADNc obtenu par RT-PCR à partir de l'ARN total extrait soit d'une larve de *C. fumiferana* saine ou soit d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV. Pour un volume réactionnel final de 50 μl, 5 μl de tampon réactionnel à PCR haute fidélité 10X, 2 μl de 50 mM MgSO₄, 1 μl de 10 mM d'un mélange de dNTP, 1 μl de 50 pmol/μl de l'amorce sens p39-F-R1 (5'-TTT AGG GGT TTA CGA CGC-3') et anti-sens p39-E-RV1 (5'-GGC AAT AAT GGG GGT GAT-3'), 0,2 μL l'ADN polymérase *Taq* haute fidélité *platinum*, 2 μl soit de l'ADNc provenant de la larve saine ou de la larve infectée par le ChfuGV et 39,8 μl d'eau distillée ont été mélangés. La quantité des échantillons des gènes de l'EGT, des ADNc de la p39 du ChfuGV et du contrôle négatif qui a été déposée sur le gel d'agarose est de 10 μl qui ont été mélangés à 2 μl de tampon de chargement 6X (solution de bleu de bromophénol 2% (p/v), solution de xylène cyanol 2% (p/v), Ficoll 400 96% (v/v)). La migration a été effectuée en appliquant un courant de 120 V durant 1 heure. Le gel d'agarose a été coloré 15 min dans 200 ml d'une solution composée de bromure d'éthidium (concentration

finale 0,01 mg/ml (p/v)) et de TAE 1X pH 8,3 (20 ml de TAE 50X (2,0 M Tris acétate et 0,05 M EDTA) dans 980 ml d'eau distillée).



Discussion

4.1 Généralités

La production *in vivo* du ChfuGV est un excellent moyen d'accumuler les quantités suffisantes de virus et de nucléocapsides enveloppées pour effectuer des études au niveau génomique et protéomique. La production *in vivo* est également une technique alternative à la production virale en culture cellulaire particulièrement lorsque qu'aucune lignée cellulaire permissive n'est disponible, tel que dans le cas de la production du ChfuGV. La production virale *in vivo* présente un avantage marqué par rapport à la production virale en culture cellulaire. En effet, pendant la production, les passages sériés effectués sur les cultures cellulaires peuvent entraîner des mutations génomiques. Puisqu'elle permet de mieux conserver l'intégrité du génome viral, la culture virale *in vivo* représente donc une alternative intéressante et non négligeable face à la production virale en culture cellulaire. Finalement, l'ADN extrait du ChfuGV produit *in vivo* était convenable tant au niveau de son intégrité qu'au niveau de la quantité produite afin d'effectuer les différentes études sur les gènes codant pour une portion des protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.

4.2 Analyses des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

Les baculovirus ont un très large génome ayant la capacité de contenir près d'une centaine de 100 gènes différents codant pour d'importantes protéines (Rohrmann, 1992). Parmi ces protéines, environ 10 protéines structurales majeures ont été identifiées à ce jour. Ces protéines essentielles sont impliquées dans le maintien de la structure et de la charpente des virions. Entre autre, parmi les protéines identifiées, on retrouve une protéine capable de lier l'ADN (6,9 kDa), la p10 (10 kDa) associée au noyau et au cytoplasme qui est impliquée dans la formation de l'enveloppe, la p24 (24 kDa) dont le rôle à ce jour n'a pas encore été déterminé, la polyédrine ou la granuline (respectivement 30 kDa et 29 kDa) du corps d'inclusion qui incluse et protège les nucléocapsides enveloppées, la p39 des nucléocapsides (39 kDa) qui est impliquée dans le déplacement de la nucléocapside du cytoplasme vers la membrane nucléaire afin de permettre à l'ADN

viral de pénétrer dans le noyau et de se répliquer, la gp64 de l'enveloppe des nucléocapsides (64 kDa) qui est une protéine de fusion d'enveloppe impliquée dans le processus d'entrée par attachement, la p74 (74 kDa) qui est requise pour l'infection des insectes, la PE de l'enveloppe (321 acides aminés), la p87 de la nucléocapside (87 kDa) dont le rôle à ce jour n'a pas encore été déterminé et la protéine VEF du corps d'inclusion (104 kDa) qui facilite l'infection par les GV en provoquant la dégradation de la membrane péritrophique des insectes et le passage des virions enveloppés vers la surface des cellules de l'intestin (Wilson et Miller, 1986; Derksen et Granados, 1988; Whitt et Manning, 1988; Blissard et Rohrmann, 1989; Kusio *et al.*, 1989; Lu et Carstens, 1991; Russell *et al.*, 1991; Rohrmann, 1992; Bah *et al.*, 1997; Afonso *et al.*, 2001). Cependant, selon les résultats obtenus lors du fractionnement sur gel de polyacrylamide des protéines totales de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV, environ 6 protéines structurales majeures ont été observées dont les poids moléculaires sont respectivement de 17 kDa, 24 kDa, 29 kDa, 34 kDa, 39 kDa et 45 kDa. Cependant, les protéines p17, p24 et p34 semblent être les protéines structurales des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV dont la présence a été la plus marquée lors du fractionnement des protéines sur gel de polyacrylamide.

Si l'on compare le contenu protéique de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV avec celui des nucléocapsides cité dans la littérature, les protéines de 6,9 kDa et de 10 kDa n'ont pas été observées clairement lors du fractionnement sur gel de polyacrylamide des protéines totales de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV. Il est tout même possible que les protéines p6.9 et p10 soient présentes sur le gel de polyacrylamide dans la traînée de protéines observée sous la protéine de 17 kDa. Cependant, la présence de cette traînée de protéines rend pratiquement impossible l'observation des protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 17 kDa. Il n'est donc pas possible de distinguer les différentes protéines individuellement. Il est également possible que la quantité de protéines totales déposée sur le gel ait été trop élevée et que le fractionnement effectué par la suite n'ait pas permis de bien visualiser les protéines séparément particulièrement les protéines de faibles poids moléculaires. Les protéines de 24 kDa et de 29 kDa précédemment citées dans la littérature ont été observées chez le

ChfuGV (Wolgamot *et al.*, 1993; Bah *et al.*, 1997). Cependant, la protéine de la matrice (la granuline, 29 kDa) citée comme étant la protéine majeure du corps d'inclusion n'est pas majoritaire dans cette étude-ci. Le gène de la granuline est sous la régulation d'un promoteur fort qui a pour effet de permettre une très forte expression de ce gène et donc une production très importante de sa protéine (Tanada et Kaya 1993). Étant donné que nous avons comme but d'étudier les gènes codant pour deux protéines associées aux nucléocapsides enveloppées, il s'est avéré important que la granuline et les protéines associées au corps d'inclusion soient absentes ou présentes qu'en très faible quantité afin de ne pas altérer la migration des protéines des nucléocapsides enveloppées ou de masquer la présence des protéines d'intérêts lors du fractionnement des protéines sur gel de polyacrylamide. Ainsi, le traitement au carbonate de sodium subi par les granules du ChfuGV a permis la dissolution de la matrice protéique (la granuline). Les nucléocapsides enveloppées du ChfuGV ont été libérées par cette dissolution. La présence sur le gel de polyacrylamide de la granuline, malgré le traitement des granules au carbonate de sodium provient probablement d'une dissolution incomplète de la matrice protéique. Parmi les protéines retrouvées dans la nucléocapside enveloppée du ChfuGV, la protéine de 34 kDa identifiée sur le gel de polyacrylamide est celle dont la présence semble être la plus abondante. Bien que la protéine de 34 kDa ait fait l'objet de peu d'étude, deux protéines homologues de 34 kDa ont été identifiées soit l'ORF891 du ChfuGV et le gène Hz-1V du granulovirus de *Heliothis zea*. Ces deux gènes codant pour des protéines de 34 kDa ont été partiellement caractérisés mais ne semblent pas avoir jusqu'à ce jour de fonctions connues (Guttieri et Burand, 1996; Bah *et al.*, 1999). De plus, dans le cas de la présente étude, il est possible que les conditions de migration sur gel de polyacrylamide utilisées lors de cette analyse, dénaturantes réductrices, aient provoquées une dénaturation et une réduction importante des ponts disulfures de certaines protéines tel que pour la p34 du ChfuGV de sorte que son poids moléculaire réel ait pu être altéré. La protéine de 34 kDa observée peut donc possiblement avoir un poids moléculaire différent de celui observé d'où une unique concordance avec les poids moléculaires des deux protéines citées dans la littérature. La protéine p39 des baculovirus citée dans la littérature comme la protéine majeure des nucléocapsides enveloppées a été observée également à 39 kDa lors de l'analyse des protéines de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV (Pearson *et al.*, 1988;

Thiem et Miller, 1989; Russell *et al.*, 1991). Cependant, cette protéine n'a pas été observée de façon majoritaire. Il est possible encore une fois que les conditions dénaturantes réductrices utilisées lors de l'analyse sur gel aient provoquées une dénaturation importante d'une certaine quantité seulement de cette protéine contenue sur le gel et que la protéine de 39 kDa observée ne soit qu'une portion de la quantité totale de protéines p39 contenue dans l'échantillon déposée sur le gel qui serait demeurée intacte. En ce qui concerne les protéines de 104 kDa (protéine VEF), 64 kDa, 74 kDa et 87 kDa (Derksen et Granados, 1988; Blissard et Rohrmann, 1989; Kusio *et al.*, 1989; Lu et Carstens, 1991), ces dernières n'ont pu être observées dû possiblement au traitement de carbonate de sodium subi par les granules qui a permis d'éliminer le corps d'inclusion, les protéines associées au corps d'inclusion ainsi que les protéines de l'enveloppe des virions inclus. La protéine de 45 kDa observée chez le ChfuGV lors de l'analyse sur gel de polyacrylamide semble avoir le même poids moléculaire qu'une protéine connue mais peu documentée dans la littérature. En effet, un homologue protéique a été citée par l'équipe de Lu et de ses collaborateurs (1996). Ils mentionnent qu'il existe chez AcMNPV une protéine dont le poids moléculaire est de 45 kDa et qui semble être essentielle pour la réplication virale dans les cellules en culture (Lu *et al.*, 1996). Une protéine ayant un poids moléculaire similaire et partageant des caractéristiques communes à celle d'AcMNPV mais dont la fonction demeure encore inconnue à ce jour a également été observée chez OpMNPV (Lu *et al.*, 1996).

4.3 Caractérisation moléculaire du gène codant pour la protéine p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

Dans un premier temps, il n'a pas été possible d'effectuer le séquençage de la région amino-terminale de la protéine de 34 kDa du ChfuGV (la p34) par la technique de dégradation d'Edman en phase liquide. Cette technique est très sensible et n'a possiblement pas fonctionnée suite au blocage de la région amino-terminale de la p34 à analyser par la présence des radicaux libres et ce malgré l'utilisation de l'acide thioglycolique lors du transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose. Nous avons eu recours à deux techniques alternatives, les digestions tryptiques internes et

l'analyse par HPLC. À l'aide de ces deux techniques et par le biais du séquençage partiel de la p34 du ChfuGV, nous avons obtenu les séquences de 5 peptides différents. C'est à partir de la séquence d'un de ces peptides, ELSNYHIFQGVTDVFRND, plus spécifiquement de la séquence peptidique IFQGV, que nous avons conçu les amorces oligonucléotidiques dégénérées qui nous ont permis d'amplifier le gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV. En effet, uniquement le peptide IFQGV a démontré un pourcentage d'identité de 100% avec une portion d'une séquence peptidique répertoriée dans Genbank, soit celle de la p39 de la nucléocapside enveloppée du XnGV.

L'amplification du gène codant pour une portion de la protéine de 34 kDa du ChfuGV (317 pb) à l'aide des amorces oligonucléotidiques que nous avons conçues, suggérerait la présence possible du gène codant pour la p34 chez le ChfuGV. Dans un premier temps, il a été possible de croire que la p34 du ChfuGV observée lors de cette analyse puisse être la même protéine que la p39 de la nucléocapside enveloppée du XnGV dû à l'identité observée entre le court peptide IFQGV et une portion de la séquence aminée de la p39 du XnGV. Les conditions dénaturantes réductrices utilisées lors de l'analyse sur gel de polyacrylamide des protéines des nucléocapsides enveloppées, ont pu causer la perte de la conformation de la protéine de 39 kDa, la p39 citée dans la littérature, en provoquant une réduction de ses ponts disulfures (-S-S-) en deux groupements sulfhydryles (-SH) (Lodish *et al.*, 1999). La structure tertiaire de la p39 a pu être altérée par les conditions d'étude utilisées. Il est donc possible que la résultante de cette altération explique que le poids moléculaire de la p39 citée dans la littérature ait pu diminuer et passer de 39 kDa à 34 kDa lors de cette analyse. Cependant, l'alignement de la séquence nucléotidique partielle obtenue de 317 pb du gène codant pour une portion de la protéine p34 du ChfuGV avec d'autres séquences de protéines p39 de nucléocapsides enveloppées d'autres baculovirus répertoriées dans la littérature n'a pas permis d'observer d'homologie concluante. L'observation de cette absence d'homologie n'a donc pas permis de renforcer le fait que le ChfuGV puisse posséder un gène codant pour une portion de la protéine de 34 kDa similaire ou identique au gène codant pour la p39 de la nucléocapside enveloppée citée dans la littérature. Des analyses plus approfondies devront

être effectuées afin de déterminer la séquence complète du gène de la p34 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV et la nature exacte de la protéine de 34 kDa.

La séquence de 317 nucléotides correspondant du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV a révélé un contenu en nucléotides G/C évalué à 48%. Ce pourcentage est plus faible que le pourcentage cité dans la littérature. En effet, selon la littérature, les protéines des baculovirus sont codées par des gènes ayant des contenus élevés en nucléotides G/C (Tanada et Hess, 1991). Cependant, seulement une portion de la séquence du gène codant pour la p34 du ChfuGV a été amplifiée et séquencée. Puisque aucune homologie concluante n'a été observée avec aucune séquence répertoriée, il est alors impossible de tirer une conclusion définitive concernant le contenu en nucléotides G/C de cette séquence. La séquence complète de ce gène est nécessaire afin de déterminer le contenu nucléotidique G/C exacte afin qu'il soit possible par la suite de le comparer avec les pourcentages de nucléotides G/C des séquences nucléotidiques des gènes baculoviraux cités dans la littérature.

La déduction de la séquence aminée à partir de la séquence nucléotidique de 317 pb du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV, a permis d'obtenir un cadre de lecture ouvert de 106 acides aminés. Deux cystéines positionnées temporairement aux acides aminés 4 et 13 ont été identifiées. Tel qu'observé dans les séquences de différentes protéines des baculovirus répertoriées dans la littérature, ces cystéines peuvent entrer dans la formation de ponts disulfures. Ces ponts sont importants pour la structure et la fonction de la protéine (Theilmann *et al.*, 1996).

Il a également été possible d'observer que le contenu en acides aminés hydrophobes de cette séquence a été évalué à 57,5%. Les acides aminés hydrophobes ne se mélangent pas à l'eau et forment des complexes de gouttelettes huileuses non miscibles avec l'eau. C'est pourquoi ces acides aminés ont tendance à se compacter vers l'intérieur de la protéine de sorte qu'ils soient éloignés de l'environnement aqueux. La présence d'un fort pourcentage d'acides aminés hydrophobes dans une protéine peut indiquer que cette protéine soit possiblement membranaire (Pelmont, 1993). Puisque seulement une

portion de la séquence aminée de la p34 est disponible, il nous est encore une fois impossible d'affirmer que cette protéine malgré l'observation du contenu élevé en acides aminés hydrophobes de sa séquence, est de nature hydrophobe donc possiblement une protéine membranaire. Une fois de plus, la séquence complète d'acides aminés est nécessaire afin de déterminer avec exactitude la nature réelle de cette protéine.

Lors de l'extraction de l'ADN du ChfuGV, la présence de l'ADN larvaire peut être une source de contamination importante. Il s'avère donc très important de vérifier que le gène ciblé, celui codant pour une portion de la p34, appartient réellement à l'ADN du ChfuGV plutôt qu'à l'ADN larvaire. L'extraction d'ARN total provenant d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV couplée à l'amplification du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV par RT-PCR ont permis de déterminer la provenance exacte du gène amplifié. En effet, l'amplification par RT-PCR du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV a permis d'observer un amplicon que dans le cas de l'utilisation de l'ADNc provenant d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV. Dans le cas de l'utilisation de l'ADNc provenant de la larve de *C. fumiferana* saine, aucun amplicon n'a été observé. Il est donc possible de conclure que le gène de 317 pb codant pour une portion de la p34 obtenu lors de cette étude a été isolé et amplifié uniquement à partir du ChfuGV.

4.4 Caractérisation du gène codant pour une portion de la protéine p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV

Le séquençage en acides aminés de courtes régions internes de la protéine de 39 kDa, la p39 du ChfuGV, par les techniques de dégradation d'Edman en phase liquide et de spectrophotométrie de masse n'a pas permis d'obtenir de séquences aminées. Donc, une seconde stratégie mise au point pour amplifier le gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV. Cette stratégie a consisté à concevoir des amorces oligonucléotidiques à partir de régions homologues identifiées entre les séquences de toutes les p39 des nucléocapsides enveloppées des différents baculovirus (GV et NPV) répertoriées dans la banque de données informatiques GenBank. L'amplification du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV à l'aide des amorces oligonucléotidiques dégénérées a

démontré la présence du gène codant pour la p39 chez le ChfuGV. Les analyses de la séquence nucléotidique de l'amplicon ont révélé la présence d'un fragment d'ADN de 570 pb ayant un contenu en nucléotides G/C évalué à 40,5%. Ce pourcentage est encore une fois, plus faible que le pourcentage cité dans la littérature. Comme il a été cité auparavant, les différentes protéines des baculovirus sont codées par des gènes ayant des contenus plus élevés en nucléotides G/C par rapport aux nucléotides A/T (Tanada et Hess, 1991). L'ADN ayant un contenu élevé en bases G/C a une structure plus stable dû au nombre plus élevé de ponts hydrogènes (3 ponts) (liens non covalents) existants entre ces bases (Watson et Crick, 1953). Cependant, puisque seule une partie de la séquence du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV a été amplifiée et séquencée, il est impossible de tirer une conclusion définitive concernant le contenu nucléotidique G/C de la séquence obtenue. La séquence nucléotidique complète de ce gène est donc nécessaire afin déterminer le contenu exact en nucléotides G/C afin qu'il soit possible par la suite de le comparer avec les pourcentages de nucléotides G/C des séquences nucléotidiques codant pour les p39 des différents baculovirus cités dans la littérature.

Par la suite, un cadre de lecture ouvert totalisant 186 acides aminés a été déduit à partir de la séquence nucléotidique amplifiée correspondant au gène codant pour une partie de la p39 du ChfuGV. Tel que cité dans la littérature, la composition en acides aminés d'une protéine donne des renseignements importants quant au rôle et à la fonction que peut jouer cette protéine au sein d'un virus. La séquence aminée obtenue correspondant à une portion de la p39 du ChfuGV contenait majoritairement des acides aminés hydrophobes (50,5%). Les acides aminés hydrophobes sont composés d'un groupement non polaire non miscible avec l'eau qui tendent à former des agrégats insolubles (Pelmont, 1993; Lodish *et al.*, 1999). Les protéines de nature hydrophobes sont souvent associées aux membranes cellulaires. Donc, sur la base des ces informations, la présence d'un fort pourcentage d'acides aminés hydrophobes dans la séquence aminée obtenue peut suggérer que la p39 isolée du ChfuGV puisse possiblement être une protéine membranaire (Pelmont, 1993). Mais, puisque encore une fois, seule une portion de la séquence de la p39 du ChfuGV est disponible, il nous est impossible d'affirmer que cette protéine est de nature hydrophobe malgré le contenu élevé en acides aminés hydrophobes

de la séquence aminée obtenue. Une fois de plus, la séquence complète d'acides aminés est nécessaire afin de déterminer avec précision la nature, la structure et la fonction exactes de cette protéine.

La séquence aminée de la p39 obtenue a été comparée avec les séquences aminées de toutes les protéines des différents baculovirus répertoriés dans la littérature. Premièrement, malgré que le poids moléculaire de la protéine du ChfuGV ciblée et identifiée dans cette étude soit de 39 kDa et deuxièmement, que les amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification par PCR aient été élaborées à partir des régions homologues et communes entre les séquences des différentes p39 des nucléocapsides enveloppées répertoriées, aucune homologie concluante n'a été observée avec les séquences aminées de ces différentes p39. La séquence aminée obtenue a plutôt démontré un fort pourcentage d'homologie, 88%, avec la protéine d'enveloppe ODVP-6E d'un autre granulovirus, le CpGV. Lors de la comparaison de la séquence aminée de la p39 du ChfuGV avec d'autres séquences aminées répertoriées, il est intéressant de noter que le plus haut pourcentage d'identité qui a été observé est avec la séquence aminée d'une protéine d'un second granulovirus. Cependant, aucune homologie concluante n'a été observée avec aucun autre granulovirus. Le ChfuGV et le CpGV sont deux virus faisant partie du même genre de baculovirus. Il est possible que le CpGV et le ChfuGV soient deux virus phylogéniquement très rapprochés ou que ces virus proviennent d'un ancêtre commun. Ceci pourrait donc expliquer l'observation d'une forte homologie entre leur protéine p39 qui en somme sont toutes les deux associées à la nucléocapside enveloppée des granulovirus. Si la séquence complète de la p39 du ChfuGV avait été complète, la possibilité d'un rapprochement phylogénique et d'un ancêtre commun entre ces deux virus à l'aide de la conception d'un arbre phylogénique généré à partir des séquences aminées complètes des protéines ODVP-6E des différents baculovirus répertoriés et de la p39 isolée du ChfuGV aurait pu être vérifiée.

Les expériences d'amplification du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV analysée se sont avérées difficiles puisqu'une seule paire d'amorces oligonucléotidiques a permis d'amplifier un fragment du gène recherché. Puisque des

identités de séquence ont été observées entre la séquence aminée de la p39 du ChfuGV et la séquence aminée de l'ODVP-6E du CpGV, la conception des amorces oligonucléotidiques utilisées a donc été effectuée à partir de la séquence aminée de la protéine ODVP-6E du CpGV. Les amorces qui n'ont pas réussies à s'apparier à l'ADN du ChfuGV lors de l'amplification par PCR n'étaient pas suffisamment homologues aux régions ciblées sur l'ADN du CpGV. La protéine ODVP-6E a une séquence nucléotidique riche en nucléotides A/T (Braunagel *et al.*, 1996). Il est donc possible que le contenu élevé en nucléotides A/T de la séquence nucléotidique de l'ODVP-6E amène des difficultés supplémentaires à l'amplification dû à la stabilité plus faible de la séquence du gène. En effet, les liens non covalents (ponts hydrogènes) entre les bases A/T sont au nombre de deux alors que les liens entre les bases C/G sont au nombre de trois. Une structure d'ADN contenant un pourcentage élevé de bases A/T peut avoir une structure plus instable qu'une structure riche en bases C/G (Watson et Crick, 1953).

La protéine de 39 kDa du ChfuGV que nous avons identifiée et appelée p39 ne semble donc pas être la p39 de la nucléocapside enveloppée citée dans la littérature mais plutôt une protéine d'enveloppe appelée l'ODVP-6E. Tel que cité dans la littérature, l'ODVP-6E du virus OpMNPV est une protéine structurale de 40,2 kDa associée à l'enveloppe des virions (Theilmann *et al.*, 1996). Cette protéine d'enveloppe est codée par un gène tardif et conservé qui a été caractérisé chez AcMNPV, CpGV et OpMNPV (Guarino et Summers, 1986; Crook *et al.*, 1993; Thielmann *et al.*, 1996). La protéine ODVP-6E est une composante structurale détectée dans la forme ODV des virions mais non détectée dans la forme BV (Theilmann *et al.*, 1996). La protéine ODVP-6E du CpGV présente un pourcentage d'identité de 46,8% avec la séquence aminée de la protéine ODVP-6E d'OpMNPV (Thielmann *et al.*, 1996). La séquence d'un gène homologue à celui codant pour l'ODVP-6E d'OpMNPV a également été déterminée chez AcMNPV. La protéine prédite chez AcMNPV est hautement plus homologue à celle d'OpMNPV (69,8%) qu'à celle du CpGV. La séquence aminée primaire de la protéine ODVP-6E démontre pour sa part, la présence d'un site conservé de glycosylation lié à une asparagine. De plus, la présence au sein de cette séquence d'un domaine conservé riche en cystéines (6 résidus cystéines) pourrait représenter une région qui serait requise pour

des liaisons intermoléculaires et intramoléculaires dues aux ponts disulfures. La conservation des résidus cystéines dans toutes les protéines ODVP-6E démontre leur importance dans le maintien de la structure et de la fonction de la protéine ODVP-6E. Selon la littérature, l'ODVP-6E contient deux régions hydrophobiques (Theilmann *et al.*, 1996). Comme les protéines à caractère hydrophobe entrent surtout dans la composition des structures membranaires, l'observation de l'homologie entre la protéine de 39 kDa isolée à partir du ChfuGV et la protéine d'enveloppe ODVP-6E vient appuyer la possibilité que la p39 des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV puisse être la protéine ODVP-6E de l'enveloppe des nucléocapsides citée dans la littérature. Cependant, puisque la séquence complète de la p39 du ChfuGV n'est pas disponible, il a été impossible d'identifier dans la séquence obtenue, le site conservé de la glycosylation lié à l'asparagine, le domaine riche en cystéines ainsi que les deux régions hydrophobiques.

Tel que cité lors de l'étude du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV, lorsque l'extraction d'ADN du ChfuGV a été effectuée, la présence de l'ADN larvaire peut être une source de contamination importante. Il s'est avéré très important encore une fois, de vérifier la provenance du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV afin de s'assurer que ce gène appartient à l'ADN viral plutôt qu'à l'ADN larvaire. Donc, afin de déterminer la provenance exacte du gène amplifié, nous avons utilisé les techniques d'extraction d'ARN total provenant d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV couplées à l'amplification par RT-PCR du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV. L'amplification par RT-PCR du gène de la p39 du ChfuGV a permis d'observer un amplicon que dans le cas de l'utilisation de l'ADN gabarit provenant d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV. Dans le cas contraire, aucun amplicon n'a été observé lors de l'utilisation de l'ADNc provenant de la larve de *C. fumiferana* saine. Finalement, il est donc possible de conclure que le fragment de gène de 570 pb codant pour une portion de la p39 du ChfuGV lors de cette étude a été isolé et amplifié uniquement à partir du ChfuGV.

Conclusion

La réalisation de ce projet de recherche est une contribution à l'avancement et à l'acquisition des connaissances sur la biologie moléculaire du ChfuGV. Ce projet de recherche a porté spécifiquement sur la caractérisation moléculaire de deux gènes codant pour les protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV.

Dans un premier temps, les résultats du séquençage par le biais des digestions tryptiques internes et de l'analyse par HPLC de cette protéine ont permis d'obtenir la séquence aminée de 5 peptides différents. Cependant, seul le peptide IFQGV a démontré un pourcentage d'identité de 100% avec une portion de la séquence aminée de la p39 de la nucléocapside enveloppée d'un autre granulovirus, le XnGV. Les amorces oligonucléotidiques dégénérées conçues à partir de cette séquence, nous ont permis d'amplifier 317 nucléotides du gène codant pour une portion de la p34 du ChfuGV. Le pourcentage de nucléotides G/C de cette séquence a été évalué à 48% et semble être plus faible que ceux des baculovirus cités dans la littérature (Tanada et Hess, 1991). Cependant, puisque seul un fragment du gène codant pour la protéine d'intérêt a été amplifié et séquencé, il a alors été impossible de tirer une conclusion définitive concernant le contenu nucléotidique G/C de cette séquence sans en avoir la séquence complète. Une séquence de 106 acides aminés a été déduite à partir de la séquence nucléotidique du gène obtenu et alignée avec les séquences aminées des différentes p39 d'autres baculovirus répertoriées dans la littérature. Il n'a pas été possible d'observer d'homologie concluante. L'observation de cette absence d'homologie n'a donc pas permis de renforcer le fait que le ChfuGV puisse posséder un gène codant pour une protéine de 34 kDa similaire ou identique au gène codant pour la p39 de la nucléocapside enveloppée des baculovirus cité dans la littérature. Des analyses plus approfondies devront être effectuées afin de déterminer la séquence complète du gène codant pour la protéine de 34 kDa de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV ainsi que la nature exacte de cette protéine. Différentes observations ont tout de même été effectuées dans la séquence aminée obtenue. En effet, la présence de deux cystéines pouvant entrer dans la formation de ponts disulfures a été observée. Le contenu en acides aminés hydrophobes de cette séquence est de 57,5%. Cependant, puisque seule une portion de la séquence de la p34 est disponible, il nous est impossible d'affirmer avec certitude que cette protéine

malgré le contenu élevé en acides aminés hydrophobes de la séquence aminée obtenue, soit de nature hydrophobe donc possiblement une protéine membranaire. Une fois encore, la séquence aminée complète est nécessaire afin de déterminer avec exactitude la nature de cette protéine. Il a été démontré par le biais d'une amplification par RT-PCR effectuée sur une extraction d'ARN total à partir d'une larve saine de *C. fumiferana* et d'une larve de *C. fumiferana* infectée par le ChfuGV, que le gène amplifié codant pour une portion de la p34 provenait de l'ADN du ChfuGV et non d'une contamination de l'ADN larvaire.

Dans un deuxième temps, l'amplification du gène codant pour une portion de la p39 du ChfuGV a été effectuée à l'aide d'amorces oligonucléotidiques conçues à partir de régions homologues identifiées entre les séquences répertoriées de toutes les p39 des nucléocapsides enveloppées des différents baculovirus. La séquence nucléotidique de l'amplicon de 570 pb obtenu a un contenu nucléotidique G/C qui a été évalué à 40,5%. L'obtention de cet amplicon lors de l'amplification par PCR a suggéré la présence possible chez le ChfuGV du gène codant pour la protéine p39 citée dans la littérature. Une séquence de 186 acides aminés a été déduite de la séquence nucléotidique et comparée aux séquences de toutes les protéines baculovirales répertoriées dans la banque de données GenBank. Un pourcentage d'homologie évalué à 88% a été observé avec une protéine d'enveloppe, l'ODVP-6E du CpGV. Aucune homologie n'a été observée entre la séquence aminée de la protéine p39 du ChfuGV et les séquences aminées des autres p39 baculovirales. La composition élevée en acides aminés hydrophobes (50,5%) de la séquence aminée obtenue de la protéine de 39 kDa isolée de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV ainsi que l'homologie élevée observée avec la protéine d'enveloppe ODVP-6E, indiquent la possibilité que la p39 isolée du ChfuGV soit une protéine d'enveloppe plutôt qu'une protéine associée directement à la nucléocapside. Nous avons également démontré dans ce cas-ci par le biais d'une amplification par RT-PCR effectuée sur une extraction d'ARN total à partir d'une larve saine de *C. fumiferana* et à partir d'une autre infectée par le ChfuGV, que le gène de la p39 a été isolé à partir de l'ADN du ChfuGV et non d'une contamination de l'ADN larvaire.

Étant donné le peu d'informations concernant la biologie moléculaire du ChfuGV et de ses protéines, nous avons eu recours à la technique du séquençage protéique interne afin d'obtenir dans un premier temps un minimum d'informations sur les protéines à l'étude et dans un deuxième temps sur les gènes codant pour ces deux protéines. L'approche utilisée afin d'effectuer la caractérisation moléculaire des protéines p34 et p39 de la nucléocapside enveloppée du ChfuGV s'est avérée une avenue ardue pour différentes raisons. Premièrement, puisque très peu d'études ont été effectuées chez le ChfuGV dû à l'absence de lignée cellulaire permissive à la réplication virale, nous avons dû considérer dans un premier temps, uniquement le poids moléculaire de ces deux protéines d'intérêts (34 kDa et 39 kDa) afin d'amorcer le projet de la caractérisation moléculaire de ces deux nouvelles protéines retrouvées chez le ChfuGV. Deuxièmement, nous avons tenté d'identifier des similitudes, autres que les poids moléculaires des deux protéines à l'étude, avec les différentes protéines citées dans la littérature afin d'élaborer différentes stratégies de travail. Les observations d'absence d'homologie avec des protéines connues ont rendu le travail plus difficile. Troisièmement, le séquençage protéique est une technique fortement sensible aux différentes contaminations tel que la présence possible d'autres protéines. Même en faible concentration, ces contaminations donnent parfois des résultats ambigus difficiles à interpréter. Finalement, l'élaboration d'amorces oligonucléotidiques dégénérées à partir des séquences aminées est compliquée dû à la dégénération du code génétique. L'amplification par PCR des gènes codant pour les protéines p34 et p39 du ChfuGV a été difficile dû à l'utilisation de ces amorces dégénérées. Ces amorces n'étant pas très spécifiques, elles ne permettent donc pas d'amplifier facilement les fragments d'ADN ciblés. La présence de fragments d'ADN non spécifiques, tel qu'il en a été le cas lors de cette étude, devient donc possible et cela rend l'analyse des résultats ardue. Malgré l'impossibilité d'observer des similitudes entre la p39 du ChfuGV et celles citées dans la littérature et le peu d'informations concernant une protéine de 34 kDa telle que la p34 du ChfuGV, nous avons identifié et amorcé partiellement la caractérisation moléculaire de deux gènes codant pour deux différentes protéines associées aux nucléocapsides enveloppées du ChfuGV. Des analyses supplémentaires et de nouvelles stratégies de travail devront être effectuées afin de

compléter le séquençage et l'analyse des gènes codant pour les protéines p34 et p39 du ChfuGV.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Claude Guertin, pour m'avoir donné la possibilité de travailler au sein de son équipe de recherche, mon co-directeur, Dr. Abderazzak Merzouki pour son aide et tous les bons conseils techniques, l'INRS-Institut Armand Frappier pour le support financier ainsi que Dr. Luc Gagnon pour sa générosité et son aide très précieux.

J'aimerais également remercier pour leurs amitiés, tous les membres du laboratoire avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

Finalement, j'aimerais remercier tout particulièrement ma mère, ma sœur, Greg et mes amis pour leur soutien, leurs encouragements et leur amour.

Liste de références

- Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Balinsky, C.A., Moser, B.A., Becnel, J.J. 2001. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *Journal of Virology* **75**(22): 11157-11165.
- Ahrens, C.H., Rohrmann, G.F. 1995. Identification of essential *trans*-acting regions required for DNA replication of the *Orgyia pseudosugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: *lef-1* is an essential replication gene. *Virology* **207**: 417-428.
- Akiyoshi, D., Chakerian, R., Rohrmann, G.F., Nesson, M.H., Beaudreau, G.S. 1985. Cloning and DNA sequencing of the granulin gene from the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *Virology* **141**: 328-332.
- Alain, R., Berthiaume, L., Trudel, M. 1989. Microscopie électronique. Dans: P. Payment et M. Trudel (éd), Manuel de Techniques Virologiques. Presses de l'Université du Québec. Sillery. 107-119.
- Anderson, D.K., Bulla, L.A.Jr., Consigli, R.A. 1981. Agglutination of vertebrate erythrocytes by the granulosis virus of *Plodia interpunctella*. *Virology* **113**: 242-253.
- Bah, A., Bergeron, J., Arella, M., Lucarotti, C.J., Guertin, C. 1997. Identification and sequence analyses of the granulin gene of *Choristoneura fumiferana* granulovirus. *Archives of Virology* **142**(8): 1577-1584.
- Bah, A., Lucarotti, C.J., Arella, M., Guertin, C. 1999. *Choristoneura fumiferana* granulovirus : sequence analysis and 5' characterization of ORF891. *Archives of Virology* **144**(4): 737-746.
- Base Nationale de Données sur les Forêts (BNDF). 1996. Abrégé de statistiques forestières canadiennes. Conseil canadien des ministres des forêts. Ottawa. 234.
- Beaton, S.D., Filshie, B.K. 1976. Comparative ultrastructural studies of insect granulosis and nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of General Virology* **31**: 151-161.
- Bergold, G.H. 1963. The molecular structure of some insect virus inclusion bodies. *Journal of Ultrastructure Research* **8**: 360-378.
- Bianchi, F.J., Snoeiijing, I., Van Der Werf, W., Mans, R.M., Smits, P.H., Vlak, J.M. 2000. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: *noctuidae*). *Journal of Invertebrate Pathology* **75**(1): 28-35.
- Bideshi, D.K., Hice, R.H., Ge, B., Federeci, B.A. 1998. Molecular characterization and expression of the *Trichoplusia ni* granulovirus helicase gene. *Journal of General Virology* **79**: 1309-1319.

- Bjornson, R.M., Rohrmann, G.F. 1992. Nucleotide sequence of the p39-capsid gene region of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **73**: 1505-1508.
- Blais, J.R. 1983. Trends in the frequency, extend, and severity of spruce budworm outbreak in eastern Canada. *Canada Journal of Forest Research* **13**: 539-547.
- Blais, J.R. 1985. The ecology of the eastern spruce : a review and discussion. Dans: C.J., Sanders, R.W. Stanrk, E.J. Mullins et J. Murphy (éd.). *Recent Advances in Spruce Budworms Research*. Ottawa. 49-59.
- Blissard, G.W., Rohrmann, G.F. 1989. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **170**: 537-555.
- Blissard, G.W., Rohrmann, G.F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology* **35**: 127-155.
- Blissard, G.W., Quant-Russell, R.L., Rohrmann, G.F., Beaudreau, G.S. 1989. Nucleotide sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gene encoding p39, a major structural protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **168**: 354-362.
- Bonneau, G., Bordeleau, C., Boulet, B., Chabot, M., Davidson, J.G., Garneau, J., Moranville, D., Therrien, P. 1999. La tordeuse des bourgeons de l'épinette: approche de gestion intégrée des épidémies. Ministère des Ressources naturelles. Québec. RN99-3072
- Bradford, M.B., Blissard, G.W., Rohrmann, G.F. 1990. Characterization of the infection cycle of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus in *Lymantria dispar* cells. *Journal of General Virology* **71**: 2841-2846.
- Braunagel, S.C., Elton, D.M., Ma, H., Summers, M.D. 1996. Identification and analysis of an *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus structural protein of the occlusion derived virus envelope ODV-E56. *Virology* **217**(1): 97-110.
- Burgess, S. 1977. Molecular weights of lepidopteran baculovirus DNA's: derivatization by electron microscopy. *Journal of General Virology* **37**: 501-510.
- Burley, S.K., Miller, A., Harrap, K.A., Kelly, D.C. 1982. Structure of the Baculovirus nucleocapsid. *Virology* **120**: 433-440.
- Charlton, C.A., Volkman, L.E. 1993. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf2* cells induces actin cable formation. *Virology* **197**: 245-254.

- Clem, R.J., Fechheimer, M., Miller, L.K. 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* **254**: 1388-1390.
- Comptois, B. 1988. *Notions d'entomologie forestière*. Modulo Éditeur. Mont-Royal. 214.
- Consigli, R.A., Russel, D.I., Wilson, M.E. 1986. The Biochemistry and Molecular Biology of the Granulosis Virus that infects *Plodia interpunctella*. *Current Topics in Microbiology DNA Immunology* **131**: 69-99.
- Corsaro, B.G., Gijzen, M., Wang, P., Granados, R.R. 1993. Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis. Dans: N.E. Beckage, S.N. Thompson et B.A. Federici (éd.), *Parasites and Pathogens of Insectes* **2**: 127-145.
- Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., Stemmer, W.P. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology* **14**: 315-319.
- Crook, N.E., Clem, R.J., Miller, L.K. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with zinc finger-like motif. *Journal of Virology* **67**: 2168-2174
- Crook, N.E., James, J.D., Smith, I.R.L., Winstanley, D. 1997. Comprehensive physical map of the *Cydia pomonella* granulovirus genome and sequence analysis of the granulin gene region. *Journal of General Virology* **78**: 965-974.
- Cunningham, J.C. 1985. Biorationals for control of spruce budworms. Dans: Sanders, C.J., R.W. Stark, E.J. Mullins et J. Murphy (éd). *Recent Advances in Spruce Budworms Research*. Ottawa: Canusa. 320-349.
- Derksen, A.C.G., Granados, R.R. 1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology* **167**: 242 .
- Dwyer, K.G., Granados, R.R. 1988. Mapping *Pieris rapae* granulosis virus transcripts and their *in vitro* translation products. *Journal of Virology* **62**: 1535-1542.
- Faulkner, P. 1981. Baculovirus. Dans: Davidson E. W. (éd.). *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases* 5-38.
- Federici, B.A. 1993. Viral pathobiology in relation to insect control. Dans: N.E. Beckage, S.N. Thompson et B.A. Federici (éd.), *Parasites DNA Pathogens of Insects* **2**: 1-101.
- Forté, A., Cabana, J., Guertin, C. 1999. Pathogenicity of a granulovirus towards *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: *Tortricidae*). *The Canadian Entomologist* **131**: 725-727.

- Funk, C.J., Consigli, R.A. 1992. Evidence for zinc binding by two structural proteins of *Plodia interpunctella* granulosis virus. *Journal of Virology* **66**: 3168-3171.
- Gombart, A. F., Pearson, M.N., Rohrmann, G.F., Gbeaudreau, G.S. 1989. A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: Genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology* **169**: 182-193.
- Granados, R.R. 1978. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a Baculovirus. *Virology* **90**: 170-174.
- Granados, R.R. 1980. Infectivity and mode of action of Baculoviruses. *Biotechnology DNA Bioengineering* **22**: 1377-1405.
- Gray, D., Régnière, J., Boulet, B. 1998. Prédiction de la défoliation par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec. Centre de foresterie des Laurentides Volume 7. Ministère des Ressources naturelles du Québec.
- Grisdale, D.G., Wilson, G.G. 1988. Guidelines for rearing spruce budworm received from the Forest Pest Management Institute. Sault-Sainte-Marie. 10.
- Guarino, L.A., Summers, M.D. 1986. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *Journal of Virology* **57**: 563-571.
- Guertin, C. 1995. Étude du potentiel insecticide de certains virus, du *Bacillus thuringiensis* et de certaines substances phagostimulantes contre les insectes défoliants de la forêt. Ministère des ressources naturelles du Québec. Rapport sur l'avancement des travaux. Projet 10240S.
- Guttieri, M.C., Burand, J.P. Nucleotide sequence, temporal expression, and transcriptional mapping of the p34 late gene of the Hz-1 insect virus. *Virology* **223**(2): 370-375.
- Harvey, G.T. 1985. The taxonomy of the coniferophagous *Choristoneura* (Lepidoptera: *Tortricidae*). Dans: Sanders, C.J., R.W. Stark, E.J. Mullins et J. Murphy (éd.), *Recent Advances in Spruce Budworms Research* 16-48.
- Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S.I., Goto, C., Maeda, S. 1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology* **262**: 277-297.
- Heffron, K.L, Oomens, A.G., Monsma, S.A., Finnerty, C.M., Blissard, G.W. 1999. Host cell receptor binding by Baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology* **258**: 455-468.
- Heldens, J.G., Liu, Y., Zuidema, D., Goldbach, R.W., Vlak, J.M. 1998. A highly conserved genomic region in baculoviruses: sequence analysis of an 11.3 kpb

DNA fragment (46.5-55.1 m.u.) of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Research* **55**(2): 187-198.

Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Dreyer, W.J. 1981. A gas-liquid solid phase peptide DNA protein sequencer. *The Journal of Biological Chemistry* **256**: 7990-7997.

Hill, J.E., Kuzio, J., Wilson, J.A., MacKinnon, E.A., Faulkner, P. 1993. Nucleotide sequence of the p74 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Biochimica Biophysica Acta* **1172**(1-2): 187-189.

Hodgeman, T.C. 1988. A new superfamily of replicative proteins. *Nature* **333**: 22-23.

ICTV, (International Committee on Taxonomy of Viruses.). 1998. Family baculoviridae. Adresse HTTP:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_bacul.htm

Kelly, D.C. 1982. Baculovirus replication, Review article. *Journal of General Virology* **63**: 1-13.

Kettela, E.G. 1995. Élaboration de stratégies de lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) au stade adulte par pulvérisation d'insecticide. Dans: Armstrong J.A. et W.G.H. Ives (éd.), *Insectes forestiers ravageurs au Canada*. Ressources Naturelles Canada 113-117.

Kool, M., Ahrens, C.H., Vlak, J.M., Rohrmann, G.F. 1995. Replication of baculovirus DNA, review article. *Journal of General Virology* **76**: 2103-2118.

Kusio, J.D., Rohel, Z., Curry, C.J., Krebs, A., Carstens, E.B., Faulkner, P. 1984. Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **139**: 414-418.

Lachance, D. 1995. Insectes forestiers ravageurs dans la Région du Québec. Dans: Armstrong J.A. et W.G.H. Ives (éd.), *Insectes forestiers ravageurs du Canada*. Ressources Naturelles Canada 27-39.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lanier, L.M., Slack, M.J., Volkman, L.E. 1996. Actin binding DNA proteolysis by Baculovirus AcMNPV: The role of virion-associated V-CATH. *Virology* **216**: 380-388.

Lanier, L.M., Volkman, L.E. 1998. Actin binding DNA nucleation by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Virology* **243**: 167-177.

- Léry, X., Giannotti, J., Taha, A., Ravalec, M., Abol-Ela, S. 1997a. Multiplication of granulosis virus isolated from the potato tuber moth in a new established cell line of *Phthorimaea operculella*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal Subscriptions* **33**: 640-646.
- Léry, X., Khamiss, O., Nour-el-Din, A., Giannotti, J., Abol-Ela, S. 1997b. Multiplication of *Spodoptera littoralis* granulosis virus in a cell line established from *Phthorimaea operculella*. *Acta Virologica* **41**: 169-174.
- Li, X., Pang, A., Lauzon, H.A., Sohi, S.S., Arif, B.M. 1997. The gene encoding the capsid protein p82 of the *Choristoneura fumiferana* multicapsid nucleopolyhedrovirus: sequencing, transcription and characterization by immunoblot analysis. *Journal of General Virology* **78**(10): 2665-2673.
- Li, L., Harwood, S.H., Rohrmann, G.F. 1998. Identification of additional genes that influence baculovirus late gene expression. *Virology* **255**: 9-19.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 1999. *Molecular Cell Biology* (4 eds) 63.
- Lu, A., Carstens, E.B. 1991. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **181**: 336-347.
- Lu, A., Carstens, E.B. 1992. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p80 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: homologue of the *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus capsid-associated gene. *Virology* **190**(1): 201-209.
- Lu, M., Iatrou, K. 1996. The gene encoding the p39 DNA the CG30 proteins of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **77**: 3135-3143.
- Lu, A., Craig, A., Casselman, R., Carstens, E.B. 1996. Nucleotide sequence, insertional mutagenesis and transcriptional mapping of a conserved region of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (map unit 64,8-66,9). *Canadian Journal of Microbiology* **12**: 1267-1273.
- Mattson, W.J., Simmons, G.A., Witter, J.A. 1988. The spruce budworm in eastern North America. Dans: Berryman, A.A (éd.), *Dynamics of forest insect populations* 309-330.
- McGaughney, V.H. 1975. A granulosis virus for indian meal moth control in stored wheat and corn. *Journal of Economic Entomology* **68**: 346-348.
- McGaughney, V.H., Beeman, R.W. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: *Pyraliae*). *Journal of Economic Entomology* **81**: 28-33.

- Morris, R.F. 1963. The development of predictive equations for the spruce budworm based on key-factor analysis. Dans: Morris R. F. (éd.). The dynamics of epidemic spruce budworm populations. *Memoirs of Entomological Society of Canada* **31**: 116-129.
- Muller, R., Pearson, M.N., Russell, R.L., Rohrmann, G.F. 1990. A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*: genetic location, sequence, transcriptional mapping and immunocytochemical characterization. *Virology* **176**(1): 133-144.
- Nigam, P.C. 1995. Tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) réaction des larves aux insecticides. Dans: Armstrong J.A. et W.G.H. Ives (éd.), *Insectes forestiers ravageurs au Canada*. Ressources Naturelles Canada 107-112.
- Olszewski, J., Miller, L.K. 1997. Identification and characterization of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation. *Journal of Virology* **71**: 5040-5050.
- Olszewski, J., Miller, L.K. 1997. A role for Baculovirus GP41 in budded virus production. *Virology* **233**(2): 292-301.
- Oppenheimer, D.I., Volkman, L.E. 1995. Proteolysis of p6.9 induced by cytochalasin D in *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus-infected cells. *Virology* **207**(1): 1-11.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* **245**: 1110-1112.
- Pearson, M.N., Quant-Russell, R.L., Rohrmann, G.F., Beaudreau, G.S. 1988. P39, a major baculovirus structure protein: immunocytochemical characterization DNA genetic location. *Virology* **167**: 407-413.
- Pelmont, J. 1993. ENZYME. Collection Grenoble France. Presse Universitaires de Grenoble 12-14 et 55-75.
- Régnière, J., Lysyk, T.J. 1995. Dynamique des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*). Dans : Armstrong J.A. et W.G.H. Ives (éd.), *Insectes forestiers ravageurs au Canada*. Ressources Naturelles Canada 95-106.
- Rohrmann, G.F. 1986. Polyhedrin structure. *Journal of General Virology* **67**: 1499-1513.
- Rohrmann, G.F. 1992. Review article: Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology* **73**: 749-761.
- Royama, T. 1984. Population dynamics of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana*. *Ecological Monographs* **54**: 429-462.

- Russell, R.L.Q., Pearson, M.N., Rohrmann, G.F. 1991. Immunoelectron microscopic examination of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cell: time course DNA localization of major polyhedron-associated proteins. *Journal of General Virology* **72**: 275-283.
- Russell, R.L., Rohrmann, G.F. 1993. A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occludes baculovirus virions. *Virology* **195**(2): 532-540.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, F. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **74**: 5463-5467.
- Service canadien des forêts (SCF). 1998. Lutte contre les ravageurs : biotechnologie au SCF. Adresse HTTP: [Http://nrca.gc.ca/cfs/proj/sci-tech/prog/biotech/pestf.html](http://nrca.gc.ca/cfs/proj/sci-tech/prog/biotech/pestf.html)
- Shapiro, M., Ignoffo, C.M. 1970. Hemmagglutination by a nucleopolyhedrosis virus of the cotton bollworm, *Heliothis zea*. *Virology* **41**: 577-579.
- Summers, M.D. 1971. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. *Journal of Ultrastructure Research* **35**: 606-625.
- Summers, M.D., Smith, G.E. 1975. *Trichoplusia ni* granulosis virus granulin: a phenol-soluble, phosphorylated protein. *Journal of Virology* **16**: 1108.
- Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N., Johnson, M.W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: *Plutellidae*). *Journal of Economic Entomology* **83**: 1671-1676.
- Tabashnik, B.E. 1992. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamond moth (Lepidoptera: *Plutellidae*), tobacco budworm (Lepidoptera: *Noctuidae*), and Colorado potato beetle (Coleoptera: *Chrysomelidae*). *Journal of Economic Entomology* **85**: 1551-1559.
- Tanada, Y., Hess, R.T. 1984. The cytopathology of Baculovirus infections in insects. *Insect Ultrastructure* **2**: 517-553.
- Tanada, Y., Hess, R.T. 1991. *Baculoviridae*. Granulosis viruses. Dans: J.R. Adams & J.R. Bonami (éd.), *Atlas of Invertebrate Viruses*. CRC Press Inc. Boca Raton 227-257.
- Tanada, Y., Kaya, H.R. 1993. DNA viral infections: *Baculoviridae*. Dans: *Insect Pathology*. Academic Press 171-216.

- Talerico, R.L. 1984. General biology of the spruce budworm and its hosts. Dans: Schmitt, D.M., D.G. Grimble et J.L. Searcy (éd.), *Managing the spruce budworm in Eastern North America* 1-10.
- Theilmann, D.A., Chantler, J.K., Stewart, S., Flipsen, H.T.M., Vlak, J.M., Crook, N.E. 1996. Characterization of a highly conserved baculovirus structural protein that is specific for occlusion derived virions. *Virology* **218**: 148-158.
- Thiem, S.M., Miller, L.K. 1989. Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **63**: 2008-2018.
- Tompkins, G.J. 1991. Purification of invertebrate viruses. Dans: Adams, J.R. et J.R. Bonami (éd.), *Atlas of Invertebrate Viruses* 31-40.
- Tweeten, K.A., Bulla, L.A., Consigli, R.A. 1980. Restriction enzyme analysis of the genome of *Plodia interpunctella* and *Pieris rapae* granulosis viruses. *Virology* **104**: 514-519.
- Van Loo, N.D., Fortunati, E., Ehlert, E., Rabelink, M., Grosveld, F., Scholt, B.J. 2001. Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *Journal of Virology* **75**: 961-970.
- Van Oers, M.M., Flipsen, J.T.M., Reusken, C.B.E.M., Vlak, J.M. 1994. Specificity of Baculovirus p10 functions. *Virology* **200**: 513-523.
- Van Oers, M.M., Hu, Z., Arif, B.M., Van Strien, E.A., Van Lent, J.W.M., Vlak, J.M. 1998. The single- nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria* encodes a p10 protein. *Journal of General Virology* **79**: 1553-1562.
- Vialard, J.E., Arif, B.M., Richardson, C.D. 1995. Introduction to the Molecular Biology of Baculoviruses. Dans: C.D Richardson (éd.), *Methods in Molecular Biology* **39**: 1-24.
- Volkman, L.E., Goldsmith, P.A., Hess, R.T., Faulkner, P. 1984. Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: identification of the target antigen. *Virology* **133**: 354-362.
- Wang, H., Chen, X., Wang, H., Arif, B.M., Vlak, J.M., Hu, Z. 2001. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a putative basic DNA-binding protein of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* **1**: 113-120.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**: 737.
- Wilson, J.A., Hill, J.E., Kuzio, J., Faulkner, P. 1995. Characterization of the baculovirus *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus p10 gene

indicates that the polypeptide contains a coiled-coil domain. *Journal of General Virology* **76**: 2923-2932.

Wilson, M.E., Miller L.K. 1986. Changes in the nucleoprotein complex of a baculovirus DNA during infection. *Virology* **151**: 315-328.

Winstanley, D., Crook, N.E. 1993. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. *Journal of General Virology* **74**: 1599-1609.

Whitt, M.A., Manning, J.S. 1988. A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. *Virology* **163**: 33-42.

Wolgamot, G.M., Gross, C.H., Russell, R.L.Q., Rohrmann, G.F. 1993. Immunocytochemical characterization of p24, a baculovirus capsid-associated protein. *Journal of General Virology* **74**: 103-107.

Yamamoto, T., Tanada, Y. 1979. Comparative analysis of the enveloped virions of two granulosis viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Virology* **94**: 71-81.

Yang, S., Miller, L.K. 1999. Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *Journal of Virology* **73**: 3404-3409.