

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

**Caractérisation moléculaire et immunobiologique de la protéine EGT
du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV)**

Par
Jakub Sawicki

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

Jury d'évaluation

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

Septembre 2005

*À mes parents,
à mon frère,
à mes filles*

Résumé

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens), est un insecte ravageur des forêts de conifères en Amérique du Nord. Les épidémies récurrentes de cet insecte causent des pertes économiques importantes de la matière ligneuse. Par conséquent, la lutte biologique contre des populations de la tordeuse constitue un enjeu important. Dans ce contexte, notre laboratoire mène un projet d'envergure visant à l'utilisation d'un baculovirus, le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV), comme agent de lutte biologique pour contrôler les populations de l'insecte.

La protéine virale EGT est non essentielle à la réplication d'un baculovirus. Le fait que la protéine EGT du ChfuGV joue un rôle important dans la mue chez les larves infectées, était à l'origine de notre projet de recherche qui consistait en la caractérisation moléculaire et immunobiologique de cette protéine virale. Ainsi, lors de cette étude, le gène *egt* codant pour la protéine EGT a été séquencé à partir de l'ADN viral du ChfuGV. L'analyse de la séquence nucléotidique et de la séquence déduite en acides aminés du gène *egt* démontrent un haut degré d'homologie avec les autres gènes *egt* baculoviraux. Les études comparatives des séquences en acides aminés suggèrent une homologie fonctionnelle entre la protéine EGT du ChfuGV et les protéines EGT des autres baculovirus.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la production des anticorps polyclonaux anti-EGT par immunisation génétique afin de suivre l'expression et la propagation de la protéine EGT lors de l'infection des larves par le ChfuGV. Dans le premier temps, l'expression d'un fragment du gène *egt* du ChfuGV codant pour la partie C-terminale de la protéine EGT dans un système d'expression procaryote (pQE32) a permis de produire la protéine recombinante tronquée EGT589Pc d'un poids moléculaire de 32 kDa. Cette protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité et concentrée à 0,2 mg/L. Dans un deuxième temps, la protéine EGT du ChfuGV a été produite en utilisant un système d'expression eucaryote (pcDNA3), lors de l'immunisation génétique visant à produire des anticorps polyclonaux anti-EGT chez les souris Balb/c (immunisées avec le

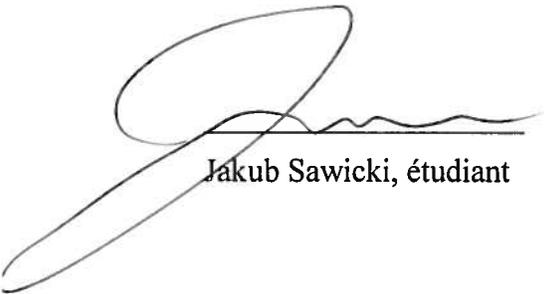
plasmide recombinant pcDNA3-EGT). La spécificité de ces anticorps a été confirmée par immunobuvardage de type Western en utilisant la protéine recombinante tronquée EGT589Pc comme antigène.

L'étude de la cinétique de production des anticorps polyclonaux anti-EGT par immunisation génétique a permis d'observer l'apparition des premiers anticorps 42 jours suivant la première immunisation avec le plasmide recombinant pcDNA3/EGT. Par ailleurs, une meilleure production d'anticorps anti-EGT a été observée lors de l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/EGT avec le plasmide recombinant pcDNA3/IL2 (14 jours suivant la première immunisation) ou avec le plasmide pcDNA3 (28 jours suivant la première immunisation). La production d'anticorps anti-EGT est plus importante avec l'immuno-adjuvant IL-2 (l'interleukine-2 murine).

Ce projet de recherche nous a permis de produire des anticorps polyclonaux anti-EGT par immunisation génétique. Ces anticorps seront être utilisés dans les essais immuno-histologiques visant à suivre l'expression de la protéine EGT et à étudier son implication dans la pathogenèse associée à l'infection au ChfuvGV des larves de *Choristoneura fumiferana*.



Claude Guertin, directeur de recherche



Jakub Sawicki, étudiant



Abderrazzak Merzouki, codirecteur de recherche

Remerciements

J'aimerais remercier chaleureusement mes deux directeurs de recherche, Dr Claude Guertin et Dr Abderrazzak Merzouki, pour m'avoir permis de mener ce travail et pour leur énorme support apporté au cours de toutes les phases de la réalisation de ce projet.

Je voudrais également remercier madame Myriam Jean et monsieur Marc Henrichon, technicien des laboratoires des Drs Abderrazzak Merzouki et Claude Guertin d'avoir partagé avec moi leur vaste expertise scientifique.

En même temps, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué aux résultats de mon travail au laboratoire et à la rédaction de ce mémoire de maîtrise.

Mon support financier a été gracieusement assuré par la Fondation Armand-Frappier. Ce projet a été réalisé grâce à la subvention du ministère des Ressources Naturelles octroyée au Dr Claude Guertin. Je tiens à remercier ces deux institutions pour leur contribution.

Finalement, j'aimerais exprimer ma gratitude et ma reconnaissance envers mes proches et mes amis pour leur encouragement et leur support.

Table des matières

Résumé	i
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xi
Introduction	2
Revue bibliographique	3
1. Tordeuse des bourgeons de l'épinette	4
2. Baculovirus	6
2.1. Généralités	6
2.2. Granulovirus	8
2.2.1. Morphologie et ultrastructure	8
2.2.2. Génome du granulovirus	11
2.2.3. Cycle d'infection et réplication des granulovirus	12
2.2.4. Phase primaire de l'infection	12
2.2.5. Phase secondaire de l'infection	14
2.3. Expression des gènes	15
2.3.1. Gènes des granulovirus et leurs produits	16
2.3.1.1. Gènes structuraux des granulovirus	16
2.3.1.2. Gènes associés à la réplication de l'ADN viral et à la transcription	19
2.3.1.3. Gènes auxiliaires	21
3. Protéine ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase (EGT) des baculovirus	23
3.1. Gène <i>egt</i> et son produit d'expression	24
4. Système d'expression	26
4.1. Système d'expression procaryote	27
4.1.1. Bactéries	27
4.2. Système d'expression eucaryote	27
4.2.1. Levures	27

4.2.2. Cellules d'insectes	28
4.2.3. Cellules de mammifères	28
5. Immunisation génétique	29
5.1. Historique	29
5.2 Mécanismes de stimulation de la réponse immunitaire	31
5.2.1. Voies d'immunisation	34
5.2.2. Techniques d'immunisation	35
5.3. Facteurs qui influencent la réponse immunitaire	36
5.3.1. Vecteur d'expression	36
5.3.2. Contribution des motifs immunostimulateurs cytosine-phosphate-guanine	37
5.3.3. Adjuvant génétique	37
5.3.3.1. Cytokines	38
5.3.3.2. Cytokines induisant la réponse cellulaire	38
5.3.3.3. Cytokines induisant la réponse humorale	39
5.3.3.4. Cytokines pro-inflammatoires	39
5.3.3.5. Molécules co-stimulatrices	39
5.4. Perspectives	40
But et objectifs	41
Matériel et méthodes	43
1. Production du ChfuGV et purification de l'ADN génomique	44
1.1. Production et purification du ChfuGV	44
1.2 Analyse par microscopie électronique du ChfuGV purifié	45
1.3 Isolation des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV.....	45
1.4. Extraction et purification de l'ADN virale du ChfuGV.....	46
2. Expression de la protéine EGT dans un système procaryote	47
2.1 Clonage du gène codant pour la protéine EGT	48
2.1.1 Amplification par PCR du gène codant pour la protéine EGT	48
2.1.2. Clonage du fragment codant pour la protéine EGT dans le vecteur pCR [®] 2.1	49
2.1.2.1 Transformation des cellules bactériennes <i>E.coli</i> (INV α F') ..	50
2.1.2.2 Sélection des colonies recombinantes et purification de l'ADN plasmidique	50

2.1.3. Sous clonage du fragment du gène codant pour la protéine EGT dans le vecteur d'expression pQE32	52
2.1.3.1. Digestion du fragment ADN codant pour la protéine EGT et du vecteur d'expression pQE32	53
2.1.3.2. Clonage du fragment d'ADN codant pour la protéine EGT dans le vecteur d'expression pQE32 et transformation des cellules bactériennes compétentes	56
2.1.3.3. Sélection des colonies recombinantes contenant le plasmide pQE32egt	56
2.2. Expression de la protéine recombinante EGTx6HIS dans les cellules bactériennes M15(pREP4)	57
2.2.1. Transformation des cellules bactériennes <i>E.coli</i> M15(pREP4) par le plasmide recombinant pQE32egt	58
2.2.2. Cinétique d'expression de la protéine recombinante EGTx6HIS par les bactéries <i>E. coli</i> M15 (pREP4)	58
2.3. Expression de la protéine recombinante EGT tronquée	61
2.3.1. Clonage d'une séquence partielle du gène <i>egt</i> du virus CfGV	61
2.3.2. Transformation des bactéries <i>E. coli</i> M15(pREP4) par les plasmides recombinants pQE32egt589Pc.....	64
2.3.3. Induction de l'expression de la protéine recombinante EGT tronquée	65
2.3.4. Purification de la protéine recombinante EGT tronquée par chromatographie d'affinité	65
2.3.5. Quantification la protéine recombinante EGT tronquée	68
3. Système d'expression eucaryote	68
3.1. Construction du vecteur d'expression recombinant pcDNA3-EGT	69
3.1.1. Amplification par PCR du gène codant pour la protéine EGT	69
3.1.2. Clonage du gène codant pour la protéine EGT dans le vecteur pCR [®] 2.1	72
3.1.3. Sous clonage du fragment codant pour la protéine EGT dans le vecteur d'expression pcDNA3	73
3.1.3.1. Digestion et purification du vecteur d'expression pcDNA3 et du fragment ADN codant pour la protéine EGT	73
3.1.3.2. Clonage du fragment d'ADN codant pour la protéine EGT dans le vecteur d'expression pcDNA3 et transformation des cellules bactériennes <i>E. coli</i> XL1-Blue	74

3.1.3.3. Criblage des bactéries XL1-Blue recombinantes et purification du vecteur recombinant pcDNA3-EGT	74
4. Production des vecteurs recombinants nécessaires à l'immunisation génétique	75
4.1. Production à grande échelle des plasmides recombinants pcDNA3-EGT, pcDNA/IL-2 et pcDNA3	75
5. Protocole d'immunisation	77
5.1. Groupes de souris et produits injectés	77
5.2. Calendrier d'immunisation et voie des injections et des prélèvements ...	77
6. Caractérisation des anticorps anti-EGT produit par l'immunisation génétique	79
6.1. Immunobuvardage de type Western	79
6.2. Tests ELISA	79
Résultats	81
1. Caractérisation moléculaire du gène codant pour la protéine EGT	82
1.1. Identification de gène codant pour la protéine EGT	82
1.2. Analyse comparative de la séquence du gène codant pour la protéine EGT du ChfuGV	89
1.3. Analyse comparative de la séquence en acides aminés de la protéine EGT du ChfuGV	89
2. Expression de la protéine recombinante EGT complète et tronquée dans un système procaryote	96
3. Expression de la protéine EGT dans un système d'expression eucaryote	108
4. Immunisation génétique et évaluation de la réponse immune	108
4.1. Plasmides utilisés lors de l'immunisation génétique	108
4.2. Analyse de la spécificité des anticorps anti-EGT par immunobuvardage de type Western	113
4.3. Analyse par ELISA de la réponse humorale induite lors de l'immunisation génétique avec le plasmide recombinant pcDNA3-EGT	118
4.4. Cinétique de la réponse humorale induite lors de l'immunisation génétique avec le plasmide recombinant pcDNA3-EGT	123
Discussion	126
Conclusion	133
Références	136

Liste des figures

Figure 1.	Le granulovirus de <i>Christoneura fumiferana</i>	9
Figure 2.	Clonage du gène <i>egt</i> dans le vecteur d'expression procaryote pQE32 en vue d'expression de la protéine EGT	54
Figure 3.	Représentation schématique de la protéine EGT tronquée par rapport à la séquence en acides aminés de la protéine EGT et à ces régions conservées	62
Figure 4.	Clonage du gène <i>egt</i> dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 en vue de l'expression de la protéine EGT	70
Figure 5.	Profil électrophorétique d'un fragment d'ADN de 1,5 kb amplifié par PCR et contenant le gène <i>egt</i> du virus ChfuGV	83
Figure 6.	Profil électrophorétique des plasmides recombinants pQE32 contenant le gène <i>egt</i> de virus CfGV après la digestion par endonucléase <i>KpnI</i>	85
Figure 7.	Séquence nucléotidique du gène <i>egt</i> et sa séquence déduite en acides aminés	87
Figure 8.	Alignement multiple des séquences codant pour le domaine responsable de la reconnaissance du substrat du gène <i>egt</i>	90
Figure 9.	Six régions hautement conservées de la protéine EGT du virus ChfuGV	92
Figure 10.	Alignement de la région VI de la protéine EGT du virus ChfuGV avec celles d'autres baculovirus	94
Figure 11.	Alignement de la région N-terminale de la protéine EGT du virus ChfuGV avec celles d'autres baculovirus.....	97
Figure 12.	Arbre phylogénétique des protéines EGT des baculovirus	99
Figure 13.	Expression de la protéine tronquée (EGT589Pc), par les cellules bactériennes <i>E. coli</i> M15[(pREP4)(pQE32egt589Pc)] à différents temps d'induction par l'IPTG	102

Figure 14.	Analyse par électrophorèse SDS-PAGE de la protéine EGT589Pc purifiée par chromatographie d'affinité à partir de la culture de cellules bactériennes <i>E. coli</i> M15[(pREP4)(pQE32egt589Pc)], ainsi qu'a partir de la culture bactérienne <i>E. coli</i> M15[(pREP4)(pQE32)]	104
Figure 15.	Analyse par électrophorèse SDS-PAGE de la protéine recombinante EGT589Pc, purifiée par chromatographie d'affinité, dialysée et concentrées	106
Figure 16.	Analyse par immunobuvardage de type Western du concentré de la protéine recombinante EGT589Pc purifiée par chromatographie d'affinité, dialysées et concentrée	109
Figure 17.	Profil électrophorétique du plasmide recombinant pcDNA3/EGT	111
Figure 18.	Profil électrophorétique des plasmides recombinants pcDNA3/EGT, pcDNA3/IL2 et les plasmides pcDNA3	114
Figure 19.	Analyse par l'immunobuvardage de type Western de la spécificité des anticorps anti-EGT produits par l'immunisation génétique	116
Figure 20.	Analyse comparative par l'immunobuvardage de type Western de la spécificité des anticorps anti-EGT produits par l'immunisation génétique	119
Figure 21.	Analyse de la réponse humorale des souris suite à l'immunisation génétique visant à produire des anticorps anti-EGT	121
Figure 22.	Cinétique de la réponse humorale observée dans les sérums des souris au cours de l'immunisation génétique visant à produire des anticorps anti-EGT	124

Liste des tableaux

Tableau I.	Protocole d'immunisation génétique des groupes de souris	78
-------------------	---	-----------

Liste des abréviations

6xHIS	étiquette de 6 histidines
a.a	acide aminé
AcMNPV	nucléopolyédrovirus d' <i>Autographa californica</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
AdorGV	granulovirus d' <i>Adoxophyes orana</i>
AgMNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Anticarsia gemmatalis</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
AsGV	granulovirus d' <i>Agrotis segmentum</i>
ATP	adénosine triphosphate
BmNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Bombyx mori</i>
BAPE	Bureau d'audiences publiques sur l'environnement
BV	phénotype de virus bourgeonnant
CfNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Choristoneura fumiferana</i>
ChfuGV	granulovirus de <i>Choristoneura fumiferana</i>
CIGV	granulovirus de <i>Cryptophlebia leucotreta</i>
CMH	complexe majeur de l'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus.
COI	<i>cut off index</i>
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CpGV	granulovirus du <i>Cydia Pomonella</i>
CnSNPV	simple polyédrovirus de <i>Culex nigripapulus</i>
CTL	lymphocytes T -cytotoxiques
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EGT	ecdysone UDP-glucosyltrasférase
EpMNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Epiphyas postvittana</i>
g	gramme
GV	granulovirus

HaNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Helicoverpa armigera</i>
HcNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Hyphantria cunea</i>
IL-2	interleukine-2
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
kpb	kilopaire de bases
kDa	kilodalton
LdNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Lymantria dispar</i>
LoGV	Granulovirus du <i>Lacanobia oleracea</i>
M	molaire
μ g	microgramme
μ L	microlitre
μ M	micromillimolaire
mM	millimolaire
MNPV	nucleopolyhédrovirus multiples
MWCO	<i>molecular weight cut-out</i>
Ni-NTA	nickel - acide nitrilotriacétique
nm	nanomètre
NPV	nucléopolyédrovirus
OpNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Orgyia pseudotsugata</i>
ORF	cadre de lecture ouvert
OV	phenotypique de virus inclus
pb	paires de base
PCR	réaction en chaîne de polymérisation
PnNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Perina nuda</i>
PoGV	granulovirus du <i>Phthorimaea operculella</i>
PTA	acide phosphotungstique
PVDF	difluorure de polyvinylidène
PxGV	granulovirus du <i>Plutella xylostella</i>
rpm	révolutions par minute

SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en presence de sodium dodecyl sulfate sulfate
SeNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Spodoptera exigua</i>
SINPV	nucléopolyédrovirus du <i>Spodoptera litura</i>
SNPV	nucleopolyédrovirus simples
SplitNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Spodoptera littoralis</i>
SpltNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Spodoptera litura</i>
SV40	virus simien 40
TAE	Tris acétate / EDTA
TE	Tris-HCL / EDTA
TKS	Tris-HCL / EDTA / SDS
TnNPV	nucléopolyédrovirus du <i>Trichoplusia ni</i>
UDP	uridine diphosphate
UDPGT	UDP-glucoronosyltransférases
VIH	virus d'immuno-déficience humaine
XcGV	granulovirus du <i>Xestia c-nigrum</i>
x g	force gravitationnelle
X-Gal	bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Introduction

Dans ses efforts visant à apprivoiser, transformer et même, dans un certain sens, à maîtriser les éléments de son environnement, l'homme cherchait souvent des alliés potentiels dans le monde des organismes vivants. Le développement de nos connaissances scientifiques, entre autres dans le domaine de microbiologie, a permis de mieux comprendre plusieurs phénomènes observés et souvent exploités depuis longtemps. Les observations de la nature, des interactions entre ces éléments composants et l'émergence de l'écologie qui avaient suivi, ont enrichi nos connaissances sur la structure et le fonctionnement des systèmes biologiques de différentes tailles et niveaux de complexité. Aujourd'hui, la science nous donne l'occasion de transformer (pour ne pas dire «améliorer») le monde naturel de façon jamais disponible auparavant, notamment grâce à la biotechnologie. Cette discipline de la science donne des possibilités de modifier la constitution des organismes selon les besoins de l'homme, afin qu'ils servent encore mieux à la réalisation des objectifs fixés par les activités humaines. Un champ important de ces activités consiste à lutter contre les organismes nuisibles du point de vue de nos objectifs économiques. L'utilisation des pathogènes naturels dans la lutte contre ces organismes constitue une alternative de plus en plus répandue et généralement mieux acceptée du point de vue écologique que la lutte chimique.

Le projet présent vise à établir les outils moléculaires appropriés pour la caractérisation des interactions entre la tordeuse des bourgeons de l'épinette, un insecte ravageur des forêts de conifères en Amérique du Nord, et son pathogène, le granulovirus ChfuGV. Ce virus est considéré comme un agent potentiel dans la lutte biologique contre la tordeuse. Des nouvelles connaissances obtenues grâce aux outils établis lors de ce projet pourraient nous permettre de mieux comprendre les interactions entre cet agent de lutte et l'insecte hôte.

Revue bibliographique

1. La tordeuse des bourgeons de l'épinette

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clemens); [Lepidoptera: Tortricidae], est un insecte ravageur défoliant des forêts conifères d'Amérique du Nord. Ces principaux hôtes sont l'épinette blanche [*Picea glauca* (Moench) Voss] et le sapin baumier [*Abies balsamea* (L) Mill] (Bonneau *et al.*, 1999 ; Moreau et Bauce, 2003). Cet insecte peut également se nourrir de mélèze larcin *Larix laricina* [*Larix laricina* (Du Roi) K.Koch], de l'épinette rouge [*Picea rubens* Sarg.], de l'épinette noire [*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.] et de la pruche du Canada [*Tsuga canadensis* (L) Corr.] (Harvey, 1985). La distribution géographique de la tordeuse des bourgeons de l'épinette concorde avec la répartition de ces principaux hôtes. Ainsi, la présence de la tordeuse couvre le territoire entre les provinces maritimes du Canada et la Colombie Britannique, ainsi que celui entre l'état de Virginie et le territoire du Yukon (Harvey, 1985). La dynamique des populations de cet insecte se caractérise par l'apparition des périodes épidémiques récurrentes qui peuvent s'étaler sur plusieurs années consécutives. L'infection généralisée causée par la tordeuse des bourgeons de l'épinette provoque la défoliation des arbres qui entraîne l'abaissement de l'activité photosynthétique, l'affaiblissement et la réduction de la croissance et, finalement, la mort des arbres (Blais 1985 ; Mattson *et al.*, 1988). Durant une épidémie, la mortalité des arbres peut varier de 80% à 90 % (Blais 1985) et les pertes de la matière ligneuse se chiffrent en plusieurs millions de mètres cubes de bois. Au cours du XX^{ième} siècle, les forêts québécoises ont été infestées à quatre reprises par la tordeuse des bourgeons de l'épinette, soit en 1909, 1940, 1967 et en 1992 (Bonneau *et al.*, 1999 ; Lachance, 1995 ; Morin et Laprise, 1990). Le caractère cyclique de la dynamique des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette résulte des interactions entre différents facteurs environnementaux à caractère abiotique (surtout les conditions climatiques) et biotique. Parmi ces derniers on peut énumérer les maladies provoquées par les entomopathogènes, comme les bactéries, les champignons et les virus (Blais, 1985 ; Régnière et Lysyk, 1995).

Le cycle de vie de la tordeuse des bourgeons de l'épinette dure un an. Les œufs pondus de la mi-juillet à la fin août éclosent après une incubation de 8 à 12 jours et les larves passent l'hiver dans les infractuosités du tronc (l'hibernaculum). Au printemps, les larves sortent de leur hibernaculum et s'alimentent des nouveaux bourgeons de feuillage qui émergent des arbres (Mattosn *et al.*, 1988 ; Moreau et Bauce, 2003). Les larves se développent jusqu'au cinquième ou sixième stade avant de passer au stade chrysalide, et les insectes adultes (papillons) émergent dans les deux semaines suivant cette transformation. La ponte des œufs a lieu quelques heures après l'accouplement. Après l'éclosion, les jeunes larves hibernent jusqu'au printemps suivant et le cycle recommence. Selon Bonneau *et al.*, (1999), les larves des cinquième et sixième stades larvaires sont responsables de plus de 85 % de la défoliation.

Afin de limiter les dommages causés par la tordeuse des bourgeons de l'épinette aux forêts et, par conséquent, de minimiser les pertes économiques qui en résultent, le contrôle efficace des populations de cet insecte devient alors primordial. Depuis l'introduction des limitations dans l'application des insecticides chimiques en milieu forestier au Québec (BAPE, 1991), l'attention s'est tournée vers l'utilisation des entomopathogènes naturels dans la lutte antiparasitaire. L'agent biologique le plus utilisé jusqu'à présent pour contrôler la population de la tordeuse des bourgeons de l'épinette est la bactérie *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Moreau et Bauce, 2003). D'autres entomopathogènes comme le champignon *Beauveria bassiana* (Todorova *et al.*, 2000) et les baculovirus sont présentement exploités pour la lutte contre les épidémies causées par la tordeuse afin de neutraliser l'émergence d'insectes résistants (McGaughey et Beeman, 1988 ; Tabashnik. 1992).

Les baculovirus sont des entomopathogènes viraux présent naturellement dans l'environnement et qui se caractérisent, entre autres, par une grande spécificité à leurs hôtes. Le ChfuvGV est un baculovirus qui a été isolé à partir des larves de la tordeuse des bourgeons d'épinette (Bird, 1959). Guertin (1995) et Forté et Guertin, (1999)

ont démontré l'efficacité de ce virus, utilisé comme bio pesticide pour le contrôle des populations de la tordeuse.

2. Baculovirus

2.1. Généralités

Le baculovirus est un virus de forme ovocylindrique qui appartient à la famille des *Baculoviridae* (Miller, 1996). Le génome du virus est composé d'une molécule d'ADN double brin, circulaire, fermée et d'une taille allant de 80 à 230 kpb (Tweeten *et al.*, 1977 ; Wormleaton *et al.*, 2003). L'ADN viral est entouré par une nucléocapside enveloppée qui forme le virion. Ce virion est enrobé dans un corps d'inclusion protéique qui protège la particule virale des facteurs inactivants tels que les rayons ultraviolet et les nucléases (Blissard, 1996 ; Vialard *et al.*, 1995).

La famille des *Baculoviridae* est composée de deux genres, soit les granulovirus (GV) et les nucléopolyédrovirus (NPV). Les granulovirus se présentent sous forme de granules d'environ 0,5 µm de diamètre. Leur corps d'inclusion sont composés principalement d'une protéine appelée la granuline (Summers et Smith, 1978; Tweeten *et al.*, 1981; Rohrmann, 1992). Les virus de la polyédrose nucléaire sont des virus qui sont également contenus dans des corps d'inclusion en forme de polyèdre d'environ 15 µm de diamètre (Rohrmann, 1992). Ces corps d'inclusion sont composés principalement de polyédrine et peuvent contenir un ou plusieurs virions (Hayakawa *et al.*, 1999). Le genre NPV est divisé en deux sous-genres qui se distinguent par le nombre de nucléocapsides par virion, soit les nucléopolyédrovirus multiples (MNPV), possédant jusqu'à huit nucléocapsides par virion et les nucléopolyédrovirus simples (SNPV) possédant une seule nucléocapsides par virion (Hayakawa et al., 1999).

Les baculovirus forment une famille de pathogènes spécifiques aux invertébrés (Cory, 2000). En général, les baculovirus infectent les larves des insectes des ordres *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera* *Neuptera*, *Siphonoptera*, *Thysanura*, *Trichoptera*, et même quelques crustacés (Hayakawa et al., 1999 ; Vialard *et al.*, 1995).

En tout, les baculovirus ont été isolés à partir de plus que 800 espèces d'insectes (Khan *et al.*, 2003). En ce qui concerne les granulovirus, ils ont été isolés à partir d'environ 150 espèces d'insectes qui appartiennent à l'ordre *Lepidoptera* (Jehle et Backhaus, 1994 ; Manzàn *et al.*, 2002). Chaque baculovirus se caractérise par un spectre d'hôte étroit et limité à un ou quelques espèces proches phylogénétiquement. Selon les règles de l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (Volkman et Blissard, 1995), le nom spécifique des baculovirus provient du nom de leur hôte naturel suivi par celui de leur genre, d'où le nom du ChfuvGV qui infecte spécifiquement l'espèce *Choristoneura fumiferana*.

La spécificité et la forte pathogénicité des baculovirus ont permis d'ouvrir la voie à leur utilisation dans le secteur de la foresterie et de l'agriculture pour contrôler les populations d'insectes ravageurs (Cory, 2000 ; Moscardi, 1999 ; Vialard *et al.*, 1995). Les baculovirus sont également utilisés pour le développement des vecteurs d'expression des protéines (Keith *et al.*, 1999 ; Miller, 1988 ; Vialard *et al.*, 1995). La majorité des études portant sur les baculovirus concerne le genre NPV, principalement grâce à la disponibilité des lignées cellulaires permissives permettant facilement la propagation de ce virus. Dans le cas des granulovirus, les travaux portant sur la production de virus ont donné des résultats peu concluants (Taha *et al.*, 2000). De nouvelles informations résultant d'études sur les baculovirus ont permis d'approfondir nos connaissances au sujet de la biologie des baculovirus. De plus, des modifications génétiques apportées à certaines espèces virales déjà en utilisation ont permis d'améliorer leur pouvoir insecticide et de modifier leur spécificité. Généralement, ces modifications consistent soit en la production de baculovirus recombinants qui expriment des neurotoxines spécifiques aux insectes, soit en la production de baculovirus recombinants qui expriment des hormones des insectes, afin de rompre l'homeostasie d'un insecte infecté et provoquer sa mort. Finalement, ces modifications consistent à produire des baculovirus génétiquement modifiés qui expriment certains gènes (Bonning et Hammock, 1996 ; Cory, 2000 ; Thiem, 1997). Dans le premier groupe on peut énumérer des baculovirus recombinants exprimant la δ -toxine provenant de la bactérie *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Merryweather *et al.*, 1990), la toxine AaIT du scorpion

Androctonus australis (Chen *et al.*, 2000, Sun *et al.*, 2002), ou la neurotoxine *tox34* de la mite *Pyemotes tritici* (Popham *et al.*, 1997). En ce qui concerne les hormones des insectes exprimées par baculovirus recombinants, des essais avec l'expression de l'hormone diurétique du *Manduca sexta* (Maeda, 1989) ou de l'hormone prothoracique (O'Reilly *et al.*, 1993) ont été conduits, mais les résultats obtenus furent plutôt modestes (Bonning et Hammock, 1996). Dans le troisième groupe, il faut énumérer les baculovirus génétiquement modifiés qui n'expriment pas de gène *egt* viral, ce qui augmente le pouvoir insecticide du virus (Slavicek *et al.*, 1999 ; Sun *et al.*, 2002).

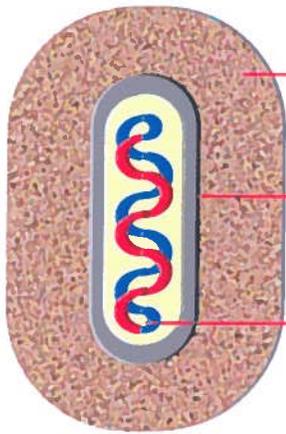
2.2. Granulovirus

2.2.1. Morphologie et ultrastructure

Les granulovirus munis d'un corps d'inclusion forment un cylindre ovoïdal de 300 à 500 nm de longueur et de 120 à 350 nm de largeur (Tweeten *et al.*, 1981). Le corps d'inclusion de nature protéique est formé principalement de la granuline et est recouvert d'une couche de protéines et de carbohydrates, nommée le calice (Minion *et al.*, 1979; Pinnock et Hess, 1978). À l'intérieur du corps d'inclusion se trouve un virion composé d'une nucléocapside enveloppée ayant entre 250 et 300 nm de longueur et entre 30 et 60 nm de largeur (Miller, 1996). L'enveloppe de la nucléocapside provient de la membrane nucléaire de l'hôte, (Blissard, 1996 ; Miller, 1996). L'enveloppe est composée d'une double couche phospholipidique et contient de nombreuses protéines structurales (Blissard, 1996). L'enveloppe est connectée à la nucléocapside par l'intermédiaire d'une structure protéique nommée le tégument (Kawamoto *et al.*, 1977 ; Liu et Maruniak, 1999). La nucléocapside qui renferme le génome viral, est composée de sous unités protéiques arrangées en anneaux superposés formant ainsi l'axe longitudinal de la nucléocapside (Blissard, 1996 ; Miller, 1996) (figure 1).

Figure 1. Le granulovirus de *Christoneura fumiferana*.

Schéma et photographie du granulovirus *Christoneura fumiferana*
(prise de microscopie électronique, agrandissement x 200 000).



Corps d'inclusion

Nucléocapside
enveloppée

ADN
double brin



2.2.2. Génome du granulovirus

Le génome des GV est formé d'une molécule d'ADN double brin circulaire d'une longueur approximative de 100 à 179 kpb. Les gènes viraux sont codés sur deux brins d'ADN et peuvent parfois se chevaucher (Blissard, 1996 ; Hashimoto *et al.*, 2000 ; Hayakawa *et al.*, 1999 ; Luque *et al.*, 2001 ; Wormleaton *et al.* 2003).

Jusqu'à présent, sept génomes de granulovirus ont été séquencés complètement, soit le granulovirus de *Xestia c-nigrum* (XcGV : 178,8 kpb, 181 cadres de lecture ouverts - Hayakawa *et al.*, 1999), de *Plutella xylostella* (PxGV : 101 kpb, 120 cadres de lecture ouverts - Hashimoto *et al.*, 2000), de *Cyndia pomonella* (CpGV : 123,5 kpb, 143 cadres de lecture ouverts - Luque *et al.*, 2001), d'*Adoxophyes orana* (AdorGV : 99,7 kpb, 119 cadres de lecture ouverts - Wormleaton *et al.*, 2003), d'*Agrotis segmentum* (AsGV : 131,7 kpb, 132 cadres de lecture ouverts – Xiulian *et al.*, 2004), de *Cryptophlebia leucotreta* (ClGV : 110,9 kpb, 128 cadres de lecture ouverts – Lange et Jehle, 2003) et de *Phthorimaea operculella* (PoGV : 119,2 kpb, 130 cadres de lecture ouverts – Croizier *et al.*, 2002). La taille du génome du virus ChfuGV est estimée à 107 kpb (Arif *et al.*, 1986).

L'analyse comparative des génomes de quatre granulovirus séquencés (AdorGV, CpGV, PxGV et XcGV) démontre une homologie allant jusqu'à 87% entre leurs gènes prédits et les gènes déjà identifiés chez d'autres baculovirus. De plus, l'orientation des gènes dans les quatre génomes des granulovirus est très bien conservée (Wormleaton *et al.*, 2003). Par contre, en ce qui concerne la présence de certains gènes et régions, une variation a été observée entre les quatre espèces analysées (Luque *et al.*, 2001 ; Wormleaton *et al.*, 2003). Selon les analyses informatiques des génomes des baculovirus déjà séquencés, les gènes de cette famille peuvent être divisés en cinq groupes. Les gènes du premier groupe sont présents chez tous les baculovirus. Les gènes du deuxième groupe sont spécifiques aux NPV et les gènes du troisième groupe sont spécifiques aux GV. Les gènes du quatrième groupe sont présents chez certains baculovirus alors que les gènes du cinquième groupe sont uniques à chaque espèce virale (Hayakawa *et al.*,

1999). La diversité des génomes des baculovirus est reflétée par les différences entre la taille et la composition des génomes à l'intérieur du même genre et parmi des espèces proches phylogénétiquement. Les différences de la taille entre des génomes des baculovirus est dûe à la présence de gènes répétés et de séquences répétées non codantes homologues (*hrs*). Ces dernières servent, notamment, d'origine et de régulateur de la réplication de l'ADN viral ainsi que de site de recombinaison entre les génomes baculoviraux (Hayakawa *et al.*, 1999 ; Kool *et al.*, 1993 ; Lu *et al.*, 1997). Les séquences *hrs* jouent également un rôle dans la régulation de la transcription de l'ADN viral (Hayakawa *et al.*, 1999). La fréquence et la composition des *hrs* dans les génomes des baculovirus déjà séquencés varient de façon spécifique (Hayakawa *et al.*, 1999 ; Luque *et al.*, 2001 ; Wormleaton *et al.*, 2003).

2.2.3. Cycle d'infection et réplication des granulovirus

Le cycle d'infection par le baculovirus est biphasique (Consigli *et al.*, 1986). Durant ce cycle, deux phénotypes distincts sont produits dans différents tissus de l'organisme infecté et à différentes étapes du cycle. Les deux phénotypes diffèrent l'un de l'autre selon leurs rôles fonctionnels respectifs et selon leur mécanisme d'entrée dans la cellule hôte (Blissard, 1996). Lors de la phase primaire de l'infection, le phénotype de virus bourgeonnant (BV) est produit. Ce phénotype ne possède pas de corps d'inclusion et il est responsable de la propagation de l'infection dans l'insecte atteint par le virus. La deuxième phase de caractère polyorganotrophique est déclenchée par le virus de phénotype BV et elle conduit à la production de virus inclus (OV). Sous cette forme, les virus sont libérés et transmis dans l'environnement (Rohmann, 1992).

2.2.4. Phase primaire de l'infection

L'infection virale est déclenchée lors de l'ingestion de la nourriture contaminée par une larve. Une fois le virus ingéré, les conditions hautement alcalines d'intestin larvaire provoquent la solubilisation des corps d'inclusions du virus, permettant ainsi la libération des nucléocapsides enveloppées (Kelly, 1982). Les virions ainsi libérés sont

hautement infectieux aux cellules épithéliales de l'intestin moyen (Volkman et Summers, 1977). Suite au contact du virion avec les cellules épithéliales de l'intestin moyen, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire permettant ainsi l'entrée de la nucléocapside dans le cytoplasme des cellules hôtes (Consigli *et al.*, 1986 ; Horton et Burand, 1993).

Bien que la présence de sites de liaisons spécifiques au virus a été révélée au niveau des bordures en brosse des cellules épithéliales par Horton et Burand (1993), aucune interaction spécifique entre ces récepteurs cellulaires et les protéines virales n'a été démontrée (Blissard, 1996). La nucléocapside est ensuite transportée vers le noyau grâce à un mécanisme impliquant les microtubules cytoplasmiques de F-actine (Charlton et Volkman, 1993). L'ADN viral est ensuite libéré au niveau du noyau par un mécanisme qui diffère selon le genre de baculovirus. Ainsi, dans le cas des NPV, l'ADN viral est libéré après la pénétration des nucléocapsides à l'intérieur du noyau (Granados, 1978), tandis que dans le cas des GV, les nucléocapsides restent dans le cytoplasme où elles s'alignent aux pores nucléaires à travers lesquels l'ADN viral est injecté directement à l'intérieur du noyau grâce aux protéines associées aux nucléocapsides (Funk et Consigli, 1993 ; Russell et Rohrmann 1990 ; Wilson *et al.*, 1987). Lors de l'étape suivante, les plaques du stroma virogène associées à la matrice nucléaire sont formées à l'intérieur du noyau. Cette structure devient le site de la synthèse de l'ADN viral, de la transcription des gènes viraux et de l'assemblage d'une nouvelle génération de nucléocapsides. En même temps, le noyau subit une désorganisation et la membrane nucléaire devient fragmentée (Vialard *et al.*, 1995).

L'enveloppe des nucléocapsides néo-formées est acquise soit au niveau de la membrane nucléaire, soit au niveau de la membrane intra cytoplasmique de la membrane basale de la cellule durant le processus de bourgeonnement du virus (Robertson *et al.*, 1974 ; Granados et Lawler, 1981, Tanada et Leutenegger, 1970). Les virus de phénotype BV ainsi produits sont transportés vers la membrane basale des cellules épithéliales de l'intestin moyen et ils sont libérés dans l'hémocèle des larves infectées (Granados et Lawler, 1981). Engelhard *et al.*, (1994) ont suggéré que le système trachéal serait

également utilisé par les virus bourgeonnants pour traverser la membrane basale de l'épithélium intestinal. La libération des virus bourgeonnants (BV) dans l'hémolymphe (Granados et Lawler, 1981 ; Keddie *et al.*, 1989) et dans le système trachéal (Engelhard *et al.*, 1994) amorce la seconde phase de l'infection par le virus, soit l'infection systémique.

2.2.5. Phase secondaire de l'infection

Les BV libérés infectent d'autres tissus susceptibles tels que les cellules de la matrice trachéale, de l'épiderme, et des hémocytes. Cependant, les cellules du corps gras demeurent la cible principale du virus lors de cette phase de l'infection (Blissard et Rohrmann, 1990 ; Consigli *et al.*, 1986 ; Engelhard *et al.*, 1994). Les BV pénètrent dans les cellules par endocytose (Volkman et Goldsmith, 1985). L'entrée du virus est facilitée par l'interaction des protéines de l'enveloppe avec les récepteurs cellulaires (Blissard, 1996). La fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale relâche la nucléocapside dans le cytoplasme. La nucléocapside est transportée vers le noyau où l'ADN viral libéré est répliqué puis transcrit (Ijkel *et al.*, 2000). Les virus générés pendant cette phase de la réplication virale peuvent acquérir l'un des deux phénotypes viraux (BV ou OV) dépendamment de la façon d'acquisition de l'enveloppe. Cependant, avec la progression de l'infection, la production des virus de phénotype BV diminue en faveur des virus de phénotype OV (Braunagel *et al.*, 1996 ; Hong *et al.*, 1994). Les virus de phénotype BV produits durant cette phase acquièrent leurs enveloppes à partir de la membrane cellulaire lors du bourgeonnement, tandis que les virus de phénotype OV acquièrent l'enveloppe à l'intérieur du noyau, à partir de la membrane nucléaire interne (Braunagel *et al.*, 1996). Les virions OV sont recouverts d'un corps d'inclusion de granuline produite en abondance lors de l'étape finale de l'infection (Rohrman, 1992). L'assemblage et l'accumulation de virus inclus à l'intérieur des cellules infectées précèdent la lyse cellulaire et la liquéfaction du corps de l'insecte, ce qui amène ultimement à la mort de ce dernier. Les virus de phénotype OV ainsi produits sont disséminés dans l'environnement (Consigli *et al.*, 1986).

2.3. Expression des gènes

Au niveau moléculaire, le cycle d'infection complexe des baculovirus est reflété par le mécanisme d'expression des gènes en cascade durant des phases inter-dépendantes. Un mécanisme de régulation différent est associé à chaque phase de l'expression génétique (Chang *et al.*, 1999).

Lors du cycle d'infection, les gènes de tous les baculovirus sont exprimés en cascade pendant des phases inter-dépendantes et, selon le moment de leur expression, il est possible de diviser ces gènes en quatre groupes. Les deux premiers groupes constituent les gènes précoces immédiats (gènes α) et les gènes précoces (gènes β), et ils sont exprimés par l'appareil de transcription cellulaire. Ces deux groupes de gènes sont responsables de la régulation de l'expression des gènes exprimés durant les phases consécutives de la réplication de l'ADN viral (Blissard 1996 ; Vialard *et al.*, 1995). Les promoteurs de ces gènes se caractérisent par la présence de la séquence canonique TATA, nécessaire pour l'attachement de la protéine TBP (*TATA binding protein*) du complexe de l'ARN polymérase II eucaryote, ainsi que par la présence du motif d'initiation de la transcription CAGT. Ce motif est requis pour la stabilisation du complexe transcriptionnel de la cellule et il est présent également dans les promoteurs des gènes transcrits par l'ARN polymérase II chez les insectes (Blissard, 1996 ; Purnell *et al.*, 1994). L'expression des gènes α et β peut être également modulée par d'autres séquences régulatrices reconnues et utilisées par les facteurs transcriptionnels de la cellule hôte. De plus, les motifs *hrs* augmentent l'activation de l'expression de ces gènes (Kogan et Blissard, 1994 ; Hayakawa *et al.*, 1999).

L'expression des groupes de gènes tardifs (gènes γ) et très tardifs (gènes δ) commence suite à la réplication de l'ADN viral (Miller, 1996). Le début de cette étape d'expression se caractérise par l'activation de la transcription par l'ARN polymérase résistante à l' α -amantine (Gruha *et al.*, 1981 ; Huh et Weaver, 1990 ; Yang *et al.*, 1991) et par le déclin du niveau de l'ARNm de l'hôte (Ooi et Miller, 1988). Les promoteurs des gènes γ et δ se caractérisent par la présence de la séquence conservée A/T/G TAAG

au niveau du site de l'initiation de la transcription (Ooi *et al.*, 1989 ; Rankin *et al.*, 1988 ; Thiem et Miller, 1989). De plus, dans les promoteurs des gènes δ (souvent hyper exprimés), le motif TAAG fait partie de la séquence bien conservée TAATAAGT/ AATT (Ooi *et al.*, 1989 ; Possee et Howard, 1987). Les gènes γ codent pour des protéines structurales et régulent également l'expression des gènes δ (Kool et Vlask, 1993). Ils sont transcrits avant les gènes très tardifs, pendant les 12 et 24 heures post-infection. L'expression des gènes δ débute environ 48 heures post-infection (Vialard *et al.*, 1995). Ceux-ci codent pour les protéines structurales qui participent dans le processus de l'occlusion du virus. Cette phase se caractérise par la réduction ou l'arrêt total de la transcription des gènes γ et elle continue jusqu'à la mort cellulaire par la lyse (Blissard, 1996 ; Vialard *et al.*, 1995 ; Chang *et al.*, 1999).

2.3.1. Gènes des granulovirus et leurs produits

Les génomes des granulovirus analysés comportent plus que 100 cadres de lecture ouverts, codant pour des produits ayant plus que 50 acides aminés. Le niveau d'homologie et le degré de conservation de ces produits varient de façon spécifique (Luque *et al.*, 2001 ; Wormleaton *et al.*, 2003).

2.3.1.1. Gènes structuraux

Le gène codant pour la granuline (gène γ) est bien conservé chez les granulovirus (Bah *et al.*, 1997, Taha *et al.*, 2000) et il démontre également un haut degré d'homologie avec le gène codant pour la polyèdrine, la protéine majeure du corps d'inclusion des NPV (Bideshi *et al.*, 2000). Ces deux protéines sont considérées comme les plus conservées parmi toutes les protéines structurales chez les baculovirus (Bideshi *et al.*, 2000 ; Luque *et al.*, 2001). La granuline est un élément composant majeur du corps d'inclusion du granulovirus. Cette phosphoprotéine hyper-exprimée de 28 à 30 kDa n'est pas glycolysée (Russel et Consigli, 1986 ; Bideshi *et al.*, 2000). La taille de la granuline du virus ChfUGV est estimée à 29,3 kDa (Bah *et al.*, 1997). La séquence en acides aminés de cette protéine particulière démontre une identité variant de 88 à 94 % avec les autres

séquences connues de la granuline (Bideshi *et al.*, 2000). Un autre gène hyper exprimé est codé par les homologues du gène *p10* (gène γ) chez les NPV, où la protéine P10 forme des corps fibreux dans le noyau et dans le cytoplasme. La protéine P10 joue également un rôle dans la morphogenèse du corps d'inclusion et dans la désintégration du noyau cellulaire qui précède la dissémination des virus (Van Oers et Vlask, 1997). Un autre gène similaire au gène *p10* a également été séquencé chez le ChfuvGV (Jean 2003). Ce gène est présent en plusieurs copies chez la plupart des NPV, ainsi que chez tous les granulovirus séquencés jusqu'à maintenant, sauf chez le CpGV (Hayakawa *et al.*, 1999 ; Luque *et al.*, 2001). Or le degré de conservation de ce gène est faible et varie considérablement parmi les espèces des GV, ainsi qu'à l'intérieur du même génome (Hayakawa *et al.*, 1999 ; Luque *et al.*, 2001 ; Wormleaton *et al.*, 2003).

L'enveloppe de la nucléocapside varie dans sa composition en lipides et en protéines selon la forme phénotypique du virus (Blissard, 1996). Les gènes codant pour les protéines associées à l'enveloppe du virus de phénotype OV, soit : ODV-E18, ODV-EC27, (Braunagel *et al.*, 1994), ODV-E56 (Braunagel *et al.*, 1996), ODV-E25 (Lu et Carstens, 1991), ODV-E66 (Hong *et al.*, 1994), et p74 (Kuzio *et al.*, 1989) sont présents dans tous les génomes des granulovirus séquencés (Wormleaton *et al.*, 2003). La protéine ODV-E25 semble être la mieux conservée (Wormleaton *et al.*, 2003). La protéine ODV-EC27 démontre une homologie aux cyclines cellulaires et elle peut jouer le rôle d'une cycline virale multifonctionnelle (Belyavsky *et al.*, 1998). La protéine p74 fait partie de l'enveloppe des virus inclus (OV) et elle participe dans le processus d'infection lors de l'ingestion de virus. Elle est responsable de l'attachement et/ou de la fusion du virion aux cellules de l'intestin moyen (Faulkner *et al.*, 1997 ; Kuzio *et al.*, 1989 ; Slack *et al.*, 2001). Jusqu'à présent, la p74 est la seule protéine de l'enveloppe du virus de phénotype OV pour laquelle la participation directe dans le mécanisme d'infection a été établie (Gorben *et al.*, 2003). Un autre groupe de gènes codant pour des protéines associées à l'enveloppe du phénotype OV et impliqués dans le processus d'infection *per os* a été identifié. Il s'agit des gènes *pif* et *pif-2* (*per os infectivity factor* – Gorben *et al.*, 2003 ; Kikhno *et al.*, 2002). Ces gènes sont bien conservés chez les baculovirus (Gorben *et al.*, 2003 ; Wormleaton *et al.*, 2003). Gorben *et al.*, (2003),

ont suggérés que le mécanisme de pénétration des virus de phénotype OV à l'intérieur des cellules épithéliales pendant l'infection serait hautement conservé à travers cette famille. Les gènes codant pour la protéine ODV-E18 (Rashidan *et al.*, 2004), pour l'ODV-E6/E56 (Rashidan *et al.*, 2002b), pour l'ODV-E66 (Rashidan *et al.*, 2002c) et pour la protéine p74 (Rashidan *et al.*, 2003) ont été aussi séquencés chez le ChfuGV.

En ce qui concerne les virus de phénotype BV, le gène codant pour la protéine F a été localisé chez tous les granulovirus séquencés jusqu'à maintenant (Wormleaton *et al.*, 2003). Cette protéine est propre également à certains virus NPV (groupe II) qui ne contiennent pas de glycoprotéine GP64, la protéine de fusion majeure de l'enveloppe du virus de phénotype BV (Monsma *et al.* 1996 ; Hyink *et al.*, 2002 ; Ijkel *et al.*, 2000). La protéine F est une protéine associée à l'enveloppe virale et elle déclenche la fusion de la membrane cellulaire avec l'enveloppe virale lors de l'entrée par l'endocytose du virus de phénotype BV à l'intérieur de la cellule (Westenberg *et al.*, 2004). La protéine F est un homologue du produit du gène *ld130* du nucléopolyédrovirus LdMNPV (Wormleaton *et al.*, 2003). Les homologues de ce gène ont été localisés également dans les génomes des nucléopolyédrovirus appartenant au groupe I et qui possèdent le gène *gp64* (Ijkel *et al.*, 2000).

Les résultats du séquençage du génome du virus ChfuGV obtenus jusqu'à présent indiquent la présence d'un gène codant pour un homologue de la glycoprotéine GP41 (Rashidan *et al.*, 2002d). Cette protéine, présente également chez tous les autres granulovirus séquencés au complet (Wormleaton *et al.*, 2003) et chez les nucléopolyédrovirus (Herniou *et al.*, 2003 ; Liu et Maruniak, 1999) constitue un élément composant majeur du tégment situé entre l'enveloppe et la nucléocapside d'un virus inclus (Kawamoto *et al.*, 1977 ; Liu et Maruniak, 1999). La GP41 est également impliquée dans l'assemblage des virions bourgeonnant (Olszewski et Miller, 1997b).

Au moins huit protéines majeures de la nucléocapside des granulovirus sont actuellement identifiées, soit : la P6.9, P12, P24, P39, P43, P78/83 et P80/87 et P91

(Hayakawa *et al.*, 1999). Les génomes des granulovirus entièrement séquencés indiquent la présence de quatre gènes codant pour les protéines de la nucléocapside. Il s'agit des gènes *p6.9*, *p24 capsid*, *vp39 capsid* et *vp91 capsid* (Wormleaton *et al.*, 2003). La protéine de la nucléocapside appelée P6.9 est une protéine basique qui joue un rôle dans l'organisation de l'ADN viral (Tweeten *et al.*, 1980). De plus, lors de l'infection, la phosphorylation de la protéine P6.9 entraîne le relâchement de l'ADN viral à l'intérieur du noyau de la cellule infectée (Blissard, 1996). Cette protéine est également responsable de la condensation de l'ADN viral avant son encapsidation lors de l'assemblage des virions (Wilson *et al.*, 1987). La protéine P24 fait partie de la surface de la nucléocapside et elle est exprimée lors de la phase tardive de l'infection virale (Wolgamot *et al.*, 1993). La protéine P39 est une composante majeure de la nucléocapside virale (Pearson *et al.*, 1988 ; Thiem et Miller, 1989). La protéine P39 est impliquée dans le déplacement de la nucléocapside du cytoplasme vers le noyau (Pearson *et al.*, 1988). La protéine de la nucléocapside P91 serait impliquée dans la stimulation de l'expression de certains gènes du virus (Lu *et al.*, 1997 ; Russell et Rohrmann, 1997). Les gènes codant pour les homologues des protéines P39 et P91 du granulovirus ont été identifiés chez le virus ChfuGV (Rashidan *et al.*, 2002f ; Rashidan *et al.*, 2002g). Le gène *vp1054* a été identifié chez tous les granulovirus entièrement séquencés (Wormleaton *et al.*, 2003). Le produit de ce gène, la protéine VP1054, est nécessaire pour un assemblage correct de la nucléocapside chez deux phénotypes du baculovirus (Olszewski et Miller, 1997a).

2.3.1.2. Gènes associés à la réplication de l'ADN viral et à la transcription.

Lors de la réplication virale, les gènes précoces (α et β) sont transcrits par l'ARN polymérase de l'hôte, mais il sont souvent activés par des produits des gènes viraux (Friesen, 1997). Chez les baculovirus, il existe un groupe de gènes qui sont essentiels pour la réplication de l'ADN baculoviral (*ie1*, *lef-1*, *lef-2*, *lef-3*, *helicase*), ainsi que pour la stimulation de ce processus (*p35*, *dna-pol*, *ie-2*, *lef-7*, *pe38*) (Lu *et al.*, 1997). Six de ces gènes, soit *ie1*, *lef-1*, *lef-2*, *lef-3*, *helicase* et *dnapol* sont conservés parmi tous les virus de cette famille séquencés jusqu'à présent (Wormleaton *et al.*, 2003).

Le gène *iel* qui code pour le facteur de l'expression précoce IE1 a été également séquencé chez le virus ChfuGV (Rashidan *et al.*, 2002c), ainsi que le gène *dnapol* qui code pour l'ADN polymérase virale (Rashidan *et al.*, 2002a). Le produit du gène *p35*, la protéine P35 (l'inhibiteur de l'apoptose – Clem, 1997) n'est pas exprimée chez les granulovirus, alors que la protéine inhibitrice IAP est codée par ce genre de baculovirus (Wormleaton *et al.*, 2003). Un gène de la famille *iap* a été également identifié chez le virus ChfuGV (Rashidan *et al.*, 2002b).

La transcription des gènes tardifs et très tardifs est effectuée par une ARN polymérase d'origine virale qui reconnaît le motif A/G/TTAAG (Grula *et al.*, 1983 ; Blissard et Rohrmann, 1990 ; Yang *et al.*, 1991). Les gènes nécessaires pour la transcription des gènes tardifs sont, entre autres, *lef-4*, *-5*, *-6*, *lef-8*, *-9*, *-10*, *-11*, *39k*, *p47* et *vlf-1* (Lu et Miller, 1997). Les produits des gènes *lef-4*, *-8*, *-9* et *p47* constituent un minimum nécessaire pour l'activation de la polymérase virale (Guarino *et al.*, 1998), tandis que le gène *vlf-1* code pour un régulateur de la transcription des gènes très tardifs (McLachlin et Miller, 1994 ; Yang et Miller, 1999). Parmi les granulovirus XcGV, PxGV, CpGV, AdorGV, AsGV, CIGV, PoGV et ChfuGV, les gènes *lef* sont généralement tous conservés, à l'exception du gène *lef-10* qui est absent chez les virus AoGV et PxGV (Hayakawa *et al.*, 1999 ; Rashidan *et al.*, 2003).

Dans le groupe des gènes actifs dans la réplication de l'ADN viral, il faut mentionner également les gènes impliqués dans le métabolisme des nucléotides. Les gènes *rnr* codent pour la ribonucléotide réductase, une enzyme qui catalyse la réduction des ribonucléoside diphosphates en deoxyribonucléosides nécessaires pour la synthèse d'ADN (Jordan et Reichard, 1998 ; Salema *et al.*, 1993). Les gènes *rnr* sont présents dans le génome du virus CpGV (Luque *et al.*, 2001), mais ils sont absents chez le virus PxGV (Hashimoto *et al.*, 2000), le virus XcGV (Hayakawa *et al.*, 1999) et le virus AoGV (Wormleaton *et al.*, 2003).

2.3.1.3. Gènes auxiliaires.

Les gènes auxiliaires ne sont pas nécessaires pour la réplication virale, mais leur présence et leur expression constituent un avantage sélectif pour les virus. En effet, les produits des gènes auxiliaires sont impliqués dans la réduction de la dépendance du virus vis-à-vis de l'hôte en augmentant l'adaptation du virus à son environnement biologique (O'Reilly, 1997). Parmi ces gènes, certains codent pour les ubiquitines qui sont des protéines impliquées entre autre dans la dégradation des protéines chez les eucaryotes (Guarino, 1998). Ces gènes sont conservés chez tous les baculovirus (Wormleaton *et al.*, 2003), même s'ils ne sont pas essentiels pour la réplication virale (Reilly et Guarino, 1996). Un gène codant pour l'ubiquitine a été séquencé chez le virus ChfuGV (Rashidan *et al.*, 2003).

Le gène *sod*, qui code pour la superoxide dismutase, ou SOD est bien conservé parmi les baculovirus, (Tomalski *et al.*, 1991 ; Pardini, 1995). L'enzyme SOD assure la protection du virus contre l'oxydation en neutralisant les radicaux libres (Pardini, 1995). Le gène *sod* est également présent chez le virus ChfuGV (Rashidan *et al.*, 2003).

Les travaux portant sur le séquençage du virus ChfuGV ont permis de localiser un gène codant pour l'enhancine (Bourrassa 2000). Cette métalloprotéine est localisée dans le corps d'inclusion et, suite à la désintégration de cette structure lors de l'infection, l'enhancine provoque la dégradation de la membrane péritrophique de l'intestin de l'insecte, ce qui facilite le passage des virions enveloppés vers la surface des cellules intestinales (Decksen et Granados, 1988 ; Wang *et al.*, 1994). Les homologues du gène codant pour l'enhancine sont souvent présents en quelques copies dans certains génomes des baculovirus (p. ex. HaGV, PuGV, TnGV - Popham *et al.*, 2001), alors que certains baculovirus ne les possèdent pas (p. ex. PxGV, AdorGV, CpGV - Hashimoto *et al.*, 2000 ; Wormleaton *et al.*, 2003). Il est intéressant de mentionner que l'ajout d'enhancine dans les formulations de bio-pesticides peut améliorer significativement leur efficacité (Granados *et al.*, 2001).

La présence des gènes codant pour la chitinase et pour la cathepsine constitue également une caractéristique spécifique pour chaque espèce baculovirale. Parmi les granulovirus, ces gènes ont été identifiés entre autre chez le virus CpGV (Kang *et al.*, 1998) et le XcGV (Hayakawa *et al.*, 1999). La chitinase et la cathepsines sont des enzymes qui participent dans le processus de liquéfaction des larves infectées par le virus (Hawtin *et al.*, 1995 ; Hawtin *et al.*, 1997).

Le génome des baculovirus renferme également les gènes *pk* et *ptp* qui codent respectivement pour les protéines kinases (PK) (Reilly et Guarino, 1994) et pour les protéines tyrosine phosphatases (PTP) (Luque *et al.*, 2001). Les protéines PK sont impliquées dans la phosphorylation des protéines virales et celles de l'hôte, un mécanisme important pour la régulation de l'activité cellulaire au niveau moléculaire. Les homologues des gènes codant pour les protéines PK et PTP ne sont pas conservés chez toutes les espèces des baculovirus. Les gènes *pk* ont été identifiés chez tous les granulovirus entièrement séquencés (Wormleaton *et al.*, 2003), tandis que les gènes *ptp* sont présents seulement chez le CpGV (Luque *et al.*, 2001). Un homologue du gène *pk*, le gène *pk-1*, a été également identifié chez le virus ChfuGV (Giannopoulos *et al.* 2005).

Le génome complexe décrit brièvement ici permet aux baculovirus d'interagir avec leur hôte non seulement au niveau cellulaire, mais aussi au niveau systémique, en manipulant la structure et la physiologie de l'insecte infecté. Par exemple, les chitinases et les cathepsines permettent d'altérer l'exosquelette de la larve et faciliter le relâchement des particules virales (Blissard, 1996). De même, le produit du gène *egt* permet au virus de prendre le contrôle de la mue, un processus physiologique fondamental dans le développement des insectes. La caractérisation moléculaire du gène *egt*, ainsi que son produit, l'enzyme ecdysone UDP-glucosyltrasférase (EGT) sont les principaux objectifs de ce travail.

3. La protéine ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase (EGT) des baculovirus

Durant son développement, une larve passe par quelques stades de développement consécutifs jusqu'à l'arrivée à sa forme adulte. Le passage entre les stades de développement est marqué par le processus de la mue. Du point de vue physiologique, la mue est régulée par différents facteurs. En effet, au niveau hormonal, l'hormone juvénile empêche la mue tandis qu'une deuxième hormone, l'ecdysone, induit ce processus et permet le passage vers la forme adulte. La balance dynamique entre ces deux hormones détermine l'état actuel du développement post-embryonnaire de l'insecte. Ainsi, lorsque la concentration en ecdysone augmente, les larves se préparent à la mue, ce qui se manifeste, entre autre, par l'arrêt de la consommation de la nourriture (Nakai *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 1996).

L'ecdysone appartient à la famille des stéroïdes et elle est produite par la glande prothoracique, située dans la partie thoracique de la larve. L'hormone est synthétisée sous forme de 3-déshydroxyecdysone, puis réduite par la 3-hydroxyecdysone- β réductase en ecdysone (la forme circulatoire). L'ecdysone est distribuée par l'hémolymphe vers les cellules de la larve où elle est hydroxylée par l'ecdysone-20-monooxygénase en 20-hydroxyecdysone, la forme active de l'hormone. Sous cette forme, l'hormone entre dans la cellule cible et est transportée vers les récepteurs spécifiques du noyau. La réponse cellulaire qui s'ensuit varie selon la cellule stimulée par la 20-hydroxyecdysone et sa fonction dans le déroulement de la mue (Caradoc-Davies *et al.*, 2001). La concentration en ecdysone est régulée par plusieurs facteurs, parmi lesquels une activité enzymatique joue un rôle de premier rang. En effet, l'ecdysone UDP-glucosyltransférase produite par les baculovirus est sécrétée dans l'hémolymphe des insectes à partir des cellules infectées (Park *et al.*, 1996). Cette enzyme catalyse le transfert d'une molécule de glucose ou de galactose associée à l'UDP, vers la forme circulatoire de l'ecdysone, ce qui produit une molécule de 22 - O - β - D - glucopyranoside ou de 22 - O - β - D - galactopyranoside (Evans et O'Reilly, 1999). La conjugaison de l'ecdysone avec une molécule hydrophile (glucose ou galactose) empêche son passage à travers la membrane cellulaire (Caradoc-Davies

et al. 2001) et la solubilise, facilitant ainsi son élimination par l'organisme infecté (Evans et O'Reilly, 1998). La balance hormonale est basculée en faveur de l'hormone juvénile et le passage vers la mue est ralenti ou arrêté complètement, comme il était observée chez plusieurs espèces virales (Burand et Park, 1992 ; Elridge *et al.*, 1992 ; O'Reilly et Miller, 1989). Par conséquent, les larves infectées maintiennent leur comportement alimentaire, elles augmentent leur poids corporel, ce qui se traduit également par une augmentation de la production virale (O'Reilly, 1995). La capacité de contrôler la mue donne alors au virus un avantage compétitif, car le rendement est un élément important de la stratégie de l'adaptation et de la survie. Cependant, la nature exacte de cet avantage n'est pas tout à fait claire (Wilson *et al.*, 2000).

L'utilisation des virus mutants qui n'expriment pas le gène *egt* (*egt*⁻) ont démontré que les larves infectées par ce type de virus succombent plus rapidement à l'infection et consomment moins de nourriture que les larves infectées par le virus sauvage (Elridge *et al.*, 1992 ; Wilson *et al.*, 2000). Par conséquent, une délétion du gène *egt* chez les baculovirus utilisés comme insecticide permet d'augmenter leur pouvoir insecticide par rapport à la souche sauvage. Toutefois, certains effets significatifs de la délétion du gène *egt* sont limités seulement au dernier stade du développement larvaire (la mortalité accélérée) et aux femelles seulement (la diminution du poids corporel). Néanmoins, du point de vue de la lutte biologique, la réduction de la quantité de la nourriture assimilée par un insecte infecté par le virus mutant *egt*⁻ constitue un phénomène important (Wilson *et al.*, 2000).

3.1. Gène *egt* et son produit d'expression

Le gène *egt* a été identifié pour la première fois dans le génome du virus AcMNPV, le baculovirus - modèle. Ce gène de 1518 pb est transcrit en ARNm de 1,7 kDa, et il code pour une pro-enzyme de 506 acides aminés d'une masse moléculaire estimée à 57 kDa (O'Reilly et Miller, 1989). Considéré comme non essentiel pour la réplication virale, le gène *egt* est présent dans tous les génomes baculoviraux séquencés jusqu'à présent, à l'exception du granulovirus XcGV (Hayakawa *et al.*, 1999)

et du polyèdrevirus de *Culex nigripapulus* (CnSNPV – Afonso *et al.*, 2001). Les promoteurs des gènes *egt* renferment les motifs précoces (CAGT) et tardifs (GTAAG), ainsi que la boîte TATA. Evans et O'Reilly (1999) ont démontré la présence de la protéine EGT de 6 à 72 heures après l'infection. Chez l'AcMNPV, la région *N*-terminale de la pro-enzyme EGT est caractérisée par la présence d'un peptide signal de 18 acides aminés, spécifique aux protéines sécrétées (O'Reilly *et al.* 1992). L'utilisation des lignées cellulaires infectées par l'AcMNPV a permis la purification de la forme sécrétée de l'EGT (O'Reilly *et al.* 1992). Cette protéine est clivée avant son excrétion par les cellules infectées pour donner la forme finale de l'enzyme. Cette observation a été également confirmée *in vivo* (O'Reilly 1995). Evans et O'Reilly (1999) ont démontré que la protéine EGT est glycosylée. Cette protéine contient en effet sept sites potentiels de *N*-glycosylation (Evans et O'Reilly, 1999).

Toutes les protéines EGT identifiées jusqu'à présent possèdent un peptide signal au niveau de la région *N*-terminale de la protéine, ainsi que six domaines homologues hautement conservés. (Manzàn *et al.*, 2002). Les protéines EGT des granulovirus sont plus courtes que leurs homologues chez les NPV. Cette différence au niveau de la partie *C*-terminale apporte un domaine homologue additionnel, conservé parmi les NPV (Khan *et al.*, 2003).

Le gène *egt* a été également identifié chez le virus ChfuGV par Bah *et al.*, (1998), et séquencé au complet par Bourrassa (2000). Ce gène se trouve dans la région conservée qui code pour la granuline, sur le brin anti-sens, et il est composé de 1344 nucléotides. Selon les analyses effectuées par Bourrassa (2000), le gène *egt* du ChfuGV possède des promoteurs TATA au niveau de sa région promotrice. Le gène *egt* du ChfuGV code pour une protéine de 50 kDa. Cette protéine est composée de 448 acides aminés, dont les 17 premiers constituent le peptide signal. La protéine EGT du ChfuGV contient sept sites potentiels de *N*-glycosylation, ainsi que les domaines conservés homologues aux protéines EGT des autres baculovirus et aux enzymes UDPGT.

La disponibilité des cultures cellulaires permissives à l'infection par granulovirus pour produire la protéine EGT est extrêmement limitée à certaines espèces de ce genre (p.ex. CpGV, PoGV - Taha *et al.*, 2000). De plus, les résultats obtenus jusqu'à présent avec la production de granulovirus utilisant ces cultures cellulaires sont mitigés (Léry *et al.*, 1997 ; Winstanley et Crook, 1993). Ainsi et afin de caractériser les propriétés moléculaires et immunologiques de la protéine EGT du ChfuGV, l'utilisation du vecteur d'expression approprié pour exprimer cette protéine constitue la meilleure approche pour atteindre cet objectif.

4. Système d'expression

La production d'une protéine recombinante en utilisant un système d'expression constitue une méthode très importante pour la recherche fondamentale et pour l'industrie biotechnologique et pharmaceutique. En général, cette méthode permet d'obtenir des quantités importantes de la protéine d'intérêt de façon relativement simple et efficace. La première protéine produite de cette façon fut la somatostatine (Itakura *et al.*, 1977). Le gène codant pour cette protéine avait été cloné dans un plasmide spécialement préparé et cette construction avait été utilisée pour transformer les bactéries *Escherichia coli*, dans lesquelles la production de la somatostatine recombinante avait eu lieu. À l'échelle commerciale, la production de l'insuline fut la première application industrielle de l'expression des protéines recombinantes (Goeddel *et al.*, 1979 ; Watson *et al.*, 1994).

Aujourd'hui, après plus de 25 ans de développement dans ce domaine, une vaste gamme de systèmes d'expression est disponible. Chaque système d'expression est optimisé pour satisfaire aux exigences particulières et pour être conforme à l'application prévue de la protéine recombinante. Généralement, les systèmes d'expression des protéines existants peuvent être divisés en deux grandes catégories: les systèmes d'expression procaryotes utilisant la bactérie *E.coli*, et les systèmes d'expression eucaryotes utilisant les levures, les cellules de mammifères et d'insectes, ainsi que les cellules végétales.

4.1. Système d'expression procaryotique

4.1.1. Bactéries

Dans un système d'expression bactérien, le vecteur d'expression (plasmide recombinant) comportant le gène codant pour la protéine d'intérêt est introduit dans la bactérie appropriée par une simple transformation, puis les transformants obtenus sont amplifiés. L'expression de la protéine est induite selon le système d'expression employé et la protéine produite est purifiée à partir du milieu de culture. L'expression d'une protéine recombinante dans ce système est relativement rapide, simple, et offre généralement un bon rendement. Par contre, en utilisant ce système, il existe une possibilité d'un repliement incorrect de la protéine exprimée, ce qui pourrait produire une protéine insoluble ou inactive. Un autre inconvénient majeur dû à l'utilisation de ce système d'expression bactérien est l'incapacité des cellules procaryotes à effectuer des modifications post-transcriptionnelles.

4.2. Système d'expression eucaryotique

4.2.1. Levures

L'expression dans un système utilisant les levures permet d'obtenir les protéines recombinantes qui ont subi les modifications post-transcriptionnelles, telles que la glycosylation et la phosphorylation. Dans ce système, les plasmides recombinants sont introduits dans les cellules hôtes par des techniques de transformation ou d'électroporation. Le rendement de production est élevé, allant jusqu'à 30% de la masse totale des protéines de la levure. De plus, l'ajout d'un signal de sécrétion à la protéine peut faciliter sa purification, puisqu'elle est sécrétée hors de la cellule hôte et il est possible de la récupérer à partir du milieu extracellulaire. Par contre, en utilisant ce système, les protéases de la levure peuvent nuire à la production de la protéine recombinante. (Anonyme, 2001 ; Watson *et al.*, 1994).

4.2.2. Cellules d'insectes

Les systèmes d'expression des protéines recombinantes dans les lignées de cellules d'insectes, telles les cellules de *Drosophila melanogaster* (Schneider, 1972) ou de *Bombyx mori* (Maeda, 1989), utilisent les vecteurs dérivés des baculovirus (*baculovirus expression systems* ou BES). Ces systèmes se caractérisent par un haut rendement, obtenu principalement grâce à l'emploi de puissants promoteurs des gènes de la phase très tardive de la réplication, tel que le promoteur de polyédrine, pour le contrôle de l'expression de la protéine d'intérêt. (Farrell *et al.*, 1998 ; Keith *et al.*, 1999). Or, l'expression des protéines dans la phase tardive empêche l'excision efficace des introns de l'ADN exprimé (O'Reilly *et al.*, 1992 ; Sumathy *et al.*, 1996). Les autres désavantages de la première génération des systèmes d'expression baculoviraux sont éliminés successivement et de nouvelles versions des systèmes BES sont présentement disponibles. Ces systèmes assurent la production continue de la protéine d'intérêt, ainsi que la glycosylation appropriée. De plus, l'emploi des promoteurs des gènes tardifs et précoces pour le contrôle de l'expression permet d'assurer l'excision nécessaire du transcrit (Farrell *et al.*, 1998).

4.2.3. Cellules de mammifères

L'expression des protéines provenant de vertébrés dans des lignées cellulaires de mammifères permet toutes les modifications transcriptionnelles requises puisque les signaux de synthèse, de maturation moléculaire et de sécrétion de la protéine recombinante sont reconnus par ces cellules. Par contre, le rendement de ce système est faible. Une approche plus récente consiste à insérer directement le plasmide recombinant *in vivo* dans les cellules de mammifères. En effet, Gordon et Ruddle (1981) ont été les premiers à introduire l'ADN récombinant dans le génome des souris et à produire une progéniture transgénique. Depuis, plusieurs animaux (e.g. cochon, vache, mouton, chèvre) sont utilisés pour la production de protéines recombinantes.

5. Immunisation génétique

L'immunisation génétique est un procédé qui consiste à administrer *in vivo* des plasmides recombinants contenant l'ADN codant pour un ou plusieurs antigènes, à un organisme pour induire une réponse immunitaire contre ce ou ces antigènes (Kucerova, 1998).

5.1. Historique

La vaccination est un moyen efficace et bien rodé dans la lutte contre les maladies infectieuses. La vaccinologie a progressée de façon remarquable depuis les travaux de Louis Pasteur et Edward Jenner sur les vaccins atténués et inactivés. Tout récemment, la technologie de l'ADN recombinant a permis de produire des vaccins basées sur les sous unités des antigènes spécifiques. L'immunisation génétique constitue un ajout relativement récent, mais tout à fait fondamental dans ce domaine.

En janvier 1987, Felgner et collaborateurs ont noté qu'un tissu pouvait être transfecté *in vivo* par lipofection. À l'occasion de ces expériences, l'expression des protéines fut observée dans les muscles, lesquels avaient été injectés directement avec le plasmide contenant le gène rapporteur. Cette constatation avait conduit à la conclusion que la lipofection n'avait pas été nécessaire pour l'expression des protéines, et que cette dernière était même plus forte en absence des lipides cationiques lors de la transfection *in vivo* (Felgner, 2003). Par la suite, Wolff et collaborateurs (1990) ont confirmé que l'injection dans les muscles de souris d'un vecteur à ADN menait à l'expression *in vivo* des gènes clonés et à une activité biologique des protéines exprimées allant jusqu'à 60 jours suivant l'injection. Cependant, le niveau de l'expression des gènes rapporteurs restait trop faible pour servir à des applications cliniques de la méthode.

Par ailleurs, Tang et collaborateurs (1992) ont démontré que l'administration par un canon à gène (*gene gun*) d'un vaccin à ADN suscitait une réponse immunitaire. En effet, l'introduction d'un gène codant pour l'hormone de croissance humaine (HGH)

au niveau des cellules épidermales de souris induit la production d'anticorps anti-HGH. Cette réponse était amplifiée par des immunisations subséquentes. Ces résultats suggèrent que l'immunisation génétique peut être une méthode de production d'anticorps plus simple que les techniques de vaccination traditionnelles, permettant ainsi une économie de temps et d'effort. En 1993, Ulmer et collaborateurs ont rapporté que l'injection directe d'un plasmide codant pour la nucléoprotéine du virus de l'influenza A/PR/8/34 menait à la production d'anticorps, au recrutement des lymphocytes T cytotoxiques et auxiliaires, et à l'induction de la mémoire immunobiologique chez la souris. Plus tard, Robinson *et al.*, (1993), ont immunisé avec succès un poulet contre le virus létal de l'influenza H7N7 en utilisant un vaccin à ADN codant pour l'hémagglutine H7. Depuis ce temps, plusieurs expériences ont démontré que les vaccins à ADN pourraient susciter une réponse immunitaire contre plusieurs autres pathogènes comme le virus de herpes bovin, le virus de la rage, le virus de l'hépatite B et C humain, le virus de la leucémie bovine, le virus de la leucémie des cellules T humaines de type 1 (HTVL-1), le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) chez une variété de modèles animaux tel que les chats et les macaques (Kucerova, 1998).

Les vaccins à ADN ont de nombreux avantages comparé aux vaccins traditionnels. Par ces avantages, les vaccins à ADN permettent la synthèse d'un antigène purifié dans sa conformation native, ce qui assure la compatibilité de l'antigène avec les cellules du système immunitaire et favorise la production d'anticorps dirigés contre l'antigène (Kucerova, 1998 ; Mor, 1998). Dans le cas d'un vaccin traditionnel, basé sur l'injection de protéines recombinantes ou d'antigènes purifiés, les antigènes sont souvent contaminés par d'autres protéines ou microorganismes et ils sont généralement moins stables et moins résistants aux variations des conditions externes (Kucerova, 1998). Ainsi, des contraintes importantes s'imposent lors de la manipulation de vaccins traditionnels (Pasquini *et al.*, 1997). Un avantage important des vaccins à ADN est leur capacité d'induire une réponse humorale et cellulaire, comparativement aux vaccins traditionnels qui induisent uniquement une réponse humorale (Sheikh et Morrow, 2003 ; Daria-Rose et Haighwood, 2003). Cependant, l'utilisation des vaccins à ADN suscite certaines inquiétudes. En effet, l'injection répétée lors de l'administration de vaccins

génétiques pourrait mener à la formation d'anticorps anti-ADN ou au recrutement des lymphocytes T contre les cellules exprimant l'antigène, ce qui pourrait mener à une réaction auto-immune (Mor, 1998). Par ailleurs, un risque de l'intégration du plasmide ADN à l'intérieur du génome de l'hôte existe. Cette intégration peut provoquer l'activation des oncogènes, l'inactivation éventuelle des gènes supprimant les tumeurs et, par conséquent, favoriser la croissance des tumeurs malignes (Gurunathan *et al.*, 2000).

5.2 Mécanismes de stimulation de la réponse immunitaire

Lors du processus de l'immunisation génétique, la première étape consiste à introduire l'ADN nu (plasmide recombinant contenant le gène codant pour la protéine) à l'intérieur des cellules eucaryotes. Un promoteur fort provenant du plasmide recombinant ainsi que l'appareil transcriptionnel de la cellule infectée permettent la transcription de l'ADN en ARN messager. La traduction de l'ARN messager conduit à la production de la protéine recombinante qui constitue ainsi l'antigène contre lequel les anticorps seront produits.

En général, quand un agent pathogène pénètre dans le milieu intérieur, le système immunitaire agit par deux principaux types de réaction de défense différents, à savoir, la réponse humorale et la réponse à médiation cellulaire. La réponse humorale vise à produire des immunoglobulines (anticorps) contre les épitopes propres à l'agent pathogène. La réponse cellulaire se manifeste principalement par la destruction des cellules infectées par l'agent pathogène.

La réponse immunitaire cellulaire est assurée d'une part par les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL CD8⁺) qui reconnaissent et détruisent toutes les cellules exprimant les peptides étrangers en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (CMH I). Dans ce cas, les peptides présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) proviennent des protéines de l'agent pathogène exprimées de façon endogène par les cellules CPA infectées.

Ces protéines sont dégradées en peptides qui vont s'associer avec les molécules du CMH classe I nouvellement synthétisées dans le réticulum endoplasmique. Les complexes CMH I/peptides sont transportés à la surface de la cellule CPA pour être présentés aux CTL CD8⁺. Les CTL CD8⁺ détruisent les cellules présentatrices d'antigène soit par l'action des ligands *Fas*, soit par l'action des perforines (Sheikh et Morrow 2003). D'autre part, les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (TH) réagissent à la présence de l'agent pathogène par la sécrétion de cytokines qui stimulent l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire, ainsi que la production des phagocytes, cellules chargées de tuer et d'ingérer les agents pathogènes, ainsi que les débris de cellules (Sheikh et Morrow 2003).

La réponse des cellules T CD4⁺ est déclenchée suite à la rencontre des cellules CPA exprimant les peptides étrangers en association avec les molécules du CMH classe II. Dans ce cas, les protéines de l'agent pathogène sont captées par les CPA par endocytose. L'action des enzymes protéolytiques dans les endosomes réduit les protéines en peptides immunogéniques. Les complexes CMH II / peptides formés ensuite sont transportés à la surface de la cellule CPA pour être présentés aux lymphocytes T CD4⁺. Une fois activées, les cellules T CD4⁺ sécrètent des cytokines pléiotropiques essentielles pour l'immunité cellulaire et humorale. En fait, les cellules T CD4⁺ humaines peuvent être divisées en deux sous-populations, TH₁ et TH₂ qui se distinguent par la nature des cytokines qu'elles produisent. Les cellules TH₁ sécrètent l'interleukine 2 (IL-2), l'interleukine 12 (IL-12), l'interféron γ (INF γ) et le facteur de tumeur nécrosée β (TNF β). Ces cytokines sont nécessaires pour l'immunité cellulaire. Elles permettent l'augmentation de l'activité cytolytique des cellules CD8⁺ cytotoxiques. Les cellules TH₂ sécrètent les interleukines IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10 qui permettent l'activation des cellules B à produire des anticorps (réponse humorale).

En principe, l'activation des lymphocytes T nécessite la génération d'au moins deux signaux. Le premier signal est généré à la suite de l'interaction de l'antigène associé aux molécules du CMH classe I ou II, des CPA, avec le récepteur pour l'antigène (TCR) des cellules T. Cette interaction spécifique entre l'antigène et le TCR est accompagnée

par des interactions entre les régions non-polymorphiques des molécules du CMH classe I et II et les co-récepteurs CD8 et CD4, respectivement. Le second signal (signal co-stimulateur) est généré à la suite de l'interaction des molécules accessoires B7 (CD80/CD86) sur les CPA avec les co-récepteurs CD28 ou CT LA4 présents à la surface des lymphocytes. Une fois reçus, ces signaux sont transportés de la membrane de la cellule au noyau à travers différentes cascades de signalisation cellulaire qui agissent en synergie pour aboutir à l'activation de la transcription du gène de l'IL-2 et, éventuellement, à la prolifération cellulaire. Les molécules du CMH classe I sont exprimées à la surface de toutes les cellules alors que les molécules du CMH classe II sont présents seulement chez les cellules de Langerhans (LHC).

La question fondamentale liée à l'immunisation génétique concerne le mécanisme par lequel l'antigène subit une maturation moléculaire et est présenté aux cellules du système pour susciter une réponse immunitaire. L'administration de l'ADN nu lors de l'immunisation génétique nécessite le processus enzymatique cytosolique pour assurer la production de la protéine d'intérêt afin de stimuler la réponse immunitaire cytotoxique restreinte aux molécules CMH classe I, alors que l'ADN nu est considéré généralement comme incapable de générer la production d'anticorps qui est induite normalement par les cellules TH₂, restreintes aux molécules du CMH classe II. Cependant, l'immunisation génétique conduit à la production d'anti-corps spécifiques à l'antigène exprimé (Sheikh et Morrow, 2003). Quel serait donc le mécanisme impliqué dans la stimulation du système immunitaire lors de l'immunisation génétique ? Au moins deux possibilités sont avancées pour expliquer le mécanisme de cette stimulation : une transfection directe des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA), ou une induction croisée par les cellules somatiques transfectées (« *cross-priming* »). Dans le dernier cas, les cellules somatiques transfectées par l'ADN plasmidique expriment l'antigène qui est repris ensuite par les cellules CPA qui vont le présenter, en association avec les molécules du CMH classe II, aux lymphocytes CD4⁺ TH₂ appropriés (Sheikh et Morrow, 2003 ; Gurunathan *et al.*, 2000). Le mécanisme exact impliqué dans le processus de stimulation du système immunitaire dépend de la voie

d'immunisation et de la technique d'administration de l'ADN nu (Sheikh et Morrow, 2003 ; Doria-Rose et Haighwood, 2003).

5.2.1. Voies d'immunisation

Parmi les facteurs déterminant dans l'élaboration d'une réponse immunitaire du type cellulaire et humorale, la voie d'administration du vaccin à ADN constitue un élément de première importance (Doria-Rose et Haighwood, 2003 ; Sasaki *et al.*, 2003).

Comme pour tous les vaccins, l'ADN plasmidique nu peut être administré dans les muqueuses, par voie intramusculaire (i.m.), orale ou cutanée (i.d.) (Doria-Rose et Haighwood, 2003 ; Hobson *et al.*, 2003). Chaque voie possède ses propres caractéristiques résultantes de la composition histologique du lieu d'immunisation et du mécanisme de la protection immune existante à ce niveau. En effet, les muqueuses se caractérisent par une sub-compartimentation du système immunitaire commun pour ces tissus selon leur localisation anatomique. Par conséquent, les mécanismes de présentation de l'antigène dans les muqueuses nasale et intestinales suite à l'immunisation seraient différents. En termes généraux, l'immunisation au niveau des muqueuses favorise le développement des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺, des CTL et des lymphocytes T-IgA. Ainsi, la transfection directe des cellules CPA serait probablement le mécanisme d'immunisation impliqué pour induire une réponse immunitaire au niveau des muqueuses (Hobson *et al.*, 2003). Dans la voie i.d., le même mécanisme d'administration de l'ADN nu serait utilisé grâce à la présence permanente et massive des cellules CPA professionnelles, tel que les cellules dendritiques dans la derme, et les cellules de Langerhans dans l'épiderme (Peachman *et al.*, 2003). Suite à la transfection, les cellules CPA migrent vers le nodule lymphatique local où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T (Peachman *et al.*, 2003). Cependant, il a été démontré que lors d'injections cutanées, les kératinocytes et les cellules de Langerhans sont les principales cellules transfectées et l'ablation de la peau inoculée empêche le développement d'une réponse immunitaire (Raz *et al.*, 1994). Il est donc possible que les cellules somatiques servent principalement de réservoir exprimant

l'antigène et qu'une induction croisée soit essentielle à l'induction d'une réponse immunitaire à ce niveau. En ce qui concerne la voie intramusculaire, des études récentes ont permis d'écarter la possibilité de transfection directe des cellules CPA résidentes dans le muscle (Shen *et al.*, 2002). En effet, les cellules CPA sont peu nombreuses dans le tissu musculaire et la probabilité de transférer ces cellules est minimale. Par contre, l'induction croisée par les myocytes semble être très probable et d'autant plus que l'immunisation par la voie intramusculaire produit une réponse humorale et cellulaire. Cependant, le mécanisme du transfert de l'antigène d'origine exogène vers les cellules CPA qui vont le présenter en association avec les molécules du CMH classe II soulève la question de la stimulation de la réponse cellulaire des lymphocytes T CD8⁺ restreinte aux molécules du CMH classe I (Sheikh et Morrow, 2003).

5.2.2. Techniques d'immunisation

Lors de l'immunisation génétique, l'ADN peut être administré par une injection à l'aide d'une aiguille (injection intramusculaire ou intradermale), soit à l'aide des outils biolistiques. Il peut être également être administré avec la nourriture. Ces méthodes peuvent produire différents types de réponses immunitaires (Doria-Rose et Haighwood, 2003). Lors de l'injection à l'aide d'une aiguille, l'ADN plasmidique purifié est suspendu dans une solution saline et administré à des sites différents au niveau des tissus. La voie la plus commune est l'injection intramusculaire au niveau des quadriceps antérieurs. Dans la technique biolistique, l'ADN plasmidique est administré en utilisant un canon à gène (« *gene gun* » - Sanford *et al.*, 1987). Cet appareil permet de bombarder les cellules à transférer par des micro-projectiles enrobés d'ADN plasmidique, ce qui permet d'ajuster la profondeur à laquelle les micro-projectiles pénètrent dans le tissu, ainsi que la quantité d'ADN injecté (Mor, 1998 ; Peachman *et al.*, 2003). D'une part, il a été suggéré que l'immunisation génétique par injection utilisant la voie intradermale et intramusculaire suscite principalement une réponse des cellules TH₁ alors que l'immunisation génétique utilisant le canon à gène suscite principalement une réponse des cellules TH₂ (Doria-Rose et Haighwood, 2003 ; Felquate *et al.*, 1997). D'autre part, Peachman *et al.* (2003) ont montré que les techniques biolistiques

permettent d'utiliser moins du matériel par rapport aux injections classiques et elles ciblent une surface plus grande qu'une aiguille. D'autres travaux ont également démontré que l'immunisation à l'aide d'un canon à gène permet d'augmenter de 10 à 100 fois l'expression à partir de l'ADN injecté par rapport à l'injection classique (Fynan *et al.*, 1993 ; Mumper et Cui, 2003 ; Tighe *et al.*, 1998).

5.3. Facteurs qui influencent la réponse immunitaire

Le pouvoir immunogénique d'un vaccin à ADN dépend de plusieurs facteurs, tel que la structure elle-même du vecteur d'expression, les motifs immunostimulateurs, la présence d'immuno-adjuvants, la séquence codante de l'antigène et le régime d'administration du vaccin (Sheikh et Morrow, 2003 ; Earlt et Thomsen, 2003 ; Sasaki *et al.*, 2003).

5.3.1. Vecteur d'expression

Les vecteurs d'expression restent les véhicules les plus répandus pour transporter les gènes étrangers à l'intérieur des cellules eucaryotes. Les vecteurs d'expression doivent être munis d'une origine de répllication (p.ex. ColEI de *E. coli*) pour maintenir leur propagation dans les cellules bactériennes et un gène de résistance à un antibiotique (e.g. kanamycine, ampicilline) pour permettre la sélection des bactéries transformées lors de la préparation de la culture bactérienne (Earlt et Thomsen, 2003). La présence d'un promoteur eucaryote, tel que le promoteur viral du cytomégalovirus (CMV) ou du virus simien 40 (SV40), est nécessaire pour assurer un haut niveau d'expression de la protéine à l'intérieur des cellules transfectées (Boshart *et al.*, 1985 ; Moreau *et al.*, 1981). Le promoteur fait partie de la cassette d'expression composée également du site de clonage multiple et d'une séquence de polyadénylation, nécessaire pour stabiliser l'ARN messenger transcrit (Earlt et Thomsen, 2003). La séquence du plasmide peut elle-même avoir un effet stimulateur additionnel du système immunitaire.

5.3.2. Contribution des motifs immunostimulateurs cytosine-phosphate-guanine

En 1986, Bird et collaborateurs ont noté la présence des motifs CpG qui sont 20 fois plus fréquents dans l'ADN procaryote que dans l'ADN eucaryote. Ces motifs sont composés de combinaisons de nucléotides cytosine-phosphate-guanine non méthylés et encadrés de deux purines en 5' et de deux pyrimidines en 3' (Krieg *et al.*, 1995 ; Krieg *et al.*, 1998). Les motifs CpG immuno-stimulants servent en effet d'adjuvant génétique et ils sont incorporés dans la structure des plasmides utilisés dans l'immunisation génétique (Chu *et al.*, 1997 ; Klinman 2003). Ainsi, la présence des motifs CpG dans la séquence des plasmides utilisés comme vaccin à ADN influence la réponse immunitaire. En effet, les motifs CpG stimulent la prolifération de plusieurs types de cellules du système immunitaire tel que les lymphocytes, les cellules NK et les CPA, ainsi que la sécrétion des cytokines immuno-stimulantes, tel que les interleukines IL-6, IL-12, l'interféron gamma (INF- γ), l'interféron alpha (INF α) et le facteur de tumeur nécrosée alpha (FTN- α) (Klinman *et al.*, 1996 ; Sato *et al.*, 1996 ; Klinman 2003), ce qui constitue une adaptation naturelle du système immunitaire à la menace provenant des micro-organismes (Sasaki *et al.*, 2003). Cependant le nombre exact des motifs CpG immuno-stimulants nécessaire à l'expression optimale de l'antigène reste à déterminer dû à l'action multidirectionnelle de ces motifs sur différents éléments du système immunitaire (Sasaki *et al.* 2003).

5.3.3. Adjuvant génétique

Une sélection soigneuse de l'adjuvant peut amplifier la réponse immunitaire suite à l'immunisation génétique. Le progrès acquis dans les domaines de l'immunologie et de la biologie moléculaire ont permis l'utilisation de différentes cytokines comme adjuvants, ainsi que le développement de nouveaux adjuvants conventionnels (Sasaki *et al.* 2003 ; Scheerlinck, 2000). Techniquement, le terme « adjuvant génétique » signifie les vecteurs d'expression qui comportent les gènes des cytokines et d'autres molécules qui modulent la réponse immunitaire et qui sont administrées en même temps que le vaccin à ADN. Les séquences codant pour les adjuvants peuvent être également

incluses dans le même vecteur d'expression que celui portant les séquences codantes pour l'ADN d'intérêt (Kim *et al.*, 1997 ; Sasaki *et al.* 2003 ; Xiang et Ertl, 1995).

5.3.3.1. Les cytokines

Parmi les facteurs déterminant dans l'élaboration d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire, la composition en cytokines sur le site d'immunisation est un élément de première importance (Sasaki *et al.*, 2003).

Les cytokines sont des protéines d'un faible poids moléculaire qui contrôlent les interactions entre les cellules lymphatiques, les cellules inflammatoires et les cellules hématopoïétiques (Kuby, 1997). En effet, les cytokines agissent comme des messagers intracellulaires dans la réponse immunitaire, stimulant ainsi les cellules associées à la réponse cellulaire qui activent les macrophages et les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (e.g., IL-2, IFN- γ , IL-12 et TNF- α) et les cellules associées à la réponse humorale (e.g., IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10) qui stimulent les lymphocytes B (Pasquini *et al.*, 1997 ; Sasaki *et al.* 2003). Le moment choisi pour injecter le gène codant pour une cytokine par rapport au gène codant pour l'antigène influence la réponse immunitaire (Barouch *et al.* 1998 ; Kusakabe *et al.*, 2000 ; Noormohammadi *et al.*, 2001).

5.3.3.2. Cytokines induisant la réponse cellulaire

L'administration d'un plasmide codant pour l'IFN- γ , l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15 ou l'IL-18 (cytokines des TH₁) comme adjuvant génétique lors de l'immunisation génétique permet d'induire une réponse cellulaire (Sasaki *et al.* 2003 ; Scheerlinck, 2001). Parmi ces cytokines, l'IL-2 a été la première utilisée comme adjuvant génétique. La molécule IL-2 sécrétée par les lymphocytes CD4⁺ TH₁ est reconnue pour activer les lymphocytes T et induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes T naifs en cellules T mémoires ou effectives (Kuby, 1997). Par ailleurs, des expériences ont montré que l'administration d'un plasmide codant pour l'IL2 reproduit les fonctions principales de l'IL-2 dans la réponse immunitaire en permettant d'augmenter

la production d'anticorps spécifiques, ainsi que le niveau d'IgG total dans le plasma et d'induire une réaction inflammatoire d'hypersensibilité retardée qui se manifeste lors du contact de l'antigène avec les cellules T CD4⁺ activées (Geissler *et al.*, 1999 ; Raz *et al.*, 1993).

5.3.3.3. Cytokines induisant la réponse humorale

L'utilisation des plasmides codant pour les cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ou IL-13 (cytokines des TH₂) comme adjuvants génétiques induit une réponse humorale. En effet, ces plasmides causent une augmentation des anticorps IgG1, des anticorps totaux et du ratio anticorps IgG1/IgG2a (Sasaki *et al.* 2003 ; Scheerlinck, 2001). À l'exception de IL-6, la réponse des cellules lymphocytes T cytotoxiques et la réaction d'hypersensibilité retardée diminue ou demeure inchangée lors de l'utilisation des cytokines sécrétées par les cellules CD4⁺ TH₂ comme adjuvant (Scheerlinck, 2001).

5.3.3.4. Cytokines pro-inflammatoires

La cytokine GM-CSF « *granulocyte/macrophages colony-stimulating factor* » stimule et recrute les cellules CPA et constitue un facteur de croissance des cellules dendritiques (Morrisey *et al.*, 1987; Caux *et al.*, 1992; Tao et Levy, 1993). Elle permet d'augmenter le titre d'anticorps (Scheerlinck, 2001). L'utilisation d'un vecteur comportant le gène codant pour cette cytokine (GM-CSF) comme adjuvant génétique lors d'immunisation génétique (exemple : vecteur codant pour les protéines du virus de la rage ou du virus VIH-1) augmente la réponse cellulaire ou humorale spécifique à l'antigène par rapport à l'injection du vecteur codant pour l'antigène seul (Kim *et al.* 1997 ; Xiang et Ertl, 1995).

5.3.3.5. Molécules co-stimulatrices

Les molécules co-stimulatrices (CD80/CD86) sont responsables de la co-stimulation des cellules T lors des réponses immunitaires à la suite de l'engagement du récepteur pour l'antigène (TCR) par complexe CMH/antigène (Kuby, 1997).

La présence de ces molécules augmente le ratio anticorps/IgG ainsi que la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (Scheerlinck, 2001). En effet, l'utilisation des plasmides codant pour les molécules co-stimulatrices CD86 (B7-2) ou CD80 (B7-1) comme adjuvant génétique accroît la réponse des cellules T auxiliaires et cytotoxiques (Sheikh et Morrow, 2003 ; Scheerlinck, 2001).

5.4. Perspectives

Présentement, la recherche dans le domaine de l'immunisation génétique est axée principalement sur le développement des plasmides de plus en plus efficaces, sur la théorie de la préparation du vaccin à ADN en vue de l'immunisation génétique et sur les mécanismes associés aux voies d'administration particulières, et sur les adjuvants. De nouvelles stratégies, comme celle de l'amorce-et-dose-rappel (« *prime-boost* ») sont développées pour augmenter l'efficacité des vaccins à ADN. Cette stratégie est basée sur les combinaisons de deux ou plusieurs modes de vaccination et elle vise d'une part à augmenter le niveau des cellules T CD4+ et CD8+, et d'autre part à générer une immunité cellulaire contre une variété d'antigène. Dépendamment de la combinaison utilisée, le niveau de la réponse cellulaire ou humorale peut être augmenté (Doria-Rose et Haighwood, 2003 ; Ramshaw et Ramsay, 2000). Également, l'immunisation génétique est de plus en plus appliquée dans la production d'anticorps spécifiques qui serviront pour la caractérisation moléculaire et immunologique des protéines recombinantes (Chambers et Johnston, 2003). C'est dans cette perspective que l'immunisation génétique sera utilisée lors de ce projet de recherche.

But et objectifs

Le projet présenté s'insère dans un projet d'envergure portant sur le génome et le protéome du granulovirus ChfuGV, un agent pathogène potentiel (bio pesticide), pour le contrôle biologique des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Notre projet consiste plus précisément à étudier la protéine EGT du ChfuGV qui jouerait un rôle important dans la mue des larves infectées. Nous supposons dans ce projet que le produit du gène *egt*, déjà identifié chez le virus ChfuGV soit un homologue fonctionnel de la protéine EGT du virus AcMNPV. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons établi les objectifs suivants au début de notre recherche :

- caractérisation moléculaire du gène *egt*, plus particulièrement :
 - o clonage, séquençage et analyse de la séquence en nucléotides, ainsi que de la séquence déduite en acides aminés du produit du gène *egt* pour s'assurer de son identité.
- caractérisation immunologique de la protéine EGT du virus ChfuGV.

Pour atteindre cet objectif nous allons :

- o produire la protéine recombinante EGT par l'expression du gène *egt* inséré dans un vecteur d'expression procaryote ;
 - o purifier la protéine recombinante et l'utiliser lors de tests ELISA et des analyses par immunobuvardage de type Western;
 - o insérer le gène *egt* dans un vecteur d'expression eucaryote (pcDNA3) et utiliser la construction ainsi obtenue lors de l'immunisation génétique pour la production des anticorps polyclonaux anti-EGT.
- caractérisation de la spécificité et de la cinétique de production des anticorps anti-EGT en présence ou en absence du vecteur pcDNA3 et de l'interleukine IL-2 comme adjuvant immunologique.

Matériel et méthodes

1. Production du ChfuGV et purification de l'ADN génomique

Le premier objectif de ce projet consistait à produire *in vivo* le virus ChfuGV et à purifier son ADN génomique. L'ADN génomique purifié du ChfuGV était nécessaire pour permettre l'isolation du gène *egt*.

1.1. Production et purification du ChfuGV

Étant donné l'absence d'une lignée cellulaire permissive pour la réplication du virus ChfuGV, le virus a été produit dans des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Des larves de deuxième stade de développement ont été fournies par le Service Canadien des forêts de Sault-Sainte-Marie. Les larves ont été déposées sur de la nourriture artificielle (Grisdale et Wilson, 1988) et ont été élevées dans une chambre environnementale (Growth Cabinet, Sanyo Caltec Scientific) à une température de 25°C, une humidité relative de 50% et une photopériode de 14 : 10 heures (jour : nuit). À leur quatrième stade larvaire, les larves ont été infectées par le virus en étalant 75 µl d'une suspension virale de 4×10^6 particules virales/ml sur 200 mm² de nourriture artificielle. Après une période d'incubation de 10 jours en présence du virus, les larves mortes et celles présentant des signes d'infection par le virus (un flétrissement, une liquéfaction ou un changement de la coloration du corps) ont été récoltées et conservées à -20°C.

Le virus a été purifié à partir des larves infectées selon la méthode de Tompkins (1991). Les larves infectées ont été homogénéisées (Omni-Mixer 17150, Du Pont Instruments, USA) dans une solution de SDS 1%. Ensuite, la suspension obtenue a été filtrée à travers une couche de coton à fromage d'une triple épaisseur, puis centrifugée à 300 x g pendant 5 minutes, afin d'éliminer les débris d'insectes. Le surnageant a été centrifugé à 10 000 x g pendant 25 minutes, afin de récupérer les particules virales et les cellules infectées par le ChfuGV. Le culot ainsi obtenu a été resuspendu dans une solution de NaCl 0,5 M et a été incubé durant 30 minutes à la température de la pièce pour permettre la lyse des cellules infectées. Ensuite, le lysat a été centrifugé deux fois pendant 10 minutes à 10 000 x g et le culot, contenant

les particules virales et les débris cellulaires, a été resuspendu dans de l'eau distillée stérile.

Les virus ChfuGV ont été purifiés par ultracentrifugation sur un gradient de glycérol. La suspension virale a été déposée sur un gradient discontinu de glycérol (Sigma, Canada) de 100% à 60% (v/v) et centrifugée à 19 000 \times g pendant 45 minutes à 4°C. Après la centrifugation, la fraction virale, située au niveau de la concentration en glycérol de 70%, a été récupérée, lavée trois fois dans l'eau stérile distillée et centrifugée à 10 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot contenant le ChfuGV purifié a été conservé à -20°C. L'intégrité des particules virales purifiées et la quantité de virus obtenue ont été vérifiées au microscope électronique.

1.2. Analyse par microscopie électronique du ChfuGV purifié

La microscopie électronique a été utilisée pour évaluer la concentration de la suspension virale et pour vérifier l'intégrité des virus purifiés. Ainsi, un volume de 100 μ l d'une suspension de billes de latex « S-130-3 polystyrène latex » (Agar Scientific, Royaume-Uni) à $3,51 \times 10^8$ billes/ml a été ajouté à 100 μ l de suspension de ChfuGV purifié diluée 1/2000. Ce mélange a été fixé sur des grilles de cuivre (MECALAB, Canada) suite à une centrifugation de 5 minutes à 50 000 x g. Ensuite, les grilles ont été rincées à l'eau distillée, séchées à la température de la pièce sur un papier buvard, puis colorées à l'acide phosphotungstique (PTA) à 3% (pH 6,0). Les grilles ainsi colorées ont été observées au microscope électronique (EM 300, Philips Electronics Industries Ltd., Eindhoven, Pays-Bas) à un agrandissement de 13 000 x. La concentration des particules virales purifiées a été déterminée en comparant leur nombre avec celui des billes de latex.

1.3. Isolation des nucléocapsides enveloppées du ChfuGV

Les nucléocapsides du virus ChfuGV ont été isolées suite à un traitement alcalin, suivi d'une ultracentrifugation sur un gradient de saccharose. Pour ce faire, 100 μ l

de la suspension de granulovirus purifiés ont été centrifugés à 10 000 x g pendant 5 minutes. Le culot obtenu a été resuspendu dans 500 µl d'une solution de Na₂CO₃ 0,5 M (pH 10.5). Suite à une incubation de 30 min à la température de la pièce, le mélange a été centrifugé à 6 000 x g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les nucléocapsides enveloppées détachées de leur corps d'inclusion, a été soumis au même traitement une seconde fois. Les deux fractions obtenues ont été combinées et déposées sur un gradient de saccharose discontinu de 50 % à 10 %. Suite à une centrifugation à 25 000 x g pendant 60 minutes à 4°C, la fraction contenant les nucléocapsides enveloppées a été récupérée, lavée dans l'eau distillée puis centrifugée à 25 000 x g pendant 60 minutes à 4°C. Le culot contenant les nucléocapsides enveloppées purifiées a été finalement resuspendu dans 200 µl de tampon TE, pH 7,0 (Tris-HCl, 10 mM, EDTA 1 mM) et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour l'extraction d'ADN viral.

1.4. Extraction et purification de l'ADN virale du ChfuGV

Les nucléocapsides enveloppées ont été digérées pendant 60 minutes à 37°C par la solution de protéinase K (250 µg/ml) dans un tampon TKS (tampon TE pH 7,4, et 0,5 % de SDS). Par la suite, l'ADN viral a été extrait en incubant la suspension des nucléocapsides digérées dans un volume de phénol saturé avec le tampon TE (pH 7,4), pendant 5 minutes à 4°C. Ce mélange a été centrifugé à 10 000 x g pendant 5 minutes et la phase aqueuse contenant l'ADN viral a été récupérée. L'extraction au phénol saturé a été répétée une fois de plus à partir de la phase aqueuse, puis l'ADN viral a été purifié 4 fois avec 1 volume de phénol : chloroforme : isoamyl (25 : 24 : 1), puis 2 fois avec 1 volume de chloroforme : isoamyl (24 : 1). L'ADN extrait a été précipité pendant 18 heures à -20°C en présence de 2,5 de volume d'éthanol 100 % glacial et 0,1 volume de CH₃COONa 3 M (pH 5,2). Ensuite, l'ADN a été sédimenté par centrifugation à 16 000 x g pendant 25 minutes et lavé dans 1ml d'éthanol à 70%. Finalement, l'ADN a été centrifugé à 16 000 x g pendant 10 minutes et resuspendu dans 30 µl de tampon TE (pH 7,4) puis conservé à -20°C. La pureté et la quantité d'ADN viral ainsi extrait

ont été vérifiées en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 260 nm et de 280 nm, ainsi que par une électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %).

Afin d'analyser les échantillons d'ADN viral, des électrophorèses sur gel d'agarose à 0,8% (p/v) dans un tampon TAE (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) ont été effectuées. Les échantillons d'ADN viral à analyser et le marqueur de poids moléculaire de 1 kpb (Invitrogen Corporation) ont été dilués dans le tampon de charge de bleu de bromophénol (0.25% p/v), de Xylène-Cyanol 0.25% (p/v), et de glycérol 30% (v/v). Un volume de 5 µl des échantillons a été déposé dans les puits d'un gel d'agarose disposé dans un appareil d'électrophorèse horizontale (Horizon™ 11.14 BRL, Life Technologie inc) rempli du tampon TAE. Pour permettre la migration de l'ADN, un courant constant de 100 V a été appliqué durant 30 minutes. Par la suite, le gel a été coloré au bromure d'éthidium 10 µg/ml et les bandes d'ADN ont été visualisées, sous les rayons UV d'un transilluminateur (Bio-Rad, Canada). La longueur des fragments d'ADN a été déterminée en comparant leur distance de migration sur le gel avec celles des fragments du marqueur de poids moléculaire de 1 kpb.

2. Expression de la protéine EGT dans un système procaryote

L'ADN viral purifié du ChfuGV a été utilisé comme matrice lors de l'amplification par PCR du gène codant pour la protéine EGT. Le gène *egt* amplifié a été cloné dans le vecteur pCR[®]2.1 afin d'augmenter sa stabilité puis a été sous cloné dans le vecteur d'expression pQE32. Le vecteur recombinant obtenu a été séquencé afin de s'assurer de l'intégrité de la séquence et du cadre de lecture du gène.

L'identification et l'analyse du gène codant pour la protéine EGT ont permis de procéder à l'étape de l'expression de cette protéine dans un système procaryote. Le vecteur d'expression pQE32 recombinant, contenant le gène *egt* a été utilisé pour transformer les cellules bactériennes *E.coli* M15(pREP4). La purification de la protéine recombinante EGT dans ce système d'expression a été effectuée par la chromatographie d'affinité.

2.1 Clonage du gène codant pour la protéine EGT

2.1.1 Amplification par PCR du gène codant pour la protéine EGT

Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier le gène codant pour la protéine EGT ont été choisies en se basant sur la séquence du gène *egt* du virus ChfuGV déjà établie. L'amorce sens (SegtF) était composé de 26 nucléotides (5'-CGCATGCTCATGTTCGTGCAACTAAT-3') et correspondait aux 18 premiers nucléotides du gène *egt*. De plus, la partie composée de 8 nucléotides en amont du codon "start" contenait une séquence correspondant au site de restriction reconnu par l'endonucléase de restriction *Sph*I et de deux nucléotides qui assuraient la concordance du cadre de lecture ouvert du gène à insérer. L'amorce anti-sens (PegtR) était composée également de 26 nucléotides et sa séquence (5'-TTCTGCAGGTTTAACCCTAGCAGTGT-3') correspondait à la région localisée 100 nucléotides en aval du codon stop du gène *egt*. Des nucléotides, correspondant au site de restriction reconnu par l'endonucléase de restriction *Pst*I ont été ajoutés en aval de l'amorce PegtR. L'ajout de ces deux sites de restriction a permis de cloner de façon directionnelle le gène *egt* dans le vecteur d'expression pQE32 préalablement clivé par les mêmes endonucléases de restriction (*Sph*I et *Pst*I). Les amorces SegtF et PegtR ont été synthétisées au service de synthèse des oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

La réaction d'amplification par PCR du gène *egt* a été effectuée à partir de 50 ng d'ADN viral (utilisé comme matrice) dans un volume final de 50µl contenant du tampon (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), un mélange de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à une concentration de 100 µM de chaque dNTP, les amorces SegtF et PegtR à une concentration finale de 0,2 µM chacune, et 1 unité d'enzyme *Taq* polymérase (Stratagene). La réaction d'amplification par PCR a été effectuée dans un thermocycleur programmable de AB Applied Biosystems (Gene AmPCRsystem 9700) selon les paramètres suivants : dénaturation de l'ADN matrice pendant 45 secondes à 94°C, appariement des amorces à l'ADN matrice dénaturé pendant 45 secondes à 55°C

et extension, par la *Taq* polymérase, des amorces pendant 90 secondes à 72°C. Ce cycle a été répété 35 fois et suivi d'une étape d'extension de 10 minutes à 72°C. Les résultats de l'amplification par PCR ont été analysés par électrophorèse sur du gel d'agarose. La taille de l'amplicon recherché était de 1,5 kpb.

2.1.2. Clonage du fragment codant pour la protéine EGT dans le vecteur pCR[®]2.1

Le fragment d'ADN amplifié par PCR a été cloné dans le vecteur pCR[®]2.1 (Invitrogen Corporation), en utilisant le système de clonage TA cloning[®]Kit du même fournisseur. Ce système met en profit la capacité de l'ADN polymérase *Taq* à ajouter de simples déoxyadénosines (A) aux extrémités 3' de toutes les molécules doubles brins, créant ainsi des extrémités cohésives et permettant d'insérer le fragment amplifié dans le vecteur pCR[®]2.1 linéarisé et muni des extrémités 3' T-dépassant le site d'insertion du vecteur. Le clonage dans le vecteur pCR[®]2.1 a permis de conserver la stabilité et l'intégrité de l'amplicon, ainsi qu'à faciliter son sous clonage dans un vecteur d'expression pQE32.

Le produit PCR a été purifié à partir du mélange réactionnel en utilisant un filtre Microcon[®] PCR (Millipore, Canada). Le produit PCR a été placé dans un filtre et a été centrifugé à 1 000 × g pendant 15 minutes. Le produit PCR purifié a été élué dans un tube collecteur en ajoutant 20 µl d'eau stérile sur le filtre et en centrifugeant ce filtre à 1 000 × g pendant 2 minutes en position inversée. Le fragment d'ADN ainsi purifié a été quantifié et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

Le fragment d'ADN amplifié purifié a été inséré dans le vecteur d'expression pCR[®]2.1 à l'aide de l'enzyme T4 ADN ligase (Invitrogen Corporation). Pour effectuer cette réaction, 10 ng d'ADN de l'amplicon et 50 ng d'ADN plasmidique ont été ajoutés dans de tampon de ligation (Tris-HCl 6 mM, pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, NaCl 5 mM, BSA 1mg/ml, β-mercaptoéthanol 7 mM, l'ATP 0,1 mM, DDT 2 mM, spermidine 1 mM) contenant 4 unités de l'enzyme T4 DNA ligase. Le volume final de cette réaction était de 10 µl. Ce mélange a été incubé pendant 18 heures dans un bain à 14°C, puis le produit

de ligation a été conservé à 4°C jusqu'à l'étape de la transformation des cellules bactériennes compétentes.

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

La transformation des cellules bactériennes *E.coli* INVαF' compétentes par le vecteur recombinant pCR®2.1egt a été effectuée en utilisant le système « TA cloning®Kit » d'Invitrogen Corporation. Ainsi, 50 µl de bactéries *E.coli* INVαF' compétentes « One Shot™ » (Invitrogen Corporation) ont été incubés pendant 30 minutes sur glace en présence de 2 µl de plasmide recombinant pCR®2.1egt, puis soumis à un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes pour permettre la pénétration de l'ADN plasmidique dans les bactéries. Les cellules bactériennes ont été incubées pendant 60 minutes à 37°C avec agitation constante (225 rpm) dans 250 µl de milieu SOC (2,0% p/v tryptone, 0,5% p/v extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ x 6H₂O, 20 mM glucose). Après cette incubation, des volumes de 20 µl, 50 µl et 150 µl de la suspension de bactéries transformées ont été étalés sur une gélose L-B Luria-Broth (1% (p/v) bacto-tryptone, 0,5% (p/v) d'extrait de levure, 1% (p/v) NaCl, 1,5% (p/v) d'agar) contenant 100 µg/ml d'antibiotique ampicilline et 40 mg/ml du substrat de sélection colorimétrique bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) (Invitrogen Corporation). Ces géloses ont été incubées, par la suite, pendant 18 heures à 37°C en position inversée à l'abri de la lumière.

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

Les bactéries transformées par le vecteur recombinant pCR®2.1egt sont sélectionnées selon le protocole basé sur deux caractéristiques du système utilisé. Premièrement, la transformation par le vecteur pCR®2.1 comportant le gène de résistance à l'ampicilline comme marqueur de sélection confère aux bactéries *E.coli* INVαF', normalement sensibles à l'ampicilline, une résistance à cet antibiotique. Ainsi, les bactéries transformées par le vecteur pCR®2.1 pourront croître dans un milieu contenant l'ampicilline. Deuxièmement, les bactéries transformées par le vecteur

recombinant sont détectées en observant la couleur des colonies (blanches ou bleues) sur les géloses. La différence de couleur est provoquée par la présence ou l'absence de l'enzyme β -galactosidase fonctionnelle. Une mutation au niveau du gène *lacZ* chez la souche bactérienne *E.coli* INV α F' empêche la synthèse de la forme active de cette enzyme, car elle est dépourvue de la séquence codant pour le peptide α . Par contre, cette séquence (*lacZ α*) est présente sur le plasmide pCR[®]2.1, ce qui permet l' α -complémentation (Ullman *et al.*, 1967) de la β -galactosidase après la transformation, à la condition que le cadre de lecture ne soit pas interrompu par l'insertion de l'ADN exogène lors de la ligation (le site de clonage se trouve à l'intérieur du gène *lacZ α*). L'activité de la β -galactosidase rétablit par α -complémentation peut être visualisée *in vivo* par un test colorimétrique, en utilisant le X-Gal comme substrat. Les bactéries ayant incorporé le pCR[®]2.1 peuvent métaboliser le substrat X-Gal par l'activité de la β -galactosidase, ce qui produit des colonies de couleur bleue. Par contre, l'insertion d'un fragment d'ADN dans le vecteur pCR[®]2.1 interrompt le cadre de lecture du gène *lacZ α* , ce qui empêche l' α -complémentation et prohibe la dégradation du substrat X-Gal, produisant ainsi des colonies blanches.

Chaque colonie bactérienne recombinante ainsi sélectionnée a été transférée dans 3 ml de milieu de culture bactérien LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline, puis incubée à 37°C pendant 18 heures. À partir de ces cultures, 1,5 ml a été prélevé pour l'extraction de l'ADN plasmidique en utilisant le système « QIA prep[®] Miniprep » (Qiagen). Après une centrifugation de 13 000 \times g pendant 1 minute, les surnageants ont été éliminés et les culots bactériens ont été resuspendus dans 250 μ l de tampon (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) contenant de la ribonucléase A (0,1 mg/ml). Par la suite, les bactéries ont été lysées durant 5 minutes à température de la pièce dans 250 μ l de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1% SDS (p/V)). Les lysats obtenus ont été neutralisés par l'ajout de 350 μ l de tampon de neutralisation (CH₃COOK 3M, pH 5,5). Ensuite, les lysats ont été centrifugés à 10 000 \times g pendant 10 minutes pour précipiter l'ADN génomique, les débris cellulaires et le SDS. Les surnageants ainsi obtenus ont été transférés sur des filtres composés d'une membrane de gel-Silice (Qiagen), insérés dans des tubes collecteurs et centrifugés à 10 000 \times g pendant 1 minute.

Ils ont été ensuite lavés deux fois en ajoutant 750 µl de solution de lavage (75% éthanol) suivi d'une centrifugation à 10 000 × g pendant 1 minute. L'ADN plasmidique a été finalement élué du filtre en ajoutant 50 µl d'eau puis a été récupéré suite à une centrifugation de 1 minute à 10 000 ×g.

La présence de l'amplicon à l'intérieur des plasmides recombinants a été confirmée par une digestion enzymatique de l'ADN plasmidique par l'endonucléase de restriction *PstI* (Life Technologies). Pour ce faire, 0,4 µg d'ADN plasmidique purifié a été incubé pendant 60 minutes à 37°C en présence de 2 unités de l'endonucléase de restriction *PstI* et de 2 µl tampon de digestion concentré « REACT 2 » du même fournisseur pour la concentration finale 50 mM Tris-HCl, (pH 8,0) 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl dans un volume total de 20 µl. Les produits de la réaction de digestion ont été analysés sur le gel d'agarose afin de vérifier la présence des fragments d'ADN de tailles prédites dans le cas d'un plasmide recombinant. Suite au profil électrophorétique d'ADN obtenu, trois plasmides recombinants pCR[®]2.1egt ont été choisis pour le sous clonage.

2.1.3. Sous clonage du fragment du gène codant pour la protéine EGT dans le vecteur d'expression pQE32

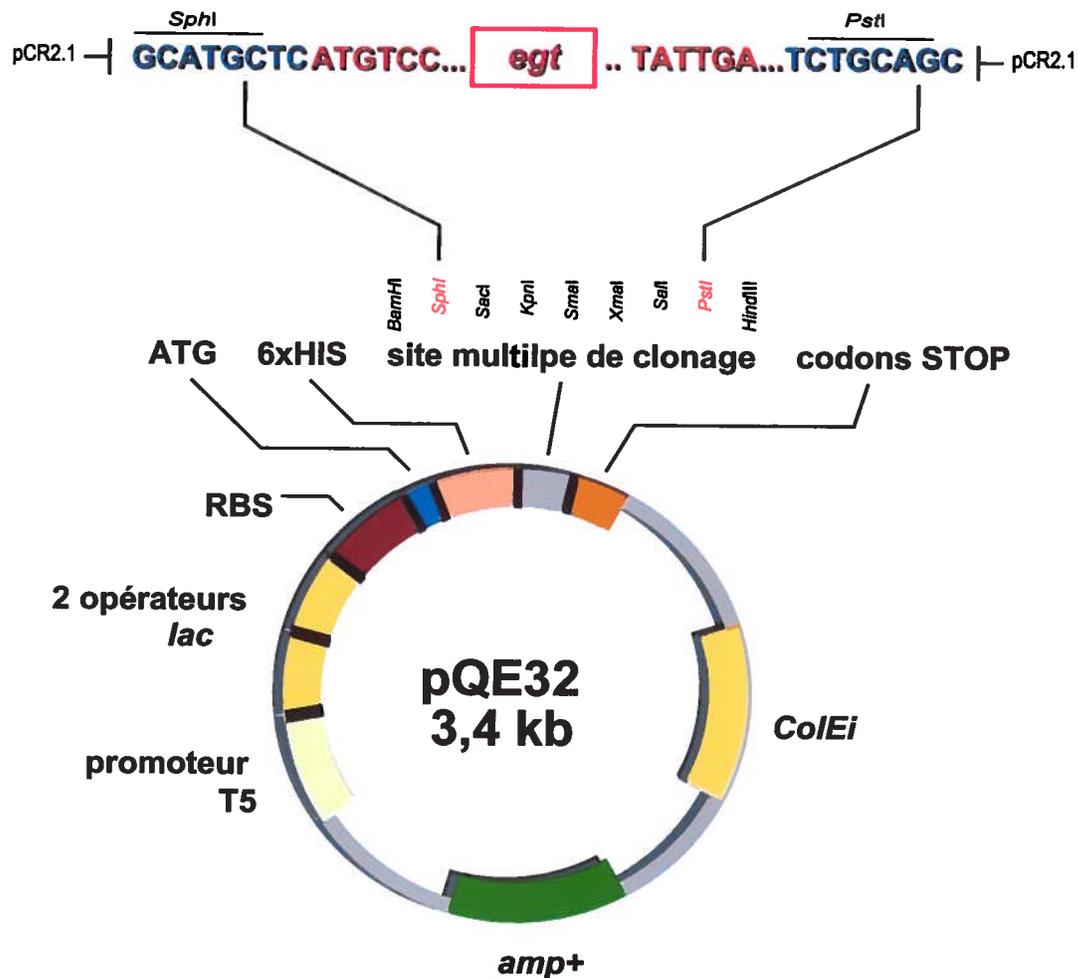
Suite à la confirmation de la présence de l'amplicon dans le vecteur recombinant pCR[®]2.1egt, le gène *egt* a été sous cloné dans le vecteur d'expression pQE32 (Qiagen). Ce vecteur d'expression permet l'ajout de 6 résidus histidines (6xHIS) à la région *N*-terminale de la protéine recombinante exprimée. La queue 6xHIS permet la détection de la protéine recombinante par immunobuvardage et, en même temps, la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité sur la colonne NI-NTA. L'expression du gène inséré au site de clonage multiple du vecteur d'expression pQE32 est régulée par le répresseur *lac*, codée par le plasmide auxiliaire PREP4 de la bactérie *E.coli* M15. La protéine répressive *lac* empêche de façon constitutive la transcription de gène codant pour la protéine recombinante en se liant à la séquence « opéron *lac* / promoteur » du vecteur d'expression pQE32. Cette répression est stoppée par l'ajout d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG). L'IPTG inactive la protéine répressive *lac*

et induit ainsi l'expression à partir du promoteur *lac*. La Figure 2 présente la stratégie du clonage du gène *egt* dans le vecteur d'expression pQE32.

2.1.3.1. Digestion du fragment ADN codant pour la protéine EGT et du vecteur d'expression pQE32

Les trois plasmides recombinants pCR[®]2.1egt sélectionnés, ainsi que le vecteur pQE32 ont été digérés en utilisant les sites de reconnaissance des endonucléases de restriction *SphI* et *PstI* insérés par PCR respectivement en amont et en aval du fragment cloné. La digestion par l'endonucléase *PstI* a été réalisée dans les mêmes conditions que la réaction décrite dans la section 2.1.2.2. et les produits de ces réactions ont été analysés par l'électrophorèse sur le gel d'agarose. Suite à la migration sur gel d'agarose des produits de digestion, les bandes d'ADN d'intérêts, correspondant au vecteur d'expression pQE32 (3,4 kpb) et au fragment d'ADN contenant l'amplicon (3,9 kpb ou 1,5 kpb, dépendamment de l'orientation de l'insert dans le plasmide pCR[®]2.1egt), ont été séparément excisées et extraites du gel d'agarose en utilisant le système de purification « Sephaglas[™] BandPrep » (Amersham Pharmacia Biotech, Canada). Les cubes de gels d'agarose contenant les fragments d'intérêt ont été dissous dans 250 µl de tampon contenant de l'iodure de sodium lors d'une incubation de 10 minutes à 60°C. L'ADN ainsi libéré a été incubé en présence de 5 µl d'une solution de billes de Sephaglas[™] BP (20% (p/v) Sephaglas, 0,15% Kathon[™] CG/ICP Biocide) pendant 5 minutes à température ambiante en mélangeant toutes les minutes, puis la solution a été centrifugée deux fois pendant 30 secondes à 13 000 ×g et lavée trois fois dans le tampon de lavage (20 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 1 mM EDTA et 0,1 mM NaCl, 70% éthanol). L'ADN lié aux billes de Sephaglas a été élué en incubant les billes pendant 5 minutes à température de la pièce en présence de 10 µl de tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl, pH8,0 ; 1 mM EDTA) pour être récupéré en centrifugeant la suspension à 13 000 ×g pendant 30 secondes et en prélevant le surnageant. L'ADN ainsi récupéré a été analysé par électrophorèse sur du gel d'agarose pour la présence des fragments d'intérêts. La concentration d'ADN a été estimée

Figure 2. Clonage du gène *egt* dans le vecteur d'expression procaryote pQE32 (Qiagen) en vue d'expression de la protéine EGT (Anonyme, 2000).



Légende :

Promoteur T5 / opérateur lac : nt 7 - 87

Site d'initiation de la transcription T5 : nt 61

Séquence codant pour l'étiquette de 6 histidines : nt 127 - 144

Site de clonage multiple : 146 - 193

Site de terminaison de la transcription de Lambda : nt. 209 - 303

Site de la terminaison de la transcription de rrnB T1 : nt 1065 - 1163

Origine de réplcation ColE1 : nt. 1639

Séquence codant pour la β -lactamase (amp+) : nt. 3257 - 2397

en comparant l'intensité de ces fragments d'ADN sur le gel avec l'intensité des fragments d'ADN du standard de poids moléculaire.

Les fragments purifiés ont été soumis à la digestion par l'endonucléase *SphI* (Life Technologies). Dans chaque réaction, environ 500 ng d'ADN ont été digérés dans un volume final de 20 µl pendant 60 min à 37°C en présence d'une unité de l'endonucléase *SphI* dans le tampon « REACT6 » (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 ; MgCl₂ 6 mM, NaCl 50 mM et KCl 50 mM - Life Technologies). Les produits de ces réactions ont été analysés suite à une électrophorèse sur gel d'agarose puis ont été purifiés en utilisant le système de purification « SephaglasTM BandPrep » selon le protocole précédemment décrit dans cette section.

2.1.3.2. Clonage du fragment d'ADN codant pour la protéine EGT dans le vecteur d'expression pQE32 et transformation des cellules bactériennes compétentes

L'ADN codant pour la protéine EGT a été cloné dans le vecteur d'expression pQE32. La réaction de ligation a été effectuée en incubant 50 ng du vecteur pQE32, 15 ng du fragment codant pour le gène *egt* et 4 unités de l'enzyme T4 ADN ligase (Life Technologies) dans 10 µl de tampon de ligation (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 ; MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, 1 mM DDT, polyéthylène glycol-800 5% w/v) pendant 18 heures à 14°C. Le produit de cette réaction, le vecteur recombinant pQE32egt a été utilisé pour transformer les cellules bactériennes TOPO 10 F' compétentes (Invitrogen Corporation) selon la méthode décrite dans la section 2.1.2.1. de ce chapitre. Les cellules bactériennes ainsi transformées ont été étalées sur une gélose LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

2.1.3.3. Sélection des colonies recombinantes contenant le plasmide pQE32egt

L'acquisition du vecteur pQE32egt recombinant par les cellules bactériennes *E.coli* TOP 10 F' compétentes permet à ces dernières de croître dans le milieu contenant de l'ampicilline. Des colonies bactériennes recombinantes ont été recueillies séparément

et transférées dans 3ml de milieu de culture bactérien LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Après une incubation de 18 heures à 37°C, 1,5 ml de chaque culture bactérienne obtenue ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN plasmidique en utilisant le système « QIA prep[®] Miniprep » selon la méthode décrite dans la section 2.1.2.2. La présence de l'insert contenant le gène *egt* à l'intérieur du vecteur d'expression pQE32*egt* a été confirmée par une double digestion de l'ADN plasmidique par les endonucléases de restriction *Hind*III et *Kpn*I. Le profil de migration obtenu suite à la digestion de l'ADN plasmidique a été comparé avec le profil prédit par le système de cartographie de restriction « NEBcutter » (New England Biolabs), disponible sur le site de la compagnie (www.neb.com).

L'intégrité de la séquence et du cadre de lecture du gène *egt* des plasmides recombinants pQE32*egt* a été vérifiée par séquençage selon la technique de Sanger (Sanger *et al*, 1977) en utilisant une amorce sens (5'-CGGATAACAATTTACACAG-3') et anti-sens (5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3') complémentaires aux séquences situées respectivement en amont et en aval du site de clonage multiple du vecteur d'expression pQE32. L'analyse des séquences en acides nucléiques obtenues a été réalisée en utilisant le logiciel « Gene Work 2.5 » (Intelligenetics Inc., USA).

2.2. Expression de la protéine recombinante EGTx6HIS dans des cellules bactériennes M15 (pREP4)

Le gène codant pour la protéine EGT cloné dans le vecteur d'expression pQE32 a été exprimé en utilisant le système « QIAexpress Expression » de Qiagen. Ce système permet d'exprimer la protéine recombinante dans les cellules bactériennes *E. coli* M15 (pREP4) qui contiennent un plasmide auxiliaire pREP4. Ce plasmide assure, entre autres, la résistance à la kanamycine et il contient également le gène codant la protéine répressive *lac* qui contrôle l'expression de la protéine recombinante. L'expression de la protéine recombinante dans ce système est induite par l'ajout d'IPTG qui inactive la protéine répressive *lac*.

2.2.1. Transformation des cellules bactériennes *E.coli* M15 (pREP4) par le plasmide recombinant pQE32egt

Afin de transformer les cellules bactériennes *E. coli* M15 (pREP4), 1 µg du plasmide recombinant pQE32egt et 1 µg du plasmide pQE32 ont été incubés séparément en présence des cellules bactériennes dans un bain de glace pendant 20 minutes, puis ce mélange a été soumis à un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes, et transféré immédiatement sur glace. Les parois bactériennes fragilisées par le choc thermique ont été régénérées en ajoutant 500 µl de bouillon PSI (milieu LB, MgSO₄ 4 mM, KCL 10 mM) et en incubant le mélange à 37°C pendant 60 minutes avec une légère agitation (150 rpm). Ensuite, les bactéries transformées ont été étalées sur une gélose agar 2xYT (tryptone 1,6% p/v, extrait de levure 1,0% p/v, NaCl 10 mM, pH 7,0) contenant 25 µg/ml de kanamycine et 100 µg/ml d'ampicilline et incubées pendant 18 heures à 37°C en position inversée.

2.2.2 Cinétique d'expression de la protéine recombinante EGTx6HIS par les bactéries *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32egt)]

La gélose 2xYT contenant de l'ampicilline et de la kanamycine permet de sélectionner exclusivement les cellules bactériennes *E. coli* M15(pREP4) contenant à la fois deux plasmides, pQE32egt et pREP4, lesquels confèrent la résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, respectivement. Ainsi, les colonies bactériennes transformées ont été transférées dans un volume de 3 ml de bouillon 2xYT contenant 25 µg/ml de kanamycine et 100 µg/ml d'ampicilline et ont été incubées 18 heures à 37°C sous agitation constante à 200 rpm. Par la suite, 0,5 ml de cette culture bactérienne a été transféré dans 10 ml de milieu liquide 2xYT contenant 25 µg/ml de kanamycine et 100 µg/ml d'ampicilline. La culture bactérienne a été incubée à 37°C sous agitation constante à 225 rpm jusqu'à ce qu'elle atteigne la phase exponentielle de croissance, déterminée en mesurant la densité optique (0,5-0,7) de la culture bactérienne à une longueur d'onde de 600 nm. Une fois la phase exponentielle atteinte, l'expression de la protéine recombinante EGT par les bactéries *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32egt)] a été induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. La culture bactérienne ainsi induite fut incubée dans les mêmes conditions durant 1, 2, 3,

5, 7, 9 et 12 heures suivant l'induction de l'expression de la protéine EGT. À chacun des différents temps 1 ml de culture bactérienne a été prélevé et centrifugé à 13 000 x g pendant 1 minute. Les culots bactériens ont été resuspendus dans le tampon de charge et conservés à -70°C jusqu'à leur analyse par électrophorèse sur du gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Par ailleurs, les culots bactériens obtenus après 5 heures d'incubation ont été utilisés pour déterminer la solubilité de la protéine recombinante. Les bactéries recombinantes ont été lysées en présence de lysozyme à une concentration finale de 1 mg/ml dans un tampon de lyse, pH 8,0 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM) pendant 30 minutes sur glace, puis en les soniquant 6 fois durant 20 s sur glace (« 550 Sonic Dismembrator », Fisher, Canada, muni d'une sonde de type « microtop »). Le lysat ainsi obtenu a été centrifugé à 10 000 x g pendant 30 minutes à 4°C . Le culot resuspendu dans le tampon de lyse et le surnageant ont été analysés par l'électrophorèse sur le gel de polyacrylamide de 12% (SDS-PAGE – Laemmli, 1970).

Les protéines contenues dans les fractions analysées ont été dissociées et dénaturées à une température 100°C pendant 5 minutes dans le tampon électrophorèse réducteur (SDS 2% p/v, glycérol 10% v/v, β -mercaptoéthanol 35 mM, Tris-HCl 625 mM, pH 6,8). Un volume de 15 μl des échantillons ainsi préparés a été déposé sur deux gels de polyacrylamide 12% identiques disposés dans une cellule électrophorétique « Mini-Protean[®] II Dual Slab Electrophoresis » (Bio-Rad) contenant du tampon SDS (Tris-HCl 25mM pH 8,3, SDS 0,1% p/v, glycine 192 mM). Suite à une électrophorèse de 45 minutes sous un voltage constant de 100 V, l'un des gels a été coloré pendant 30 minutes dans une solution de bleu de coomassie (bleu de coomassie R-250 0,4% p/v (Bio-Rad), méthanol 40% v/v, acide acétique 10% v/v) et décoloré pendant 4 heures dans une solution de décoloration (méthanol 40% v/v, acide acétique 10% v/v). Les protéines du second gel ont été transférées sur une membrane PVDF dans le but de réaliser un immunobuvardage de type Western (Burnette, 1981).

La détection de la protéine recombinante EGTx6HIS a été effectuée en utilisant la technique de l'immunobuvardage de type Western. Dans cette méthode, les protéines séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) ont été transférées sur une membrane PVDF en utilisant un courant électrique. La présence de protéine d'intérêt sur cette membrane a été détectée par une réaction immunochimique à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-6HIS. La détection du complexe antigène - anticorps a été possible grâce à l'utilisation d'un anticorps secondaire, dirigé contre les domaines constants de l'anticorps primaire et couplé à un substrat chromogène. L'anticorps primaire utilisé était dirigé contre la séquence de six histidines ajoutées en amont de la séquence de la protéine EGT recombinante.

Brièvement, le gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) produit par l'électrophorèse a été rincé dans de l'eau déionisée et déposé sur la membrane PVDF (BioRad), préalablement activée pendant 5 minutes dans du méthanol 70%, puis saturée dans le tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20% v/v). Le transfert des protéines du gel de polyacrylamide sur la membrane a été effectué pendant 60 minutes sous un courant constant de 20 mA dans l'appareil « Mini Trans-Blot » BioRad en présence du tampon de transfert refroidi.

Suite au transfert des protéines, les sites libres de la membrane PVDF ont été bloqués pendant 1 heure à 37°C dans une solution contenant du BSA 2% (p/v), TWEEN 20 0,1% (p/v) et Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Par la suite, la membrane a été incubée avec une agitation constante pendant 1 heure à température de la pièce dans la solution d'anticorps monoclonaux anti-histidine (anti-6xHIS) de souris « Penta-HisTM Antibody » (Qiagen) (0,1 µg/ml) dans du BSA 1% (p/v), Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. La membrane a été lavée trois fois pendant 20 minutes avec le tampon de lavage (Tween-20 0,05% v/v et Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) et incubée, avec agitation constante, pendant 1 heure, à température de la pièce en présence de l'anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de souris et conjugué à la biotine (CALBIOCHEM[®], Biosciences Inc., Canada) dilué 1 : 250 dans le même tampon que l'anticorps primaire. La membrane a été de nouveau lavée trois fois puis incubée 30 minutes à température de la pièce

dans une solution contenant le complexe streptavidine-peroxidase (CALBIOCHEM[®], Biosciences Inc.) dilué 1: 250. La membrane a été lavée puis incubée 10 minutes à température de la pièce dans une solution révélatrice 3-3' diamino benzidine hypochloride 0,4 % (v/v) (DAB substrate, CALBIOCHEM[®], Biosciences Inc.).

Les essais visant à exprimer la protéine recombinante EGT à partir du gène complet n'ayant mené en vain à des résultats concluants. De nouveaux essais visant à exprimer un fragment de protéine EGT ont été entrepris.

2.3. Expression de la protéine recombinante EGT tronquée

Un plasmide recombinant contenant une séquence partielle du gène *egt* du ChfuGV a été construit afin d'exprimer une protéine EGT tronquée. Les démarches visaient à produire une protéine EGT tronquée en *N*-terminale mais possédant toujours des régions conservées et importantes pour le bon fonctionnement de la protéine (figure 3). La construction de ce plasmide recombinant a été réalisées en utilisant les mêmes étapes que celles appliquées dans le cas du plasmide recombinant pQE32egt.

2.3.1. Clonage d'une séquence partielle du gène *egt* du virus ChfuGV

Afin de produire le plasmide recombinant pQE32egt589Pc, une amorce sens a été désignée pour amplifier la partie *C*-terminale du gène *egt* du virus ChfuGV. L'amorce Bam589F (5'-GCGGATCCACCTGTGGCGGTCAAACCTTT-3') était composée de 28 nucléotides. Les 20 derniers correspondaient à la séquence de l'acide nucléique 589 à l'acide nucléique 608 du gène *egt*. De plus, un site de reconnaissance de l'endonucléase *Bam*HI a été ajouté en amont des séquences homologues au gène *egt*. L'amorce anti-sens PegtR déjà décrite dans la section 2.1.1. a été utilisée lors de la réaction d'amplification par PCR. Cette réaction a été réalisée selon

Figure 3. Représentation schématique de la protéine EGT tronquée par rapport à la séquence en acides aminés de la protéine EGT et à ces régions conservées.

Les zones bleues représentent le peptide signal (au début) et les régions hautement conservées (de I à VI).

pQE32egt

protéine EGT complète



pQE32eg589Pc

protéine EGT tronquée EGT589Pc



le protocole déjà décrit à la section 2.1.1. Les produits de cette réaction ont été analysés par électrophorèse sur le gel d'agarose. Les amplicons ont été purifiés, stabilisés dans le vecteur pCR[®]2.1 puis sous-clonés dans le vecteur d'expression pQE32 pour produire le plasmide recombinant pQE32 selon les méthodes décrites dans ce chapitre (section 2.1.3.), en utilisant les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Pst*I. Le plasmide recombinant pQE32egtB589Pc, suite à sa digestion par les endonucléases de *Hind*III, *Pst*I, *Hinc*II et *Rsa*I, a été analysés par électrophorèse sur le gel d'agarose. Les résultats des profils de migration obtenus ont été comparés avec ceux prévus en utilisant le système de cartographie de restriction « NEBcutter » (New England Biolabs), disponible sur le site de la compagnie (www.neb.com). Une fois que le clonage du plasmide recombinant pQE32egt589Pc a été confirmé, il a été séquencé afin d'établir la conformité du cadre de lecture ouverts du fragments du gène *egt*. Les plasmides séquencés ont été utilisés pour transformer les cellules bactériennes *E. coli* M15(pREP4) dans le but d'exprimer la partie C-terminale de la protéine EGT du virus ChfuGV. Le plasmide recombinant pQE32egt589Pc contenait un fragment de gène correspondant à 269 acides aminés de la protéine EGT et d'une taille théorique de 32.2 kDa.

2.3.2. Transformation des bactéries *E. coli* M15(pREP4) par les plasmides recombinants pQE32egt589Pc

La réaction de transformation a été réalisée en incubant 1 µg du vecteur pQE32egt589Pc et 1 µg du vecteur pQE32 séparément avec 100 µl de bactéries complémentes *E. coli* M15(pREP4) durant 20 minutes sur la glace. La transformation avec le plasmide pQE32 seul servait en fait de contrôle négatif lors de l'expression et la purification de la protéine recombinante. Les bactéries ont été ensuite soumises à un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes, permettant la pénétration de l'ADN plasmidique. La régénération des parois cellulaires s'est déroulée durant une incubation de 90 minutes à 37°C sous agitation (225 rpm) en présence de 500 µl du milieu PSI. Par la suite, les cellules bactériennes transformées ont été étalées sur les géloses 2 x YT contenant 100 µg/ml de kanamycine puis incubées en position inversée pendant 18 heures à 37°C. Ainsi, seules les bactéries transformées étaient capables de croître

et ce, grâce à leur résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, respectivement conférée par les plasmides pQE32egt589Pc et pREP4.

2.3.3. Induction de l'expression de la protéine recombinante EGT tronquée

À partir de la culture de bactéries *E. coli* M15(pREP4) contenant le plasmide recombinant pQE32egt589Pc, un volume de 20 µL a été prélevé et inoculé dans 3 ml de milieu 2 x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine. Pour des fins de comparaison des profils d'expression, la culture des bactéries transformées par le plasmide pQE32 seul (contrôle négatif) a été incubée dans les mêmes conditions expérimentales. Suite à une incubation de 16 heures à 37°C sous agitation constante de 225 rpm, 3 ml de la culture bactérienne a étéensemencée dans 100 ml de milieu nutritif liquide 2 x YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine. Par la suite, une incubation à 37°C sous agitation constante a été effectuée jusqu'à ce que les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance. Cette phase exponentielle est atteinte lorsque la mesure de la densité optique de la culture bactérienne se situe entre 0,6 et 0,8 à une longueur d'onde de 600 nm. L'expression de la protéine recombinante EGT tronquée par les bactéries *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32egt589Pc)] en phase exponentielle de croissance a été induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM.

2.3.4. Purification de la protéine recombinante EGT tronquée par chromatographie d'affinité

Une protéine recombinante exprimée dans le système d'expression procaryote «QIAexpress Expression» de Qiagen est liée à un résidu de six histidines. La présence de ce résidu permet de purifier le produit d'expression par chromatographie d'affinité en utilisant une matrice Ni-NTA de nickel et d'acide nitrilotriacétique (NTA). L'acide nitrilotriacétique demeure lié à quatre des six sites de liaison de l'ion nickel. Les deux sites libres sont ainsi disponibles pour la liaison aux résidus d'histidines de la protéine recombinante, ce qui permet à la protéine recombinante de s'associer à la colonne Ni-NTA.

Le système d'expression décrit ici offre deux méthodes de l'élution de la protéine recombinante, dépendamment de la solubilité de la protéine recombinante. Lorsque la protéine recombinante est soluble, son élution à l'état natif se fait à l'aide d'une concentration croissante d'imidazole. Ce composé homologue à l'histidine entre en compétition croissante avec l'histidine pour la liaison aux ions de nickel de la colonne. Une forte concentration d'imidazole provoque la dissociation de la queue de six résidus histidines et permet l'élution de la protéine recombinante de la colonne Ni-NTA. Lorsque la protéine est insoluble, elle est éluee dans des conditions dénaturantes, en utilisant des produits fortement dénaturants, comme l'hydrochloride de guanidine (GuHCl 6M), l'urée 8M ou des détergents comme sodium dodecyl sulfate (SDS). Pour ce projet, l'élution de la protéine EGT tronquée a été réalisée dans des conditions dénaturantes.

Suite à l'induction de l'expression de la protéine recombinante EGT tronquée durant 6 heures, les cellules bactériennes bactéries *E. coli* M15[(pREP4) (pQE32egt589Pc)] et ont été récoltées séparément par centrifugation à 4 000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Par la suite, un volume de 25 ml de tampon d'urée 8M avec du SDS (urée 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-HCl 0,1, SDS 0,25% (p/v), pH 8,0) a été ajouté pour solubiliser le culot. Cette suspension a été incubée pendant 2 heures à 37°C avec une agitation constante (200 rpm), puis centrifugée à 10 000 x g. Ensuite, un volume de Triton-X 1% (v/v) a été ajoutée au surnageant obtenu. L'incubation à la température de la pièce a été poursuivie durant 20 minutes, puis 1 ml de matrice Ni-NTA 50% a été ajouté. La suspension obtenue a été incubée pendant 2 heures à la température de la pièce sous agitation constante de 225 rpm. Ensuite, la matrice Ni-NTA a été récoltée par une centrifugation à 2 500 x g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant obtenu (fraction F1) a été conservé. Le culot composé de la matrice Ni-NTA a été resuspendu dans 5 ml de tampon d'urée 8M, pH 8,0 et transféré dans une colonne de 5 ml (Qiagen) fixée verticalement. L'excédant de la colonne a été récolté (fraction F2). Les protéines contaminant ont été éliminées par une série de 8 lavages par 1 ml de tampon d'urée 8M (sans SDS), pH 6,3 (fractions

L1 à L8). La protéine recombinante EGT tronquée a été éluée de la matrice Ni-NTA suite à l'application de huit volumes de 0,5 ml de tampon d'éluion au pH 5,3 (urée 8M avec du SDS 0,1% (p/v), (fractions E1 à E8), puis de huit volumes de de 0,5 ml de tampon d'éluion au pH 4,3 (urée 8M avec du SDS 0,1% (p/v) (fractions E9 à E16). Les fractions récoltées lors des différentes étapes de la purification de la protéine recombinante EGT tronquée ont été analysées par l'électrophorèse sur le gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) de 12 % et par l'immunobuvardage de type Western.

Les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été dialysées ensemble trois fois en utilisant la membrane «Slide-a-Lyser» (Bio-Lynx) ayant une porosité de 3,5 kDa. La dialyse a été réalisée contre un volume de 2 litres de tampon PBS 10 mM, pH 7,4 (sodium phosphate $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM), d'abord deux fois durant 2 heures à la température de la pièce, puis pendant 14 heures à 4°C. L'éluat dialysé contenant la protéine recombinante EGT tronquée purifiée par la chromatographie d'affinité a été concentré par l'ultrafiltration sur le filtre de cellulose «Centricon Plus-20» (Millipore) ayant la porosité de 10 kDa. D'abord, le volume de l'éluat dialysé a été complété à 10 ml avec le tampon PBS 10 mM, pH 7,4. Ensuite, le filtre pourvu d'un tube collecteur a été centrifugé à 4 000 x g pendant 25 minutes à 4°C. Le filtrat ainsi obtenu a été éliminé et la protéine d'intérêt a été récupérée dans l'élément collecteur en centrifugeant le filtre en position inversée à 1 000 x g et à 4°C. La solution contenant la protéine EGT recombinante tronquée a été conservée à -70 °C.

Toutes ces étapes ont été appliquées également à une culture de cellules bactériennes *E.coli* M15(pREP4) transformées par le plasmide pQE32 seul (*E. coli* M15[(pREP4) (pQE32)]). Ceci était nécessaire pour s'assurer que la protéine purifiée par la chromatographie d'affinité soit une protéine recombinante et non une protéine d'origine bactérienne.

Le produit de l'expression de la protéine recombinante EGT tronquée et les protéines d'origine bactérienne ont été séparés par électrophorèse sur deux gels identiques de polyacrylamide (SDS-PAGE) de 12%. Les protéines du premier gel

de polyacrylamide ont été colorées au bleu de coomassie tandis que les protéines du second gel de polyacrylamide ont été transférées sur une membrane PVDF afin d'être analysées par immunobuvardage de type Western, selon la méthodologie décrite dans section 2.2.2.

2.3.5. Quantification de la protéine recombinante EGT

La protéine recombinante EGT tronquée concentrée a été quantifiée selon la méthode de Bradford (1976). Le concentré de protéine en question a été diluée dans le tampon PBS 10 mM afin d'obtenir les dilutions consécutives 1 :2, 1 :4, 1 :8 et 1 :16. De même, le standard d'albumine provenant de sérum bovin lyophilisé « Assay Standard II, » (Bio-Rad) a été dilué dans le même tampon pour obtenir des concentrations 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 et mg/ml, 0,03 mg/ml. Dix microlitres de chacune des différentes dilutions du standard et de la protéine recombinante EGT ont été transférés dans les puits d'un plateau de 96 puits « NUNCTM Brand Products, » (Nalge Nunc International, Denmark), puis 200 µl du colorant réactif « Dye reagent » (Bio-Rad) préalablement dilué 4 fois dans l'eau distillée ont été ajoutés dans chacun des puits. Les solutions ainsi obtenues ont été incubées pendant 5 minutes à la température de la pièce, puis la densité optique de chacun des puits a été mesurée à une longueur d'onde de 620 nm à l'aide du lecteur « Digiscan microplate ». Les résultats de la lecture ont été compilés et analysés en utilisant le logiciel « *Digiwin Software*, version 3.1 » (ASYS Hitech GnbH, source Phonenix Biotech corp., Canada). La densité optique des différentes dilutions du standard a permis de tracer une courbe standard utilisée pour déterminer la concentration de la protéine recombinante EGT tronquée purifiée sur la colonne d'affinité.

3. Système d'expression eucaryote

L'expression de la protéine EGT dans un système eucaryote a été nécessaire pour produire, dans un modèle animal, les anticorps polyclonaux dirigés contre cette protéine. Pour y arriver, le gène *egt* a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote

pcDNA3 (Invitrogen Corporation) et le vecteur recombinant a été injecté les cellules de souris Balb/c. Ce système d'expression est simple, rapide, peu coûteux et il permet les modifications post-transcriptionnelles de la protéine recombinante. De plus, dans ce système d'expression, aucune étape de purification de la protéine n'est requise.

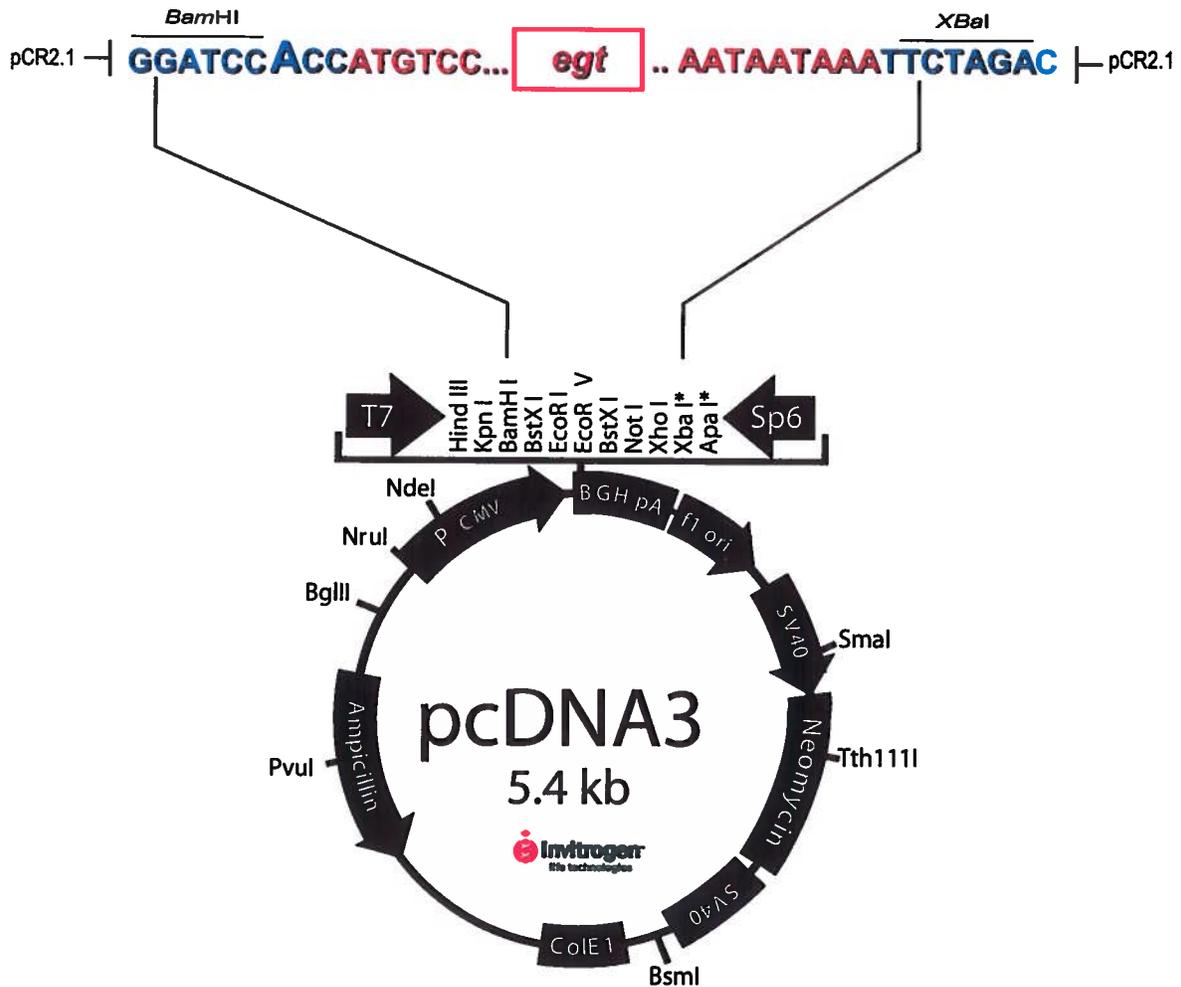
3.1. Construction du vecteur d'expression recombinant pcDNA3/EGT

Essentiellement, le clonage du gène *egt* dans le vecteur d'expression pcDNA3 comprend des manipulations similaires à celles exécutées lors des étapes de clonages nécessaires à la mise au point du système d'expression procaryote. La figure 4 présente la stratégie du clonage du gène *egt* dans le vecteur d'expression pcDNA3.

3.1.1. Amplification par PCR du gène codant pour la protéine EGT

Le gène *egt* a été amplifié par PCR en utilisant l'ADN génomique du virus ChfuGV. Les amorces utilisées dans cette réaction ont été conçues pour correspondre aux deux extrémités du gène *egt* et pour ajouter des sites de restriction nécessaires au clonage de ce gène dans le système eucaryote. L'amorce sens *egtBamHFw* était composée de 27 acides nucléiques. La séquence de ces nucléotides (5'-CCGGATCCACCATGTTTCGTCGTGCAACTAA-3') était spécifique aux 16 premiers nucléotides du gène *egt*. En amont de cette séquence a été ajoutée la séquence de Kozak (ACC) (Kozak, 1987) et la séquence correspondant au site de restriction reconnu par l'endonucléase de restriction *BamHI*. L'amorce anti-sens *egtXbaRw* était composée de 27 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5'-CCTCTAGAATTTATTATTTCTCAACAC-3') correspondait aux 19 derniers nucléotides du gène *egt*. Le codon « stop » a été remplacé en ajoutant en aval de l'amorce anti-sens le site de restriction reconnu par l'endonucléase de restriction *XbaI*.

Figure 4 Clonage du gène *egt* dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (Invitrogen) en vue de l'expression de la protéine EGT.



Légende :

Promoteur CMV : nt 209 - 863

Promoteur T7 : nt. 864 - 882

Site de clonage multiple : nt. 889 - 994

Promoteur Sp6 : nt. 999 - 1016

Séquence de polyadénylation BGH : nt. 1018 - 1249

Promoteur SV40 : nt. 1790 - 2115

Origine de répliation SV40 : nt. 1984 - 2069

ORF Néomycine : nt. 2151 - 2945

Séquence de polyadénylation SV40 : nt. 3000- 3372

Origine de répliation ColE1 : nt. 3632 - 4305

Séquence codant pour la β - lactamase : nt. 4450 - 5310

Les amorces *egtBamHFw* et *egtXbaRw* ont été synthétisées à l'INRS-Institut Armand-Frappier au service de synthèse des oligonucléotides.

L'ajout des sites de restriction reconnus par endonucléases de restriction *BamHI* et *XbaI* était nécessaire afin de cloner de façon directionnelle le gène *egt* dans le vecteur d'expression pcDNA3, clivé préalablement par ces mêmes enzymes de restrictions.

La réaction d'amplification du gène *egt* par PCR a été réalisée en utilisant les amorces *egtBamHFw* et *egtXbaRw* et en suivant le protocole décrit dans la section 2.1.1. de ce chapitre. Les produits de cette réaction ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

3.1.2. Clonage du gène pour la protéine EGT dans le vecteur pCR[®]2.1

Le clonage dans le vecteur pc pCR[®]2.1 a eu pour le but de stabiliser et de conserver l'intégrité de l'ORF codant pour la protéine EGT amplifiée et aussi de faciliter son sous clonage dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3. Ainsi, le produit de PCR a été purifié puis cloné dans le vecteur pCR[®]2.1 en utilisant le système système « TA Cloning[®]Kit » selon les procédures décrites à la section 2.1.2. La présence des plasmides recombinants pCRBegtX extraits des cellules bactériennes transformées a été confirmée en effectuant la digestion de ces plasmides par les endonucléases de restriction *EcoRI*, *EcoRV* et *KpnI*. Le profil de migration obtenu, suite à la digestion de l'ADN plasmidique a été comparé avec le profil prédit par le système de cartographie de restriction « NEBcutter » (New England Biolabs, www.neb.com). Brièvement, 0,2 µg d'ADN plasmidique a été incubé en présence de 10 unités d'endonucléases de restriction (*EcoRI*, *EcoRV* et *KpnI*) dans 20 µl d'un tampon de digestion approprié pour chaque enzyme pendant 60 minutes, à 37°C. Les produits de cette réaction ont été analysés par électrophorèse sur du gel d'agarose 0,8 %.

3.1.3. Sous clonage du fragment codant pour la protéine EGT dans le vecteur d'expression pcDNA3

L'ORF codant pour la protéine EGT, inséré au niveau du pCR[®]2.1, a été sous cloné dans le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3. Ce vecteur est muni d'une origine de réplication ColE1 d'origine bactérienne qui lui permet la propagation dans les bactéries *E.Coli*. Une autre caractéristique du plasmide pcDNA3 est la présence d'un promoteur du cytomégalovirus humain (CMV) qui assure un fort niveau transcriptionnel du gène inséré dans le site de clonage multiple. La stabilité des transcrits est assurée par l'ajout d'une queue d'adénines provenant de la séquence de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGH), situé en aval du site de clonage multiple du plasmide pcDNA3. Finalement, le vecteur possède comme marqueur de sélection le gène de la β -lactamase qui confère aux bactéries transformées par ce plasmide la résistance à l'ampicilline (figure 4).

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

Une quantité de 1 μ g de plasmide recombinant pCRBegtX et la même quantité de vecteur d'expression pcDNA3 ont été digérées aux sites de reconnaissance des endonucléases de restriction *Bam*HI et *Xba*I situés, respectivement, en amont et en aval du fragment codant pour la protéine EGT. Les produits de cette réaction ont été séparés sur du gel d'agarose et les fragments d'ADN correspondant au vecteur d'expression pcDNA3 (5,4 kpb) et au fragment codant pour la protéine EGT (1,4 kpb) ont été séparément excisés et extraits du gel d'agarose en utilisant le système Sephaglas[™] BandPrep (Amersham), selon la méthode décrite à la section 2.1.3.1. de ce chapitre.

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

Le gène codant pour la protéine EGT a été inséré de façon directionnelle dans le site de clonage multiple du vecteur linéarisé pcDNA3. Ainsi, 80 ng de l'ADN codant pour le gène *egt* et 30 ng du vecteur pcDNA3 ont été incubés durant 18 heures à 14°C, en présence de 4 unités de l'enzyme T4 ADN ligase (Life Technologies) dans un volume final de 10 µl contenant le tampon de ligation 1x (6 mM Tris-HCl pH 7,5; 6 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 0.1 mg BSA, 7 mM β-mercaptoéthanol, 0,1 mM ATP, 2 mM DDT, 1 mM spermidine). Les produits de cette réaction ont été utilisés pour transformer les cellules bactériennes *E. coli* XL1-Blue compétentes par choc thermique, selon le protocole décrit dans la section 2.1.2.1. de ce chapitre. Ces cellules compétentes assurent un plus grand taux de réplication des plasmides par rapport aux cellules bactériennes INVαF'. Les cellules bactériennes *E. coli* XL1-Blue transformées ont été ensemencées sur une gélose LB agar enrichie de l'ampicilline (100 µg/ml).

3.1.3.3. Criblage des bactéries XL1-Blue recombinantes et purification du vecteur recombinant pcDNA3/EGT

La sélection des bactéries *E. coli* XL1-Blue recombinantes a été basée sur leur résistance à l'ampicilline conférée par le vecteur pcDNA3. Ainsi, les colonies sélectionnées ont été transférées séparément dans 3ml de milieu LB liquide contenant 100 µg/ml d'ampicilline et incubées à 37°C pendant 18 heures. Les plasmides recombinants ont été extraits de ces bactéries en utilisant le système « QIA prep[®] Miniprep » de Qiagen selon le protocole décrit dans la section 2.1.2.2. de ce chapitre. La présence du gène codant pour la protéine EGT à l'intérieur des plasmides recombinants a été confirmée par une double digestion de l'ADN plasmidique par les endonucléases de restriction *Hind*III et *Xba*I. Les produits de la digestion ont été analysés par électrophorèse sur du gel d'agarose à 0,8%.

Des plasmides recombinants pcDNA3/EGT ont été séquencés au service de séquençage de « DNA Landmarks » (St-Jean-Sur-Richelieu, Québec) par la technique

de Sanger (Sanger, 1977), afin de confirmer l'identité du gène inséré et de s'assurer de l'intégrité de son cadre de lecture. Le séquençage a été effectué en utilisant l'amorce universelle T7 et l'amorce universelle anti-sens Sp6 qui correspondent aux séquences situées en amont et en aval du site de clonage multiple du vecteur d'expression pcDNA3, respectivement. Les séquences générées ont été analysées à l'aide du logiciel « Gene Work 2.5 » (Intelligenetics, USA).

4. Production des vecteurs recombinants nécessaires à l'immunisation génétique

La production des anticorps anti-EGT par l'immunisation génétique nécessitait la production d'une grande quantité des plasmides recombinants pcDNA3/EGT et pcDNA3/IL-2 (fourni par le laboratoire du Dr H. Ertl de l'institut Wistar de Philadelphie), ainsi que du plasmide pcDNA3. Le plasmide recombinant pcDNA3/EGT injecté au souris a été utilisé pour produire la protéine recombinante EGT dans les cellules des souris, et pour déclencher, par la suite, la production d'anticorps anti-EGT. Le plasmide pcDNA3/IL-2 a été utilisé comme immuno-adjuvant visant à augmenter la réponse immunitaire contre la protéine recombinante EGT. Le plasmide pcDNA3 a été utilisé comme témoin négatif pour s'assurer que les anticorps anti-EGT produits par les souris provenaient de l'expression des gènes insérés dans les plasmides recombinants.

4.1. Production à grande échelle des plasmides recombinants pcDNA3/EGT, pcDNA3/IL-2 et pcDNA3.

L'injection de plasmides recombinants dans des cellules des souris Balb/c nécessitait la production à grande échelle des plasmides pcDNA3/EGT, pcDNA3/IL-2 et pcDNA3. Cette tâche a été réalisée à l'aide du système « MaxiPrep[®] Plasmid Purification Kit » de Qiagen.

Des colonies bactériennes *E.coli* XL1-Blue transformées par chacun des plasmides recombinants ont été inoculées dans 3ml de milieu LB liquide contenant 100 µg/ml d'ampicilline et incubées sous agitation à 37°C, pendant 12 heures. Un volume

de 5 ml de chaque culture a été transféré dans 1000 ml de milieu LB contenant la même concentration en ampicilline et incubé sous agitation constante durant 12 heures, à 37°C. La culture bactérienne a été divisée en fractions de 200 ml puis a été centrifugée à 6 000 x g pendant 15 minutes, à 4°C. Les culots bactériens ont été délicatement remis en suspension dans 10 ml du tampon (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM Na₂EDTAx2H₂O, 100 µg/ml de RNase A) puis, les parois bactériennes ont été détruites par un traitement de 5 minutes, avec 10 ml de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1% (p/v) SDS). Les lysats obtenus ont été neutralisés par l'ajout de 10 ml de tampon de neutralisation froid (CH₂COOK 3 M, pH 5,5) et par l'incubation durant 20 minutes sur la glace. L'ADN génomique, les protéines, les débris cellulaires et le SDS ont été sédimentés suite à une centrifugation de 20 000 x g à 4°C, pendant 30 minutes. Le surnageant a été centrifugé une seconde fois et transféré sur une colonne de résine « QIAGEN-tip 500 » (Qiagen) préalablement équilibrée avec 10 ml d'un tampon (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% (v/v) isopropanol). La colonne a été lavée deux fois avec 30 ml de tampon de lavage (NaCl 1 M, MOPS 50 mM, pH 7,0; 15% (v/v) isopropanol) et l'ADN plasmidique a été élué de la colonne par l'ajout de 15 ml de tampon d'éluion (1,4 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% (v/v) isopropanol), puis précipité par l'addition de 10,5 ml d'isopropanol à température de la pièce, suivi d'une centrifugation à 20 000 x g à 4°C pendant 30 minutes. Le culot d'ADN plasmidique ainsi obtenu a été lavé avec 5 ml d'éthanol 70% et centrifugé à 20 000 x g pendant 10 minutes, puis remis à la suspension dans un volume de 200 µl d'eau distillée.

La concentration et la pureté de l'ADN ont été ainsi estimées en mesurant la densité optique des échantillons d'ADN à des longueurs d'ondes de 260 nm et 280 nm. L'identité des plasmides purifiés a été confirmée par l'analyse de leur profil de migration sur le gel d'agarose suite à leur digestion par les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Xbo*I, selon la méthode décrite dans la section 2.1.3.1. de ce chapitre. La concentration finale des ADN plasmidiques destinés à l'injection a été ajustée à 1 mg/ml avec du tampon PBS.

5. Protocole d'immunisation

L'immunisation génétique des souris par l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/EGT visait à produire les anticorps anti-EGT.

5.1. Les groupes de souris et produits injectés

L'immunisation génétique a été réalisée chez 25 souris femelles Balb/c âgés de 4-6 semaines (Charles River Laboratoires, St-Constant, Québec). Les souris ont été divisées en cinq groupes de cinq souris. Le premier groupe a été injecté avec de la solution saline PBS. Les souris du deuxième groupe ont été injectées avec 50 µg du plasmide pcDNA3. Les souris du troisième groupe ont été injectées avec 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/EGT. Les souris du quatrième groupe ont été injectées avec 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/EGT et 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/IL2. Finalement, les souris du cinquième groupe ont été injectées avec 50 µg du plasmide recombinant pcDNA-EGT et 50 µg du plasmide pcDNA3. Le Tableau I résume le protocole d'immunisation des souris Balb/c utilisé dans cette expérience.

5.2. Calendrier d'immunisation et voie des injections et des prélèvements

Toutes les injections ont été effectuées au jour 0, 14, 28, 42 et 56 au niveau du quadriceps caudal des pattes postérieures des souris à l'aide d'une aiguille 26G. Aux jours 0, 14, 28, 42, 56 et 72, les souris ont été anesthésiées par inhalation de méthoxyflurane afin d'effectuer un prélèvement au niveau de la veine retro-orbital de l'œil. Au jour 72, le sang a été prélevé suite à une ponction cardiaque. Le sang prélevé a été centrifugé à 2 000 x g pendant 15 minutes, à 4°C et les surnageants contenant le sérum ont été recueillis, puis conservés à -70°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau I. Protocole d'immunisation génétique des groupes de souris

Groupe	Nombre de souris	Matériel injecté	Voie d'inoculation	Quantité injectée (µg)	Volume final injecté (µl/animal)
I	5	PBS	i.m.	50	50
II	5	ADN plasmidique : pcDNA3	i.m.	50	50
III	5	ADN plasmidique : pcDNA3/EGT	i.m.	50	50
IV	5	ADN plasmidique : pcDNA3/EGT pcDNA3	i.m.	100	50
V	5	ADN plasmidique : pcDNA3/EGT pcDNA/IL2	i.m.	100	50

6. Caractérisation des anticorps anti-EGT produit par l'immunisation génétique

La spécificité des anticorps produits par l'immunisation génétique a été étudiée par immunobuvardage de type Western, tandis que la cinétique de leur production et leur titre ont été analysés par des tests ELISA.

6.1. Immunobuvardage de type Western

L'immunobuvardage de type Western a été conduit selon le protocole décrit dans la section 2.2.2. de ce chapitre. Dans ces expériences, le produit d'expression de la protéine recombinante EGT tronquée a été utilisé comme antigène. La protéine recombinante EGT tronquée a été exposée au sérum des souris injectées avec les différents plasmides utilisés lors de l'immunisation génétique. La dilution optimale de sérum (1 : 400) a été établie empiriquement par l'immunobuvardage de type Western.

6.2. Tests ELISA

La spécificité et la cinétique de la production des anticorps anti-EGT par souris immunisées génétiquement ont été analysées par des tests ELISA. Ces tests ont été réalisés dans des plateaux de 96 puits « NUNCTM Brand Products, » (Nalge Nunc International, Denmark), Brièvement, 10 ng de protéine recombinante EGT tronquée par puits ont été incubés pendant 24 heures à 4°C, puis les puits ont été lavés en ajoutant 300 µl/puit de tampon de lavage (10 mM PBS, pH 7,2, 0,05% Tween 20) et les sites non liés des puits ont été saturés par 300 µl/puits de solution de 2% BSA (p/v) et 0,1% Tween 20 dans 10mM PBS pH7,2. Après une incubation de 90 minutes à la température de la pièce, les puits ont été lavés, puis 100 µl/puits des sérums de souris Balb/c dilués de 1/100 à 1/12 800 ont été ajoutés. Suite à une incubation d'une heure, les puits ont été lavés 5 fois avec 300 µl/puits de tampon de lavage, puis 100 µl/puits d'anticorps de chèvre couplés à la peroxydase et spécifiques aux anticorps IgG de souris (dilué 1/6 400) (Calbiochem[®], USA) ont été ajoutés et incubés pendant 1 heure. Suite à une série de 5 lavages avec 300 µl de tampon de lavage, un volume de

100 µl/puits du complexe Stréptavidine-peroxydase « Horse Radish Peroxidase » (Calbiochem[®], USA) diluée 1/250 a été ajouté et incubé pendant 30 minutes. Les puits ont été à nouveau lavés 5 fois avec 300 µl de tampon de lavage puis 100 µl/puits de la solution de substrat (OPD 0,4% p/v, H₂O₂ 0,012% v/v, 50 mM acide citrique, Na₂HPO₄ 100 mM, pH 5,0) ont été ajoutés et incubés 30 minutes à l'obscurité. Cette incubation a été arrêtée par l'ajout de 100 µl/puits de HCl 1 N. Ensuite, les densités optiques (D.O) de chacun des puits ont été mesurées à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre « Digiscan microplate ». Les résultats des lectures ont été compilés et analysés à l'aide du logiciel « Digiwin Software, version 3.1 » (ASYS Hitech GnbH, source Phonenix Biotech corp., Canada).

Les résultats obtenus des tests ELISA ont été interprétés en se basant sur le paramètre COI (« *cut off index* »). La valeur de ce paramètre a été obtenue en mesurant la densité optique produite par le test ELISA lors de l'utilisation du denier prélèvement des sérums de souris immunisées avec le plasmide pcDNA3 (groupe III). Cette mesure a été répétée 20 fois et la valeur de la densité moyenne obtenue, corrigée pour le double de la valeur de l'écart-type a constitué la valeur limite COI. Ainsi, les valeurs des densités optiques supérieures à la valeur limite COI ont été considérées comme significatives.

Résultats

1. Caractérisation moléculaire du gène codant pour la protéine EGT

1.1. Identification de gène codant pour la protéine EGT

Le gène *egt* du virus ChfuGV a été amplifié par PCR à partir de l'ADN viral en utilisant des amorces sens et anti-sens portant respectivement les sites de reconnaissance des endonucléases de restriction *SphI* et *PstI*. L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose, après la coloration au bromure d'éthidium, du produit amplifié par PCR montre un fragment de 1,5 kpb qui correspondait au fragment contenant le gène *egt* du virus ChfuGV (figure 5).

Par la suite, le fragment d'ADN amplifié a été purifié, puis cloné dans le vecteur de clonage pCR[®]2.1 afin de conserver la stabilité et l'intégrité du fragment et de faciliter son sous clonage dans le vecteur d'expression pQE32. Une fois le gène *egt* sous cloné dans le vecteur pQE32, le plasmide recombinant a été linéarisé à l'aide de l'endonucléase de restriction *KpnI*. Une analyse par l'électrophorèse sur le gel d'agarose a permis de confirmer l'insertion du gène *egt* dans le plasmide pQE32 en plus de confirmer la taille (4,9 kpb) du plasmide recombinant pQE32*egt* (figure 6). La différence entre la taille du plasmide pQE32 (3,4 kpb), linéarisé à l'aide de l'endonucléase de restriction *PstI*. et la taille du plasmide recombinant pQE32*egt* (4,9 kpb) correspond à la taille du gène *egt* (1,5 kpb) inséré dans le plasmide pQE32.

Le plasmide recombinant pQE32*egt* a été séquencé afin de confirmer la séquence du gène *egt* inséré dans le plasmide ainsi que de la position du cadre de lecture ouvert du gène *egt* par rapport au site d'initiation de la transcription du vecteur d'expression pQE32. La séquence obtenue a été analysée et comparée avec les séquences des gènes *egt* d'autres granulovirus à l'aide du logiciel « Gene Work 2.5 » (Intelligenetics Inc., USA).

La séquence nucléotidique du gène *egt* du ChfuGV comprend un ORF de 1347 pb codant pour un polypeptide de 448 acides aminés (figure 7). Cet ORF est précédé d'une région promotrice comportant plusieurs éléments pouvant être impliqués dans

Figure 5 Profil électrophorétique d'un fragment d'ADN de 1,5 kb amplifié par PCR et contenant le gène *egt* du virus ChfuGV.

L'amplification par PCR du gène *egt* du ChfuGV (puits 1) et du gène codant pour la granuline du même virus à titre de contrôle positif (puits 2).

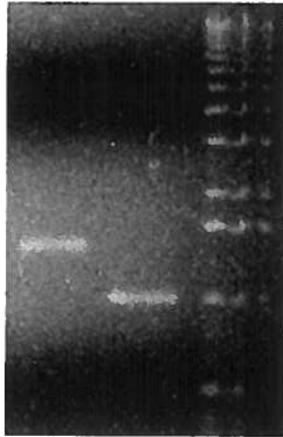
amplicon 1,5 kpb

**ctl
+**

**std
1 kb**

1

2



2 kb

1.6 kb

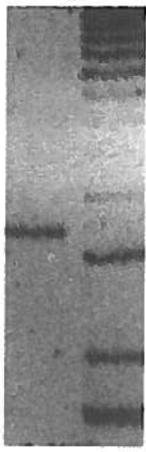
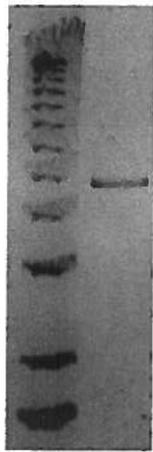
1 kb

Figure 6 Profil électrophorétique des plasmides recombinants pQE32 contenant le gène *egt* de virus CfGV après la digestion par endonucléase *KpnI*.

La digestion du plasmide recombinant pQE32*egt* (puits 1) par l'endonucléase *KpnI* montre que la masse moléculaire du plasmide recombinant linéarisé est de 4,9 kpb. La digestion du plasmide pQE32 (puits 2) par l'endonucléase *PstI* montre que la masse moléculaire de plasmide linéarisé est de 3,4 kpb

1

2



— 5 kpb
— 4
— 3
— 2



Figure 7 Séquence nucléotidique du gène *egt* et sa séquence déduite en acides aminés.

Les séquences soulignées correspondent aux promoteurs précoces TATA (-77 nt, -72 nt, -38 nt), aux sites potentiels d'initiation de la transcription CATT (-118 nt, -81 nt, -61 nt, -11 nt) et au promoteur tardif ATAGG (-198 nt). La séquence en rouge correspond au site d'initiation de la traduction du gène codant pour la protéine EGT.

la régulation de l'expression du gène *egt*. Ainsi, cette région comprend trois boîtes TATA situées à -77 nt, -72 nt et -38 nt en amont du codon d'initiation ainsi que quatre sites potentiels d'initiation de la transcription (CATT), situés à -118 nt, -81 nt, -61 nt et -11 nt et une séquence caractéristique du promoteur tardif (ATAAG), située à -198 nt.

En ce qui concerne la région en aval, aucun signal de polyadénylation n'a pas été localisé jusqu'à 150 pb après le codon stop du gène *egt*.

1.2. Analyse comparative de la séquence du gène codant pour la protéine EGT du ChfuGV

Afin de confirmer l'identité du gène *egt* isolé du ChfuGV, la séquence d'acides nucléiques de ce gène a été alignée avec celles des gènes d'autres granulovirus. La figure 8 présente l'alignement d'une région codant pour le domaine responsable de la reconnaissance du substrat. L'alignement des séquences *egt* a permis d'identifier 7 régions (de 40 à 140 pb) hautement conservées et caractéristiques des gènes *egt*. Ces observations ont permis de confirmer l'identité du gène *egt* isolé du granulovirus ChfuGV.

1.3. Analyses comparatives de la séquence déduite en acides aminés de la protéine EGT du ChfuGV.

Le gène *egt* du virus ChfuGV code pour une protéine déduite de 448 acides aminés qui a une masse moléculaire prédite de 50 kDa. La protéine EGT du ChfuGV comporte sept sites potentiels de *N*-glycosylation et six régions hautement conservées, soit les régions I, II, III, IV, V et VI (figure 9). La région VI comporte une séquence caractéristique de la famille des enzymes UDP-glucosyltransférases. Dans les régions conservées, des acides aminés occupant des positions précises ne varient pas entre les différentes protéines EGT. Par exemple, on retrouve un motif très conservé dans la région VI qui est composé du tryptophane (W), de la glycine (G), de l'acide glutamique (E), de la proline (P) et de deux glutamines (Q) (figure 10).

Figure 8. Alignement multiple des séquences codant pour le domaine responsable de la reconnaissance du substrat du gène *egt*.

Les segments encadrés correspondent aux séquences conservées. La séquence 1 correspond à la séquence du gène *egt* du virus ChfuGV cloné dans le vecteur d'expression pQE32.

	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160										
1. ChfuGV	ATTGGTTTCC	CAAGCAGATA	TTTAAATCAT	CCCAAATG	TAAAATTAT	TTTATAAA	CAAGCAGG	TCTTCA									
2. AoGV	AAATGGTTT	ACCGCAGAG	GAATATTTT	GAAAGAACCC	TCTGTTT	CAATAAAC	AAAGCAGG	CAATTTT									
3. CpGV	AAATGGTTT	CCCGCAGAG	GCGCTTT	CAACAGTGG	TGTGCTCA	AGTTGTTT	CTGACG	CAGGGTGGG	TGCA								
4. EaGV	AAATGGTTT	CCGCAAG	GAGACATAT	TGAATCAG	CGTAATG	TAAAGCTG	TTTATTAT	TCAGGGTGG	TGTACA								
5. LoGV	CATGGTTT	CCGCAA	GAGACGTT	TAAATCA	CCCGCA	ATAAAA	ACTTTT	ATATAC	GCAGGGTGG	TCTTCA							
6. PoGV	--TGGTTT	CCACAG	GCGCAAT	TGTTAA	ATTACGG	CAATA	TAAAGTT	ATTTATA	AAACAA	GGTGGTCTTCA							
7. PxGV	--TGGTTT	CCACAG	GCGCGT	GTTAA	AGCAC	AAAAAT	TTCAA	ACTGTTT	ATATAC	GCAGGGAGG	ACTGCA						
8. Cons.	TGGTTTCC	CAAGCA	GA	T	TTAA	AC	AT	T	AA	T	TTTAT	AA	CA	GG	GG	CT	CA

	1170	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240										
1.	ATCTGTGGAC	GAAGTGT	CATAGCGAA	TACCG	TTATTTGT	ATTC	CAATGCT	TGGG	ATCAATTT	TGTAATTG								
2.	GTCGATAGAC	GAAGCG	TAGATAAT	GAAATAC	CCATAT	ATTTGTT	TGCTTT	GATGGG	TGATCAA	TTTTTAA	AGC							
3.	GTCGATAGAT	GAGGCG	TGACGG	CGGGT	GCCAT	GCTGTGC	ATA	CCGATG	CTGGG	TGATCAA	TTTTTCAA	TTG						
4.	ATCTACCGAT	GAAGCA	TAGATAG	CTGTCT	GCCTT	CTGGGA	ATA	CCATG	CTGGG	TGATCAG	TTTA	AAAC						
5.	ATCTACCGAT	GAAGCA	TAAATAG	CGGTCT	CCATAT	ATGGG	ATTCC	TATAAT	GGGT	TGATCAG	TTTTATA	AGT						
6.	GTCACCGAG	CAAT	AATGAAG	CTGGTCT	TTCC	SAT	CTAGT	TTGCC	TTT	GATGGG	GGACCA	ATTTTA	AAAGC					
7.	GTCGAATT	GACGAGG	CATT	GATAAC	ACGCT	CC	SAT	CTGGT	CTGCC	ATATGGG	TGATCAA	TTT	AAAGC					
8.	TC	A	GA	GAAG	T	GATA	CG	CT	CC	AT	G	T	CC	ATG	TGGG	TGATCAA	TTTT	AAAGC

Figure 9. Six régions hautement conservées de la protéine EGT du virus ChfuGV.

en rouge : le peptide signal

encadrés : six domaines (I - IV) conservés chez toutes les protéines EGT

en noir soulignés : sites potentiels de *N*-glycosylation

MFVQLILVVLAPCFVCS **I** (25 a.a. - 38 a.a.)
SNILCVF **PTPALSHQSVFAAY** VDKL

VIAGH **NVT** VITP...NLV **II** (84 a.a. - 101 a.a.)
NST SI **KKRGLVADELVT AENY** TPIIDMV

VEQIKSY **NVT** NLLKNKDN...HLYRTPIIK **III** (154 a.a. - 163 a.a.)
SSGYGTNENF KTM...RS **NFS**

IV (226 a.a. - 256 a.a.)
E...QQ **SVKLLFVNVP HVFDS DRPVGENVQYLGGIHL** KKPRP

VRDIKLIEFLNQKTNI **V** (278 a.a. - 296 a.a.)
IYVSFGSIL DAAAMDESLLTEFVKVFTKFNVLWKIDNV

KFNLS **VI** (346 a.a. - 375 a.a.)
DN...KL **FITQGGVQSVDEAVDSEIPLICIPMVG DQ** FV

NCRRIDQLNIGVVVNILKLESENLYKKINDVM **NDT** TIVDKIHALKKNIH DAPMKPLHKA
LWYTQKVL RNNKY

Figure 10. Alignement de la région VI de la protéine EGT du virus ChfuGV avec celles d'autres baculovirus

Les acides aminés en rouge sont aux positions conservées par toutes les protéines de la famille des enzymes d'UDP-glucosyl transférases.

ChfuGV	NWFPQRDI LNHPNVKLFITQGGVQSVDEAVDSEI PLICI PMVGDQFVN
AoGV	KWLPQRNII LKNPRVKLFITQGGILSIDEAVDNEI PMIVVPLMGDQFLN
CpGV	EWFPQRALLNSGVVVKLFVTQGGQLQSIDEAVDGGV PMLCI PMVGDQFLN
EaGV	EWFPQRDI LNHANVKLFITQGGVQSTDEAIDSCV PLLGI PMVGDQFYN
LoGV	SWFPQRDVLNHPHIKVFITQGGVQSTDEAVNSGV PMIGI PIMGDQFYN
PoGV	KWFPQRELLNYGNIKLFITQGGVQSTSE SIEAGV PMLVL PLMGDQFYN
PxGV	DWLPQRSVLKHENLKL FITQGGVQSIDEAIDNTV PMLVVPTMGDQFFN
AcMNPV	NWFNQRAVLRHKKMAAFITQGGQLQSSDEALEAGI PMVCL PMMGDQFYH
AgMNPV	KWFNQRGV LNHPNVVAFVTQGGQLQSSDEALHARV PMVCL PMMGDQFHH
BmNPV	NWFNQRAVLRHKKMAAFITQGGQLQSSDEALEAGI PMVCL PMMGDQFYH
CfNPV	KWFDQRAVLRHKKVVA FVMQAGLQSSDEALESRV PMVCL PMMGDQFHH
LdMNPV	KWFAQFEV LQHKNVKA FVTQAGVQSTDEAVENLV PLVGV PLMGDQAFN
SplitNPV	RWFPQRRV LKHRNVKVFITQGGVQSTDEAIDAGV PMFGVPIMGDQFYN
SplitNPV	RWFPQRRV LKHRNVKVFITQGGVQSTDEAIDAGV PMVGV PIMGDQFYN
Consensus	WFPQR VL H VK FITQGG QS DEA VPM P MGDQF N

L'alignement de la région *N*-terminale de la protéine EGT du virus ChfuGV avec celles des protéines EGT d'autres baculovirus démontre la présence d'un domaine (15 a.a. à 34 a.a.) ayant un haut niveau de polymorphisme, suivi d'un motif hautement conservé (figure 11). Le domaine polymorphe constitue, par son caractère hydrophobe, le peptide signal de la protéine EGT. Le motif conservé, propre aux protéines sécrétoires, sert de site de clivage lors de la maturation de la protéine.

La séquence en acides aminés de la protéine EGT du virus ChfuGV montre un pourcentage d'homologie de 35% à 68% avec les séquences des protéines EGT d'autres baculovirus. Dans l'arbre phylogénétique, le virus ChfuGV se trouve en relation avec le groupement des granulovirus mais de façon plus éloignée (figure 12).

Ces différents résultats ont permis de confirmer l'identité du gène amplifié comme étant le gène *egt* du virus ChfuGV.

2. Expression de la protéine recombinante EGT complète et tronquée dans un système procaryote.

L'expression de la protéine EGT du virus ChfuGV dans le système d'expression procaryote a nécessité le clonage du gène *egt* dans le vecteur d'expression pQE32, l'expression de la protéine recombinante EGT et la purification du produit de l'expression.

Afin d'exprimer la protéine EGT, les bactéries *E. coli* M15 (pREP4) ont été transformées par le plasmide recombinant pQE32egt. Les protéines provenant des bactéries transformées ont été prélevées à différents temps suivant l'induction de l'expression et ont été séparées par l'électrophorèse sur le gel de polyacrylamide à 12 % dans des conditions dénaturantes. La présence de la protéine recombinante EGT a été détectée par l'immunobuvardage de type Western en utilisant les anticorps monoclonaux spécifiques à la queue de six histidines (anti-6HIS) en région *N*-terminale. Malgré la variation des différents paramètres d'expression, tel que le temps d'incubation (de 2 à 24 heures), la température d'incubation (de 30 à 37 °C) et la concentration d'IPTG

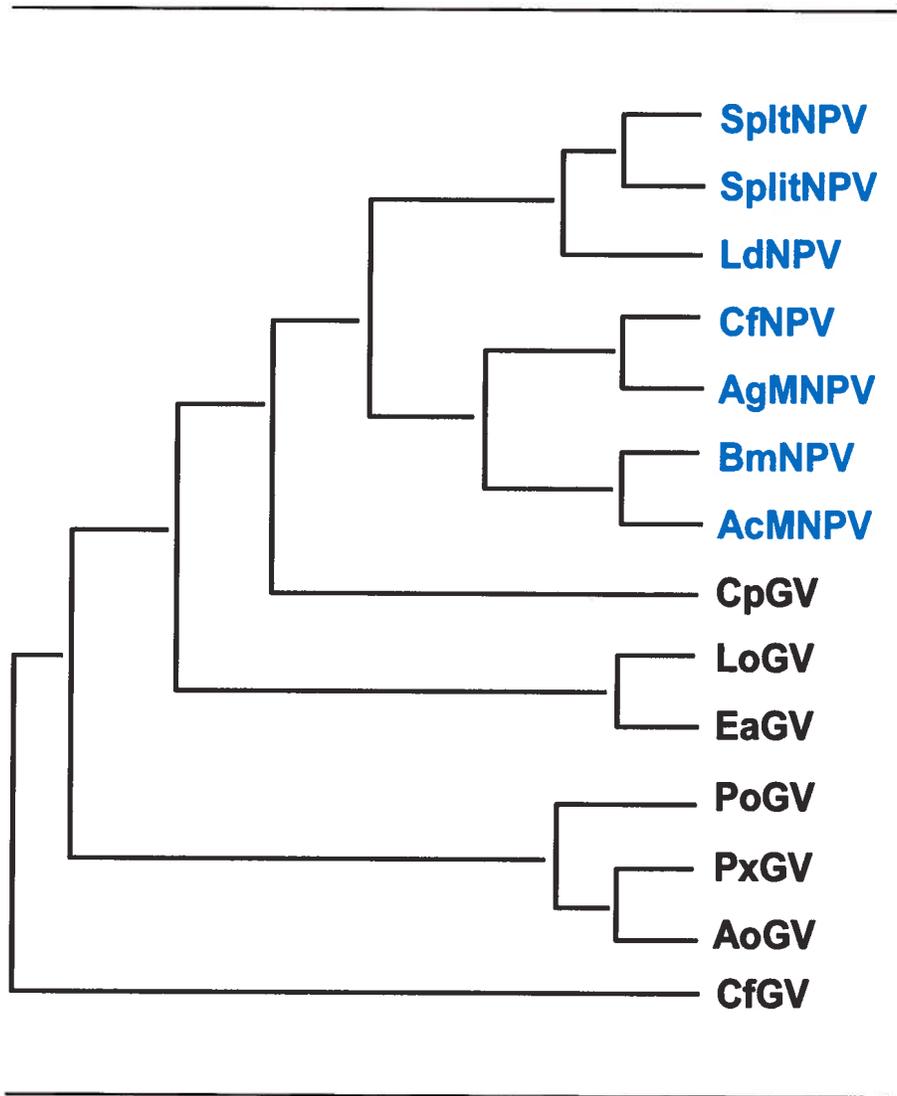
Figure 11. Alignement de la région *N*-terminale de la protéine EGT du virus ChfuGV avec celles d'autres baculovirus.

Les flèches indiquent le site de clivage du peptide signal.

ChfuGV	-----MFVQ-LILVVLAPCFVCS-	SNILCVFPTPALSH
AoGV	-----MYS---LIVLSLLFTVVSS	ARILCVFPIPSYSH
CpGV	MGRYTPNGAQPNLSLNMFRNNLVLLLPSLVHVFVHT	ANILCVFPTPAFSH
EaGV	-----MWTAA--IVVVLASSA-AA	HNILCVFPTPAYSH
LoGV	-----MFIS-ILLLALAVERIC	ANILCVFPTPAYSH
PoGV	----MHKCATKISFKMIK---LIFFLFFVVKTES	ANILCVFPTPAYSH
PxGV	-----MTLK-LLILFLGAAN--S	ANILCVFPTPSYSH
AcMNPV	-----MTILCWLALLSTLTAVNA	ANILAVFPTPAYSH
AgMNPV	-----MIFILLTLLAVSGAKT	ANILAVLPTPAYSH
BmNPV	-----MTILCWLALLSTLTAVNA	VNILAVFPTPAYSH
CfNPV	-----MASLLIALTLLAADAQT	ANILAVLPTPAYSH
SplitNPV	-----MKMIILVVSLHVLNRNSAA	VRVLCMFPTPSYSH
SplitNPV	-----MKMIILVLLHALRNSAA	VRVLCMFPTPSYSH
Consensus	-----	ANILCVFPTPAYSH



Figure 12. Arbre phylogénétique des protéines EGT des baculovirus.



(de 0,25 à 1 mM), l'expression de la protéine recombinante EGT n'a pas été détectée, et ceci en menant la purification dans des conditions natives et dénaturantes.

L'expression de la protéine EGT ayant échoué, un plasmide recombinant contenant la séquence partielle du gène *egt* a été utilisé pour exprimer la protéine EGT tronquée en région *N*-terminale.

Afin d'exprimer la protéine EGT tronquée (EGT589Pc), les bactéries *E. coli* M15(pREP4) ont été transformées par le plasmide recombinant pQE32egt589Pc. Les protéines provenant des bactéries transformées ont été prélevées à différent temps suivant l'induction de l'expression par l'ajout d'IPTG. Une analyse par l'électrophorèse sur le gel de polyacrylamide à 12 % dans des conditions dénaturantes a montré que seule la bactérie recombinante *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32egt589Pc)] est capable d'exprimer une protéine à 32 kDa (figure 13, puits 3 à 5 et 7 à 9) alors que la bactérie transformée par le vecteur d'expression pQE32 seul (témoin négatif) n'exprime pas cette protéine (figure 13, puits 6). Aucune différence n'a pas été observée au niveau de l'expression de la protéine recombinante EGT tronquée en fonction du temps (4 à 6 heures), suivant l'induction par l'IPTG.

La protéine de 32 kDa exprimée par les bactéries recombinantes *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32egt589Pc)] a été purifiée dans des conditions dénaturantes sur une colonne d'affinité Ni-NTA. Les fractions contenant une quantité importante de la protéine EGT589Pc ont été observées lors d'élution à pH 5,3 (fractions 4 à 9 - figure 14). Ces fractions ont été mises ensemble, dialysées et concentrées, puis analysées par l'électrophorèse sur le gel de polyacrylamide 12 % (figure 15). La concentration de la protéine recombinante EGT589Pc a été déterminée par la méthode de Bradford à 0,2 mg/l. Les mêmes étapes de purification ont été réalisés avec les bactéries recombinantes *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32)] (témoin négatif) afin de s'assurer de l'absence de la protéine recombinante de 32 kDa. Les échantillons de protéines ont été analysés par immunobuvardage de type Western en utilisant les anticorps monoclonaux dirigés contre la queue de 6 histidines (anti-6HIS), située en partie

Figure 13. Expression de la protéine tronquée (EGT589Pc), par les cellules bactériennes *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32egt589Pc)] à différents temps d'induction par l'IPTG.

Une culture de cellules bactériennes *E. coli* M15(pREP4) transformées par le plasmide recombinant pQE32egt589Pc a été induite par 1 mM d'IPTG pendant 0 heures (puits 2), ainsi que pendant 4 heures (puits 3 et 7), 5 heures (puits 4 et 8) et 6 heures (puits 5 et 9). Les mêmes cellules bactériennes, mais transformées par le plasmide pQE32 ont été utilisées comme contrôle négatif et ont été induites durant 6 heures (puits 6). Les protéines contenues dans les lysats bactériens ont été séparées par électrophorèse sur le gel de polyacrylamide de 12% (SDS-PAGE), puis le gel a été coloré au bleu de coomassie. Cette analyse montre que les bactéries recombinantes *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32egt589Pc)] expriment une protéine de 32 kDa qui n'a pas été exprimée par les bactéries contrôle négatif. La protéine de 32 kDa correspond donc à la protéine EGT tronquée (EGT589Pc) du ChfuGV. L'expression de la protéine de 32 kDa ne varie pas en fonction du temps (4 à 6 heures) de l'induction.

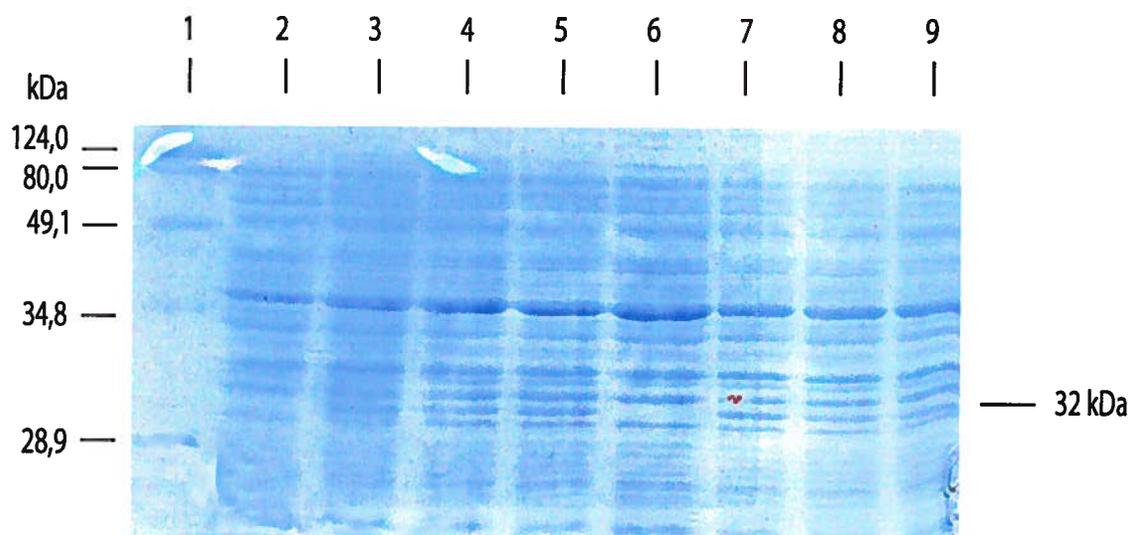


Figure 14. Analyse par électrophorèse SDS-PAGE de la protéine EGT589Pc purifiée par chromatographie d'affinité à partir de la culture de cellules bactériennes *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32egt589Pc)], ainsi qu'à partir de la culture bactérienne *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32)].

La protéine recombinante EGT589Pc a été purifiée dans des conditions dénaturantes à partir de lysat des cellules bactériennes *E. coli* M15 [(pREP4)(pQE32egt589Pc)] par chromatographie d'affinité sur la colonne de nickel – acide nitriloacétique (Ni-NTA).

- Fractions F1 et F2 : excédant de la colonne;
- Fractions L1 à L8 : fractions contenant les protéines libérées de la colonne lors du lavage;
- Fractions E1 à E8 : fractions contenant les protéines libérées de la colonne lors d'élution à pH 5,3;
- Fractions E9 à E16 : fractions contenant les protéines libérées de la colonne lors d'élution à pH 4,3 (Figure 14a).

Les fractions ainsi recueillies ont été analysées par électrophorèse sur le gel de polyacrylamide de 12% et visualisées par coloration au bleu de coomassie. Cette analyse démontre une forte présence de la protéine EGT589Pc dans les fractions éluées à un pH 5,3 (fractions E4 à E9) et l'absence de cette protéine lors de la purification à partir de la culture bactérienne *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32)], servant de contrôle négatif.

pQE32egt589Pc

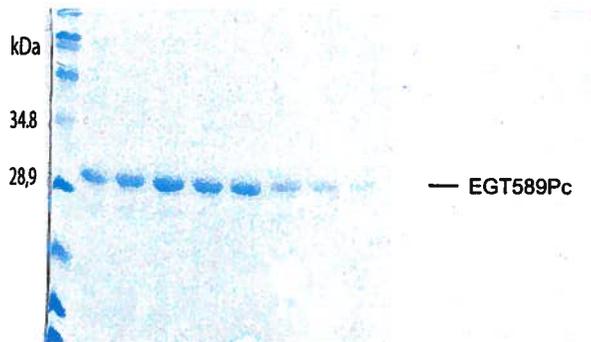
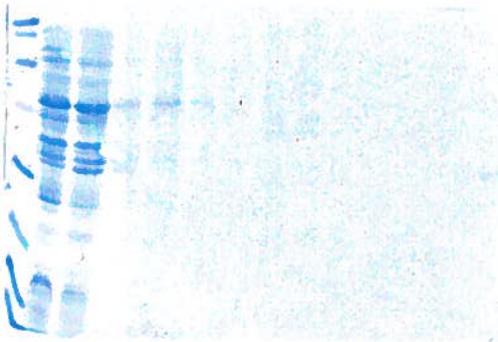
F1/F2

L1 à L8

E1 à E3

E4 à E8

E9 à E16



pQE32

F1/F2

L1 à L8

E1 à E3

E4 à E8

E9 à E16

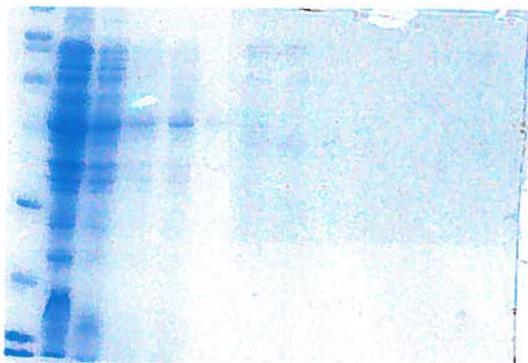
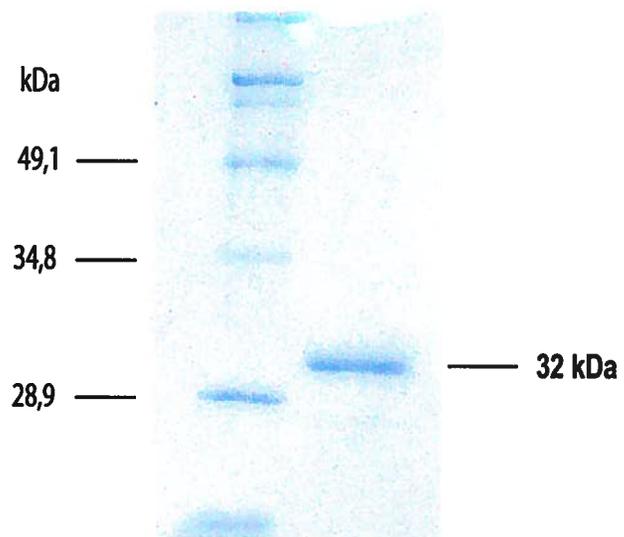


Figure 15. Analyse par électrophorèse SDS-PAGE de la protéine recombinante EGT589Pc, purifiée par chromatographie d'affinité, dialysée et concentrées.

Les fractions E4 à E9 obtenues suite à la purification de la protéine recombinante tronquée EGT589Pc par chromatographie d'affinité (Ni-NTA) ont été combinées, dialysées contre un tampon PBS, puis concentrées sur le filtre de cellulose de porosité 10 kDa. Le concentré obtenu a été analysé par électrophorèse sur le gel de polyacrylamide 12% et visualisé par coloration au bleu de coomassie. Une protéine de 32 kDa correspondant à la protéine recombinante EGT589Pc a été observée en absence de protéines contaminantes.



N-terminale de la protéine recombinante EGT589Pc (figure 16). Il est possible d'observer une réaction antigène - anticorps au niveau de la protéine recombinante de 32 kDa exprimée par les bactéries *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32egt589Pc)] après la purification et la concentration de la protéine EGT589Pc (puits 1). Cette réaction est absente du lysat des cellules bactériennes contrôles *E. coli* M15(pREP4) (puits 2). Cette analyse a permis de constater que la protéine ainsi produite et purifiée correspond à la protéine EGT589Pc codée par le plasmide recombinant pQE32egt589Pc.

3. Expression de la protéine EGT dans un système d'expression eucaryote

Le fragment codant pour le gène *egt* du virus ChfuGV a été amplifié par PCR à partir de l'ADN viral en utilisant les amorces sens et anti-sens contenant les sites de restriction des endonucléases *Bam*HI et *Xba*I, respectivement. La taille du fragment amplifié a été déterminée à 1,4 kpb suite à une analyse par électrophorèse sur le gel d'agarose. Ce fragment a été purifié et cloné dans le vecteur pCR[®]2.1, puis sous cloné dans le vecteur d'expression pcDNA3. L'insertion du gène *egt* dans le plasmide pcDNA3 vérifiée par une série de digestions avec les endonucléases de restriction. La figure 17 présente les résultats de la digestion du plasmide pcDNA3/EGT par l'endonucléase de restriction *Hind*III qui produit deux fragments d'ADN de 5394 et 1328 pb.

Le plasmide recombinant pcDNA3/EGT a été séquencé afin de comparer la séquence en nucléotides du gène inséré avec celle du gène *egt* du virus ChfuGV. La comparaison a démontré une homologie de 100% entre le gène inséré et le gène viral, à l'exception de la modification apportée volontairement dans le codon « stop » du gène. Ce plasmide a été utilisé lors de l'immunisation génétique.

4. Immunisation génétique et évaluation de la réponse immune

4.1. Plasmides utilisés lors de l'immunisation génétique

Les plasmides pcDNA3/EGT, pcDNA3 et pcDNA3/IL2 ont été produits en grande quantité puis purifiés afin d'être injecté aux souris. La qualité des plasmides

Figure 16. Analyse par immunobuvardage de type Western du concentré de la protéine recombinante EGT589Pc purifiée par chromatographie d'affinité, dialysées et concentrée.

Les fractions d'élution E4 à E9 contenant la protéine recombinante EGT589PC et obtenues suite à la purification par chromatographie d'affinité ont été combinées, dialysées et concentrées. La protéine recombinante EGT589Pc concentrée (puits 1), ainsi que le produit de la purification des protéines à partir de culture bactérienne *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32)] (puits 2) ont été analysés par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la queue de 6 histidines de la protéine recombinante EGT589Pc. Cette analyse montre que seul la protéine recombinante purifiée a été reconnue par les anticorps monoclonaux anti-6HIS (puits 1).

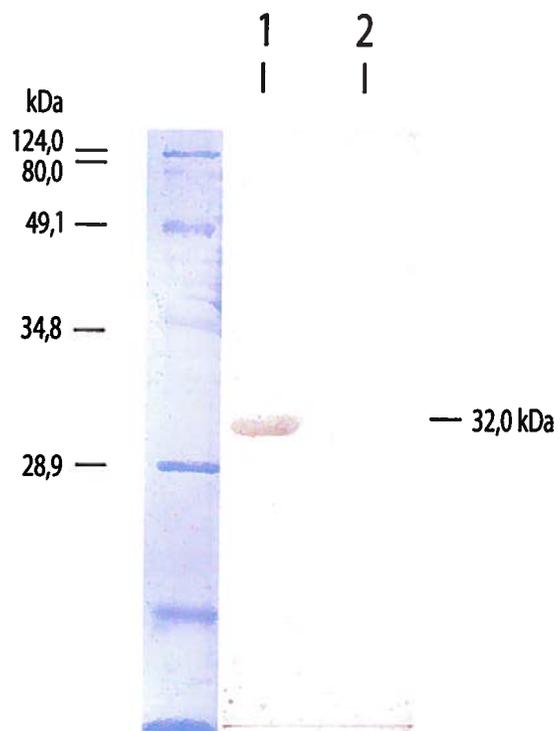
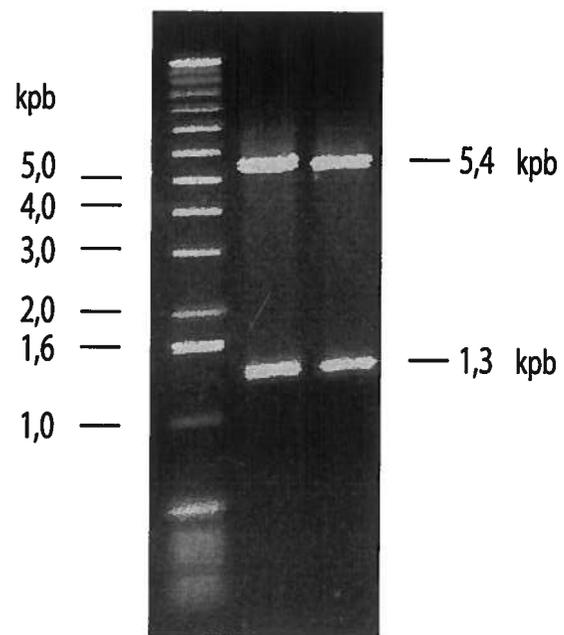


Figure 17. Profil électrophorétique du plasmide recombinant pcDNA3/EGT.

Les plasmides recombinants pcDNA3/EGT ont été digérés par l'endonucléase de restriction *Hind*III et les produits de cette réaction ont été analysés par l'électrophorèse sur le gel d'agarose. Les plasmides pcDNA3/EGT possédant deux sites de restriction reconnues par endonucléase de restriction *Hind*III, sont clivés en deux fragments d'ADN de 5,4 kpb et de 1,3 kpb.



et leur intégrité ont été analysés par l'électrophorèse sur gel d'agarose suite à une digestion avec l'endonucléase de restriction *Bam*HI (figure 18). Le plasmide recombinant pcDNA3/EGT a été injecté aux souris dans le but de produire des anticorps polyclonaux spécifiques à la protéine EGT. Le plasmide recombinant pcDNA3/IL2 qui exprime l'IL-2 murin et le plasmide pcDNA3 ont été co-injectés avec le plasmide pcDNA3/EGT comme adjuvants génétiques. De plus, le plasmide pcDNA3 seul a été injecté comme témoin négatif.

4.2. Analyse de la spécificité des anticorps anti-EGT par immunobuvardage de type Western

L'analyse par l'immunobuvardage de type Western montre que l'immunisation des souris avec le plasmide pcDNA3/EGT a permis la production d'anticorps anti-EGT (figure 19A, puits 4 à 6) à partir du 42^{ème} jour suivant la première immunisation. À noter également, la détection d'une protéine contaminante ayant une masse moléculaire légèrement inférieure à la protéine recombinante EGT589Pc. Cette protéine contaminante est reconnue par des anticorps présents dans le sérum de tous les groupes de souris (pcDNA3, pcDNA3/EGT, pcDNA3/EGT+pcDNA3, pcDNA3/EGT+pcDNA3/IL2) et à tous les différents temps post-immunisation (figure 19). L'analyse par l'immunobuvardage de type Western montre également qu'il est possible d'accélérer la production d'anticorps anti-EGT en injectant, en combinaison, les plasmides pcDNA3/EGT et pcDNA3 lors de l'immunisation des souris. Ainsi, la production d'anticorps apparaît clairement 28 jours suivant la première immunisation (figure 19B). L'accélération de la production d'anticorps anti-EGT est encore plus marquée lors que les souris sont injectées avec le plasmide pcDNA3/EGT en combinaison avec le plasmide pcDNA3/IL2 (figure 19C). En effet, des anticorps dirigés contre la protéine recombinante EGT589Pc sont produits deux semaines suivant la première immunisation.

Une deuxième analyse par l'immunobuvardage de type Western a permis d'étudier la spécificité d'anticorps anti-EGT produit par l'immunisation génétique avec

Figure 18. Profil électrophorétique des plasmides recombinants pcDNA3/EGT, pcDNA3/IL2 et les plasmides pcDNA3.

Les différents plasmides préparés pour l'injection ont été digérés par endonucléase de restriction *Bam*HI. Le plasmide pcDNA3 digéré migre à 5,4 kpb (puits 1 et 2), le plasmide recombinant pcDNA3/EGT digéré migre à 6,8 kpb (puits 4 à 9) et le plasmide recombinant pcDNA3/IL2 digéré est clivé en deux fragments de 5,8 kpb et 1 kb (puits 11 et 12).

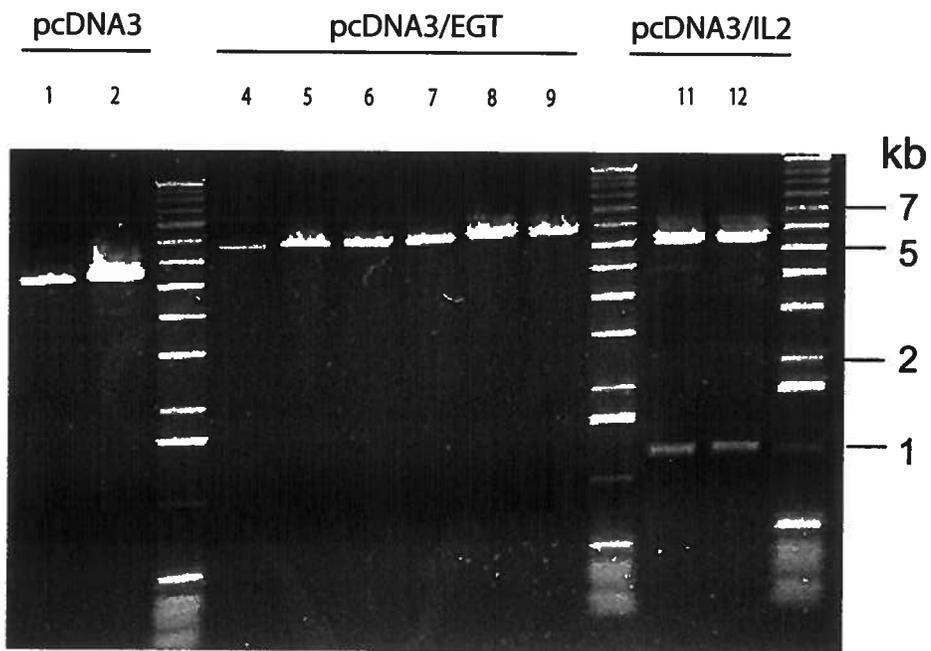
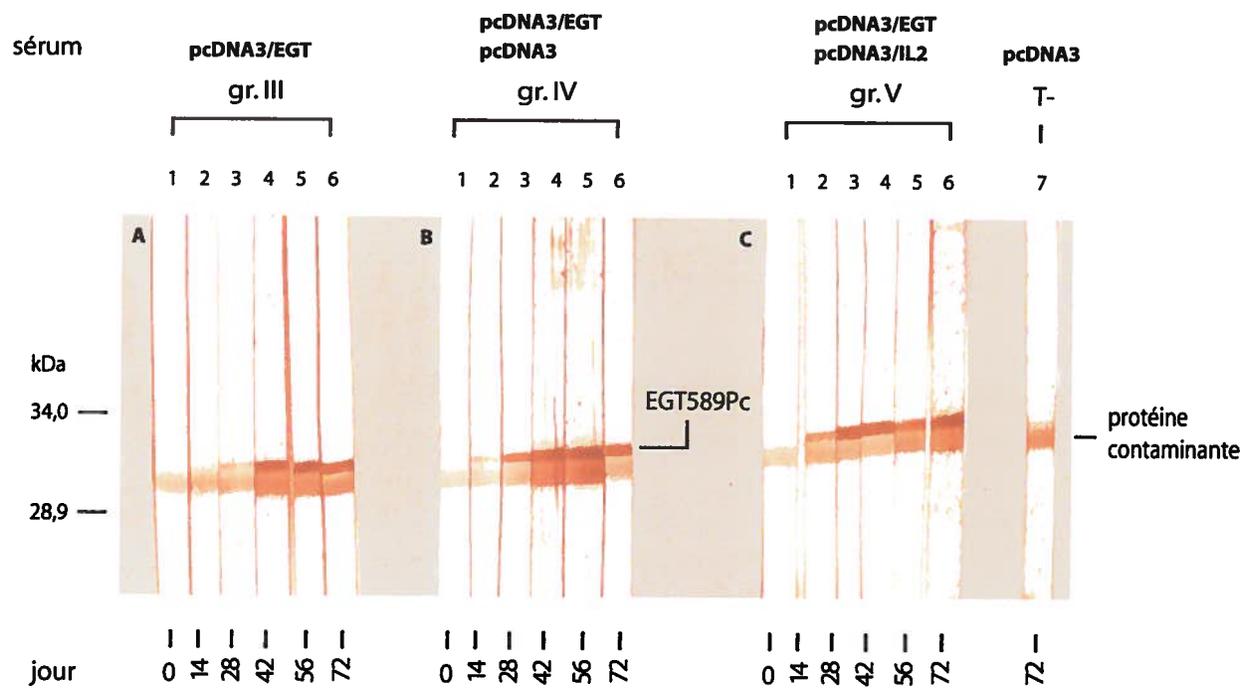


Figure 19. Analyse par immunobuvardage de type Western de la spécificité des anticorps anti-EGT produits par l'immunisation génétique.

L'analyse par immunobuvardage de type Western a été effectuée en utilisant les sérums des souris immunisées avec les plasmides recombinants pcDNA3/EGT (groupe III, figure 19A), avec le plasmide recombinant pcDNA3/EGT combiné au de plasmide pcDNA3 (groupe IV, figure 19B) et les plasmides recombinants pcDNA3/EGT et pcDNA3/IL2 combinés (groupe V, figure 19C). La protéine recombinante EGT589Pc purifiée constitue le matériel sondé par les anticorps produits. Les sérums des trois différents groupes contiennent des anticorps qui reconnaissent la protéine recombinante EGT 589Pc (figure 19A, ligne 3 à 6 ; figure 19B, ligne 2 à 6 ; figure 19C, ligne 2 à 6). Les anticorps contenus dans le sérum des souris immunisées reconnaissent aussi une protéine contaminante ayant une masse moléculaire légèrement inférieure à celle de la protéine recombinante (figure 19 A, B, C, ligne 1 à 6 ; témoin négatif pcDNA3, ligne 7).



le plasmide recombinant pcDNA3/EGT (groupe III). Le sérum des souris injectées avec le plasmide pcDNA3/EGT a été utilisé pour sonder la protéine recombinante EGT589Pc ainsi que les protéines bactériennes *E. coli* M15(pREP4) (figure 20, lignes 4 et 6). Le sérum anti-EGT possède des anticorps dirigés contre la protéine recombinante EGT589Pc (Figure 20, ligne 4) et contre la protéine contaminante (figure 20, lignes 4 et 6). La protéine recombinante EGT589Pc et les protéines bactériennes *E. coli* M15(pREP4) ont été également sondées avec des anticorps monoclonaux anti-6HIS. Une réaction avec la protéine recombinante EGT589Pc était très spécifique tandis qu'aucune réaction n'a pas été observée lors de réaction avec le lysat bactérien (figure 20, lignes 6 et 7, respectivement). Finalement, les résultats obtenus montrent également que le sérum des souris immunisées avec le plasmide pcDNA3 (témoin négatif) contient des anticorps dirigés contre la protéine contaminante (figure 20, ligne 8).

4.3. Analyse par ELISA de la réponse humorale induite lors de l'immunisation génétique avec le plasmide recombinant pcDNA3/EGT.

Le paramètre indiquant la valeur de densité optique limite COI (« *cut off index* ») a été déterminé lors d'un test ELISA dit de sensibilité. Pour ce faire, un test ELISA a été répété 20 fois en utilisant le dernier prélèvement des sérums de souris, injectées avec le plasmide pcDNA3 (témoins négatifs). La valeur de la densité optique moyenne (1,122), additionnée à la valeur de l'écart-type (0.086) multipliée par 2, a permis de déterminer à 1,295 l'indice de la valeur limite. Au-delà de cette valeur les densités optiques sont considérées significatives.

La figure 21 présente les valeurs des densités optiques pour les sérums des cinq différents groupes de souris immunisées. Tel que prévu, les tests ELISA utilisant les sérums de souris immunisées avec une solution saline (PBS) ou avec le plasmide pcDNA3 ont montré des densités optiques inférieures à celle du COI, elles sont donc non-significatives. Par contre, le test ELISA montre clairement la production significative d'anticorps anti-EGT spécifiques par les souris immunisées avec le plasmide pcDNA3/EGT combiné ou non avec le plasmide pcDNA3. La production d'anticorps

Figure 20. Analyse comparative par immunobuvardage de type Western de la spécificité des anticorps anti-EGT produits par immunisation génétique.

Une dilution 1 :400 du sérum anti-EGT final des souris immunisées avec le plasmide pcDNA3/EGT (groupe III) a été incubée en présence de la protéine recombinante EGT589Pc purifiée (ligne 4) et en présence du lysat de cellules bactériennes *E. coli* M15 [(pREP4)(pQE32)] (ligne 6). Ces mêmes protéines ont été incubées en présence d'anticorps anti-6HIS (lignes 5 et 7). De plus, la protéine recombinante EGT589Pc a été incubée en présence du sérum du groupe II (témoin négatif) immunisé avec le plasmide pcDNA3 seul (ligne 8). La protéine recombinante EGT est reconnue par les anticorps anti-6HIS (ligne 5) et par les anticorps contenus dans le sérum des souris injectées avec le plasmide recombinant pcDNA3/EGT (ligne 4). Le sérum des souris injectées avec le plasmide pcDNA3/EGT possède aussi des anticorps qui reconnaissent une protéine contaminante présente à la fois dans le lysat de bactéries *E. coli* M15[(pREP4)(pQE32)] (ligne 6) et dans le concentré de la protéine recombinante EGT589Pc (ligne 4). Cette protéine recombinante n'est toutefois pas reconnue par les anticorps anti-6HIS (lignes 5 et 7). Le sérum des souris injectées avec le plasmide pcDNA3 (témoin négatif) possède des anticorps contre la protéine contaminante.

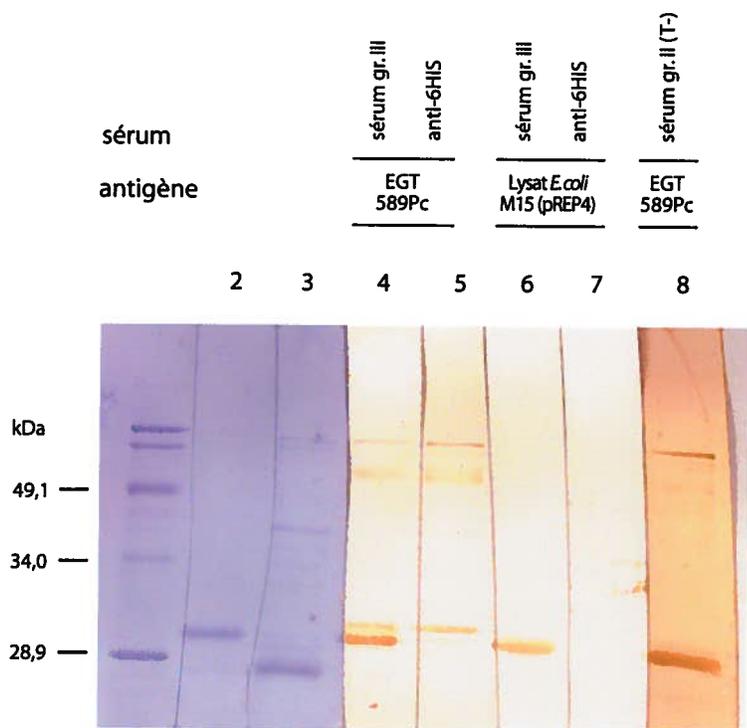


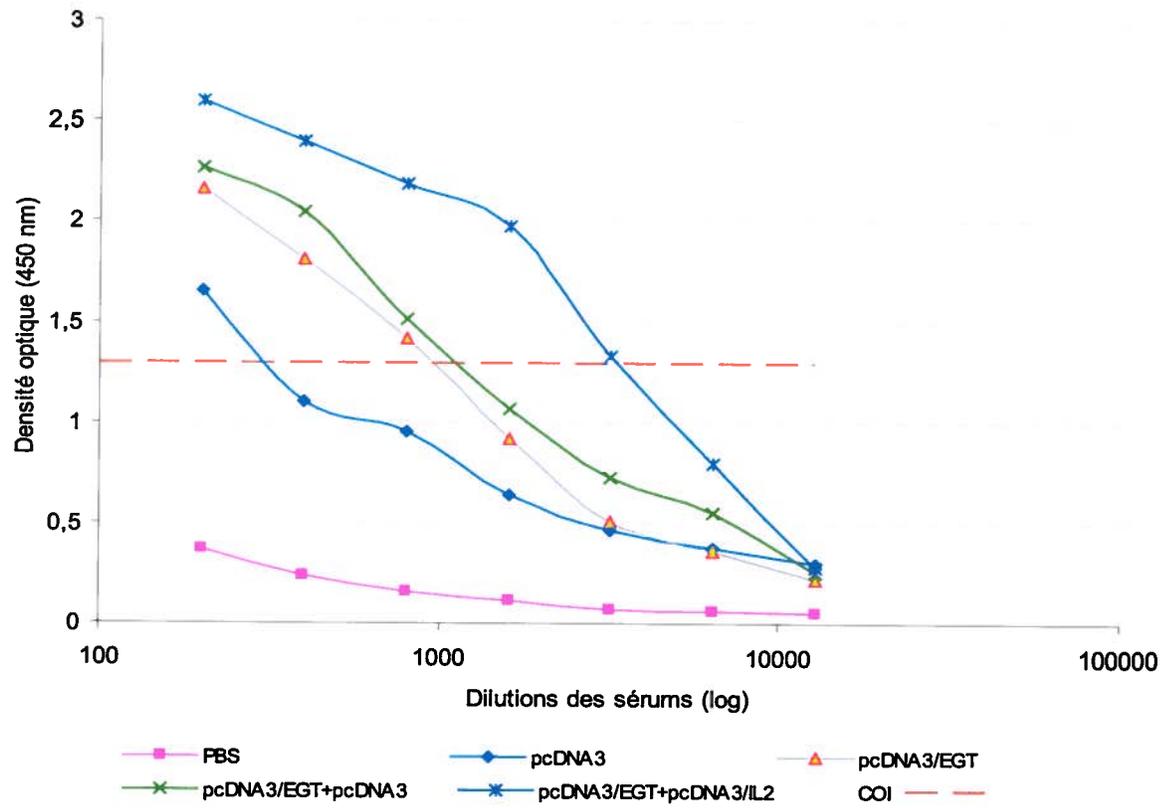
Figure 21. Analyse de la réponse humorale des souris suite à l'immunisation génétique visant à produire des anticorps anti-EGT.

Les tests ELISA ont été effectués avec les sérums dilués de souris prélevés 72 jours après la première immunisation. Les dilutions étaient de 1 :200, 1 :400, 1 :800, 1 :1600, 1 :3200, 1 :6400 et 1 :12800.

Groupes représentés :

- | | |
|-------------------------------|---|
| Gr. I : PBS | : témoin négatif |
| Gr. II : pcDNA3 | : vecteur pcDNA3 (témoin négatif) |
| Gr. III : pcDNA3/EGT | : plasmide recombinant exprimant la protéine EGT |
| Gr. IV : pcDNA3/EGT+pcDNA3 | : plasmide recombinant exprimant la protéine EGT co-injecté avec le plasmide pcDNA3 comme adjuvant génétique |
| Gr. V: pcDNA3/EGT+pcDNA3/IL2: | plasmide recombinant exprimant la protéine EGT co-injecté avec le plasmide recombinant exprimant l'interleukine IL2 murin |

Le trait horizontal correspond à la valeur du COI.



anti-EGT la plus importante est obtenue suite à l'immunisation des souris avec le plasmide pcDNA3/EGT combiné au plasmide recombinant pcDNA3/IL2.

4.4. Cinétique de la réponse humorale induite lors de l'immunisation génétique avec le plasmide recombinant pcDNA3/EGT.

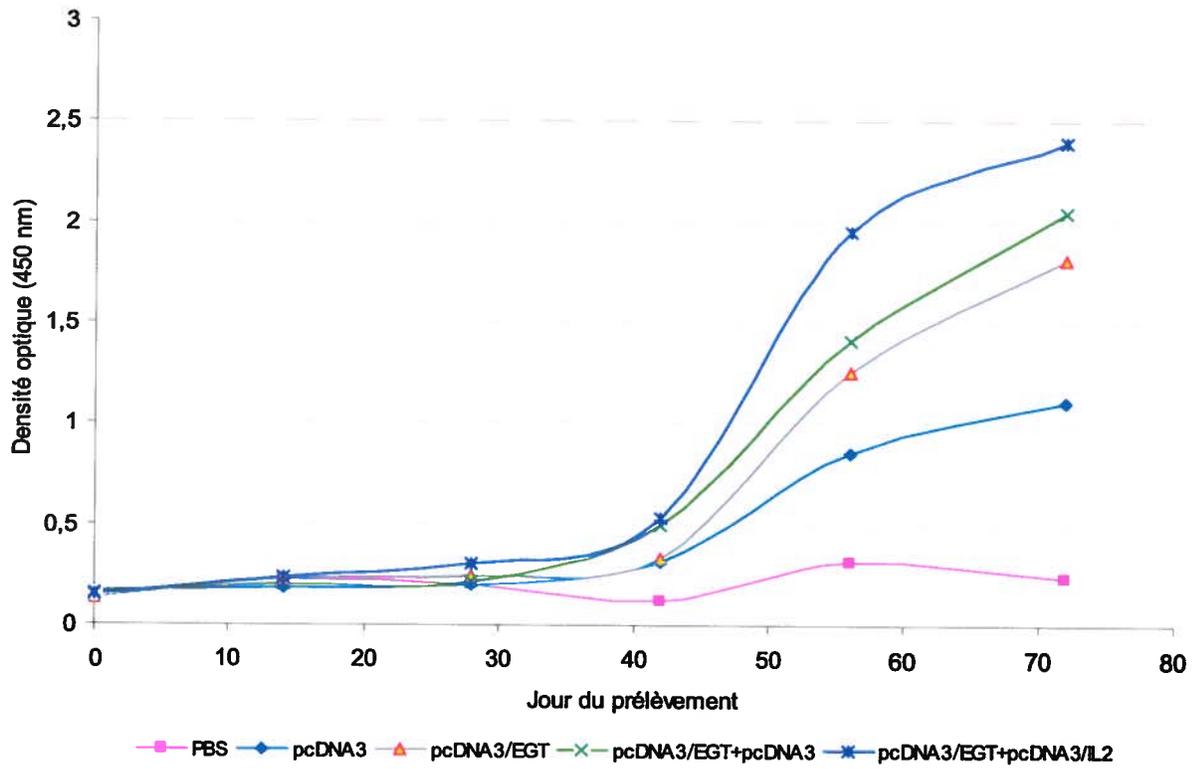
L'analyse de la cinétique de la réponse humorale induite par l'immunisation génétique par le plasmide recombinant pcDNA3/EGT a permis d'observer le niveau de production d'anticorps en fonction du nombre de jours après la première immunisation et d'évaluer l'influence des plasmides co-injectés avec le plasmide pcDNA3/EGT sur le niveau de la réponse humorale (figure 22). Une réponse humorale significative n'a été observée que 42 jours suivant la première injection pour les groupes III, IV et V. La plus importante production d'anticorps a été observée chez les souris injectées avec le plasmide pcDNA3/EGT combiné au plasmide pcDNA3/IL2 (groupe V). Il faut noter également une augmentation de la réponse humorale chez les souris injectées avec le plasmide pcDNA3 (groupe II) par rapport aux souris du groupe I, injectées avec le tampon PBS.

Figure 22. Cinétique de la réponse humorale observée dans les sérums des souris au cours de l'immunisation génétique visant à produire des anticorps anti-EGT.

Les souris ont été injectées au jour 0 et elles ont reçu 4 doses de rappel aux jour 14, 28, 42 et 56. Les tests ELISA ont été effectués sur les sérums de ces souris, récoltés aux jours 0, 14, 28, 42, 56 et 72.

Groupes représentés :

- | | |
|-------------------------------|---|
| Gr. I : PBS | : témoin négatif |
| Gr. II : pcDNA3 | : vecteur pcDNA3 (témoin négatif) |
| Gr. III : pcDNA3/EGT | : plasmide recombinant exprimant la protéine EGT |
| Gr. IV : pcDNA3/EGT+pcDNA3 | : plasmide recombinant exprimant la protéine EGT co-injecté avec le plasmide pcDNA3 comme adjuvant génétique |
| Gr. V: pcDNA3/EGT+pcDNA3/IL2: | plasmide recombinant exprimant la protéine EGT co-injecté avec le plasmide recombinant exprimant l'interleukine IL2 murin |



Discussion

Il a été démontré, lors de ce projet, que le génome du virus ChfuGV renferme le gène *egt* de 1347 pb qui code pour la protéine EGT de 448 acides aminés et d'un poids moléculaire théorique de 50 kDa. Dans le cadre de la réalisation des objectifs de notre projet de recherche, nous avons amplifié le gène *egt* à partir de l'ADN viral extrait du virus ChfuGV. L'analyse des séquences nucléotidiques du gène *egt* démontre un haut degré de conservation au niveau de plusieurs motifs qui sont présents dans les séquences des gènes *egt* d'autres granulovirus tel que l'AoGV, le CpGV, l'EaGV, le LoGV, le PoGV et le PxGV. Ces motifs conservés dans le gène *egt* codent pour des domaines de la protéine EGT qui sont importants pour son activité enzymatique. La protéine EGT appartient à la famille des UDP-glycosyl transférases et elle intervient au niveau de la balance hormonale entre l'hormone juvénile qui empêche la mue et l'ecdysone qui favorise ce processus chez une larve. Suite à l'infection d'une larve par un baculovirus, l'enzyme EGT virale catalyse le transfert d'une molécule de glucose ou de galactose conjuguée à l'UDP vers l'ecdysone qui devient alors inactivée. Une larve infectée demeure alors dans son stade actuel de développement à cause de la prédominance de l'hormone juvénile. Par conséquent, une larve infectée continue de s'alimenter et augmente son poids corporel, ce qui se traduit également par une augmentation de la production virale, étant donné que des ressources additionnelles deviennent disponibles pour cette fin. À l'intérieur de toutes les protéines EGT des virus analysés (le ChfuGV, l'AoGV, le CpGV, l'EaGV, le LoGV, le PoGV, le PxGV, l'AcMNPV, l'AgMNPV, le BmNPV, le CfNPV, le LdMNPV, le SplitNPV et le SpltNPV), nous avons pu distinguer 6 régions hautement conservées. Les régions II, III et IV sont probablement responsables de la reconnaissance de l'ecdysone tandis que la région VI est liée à la reconnaissance de l'UDP conjuguée au sucre (Manzà *et al.*, 2003).

Comme chez toutes les protéines EGT des baculovirus, notre analyse de la séquence en acides aminés de la région N-terminale de la protéine EGT du virus ChfuGV a montré la présence d'un peptide signal hydrophobe. Le peptide signal permet de diriger la pro-enzyme dans le compartiment extracellulaire. Ce peptide signal

est scindé du reste de la protéine avant sa excrétion par les cellules infectées (Manzà *et al.*, 2003). L'alignement des régions initiales des protéines EGT des virus ChfuGV, AoGV, CpGV, EaGV, LoGV, PoGV, PxGV, AcMNPV, AgMNPV, BmNPV, CfNPV, SplitNPV et SpltNPV montre un grand polymorphisme au niveau des séquences des peptides signaux. Le polymorphisme disparaît et l'homologie entre les séquences augmente abruptement après le site de clivage. Ce haut niveau de polymorphisme laisse suggérer que le peptide signal joue un rôle important dans la reconnaissance spécifique des cellules de l'hôte. Par exemple, les virus SplitNPV et SpltNPV possèdent les peptides signaux presque identiques. En effet, ces virus ont été isolés de deux espèces d'insectes qui sont très proches phylogénétiquement.

Le gène *egt* est considéré comme non essentiel pour la réplication virale. Cette caractéristique pourrait expliquer le fait que le gène *egt* est exprimé à différents temps post-infection selon les différentes espèces de baculovirus. Cette variation est reflétée, entre autres, par la configuration des motifs régulateurs au niveau du promoteur du gène *egt*. Chez le virus ChfuGV, le promoteur du gène *egt* renferme des motifs TATA caractéristiques des promoteurs précoces. Par contre, le trait de guanine/pyrimidine associé à plusieurs promoteurs des gènes précoces de cette famille de virus est absent chez le ChfuGV. De plus, le motif ATAAG caractéristique du promoteur tardif est également présent en amont du gène *egt* de ce virus. La présence des motifs précoces et tardifs dans le promoteur du gène *egt* du ChfuGV pourrait indiquer qu'il y a une expression continue du gène *egt* tout au long de l'infection par le ChfuGV, comme c'est le cas pour le gène *egt* du virus AcMNPV (Evans et O'Reilly, 1999) ou du virus EaGV (Manzà *et al.*, 2003). Il est également possible que l'expression du gène *egt* du ChfuGV s'apparente d'avantage à celui du virus EpMNPV (Caradoc-Davies *et al.*, 2001). En effet, dans ce cas, la transcription à partir du motif tardif n'a pas eu lieu malgré sa présence dans la région promotrice du gène. Toutes ces informations pourraient indiquer un mécanisme particulier de l'expression du gène *egt*. Il est donc possible que ce mécanisme résulte encore une fois de la spécificité de l'hôte dont le caractère non essentiel du gène *egt* permet aux espèces virales d'ajuster la régulation d'expression par

rapport à cette spécificité, sans toutefois diminuer la capacité de la propagation du virus.

L'analyse des séquences nucléotidiques du gène *egt* du virus ChfuGV a également révélée l'absence du signal de polyadénylation AATAAA en aval de ce gène, contrairement à la majorité des gènes *egt* d'autres baculovirus qui possèdent ce signal (Khan *et al.*, 2003; Manzàn *et al.*, 2003). La présence de la séquence poly(A) est nécessaire pour augmenter le niveau de la transcription et pour stabiliser la molécule d'ARNm. Le signal de polyadénylation permet d'ajouter la séquence poly(A) au transcrit du gène par une poly-A polymérase cellulaire. La présence de la séquence poly(A) du côté 3' de la molécule d'ARNm est nécessaire pour l'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes (Thoma *et al.*, 2004). Puisque seuls les transcrits de l'ARN polymérase II sont munis des signaux de polyadénylation, il est donc possible que les enzymes qui interagissent avec l'ARN polymérase II soient capables d'ajouter la séquence poly(A). L'ARN polymérase II de la cellule infectée participe dans l'expression des gènes viraux lors de la phase précoce (l'expression des gènes α et β). Par ailleurs, dans la région promotrice du gène *egt* du virus ChfuGV se trouvent les motifs caractéristiques pour cette phase de l'expression du gène *egt*. L'absence du signal de polyadénylation suggère donc que, malgré la présence des motifs précoces dans le promoteur, l'expression du gène *egt* chez le virus ChfuGV serait plutôt régulée par son promoteur tardif.

L'analyse phylogénétique basée sur les séquences en acides aminés des protéines EGT effectuée lors de ce projet a permis placer le virus ChfuGV dans le même clade que les autres granulovirus mais sur une position relativement distincte (figure 12). Traditionnellement, la phylogénie des baculovirus est basée sur l'analyse des gènes individuels, tels que ceux de la polyèdrine (Bulach *et al.*, 1999), de la granuline (Bideshi *et al.*, 2000), de l'ADN polymérase (Bulach *et al.*, 1999) ou de l'EGT (Manzàn *et al.*, 2003). Les résultats obtenus dans cette étude correspondent généralement à la littérature pour la protéine analysée. Toutefois, il faut remarquer que ce type d'analyse est de plus en plus remplacé par des comparaisons basées sur les génomes baculoviraux complets et leur nombre croissant rend ce type d'études de plus en plus informatif.

Une étude de ce genre effectuée par Herniou et collaborateurs (2003) a été basée sur l'analyse de 13 génomes complets des baculovirus et, en particulier, sur 30 gènes communs pour les baculovirus. Le gène *egt* ne faisait pas partie de ce groupe, ce qui pourrait être interprété comme signe de faiblesse pour l'application de telles démarches analytiques sur le gène *egt*, surtout que ce dernier est absent chez le virus XcGV (Hayakawa *et al.*, 1999) et CnSNPV (Afonso *et al.*, 2001).

Le principal objectif de ce projet consistait à exprimer la protéine EGT du virus ChfuGV dans un système d'expression procaryote. Cet objectif a été atteint de façon partielle puisque nous avons réussi à exprimer la partie C-terminale de cette protéine. En effet, l'expression des protéines sécrétoires pose certains problèmes techniques. Bowden et Georgiou (1990) avaient montré que chez la bactérie *E. coli* et chez les autres bactéries Gram-négatives, des polypeptides sécrétés s'accumulent dans l'espace périplasmique où ils sont exposés à des conditions différentes que celles du cytoplasme. Ils ont également observé que la présence du peptide signal à un caractère hydrophobe du côté N-terminal influence le rendement de l'expression de certaines protéines. Ce peptide signal peut être clivée du reste de la protéine, causant ainsi la perte de la queue de 6 histidines qui lui précède et qui est essentielle pour la purification de la protéine recombinante. Par ailleurs, d'autres phénomènes associés à la présence du peptide signal ont été rapportés, tel que la formation des corps d'inclusion dans l'espace périplasmique, la formation des agrégats des protéines ou l'arrêt temporaire de la transcription dû à l'interaction de la partie N-terminale hydrophobe de ce peptide avec des composants du ribosome (Anonyme, 2001; Bowden et Georgiou, 1990; Tsalkova *et al.*, 1999). Ce dernier phénomène conduit à l'accumulation des peptides de faible poids moléculaire (Tsalkova *et al.*, 1999). Nous avons observé la présence de peptides d'une masse moléculaire inférieure à 7 kDa qui réagissent avec les anticorps anti-6HIS lors de l'expression de la protéine EGT entière. Il est raisonnable de penser que le phénomène d'accumulation de peptide de faible poids moléculaire serait responsable de l'échec de l'expression de la protéine EGT entière dans notre système expérimental.

L'influence du peptide signal *N*-terminal sur l'expression de la protéine EGT a été confirmée par la réussite des essais d'expression du fragment *C*-terminal de cette protéine. Le fragment ainsi produit, soit la protéine EGT589Pc de 32 kDa, a été reconnue par les anticorps anti-6HIS (figure 16), mais des essais consécutifs ont démontré que cette protéine n'a pas été purifiée à l'homogénéité. La présence d'une deuxième protéine d'un poids moléculaire semblable à la protéine EGT589Pc a été détectée lors des tests d'immunobuvardage de type Western utilisant les anticorps anti-EGT produits par immunisation génétique, et les anticorps anti-*E.coli* (figures 19 et 20). Un signal pareil, correspondant à la masse de 30 kDa a été observé lors des expériences similaires conduites par Jean (2003). Il s'agit donc d'une protéine d'origine bactérienne, capable de se fixer sur la colonne de Ni-NTA soit par elle-même, soit en formant un agrégat avec la protéine recombinante munie de la queue de 6 histidines. Une formation des tels agrégats a été également observée par le groupe de Bowden et Georgiou (1990).

La co-purification de ces deux protéines et leur présence dans l'extrait protéique explique les résultats observés lors des tests d'immunobuvardage de type Western utilisant les anticorps anti-EGT produit par immunisation génétique. Le signal correspondant à la protéine contaminante a été également observé dans les sérums prélevés au jour 0 (figure 19), ce qui signifie que les souris produisent des anticorps contre la protéine contaminante d'origine bactérienne (bactérie *E. coli*), déjà présente dans leur environnement.

Les analyses par immunobuvardage de type Western ont démontré que l'immunisation génétique avec le plasmide recombinant codant pour la protéine EGT du virus ChfuGV a permis de produire les anticorps anti-EGT réagissant spécifiquement avec la protéine EGT589Pc (figures 19 et 20). La cinétique de cette production varie en fonction de la combinaison des plasmides utilisés comme adjuvants immunologiques. En effet, nous avons constaté que la présence du plasmide recombinant codant pour l'interleukine-2 murine comme adjuvant immunologique augmente la production et la spécificité des anticorps anti-EGT (figure 22), tel que rapporté par Prayaga *et al.*,

(1997) et Chow *et al.*, (1997). Cet effet de l'IL-2 s'explique par sa capacité de stimuler la prolifération cellulaire renforçant ainsi la réponse immunitaire humorale (Chow *et al.*, 1998).

L'utilisation du plasmide pcDNA3 comme adjuvant génétique lors des expériences d'immunisation génétique s'est avérée très bénéfique pour la production d'anticorps anti-EGT. En effet, sa présence a influencé positivement la réponse humorale chez les souris Balb/c injectées avec un mélange de plasmides pcDNA3/EGT+pcDNA3 (groupe IV) en comparaison avec le groupe de souris injecté avec le plasmide pcDNA3/EGT seul (groupe III) (figure 22). De plus, l'effet immunoadjuvant du plasmide pcDNA3 a été également visible chez le groupe témoin (groupe II). La stimulation de la réponse humorale par le plasmide pcDNA3 serait associée à la présence des motifs CpG dans sa séquence.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons réussi à produire des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine EGT par immunisation génétique. Ces anticorps pourraient être utilisés dans les essais immuno-histologiques visant à détecter la protéine EGT dans les larves infectées et à suivre la propagation de cette protéine en fonction du temps après l'infection. La compréhension de ce processus et de son lien éventuel avec le mécanisme de la régulation de l'expression du gène *egt* chez le virus ChfuGV pourraient répondre à la question concernant l'expression de la protéine EGT lors du processus de l'infection et, pas conséquent, mener au développement d'un virus ChfuGV amélioré comme arme biologique dans la lutte contre la tordeuse des bougeons de l'épinette.

La méthode de purification de la protéine recombinante EGT par chromatographie d'affinité sur la colonne Ni-NTA utilisée dans cette étude s'est avérée inefficace. Ainsi, l'application d'une chromatographie d'affinité utilisant des anticorps anti-*E.coli* pour éliminer les protéines contaminantes d'origine bactérienne permettrait une meilleure séparation de la protéine d'intérêt. Il est également possible que l'utilisation des anticorps anti-EGT dirigés contre la protéine EGT recombinante provenant d'une autre espèce baculovirale pourrait nous permettre d'améliorer nos tests pour la purification de la protéine EGT589Pc à homogénéité. Cette suggestion est supportée par les travaux d'Evans et O'Reilly (1998) qui ont réussi à produire des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine EGT du virus AcMNPV par immunisation classique. Ces anticorps ont été utilisés dans les essais immunologiques lors des analyses de la protéine EGT du virus AgMNPV (Rodrigues *et al.*, 2001). Étant donné l'important degré de conservation de certaines régions de cette protéine à travers toutes les espèces baculovirales, il est possible que ces anticorps puissent être utilisés dans la chromatographie d'affinité pour purifier à homogénéité la protéine EGT recombinante provenant d'une autre espèce virale.

Finalement, il faut souligner que l'expression d'une protéine possédant un peptide signal dans un système d'expression procaryote tel que le vecteur pQE32, exige une approche expérimentale particulière. Ce peptide signal doit être éliminé de la protéine recombinante afin d'assurer un niveau adéquat de l'expression

de la protéine, ainsi que de la présence de la queue de six histidines. L'approche appliquée dans cette étude nous a permis d'exprimer un fragment de la protéine EGT du virus ChfuGV privé du peptide signal. L'expression d'un fragment d'une protéine est très avantageuse pour la production des anticorps spécifiques à un nombre réduit d'épitopes lors d'immunisation classique. Ainsi, des anticorps plus spécifiques peuvent être obtenus également lors d'immunisations génétiques utilisant seulement des fragments du gène *egt* codant pour les régions conservées de la protéine EGT.

Références

- AFONSO, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Balinsky, C. A., Moser, B. A., Becnel, J. J., Rock, D. L. et G. F. Kutish. 2001. Genome sequence of baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. J. Virol., vol. 262, p. 11157 - 11165.
- ANONYME. s.d.. <http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3.pdf>
- ANONYME. 2001. The Qiaexpressionist. Handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5^{ème} édition. Qiagen Corp., USA.
- ARIF, B. M., Guangyu, Z. et P. Jamieson. 1986. A comparison of three granulosis viruses isolated from *Choristoneura* spp. J. Invertebr. Pathol., vol. 48, p. 180 - 186.
- BAH A., Lucarotti C.J., Arella M., et C. Guertin. 1997. *Choristoneura fumiferana* granulovirus: sequence analysis and 5' characterisation of ORF891. Arch Virol., vol. 142(8), p. 737 - 746
- BAH A., Bergeron J., Arella M., Lucarotti C.J. et C. Guertin. 1997. Identification and sequence analyses of the granulin gene of *Choristoneura fumiferana* granulovirus. Arch Virol., vol. 142(8), p. 1577 - 1584.
- BAPE. 1991. Des forêts en santé – rapport de la Commission sur la protection des forêts. Gouvernement du Québec.
- BAROUCH, D. H., Santra, S., Steenbeke, T. D. Zheng, X. X., Perry, H. C., Davies, M. E., Freed, D. C., Craiu, A., Strom, T. B. Shiver, J. W. et N. L. Letvin. 1998. Augmentation and suppression of immune responses to an HIV-1 DNA vaccin by plasmid cytokine/Ig administration. J. Immunol., vol. 161 (4), p. 1875 - 1882.
- BELYAVSKIY, M., Braunagel, S. et M. Summers. 1998. The structural protein ODV-EC27 of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus is a multifunctional viral cyclin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 95, p. 11205 – 11210.
- BIDESHI, D. K., Bigot, Y. et B.A Federici. 2000. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of the *Harrisina brillians* granulovirus granulin gene. Arch Virol., vol. 145, p. 1933 - 1945.
- BIRD, F. T. 1959. Polyhedrovirus and granulovirus causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens. Journal of insect Pathology., vol. 1, p. 406-430.
- BLAIS, J. R. 1985. The ecology of the eastern spruce budworm: a review and discussion. dans: Recent advances in spruce budworm research. Éditeurs: C.J. Sanders, R. W. Stark, E.J. Mullins et J. Murphy. Canusa, Ottawa, p. 49 - 59.

- BLISSARD, G. W. et G. F. Rohrmann. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Ann. Rev. Entomol., vol. 35, p.127-155.
- BLISSARD, G. W. 1996. Baculovirus - insect cell interactions. Cytobiotechnology., vol. 20, p.73 - 93.
- BONNEAU, G., Bordeleau, C., Boulet, B., Chabot, M., Davidson, J-G., Garneau, J., Moranville, D. et P. Therrien. 1999. Les insectes forestiers nuisibles; La tordeuse des bourgeons de l'épinette: approche de gestion intégrée des épidémies. Gouvernement du Québec, Ministère des Ressources Naturelles.
- BONNING, B.C. et B.D. Hammock. 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. Ann. Rev. Entomol., vol. 41, p.191 - 210.
- BOSHART., M. Weber, F., Jahn, G., Dorsch- Hasler, K., Fleckenstein, B. et W. Scaffner. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell., vol. 41, p. 521 - 530.
- BOURRASSA, A. 2000. Caractérisation des gènes *enhancin* et *egt* du granulovirus de *Choristoneura fumiferana*. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en microbiologie appliquée. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Sainte-Foy. 103 p.
- BOWDEN, G.A et G. Georgiou. 1990. Folding and aggregation of β -lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. . J. Biol. Chem., vol. 256, p. 16760 - 16766.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., vol. 72, p. 248 - 254.
- BRAUNAGEL, S.C. et M.D. Summers. 1994. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV and ECV viral envelopes and nucleocapsids: Structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. Virology., vol. 202, p. 315 - 328.
- BRAUNAGEL, S.C., Elton, D.M., Ma, H. et M.D. Summers. 1996. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derivad virus envelope, ODV-E56. Virology., vol. 217, p. 97 - 110.
- BULACH, D.M., Kumar, C.A., Zaia, A., Liang, B. et D. E. Tribe. 1999. Group II nucleopolyherovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerases gene sequences. J. Invertebr. Pathol., vol. 73, p. 59 - 73.

- BURAND, J. et E. Park. 1992. Effect of nuclear polyhedrosis virus infection on the developpement and pupation of gypsy moth larvae. J. Invertebr. Pathol., vol. 60, p. 171 - 175.
- BURNETTE, W. N. 1981. Western blotting : Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A. Anal. Biochem., vol. 112, p.195 - 203.
- CARADOC-DAVIES, K. M. B., Graves, S, O'Reilly, D. R., Ewans, O. P. et V. K. Ward. 2001. Identification and *in vivo* characterisation of the *Epiphyas postittana* nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. Virus Genes., vol. 22, p. 255 - 264.
- CAUX, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. et J. Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. Nature., vol. 360, p. 258-261.
- CHAMBERS, R. S. et S.A. Johnston. 2003. High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunisation. Nature Biotechnology., vol. 21, p. 1080 - 1092.
- CHANG, M-J., KUZIO, J. et G.W Blissard. 1999. Modulation of translational efficiency by contextual nucleotides flanking a baculovirus initiator AUG codon. Virology., vol. 259, p. 369 - 383.
- CHARLTON, C.A. et L.E. Volkman. 1993. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf21 cells induces actin cable formation. Virology., vol. 197, p. 245 - 254.
- CHEN, X., Sun, X., Hu, Z., Li, M., O'Reilly, D.R., Zuidema, D. et J.M Vlak. 2000. Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* Single-Nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide. J. Invertebr. Pathol., vol. 76, p. 140 - 146.
- CHOW, Y. H., Huang, W. L., Chi, W. K., Chu, Y. D. et M. H. Tao. 1997. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. J. Virol., vol. 71, p. 169 - 178.
- CHOW, Y. H., Chiang, B. L., Lee, Y. L., Chi, W. K., Lin W. C., Chen, Y. T. et M. H. Tao. 1998. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. J. Immunol., vol. 160, p. 1320 - 1329.

- CHU, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. et C. V. Harding. 1997. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. J. Exp. Med., vol. 186, p. 1623 - 1631.
- CLEM, R. J. 1997. Regulation of programmed cell death by baculoviruses. *Dans: The baculoviruses*. Éditeur: L.K. Miller. Plenum, New York, p. 237 – 261.
- CONSIGLI, R.A, Russel, D.L. et M.E. Wilson. 1986. The biochemistry and molecular biology of the granulosis virus that infects *Plodia interpunctella*. Curr. Topics. Microbiol. Immunol., vol. 131, p. 69 – 81.
- CORY, J.S. 2000. Assessing the risk of releasing genetically modified virus insecticides: progress to date. Crop Production., vol. 19, p.779 - 785.
- CROIZIER, L., Taha, A., Croizier, G. et M. Lopez Ferber. 2002. The complete sequence of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*, granulovirus. GenBank, numéro d'accèsion NC-004062.
- DECKSEN, A. C. G. et R. R. Granados. 1988. Alteration of lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. Virology., vol. 167, p. 242 - 250.
- DORIA-ROSE, N. A. et N. L. Haighwood. 2003. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Dans: Methods. Nucleic acid vaccines*. vol.31, Éditeur: J. W. Morrow et N. A. Sheikh. Elsevier Inc, New York, p. 207 - 216.
- ELRIDGE, R., O'Reilly, D. R., Hamock, B. D. et L. K. Miller. 1992. Insecticidal properties of genetically engineered baculoviruses expressing an insect juvenile hormone esterase gene. Appl. Environ. Microbiol., vol. 58, p. 1583 - 1591.
- ENGELHARD, E. K., Kam-Morgan, L.N.W., Washburn, J. O. et L.E. Volkman. 1994. The insect tracheal system: a conduit for systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A., vol. 91, p. 3224 - 3227.
- ERTL, P. F. et L. L. Thomsen. 2003. Technical issues in construction of nucleic acid vaccines. *Dans: Methods. Nucleic acid vaccines*. vol.31, Éditeur: J. W. Morrow et N. A. Sheikh. Elsevier Inc, New York, p. 199 - 206.
- EVANS, P. O. et D. R. O'Reilly. 1998. Purification and kinetic analysis of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. Biochem. J., vol. 330, p. 1265 - 1270.
- EVANS, P. O. et D. R. O'Reilly. 1999. Expression and structural characterisation of baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. J. Gen. Virol., vol. 80, p. 485 - 492.

- FARRELL, P. J., Lu, M., Prevost, J., Brown, C., Behie, L. et K. Iatrou. 1998. High-level expression of secreted glycoproteins in transformed lepidopteran insect cells using a novel expression vector. Biotechnol. Bioeng., vol. 60, p. 656 - 663.
- FAULKNER, P., Kuzio, J., William, G. V. et J. A. Wilson. 1997. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo. J. Gen. Virol., vol. 78, p. 3091 - 3100.
- FELGNER, P.L. 2003. Reflections on the discovery of DNA vaccines. Dans: Methods. Nucleic acid vaccines. vol.31, Éditeur: J. W. Morrow et N. A. Sheikh. Elsevier Inc, New York, p. 181 - 182.
- FELGNER, P.L., Gradek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, W.M., Wenz, M., Northrop, G.M., Ringold, G.M. et M. Danielsen. 1987. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci.USA., vol. 84, p. 7413 - 7417.
- FELQUATE, D. M., Heaney, S., Webster, R. G. et H. L. Robinson. 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun immunisation. J. Immunol., vol. 158, p. 2278-2284.
- FORTE, A. J. et C. Guertin. 1999. Pathogenicity of granulovirus toward *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). The Canadian Entomologist., vol. 131, p. 725-727.
- FRIESEN, P. D. 1997. Regulation of baculovirus early gene expression. Dans: The baculoviruses. Éditeur: L.K. Miller. Plenum, New York, p. 141 – 170.
- FUNK, C.J. et R.A. Consigli. 1983. Phosphate cycling on the basic protein of *Plodia interpunctuella* granulosis virus. Virology, vol. 193, p. 396 - 402.
- FYNAN, E. F., Webster, R.G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C., et H. L. Robinson. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, p. 11478 - 11482.
- GEISLER, M., Bruss, V., Michalak, S., Hockenjos, B., Ortmann, D., Offensperger, W. B., Wands, J.R. et H. E. Blum. 1999. Intracellular retention of hepatitis B virus surface proteins reduces interleukin-2 augmentation after genetic immunizations. J. Virol., vol. 73, p. 4284 – 4292.
- GIANNOPOULOS, P.N., Nassoury, N., Lamontagne, L., Guertin, C., et K.K. Rashidan. 2005. *Choristoneura fumiferana* Granulovirus pk-1: a baculoviral protein kinase. J Biochem Mol Biol., vol. 31, p. 457-467.

- GOEDDEL, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszeski, A., Itakura, K. et A. D. Riggs. 1979. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 76, p. 106-110.
- GORBEN, P., Pijlman, A.J., Pruijssers, P et J.M Vlak. 2001. Identification of *pif-2*, a third conserved baculovirus gene required for *per os* infection of insects. J. Gen. Virol., vol. 84, p. 2041-2049.
- GORDON, J. W. et F. H. Ruddle. 1981. Integration and stable germ-line transmission of genes injected into mouse pronuclei. Science., vol. 214, p. 1244 - 1246.
- GRANADOS, R. R. 1978. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cell by a baculovirus. Virology, vol. 90, p. 170-172.
- GRANADOS, R. R. et K.A. Lawler. 1981. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. Virology., vol. 108, p. 297-308.
- GRANADOS, R. R., Fu, Y., Corsaro, B. et P. R. Huges. 2001. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the enchancin from *Trichoplusia ni granulovirus*. Biol. Control., vol. 20, p. 153 - 159.
- GRISDALE, D.G. et G.G. Wilson. 1993. Guidelines for rearing spruce budworm. Service Canadien des forêts. Sault-Sainte-Marie, 6 p.
- GRULA, M. A., Buller, P. L. et R. F. Weaver. 1981. α -Amantin-resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperla* cells. J. Virol., vol. 38, p. 919 - 921.
- GUARINO, L. A. 1998. Identification of viral gene encoding for a ubiquitin-like protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 87, p. 409 - 413.
- GUARINO, L. A., Xu, B., Jin, J. et W. Dong.. 1998. A virus encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. J. Virol., vol. 72, p. 7985 - 7991.
- GUERTIN, C. 1995. Étude du potentiel insecticide de certains virus, du *Bacillus thuringiensis* et de certaines substances phagostimulantes contre les insectes defolians de la forêt. Ministère des ressources naturelles du Québec. Rapport sur l'avancement des travaux. Projet 10240S.
- GURUNATHAN, S., Klinman, D. M. et R. A. Seder. 2000. DNA Vaccines : Immunology, Application and Optimization. Annu. Rev. Immunol., vol. 18, p. 927-974.

- HARVEY, G.T. 1985. The taxonomy of the coniferfagous *Coristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae): a review. *dans: Recent advances in spruce budworm research. Éditeurs: C.J. Sanders, R.W. Stark, E.J. Mullins et J. Murphy. Canusa, Ottawa, p. 16 - 48.*
- HASHIMOTO, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y. et T. Matsumoto. 2000. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology.*, vol. 275, p. 358 - 72.
- HAWTIN, R. E., Arnold, K., Ayres, M. D., Zanutto, P. M. D. A., Howard, S. C., Gooday, G. W., Chappell, L. H., Kitts, P. A., King, L. A., et R. D. Possee. 1995. Identification and preliminary characterization of chitinas gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology.*, vol. 212, p. 613 - 685.
- HAWTIN, R. E., Zarkowska, T., K., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A. et R. D. Possee. 1997. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology.*, vol. 238, p. 243 - 253.
- HAYAKAWA, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S. I., Goto, C. et S. Maeda. 1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology.*, vol. 262, p. 277 - 97.
- HERNIOU, E. A., Olszewski, J.A., Cory, J.S. et D.R. O'Reilly. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Ann. Rev. Entomol.*, vol. 48, p. 211 - 234.
- HOBSON, P., Barnfield, C., Barnes, A. et L. S. Klavinskis. 2003. Mucosal immunization with DNA vaccines. *Dans: Methods. Nucleic acid vaccines. Vol.31, Éditeur: J. W. Morrow et N. A. Sheikh. Elsevier Inc, New York, p. 217 - 224.*
- HONG, T., Braunagel, S. C. et M.D. Summers. 1994. Transcription, transduction and cellular localization of PDV-E66: A structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology.*, vol. 204, p. 210 - 222.
- HORTON, H. M. et J. P. Burand. 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J. Virol.*, vol. 67, p. 1860 - 1868.
- HUH, N. E. et R. F. Weaver,. 1990. Identifying the RNA polymerase that synthesizes specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.*, vol 71, p.195 - 201.

- HYINK, O., Dellow, R.A., Olsen, M.J., Caradoc-Davies, K.M.B., Drake, K., Herniou, E.A., Cory, J.S., O'Reilly, D.R. et V.K Ward. 2002. Whole genome analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. J. Gen. Virol., vol 83, p. 957 - 971.
- IJKEL, W.F.J., Westenberg, M, Goldbach, R.W., Blissard, G.W., Vlak, J.M. et D. Zuidema. 2000. A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site. Virology., vol. 275, p. 30 - 41.
- ITAKURA, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A., Heyneker, H. L., Bolivar, F. et H. Boyer. 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somostatin. Science., vol. 198, p. 1056 - 1063.
- JEAN, M. 2003. Identification et caractérisation du gène p10 et de la protéine P10 du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) : Production d'anticorps anti-P10 par l'immunisation classique et par l'immunisation génétique. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître des sciences (M. Sc.) en microbiologie appliquée. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Sainte-Foy. 152 p.
- JEHLE, J. A. et H. Backhaus. 1994. The granuline gene region of *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus: sequence analysis and phylogenetic considerations. J. Gen Virol., vol. 75, p. 3667-3671.
- JORDAN, A. et P. Reichard. 1998. Ribonucleotide reductases. Ann. Rev. Biochem., vol. 67, p. 71 - 98.
- KANG, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E., et D. R. O'Reilly. 1998. Identification and characterisation of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes. J. Gen. Virol., vol. 79, p. 2283 - 2292.
- KAWAMOTO, F. et M. Kunada. 1977. Envelopment of the nuclear polyhedrosis virus of the oriental tussock moth *Euproctis subflava*. Virology., vol. 77, p. 867 - 871.
- KEDDIE, B. A., Aponte, G.W. et L.E. Volkman 1989. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. Science., vol. 243, p. 1728 -1730.
- KEITH, M. B., Farrell, P.J., Iatrou, K. et L.A Behie. 1999. Screening of transfected insect cell lines for recombinant protein production. Biotechnol. Prog., vol. 15, p. 1046 -1052.
- KELLY, D. C. 1982. Baculovirus replication, Review article. J. Gen. Virol., vol. 63, p. 1-13.

- KHAN, S., Sneddon, K., Fielding, B., Ward, V. et S. Davidson. 2003. Functional characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene of *Helicoverpa armigera* single-enveloped nucleopolyhedrovirus isolated in South Africa. Virus. Gen., vol. 27, p. 17 - 27.
- KIKHNO, I., Gutierrez, S., Croizier, L., Croizier, G. et M.L. Ferber. 2002. Characterization of *pif*, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyherovirus. J. Gen. Virol., vol. 83, p. 3013 - 3022.
- KIM, J. J., Ayyavoo, V., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M. A., Dang, K., Wang, B., Boye, J. D. et D. B. Weiner. 1997. *In vivo* engineering of cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. J Immunol., vol. 158, p. 816-826.
- KLINMAN, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. et A. M. Krieg. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. Proc. Natl Acad Sci USA., vol. 93, p. 2879-2883.
- KLINMAN, D. M. 2003. CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert. Rev. Vaccines., vol. 2, p. 305 - 315.
- KOGAN, P.H et G.W. Blissard, J. M. 1994. A baculovirus *gp64* early promoter recognizes is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements. J. Virology., vol 68, p.813 - 822.
- KOOL, M. et J. M Vlak. 1993. The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. Arch. Virol., vol 130, p.1-16.
- KOZAK, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res., vol 26, p. 8125 - 48.
- KRIEG, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky G. A. et D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. Nature., vol. 374, p. 546-549.
- KRIEG, A. M., Yi, A. K., Schorr, J., et H. L. Davis. 1998. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. Trends in Microbiology., Vol. 6, p. 23 – 27.
- KUBY, J. 1997. Immunology. Third Edition. W. H. Freeman and Compagny. New York, USA.
- KUCEROVA, L. 1998. DNA/Genetic Vaccination (minireview). Viral immunology., vol. 11, p. 55-63.

- KUSAKABE, K., Xin, K. Q., Katoh, H., Sumino, K., Hagiwara, E., Kawamoto, S., Okuda, K., Miyagi, Y., Aoki, I., Nishioka, K. et D. Klinman. 2000. The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific ADN vaccine. J. Immunol., vol. 164, p. 3102 - 3111.
- KUZIO, J., Jaques, R. et P. Faulkern. 1989. Identification of p74 a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. Virology., vol. 173, p. 759-763.
- LACHANCE, D. 1995. Insectes forestiers ravageurs dans la région du Québec. *Dans: Insectes forestiers ravageurs au Canada.* Éditeur: J. A. Armstrong et W. G. H Ives. Ressources Naturelles Canada, Ottawa, p. 27 - 39.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., vol. 227, p. 680 - 685.
- LANGE, M et J. H. Jehle. 2003. The genome of the *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus. Virology., vol. 20. p. 220 – 236.
- LÉRY, X, Giannotti, J, Taha, A. Ravalec, M. et S. Abol-Ela. 1997. Multiplication of a granulosis virus isolated from the potato tuber moth in a new established cell line of *Phthorimaea operculella*. In Vitro. Cell. Dev. Biol. Anim., vol. 33, p. 640-646.
- LIU, J.C et J.E. Maruniak. 1999. Molecular characterization of genes in the GP41 region of baculoviruses and phylogenetic analysis based upon GP41 and polyhedrin genes. Virus Res., vol. 64, p. 187 - 196.
- LU, A. et E. B. Carstens. 1991. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology., vol. 181, p. 336 - 347.
- LU, A., Krell, P., Vlak, J.M. et G. F. Rohrmann. 1997. Baculovirus DNA replication. *dans The Baculoviruses.* Éditeur: L.K. Miller. Plenum, New York, p.157-167.
- LU, A et L. K. Miller. 1997. Regulation of late and very late gene expression. *dans The Baculoviruses.* Éditeur: L.K. Miller. Plenum, New York, p.193 - 216.
- LUQUE, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D.R. et D. Winstanley. 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. J. Gen. Virol., vol. 82, p. 2531-47.
- MAEDA, S. 1989. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 165, p. 1177 – 1183.

- MANZÀN, M. A., Lozano, M.E., Sciocco-Cap, A., Ghiringhelli, P. D. et V. Romanowski. 2002. Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Epinotia aporema* granulovirus. Virus Genes., vol. 24, p. 119 – 130.
- McGAUGHEY, W. H. et R. W. Beeman. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: *Pyralidae*). J. Econ. Entomol., vol. 81, p. 28 - 33.
- McLACHLIN, J. R., et L. K. Miller. 1994. Identification and characterisation of *vif-1*, a baculovirus gene involved in very late gene expression. J. Virol., vol. 68, p. 7746 - 7756.
- MATTSON, W. J., Simmons, G. A. et J. A. Witter. 1988. The spruce budworm in eastern North America. *Dans: Dynamics of forest insect populations. Éditeur: A. A. Berryman. Plenum Publishing Corp., New York, p. 309 - 330.*
- MEADA, S. 1989. Gene transfer vectors of a baculovirus, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, and their use for expression of foreign genes in insect cells. *Dans: Invertebrate cell system applications. Éditeur: J. Mitsuhashi. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, vol. I, p. 167 – 181.*
- MERRYWEATHER, A. T., Weyer, U., Harris, M. P. G., Hirst, M., Booth T. F. et R. D. Possee. 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subs. *Kurstaki* HD-73 delta endotoxin. J. Gen. Virol., vol. 71, p. 1535 - 1544.
- MILLER, L. K. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. Ann. Rev. Microbiol., vol 42, p. 177-199.
- MILLER, L. K. 1996. Insect viruses. *dans: Fundamental virology. Éditeur: B.N Fields, D.M. Knippe et P.M. Howley. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. p 401 – 424.*
- MINNION, F. C., Coons, L. B. et J. R. Broome. 1979. Characterization of the polyhedral envelope of the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis virescens*. J. Invertebr. Pathol., vol. 34, p. 303 - 307.
- MONSMA, S. A., Oomens, A. G. P. et G.W. Blissard. 1996. The gp64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell to cell transmission of infection. J. Virol., vol. 70, p. 4607 – 4616.
- MOR, G., Yamshchikov, G., Sedegah, M., Takeno, M., Wang, R. Houghten, R. A., Hoffman, S. et D. M. Klinman. 1996. Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination of mice. J. Clin. Invest., vol. 98, p. 2700 - 2705.

- MOR G. 1998. Commentary. Plasmide DNA : A new era in vaccinology. Biochemical Pharmacology., vol. 55, p. 1151-1153.
- MOREAU, G. et E. Bauce. 2003. Lethal and sublethal effects of single and double applications of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* on spruce budworm (Lepidoptera: *Tortricidae*) larvae. J. Econ. Entomol., vol. 96, p. 280 - 286.
- MOREAU, P., Hen, R., Wasylyk, B., Everett, R., Gaub, M. P. et P. Chambon. 1981. The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. Nucleic Acids Res., vol. 9, p. 6047 - 6068.
- MORIN, H., et D. Laprise. 1990. Histoire récente des épidémies de la Tordeuse des bourgeons de l'épinette au nord du Lac Saint-Jean, Québec: une analyse dendrochronologique. Can. J. For. Res., vol. 20, p. 1 - 8.
- MORRISEY, P., Bressler., L., Park, L. S., Alpert, A. et S. Gillis. 1987. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments de primary antibody response by enhancing the function of antigen-presenting cells. J. Immunol., vol. 139, p.1113-1119.
- MOSCARDI, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses foer control of Lepidoptera. Ann. Rev. Entomol., vol. 44, p. 257 - 289.
- MUMPER, R. J., et Z. Cui. 2003. Genetic immunization by jet injection of targeted pDNA-coated nanoparticles. Dans: Methods. Nucleic acid vaccines. vol.31, Éditeur: J. W. Morrow et N. A. Sheikh. Elsevier Inc, New York, p. 255 - 262.
- NAKAI, M., Shiotsuki, T. et Y. Kunimi. 2004. An entomopoxvirus and granulovirus use different mechanisms to prevent pupation of *Adoxophyes honmai*. Virus Res., vol. 101, p. 185 - 191.
- NOORMOHAMMADI, A. H., Hochrein, H., Curtis, J. M., Baldwin, T. M. et E. Handman. 2001. Paradoxical effects of IL-12 in leishmaniasis in the presence and absence of vaccinating antigen . Vaccine., vol. 19, p. 4043 - 4052.
- OLSZEWSKI, J. et L. K. Miller. 1997a. Identification and characterisation of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation. J.Virol., vol. 71, p. 5040 - 5050.
- OLSZEWSKI, J. et L. K. Miller. 1997b. A role for GP41 in budded virus production. Virology., vol. 233, p. 292 - 301.
- OOI, B. G. et L. K. Miller. 1988. Regulation of host RNA levels during baculovirus infection. Virology., vol. 166, p. 515 - 523.

- OOI, B. G., Rankin, C., et L. K. Miller. 1989. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. J. Mol. Biol., vol. 210, p. 721 - 736.
- O'REILLY, D. R. 1995. Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. Insect Biochem. Mol. Biol., vol. 25, 541 - 550.
- O'REILLY, D. R. 1997. Auxiliary genes of baculoviruses. *Dans: The baculoviruses*. Éditeur: L.K. Miller. Plenum, New York, p. 267 - 300.
- O'REILLY, D. R., M. R. Brown et L. K. Miller. 1992. Alteration of ecdysteroid metabolism due to baculovirus infection of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: host ecdysteroids are conjugated with galactose. Insect Biochem. Mol. Biol., vol. 22, p. 313 - 320.
- O'REILLY, D. R., Kelly, T. J., Masler, E. P., Thyagaraja, B. S. Robson, R. M., Shaw, T. C. et L. K. Miller. 1993. Overexpression of *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone using baculovirus vectors. Insect Biochem. Mol. Biol., vol. 25, p. 475 - 485.
- O'REILLY, D. R. et L. K. Miller. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. Science., vol. 245, 1110 - 1112.
- O'REILLY, D. R., Miller, L. K. et V. A. Luckow. 1992. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. W. H Freeman and Co., New York.
- PARDINI, R. S. 1995. Toxicity of oxygen from naturally-occurring redox-active prooxidants. Arch. Insect Biochem. Physiol., vol. 29, p. 101 - 118.
- PARK, E. J., Yin, C. M. et J. P. Burand. 1996. Baculovirus replication alters hormone-regulated host development. J. Gen. Virol., vol. 77, p. 547 - 554.
- PASQUINI, S., Xiang, Z., Wang, Y., He, Z., Deng, H., Blaszczyk-Thurin, M. et H. C. J. Ertl. 1997. Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants. Immunology and cell Biology., vol. 75, p. 397 - 401.
- PEACHMAN, K. K., Rao, M. et C. R. Alving. 2003. Immunization with DNA through the skin. *Dans: Methods. Nucleic acid vaccines*. vol.31, Éditeur: J. W. Morrow et N. A. Sheikh. Elsevier Inc, New York, p. 323 - 242.
- PEARSON, M. N., Russell, R. L., Rohrmann, G. F., et G. S. Beaudreau. 1988. P39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. Virology., vol. 167, p. 407 - 413

- PINNOCK, D.E. et R.T. Hess. 1978. Morphological variations in the cytopathology associated with granulovirus in the fruit-tree leaf roller, *Archips argyrospila*. J. Ultrastruct. Res., vol. 63, p. 252 - 260.
- POPHAM, H. J. R., Li, Y et. et L. K. Miller. 1997. Genetic improvement of *Helicoverpa zea* nuclear polyhedrosis virus as a biopesticide. Biol. Control., vol. 10, p. 83 - 91.
- POPHAM, H. J. R., Bischoff, D. S. et J. M. Slavicek. 2001. Both *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus *enhancin* genes contribute to viral potency. J. Virol., vol. 75, p. 8639 - 8648.
- POSSEE, R.D. et S.C. Howard. 1987. Analysis of the polyhedron gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Nucl. Acids Res., vol. 15, p. 10233 - 10248.
- PRAYAGA, S. K., Ford, M. J. et J. R. Haynes. 1997. Manipulation of HIV-1 gp120-specific immune responses elicited via gene gun-based DNA immunization. Vaccine., vol. 15, p. 1349 - 1352.
- PURNELL, B.A., Emanuel, P.A., Hu, Z., Li, M., O'Reilly, D.R., Zuidema, D. et J.M. Vlak. 1994. TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in *Drosophila* class II genes. Genes and Development. vol. 8, p. 830 - 842.
- RAMSHAW, I. A. et A. J. Ramsay. 2000. The prime-boost strategy : exciting prospects for improved vaccination. Immunology., vol. 21, p.163-165.
- RANKIN, C., Ladin, B. F. et R. F. Weaver. 1986. Physical mapping of temporally regulated, overlapping transcripts in the region of the 10K protein gene in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol., vol. 57, p. 18-27.
- RASHIDAN, K.K., Nassoury, N. et C. Guertin. 2002a. Partial sequence of a gene in *Choristoneura fumiferana* granulovirus that codes for a protein homolog to baculoviral DNA-polymerase. GenBank, numéro d'accèsion AY161135
- RASHIDAN, K.K., Nassoury, N. et C. Guertin. 2002b. Partial sequence of a gene coding for a putative inhibitor of apoptosis protein (IAP) from *Choristoneura fumiferans* granulovirus. GenBank, numéro d'accèsion AY164587.
- RASHIDAN, K.K., Nassoury, N., Merzouki, A. et C. Guertin. 2002c. Identification and characterization of a putative baculoviral transcriptional factor IE-1 from *Choristoneura fumiferana* granulovirus. J Biochem Mol Biol., vol. 35, p. 553-561.

- RASHIDAN, K.K., Nassoury, N et C. Guertin. 2002d. Identification and molecular characterization of a gene encoding GP41, a baculoviral structural glycoprotein in *Choristoneura fumiferana* granulovirus. GenBank, numéro d'accèsion AF549454
- RASHIDAN, K.K., Nassoury, N., Giannopoulos, P.N. et C. Guertin. 2002e. Identification and characterization of a conserved baculoviral structural protein ODVP-6E/ODV-E56 from *Choristoneura fumiferana* granulovirus. J Biochem Mol Biol., vol.35, p. 595-603.
- RASHIDAN, K.K., Nassoury, N et C. Guertin. 2002f. Identification of a major baculoviral capsid protein in ChfuGV. GenBank, numéro d'accèsion DQ023310.
- RASHIDAN, K.K., Giannopoulos,P.N., Nassoury, N. et C. Guertin. 2002g. Partial sequencing of a gene coding for a 91kDa in *Choristoneura fumiferana* granulovirus (ChfuGV). GenBank, numéro d'accèsion AF517769.
- RASHIDAN, K.K., Nassoury, N., Giannopoulos, P.N., Mauffette, Y et C. Guertin. 2003. Identification, characterization and phylogenic analysis of conserved genes within the *p74* gene region of *Choristoneura fumiferana* granulovirus genome. J. Biochem. Mol. Biol., vol. 37, p. 700-708.
- RASHIDAN, K.K., Nassoury, N., Giannopoulos, P.N., Mauffette, Y et C. Guertin. 2004. Identification, characterization and phylogenic analysis of conserved genes within the *odvp-6e/odv-e56* gene region of *Choristoneura fumiferana* granulovirus. J. Biochem. Mol. Biol., vol. 37, p. 206-212.
- RAZ, E., Watanabe, A., Baird, S., Eisenberg, R. A., Parr, T. B., Lotz, M., Kipps, T. J. et D. Carson. 1993. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 90, p. 4523 - 4527.
- RAZ, E., Carson, D.A., Parker, S.E, Parr, T.B. Abai, A.M. Aichinger G. Gromkowsi, S.H. Singh, M. Lew, D., Yankauckas, M.A., Bair S.M. et G. H. Rhodes. 1994. Intradermal gene immunisation : the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to virus. Proc. Natl. Acad. USA., vol. 91, p. 9519 - 9523.
- REGNIERE, J. et T. J. Lysyk. 1995. Dynamique des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Chorionique fumiferan*). Dans: Insectes forestiers ravageurs au Canada. Éditeurs: J. A. Armstrong et W. G. H. Ives. Ressources Naturelles Canada, Ottawa, p. 95 - 106.
- REILLY, L. M. et L. A. Guarino. 1994. The *pk-1* gene of *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus encodes a protein kinase. J. Gen. Virol., vol. 75, p. 2999 - 3006.

- REILLY, L. M. et L. A. Guarino. 1996. The viral ubiquitin gene of *Autographa californica* is not essential for viral replication. Virology, vol. 218, p. 243 - 247.
- ROBERTSON, J. S., Harrap, K. A. et J.F.Longworth. 1974. Baculovirus morphogenesis : The acquisition of the virus envelope. J. Invert. Pathol., vol. 13, p. 248-251.
- ROBINSON, H. L., Hunt, L.A. et R. G. Webster. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine, vol. 11, p. 957-960.
- RODRIGUES, J. C. M., De Souza, M. L., O'Reilly, D., Velloso, L. M., Pinedo, F. J. R., Razuck, F. B., Ribeiro, B. et B. M. Ribeiro. 2001. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus. Virus Genes, vol. 22, p. 103 – 112.
- ROHRMANN, G. F. 1992. Baculovirus structural proteins. J. Gen. Virol., vol. 73, p. 749-761.
- RUSSEL, D. L. et R.A Consigli. 1986. Two-dimensional polyacrylamide gel analysis of *Plodia interpunctella* granulosis virus. J. Virol, vol. 60, p. 82-89.
- RUSSEL, R.L.Q et G.F. Rohrmann. 1990. The *pf.5* gene region of nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*: DNA sequence et transcriptional analysis of four late genes. J. Gen.Virol, vol. 71, p. 551-560.
- RUSSEL, R.L.Q et G.F. Rohrmann. 1997. Characterisation of P91, a protein associated with virions of an *Orgyia pseudotsugata* baculovirus. Virology, vol. 233, p. 210 –223.
- SALEMA, J. S., Scott, C. P., Li, L.-S., Cooperman, B. S. et H. Rubin. 1993. High level expression of the large subunit of mouse ribonucleotide reductase in a baculovirus system. FEBS,vol. 323 p. 93-95.
- SANFORD J.C., Smith, F. D. et R. A. Russell. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods Enzymol., vol. 217, p. 483-509.
- SANGER, F. Nicklen, S. et A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. USA., vol. 74, p. 5463 - 5467.
- SASAKI, S., Takeshita, F., Xin, K-Q., Ishii, N. et K. Okuda. 2003. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. Dans: Methods. Nucleic acid vaccines. vol.31, Éditeur: J. W. Morrow et N. A. Sheikh. Elsevier Inc, New York, p. 243 - 254.

- SATO, Y., Roman, M. Tigue, J., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Sioverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A. et E. Raz. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. Science., vol. 273, p. 352-354.
- SCHEERLINK, J-P. Y. 2001. Genetic adjuvant for DNA vaccines. Vaccine., vol. 19, p. 2647-2656.
- SCHEN, X., Wong, S. B. J., Buck, C. B. Zhang, J. et R. F. Siliciano. 2002. Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8⁺ CTL following exposure to vaccine virus via different routes. J. Immunol., vol. 169, p. 4222 - 4229.
- SCHNEIDER, I. 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. J. Embryol. Exp. Morphol., vol. 27, p. 353 - 365.
- SHEIKH, N. A. et W. J. W. Morrow. 2003. Guns, genes and spleen: a coming of age for rational vaccine design. *Dans: Methods. Nucleic acid vaccines. vol.31, Éditeur: J. W. Morrow et N. A. Sheikh. Elsevier Inc, New York, p. 183 – 192.*
- SLACK, J.M., Dougherty, E.M. et S.D. Lawrence. 2001. A study of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV envelope protein p74 using GFP tag. J.Gen.Virol., vol. 82, p. 2279 – 2287.
- SLAVICEK, J.M., Ropham, H.J.R. et C.I.Riegel. 1999. Deletion of the *Lymantaria dispar* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyl gene enhances viral killing speed in the last instar of the gypsy moth. Biological Control., vol. 16, p. 91 – 103.
- SUMATHY, S., Palham, V. S. et K. P. Gopinathan 1996. Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. Prot. Express. Purif., vol 7, p. 262 - 268.
- SUMMER, M. D. et G. E. Smith. 1978. Baculovirus structural polypeptides. Virology., vol. 84, p. 390 - 402.
- SUN, X., Chen, X., Zhang, Z., Wang, H., Bianchi, F. J. J. A., Peng, H., Vlak, J. M. et Z. Hu. 2002. Bollworm responses to release of genetically modified *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedroviruses in cotton. J. Invertebr. Pathol., vol. 81, p. 63 - 69.
- TABASHNIK, B. E. 192. 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*). J. Econ. Entomol., vol. 85, p. 1551 - 1559.

- TAHA, A., Nour-el-Din, A., Croizier, L., Ferber, M.L. et G. Croizier. 2000. Comparative analysis of the granulin region of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses. Virus Genes., vol. 21, p. 147 – 155.
- TANADA, Y. et R. J. Leutenegger. 1970. Multiplication of granulosis virus in larval midgut cells of *Trochoplusia ni* and possible pathways invasion into the hemocoel. J. Ultrastr. Res., vol. 30, p. 389 - 600.
- TANG, D-C., De Vit, M. et S. A. Johnston. 1992. Genetic immunization is a simple methode for eliciting an immune response. Nature., vol. 356, p. 152-154.
- TAO, M-H. et R. Levy. 1993. Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. Nature., vol. 362, p. 755-758.
- THIEM, S. M. 1997. Prospects of altering host range for baculovirus bioinsecticides. Current Opinion in Biotechnology., vol. 8, p. 317 - 322.
- THIEM, S. M. et L. K. Miller. 1989. Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrovirus. J. Virol., vol. 63, p. 2003 - 2018.
- TIGHE, H., Corr, M., Roman, et E. Raz. 1998. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. Immunol. Today, vol. 19, p. 89 - 97.
- THOMA, C., Bergamini, G., Galy, B., Hundsdoerfer, P. et M. W. Hentze. 2004. Enhancement of IRES-mediated translation of the *c-myc* and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP. Molecular Cell., vol. 15, p.925 - 935.
- TODOROVA, S.I., C. Cloutier, J.C. Côté et D. Coderre. 2002. Pathogenicity of six isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina, Hyphomycetes) to *Perillus bioculatus* (F) (Hem., Pentatomidae). J. Applied Entomol., vol. 126, p. 182-185.
- TOMALSKI, M. DJ., Eldride, R et L. K. Miller. 1991. A baculovirus gene homologues of a Cu/Zn superoxide dismutase gene. Virology., vol. 184, p. 149 - 161.
- TOMPKINS, G. J. 1991. Purification of invertebrate viruses. Dans: Atlas of invertebrate viruses. Éditeur: J. R. Adams et J. R. Bonami. CRC Press Inc., Boca Raton, p. 31 – 40.
- TSALKOVA, T., Kramer, G. et B. Hardesty. 1999. The effect of a hydrophobic N-terminal probe on translational pausing of chloramphenicol acetyl transferase and rhodanase. J. Mol. Biol., vol. 286, p. 71 - 81.

- TWEETEN, K. A., Bulla, L. A. et R. A. Consigli. 1977. Supercoiled circular DNA of an insect granulovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 74, p. 3574 - 3578.
- TWEETEN, K. A., Bulla, L. A. et R. A. Consigli. 1980. Characterization of an extremely basic protein derived from granulovirus nucleocapsid. J. Virol., vol 33, p. 866-876.
- TWEETEN, K. A., Bulla, L. A. et R. A. Consigli. 1981. Applied and molecular aspect of insect granulosis virus. Microbiol. Rev., vol. 3, p. 379 - 408.
- ULLMAN A., Jacob F. et J. Monod. 1967. Characterisation by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. J. M. B., vol. 24, p. 339 - 343.
- ULMER, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S.E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki V. J., Gromkowski S. H., Deck R. R., DeWitt, C.M., Friedman, A. Hawe L. A., Leander K. R., Marinez D, Perry HC, Shiver J. W., Montgomery D.L. et M.A. Liu. 1993. Eterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science., vol. 259, p. 1745 - 1749.
- VAN OERS, M. et J. M. Vlask. 1997. The Baculovirus 10 kDa Protein. J. Inverteb. Pathol., vol. 70, p. 1-17.
- VIALARD, J. E., Arif, B. M. et C. D. Richardson. 1995. Introduction to the molecular biology of baculoviruses *dans* Methods in Molecular Biology., vol. 39 : Baculovirus Expression protocols. *Éditeur*: C. D. Richardson. Humana Press Inc. Totowa, NJ., p. 1 - 24
- VOLKMAN, L. E. et G. W. Blissard. 1995. Baculoviridea: Taxonomic structure and properties of the family. In classification and nomenclature of viruses: Sixth report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Arch. Virol., vol. Supplement 10, p. 104-113.
- VOLKMAN, L. E. et P. A. Goldsmith. 1985. Mechanism of neutralisation of buded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. Virology., vol. 143, p. 185 - 195.
- VOLKMAN, L. E. et M. D. Summers. 1977. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated and nonoccluded forms. J. Invertebr. Pathol., vol. 30, p. 102-103.
- WANG, P, Hammer, D. A. et R. R. Granados. 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. J. Gen. Virol., vol. 75, p. 1961 - 1967.

- WATSON, J. D., Gilamn, M., Witkowski, J. et M. Zoller. 1994. ADN recombinant. 2^e Édition. DeBoeck Université, Bruxelles.
- WESTENBERG, M., Veenman, F., Roode, E. C., Goldbach, R. W., Vlak, J. M. et D. Zuidema. 2004. Functional analysis of the putative fusion domain of the baculovirus envelope fusion protein F. J. Virol., vol. 78, p. 6946 - 6954.
- WILSON, M. E., Mainprize, T. H., Friesen, P. D. et L. K. Miller. 1987. Location, transcription and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. J. Virol., vol. 61, p. 661 - 666.
- WILSON, K. R., O'Reilly, D. R., Hails, R. S. et J. S. Cory. 2000. Age-related effects of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *egt* gene in the cabbage looper (*Trichoplusia ni*). Biological Control., vol. 19, p. 57 - 63.
- WINSTANLEY, D. et N. E. Crook. 1993. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. J Gen Virol., vol. 74, p.1599-1609.
- WOLFF, J. A., Malone, R. W., Williams, P., W., Acsadi, G., Jani, A. et P. L. Felgner. 1990. Direct gene transfert into mouse muscle in vivo. Science., vol. 247, p. 1465-1468.
- WOLGAMOT, G. M., Gross, C. H., Russel, R. L. Q. et G. F. Rohrmann. 1993. Immunocytochemical characterization of p24, a baculovirus capsid-associated protein. J. Gen. Virol., vol. 74, p. 103 - 107.
- WORMLEATON, S., Kuzio, J. et D. Winstanley. 2003 The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome. Virology., vol. 311, p. 350 - 365.
- XIANG, Z. Q. et H. C. J. Ertl. 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. Immunity., vol. 2, p. 129 - 135.
- XIULIAN, A., Zhifang, W., Bo, W., Wei, Z., Jianhong, F., Chunsheng, C., Yuhu, S et H. Mei. 2004. *Agrotis segetum* granulovirus, complete genome. GenBank, numéro d'accèsion NC-005839.
- YANG, L., Stetler, D.A. et R.F. Weaver. 1991. Structural comparison of of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerase and three nuclear RNA polymerases from the host, *Spodoptera frugiperda*. Virus Res., vol. 20, p. 251 - 264.
- YANG, S. et L. K. Miller. 1999. Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor. J. Virol., vol. 73, p. 3404 - 3409.

