

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Microbiologie et Biotechnologie

**Réplication de baculovirus sauvage et recombinant
dans un système cellulaire en absence de sérum
de veau foetal (SVF)**

Par
Jean-François Michaud

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

François Shareck,
Microbiologie et Biotechnologie

Examineur externe

David Morse,
Institut de recherche en biologie végétale

Directeur de recherche

Serge Belloncik,
Microbiologie et Biotechnologie

Résumé

Les virus des polyédroses nucléaires (VPN) sont des baculovirus très intéressants car ils peuvent être utilisés comme bioinsecticides contre plusieurs insectes ravageurs de plantations, ou comme vecteurs d'expression de gènes pour la production de protéines d'intérêts médicaux, biologiques et pharmaceutiques. Les VPN sont très susceptibles aux mutations en culture cellulaire. Pourtant, une stabilité sur plusieurs passages viraux successifs en culture cellulaire est nécessaire pour que la production massive de bioinsecticides et de protéines recombinantes soit possible. C'est pourquoi, plusieurs études ont évalué la stabilité de VPN dans différents systèmes cellulaires contenant du sérum de veau foetal (SVF). Toutes ces études ont démontré une stabilité virale sur 10 passages viraux en moyenne, après quoi la présence de mutants FP (Few Polyhedra) était évidente. Par contre, aucune étude de stabilité de VPN n'a été effectuée dans un système cellulaire sans SVF.

Notre laboratoire possède une lignée cellulaire adaptée à un milieu de culture très simple sans SVF qui supporte encore très bien la production de VPN même après plus de 500 passages cellulaires. Comme le SVF est un produit très dispendieux, peut contenir des facteurs cytotoxiques, est susceptible aux contaminations par les mycoplasmes et nuit à la purification des protéines recombinantes, il semblait intéressant de vérifier si notre système cellulaire sans SVF offre une stabilité de production de VPN aussi élevée qu'un système cellulaire avec SVF, autant pour la production de bioinsecticides que pour celle de protéines recombinantes. Le virus sauvage GmMVPN a été utilisé pour vérifier la stabilité de production de bioinsecticides, alors que le virus AcLuci, recombinant hybride de AcMVPN et de BmMVPN exprimant la luciférase au lieu de la polyédrine, a été utilisé pour vérifier la stabilité de production de protéines recombinantes.

Après 10 à 12 passages du GmMVPN sauvage dans notre système cellulaire sans SVF, des caractéristiques reliées à l'apparition de mutants FP ont été observées, dont une diminution du nombre de polyèdres totaux et par cellule infectée, du pourcentage de

III

cellules infectées, du nombre de virions à l'intérieur des polyèdres, de la synthèse de membrane virale *de novo* et de la virulence des polyèdres envers des larves de *Galleria mellonella*. Une modification de la forme des polyèdres, une augmentation de la production de virus extracellulaires et l'expression de deux nouvelles protéines virales ont également été observées après plusieurs passages viraux. De plus, une diminution de l'expression de la polyédrine et d'une protéine de 23 kDa suggère que les mutants FP obtenus proviennent entre autres de mutations dans le gène FP25K de GmMVPN, concordant avec plusieurs études dans un système cellulaire avec SVF. Finalement, en fonction des passages du recombinant AcLuci dans notre système cellulaire sans SVF, une stabilité d'expression de luciférase, et par conséquent de protéines recombinantes, a été observée sur plus de 18 passages viraux. Notre système cellulaire sans SVF offre donc une stabilité virale sur plusieurs passages viraux successifs aussi élevée que dans un système cellulaire avec SVF, permettant ainsi une production simple et rentable de bioinsecticides et de protéines recombinantes à l'aide de baculovirus.



Étudiant



Directeur de recherche

Remerciements

Je désire tout d'abord remercier particulièrement mon directeur de recherche, Monsieur Serge Belloncik, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour toute la durée de ma maîtrise. Ses précieux conseils, son encadrement et sa patience m'ont grandement aidé à réaliser mon projet de maîtrise.

Mes remerciements vont également à Madame Monique Couillard, la technicienne du laboratoire, qui m'a apporté un grand soutien technique et m'a encouragé tout au long de ma maîtrise.

Je remercie également Monsieur Robert Alain (M.Sc.) et la technicienne de laboratoire Nicole Mayeu, qui m'ont grandement aidé en microscopie électronique.

Ma reconnaissance va également à Monsieur Marcel Desrosiers, qui m'a apporté ses connaissances techniques à propos de la cytofluorométrie.

Je veux aussi remercier Monsieur Guy Charpentier pour nous avoir fourni les larves pour débiter l'élevage de larves de *Galleria mellonella*.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Hajime Mori, de l'Institut de Technologie de Kyoto au Japon, qui nous a fourni le virus recombinant AcLuci.

Je désire finalement remercier la Fondation Armand-Frappier pour m'avoir soutenu financièrement et tous mes amis de l'Institut Armand-Frappier, qui m'ont apporté leur soutien moral et qui m'ont fourni de précieux conseils.

2.1.2. Passages de GmMVPN et d'AcLuci	36
2.1.2.1. Préparation des inoculum viraux	36
2.1.2.1.1. Virus recombinant AcLuci	36
2.1.2.1.2. Virus sauvage GmMVPN	37
2.1.2.2. Infections virales	37
2.1.2.3. Prélèvements viraux	38
2.1.2.4. Titrage viral	40
2.1.2.5. Nombre de passages viraux effectués	40
2.1.3. Production d'antisérums contre le GmMVPN	41
2.1.3.1. Préparation du premier antigène : polyèdres dissous de GmMVPN produits <i>in vivo</i>	41
2.1.3.2. Préparation du deuxième antigène : mélange de virions et de polyèdres dissous de GmMVPN produits <i>in vitro</i>	41
2.1.3.3. Immunisation	42
2.1.3.4. Prélèvement et conservation des sérums et des antisérums	43
2.1.3.5. Vérification de la qualité des antisérums produits par la technique de double immuno-diffusion	43
2.1.3.5.1. Présence d'anticorps précipitants dans les antisérums	44
2.1.3.5.2. Spécificité des anticorps précipitants présents dans les antisérums	44
2.2. Analyse des effets de passages viraux en culture de cellules Sf9 MM8-SF	45
2.2.1. Analyse des effets de passages de GmMVPN	45
2.2.1.1. Pourcentage d'infection et décompte de polyèdres	45
2.2.1.2. Microscopie électronique	46
2.2.1.3. Analyse de la virulence des polyèdres par des épreuves biologiques avec des larves de <i>Galleria mellonella</i>	47
2.2.1.3.1. Élevage de larves de <i>Galleria mellonella</i>	47
2.2.1.3.2. Préparation des polyèdres	47
2.2.1.3.3. Virulence des polyèdres envers des larves de <i>Galleria mellonella</i> de 3 ^e ou 4 ^e stade	48
2.2.1.4. Analyse des protéines virales	50
2.2.1.4.1. Électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide	50
2.2.1.4.2. Immunobuvardage de type Western	51
2.2.1.4.3. Immunoperoxydase	52
2.2.1.5. Analyse de populations virales par la technique de plages	53
2.2.1.6. Analyse du contenu en ADN des cellules par la technique de cytofluorométrie	54
2.2.1.7. Essai de rétablissement d'une production normale de polyèdres chez des GmMVPN obtenus après plusieurs passages viraux	55
2.2.1.8. Production de polyèdres de GmMVPN de différents passages chez des cellules Sf9 MM8-SF d'un même passage cellulaire	56
2.2.2. Analyse des effets de passages d'AcLuci	57
2.2.2.1. Activité luciférase	57

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	59
3.1. Détermination de certains paramètres utilisés lors des passages de GmMVPN et d'AcLuci	59
3.2. Effet de passages de GmMVPN sur la production de virus extracellulaires	60
3.3. Effet de passages de GmMVPN sur la production de polyèdres	63
3.3.1. Nombre de polyèdres produits par millilitre de milieu de culture	63
3.3.2. Nombre de polyèdres par cellule infectée	63
3.3.3. Forme et dimensions des polyèdres	69
3.3.4. Démonstration par la technique de plages de la sélection de populations de GmMVPN produisant moins de polyèdres	80
3.4. Effet de passages de GmMVPN sur l'infection virale	80
3.4.1. Pourcentage de cellules Sf9 MM8-SF infectées	80
3.4.2. Observations en microscopie électronique	85
3.4.3. Évaluation par la technique de cytofluorométrie de la vitesse d'accumulation en phase G ₂ /M du cycle cellulaire des cellules infectées	93
3.5. Effet de passages viraux sur l'expression de protéines	101
3.5.1. Expression de protéines recombinantes	101
3.5.2. Expression de protéines de GmMVPN	104
3.5.2.1. Expression de protéines virales majeures et de nouvelles protéines virales	104
3.5.2.2. Expression de polyédrine	106
3.5.2.3. Expression de protéines virales	107
3.5.2.4. Expression de polyédrine non-cristallisée	120
3.6. Effet de passages de GmMVPN sur la virulence des polyèdres envers des larves de <i>Galleria mellonella</i>	123
3.6.1. Pourcentage de larves infectées	123
3.6.2. Évaluation de la DI ₅₀	123
3.6.3. Évaluation de la DL ₅₀	124
3.6.4. Analyse du temps léthal	124
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	134
CONCLUSION	152
Liste des références	154
Annexes	165

Liste des figures

Figure 1 : Localisation des éléments structuraux des VPN	10
Figure 2 : Cycle viral des VPN	16
Figure 3 : Effet de passages de GmMVPN sur la production de virus extracellulaires	61
Figure 4 : Effet de passages de GmMVPN sur le nombre de polyèdres produits par millilitre de milieu de culture	64
Figure 5 : Effet de passages de GmMVPN sur le nombre de polyèdres par cellule infectée	66
Figure 6 : Cellules Sf9 MM8-SF passage 510 infectées par du GmMVPN	70
Figure 7 : Cellules Sf9 MM8-SF passage 510 infectées par du GmMVPN et colorées par la technique Buffalo Black	72
Figure 8 : Cellules Sf9 MM8-SF passage 510 infectées par du GmMVPN et colorées au Giemsa	76
Figure 9 : Plages de cellules Sf9 infectées par du GmMVPN	81
Figure 10 : Effet de passages de GmMVPN sur l'infection virale, en terme de pourcentage de cellules Sf9 MM8-SF infectées	83
Figure 11 : Effet de passages de GmMVPN sur l'infection virale. Observations en microscopie électronique à 7 jours post-infection	86
Figure 12 : Vitesse d'accumulation en phase G ₂ /M du cycle cellulaire de cellules infectées par GmMVPN. Analyse du contenu en ADN des cellules par la technique de cytofluorométrie	95
Figure 13 : Effet de passages de GmMVPN sur l'infection virale, en terme de vitesse d'accumulation en phase G ₂ /M du cycle cellulaire de cellules infectées. Technique de cytofluorométrie	98
Figure 14 : Effet de passages d'AcLuci sur l'expression de protéines recombinantes, en terme d'activité luciférase totale et par cellule	102

IX

Figure 15 : Effet de passages de GmMVPN sur l'expression de protéines virales majeures et de nouvelles protéines virales. Technique d'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide	110
Figure 16 : Relation entre le poids moléculaire des protéines standards et leur mobilité relative par rapport à la migration totale du bleu de bromophénol sur gel de SDS-polyacrylamide 12%	112
Figure 17 : Vérification de la présence d'anticorps précipitants dans l'antisérum des six cobayes immunisés contre le GmMVPN. Technique de double immuno-diffusion sur agarose Seakem ME 1%	114
Figure 18 : Vérification de la spécificité des anticorps précipitants présents dans l'antisérum des six cobayes immunisés contre le GmMVPN. Technique de double immuno-diffusion sur agarose Seakem ME 1%	116
Figure 19 : Effet de passages de GmMVPN sur l'expression de la polyédrine et de plusieurs autres protéines virales. Technique d'immunobuvardage de type Western	118
Figure 20 : Effet de passages de GmMVPN sur l'expression de polyédrine non-cristallisée. Technique d'immunoperoxydase	121
Figure 21 : Effet de passages de GmMVPN sur la virulence des polyèdres envers des larves de <i>Galleria mellonella</i> , en terme de pourcentage de larves infectées après ingestion de différentes doses de polyèdres	126
Figure 22 : Effet de passages de GmMVPN sur la virulence des polyèdres envers des larves de <i>Galleria mellonella</i> , en terme de DI_{50} (dose de polyèdres causant une infection de 50% des larves)	128
Figure 23 : Effet de passages de GmMVPN sur la virulence des polyèdres envers des larves de <i>Galleria mellonella</i> , en terme de DL_{50} (dose de polyèdres causant la mort de 50% des larves)	130
Figure 24 : Effet de passages de GmMVPN sur la virulence des polyèdres envers des larves de <i>Galleria mellonella</i> , en terme de temps léthal en utilisant une dose de 2×10^7 polyèdres par larve	132

Liste des annexes

Annexe I : Préparation du milieu de culture MM8-SF	166
Annexe II : Préparation de milieu Grace + 10% SVF	168
Annexe III : Préparation de la diète artificielle pour larves de <i>Galleria mellonella</i>	169
Annexe IV : Liste des produits utilisés lors de ce projet	170

Introduction

Les baculovirus sont des virus d'insectes et sont très étudiés à travers le monde. L'intérêt majeur porté à ces virus se situe dans deux différents domaines. Premièrement, ils sont virulents envers plusieurs insectes ravageurs de plantations et sont donc utilisés comme bioinsecticides. De plus, ils peuvent être utilisés comme vecteurs d'expression de gènes pour la production de protéines, ce qui confère aux baculovirus plusieurs applications médicales, pharmaceutiques et biologiques.

Les virus des polyédroses nucléaires (VPN) ont été utilisés lors de cette étude. Ces virus, tout comme les virus des granulosés (VG), font partie de la grande famille des *Baculoviridae* (ou baculovirus). Contrairement aux VG, les VPN se répliquent dans plusieurs lignées cellulaires *in vitro*. Ceci rend les VPN très intéressants pour la production de bioinsecticides et de protéines recombinantes, car la culture cellulaire *in vitro* permet de les produire massivement en milieu industriel.

Les plus grands problèmes lors de la production massive de baculovirus sont le coût de production et la pureté. En effet, des composants des milieux de culture, et en particulier le sérum de veau fœtal (SVF), sont très dispendieux et augmentent considérablement les coûts de production de bioinsecticides et de protéines recombinantes. De plus, le SVF est susceptible aux contaminations par les mycoplasmes et nuit à la purification de protéines recombinantes produites par des baculovirus. C'est pourquoi, depuis plusieurs dizaines d'années, les scientifiques ont développé plusieurs moyens pour remplacer ou supprimer le SVF des milieux de cultures, tout en conservant une production de baculovirus d'aussi bonnes qualité et quantité. En particulier, un milieu de culture semi-défini très simple et ne contenant pas de SVF a été développé. C'est le milieu Mitsuhashi-Maramorosch sans sérum (milieu MM-SF) (Mitsuhashi, 1982), qui a été simplifié par Koike et Sato (1988) (milieu MM8-SF) et modifié par l'ajout de lipides commerciaux ou de cholestérol (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997) pour la production de VPN par la lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda* clone 9 (Sf9) adaptée (Sf9 MM8-SF).

Avant de passer à une production massive de baculovirus dans ce système cellulaire sans SVF, il était très important de savoir s'il y a stabilité de production virale après plusieurs passages viraux. En effet, lors de la production industrielle massive, des passages successifs de virus doivent être effectués. Donc, un système cellulaire offrant une stabilité virale sur un faible nombre de passages viraux n'est pas intéressant pour la production massive. Dans cet ordre d'idée, plusieurs études ont été effectuées dans le but de démontrer la stabilité de production de VPN en fonction des passages viraux dans différents systèmes cellulaires en présence de SVF. Tous ces travaux ont sensiblement donné les mêmes résultats, c'est-à-dire que la stabilité virale durait en moyenne dix passages de virus. Cette diminution de stabilité peut être en grande partie expliquée par la sélection de mutants FP (Few Polyhedra) lors des passages viraux. Ces mutants produisent entre autres moins de corps d'inclusion (polyèdres) que les VPN sauvages.

Ce qui est intéressant à observer, c'est, qu'à notre connaissance, aucune étude n'a été publiée sur la stabilité de VPN dans un système cellulaire en absence de SVF. L'objectif principal de ce mémoire est donc de vérifier la stabilité de production de VPN en fonction des passages viraux dans notre système cellulaire sans SVF, et ce autant pour la production de bioinsecticides que pour la production de protéines recombinantes. Dans le cadre de ce projet, le virus sauvage GmMVPN a été utilisé pour vérifier la stabilité de production de bioinsecticides, alors que le virus AcLuci, recombinant hybride de AcMVPN et de BmMVPN exprimant la luciférase au lieu de la polyédrine sous le contrôle du promoteur fort de la polyédrine, a été utilisé pour vérifier la stabilité de production de protéines recombinantes.

Après interprétation des résultats obtenus lors de cette étude, nous avons été en mesure de démontrer si la production virale dans un système cellulaire sans SVF est aussi stable que dans un système cellulaire avec SVF. Nous avons également pu analyser les causes et les phénomènes qui peuvent expliquer la baisse de stabilité virale en fonction des passages viraux dans notre système cellulaire, dont l'apparition de mutants FP. Finalement, si notre système cellulaire sans SVF offre une stabilité de production virale sur autant ou même plus de passages viraux que dans un système cellulaire en présence de SVF, nous aurons

fait une progression vers l'amélioration et la rentabilisation de la production de masse de bioinsecticides et de protéines recombinantes à l'aide des baculovirus.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1.1. Virus des polyédroses nucléaires (VPN)

1.1.1. Classification et nomenclature

Les virus classés dans le genre *Nucleopolyhedrovirus* (virus des polyédroses nucléaires ou VPN) font partie de la grande famille des *Baculoviridae* (ou baculovirus), dont les hôtes sont certains crustacés et une très grande variété d'insectes (Murphy *et al.*, 1995; Blissard et Rohrmann, 1990; Rohrmann, 1992; Rohrmann, 1999). Les insectes hôtes sont principalement les lépidoptères (Murphy *et al.*, 1995; Rohrmann, 1999).

Les membres de la famille des *Baculoviridae* forment des corps d'inclusion protéiques à l'intérieur des cellules infectées (Murphy *et al.*, 1995; Rohrmann, 1999). Cette famille contient deux genres, soit les *Nucleopolyhedrovirus* et les *Granulovirus* (virus des granulosés ou VG) (Murphy *et al.*, 1995; Rohrmann, 1999). C'est la structure des corps d'inclusion qui distingue ces deux genres (Murphy *et al.*, 1995; Blissard et Rohrmann, 1990; Rohrmann, 1992; Rohrmann, 1999). Ainsi, un corps d'inclusion (ou granule) formé par des VG consiste en une structure protéique protectrice de forme ellipsoïdale de 0,25 à 0,5 μm de diamètre contenant généralement un seul virion, alors qu'un corps d'inclusion (ou polyèdre) formé par des VPN consiste en une structure protéique protectrice de forme polyédrique de 1 à 15 μm de diamètre contenant plusieurs virions (figure 11, 1a : page 87).

Un autre groupe de baculovirus existe. Ces baculovirus infectent aussi les insectes et présentent des caractéristiques très semblables aux membres de la famille des *Baculoviridae*, mais ne sont pas classés dans cette famille, car ils ne peuvent former de corps d'inclusion à l'intérieur des cellules infectées (Murphy *et al.*, 1995; Burand, 1999). Ces virus se nomment baculovirus non-inclus (ou BNI) (Burand, 1999).

Les espèces virales classées dans le genre VPN sont divisées selon le nombre de nucléocapsides présentes à l'intérieur des virions. Ainsi, les espèces virales contenant de une à de multiples (M) nucléocapsides à l'intérieur d'une seule enveloppe virale se nomment MVPN, alors que celles toujours constituées d'une nucléocapside simple (S) enveloppée se nomment SVPN (Murphy *et al.*, 1995; Rohrmann, 1999). Dans le cadre de ce projet, seulement les MVPN seront étudiés.

Les espèces du genre VPN, comme toutes celles faisant partie des baculovirus, sont nommées selon l'insecte à partir duquel le virus a été isolé (Murphy *et al.*, 1995; Rohrmann, 1999). Donc, un MVPN isolé à partir de larves de *Galleria mellonella* (insecte responsable de la destruction des ruches d'abeille) se nomme *Galleria mellonella* MVPN, alors qu'un autre MVPN isolé à partir de larves d'*Autographa californica* (ou autographe de la luzerne) se nomme *Autographa californica* MVPN.

L'abréviation des espèces virales acceptées depuis longtemps dans le genre VPN est formée par la première lettre du genre et la première lettre de l'insecte à partir duquel le virus a été isolé (Murphy *et al.*, 1995). Ainsi, *Galleria mellonella* MVPN et *Autographa californica* MVPN sont respectivement nommés GmMVPN et AcMVPN (Murphy *et al.*, 1995). Cependant, plusieurs problèmes sont reliés à l'utilisation de ces abréviations, car les VPN ont été rapportés chez plus de 500 espèces d'insectes (Blissard et Rohrmann, 1990; Rohrmann, 1992). De plus, des centaines d'espèces virales ont été proposées à l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) depuis plusieurs années pour être acceptées dans le genre VPN (Murphy *et al.*, 1995). C'est pourquoi l'abréviation a changé chez les espèces virales qui ont été officiellement acceptées récemment dans le genre VPN ou qui sont actuellement en procédure d'acceptation par l'ICTV (Murphy *et al.*, 1995). L'abréviation de ces VPN est maintenant formée par les deux premières lettres du genre et les deux premières lettres de l'espèce de l'insecte à partir duquel le virus a été isolé (Murphy *et al.*, 1995). Par exemple, l'abréviation de *Wiseana signata* VPN, un virus qui n'était pas encore accepté officiellement dans le genre VPN en 1993, est WisiVPN (Murphy *et al.*, 1995).

1.1.2. Structure

1.1.2.1. Nucléocapside

Les VPN sont des virus à ADN double-brin circulaire en forme de superhélice de 88 à 170 kilobases (kb), selon le virus, pour une moyenne d'environ 100 kb (Burgess, 1977; Schafer *et al.*, 1979; Faulkner et Carstens, 1986; Blissard et Rohrmann, 1990; Murphy *et al.*, 1995; Rohrmann, 1999). La séquence complète du génome viral a été répartie en unités de 0 à 100%, la position 0% correspondant à la région hr1, c'est-à-dire une région contenant des répétitions homologues de séquences et des sites de restriction EcoRI (Blissard et Rohrmann, 1990; Ayres *et al.*, 1994). Le génome viral code pour plusieurs protéines (Summers et Smith, 1978; Wood, 1980; Braunagel et Summers, 1994; Ayres *et al.*, 1994), mais seulement quelques-unes sont bien caractérisées.

Le génome viral est étroitement associé à une petite protéine basique de 6.5 à 6.9 kilodaltons (kDa) riche en arginine, en sérine et en thréonine (Wilson *et al.*, 1987; Russell et Rohrmann, 1990b). Cette protéine se nomme p6.5-6.9, ou protéine liée à l'ADN (figure 1). Les résidus arginine serviraient à maintenir un lien étroit avec l'ADN et à stabiliser cet ADN, alors que les résidus sérine/thréonine seraient impliqués dans le relâchement de l'ADN viral à l'intérieur du noyau cellulaire au début de l'infection virale (Wilson *et al.*, 1987; Russell et Rohrmann, 1990b).

Le complexe ADN - p6.5-6.9 est entouré d'une capsidie hélicoïdale de 30 à 60 nanomètres (nm) de largeur par 250 à 300 nm de longueur, formant ainsi une nucléocapsidie (Faulkner et Carstens, 1986; Murphy *et al.*, 1995; Rohrmann, 1999). Cinq protéines structurales formant cette capsidie sont maintenant bien caractérisées (figure 1). La présence de chacune de ces protéines dans la capsidie a été déterminée par les techniques d'immunobuvardage de type Western et/ou d'immunogold en microscopie électronique. La première est la p39, d'un poids moléculaire de 39 à 39,5 kDa, et est la protéine structurale majeure des capsidies (Pearson *et al.*, 1988; Blissard *et al.*, 1989; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991). La seconde est la p25 (ou p24), une protéine de 25 kDa (ou 24 kDa) bien distribuée dans toute la capsidie (Goh, 1993; Wolgamot *et al.*, 1993). La troisième est la p80 chez AcMVPN (ou la p87 chez OpMVPN), une protéine de 80 kDa

(ou 87 kDa) associée à la capsid (Lu et Carstens, 1992; Müller *et al.*, 1990). Cette protéine n'est cependant pas en aussi grande concentration que la p39 (Müller *et al.*, 1990). La quatrième est la p91, une protéine de 91 kDa associée à la capsid des VPN et présente autant dans la capsid que dans l'enveloppe entourant la capsid (Russell et Rohrmann, 1997). La dernière est la pp78/83, une phosphoprotéine de 78 kDa ou de 83 kDa associée à la structure terminale des nucléocapsides matures (Vialard et Richardson, 1993). La protéine de 83 kDa est un dérivé phosphorylé de la protéine de 78 kDa.

1.1.2.2. Virus extracellulaire (VEC)

Chez les VPN, des virions de deux phénotypes distincts sont produits (Volkman et Summers, 1977). Le premier phénotype est le virus extracellulaire (VEC) (ou en anglais BV : « budded virus ») (figure 1). Ce virus est constitué d'une seule nucléocapsid enveloppée (figure 1). Il acquiert son enveloppe par bourgeonnement d'une nucléocapsid au travers de la membrane cytoplasmique d'une cellule infectée. Par ce processus, le virus est relâché à l'extérieur de la cellule infectée et acquiert la gp64, une glycoprotéine de 64 kDa (ou 67 kDa) retrouvée uniquement dans l'enveloppe des VEC et servant de récepteur viral (figure 1) (Volkman *et al.*, 1984; Volkman, 1986; Whitford *et al.*, 1989; Blissard et Wenz, 1992). Cette protéine est en concentration particulièrement élevée à l'intérieur de péplomères, c'est-à-dire de petites structures de nature glycoprotéique traversant l'enveloppe virale et projetées à l'extérieur du virus, retrouvés à une extrémité du VEC (figure 1) (Volkman *et al.*, 1984). Le récepteur viral doit être sous forme homotrimérique pour être fonctionnel, c'est-à-dire composé de trois protéines gp64 (Oomens, Monsma et Blissard, 1995).

1.1.2.3. Virus inclus (VI)

Le second phénotype est le virus inclus (VI) (figure 1). Le VI est formé d'une ou de plusieurs nucléocapsides entourées d'une enveloppe simple (figure 1). Contrairement à l'enveloppe du VEC, cette enveloppe provient d'une synthèse de membrane *de novo* par le virus (Robertson, Harrap et Longworth, 1974; Stoltz, Pavan et Dacunha, 1973; Knudson et Harrap, 1976). Plusieurs protéines virales sont exclusivement retrouvées chez les VI. La première est la p74 (figure 1), récepteur viral essentiel pour infecter les cellules

épithéliales de l'intestin de l'insecte (Kuzio, Jaques et Faulkner, 1989; Faulkner *et al.*, 1997). Cette protéine de 74 kDa n'est pas exprimée en grande quantité dans les cellules infectées (Kuzio, Jaques et Faulkner, 1989). La seconde est la gp41, une glycoprotéine structurale de 41 kDa présente dans le tégument, c'est-à-dire dans la région entre la capsid et l'enveloppe du virus inclus (figure 1) (Whitford et Faulkner, 1992a; Whitford et Faulkner, 1992b). Les autres protéines structurales connues sont toutes présentes exclusivement dans l'enveloppe du virus inclus, déterminé par les techniques d'immunobuvardage de type Western et d'immunogold en microscopie électronique. La VI-E18/35, la VI-E25 (ou p25), la VI-E56 et la VI-E66 font partie de ces protéines structurales (figure 1). La VI-E18/35 correspond à deux protéines de 18 kDa et de 35 kDa ayant la même séquence N-terminale en acides aminés (Braunagel *et al.*, 1996a). La VI-E25 a un poids moléculaire de 25 kDa (Russell et Rohrmann, 1993). Cette p25 n'est pas la même protéine que la p25 structurale présente dans la capsid, car la p25 de capsid est exprimée plus tôt dans les cellules infectées et est également présente dans les virus extracellulaires (Goh, 1993; Russell et Rohrmann, 1993). Finalement, la VI-E56 et la VI-E66 sont des protéines structurales de 56 kDa et de 66 kDa, respectivement (Braunagel *et al.*, 1996b; Hong, Braunagel et Summers, 1994).

1.1.2.4. Polyèdres

Les VI sont protégés à l'intérieur d'un corps d'inclusion (ou polyèdre) de forme plus ou moins polyédrique de 1 à 15 µm de diamètre (figure 1) (Raghow et Grace, 1974; Knudson et Harrap, 1976; Murphy *et al.*, 1995; Rohrmann, 1999). Plusieurs VI sont présents par corps d'inclusion (figure 11, 1a : page 87). Le polyèdre protège ces virions contre les rayons ultraviolets, la dessiccation et tout autre facteur extérieur qui pourrait abîmer les virions et l'ADN viral. Trois protéines sont reliées aux polyèdres, soient la polyédrine, la p10 et la protéine de l'enveloppe du polyèdre (protéine EP) (figure 1).

La polyédrine (ou p29) est la protéine majeure formant la matrice des corps d'inclusion (figure 1) (Rohrmann, 1986; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991). Son poids moléculaire se situe entre 27 et 33 kDa selon le VPN, avec une moyenne de 29 kDa (Croizier et Croizier, 1977; Wood, 1980; Rohrmann, 1986). La polyédrine est la protéine virale la

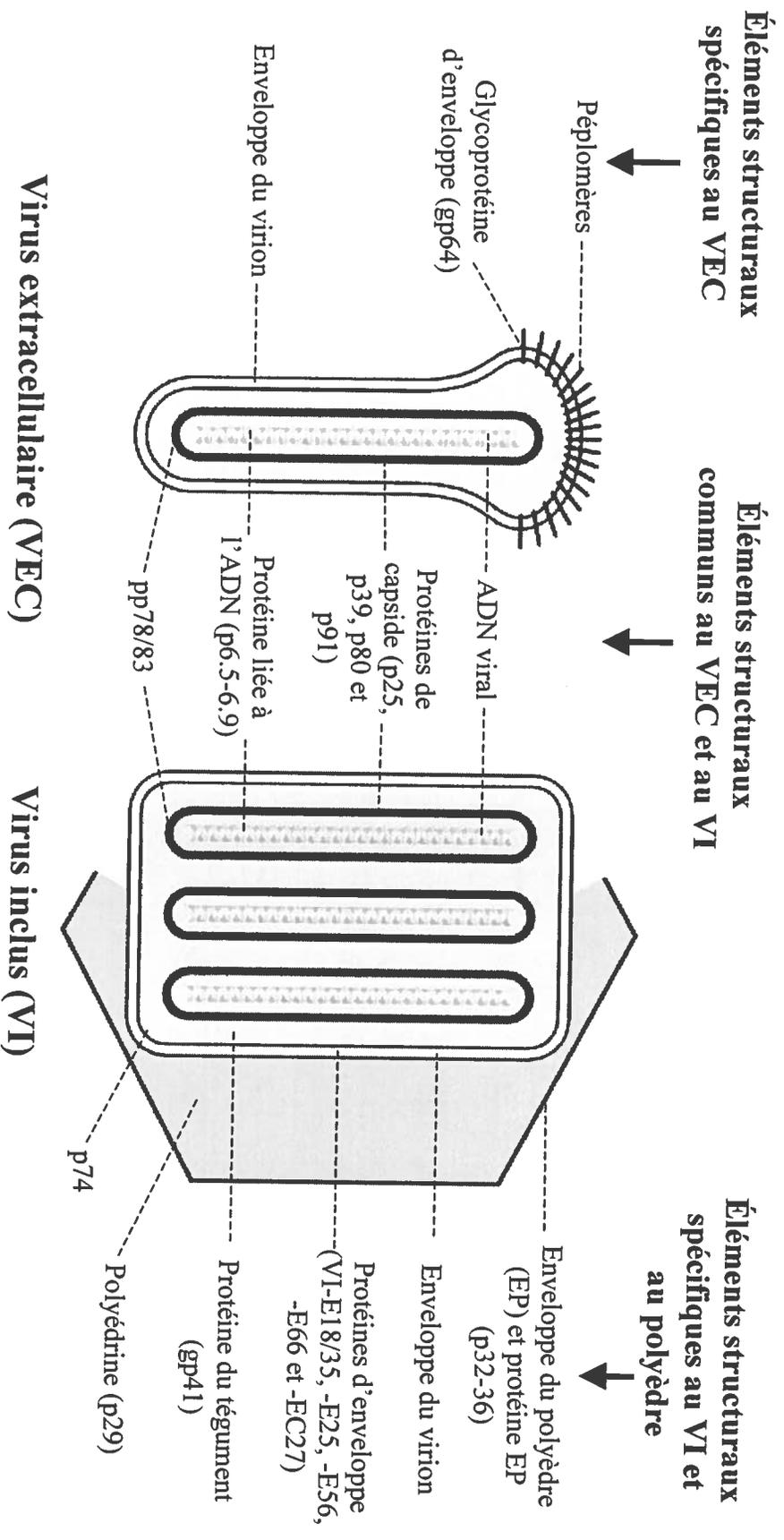
plus étudiée, car elle est hyperexprimée et est la protéine virale la plus abondante à l'intérieur des cellules infectées (Quant *et al.*, 1984). Le rôle de la polyédrine est le même que celui des polyèdres, c'est-à-dire de stabiliser les virions dans l'environnement et de protéger l'ADN viral contre les rayons ultraviolets (Blissard et Rohrmann, 1990).

La p10, une protéine de 10 kDa, est également hyperexprimée. Elle est associée au polyèdre, mais n'est pas une protéine structurale présente en concentration importante à l'intérieur du polyèdre (Quant-Russell *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1989; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991). Elle est plutôt concentrée dans un réseau de filaments protéiques à l'intérieur des cellules infectées (Quant-Russell *et al.*, 1987; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991). En effet, des virus mutants n'exprimant pas la p10 (mutants p10-) ne forment pas ces filaments, alors que des VPN sauvages en forment (Williams *et al.*, 1989; Gross, Russell et Rohrmann, 1994). La p10 est essentielle à un assemblage normal des polyèdres, car les mutants p10- forment des polyèdres très fragiles et se brisant facilement (Williams *et al.*, 1989; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991; Gross, Russell et Rohrmann, 1994). La p10 semble aussi aider l'enveloppe du polyèdre (EP) à s'attacher autour du polyèdre, car l'EP des mutants p10- ne s'associe pas ou s'attache de manière aberrante au polyèdre (Williams *et al.*, 1989; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991; Gross, Russell et Rohrmann, 1994). Finalement, la p10 semble être importante lors de la lyse cellulaire à la fin de l'infection virale, étant donné qu'aucune lyse cellulaire n'est observée chez les cellules infectées par des mutants p10-, alors qu'il y a lyse cellulaire lors d'une infection par un virus sauvage (Williams *et al.*, 1989).

La protéine EP est une protéine de 32 à 36 kDa (p32-36) (figure 1). Elle est présente uniquement dans l'enveloppe du polyèdre (EP) (Gombart *et al.*, 1989; Russell et Rohrmann, 1990a; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991; Gross, Russell et Rohrmann, 1994) et est exprimée en assez faible concentration dans les cellules infectées (Gombart *et al.*, 1989; Gross, Russell et Rohrmann, 1994). La protéine EP, avec l'aide de la p10, semble essentielle à la formation de l'enveloppe autour du polyèdre, et donc nécessaire à la stabilité du polyèdre (Williams *et al.*, 1989; Russell et Rohrmann, 1990a; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991; Gross, Russell et Rohrmann, 1994).

Figure 1 : Localisation des éléments structuraux des VPN.

(Adapté à partir de Blissard et Rohrmann, 1990).



1.1.3. Cycle viral

1.1.3.1. Cycle viral *in vivo*

1.1.3.1.1. Infection primaire

Le cycle viral *in vivo* des VPN (figure 2A) a été révisé par Granados et Lawler (1981). Lorsqu'ingérés par une larve d'insecte, les polyèdres sont très virulents, ce qui offre la possibilité de les utiliser comme bioinsecticides (Wood et Granados, 1991). Après ingestion, ces corps d'inclusion sont dissous dû au pH alcalin présent dans l'appareil digestif de la larve (figure 2A). Les VI ainsi libérés engendrent une infection primaire (figure 2A) (Granados et Lawler, 1981), c'est-à-dire qu'ils infectent les cellules épithéliales de l'intestin de la larve grâce au récepteur viral p74. En effet, les polyèdres de mutants dont le gène de la p74 est inactivé ne sont pas virulents lorsqu'ingérés par des larves d'insecte (Kuzio, Jaques et Faulkner, 1989; Faulkner *et al.*, 1997). L'infection virale s'effectue par fusion directe de la membrane virale avec la membrane cellulaire (figure 2A) (Horton et Burand, 1993). Après pénétration dans la cellule épithéliale, les nucléocapsides entrent dans le noyau cellulaire en traversant les pores de la membrane nucléaire et le génome viral est relâché à l'intérieur du noyau par décapsidation (figure 2A) (Granados et Lawler, 1981), grâce à la protéine p6.5-6.9 (Wilson *et al.*, 1987; Russell et Rohrmann, 1990b). La réplication de l'ADN viral et l'assemblage des nucléocapsides s'effectuent à l'intérieur du noyau, dans une structure virale nommée stroma virogénique (figure 2A) (Granados et Lawler, 1981; Rohrmann, 1999). Après assemblage, deux options s'offrent aux nucléocapsides, chacune menant à la formation de virus de phénotype distinct (Volkman et Summers, 1977). La première option mène à la formation de virus extracellulaire (VEC) (figure 2A, ①) et la seconde mène à la formation du virus inclus (VI) (figure 2A, ②).

Pour former un VEC, une nucléocapside bourgeonne au travers de la membrane nucléaire, perd cette membrane dans le cytoplasme et bourgeonne ensuite au travers de la membrane cytoplasmique (figure 2A, ①) (Granados et Lawler, 1981). Grâce à ce dernier bourgeonnement, le virus acquiert le récepteur viral gp64, qui était déjà présent dans la membrane cytoplasmique lors du bourgeonnement (figure 2A) (Volkman *et al.*, 1984;

Volkman, 1986; Rohrmann, 1992), et est relâché dans l'hémolymphe, ou système circulatoire de la larve (Granados et Lawler, 1981).

Les étapes menant à la formation de VI dans les cellules épithéliales de l'intestin de la larve s'effectuent pendant une phase plus tardive de l'infection (figure 2A, ②). Dans ce cas, il y a maturation et enveloppement de plusieurs nucléocapsides ensemble à l'intérieur d'une membrane synthétisée *de novo* par le virus (figure 2A) (Robertson, Harrap et Longworth, 1974; Stoltz, Pavan et Dacunha, 1973; Knudson et Harrap, 1976). Lors de ce processus, les virions acquièrent toutes les protéines reliées exclusivement au VI, dont la p74, la gp41, la VI-E18/35, la VI-E25 (ou p25), la VI-E35, la VI-E56 et la VI-E66. Les virions matures et enveloppés sont des virions destinés à être inclus dans des polyèdres. Pour ce faire, la polyédrine et la p10 sont préalablement exprimées en grande concentration dans le cytoplasme dans la phase tardive de l'infection virale et sont transportées vers le noyau (figure 2A) (Rohrmann, 1986; Quant-Russell *et al.*, 1987; Blissard et Rohrmann, 1990; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991). Les virions sont ensuite inclus à l'intérieur de corps d'inclusion (ou polyèdres) (figure 2A), qui se forment par la cristallisation de la polyédrine autour des virions et par la formation de l'enveloppe du polyèdre (EP) (Raghow et Grace, 1974; Knudson et Harrap, 1976; Chung, Brown et Faulkner, 1980). Les protéines p10 et EP jouent un rôle important dans la formation des polyèdres (Williams *et al.*, 1989; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991; Gross, Russell et Rohrmann, 1994) et la protéine VI-E25 semble être importante pour inclure les virions à l'intérieur de ces corps d'inclusion (Russell et Rohrmann, 1993). Après inclusion, plusieurs VI sont présents à l'intérieur d'un corps d'inclusion de forme plus ou moins polyédrique de 1 à 15 μm de diamètre (figure 11, 1a : page 87) (Raghow et Grace, 1974; Knudson et Harrap, 1976; Rohrmann, 1999). Ces polyèdres sont relâchés lors de la lyse cellulaire (figure 2A), induite entre autres par la protéine p10 (Williams *et al.*, 1989).

1.1.3.1.2. Infection secondaire

Suite au relâchement de virus extracellulaires (VEC) dans l'hémolymphe à partir de cellules épithéliales de l'intestin de la larve, une infection secondaire est amorcée. Les VEC se dispersent dans le système circulatoire de la larve et infectent plusieurs types de

cellules, dont les cellules adipeuses, épithéliales, musculaires et les hémocytes (figure 2A) (Granados et Lawler, 1981), grâce à la gp64 (Monsma, Oomens et Blissard, 1996). Contrairement à l'infection par les VI, l'infection par les VEC ne s'effectue pas par fusion directe, mais par endocytose, c'est-à-dire par invagination de la membrane cellulaire qui englobe les virus extracellulaires, formant ainsi une vésicule intracellulaire nommée endosome (figure 2A) (Volkman et Goldsmith, 1985; Volkman, 1986). Dû à la diminution du pH à l'intérieur de l'endosome, la gp64 provoque la fusion de la membrane des VEC avec celle de l'endosome, ce qui permet le relâchement des nucléocapsides dans le cytoplasme cellulaire (figure 2A) (Volkman et Goldsmith, 1985; Volkman, 1986; Blissard et Wenz, 1992). Après décapsidation, réplication de l'ADN viral, assemblage de nouvelles nucléocapsides et expression de protéines dont la p10 et la polyédrine, des VEC et des polyèdres contenant des virions sont produits (figure 2A), par les mêmes étapes que celles décrites précédemment. Les VEC produits infectent ensuite d'autres cellules larvaires (figure 2A), et ainsi de suite jusqu'à liquéfaction et mort de la larve. Donc, le VEC permet la transmission du virus de cellules à cellules et est responsable de l'amplification virale dans l'hémolymphe des larves (Volkman et Summers, 1977), grâce à la gp64 (Monsma, Oomens et Blissard, 1996). Après décomposition de la larve, les polyèdres protègent les VI jusqu'à ce qu'une autre larve ingère ces corps d'inclusion et qu'un autre cycle viral s'enclenche (figure 2A). Donc, les polyèdres sont très importants pour que les VPN puissent se propager dans une population larvaire.

1.1.3.2. Cycle viral *in vitro*

Le cycle viral *in vitro* des VPN (figure 2B) est très semblable à l'infection secondaire lors du cycle viral *in vivo* (section 1.1.3.1.2. et figure 2A). Donc, lors d'une infection virale en culture cellulaire, les virus extracellulaires (VEC), obtenus à partir de l'hémolymphe de larves en phase virémique ou à partir du surnageant de cellules infectées *in vitro*, pénètrent dans la cellule par endocytose grâce à la gp64, acquise lors du bourgeonnement de nucléocapsides au travers de la membrane cytoplasmique de cellules infectées (figure 2B) (Volkman *et al.*, 1984; Volkman et Goldsmith, 1985; Volkman, 1986; Blissard et Wenz, 1992). Après entrée de nucléocapsides dans le noyau, décapsidation, réplication de l'ADN viral, assemblage de nouvelles nucléocapsides et expression de protéines dont la

p10 et la polyédrine, des VEC et des polyèdres contenant des virions sont produits (figure 2B), par les mêmes étapes que celles décrites plus haut. Les VEC produits infectent ensuite d'autres cellules adjacentes (figure 2B). Le VEC permet donc la transmission du virus de cellules à cellules et est responsable de l'amplification virale en culture cellulaire (Volkman et Summers, 1977), grâce à la gp64 (Monsma, Oomens et Blissard, 1996). Finalement, les polyèdres produits sont relâchés lors de la lyse cellulaire (figure 2B). Ces polyèdres ne sont pas virulents *in vitro*, mais le sont lorsqu'ingérés par des larves d'insectes, ce qui offre la possibilité de les utiliser comme bioinsecticides (figure 2B).

1.1.4. Mécanisme viral permettant d'optimiser la réplication virale

Pour qu'une infection virale génère une quantité optimale de virus, des mécanismes doivent être utilisés par les virus pour optimiser la réplication virale à l'intérieur des cellules infectées. Dans le cas des VPN, un mécanisme implique la protéine structurale virale VI-EC27. Cette protéine de 27 kDa se retrouve surtout dans l'enveloppe et la capsid des virus inclus (figure 1), mais également en faible quantité dans les virus extracellulaires (Braunagel *et al.*, 1996a; Belyavskiy, Braunagel et Summers, 1998). Cette protéine joue le rôle d'une cycline virale ayant deux fonctions principales (Braunagel *et al.*, 1998; Belyavskiy, Braunagel et Summers, 1998; Ikeda et Kobayashi, 1999).

Premièrement, lorsqu'elle est liée à la kinase cdc2, elle forme un analogue non-dégradable du complexe cycline B - cdc2 cellulaire. Or, la dégradation du complexe cycline B - cdc2 est nécessaire pour que le cycle cellulaire passe de la métaphase à l'anaphase et termine ainsi la phase de mitose (ou phase M) du cycle cellulaire. Donc, comme le complexe VI-EC27 - cdc2 viral n'est pas dégradé, le cycle cellulaire est bloqué à la phase G₂/M (Braunagel *et al.*, 1998; Belyavskiy, Braunagel et Summers, 1998; Ikeda et Kobayashi, 1999). Cet arrêt permet une transcription élevée des gènes viraux au détriment de la transcription des gènes cellulaires.

Figure 2 : Cycle viral des VPN.

A) *In vivo*

B) *In vitro*

① 1^{ère} option : formation de virus extracellulaire (VEC).

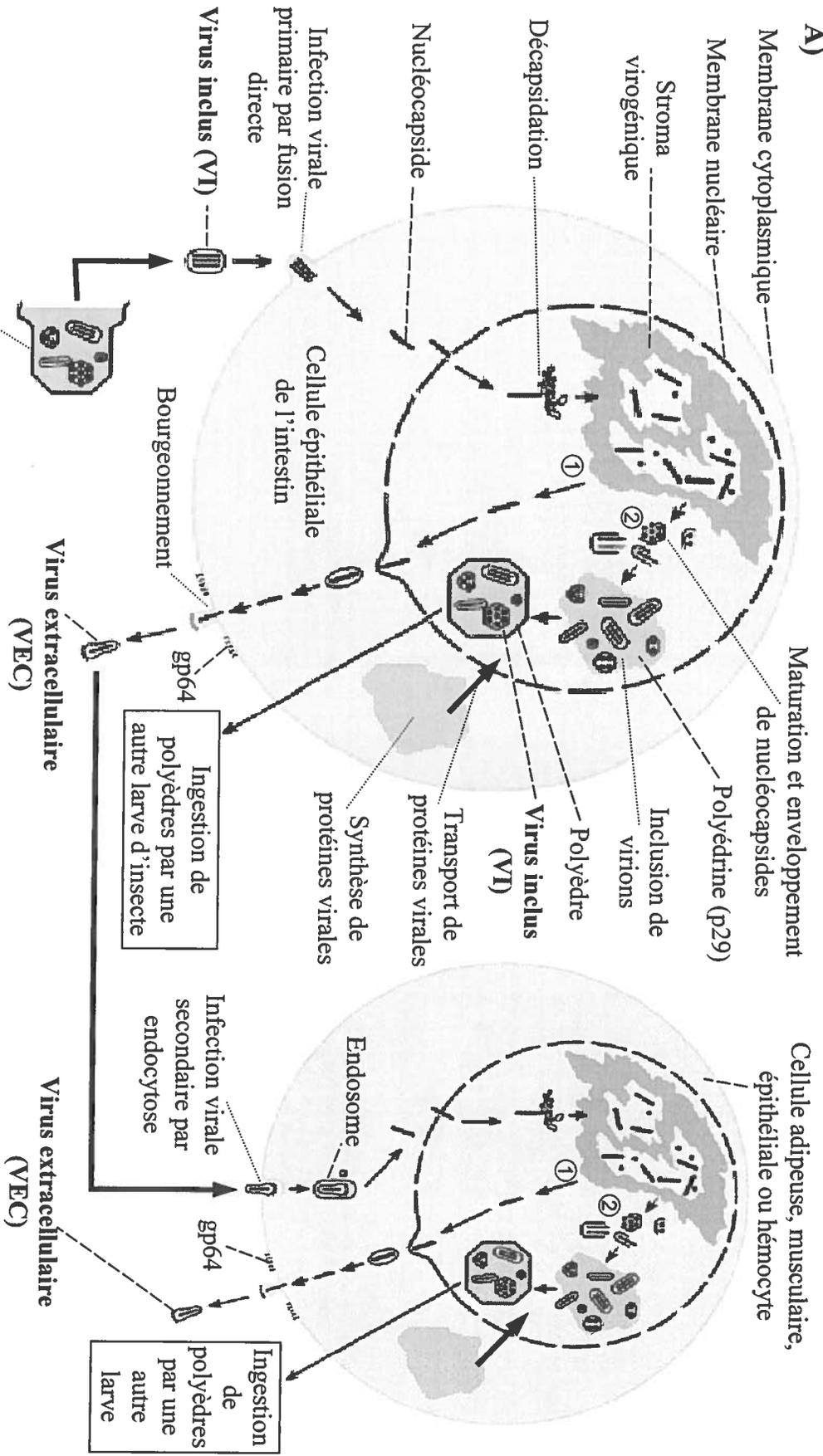
② 2^{ième} option : formation de virus inclus (VI).

..... = Étape du cycle viral.

--- = Structure cellulaire ou virale.

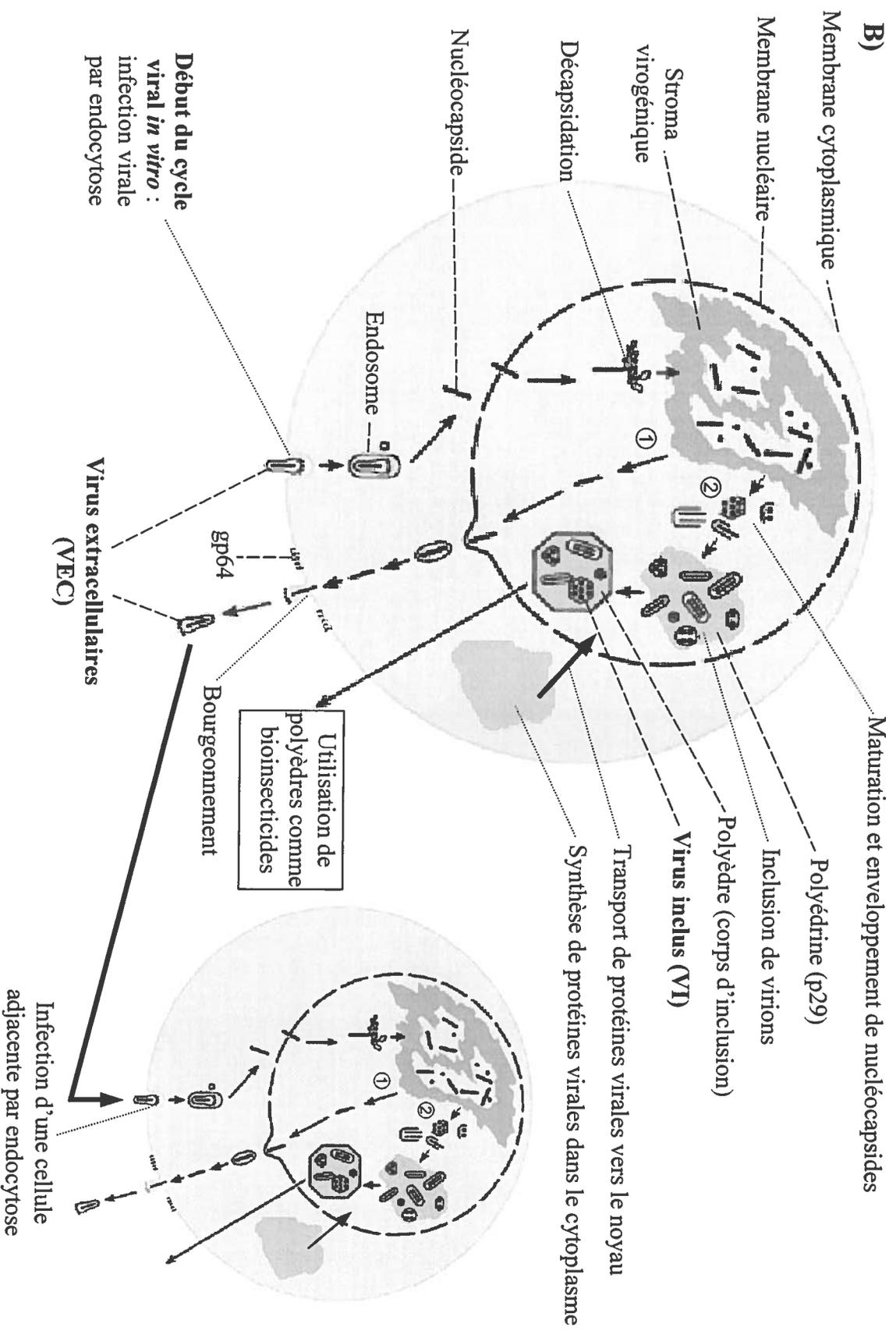
(Adapté à partir de Blissard et Rohrmann, 1990).

A)



Début du cycle viral *in vivo* :
ingestion et dissolution de polyédres
dans l'appareil digestif de la larve hôte

B)



Deuxièmement, la liaison de la protéine virale VI-EC27 à la protéine kinase cdk6 résulte en une activité semblable à celle de la cycline D cellulaire. Or, cette cycline D cellulaire forme un complexe avec plusieurs kinases et fait partie d'une série de réactions qui provoquent la transition de la phase G₁ à la phase S du cycle cellulaire, c'est-à-dire la phase où il y a synthèse et réplication d'ADN. Donc, même si les cellules infectées n'entrent jamais dans la phase S du cycle cellulaire (elles sont bloquées en phase G₂/M du cycle cellulaire), le complexe VI-EC27 - cdk6 permet une synthèse et une réplication d'ADN viral élevée (Braunagel *et al.*, 1998; Belyavskiy, Braunagel et Summers, 1998).

1.2. Culture cellulaire d'insectes

1.2.1. Historique et importance de la culture cellulaire d'insectes

Un intérêt majeur est porté aux VPN pour deux raisons. D'abord, parmi les insectes hôtes de ces virus, plusieurs sont ravageurs de plantations, d'où l'intérêt d'utiliser ces virus comme insecticide biologique. Cette utilisation potentielle a d'ailleurs été étudiée en détails auparavant (Wood et Granados, 1991). Ensuite, le génome de ces virus contient deux gènes hyperexprimés sous le contrôle de promoteurs forts, soit les gènes de la polyédricité et de la p10. Chacun de ces gènes peut être remplacé par le gène codant pour des protéines étrangères, ce qui permet d'atteindre un haut niveau d'expression de protéines, d'où l'intérêt d'utiliser les VPN recombinants comme vecteurs d'expression de gènes d'intérêt médical, biologique ou pharmaceutique (Luckow et Summers, 1988; Miller, 1988). Dans cet ordre d'idées, plusieurs études et résumés sur la biologie moléculaire des VPN ont été publiés (Faulkner et Carstens, 1986; Blissard et Rohrmann, 1990). D'ailleurs, le génome de AcMVPN, l'espèce type des MVPN (Murphy *et al.*, 1995), a été séquencé au complet (Ayres *et al.*, 1994).

À la fin des années 60 et au début des années 70, des découvertes majeures ont complètement révolutionné les possibilités de production de VPN. En effet, plusieurs études ont démontré que les VPN peuvent se répliquer *in vitro* en culture cellulaire.

Les premières études ont été effectuées sur des tissus primaires d'insectes ou sur des cellules d'insectes n'ayant pas été cultivées pour plus de 30 passages, et n'étant donc pas

vraiment considérées comme des lignées cellulaires établies. Par exemple, il a été démontré par la technique d'immunofluorescence que des VPN pouvaient se répliquer *in vitro* en culture de tissus d'ovaires de *Bombyx mori* (Krywienczyk et Sohi, 1967). Une autre étude a démontré que les virus *Heliothis* VPN pouvaient se répliquer à l'intérieur des cellules *Heliothis zea* adaptées à la culture cellulaire *in vitro* depuis quelques passages (Ignoffo, Shapiro et Hink, 1971).

Les techniques de culture cellulaire se sont améliorées rapidement et quelques études de réceptivité virale ont été effectuées quelques années plus tard sur des lignées cellulaires établies. Ainsi, la lignée cellulaire provenant de la larve de *Spodoptera frugiperda* (Goodwin *et al.*, 1970) a démontré une permissivité à l'infection par les virus *Spodoptera frugiperda* MVPN (SfMVPN) (Goodwin *et al.*, 1970; Knudson et Tinsley, 1974). De plus, il a été possible d'infecter cette lignée cellulaire par les virus *Trichoplusia ni* MVPN (TnMVPN) et *Autographa californica* MVPN (AcMVPN) (Goodwin *et al.*, 1973). D'autres chercheurs ont réussi à produire le virus *Bombyx mori* MVPN (BmMVPN) (Raghow et Grace, 1974) sur une lignée cellulaire établie provenant de la larve de *Bombyx mori* (Grace, 1967). De plus, il a été démontré que la lignée cellulaire provenant de l'insecte *Trichoplusia ni* (Hink, 1970) supportait la réplication du virus *Trichoplusia ni* MVPN (TnMVPN) (Faulkner et Henderson, 1972), déterminé par la production de polyèdres et l'observation des cellules infectées en microscopie électronique. De plus, dans cette dernière étude, il a été démontré que les polyèdres produits *in vitro* étaient aussi virulents envers la larve que des polyèdres produits *in vivo*.

Plusieurs dizaines d'autres études sur la réplication de VPN en culture cellulaire ont été publiées pendant ces années. Cette découverte était très importante, car la production virale en culture cellulaire offre plusieurs avantages par rapport à la production chez la larve. Premièrement, la culture cellulaire offre la possibilité de production massive de bioinsecticides ou de protéines recombinantes en fermenteurs industriels. Ensuite, la culture cellulaire offre une pureté beaucoup plus élevée que la larve. En effet, plusieurs contaminants peuvent être présents chez la larve, car il est difficile d'y contrôler la présence de bactéries, de champignons, de moisissures et de virus indésirables. Par

exemple, les virus des polyédroses cytoplasmiques (VPC) peuvent souvent se retrouver à l'intérieur de la larve de la tordeuse d'épinière. Finalement, plusieurs protéines larvaires rendent difficile la purification de protéines recombinantes exprimées par des VPN recombinants.

1.2.2. Milieux de culture contenant du sérum de veau fœtal (SVF)

Pour que la production virale en culture cellulaire soit vraiment avantageuse par rapport à la production virale chez la larve, il est nécessaire que les cellules infectées utilisées soient hautement productrices de virus extracellulaires (VEC), de polyèdres et/ou de protéines recombinantes. De plus, les milieux de culture utilisés doivent être rentables, c'est-à-dire qu'ils doivent permettre la production d'une grande quantité de virus infectieux à coût modique.

Or, les premiers milieux de culture utilisés pour la culture de cellules d'insectes (Grace, 1962) ne possédaient pas toutes ces caractéristiques. Ceci était en grande partie dû au sérum de veau fœtal (SVF) qui était, et qui est toujours aujourd'hui, rajouté à une concentration de 5 à 20% dans les milieux de culture. Bien sûr, grâce aux protéines, aux vitamines, aux peptides, aux acides aminés, aux lipides, aux ions métalliques et aux facteurs de croissance que le SVF contient, les cellules s'y multiplient très bien et y supportent très bien la réplication virale (Agathos, 1991). Par contre, le SVF est un produit très dispendieux, ce qui n'est pas avantageux pour une production à grande échelle de virus. De plus, le SVF peut contenir des facteurs cytotoxiques, est susceptible aux contaminations par les mycoplasmes et nuit à la purification de protéines recombinantes produites (Agathos, 1991). C'est pourquoi plusieurs tentatives ont été effectuées depuis 1969 afin de diminuer la concentration en SVF ou de remplacer le SVF des milieux de culture de cellules d'insectes.

1.2.3. Développement de milieux de culture ne contenant pas de SVF

Depuis la fin des années 60, plusieurs milieux chimiquement définis ou semi-définis ne contenant pas de SVF ont été développés (Mitsubishi et Goodwin, 1989).

1.2.3.1. Milieux chimiquement définis

Les milieux chimiquement définis ne contenant pas de SVF sont principalement développés à partir d'un mélange de plusieurs substances bien définies, comme des vitamines, des facteurs de croissance, des sucres, des acides aminés et des sels inorganiques (Mitsubishi et Goodwin, 1989). Ce type de milieu est important dans le but d'effectuer des études biochimiques et virologiques sur les VPN. Très peu de milieux de culture définis sans SVF ont été développés. Cependant, le milieu développé par Wilkie, Stockdale et Pirt (1980) entre dans cette catégorie. Ce milieu chimiquement défini supporte très bien la croissance de la lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda* et de deux lignées cellulaires de moustique. De plus, les cellules *Spodoptera frugiperda* adaptées à ce milieu de culture supportent très bien la réplication de AcMVPN, mesuré par la production de polyèdres.

1.2.3.2. Milieux semi-définis

Un milieu de culture semi-défini est un milieu de culture contenant une ou plusieurs substances naturelles non-définies. Un plus grand intérêt a été porté à ces milieux de culture sans SVF, car ils ne sont pas dispendieux et sont simples à produire (Mitsubishi et Goodwin, 1989). Ils possèdent donc un grand potentiel pour la production massive de virus. Par conséquent, plusieurs études ont été effectuées afin d'adapter des lignées cellulaires à des milieux de culture semi-définis sans SVF. Les substances non-définies les plus souvent utilisées sont les hydrolysats de protéines, comme l'hydrolysate de lactalbumine (LH) et le yeastolate (YL), mais aussi les peptones, les extraits de levure et le bouillon tryptose phosphate (Mitsubishi et Goodwin, 1989; Agathos, 1991).

Dans cet ordre d'idée, des travaux ont été réalisés pour remplacer le SVF des milieux de culture par des substances non-définies. Ainsi, Goodwin (1976) a réussi à adapter la lignée cellulaire d'insectes de *Lymantria dispar* dans un milieu contenant des acides aminés et plusieurs peptones au lieu du SVF. D'autres chercheurs ont tenté de remplacer le SVF soit par le bactotryptose, soit par le bactotryptone ou soit par le bactopeptone (Hink, Strauss et Lynn, 1977). Le bactotryptose semblait le plus bénéfique, et plus de 185 passages de la lignée cellulaire TN-368 ont été effectués dans ce milieu sans SVF

supplémenté de quelques protéines. De plus, Röder (1982) a cultivé trois lignées de cellules de lépidoptères dans le milieu BML/TC-10, dans lequel il a diminué progressivement la concentration de SVF pour la remplacer par 1% d'émulsion de jaune d'œuf. Les cellules adaptées à ce milieu présentaient une aussi bonne croissance cellulaire qu'avant l'adaptation et supportaient encore très bien la production de baculovirus, même en absence de SVF. Par contre, Kuno (1983) a tenté de remplacer le SVF par du bouillon tryptose phosphate afin de cultiver sept lignées cellulaires de moustique, mais le taux de croissance des cellules adaptées et la production de virus ont diminué par rapport au système cellulaire avec SVF.

D'autres études ont été effectuées pour remplacer le SVF des milieux de culture par des substances bien définies, mais dans un milieu de culture contenant déjà des substances non-définies. Ainsi, Kitamura, Imai et Grace (1973) ont remplacé le SVF par 1% d'albumine sérique de boeuf dans un milieu de culture contenant du LH et du YL et ont adapté deux lignées cellulaires de moustique à ce nouveau milieu. Ils ont reporté que ces deux lignées cellulaires ont eu un taux de croissance élevé pendant plus de six mois. De plus, Goodwin et Adams (1978) ont démontré l'importance de rajouter du glycérol dans leur milieu de culture semi-défini sans SVF pour stimuler la croissance des cellules de *Lymantria dispar*.

Finalement, il a été démontré par plusieurs études que les suppléments lipidiques sont très importants et peuvent remplacer le SVF pour stimuler la croissance cellulaire et stabiliser la réplication virale dans des milieux de culture semi-définis. En effet, Goodwin et Adams (1980) ont réussi à effectuer 80 passages de la lignée cellulaire de *Lymantria dispar* en absence de SVF en rajoutant une fraction de liposome (cholestérol, L- α -phosphatidylcholine et DL- α -tocophérolacétate). Aussi, Brooks et Tsang (1980) ont remplacé le SVF par des émulsions de cholestérol et de lécithine. Les deux lignées cellulaires d'insectes adaptées à ce milieu ont eu un taux de croissance très élevé pendant plus de deux ans.

Dans le but de produire des protéines recombinantes dans des milieux de culture semi-définis peu coûteux, Maiorella *et al.* (1988) ont remplacé le SVF par du cholestérol, des acides gras méthyl-esters et de l'extrait de levure. En utilisant ce milieu, ils ont réussi à produire des baculovirus recombinants de manière très efficace à partir de cellules Sf9 cultivées en fermenteurs de 21 litres. Ensuite, Hink (1991) a réussi à remplacer le SVF par un supplément lipidique, contenant plusieurs lipides mais peu de protéines, pour la production de protéines recombinantes par des cellules Sf9 infectées par des VPN recombinants. Ici, la croissance cellulaire était même plus rapide et la production de protéines recombinantes plus élevée que dans un milieu contenant du SVF.

Finalement, Goodwin (1990) a confirmé que plusieurs suppléments lipidiques peuvent stimuler la croissance de lignées cellulaires d'insectes et la répllication virale en absence de SVF. Ces suppléments peuvent être des stérols, des phospholipides polyinsaturés ou des acides gras insaturés. Étant donné qu'une concentration élevée de ces lipides est toxique pour les cellules, il est préférable de les ajouter à l'intérieur de peptoliposomes ou sous forme de peptolipides ou de protéolipides (Goodwin, 1991).

1.2.3.2.1. Milieux semi-définis MM-SF (milieu Mitsuhashi-Maramorosch sans sérum)

Tous les travaux décrits ci-dessus ont permis de réduire considérablement le coût de préparation des milieux de culture, en plus de réduire tous les désavantages reliés à l'utilisation du SVF. Par contre, parmi tous ces milieux de culture développés, aucun ne semble aussi simple à préparer et aussi peu dispendieux que le milieu de culture MM-SF (milieu Mitsuhashi-Maramorosch sans sérum) (Mitsuhashi, 1982; Mitsuhashi et Goodwin, 1989). En effet, en plus de ne pas contenir de SVF, ce milieu ne nécessite aucun supplément lipidique pour stimuler la croissance cellulaire. Ce milieu semi-défini a été développé à partir du milieu MM de Mitsuhashi et Maramorosch, d'où le SVF a été enlevé (Mitsuhashi, 1982).

D'autres simplifications ont été effectuées à ce milieu en remplaçant les mélanges de sels organiques par de l'eau de mer diluée et le glucose par du sucre de table. Ce milieu très

simple et autoclavable, nommé milieu MTCM-1601, peut supporter la croissance d'au moins 10 lignées cellulaires de lépidoptères (Mitsuhashi, 1989).

Koike et Sato (1988) ont également modifié le milieu MM-SF en omettant les sels carbonate de sodium hydrogène et phosphate de sodium dihydrogène. Les nouveaux milieux autoclavables, nommés no. 8, no. 10 et no. 15, supportent la croissance de 9 lignées cellulaires de lépidoptères cultivées en monocouches ou en suspension dans des fermenteurs de 500 mL et de 40 litres. La composition finale du milieu MM-SF no. 8 (ou milieu MM8-SF) est la plus simple possible. Ce milieu contient des sels inorganiques, qui contribuent à maintenir une bonne balance ionique et une bonne pression osmotique pour les cellules, des sucres, l'agent épaississant pluronique F-68 et des hydrolysats de protéines non-définis, soit le yeastolate et l'hydrolysat de lactalbumine, qui fournissent des vitamines, des protéines, des peptides et des acides aminés (Agathos, 1991; Koike et Sato, 1988). À noter qu'en plus de ne pas contenir de SVF, ce milieu ne nécessite aucun supplément de lipides et de protéines.

La lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda* clone 9 (Sf9) a été isolée à partir de la lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21 (Vaughn *et al.*, 1977) et est cultivée dans un milieu contenant 10% de SVF. Dans notre laboratoire, cette lignée cellulaire a été adaptée au milieu de culture MM8-SF sans SVF (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Les cellules adaptées, nommées Sf9 MM8-SF, s'y multiplient très bien. La réplication de VPC (virus des polyédroses cytoplasmiques) dans ces cellules n'est pas affectée. Cependant, il a été démontré que l'ajout d'une faible concentration de 20 µg/mL de cholestérol lors de l'infection virale est nécessaire pour permettre la réplication de VPN (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Cette concentration de cholestérol n'est pas toxique pour les cellules. De plus, même après plus de 500 passages cellulaires en monocouches dans des flacons ou en suspension dans des fermenteurs de 100 mL, la production de virus extracellulaires (VEC) et de polyèdres de VPN est encore aussi élevée que dans un système cellulaire contenant 10% de SVF.

1.3. Stabilité virale en fonction des passages viraux

Un des objectifs de notre laboratoire est de produire massivement des bioinsecticides ou des protéines recombinantes dans des fermenteurs de grands volumes en utilisant notre système cellulaire en absence de SVF. Par contre, avant de passer à cette étape, il est nécessaire de vérifier la stabilité de production virale en fonction des passages de virus. En effet, plusieurs passages viraux successifs doivent être effectués pour produire des VPN à grande échelle. Donc, un système cellulaire qui offre une stabilité virale sur le plus grand nombre de passages viraux successifs est le plus intéressant pour la production massive de VPN en bioréacteurs industriels. Selon Chakraborty et Reid (1999), cette stabilité virale devrait être d'au moins 8 à 10 passages de virus.

1.3.1. Mutations des VPN en culture cellulaire

Un des grands problèmes en culture cellulaire est que les VPN sont très susceptibles aux mutations. En effet, Lee et Krell (1992) ont observé qu'en effectuant des passages en série de AcMVPN sur la lignée cellulaire Sf9 en présence de 10% de SVF, plusieurs mutations apparaissaient. En fait, pendant leur projet, il s'est tellement produit de mutations qu'après 65 passages en série, la majorité des populations virales analysées avaient une longueur de génome équivalente à 40% du génome du virus au passage 1. Il ont démontré que ce phénomène était dû à des délétions d'ADN survenant pendant les passages viraux.

Même si le taux de mutations est très élevé lors de passages en série de VPN, plusieurs mutations n'affectent pas la virulence *in vitro* des virus produits. En effet, Burand et Summers (1982) ont isolé plusieurs AcMVPN passés en série 30 fois sur les cellules TN-368. À l'aide d'enzymes de restriction, ils ont observé que dans la plupart des populations virales isolées, le génome contenait une insertion d'ADN viral dans la région entre les positions 14 et 28% du génome viral. Pourtant, ces virus étaient encore virulents en culture cellulaire et lorsqu'ingérés par des larves.

Par contre, il suffit d'une seule mutation dans un gène essentiel au virus pour que la virulence soit modifiée. Si cette mutation est nuisible à la réplication virale, les

populations virales mutées disparaîtront en fonction des passages. Cependant, si cette mutation est avantageuse pour le virus, ces virus mutés prendront le dessus sur les autres populations virales non mutées et auront tendance à s'accumuler en fonction des passages. Le meilleur exemple pour illustrer ceci est une étude effectuée par Kumar et Miller (1987). En observant le génome de populations de AcMVPN pendant 10 passages successifs sur les cellules TN-368, ils ont réalisé que les populations virales présentant des délétions d'ADN dans les régions 7,6 à 13,1% ou 14,4 à 17,9% du génome ou des insertions d'ADN dans la région 33,6 à 37,2% du génome devenaient prédominantes après 10 passages viraux. Ceci démontre que ces mutations ont procuré un avantage de croissance au virus. Par contre, des insertions d'ADN dans d'autres régions du génome viral pendant les passages viraux ne causaient pas d'accumulation de ces virus mutés après 10 passages viraux, démontrant que ces mutations n'avantageaient pas la réplication du virus muté.

La plupart des mutations favorables à la croissance virale en culture cellulaire produisent des mutants FP (Few Polyhedra), c'est-à-dire des mutants qui produisent moins de 10 polyèdres par cellule infectée, contrairement aux virus sauvages MP (multiple polyhedra) qui produisent plus de 30 polyèdres par cellule infectée (Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976). Ces différences sont facilement observables par la technique de plages. En effet, les mutants FP forment des plages (foyers de cellules) dans lesquelles se trouvent un mélange de cellules ne contenant pas de polyèdres et de cellules contenant moins de 10 polyèdres, alors que les virus MP forment des plages à l'intérieur desquelles se trouvent seulement des cellules présentant plusieurs polyèdres (Hink et Vail, 1973). De plus, ces mutants produisent des polyèdres ne contenant pas de virions ou à l'intérieur desquels se trouvent peu de virions courts (Knudson et Harrap, 1976). Les polyèdres de mutants FP sont peu virulents envers la larve et les virus extracellulaires (VEC) de ces mutants sont produits en grande quantité (Fraser et Hink, 1982). Habituellement, l'apparition de mutants FP lors de passages en série de VPN en culture cellulaire mène à la sélection de ces mutants aux dépens des virus sauvages MP, car les mutants FP produisent plus de VEC et se propagent donc plus rapidement (Fraser et Hink, 1982). Plusieurs régions du

génomique des VPN peuvent subir des mutations générant des mutants FP, mais seulement quelques-unes ont été caractérisées pour le moment.

La première région rapportée se situe entre les positions 86,4 et 86,6% du génome de AcMVPN. En effet, dans une étude effectuée par Miller et Miller (1982), le génome de mutants FP isolés après 25 passages viraux en culture cellulaire de TN-368 contenait entre autres une insertion d'un élément transposable d'origine cellulaire dans cette région.

Une autre région susceptible aux mutations est le gène de la polyédrine. Les mutants FP générés se nomment M5 (ou PFM-C) (Brown *et al.*, 1980). En culture cellulaire, les mutants M5 produisent seulement 1 gros polyèdre cubique de 10 à 15 µm de diamètre par cellule infectée, alors qu'un VPN sauvage produit au moins 30 polyèdres de 1 à 15 µm de diamètre par cellule infectée. Les polyèdres des mutants M5 ne contiennent pas ou contiennent très peu de virions. De plus, ces polyèdres démontrent une virulence très faible lorsqu'ingérés par des larves (Brown *et al.*, 1980). Hirumi, Hirumi et McIntosh (1975) ont démontré que ce type de mutant peut être sélectionné lors de passages en série de TnMVPN sur la lignée cellulaire TN-368. Les modifications de morphologie entre un virus muté M5 et un virus sauvage semblent être dues à une mutation ponctuelle qui substitue une leucine par une proline dans la polyédrine (Carstens, Krebs et Gallerneault, 1986). Cette substitution semble provoquer un mauvais repliement de la polyédrine et change donc complètement la structure de cette protéine.

Finalement, la région la plus étudiée du point de vue des mutations est sans contredit à l'intérieur du gène FP25K. Des mutations dans cette région semblent apparaître très fréquemment lors de passages en série de VPN en culture cellulaire, sans doute parce que le gène FP25K contient des points chauds, c'est-à-dire des régions très susceptibles aux mutations (Harrison et Summers, 1995a). Ces mutations provoquent l'apparition de mutants FP.

Plusieurs études ont démontré la présence de différents types de mutations dans le gène FP25K des VPN, soit la région entre les positions 37,7 et 38,8% du génome. Fraser,

Smith et Summers (1983) ont démontré que plusieurs mutants FP de GmMVPN et d'AcMVPN produisant peu de polyèdres par cellule contenaient des insertions d'ADN dans le gène FP25K. Ces insertions étaient composées d'ADN du génome cellulaire (Fraser *et al.*, 1985). Cette équipe de recherche a également observé que ces mutants n'exprimaient plus une protéine de 25 kDa, nommée protéine FP25K. Cette protéine n'est pas la protéine de capsid p25, même si elles ont le même poids moléculaire, car la p25 de capsid est toujours présente chez les mutants FP (Goh, 1993). De plus, elle est différente de la protéine VI-E25 (Braunagel *et al.*, 1999). La protéine FP25K est donc une nouvelle protéine très peu connue (Harrison et Summers, 1995a).

Des résultats semblables ont été observés par Beames et Summers (1988, 1989) en utilisant la lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda*. Cependant, dans cette étude, les mutants FP contenaient soit des insertions de séquences d'ADN cellulaire ou soit des délétions d'ADN viral plus ou moins longues à l'intérieur du gène FP25K. Ils ont aussi démontré que ces mutations altéraient la transcription du gène de FP25K, empêchant ainsi l'expression de la protéine de 25 kDa. Les mutations dans le gène FP25K d'AcMVPN et de GmMVPN sont très souvent de ce type (Bischoff et Slavicek; 1997). Par contre, d'autres types de mutations dans le gène FP25K ont été observés par Bischoff et Slavicek (1997) chez des mutants FP de VPN de *Lymantria dispar*. En effet, les insertions et délétions observées étaient très courtes, soit de l'ordre de quelques paires de bases. Ce type de mutation est plus rare dans le gène FP25K de GmMVPN et d'AcMVPN.

Ce qui est étonnant, c'est que la mutation d'un seul gène des VPN, soit le gène FP25K, peut générer des virus ayant toutes les caractéristiques des mutants FP. En effet, Harrison et Summers (1995b) ont démontré que des AcMVPN mutés seulement dans le gène FP25K produisaient peu de polyèdres, peu de virions par polyèdre, des polyèdres peu virulents *in vivo* et beaucoup de virus extracellulaires. La protéine de 25 kDa codée par le gène FP25K, nommée protéine FP25K, semble donc très importante pour que les VPN demeurent des virus sauvages MP. C'est pourquoi des équipes de recherche ont récemment tenté de mieux caractériser cette protéine et de déterminer ses rôles.

La FP25K est une protéine située dans la nucléocapside des virus extracellulaires (VEC) et des virus inclus (VI) (Braunagel *et al.*, 1999). En immunobuvardage de type Western avec des anticorps dirigés contre la FP25K, deux bandes de protéines sont révélées dans des échantillons de VPN sauvages non-mutés, l'une à 25 kDa et l'autre à 23 kDa (Braunagel *et al.*, 1999). Ceci indique que 2 formes de la protéine FP25K sont présentes lors de l'infection virale. Selon cette équipe de recherche, les fonctions de la protéine de 23 kDa sont probablement distinctes de celles de la protéine de 25 kDa, étant donné que la protéine de 23 kDa n'interagit pas avec les mêmes protéines que la FP25K. De plus, la protéine de 23 kDa est exprimée dans une phase plus tardive de l'infection virale que la FP25K. Les travaux effectués par Braunagel *et al.* suggèrent que l'expression de la protéine de 23 kDa proviendrait du gène de la FP25K, mais à partir d'un site de traduction interne. Donc, des mutants FP ne pouvant pas transcrire le gène FP25K ne peuvent exprimer ni la protéine de 25 kDa, ni celle de 23 kDa.

De plus, des virus mutés dans le gène FP25K expriment moins de polyédrine que des virus sauvages et le transport de cette polyédrine vers le noyau est également moins efficace (Jarvis, Bohlmeyer et Garcia Jr., 1992). En effet, la protéine FP25K est importante pour maintenir un niveau optimal de transcription du gène de la polyédrine, car des virus mutés dans le gène FP25K ont un taux de transcription du gène de la polyédrine réduit par rapport aux virus sauvages (Harrison, Jarvis et Summers, 1996). Par contre, il n'y a pas de réduction de la transcription de la p10 chez ces mutants FP, démontrant que la protéine FP25K ne stimule pas la transcription de tous les gènes exprimés tardivement lors de l'infection virale (Harrison, Jarvis et Summers, 1996). La diminution de l'expression de la polyédrine chez les mutants FP pourrait expliquer la faible quantité de polyèdres produits par ces mutants.

De plus, selon Braunagel *et al.* (1999), l'expression de certaines protéines présentes dans les virions, comme la p39 et la gp64, est augmentée chez des virus mutés dans le gène FP25K. De plus, les protéines FP25K, en interagissant avec plusieurs protéines, semblent être importantes pour transporter vers le noyau certaines protéines virales nécessaires à la maturation et à l'enveloppement des VI, comme les protéines VI-E66 et VI-E25

(Braunagel *et al.*, 1999; Hong, Summers et Braunagel, 1997). Comme cet enveloppement est nécessaire à l'inclusion des virions dans les polyèdres (Robertson, Harrap et Longworth, 1974; Fraser et Hink, 1982; Harrison et Summers, 1995b), ce phénomène pourrait expliquer en partie la diminution du nombre de VI à l'intérieur des polyèdres des mutants FP.

1.3.2. Études de stabilité virale

Plusieurs études de stabilité de VPN en fonction des passages viraux ont été effectuées dans le but de tester des systèmes cellulaires contenant de 8 à 10% de SVF. Tous ces travaux ont démontré l'apparition de mutants FP après quelques passages viraux en culture cellulaire avec un inoculum de départ de VPN sauvages MP. Hink et Strauss (1976) ont observé qu'après seulement 4 passages d'*Autographa californica* MVPN (AcMVPN) sur les cellules d'insectes de *Trichoplusia ni* TN-368, les mutants FP étaient dominants. D'autres études ont rapporté le même phénomène, mais après 10 à 15 passages de *Trichoplusia ni* MVPN (TnMVPN) sur les cellules TN-368 (MacKinnon *et al.*, 1974; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976). Fraser et Hink (1982) ont observé que des passages successifs de *Galleria mellonella* MVPN (GmMVPN) sur les cellules TN-368 généraient une majorité de mutants FP après 5 passages viraux. De plus, Slavicek *et al.* (1996) ont démontré que 95% des virus produits étaient des mutants FP après 5 passages de *Lymantria dispar* MVPN (LdMVPN) sur les cellules Ld652Y de l'insecte *Lymantria dispar*. Finalement, Chakraborty et Reid (1999) ont observé que les mutants FP étaient dominants à partir du passage 7 de *Helicoverpa armigera* SVPN (HaSVPN) en culture de cellules HZ-AM1 de l'insecte *Helicoverpa zea*. Donc, la stabilité de VPN en culture cellulaire contenant de 8 à 10% de SVF semble durer en moyenne 10 passages viraux, mais dépend du système virus/cellules utilisé.

Dû à l'apparition de mutants FP, les phénomènes suivants ont été observés en fonction des passages viraux. Le nombre de polyèdres par cellule infectée est passé d'une valeur de plus de 30 à une valeur de moins de 10 (MacKinnon *et al.*, 1974; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Hink et Strauss, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976; Fraser et Hink, 1982; Slavicek *et al.*, 1996; Chakraborty et Reid, 1999). De plus, le nombre de polyèdres

produits par millilitre de milieu de culture a diminué d'un facteur de 10 (Hink et Strauss, 1976). Ensuite, le pourcentage de cellules infectées a diminué significativement, passant de plus de 80% à moins de 50% après 5 passages viraux (Slavicek *et al.*, 1996).

En technique de plages, les VPN des premiers passages formaient des plages denses constituées de foyers de cellules contenant plus de 30 polyèdres, alors que les VPN des passages plus élevés formaient des plages habituellement plus grandes et moins denses constituées de cellules dans lesquelles se trouvent peu ou pas de polyèdres (Faulkner, Brown et Potter, 1976; Hink et Strauss, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976; Fraser et Hink, 1982; Slavicek *et al.*, 1996; Chakraborty et Reid, 1999).

En microscopie électronique, plusieurs virions étaient présents à l'intérieur des polyèdres de VPN des premiers passages, alors que les polyèdres des passages viraux plus élevés contenaient peu ou ne contenaient pas de virions (MacKinnon *et al.*, 1974; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976; Fraser et Hink, 1982; Slavicek *et al.*, 1996; Chakraborty et Reid, 1999). De plus, les virions présents à l'intérieur des polyèdres de VPN de passages élevés étaient souvent plus courts (MacKinnon *et al.*, 1974; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976). Ensuite, après plusieurs passages viraux, MacKinnon *et al.* (1974) ont observé que des noyaux de cellules infectées contenaient des virions, mais aucun polyèdre. De plus, très peu de membrane virale synthétisée *de novo* était présente dans le noyau des cellules infectées par des VPN de passages élevés (Fraser et Hink, 1982).

Ensuite, dans la plupart des études, de 5 à 100 fois plus de virus extracellulaires (VEC) étaient produits lors des passages viraux plus élevés (Fraser et Hink, 1982; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976; Slavicek *et al.*, 1996). Cependant, dans une des études, la quantité de VEC a augmenté de 5 fois pendant la sélection des mutants FP, mais a diminué par la suite, pour revenir à une valeur inférieure à la valeur initiale (Chakraborty et Reid, 1999).

De plus, la virulence *in vivo* des polyèdres était 8, 38 ou 350 fois moins élevée (Chakraborty et Reid, 1999; Hink et Strauss, 1976; Fraser et Hink, 1982, respectivement) ou même nulle (MacKinnon *et al.*, 1974; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976) après plusieurs passages viraux, déterminé par la dose de polyèdres causant la mort de 50% des larves (DL₅₀).

Finalement, après plusieurs passages de GmMVPN, Fraser et Hink (1982) ont observé en électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide que les VEC ne contenaient plus des protéines de 143 kDa et de 25 kDa, mais contenaient des protéines de 91,5 kDa et de 33 kDa qui n'étaient pas présentes au début des passages viraux.

À notre connaissance, aucune étude complète de stabilité virale en fonction des passages de VPN n'a été effectuée dans un système cellulaire en absence de SVF. Pourtant, cet aspect est très important en vue de diminuer les coûts de production et d'améliorer la qualité de production à grande échelle de bioinsecticides.

De plus, plusieurs études ont clairement démontré la possibilité de produire des protéines recombinantes à l'aide de VPN recombinants dans un système cellulaire sans SVF de grand volume. Par exemple, dans des fermenteurs de 100 mL ou dans des systèmes de cultures de 6 à 36 litres avec injection d'air, Maiorella *et al.* (1988) ont obtenu une production du facteur de croissance M-CSF aussi efficace dans un système cellulaire en absence de SVF que dans un système cellulaire en présence de 10% de SVF, en utilisant un AcMVPN recombinant exprimant la M-CSF. De plus, en utilisant un AcMVPN recombinant exprimant la β -galactosidase pour infecter des cellules à l'intérieur d'un bioréacteur de 300 mL, Kompier *et al.* (1991) ont réussi à produire autant de protéines recombinantes β -galactosidase dans un système cellulaire sans SVF que dans un système cellulaire contenant 10% de SVF. Cependant, à notre connaissance, aucune étude complète n'a été effectuée concernant l'effet de passages en série de VPN recombinants sur la production de protéines recombinantes dans un système cellulaire sans SVF. Pourtant, il est très important de vérifier cet aspect avant de produire massivement des protéines recombinantes en fermenteurs industriels.

C'est pourquoi il était nécessaire d'investiguer l'effet de passages de VPN sur la stabilité de production de bioinsecticides et de protéines recombinantes dans un système cellulaire en absence de SVF.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1. Étapes techniques

2.1.1. Culture cellulaire d'insectes

2.1.1.1. Lignées cellulaires

Lors de ce projet, deux lignées cellulaires ont été utilisées. La première était la lignée Sf9, c'est-à-dire le clone numéro 9 isolé de la lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21 (Vaughn *et al.*, 1977). Les cellules Sf9 ont été cultivées dans le milieu Grace supplémenté de 10% de SVF (Grace, 1962) (annexe II).

La deuxième lignée cellulaire était la lignée Sf9 MM8-SF, cultivée dans le milieu Mitsunashi-Maramorosch sans sérum (milieu MM-SF) (Mitsunashi, 1982) simplifié par Koike et Sato (1988) (milieu MM-SF no. 8 ou MM8-SF) (annexe I). Les cellules Sf9 MM8-SF sont les cellules Sf9 adaptées au milieu de culture MM8-SF par notre laboratoire (Belloncik, Akoury et Cheroutre, 1997). Ce milieu de culture est très simple, ne contient aucun supplément de lipides et ne contient pas de sérum de veau foetal (SVF). Les cellules Sf9 MM8-SF représentent un bon modèle pour réaliser ce projet, car en plus de croître en absence de SVF, elles supportent aussi bien la réplication des VPN et des VPC que les cellules Sf9. Ce sont donc les cellules Sf9 MM8-SF qui ont été utilisées lors de l'étude de stabilité virale en fonction des passages de GmMVPN et du virus recombinant AcLuci.

2.1.1.2. Maintien des lignées cellulaires

Les deux lignées cellulaires ont été maintenues dans leur milieu de culture respectif, préalablement ajusté à un pH de 6.18, à l'intérieur de flacons de 25 cm² (F25) de Corning ou de fermenteurs de 100 mL de Bellco Glass. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées dans leur milieu de culture respectif à une densité de 2 X 10⁵ cellules vivantes par mL, à raison de 5 mL par F25 et de 100 mL par fermenteur. Elles ont ensuite été incubées à 28°C. Dans les fermenteurs, les cellules ont été maintenues en suspension grâce à une barre magnétique suspendue tournant dans le milieu de culture lorsque mise

sur un agitateur magnétique (Bellco Biotechnology) réglé à 75 RPM (rotations par minute), alors que les cellules en F25 se sont multipliées en monocouche. Après sept jours d'incubation, les cellules ont été transférées dans du nouveau milieu de culture dans les mêmes conditions que ci-dessus. Les deux lignées cellulaires ont été maintenues de cette manière pendant toute la durée de ce projet.

2.1.1.3. Décomptes cellulaires

En F25, les cellules ont été décollées à l'aide d'un grattoir à cellules et 0,4 mL de suspension cellulaire a été prélevé. En fermenteur, un volume de 2,4 mL de suspension cellulaire a été directement prélevé et 0,4 mL de cet échantillon a été utilisé. Chaque échantillon de 0,4 mL a été mélangé à 0,1 mL de colorant Trypan Bleu 0,4% (Gibco BRL, #15250-061), étalé sur un hémacytomètre et observé au microscope optique. Les cellules vivantes et mortes présentes dans le grand carré du centre de chacune des deux chambres de l'hémacytomètre ont été comptées, les cellules mortes étant colorées en bleu. Tous les décomptes cellulaires de ce projet ont été effectués en triplicata et une différence maximale de 10% entre les décomptes d'un même échantillon a été exigée pour accepter le décompte. Le nombre de cellules vivantes ou mortes par millilitre de milieu de culture a été calculé en utilisant la formule :

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

2.1.2. Passages de GmMVPN et d'AcLuci

2.1.2.1. Préparation des inoculums viraux

Deux virus ont été préparés et ont servi d'inoculums lors de l'étude de stabilité virale en fonction des passages viraux. Le premier est le virus recombinant AcLuci et le second est le virus sauvage GmMVPN.

2.1.2.1.1. Virus recombinant AcLuci

Le virus recombinant AcLuci nous a été gracieusement fourni par le Dr. Hajime Mori de l'Institut de Technologie de Kyoto au Japon. Ce virus est un hybride d'AcMVPN et de BmMVPN sauvages, mais dont une partie du gène de la polyédrine a été remplacée par le cadre de lecture ouvert (CLO) du gène de la luciférase de luciole (Mori *et al.*, 1992).

L'expression de cette luciférase est donc sous le contrôle du promoteur fort de la polyédrine. Ce virus n'exprime pas la polyédrine et ne peut par conséquent pas former de polyèdres. Un passage de ce virus a été effectué sur des cellules Sf9 MM8-SF en F25 et les virus extracellulaires (VEC) relâchés dans le surnageant après répliation virale ont été utilisés comme inoculum pour ce projet. Le titre viral a été déterminé par la technique de dilutions limites décrite plus bas (section 2.1.2.4).

2.1.2.1.2. Virus sauvage GmMVPN

Le virus sauvage GmMVPN utilisé comme inoculum de départ lors de ce projet a préalablement été passé 2 fois dans des larves de *Galleria mellonella*. Pour ce faire, des polyèdres de GmMVPN, récoltés à partir de larves de *Galleria mellonella* en phase virémique, ont été ajoutés à la diète artificielle (annexe III) de larves de *Galleria mellonella* et des larves y ont été ajoutées. Après 7 jours d'incubation à 28°C, une goutte d'hémolymphe par larve en phase virémique a été prélevée en piquant la larve à l'aide d'une aiguille stérile. Chaque goutte a été transférée sur des cellules Sf9 MM8-SF à 2×10^5 cellules/mL et les VEC de GmMVPN relâchés dans le surnageant après 7 jours d'infection ont constitué l'inoculum de départ pour ce projet. Ce surnageant a été titré par la technique de dilutions limites décrite plus bas (section 2.1.2.4).

2.1.2.2. Infections virales

Lors de chaque passage viral, des cellules Sf9 MM8-SF ont dû être cultivées dans le milieu MM8-SF. Des fermenteurs de 100 mL de Bellco Glass ont été utilisés lors des passages 1 à 16 de GmMVPN et 1 à 13 d'AcLuci. Deux fermenteurs de cellules ont été nécessaires par passage de virus, l'un servant de témoin non-infecté et l'autre destiné à être infecté. Cependant, trois fermenteurs de cellules ont été infectés lors des passages 1, 5, 10 et 15 de GmMVPN, car la production d'une grande quantité de polyèdres était nécessaire dans le but d'effectuer des épreuves biologiques. Lors des passages 17 à 20 de GmMVPN et 14 à 18 d'AcLuci, ce sont des flacons de 25 cm² (F25) de Corning qui ont été utilisés. Les conditions de culture étaient les mêmes que celles décrites à la section 2.1.1.2.

Au début de la phase logarithmique de croissance des cellules, soit après trois jours d'incubation à 28°C, les cellules Sf9 MM8-SF présentes dans les fermenteurs ou les F25 ont été infectées par GmMVPN ou AcLuci.

Dans le but d'infecter les cellules Sf9 MM8-SF en fermenteur de 100 mL, 3 échantillons de 2,4 mL de cellules ont été prélevés par fermenteur et 0,4 mL de chacun de ces 2,4 mL a été utilisé pour un décompte de cellules vivantes à l'hémacytomètre, comme décrit précédemment. La concentration de cellules vivantes dans chaque fermenteur a ainsi été déterminée. Par la suite, les suspensions de virus extracellulaires de GmMVPN ou d'AcLuci, dont le titre viral était connu, ont été diluées dans 11 mL de milieu MM8-SF. Dix mL de ces dilutions de suspensions virales ont été ajoutés par fermenteur contenant les cellules Sf9 MM8-SF. La multiplicité d'infection (MI) utilisée a été de 0,1, ce qui signifie que l'infection virale a été effectuée dans un rapport d'un ufp (unité virale formant des plages) pour 10 cellules vivantes. Du cholestérol (annexe I) a été ajouté pour donner une concentration finale de 20µg/mL. Dans le cas du fermenteur témoin, 10 mL de milieu MM8-SF sans virus ont été ajoutés. Les fermenteurs ont ensuite été incubés 7 jours à 28°C sur une plaque agitatrice magnétique.

Pour infecter les cellules Sf9 MM8-SF en F25, les cellules ont été décollées de 3 F25 à l'aide d'un grattoir à cellules et 0,4 mL a été prélevé de chaque F25 pour effectuer un décompte de cellules vivantes à l'hémacytomètre. Les suspensions virales ont ici été diluées dans 1,1 mL de milieu MM8-SF. Ensuite, 1 mL de dilution de suspension virale a été ajouté à chaque F25 contenant 4 mL de cellules Sf9 MM8-SF, pour atteindre une MI de 0,1. Du cholestérol (annexe I) a été ajouté pour donner une concentration finale de 20µg/mL. Dans le cas des F25 témoins, 1 mL de milieu MM8-SF sans virus a été ajouté. Les F25 ont ensuite été incubés 7 jours à 28°C.

2.1.2.3. Prélèvements viraux

Après 7 jours d'infection, des prélèvements de cellules infectées par AcLuci et de cellules non-infectées ont été effectués. Dans le but de mesurer l'activité luciférase à chaque passage d'AcLuci, 3 échantillons de 30 mL par fermenteur infecté et 1 échantillon de 30

mL par fermenteur témoin non-infecté ont été prélevés. Dans le cas des F25, le contenu de 3 F25 infectés et de 1 F25 témoin non-infecté ont été prélevés. De plus, dans le but d'effectuer des décomptes de cellules vivantes et de cellules mortes à l'hémacytomètre à chaque passage viral, 3 échantillons de 2,4 mL de chaque fermenteur infecté et de chaque fermenteur témoin non-infecté ont été prélevés. En F25, c'est un échantillon de 0,4 mL par F25 qui a été prélevé dans 3 F25 infectés et dans 3 F25 témoins non-infectés.

Également après 7 jours d'infection, des échantillons de cellules infectées par GmMVPN et de cellules non-infectées ont été prélevés. Premièrement, dans le but d'effectuer des décomptes de polyèdres et des décomptes de cellules infectées et non-infectées à chaque passage viral, 3 échantillons de 2,4 mL de chaque fermenteur infecté et de chaque fermenteur témoin non-infecté ont été prélevés. Lors de prélèvements en F25, c'est 1 échantillon de 2,4 mL par F25 qui a été prélevé dans 3 F25 infectés et dans 3 F25 témoins non-infectés. Ensuite, afin d'observer en microscopie électronique des cellules Sf9 MM8-SF infectées par les GmMVPN de passages 2, 7, 12, 17 et 20, des prélèvements de 5 mL par fermenteur infecté ou par F25 infecté ont été effectués lors de ces passages viraux. Finalement, dans l'objectif d'utiliser les polyèdres de GmMVPN passages 1, 5, 10 et 15 dans des épreuves biologiques, 90 mL ont été prélevés dans chacun des 3 fermenteurs infectés lors de ces passages de virus.

Le contenu restant de chaque fermenteur ou de chaque F25 de cellules Sf9 MM8-SF infectées par GmMVPN ou par AcLuci a été centrifugé 10 minutes à 1500 RPM (environ 600 g) dans une centrifugeuse réfrigérée (modèle PR-2, IEC International Centrifuge). Le surnageant contenant les virus extracellulaires a été prélevé en vue d'effectuer un titrage viral et a ensuite été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation lors d'infections virales ultérieures. Les culots de cellules infectées par GmMVPN ont été conservés à -20°C dans du milieu MM8-SF en vue d'utiliser ces cellules lors des techniques d'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide et d'immunobuvardage de type Western.

2.1.2.4. Titrage viral

Les surnageants de culture contenant les virus extracellulaires (VEC) de chaque passage viral ont été titrés selon la technique de dilution limite décrite par Reed et Muench (1938) et adaptée par Summers et Smith (1987). Les surnageants à l'intérieur desquels se trouvent les GmMVPN ont été titrés sur les cellules Sf9 MM8-SF. Par contre, étant donné que le virus recombinant AcLuci ne forme pas de polyèdres, les surnageants contenant les virus AcLuci ont été titrés sur les cellules Sf9, car l'effet cytopathique causé par ce recombinant est plus facilement visible sur les cellules Sf9.

La dose infectieuse en culture de tissus causant 50% d'infection ($DICT_{50}/mL$) a été déterminée. Pour ce faire, les dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-11} des suspensions de VEC ont été effectuées en 3 répétitions dans du milieu Grace contenant 10% de SVF ou dans du milieu MM8-SF, selon la lignée cellulaire utilisée. Pour chaque dilution de suspension virale de chaque répétition, 25 μ l ont été ajoutés à 4 puits d'une plaque à 96 puits (Costar, Corning) contenant chacun $1,25 \times 10^4$ cellules dans leurs milieux respectifs. Dans le cas du titrage viral avec les cellules Sf9 MM8-SF, 20 μ g/mL de cholestérol (annexe I) ont été ajoutés. Après 7 jours d'incubation à 28°C, tous les puits ont été observés. Les puits présentant au moins une cellule contenant des polyèdres de GmMVPN ont été considérés positifs. Cependant, dans le cas du titrage d'AcLuci, ce sont les puits à l'intérieur desquels se trouvaient au moins un foyer de cellules présentant des effets cytopathiques qui ont été considérés positifs. La valeur de la $DICT_{50}/mL$ a été évaluée par la méthode de Karber (Karber, 1931) et la concentration en unités virales formant des plages (ufp/mL) a été déterminée en multipliant la valeur de la $DICT_{50}/mL$ obtenue par un facteur de 0,7.

2.1.2.5. Nombre de passages viraux effectués

Le titre viral obtenu a permis d'effectuer un autre passage de virus à MI de 0,1 sur les cellules Sf9 MM8-SF en absence de SVF. Tous les passages viraux ont été effectués de cette manière, jusqu'au passage 20 de GmMVPN et jusqu'au passage 18 d'AcLuci.

2.1.3. Production d'antisérums contre le GmMVPN

2.1.3.1. Préparation du premier antigène : polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo*

Cet antigène a été produit dans des larves de *Galleria mellonella*. Pour ce faire, des polyèdres de GmMVPN sauvages MP ont été ajoutés à la diète artificielle (annexe III) de larves de *Galleria mellonella* et plusieurs larves y ont été ajoutées par la suite. Après incubation de 15 jours à 28°C, les larves infectées contenant des polyèdres ont été broyées à 4°C pendant 5 minutes à l'aide d'un broyeur mécanique réglé à vitesse « 5 » (Sorvall, Dupont Instruments). Le broyat a été filtré sur de la gaze stérile pour enlever les gros débris de larves. Les polyèdres récoltés dans le filtrat ont été centrifugés pendant 10 minutes à position « 6 » (environ 1100 g) d'une centrifugeuse clinique de table (IEC, International Equipment) et ont été lavés 3 fois dans du PBS 1X stérile, pour éliminer les virions dans le surnageant. Les polyèdres isolés ont été comptés à l'hémacytomètre, comme décrit à la section 2.2.1.1., et 4 échantillons de $1,3 \times 10^8$ polyèdres/mL ont ensuite été congelés à -20°C jusqu'à l'immunisation.

Quelques heures avant chaque immunisation, $1,3 \times 10^8$ polyèdres ont été décongelés et ont été dissous pendant 2 heures à température de la pièce dans du tampon carbonate 0,2M (Na_2CO_3 0,2M + NaHCO_3 0,2M) dans un rapport 1 : 1. Ensuite, les polyèdres dissous ont été dilués avec du PBS 1X stérile dans un rapport 1 : 1 et ont été injectés avec ou sans adjuvant à des cobayes selon le plan d'immunisation de la section 2.1.3.3.

2.1.3.2. Préparation du deuxième antigène : mélange de virions et de polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vitro*

Cet antigène a été produit sur la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF. Pour ce faire, 10 F25 contenant chacun 10^6 cellules ont été infectés à MI de 1 par une suspension de virus extracellulaires de GmMVPN passage 2 (virus sauvage MP) en présence de 20µg/mL de cholestérol (annexe I), comme décrit précédemment. Au jour 10 post-infection, toutes les cellules ont été décollées à l'aide d'un grattoir à cellules et ont été traitées aux ultrasons dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 2.2.1.1, pour libérer les polyèdres et les virions. Les échantillons ont ensuite été centrifugés ensemble 10 minutes

à 2000 RPM (environ 600 g) dans une centrifugeuse réfrigérée (modèle PR-2, IEC International Centrifuge) et le surnageant contenant les virions a été congelé à -20°C jusqu'aux immunisations. Le culot de polyèdres a ensuite été lavé 3 fois dans du PBS 1X stérile et les polyèdres ainsi isolés ont été comptés à l'hémacytomètre, comme décrit à la section 2.2.1.1. Quatre échantillons de $1,0 \times 10^8$ polyèdres/mL ont été congelés à -20°C jusqu'aux immunisations.

Quelques heures avant chaque immunisation, $1,0 \times 10^8$ polyèdres ont été décongelés. Comme des polyèdres produits *in vitro* sont plus difficiles à dissoudre que des polyèdres produits *in vivo*, ces polyèdres ont été dissous dans du tampon carbonate 0,5M (Na_2CO_3 0,5M + NaHCO_3 0,5M), au lieu de 0,2M, pendant 2 heures à température de la pièce dans un rapport 1 : 1. Ensuite, les polyèdres dissous ont été dilués dans un rapport 1 : 1 avec la suspension de virions de GmMVPN prélevée ci-dessus. Ce mélange a été injecté à des cobayes, avec ou sans adjuvant, selon le plan d'immunisation de la section 2.1.3.3.

2.1.3.3. Immunisation

Le plan d'immunisation suivi a été le suivant :

- 1) Six cobayes mâles ou femelles ont été immunisés, les trois premiers par l'antigène produit *in vivo* (antigène 1) et les trois autres par l'antigène produit *in vitro* (antigène 2).
- 2) Au jour 0, chaque cobaye a été injecté par voie sous-cutanée avec 1 mL d'échantillon contenant 50% d'adjuvant Freund complet (Miles Laboratories Inc.) ($1,625 \times 10^7$ polyèdres dissous de l'antigène 1 ou $1,25 \times 10^7$ polyèdres dissous de l'antigène 2 par cobaye, selon le cas).
- 3) Au jour 14, l'injection de chaque cobaye a été exécutée par voie sous-cutanée avec 1 mL d'échantillon contenant 50% d'adjuvant Freund incomplet (Miles Laboratories Inc.) (mêmes quantités de polyèdres qu'au jour 0).
- 4) Aux jours 21 et 35, chaque cobaye a été injecté par voie intra-musculaire avec 0,3 mL d'échantillon sans adjuvant ($0,975 \times 10^7$ polyèdres dissous de l'antigène 1 ou $0,75 \times 10^7$ polyèdres dissous de l'antigène 2 par cobaye, selon le cas).

2.1.3.4. Prélèvement et conservation des sérums et des antisérums

Au jour 0, avant la première injection, 2 mL de sang par cobaye anesthésié ont été prélevés derrière l'œil à l'aide d'un tube capillaire et ont été transférés dans un tube à prélèvements sanguins, qui permet de séparer le sérum et le sang coagulé après centrifugation pendant 15 minutes à 1000 RPM (environ 150 g) d'une centrifugeuse réfrigérée (modèle PR-2, IEC International Centrifuge). Les sérums témoins (ou sérums pré-immunisation) ainsi obtenus ont été congelés à -20°C .

De plus, au jour 49, une exsanguination sous anesthésie des six cobayes immunisés a été effectuée et l'antisérum (ou sérum post-immunisation) de chacun des six cobayes a été obtenu et conservé de la même manière que les sérums témoins, comme décrit ci-dessus.

2.1.3.5. Vérification de la qualité des antisérums produits par la technique de double immuno-diffusion

Comme l'objectif de cette partie du projet était seulement d'analyser la présence et la spécificité des anticorps produits par des cobayes immunisés, et non de quantifier ces anticorps, la technique de double-immunodiffusion a été préférée à celle d'ELISA ou d'immunobuvardage de type Western, car elle est plus simple et plus pratique.

Dans des plateaux à 4 puits de 6 centimètres de diamètre (Linbro, Flow Laboratories, #76-237-05), 12 mL d'agarose Seakem ME 1%, préalablement chauffé pendant 15 minutes à 90°C , ont été versés dans chacun des puits. Après durcissement du gel à température de la pièce dans une chambre humide, un trou central et 6 trous périphériques équidistants à 1,5 cm du trou central ont été pratiqués à l'aide de la grosse ouverture d'une pipette Pasteur. Les puits ainsi formés ont été remplis par un antigène, un sérum ou un antisérum, selon le cas (voir sections 2.1.3.5.1 et 2.1.3.5.2 ci-après). À la fin de la même journée, les puits ont été remplis de nouveau par les mêmes échantillons et la diffusion a été effectuée à la température de la pièce pendant 48 heures en chambre humide. Les gels ont ensuite été séchés et colorés au bleu de Coomassie 0,25%, comme décrit dans la section traitant de la coloration des gels de SDS-polyacrylamide (section 2.2.1.4.1.).

Ce sont les bandes de précipitation colorées en bleu apparaissant entre les puits pratiqués dans le gel d'agarose qui ont été analysées. Ces bandes apparaissaient lorsque des anticorps présents dans les antisérums ou les sérums rencontraient des antigènes lors de la diffusion et formaient des complexes anticorps-antigènes qui précipitaient. Donc, la présence d'une bande de précipitation signifiait qu'il y avait présence d'anticorps précipitants dans le sérum ou dans l'antisérum qui reconnaissaient l'antigène testé.

2.1.3.5.1. Présence d'anticorps précipitants dans les antisérums

Pour vérifier si les cobayes immunisés avaient produit des anticorps contre les antigènes injectés, les sérums pré- et post-immunisation de chaque cobaye ont été testés contre ces antigènes par la technique de double immuno-diffusion. Pour ce faire, les sérums pré- et post-immunisation des cobayes #1 à #3, immunisés contre les polyèdres dissous produits *in vivo*, ont été dilués 1/10 dans du PBS 1X et ont été placés dans les puits périphériques de gels d'agarose Seakem ME 1%. Dans les puits centraux, des polyèdres dissous ou non-dissous de GmMVPN produit *in vivo* ont été ajoutés à la même concentration que lorsqu'injectés aux cobayes.

La même procédure a été effectuée pour tester les sérums pré- et post-immunisation des cobayes #4 à #6, immunisés par un mélange de virions et de polyèdres dissous produits *in vitro*, mais les puits centraux ont ici été remplis par un mélange de polyèdres dissous ou non-dissous et de virions de GmMVPN produit *in vitro* sur les cellules Sf9 MM8-SF, à la même concentration que lorsqu'injectés aux cobayes.

Si un antisérum de cobaye produit après immunisation formait un précipité avec l'antigène qui lui avait été injecté, et si le sérum pré-immunisation du même cobaye ne formait aucun précipité avec ce même antigène, nous pouvions affirmer que ce cobaye avait produit des anticorps contre l'antigène injecté.

2.1.3.5.2. Spécificité des anticorps précipitants présents dans les antisérums

Pour vérifier que les antisérums produits par chaque cobaye étaient bien spécifiques au GmMVPN, plusieurs antigènes ont été testés contre l'antisérum de chaque cobaye par la

technique de double immuno-diffusion. Pour ce faire, l'antisérum de chaque cobaye a été dilué 1/10 dans du PBS 1X et a été déposé dans un puits central. Dans les 6 puits périphériques, 6 antigènes différents ont été déposés, à la même concentration que lorsqu'ils ont été injectés aux cobayes. Les 2 premiers étaient les 2 antigènes utilisés pour immuniser les cobayes, soit des polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* et un mélange de polyèdres dissous et de virions de GmMVPN produits *in vitro*. Les 2 autres antigènes étaient les mêmes que les 2 premiers, mais sans dissolution des polyèdres. Enfin, les 2 derniers antigènes étaient des antigènes de cellules Sf9 MM8-SF non infectées (protéines cellulaires) et de broyats de larves de *Galleria mellonella* non infectées (protéines larvaires), préparés exactement dans les mêmes conditions que lors de la préparation des antigènes de GmMVPN injectés aux cobayes (sections 2.1.3.1 et 2.1.3.2).

Si un antisérum de cobaye formait un précipité avec les antigènes viraux, mais non avec les antigènes cellulaires ou larvaires, nous pouvions conclure que ce cobaye avait produit des anticorps spécifiques contre GmMVPN.

2.2. Analyse des effets de passages viraux en culture de cellules Sf9 MM8-SF

2.2.1. Analyse des effets de passages de GmMVPN

2.2.1.1. Pourcentage d'infection et décompte de polyèdres

Avec chacun des 3 échantillons de 2,4 mL de cellules Sf9 MM8-SF prélevés précédemment lors de chaque passage de GmMVPN, 0,4 mL a été utilisé pour effectuer des décomptes cellulaires en triplicata à l'hémacytomètre, comme décrit à la section 2.1.1.3. Les cellules vivantes, vivantes infectées, mortes, mortes infectées et totales ont ainsi été comptées. Les cellules contenant de un à plusieurs polyèdres (structures denses de forme polyédrique) lorsqu'observées au microscope photonique étaient considérées infectées. Les pourcentages d'infection ont ensuite été calculés par la formule :

$$\left(\frac{\text{nb. cellules infectées totales par mL}}{\text{nb. cellules totales par mL}} \right) \times 100$$

Avec les 2 mL restants, une centrifugation a été effectuée pendant 5 minutes à position « 6 » (environ 1100 g) d'une centrifugeuse clinique de table (IEC, International Equipement) et le culot de cellules a été resuspendu dans 2 mL de PBS 1X (Gibco BRL #14190-144). Cette suspension cellulaire a été traitée 2 fois 3 minutes aux ultrasons (Sonic dismembrater 550 de Fisher Scientific) pour libérer les polyèdres. Des décomptes de polyèdres ont par la suite été effectués en triplicata à l'hémacytomètre, sans ajout de Trypan Bleu. Les polyèdres formaient des structures denses directement observables au microscope photonique. Le nombre de polyèdres produits par millilitre de milieu de culture a été calculé en utilisant la formule :

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

Par la suite, le nombre de polyèdres par cellule infectée a été calculé en utilisant la formule :

$$\text{Nombre de polyèdres par mL} / \text{nombre de cellules infectées par mL}$$

2.2.1.2. Microscopie électronique

Avec les échantillons de 5 mL de cellules Sf9 MM8-SF infectées, prélevés précédemment lors des passages 2, 7, 12, 17 ou 20 de GmMVPN, les étapes suivantes ont été réalisées. Les cellules ont été lavées 1 fois dans du PBS 1X et centrifugées 5 minutes à 3000 RPM (environ 800 g) dans une centrifugeuse à microtubes (Biofuge 13 de Baxter Canlab). Les culots cellulaires ont ensuite été traités pendant 1h30 à 4°C dans du tampon de fixation (glutaraldéhyde 2,5% dilué dans du tampon cacodylate 0,1M, pH 7,2) et ont été lavés 3 fois dans du tampon cacodylate contenant 3% de sucrose. Les culots ont ensuite été postfixés pendant 2 heures à 21°C dans un tampon s-collidine contenant 1,33% de tétraoxyde d'osmium (OsO₄) et ont été déshydratés progressivement avec de l'acétone 25%, 50%, 75%, 95% et 100%. Les échantillons ont été imprégnés dans un mélange d'acétone et de résine SPURR pendant toute une nuit et dans de la résine SPURR pure pendant 3 heures. Ils ont ensuite été incubés à 60°C pendant 24 heures pour permettre la polymérisation de la résine. Enfin, les blocs de résine ont été coupés en couches ultrafines à l'aide d'un couteau en diamant. Ces coupes ont été déposées sur une grille en cuivre et

ont été colorées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb. Finalement, elles ont été observées au microscope électronique à transmission Philips 300 (Philips, Hollande).

2.2.1.3. Analyse de la virulence des polyèdres par des épreuves biologiques avec des larves de *Galleria mellonella*

2.2.1.3.1. Élevage de larves de *Galleria mellonella*

Pour débiter l'élevage de larves dans notre laboratoire, des larves de *Galleria mellonella* nous ont été fournies généreusement par le Dr. Guy Charpentier, de l'UQTR à Trois-Rivières. Les larves ainsi obtenues ont été placées dans des contenants d'élevage en plastique d'environ 30 cm de diamètre munis d'un grillage dans le couvercle pour laisser l'air circuler. De la diète artificielle (annexe III) a été donnée aux larves et celles-ci ont été incubées à 28°C à 50% d'humidité relative dans un incubateur Convion. Après environ 2 semaines d'incubation, les larves se sont transformées en chrysalides et 10 jours plus tard, des papillons sont apparus. À l'état papillon, les femelles fécondées ont pondu des œufs autour du couvercle du contenant pendant environ 1 semaine. Les œufs ont alors été transférés dans un nouveau contenant d'élevage sur de la nouvelle diète artificielle. Les œufs ont éclos en quelques jours et les larves produites ont alors recommencé le cycle de vie de l'insecte. L'état larvaire a duré 4 à 5 semaines. L'élevage de larves a été maintenu de cette façon pour toute la durée de ce projet.

2.2.1.3.2. Préparation des polyèdres

Avec les 3 échantillons de 90 mL de cellules Sf9 MM8-SF infectées, prélevés lors de chacun des passages 1, 5, 10 ou 15 de GmMVPN en fermenteurs de 100 mL, les étapes suivantes ont été réalisées. Les cellules infectées de chaque échantillon ont été centrifugées 10 minutes à 1500 RPM (environ 600 g) dans une centrifugeuse réfrigérée (modèle PR-2, IEC International Centrifuge), ont été lavées 2 fois dans du milieu MM8-SF et ont ensuite été traitées aux ultrasons pour libérer les polyèdres des cellules, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Les polyèdres ont ensuite été centrifugés 10 minutes à position « 6 » (environ 1100 g) d'une centrifugeuse clinique de table (IEC, International Equipment), ont été lavés 1 fois dans du milieu MM8-SF et ont

été comptés en triplicata à l'hémacytomètre, comme décrit précédemment. La concentration en polyèdres de chaque échantillon a ainsi pu être évaluée.

Pour préparer des polyèdres originaux (polyèdres de GmMVPN passage 0), des larves de *Galleria mellonella* ont été infectées par des polyèdres de GmMVPN provenant de broyats de larves de *Galleria mellonella* en phase virémique. La procédure de production et de récolte de polyèdres a été la même que celle décrite à la section 2.1.3.1, sauf que les polyèdres finaux obtenus ont été resuspendus dans du milieu MM8-SF au lieu du PBS 1X. Les polyèdres ont ensuite été comptés en triplicata à l'hémacytomètre pour déterminer la concentration en polyèdres, comme décrit ci-dessus.

2.2.1.3.3. Virulence des polyèdres envers des larves de *Galleria mellonella* de 3^e ou 4^e stade

Avec les polyèdres de chacun des passages 1, 5, 10, 15 et original de GmMVPN préparés ci-dessus, 3 répétitions ont été effectuées. Lors de chaque répétition, 24 larves n'ont pas été infectées (témoin négatif), 24 larves ont été infectées par 2×10^7 polyèdres, 24 larves par 2×10^6 polyèdres, 24 larves par 2×10^5 polyèdres et 24 larves par 2×10^4 polyèdres.

Pour ce faire, une alvéole de cire d'abeille hexagonale de 5 millimètres de diamètre a été déposée dans chaque puits de 1,7 centimètres de diamètre de plaques à 24 puits (Linbro, Flow Laboratories, #76-033-05). Des dilutions décimales des polyèdres ont été effectuées dans du milieu MM8-SF et des volumes de dilutions contenant le nombre de polyèdres désiré ont été déposés sur chaque alvéole de cire d'abeille. Un volume équivalent de milieu MM8-SF sans polyèdres a été déposé dans le cas du témoin négatif. Après séchage complet des gouttes déposées, 1 larve de *Galleria mellonella* de 3^e ou 4^e stade a été ajoutée à chaque alvéole de cire d'abeille contenant ou non des polyèdres. Les plaques ont été incubées pendant 20 jours à 28°C dans un incubateur Conviron et des observations journalières ont été effectuées. Ainsi, le moment où chaque larve a terminé de manger l'alvéole de cire d'abeille et où chaque larve est morte a été noté. De plus, lorsque l'alvéole de cire d'abeille a été complètement mangée, soit après 2 à 4 jours, de la diète artificielle (annexe III) a été ajoutée jusqu'à la fin de l'incubation.

Après 20 jours d'incubation, toutes les larves, mortes ou vivantes, ont été colorées par la technique de Buffalo Black. Pour ce faire, chaque larve a été broyée à l'aide d'un broyeur manuel Kontes (Fisher Scientific, #K749520-0000) et une goutte de chaque broyat a été étendue sur une lame de microscope. Après séchage de chaque frottis, toute la lame a été recouverte de la solution Naphtol Blue Black (Naphtol Blue Black 0,1%, méthanol 50%, acide acétique glacial 30%, dans de l'eau distillée) et la coloration a été effectuée pendant 5 minutes à environ 50°C. Par la suite, les lames ont été lavées abondamment avec de l'eau. Après assèchement, les lames ont été observées au microscope optique à 1000X à l'huile à immersion. Un frottis contenant des polyèdres colorés en bleu foncé signifiait que la larve correspondante était infectée.

Quatre aspects ont été analysés pour évaluer la virulence des polyèdres de GmMVPN envers des larves de *Galleria mellonella*. Premièrement, le pourcentage de larves infectées (% d'infection) après ingestion de chaque quantité de polyèdres a été déterminé par la formule :

$\frac{\text{Nombre de larves infectées (Buffalo Black positives)}}{\text{(Nombre de larves totales (24) - nombre de larves mortes non-infectées)}} \times 100$

Deuxièmement, la dose de polyèdres causant une infection de 50% des larves (DI₅₀) a été déterminée. Cette valeur a été obtenue en traçant le graphique du pourcentage de larves infectées en fonction du nombre de polyèdres ingérés par larve. L'endroit sur chaque droite tracée qui coupait la valeur de 50% d'infection correspondait à la valeur de chaque DI₅₀.

Troisièmement, la dose de polyèdres causant la mort de 50% des larves (DL₅₀) a été déterminée. Cette valeur a été trouvée en traçant le graphique du pourcentage de larves mortes infectées en fonction du nombre de polyèdres ingérés par larve. La valeur de chaque DL₅₀ correspondait à l'endroit sur chaque droite tracée qui coupait la valeur de 50% de mortalité.

Pourcentage de larves mortes infectées :

$$\frac{\text{Nombre de larves mortes infectées}}{(\text{Nombre de larves totales (24)} - \text{nombre de larves mortes non-infectées})} \times 100$$

Finalement, le temps léthal, c'est-à-dire le temps qu'une dose de polyèdres prend pour entraîner la mort des larves de *Galleria mellonella*, a été analysé en utilisant la dose la plus concentrée de polyèdres, soit 2×10^7 polyèdres par larve. Cet aspect a pu être étudié en déterminant le pourcentage des larves mortes infectées qui sont mortes à l'intérieur de chacun des intervalles de temps d'incubation de 0-5 jours, de 6-10 jours, de 11-15 jours, de 16-20 jours et de plus de 20 jours, par la formule :

$$\frac{\text{Nombre de larves mortes infectées dans l'intervalle de temps d'incubation} \times 100}{\text{Nombre de larves mortes infectées pour tous les intervalles de temps}}$$

2.2.1.4. Analyse des protéines virales

2.2.1.4.1. Électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide

Un million de cellules Sf9 MM8-SF témoins non-infectées ou infectées par GmMVPN aux passages 2, 7, 12, 16, 17 ou 20 (vivantes et mortes) ont été traitées suivant une méthode similaire à celle de Laemmli (1970). Ces échantillons ont d'abord été incubés pendant 15 minutes à 90°C dans 200 µl de tampon de dénaturation de protéines (SDS 1%, 2-mercaptoéthanol 1%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,003%, dans du Tris-HCl 50mM, pH 6.8). Le même traitement a été effectué avec le standard de poids moléculaire pour SDS-PAGE (Bio-Rad, #161-0314) dilué 1/5 dans le tampon de dénaturation.

Les protéines présentes dans 10 µl (50 000 cellules) de chacun des échantillons ont été séparées par la technique d'électrophorèse sur un gel de SDS-polyacrylamide composé d'un gel de concentration à 4% et d'un gel de séparation à 12% d'acrylamide/bis-acrylamide (préparés à partir d'une solution stock de 29,2g acrylamide / 0,8g N,N'-méthylènebisacrylamide dans 100 mL d'eau). L'électrophorèse a été réalisée à 100V

pendant 1h30 dans un tampon (glycine 0,2M, SDS 0,1%, dans du Tris-HCl 25mM, pH 8,3) à l'aide du module pour électrophorèse sur mini-gel Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, #165-2940).

Le gel a ensuite été coloré pendant 20 minutes au bleu de Coomassie 0,25% (dilué dans du méthanol 45% et de l'acide acétique 10%), décoloré 2 fois 20 minutes dans une première solution (méthanol 25%, acide acétique 8%) et décoloré 2 heures dans une deuxième solution (méthanol 5%, acide acétique 7,5%). Avant d'être analysé, le gel a été séché pendant 1 heure à l'aide du sécheur de gel Modèle 583 (Bio-Rad, #165-1745). Les standards de poids moléculaires étaient la phosphorylase B (97,4 kDa), l'albumine sérique (66,2 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), l'anhydrase carbonique (31 kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa) et le lysozyme (14,4 kDa).

2.2.1.4.2. Immunobuvardage de type Western

Les protéines, présentes dans 10^6 cellules Sf9 MM8-SF témoins non-infectées ou infectées par GmMVPN passages 2, 7, 12, 16, 17 ou 20 (vivantes et mortes) et dans le standard de poids moléculaire pour SDS-PAGE (Bio-Rad, #161-0314), ont été séparées par la technique d'électrophorèse sur un gel de SDS-polyacrylamide 12%, comme mentionné ci-dessus. Ces protéines ont ensuite été transférées sur une membrane activée de poly(vinylidène difluoride) (PVDF) (Bio-Rad, #162-0184) toute une nuit à 35V dans un tampon de transfert à 4°C (glycine 200mM, méthanol 20%, dans du Tris-HCl 25mM, pH 8,3), à l'aide de la trousse de transfert électrophorétique de protéines Mini Trans-Blot (Bio-Rad, #170-3930), selon la méthode fournie par le fabricant.

Les membranes de PVDF ont ensuite été traitées 3 fois dans un tampon de lavage (NaCl 200mM, Tween 20 0,1%, dans du Tris-HCl 10 mM, pH 7,5) et les sites non-spécifiques ont été bloqués pendant 1 heure dans une solution contenant 3% de BSA (BSA Fraction V) et 0,25% de gélatine, dans du tampon de lavage. Après 2 lavages, les membranes ont été incubées pendant 2 heures en présence de l'un des 3 sérums énumérés plus bas, dilués 1/3000 dans du tampon de dilution d'anticorps (BSA Fraction V 1% dans du tampon de lavage). Une dilution d'antisérum de 1/3000 a été choisie, car cette dilution était celle qui

révélaient le mieux les bandes de protéines virales sans révéler les bandes de protéines cellulaires parmi les dilutions d'antisérums préalablement testées de 1/500, 1/1000, 1/3000, 1/5000, 1/10 000 et 1/30 000. De plus, à cette dilution, aucune protéine virale n'a été révélée en utilisant un sérum de cobaye pré-immunisation.

- 1) Un sérum de cobaye pré-immunisation.
- 2) L'antisérum produit chez le cobaye #2, immunisé contre les polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*.
- 3) L'antisérum produit chez le cobaye #6, immunisé contre les virions et les polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vitro* en culture de cellules Sf9 MM8-SF.

Après 3 autres lavages, les membranes ont été incubées pendant 1 heure en présence d'un anticorps anti-IgG de cobaye conjugué à la peroxydase de raifort (Miles, Yeda Ltd., #61-208) dilué 1/3000 dans du tampon de dilution d'anticorps. Après trois lavages dans du tampon de lavage exempt de Tween 20, les bandes de protéines ont été révélées en ajoutant le substrat de la peroxydase (4-chloro-1-naphtol 0,5 mg/mL dans du PBS 1X) en présence de 0,01% de peroxyde d'hydrogène pendant 45 minutes. Deux derniers lavages ont été réalisés pour éliminer le 4-chloro-1-naphtol. Les bandes de protéines reconnues par les anticorps présents dans les différents sérums ont été colorées en violet.

Pour révéler les bandes de protéines standards, une bande de membrane de PVDF contenant les protéines standards a été découpée, juste avant l'étape de blocage avec une solution de 3% de BSA. La bande de membrane a ensuite été colorée pendant 3 minutes dans une solution de bleu de Coomassie brillant 0,05% contenant 30% de méthanol et 12% d'acide acétique glacial et a été décolorée 3 fois (10 minutes, 30 minutes et 2 heures) dans une solution contenant 30% de méthanol et 12% d'acide acétique.

2.2.1.4.3. Immunoperoxydase

En F25, 10^6 cellules Sf9 MM8-SF ont été infectées en présence de 20 $\mu\text{g/mL}$ de cholestérol (annexe I) à MI de 1 par les suspensions de virus extracellulaires des GmMVPN passages 1, 7, 12 et 19. Des F25 contenant 10^6 cellules Sf9 MM8-SF non-

infectées ont également été incubés en parallèle. Après 8 jours d'incubation à 28°C, c'est-à-dire lorsque plusieurs cellules contenaient des polyèdres, les surnageants de culture ont été retirés et les cellules en monocouche ont été lavées 2 fois dans du PBS 1X. Par la suite, les cellules ont été recouvertes pendant 1 heure à 4°C dans la solution de fixation (paraformaldéhyde 2%, NaCl 0,2%, dans du tampon phosphate 0,1M, pH 5,5) et traitées 3 fois avec la solution de lavage (BSA Fraction V 1%, Tween 20 0,05%, dans du PBS 1X, pH 7,3).

Ensuite, les cellules fixées ont été incubées pendant 2 heures à 37°C dans une chambre humide en présence de l'antisérum produit chez le cobaye #2, immunisé contre les polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*, dilué 1/100 dans de la solution de lavage. Après 3 lavages, les cellules ont été incubées dans une chambre humide pendant 2 heures à 37°C avec un anticorps anti-IgG de cobaye conjugué à la peroxydase de raifort (Miles, Yeda Ltd., #61-208) dilué 1/100 dans la solution de lavage. Par la suite, trois lavages ont été effectués pour éliminer les anticorps en excès. Finalement, les cellules ont été incubées en présence du substrat de la peroxydase (3,3'- tétrachlorure de diaminobenzidine Grade II 0,05% dans du Tris-HCl 0,05M, pH 7,6) et de 0,01% de peroxyde d'hydrogène. La présence d'antigènes viraux a été détectée en moins de 10 minutes par la formation de précipités bruns à l'intérieur des cellules infectées. Toutes les réactions ont été arrêtées en même temps à l'aide de lavages dans du Tris-HCl 0,05M.

2.2.1.5. Analyse de populations virales par la technique de plages

Dans des plaques à 6 puits de 3,5 centimètres de diamètre (Linbro, Flow Laboratories, #76-058-05), 8×10^5 cellules Sf9 bien distribuées ont été cultivées dans chaque puits en présence de 10% de SVF. Après 48 heures d'incubation à 28°C, soit lorsque la confluence cellulaire était d'environ 60%, le surnageant a été enlevé. Immédiatement, 1 mL de suspension de virus extracellulaires de GmMVPN passage 2 ou passage 19, préalablement dilué de 10^{-1} à 10^{-4} dans le milieu de culture Grace contenant 10% de SVF, a été ajouté aux tapis cellulaires. L'infection a été effectuée pendant 1 heure sur un plateau basculant (Bellco Biotechnology).

Juste avant le fin de l'infection virale, de l'agarose Seakem ME conservé à 47°C (agarose Seakem ME 1,25%, dans du milieu Grace contenant 10% de SVF) a été mélangé à une solution de rouge neutre conservée à 37°C (rouge neutre 0,006%, dans du milieu Grace contenant 10% de SVF) dans un rapport 1 : 1. Les dilutions de virus ont été enlevées des puits des plaques à 6 puits et ont été rapidement remplacées par 3 mL du mélange agarose/rouge neutre. Cette stratégie a été utilisée pour éviter de tuer les cellules par une chaleur trop élevée et pour éviter que l'agarose ne se solidifie trop rapidement. Après la solidification de l'agarose, les plaques ont été incubées à l'envers à 28°C jusqu'à l'apparition de plages complètes, soit après environ 10 jours.

Une plage correspondait à un foyer de cellules contenant des polyèdres. Toutes les plages des puits présentant de 30 à 100 plages isolées ont été analysées au microscope optique à 250X et 400X. Le nombre de polyèdres par plage, le nombre de cellules infectées par plage et le nombre de polyèdres par cellule ont été évalués. La présence du rouge neutre a seulement permis de différencier les cellules mortes (non-colorées) des cellules vivantes (roses).

2.2.1.6. Analyse du contenu en ADN des cellules par la technique de cytofluorométrie

La technique de cytofluorométrie utilisée lors de ce projet a été basée sur celle utilisée par Léry, Charpentier et Belloncik (1999). Ainsi, en F25, 10^6 cellules Sf9 MM8-SF ou Sf9 ont été infectées à MI de 1 ou de 20, selon le cas, par les suspensions de virus extracellulaires des GmMVPN passages 1, 5, 10, 15 ou 20. Des F25 contenant 10^6 cellules Sf9 MM8-SF ou Sf9 non-infectées ont également été incubés en parallèle. Après 16h, 24h, 48h, 72h et/ou 96h d'incubation à 28°C, selon le cas, 10^6 cellules ont été prélevées par F25, centrifugées (environ 750 g) et resuspendues dans 100 μ l de leur milieu de culture respectif. Chaque échantillon a ensuite été incubé pendant 30 minutes à température de la pièce dans 2 mL de tampon Krishan (citrate de sodium 0,1%, détergent Igepal CA-630 0,6%, bromure d'éthidium 50 μ g/mL, RNase T1 30U/mL, dans de l'eau déionisée), pour séparer le cytoplasme du noyau et pour colorer l'ADN présent dans le

noyau au bromure d'éthidium. Les noyaux ont finalement été analysés par le cytomètre en flux de comptoir COULTER EPICS XL-MCL de Beckman-Coulter.

10^6 lymphocytes de sang périphérique humain lyophilisés (trousse de cellules Cyto-Comp, Beckman-Coulter, #PN6607023) ont été traités de la même manière dans du tampon Krishan et ont été utilisés comme standard pour le calibrage de l'appareil. La configuration standard de l'appareil a été utilisée. Le bromure d'éthidium, intercalé dans l'ADN à l'intérieur des noyaux de cellules, a été excité par un rayon laser émettant à 488 nm. La fluorescence ensuite émise à une longueur d'onde de 617 nm par le bromure d'éthidium intercalé dans l'ADN a été captée par le 3^e de 4 détecteurs de fluorescence (PMT) du cytomètre en flux. Les données obtenues pour chaque échantillon étaient basées sur le décompte de 10 000 noyaux, après élimination des doublets de cellules et des débris cellulaires.

2.2.1.7. Essai de rétablissement d'une production normale de polyèdres chez des GmMVPN obtenus après plusieurs passages viraux

Lors d'une tentative de rétablir la production normale de polyèdres chez des GmMVPN de passages élevés, une suspension de GmMVPN passage 20 a été passée 1 fois chez la larve de *Galleria mellonella*. Pour ce faire, de 0,2 à 0,3 mL de suspension de virus extracellulaires du 20^e passage a été injecté de manière aseptique à plusieurs grosses larves de *Galleria mellonella* à l'aide d'une aiguille 30G de ½ pouce (Becton Dickinson, #305106). Les larves ont ensuite été incubées à 28°C avec de la diète artificielle (annexe III) jusqu'à l'apparition de symptômes d'infection.

Par la suite, en piquant la larve à l'aide d'une aiguille stérile, l'hémolymphe de chaque larve a été transférée dans 1 mL de milieu MM8-SF à 4°C. L'infection des larves a été confirmée par la coloration Buffalo Black des polyèdres présents dans une goutte d'hémolymphe et le contenu de quelques larves infectées a été préparé pour observation en microscopie électronique, comme décrit précédemment.

L'hémolymphe de chaque larve, diluée dans le milieu MM8-SF, a été utilisée pour infecter 10^6 cellules Sf9 MM8-SF en F25 en présence de 20 $\mu\text{g/mL}$ de cholestérol (annexe I). Après 7 jours d'incubation à 28°C, le surnageant contenant les virus extracellulaires (VEC) a été titré, comme décrit plus haut. Ce virus a été nommé « GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves ».

Cette suspension de VEC a ensuite été utilisée pour effectuer un passage de virus en culture de cellules Sf9 MM8-SF en F25 à MI de 0,1, comme décrit à la section 2.1.2. Après 7 jours d'incubation à 28°C, le titre viral, le pourcentage de cellules infectées, le nombre de polyèdres produits par millilitre de milieu de culture, le nombre de polyèdres par cellule infectée et l'infection virale à l'intérieur d'une cellule infectée observée en microscopie électronique ont été déterminés et comparés aux données recueillies lors des passages 1 à 20 de GmMVPN.

2.2.1.8. Production de polyèdres de GmMVPN de différents passages chez des cellules Sf9 MM8-SF d'un même passage cellulaire

Il a déjà été démontré que le fait de maintenir des cellules d'insectes pendant plus de 5 ans dans un milieu de culture ne contenant pas de SVF n'a aucune influence sur la susceptibilité des cellules à l'infection par des baculovirus (Lynn, 2000). Pour confirmer que la baisse de production de polyèdres obtenue lors des passages de GmMVPN était bien due à une modification du virus et non à une modification de susceptibilité de la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF à l'infection virale, des suspensions de virus extracellulaires (VEC) de GmMVPN de différents passages ont été utilisées pour infecter la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF d'un même passage cellulaire. Pour ce faire, dans des F25, 10^6 cellules Sf9 MM8-SF passage 510 ont été infectées à MI de 1 par les suspensions de VEC des GmMVPN passages 1, 7, 12, 17, 19 ou 20 amplifié une fois sur larves. Après 7 jours d'incubation à 28°C, des photos des cellules infectées ont été prises en microscopie optique à 250X. De plus, les cellules infectées ont été colorées directement dans les F25 par la technique Buffalo Black (comme décrit à la section 2.2.1.3.3), qui colore les polyèdres en bleu foncé, ou au Giemsa, qui colore le matériel nucléaire en rouge et le matériel cytoplasmique en bleu, mais qui ne colore pas les

structures protéiques aussi denses que les polyèdres. Pour ce faire, les cellules ont été fixées pendant 10 minutes dans du méthanol 100%, séchées et colorées pendant 15 minutes dans du Giemsa (Fisher Scientific, #SG28-500) dilué 1/15 dans de l'eau. Après lavage à l'eau distillée et séchage, les échantillons ont été observés au microscope optique à 1000X à l'huile à immersion.

2.2.2. Analyse des effets de passages d'AcLuci

2.2.2.1. Activité luciférase

Pour mesurer l'expression de la luciférase par les virus AcLuci, les étapes suivantes ont été effectuées sur les 3 échantillons de 30 mL de cellules Sf9 MM8-SF infectées et sur l'échantillon de 30 mL de cellules Sf9 MM8-SF non-infectées, prélevés précédemment lors de chaque passage d'AcLuci. Dans le cas des passages viraux en F25, ces étapes ont été effectuées sur 5 mL au lieu de 30 mL. La trousse d'essai de rapporteur de gène de la luciférase (Boehringer Mannheim, #1669893) a été utilisé lors de cette partie du projet.

Les cellules ont été centrifugées pendant 10 minutes à 1500 RPM (environ 340 g) d'une centrifugeuse réfrigérée (modèle PR-2, IEC International Centrifuge), ont été lavées 2 fois dans du PBS 1X et ont été détruites pendant 15 minutes à température de la pièce dans 600 µl de tampon de lyse (tampon tricine 25mM, pH 7.8, contenant du Nonidet P-40, du glycérol, du DTT et de l'EDTA). Avec les cellules provenant de F25, un volume de 100 µl de tampon de lyse a été utilisé au lieu de 600 µl, pour conserver les mêmes concentrations cellulaires. Après une centrifugation de 35 secondes à 13 000 RPM (environ 14 500 g) dans une centrifugeuse à microtubes (Biofuge 13 de Baxter Canlab), la luciférase présente dans le surnageant a été congelée à -20°C .

Après décongélation, des dilutions décimales en série des échantillons ont été effectuées dans du tampon de lyse. Juste avant la lecture de l'activité luciférase, 10 µl de dilution d'échantillon ont été mélangés à 25 µl de substrat de luciférase (D(-)-Luciférine, [D(-)-2-(6-hydroxy-2'-benzothiazolyl)- Δ^2 -thiazoline-acide carbonique], dans du tampon tricine). L'activité luciférase a immédiatement été mesurée par l'analyseur à scintillation Tri-Carb 2200CA (Packard, Canberra) pendant 1 minute. Le protocole utilisé était le protocole 25,

qui permet de mesurer la luminescence totale émise par la réaction luciférine-luciférase. Les résultats ont été obtenus en CPM (comptes de photons simples émis par minute).

Chapitre 3 : Résultats

3.1. Détermination de certains paramètres utilisés lors des passages de GmMVPN et d'AcLuci

Il est important de travailler en conditions optimales d'infection lors de passages de virus en culture cellulaire. Divers paramètres ont donc été étudiés à cet effet pour optimiser les conditions d'infection.

D'abord, pour être les plus productrices de virus, les cellules doivent être infectées en phase logarithmique de croissance (Kioukia *et al.*, 1995), c'est-à-dire infectées lorsqu'une grande proportion des cellules sont dans la phase S du cycle cellulaire (Doverskog *et al.*, 2000). Donc, des courbes de croissance de cellules Sf9 MM8-SF, cultivées à 2×10^5 cellules par mL en fermenteurs de 100 mL, ont été tracées pour déterminer la phase logarithmique de croissance de ces cellules (graphique non montré). Il a ainsi été démontré que la phase de latence durait 2 jours et que la phase logarithmique de croissance commençait au 3^e jour pour se terminer au 10^e jour. Par conséquent, le jour 3 a été choisi pour effectuer les infections virales.

La multiplicité d'infection (MI) est également un paramètre important à contrôler lors des infections virales. Donc, des études préliminaires ont été effectuées en fermenteur de 100 mL en infectant au 3^e jour des cellules Sf9 MM8-SF par du GmMVPN à MI de 1 et de 0,1. Il a ainsi été démontré qu'après 7 jours d'infection à MI de 0,1 et de 1, le pourcentage de cellules infectées et la quantité de polyèdres produits étaient très semblables. La MI choisie pour le projet a donc été de 0,1, car l'utilisation d'une concentration moindre de virus était préférable pour éviter de favoriser l'apparition de mutants lors des passages viraux.

Il est également important que la population virale utilisée comme inoculum de départ d'un projet de stabilité virale contienne la plus grande proportion possible de virus

sauvages MP par rapport aux virus mutés FP. Or, il a déjà été démontré que le fait de passer quelques fois des polyèdres de VPN *in vivo* diminuait la proportion de mutants FP dans la population virale (Fraser et Hink, 1982). Donc, avant d'utiliser le virus GmMVPN comme inoculum de départ, des polyèdres de GmMVPN ont été passés 2 fois dans des larves de *Galleria mellonella*, comme décrit à la section 2.1.2.1.2 du chapitre « Matériel et méthodes ».

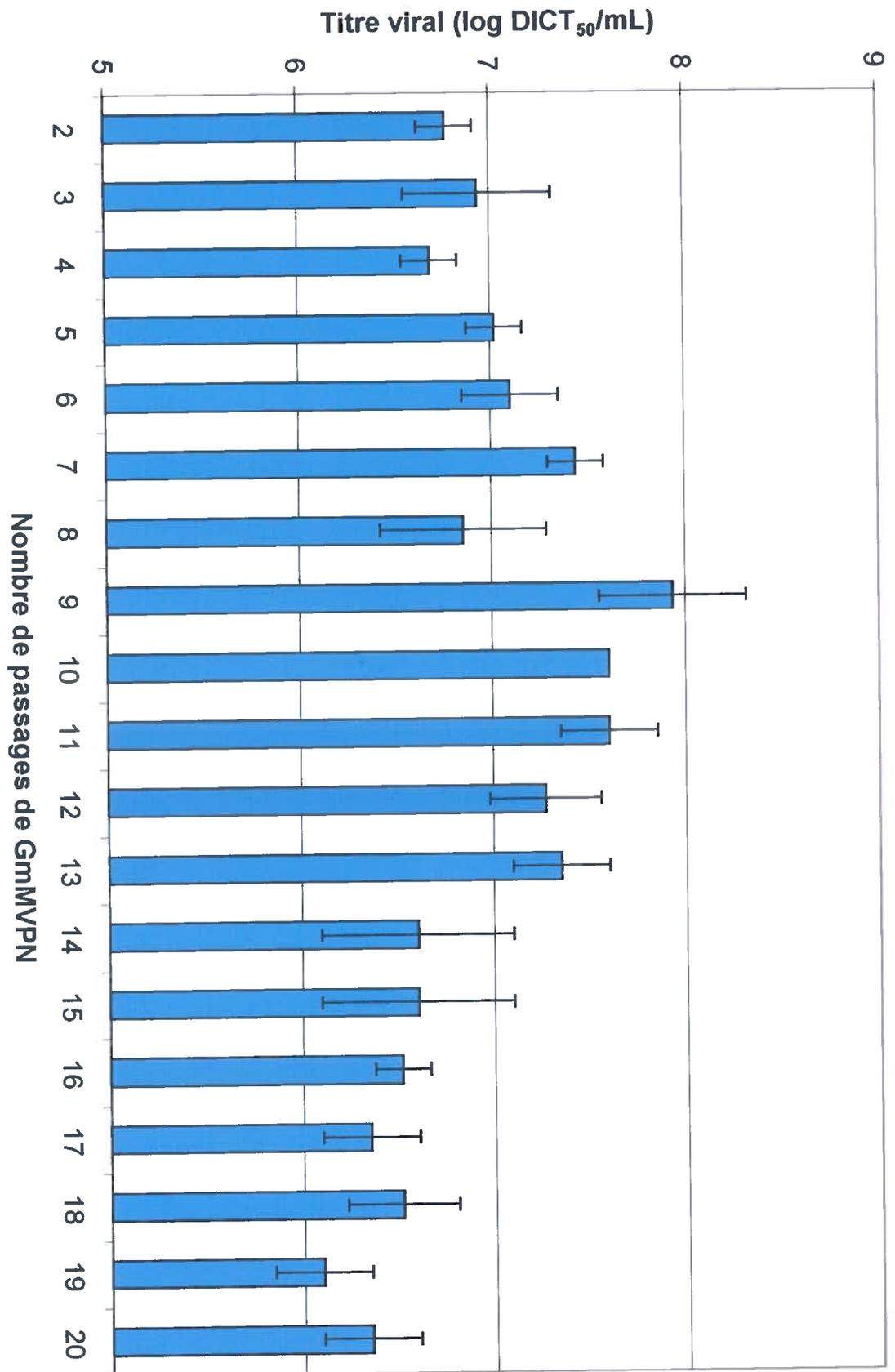
Pour ce qui est du virus recombinant, deux virus exprimant la luciférase étaient disponibles dans notre laboratoire, soit les virus AcLuci et 52BG(3). Des tests de réceptivité ont été effectués sur les cellules Sf9 MM8-SF et Sf9 à MI de 0,1. Après 7 jours d'infection, nous avons obtenu une activité luciférase plus élevée dans les cellules infectées par AcLuci que dans les cellules infectées par 52BG(3). De plus, contrairement au virus 52BG(3), c'est le promoteur fort de la polyédrine qui régule l'expression de la luciférase chez le virus AcLuci. L'expression de la luciférase chez le virus AcLuci est par conséquent la plus représentative de l'expression de protéines recombinantes chez les VPN. Le virus AcLuci a donc été choisi comme inoculum de départ du projet de stabilité virale.

3.2. Effet de passages de GmMVPN sur la production de virus extracellulaires

Le titre des suspensions de virus extracellulaires (VEC) a été stable lors des 6 premiers passages de GmMVPN, demeurant près ou tout juste sous la valeur de 10^7 DICT₅₀/mL (figure 3). Cependant, entre les passages 7 et 13 de GmMVPN, le titre viral a atteint une valeur plus élevée, oscillant entre $10^{7,3}$ et $10^{7,9}$ DICT₅₀/mL, soit une augmentation maximale de près de 10 fois la valeur du titre viral au passage 1. Enfin, le titre viral des passages 14 à 20 a diminué considérablement, étant évalué à $10^{6-6,5}$ DICT₅₀ / mL, ce qui est une valeur plus faible que celle obtenue lors des 6 premiers passages de GmMVPN. Après le passage 14, le titre du virus a seulement pu être rétabli en passant les virus provenant du passage 20 chez la larve de *Galleria mellonella*. En effet, le titre de GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves était de $10^{7,35}$ DICT₅₀ / mL. Il est finalement à noter que les titres des suspensions de virus extracellulaires obtenus lors des passages 4 et 8 semblent un peu plus faibles que la tendance.

Figure 3 : Effet de passages de GmMVPN sur la production de virus extracellulaires.
MI = 0,1. Observations à 7 jours post-infection.

Chaque valeur correspond à la moyenne de trois titrages viraux. L'écart type entre ces trois répétitions a été ajouté au graphique (barres verticales avec extrémités horizontales).



3.3. Effet de passages de GmMVPN sur la production de polyèdres

3.3.1. Nombre de polyèdres produits par millilitre de milieu de culture

Le nombre de polyèdres produits par millilitre de milieu de culture a été déterminé à l'aide de décomptes de polyèdres en triplicata à l'hémacytomètre, comme décrit à la section 2.2.1.1. La production de polyèdres par les GmMVPN des 4 premiers passages était d'environ 1×10^7 polyèdres/mL, ce qui est une valeur normale (figure 4). Elle a ensuite augmenté lors des passages 5 à 9 de GmMVPN, atteignant une valeur aussi élevée que 3×10^7 polyèdres/mL, probablement due à une adaptation du virus à la culture cellulaire. Par contre, à partir du 10^e passage viral, cette valeur a diminué considérablement, pour atteindre une production extrêmement faible de 1 à 2×10^6 polyèdres par mL à partir du passage 13, soit une diminution de 10 à 30 fois par rapport à la valeur obtenue lors des 9 premiers passages viraux. Par la suite, la production normale de polyèdres n'a pas pu être rétablie jusqu'au passage 20 de GmMVPN, mais un passage de GmMVPN passage 20 une fois dans des larves de *Galleria mellonella* a rétabli partiellement la production de polyèdres par millilitre de milieu de culture, avec une production de $6,53 \times 10^6$ polyèdres/mL, ce qui est comparable à la valeur obtenue au passage 12 de GmMVPN (figure 4).

3.3.2. Nombre de polyèdres par cellule infectée

Le nombre de polyèdres par cellule infectée a été déterminé à l'aide de décomptes de polyèdres et de cellules infectées en triplicata à l'hémacytomètre, comme décrit à la section 2.2.1.1. Selon la figure 5, les cellules infectées contenaient une quantité égale ou supérieure à 40 polyèdres lors des 9 premiers passages de GmMVPN en culture de cellules Sf9 MM8-SF, ce qui constitue une valeur normale. Par contre, à partir du passage 10 de GmMVPN, cette valeur a chuté sous les 30 polyèdres par cellule infectée, pour même atteindre un niveau inférieur à 10 polyèdres par cellule infectée à partir du 15^e passage viral. Enfin, le fait de passer le GmMVPN passage 20 une fois dans des larves de *Galleria mellonella* a rétabli partiellement la quantité de polyèdres par cellule infectée, avec une valeur de 15,1, ce qui ressemble au nombre de polyèdres par cellule infectée obtenu entre les passages 11 et 14 de GmMVPN.

Figure 4 : Effet de passages de GmMVPN sur le nombre de polyèdres produits par millilitre de milieu de culture. MI = 0,1. Observations à 7 jours post-infection.

Chaque valeur correspond à la moyenne de trois décomptes de polyèdres. L'écart type entre ces trois répétitions a été ajouté au graphique (barres verticales avec extrémités horizontales).

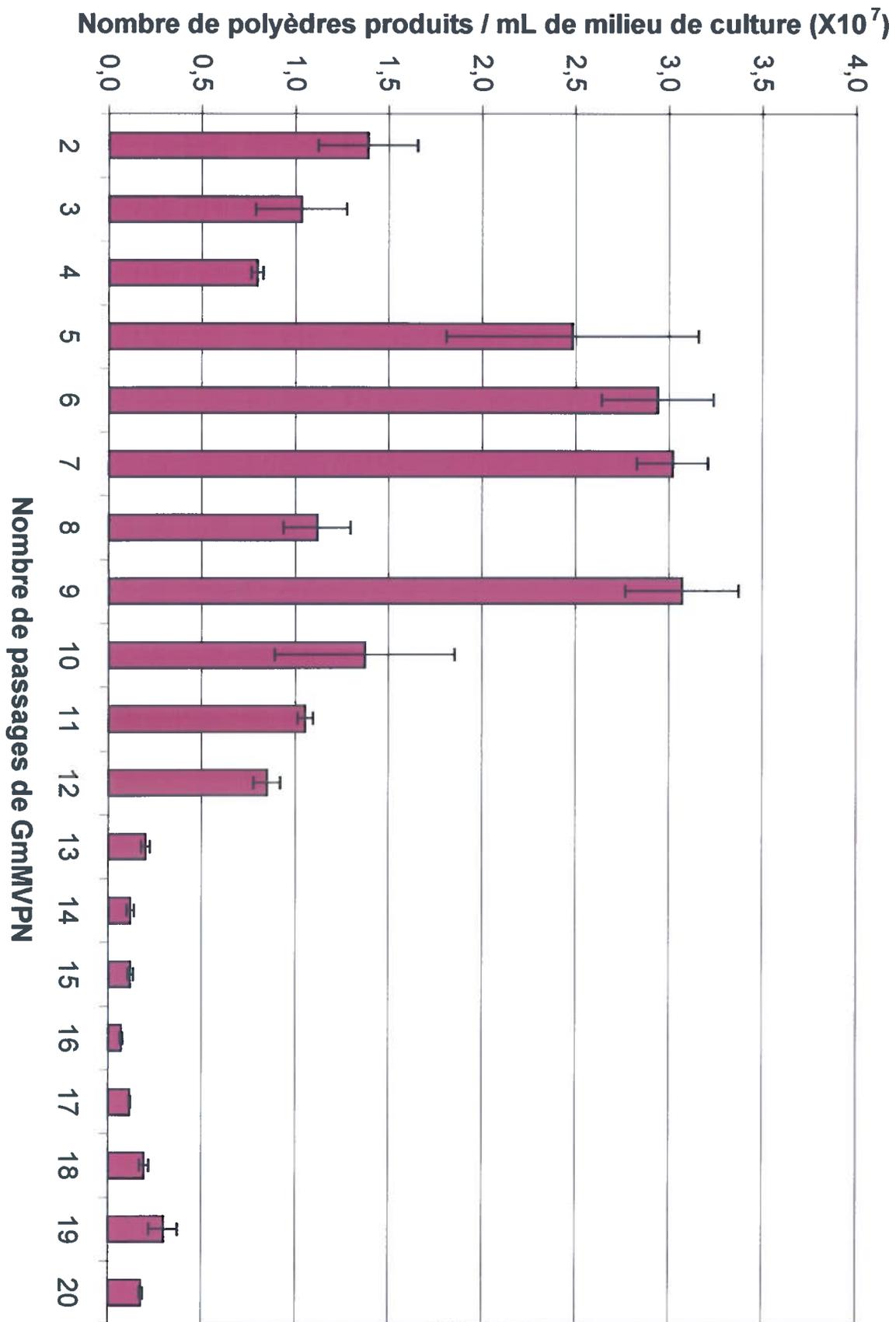
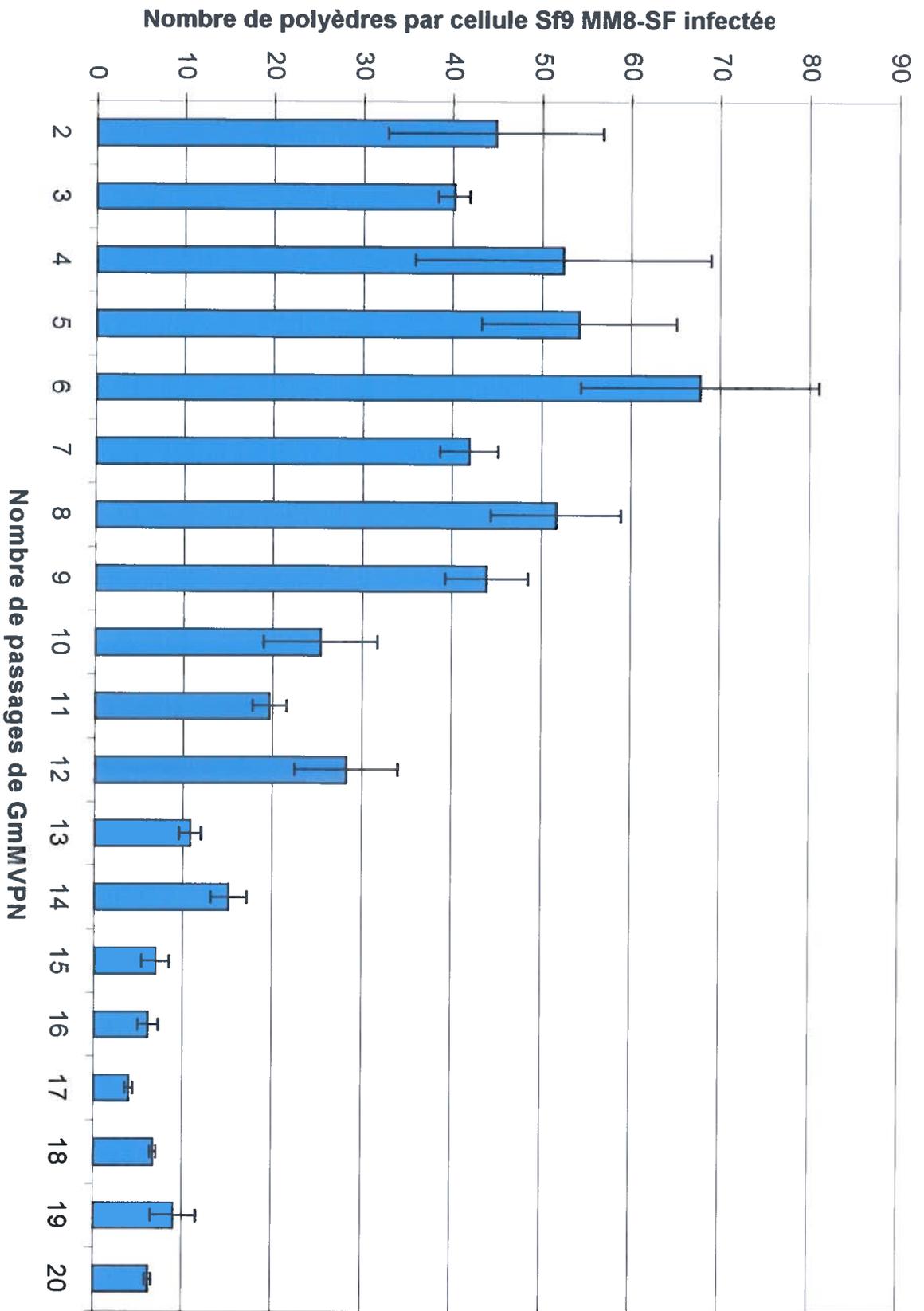


Figure 5 : Effet de passages de GmMVPN sur le nombre de polyèdres par cellule infectée. MI = 0,1. Observations à 7 jours post-infection.

Chaque valeur correspond à la moyenne de trois mesures. L'écart type entre ces trois répétitions a été ajouté au graphique (barres verticales avec extrémités horizontales).



Pour vérifier que cette baisse évidente de polyèdres par cellule infectée était bien due à une modification du virus, et non à une baisse de susceptibilité de la lignée cellulaire à l'infection virale, des cellules Sf9 MM8-SF d'un même passage (passage 510) ont été infectées en F25 à MI de 1 par les suspensions de virus extracellulaires des GmMVPN passages 1, 7, 12, 17, 19 ou 20 amplifié une fois sur larves. Par la microscopie optique à 250X (figure 6), nous avons pu observer directement une diminution du nombre de polyèdres par cellule Sf9 MM8-SF passage 510 infectée en fonction des passages de GmMVPN. En effet, en observant les cellules infectées par GmMVPN passage 1 et passage 7 (figures 6A et 6B), le nombre de polyèdres par cellule infectée était très élevé, et même tellement élevé qu'il a été impossible de les compter. Cependant, à partir du 12^e passage viral (figure 6C), une proportion de cellules contenant moins de 10 polyèdres a commencé à apparaître. Ces cellules à l'intérieur desquelles se trouvaient peu de polyèdres étaient dominantes lorsqu'elles ont été infectées par GmMVPN passage 17 ou passage 19 (figures 6D et 6E). La diminution du nombre de polyèdres par cellule infectée en fonction des passages de GmMVPN était donc même évidente chez des cellules d'un même passage cellulaire. De plus, encore une fois, la valeur obtenue en utilisant le GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves (figure 6F) était très semblable à celle du passage 12 de GmMVPN.

Ces mêmes cellules infectées ont été colorées par la technique Buffalo Black (figure 7). Les polyèdres colorés en bleu foncé présents à l'intérieur de 100 cellules infectées prises au hasard ont été comptés au microscope optique au grossissement de 1000X. Ainsi, nous avons pu observer que le pourcentage de cellules infectées contenant plus de 30 polyèdres, caractéristique des virus sauvages MP, a diminué beaucoup en fonction des passages de GmMVPN. En effet, 82% des cellules à l'intérieur desquelles se trouvaient des polyèdres de GmMVPN passage 1 ou passage 7 contenaient plus de 30 polyèdres, alors que cette valeur a diminué à 55% au 12^e passage viral et à 20% au 19^e passage viral (figure 7). Nous avons également constaté que le nombre moyen de polyèdres par cellule infectée a diminué en fonction des passages viraux, passant d'une valeur de 50 aux passages 1 et 7 de GmMVPN, à 27 au passage 12 et à 17 au passage 19 (figure 7), et ce même si des cellules d'un même passage cellulaire (Sf9 MM8-SF passage 510) ont été

utilisées. Ici encore, les valeurs trouvées en utilisant le GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves étaient très semblables à celles trouvées au 12^e passage de GmMVPN, avec 58% des cellules infectées contenant plus de 30 polyèdres, pour une moyenne de 32 polyèdres par cellule infectée (figure 7E).

3.3.3. Forme et dimensions des polyèdres

Les mêmes cellules Sf9 MM8-SF passage 510, infectées par les GmMVPN passages 1, 7, 12, 19 ou 20 amplifié une fois sur larves, ont été colorées au Giemsa. Cette technique a permis d'observer de façon claire les polyèdres non-colorés à l'intérieur de cellules colorées, et donc de bien pouvoir discerner la forme des polyèdres au microscope optique au grossissement de 1000X (figure 8). Par ce moyen, nous avons constaté que la forme des polyèdres changeait en fonction des passages de GmMVPN. En effet, sur 100 cellules Sf9 MM8-SF passage 510 infectées prises au hasard, près de 85% des cellules infectées par GmMVPN passage 1 ou passage 7 contenaient des polyèdres de forme polyédrique (figures 8A et 8B), alors que ce pourcentage a baissé à 50% au passage 12 de GmMVPN (figure 8C) et à 34% au 19^e passage viral (figure 8D). Les autres cellules infectées contenaient des polyèdres de forme cubique, devenant dominantes dans le cas du passage 19 de GmMVPN (figure 8D).

De plus, la grosseur moyenne des polyèdres a augmenté en fonction des passages de GmMVPN, car les polyèdres de forme cubique avaient tendance à être plus gros que les polyèdres de forme polyédrique (figure 8).

Encore une fois, les polyèdres de GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves ont démontré une grande similitude avec ceux du 12^e passage viral. En effet, 62% des cellules infectées par GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves contenaient des polyèdres de forme polyédrique (figure 8E).

Figure 6 : Cellules Sf9 MM8-SF passage 510 infectées par du GmMVPN. MI = 1.
Observations en microscopie optique à 7 jours post-infection.

A, B, C, D, E et F = GmMVPN passages 1, 7, 12, 17, 19 et 20 amplifié une fois sur larves, respectivement.

→ = polyèdres à l'intérieur de cellules infectées

Grossissement : 250X

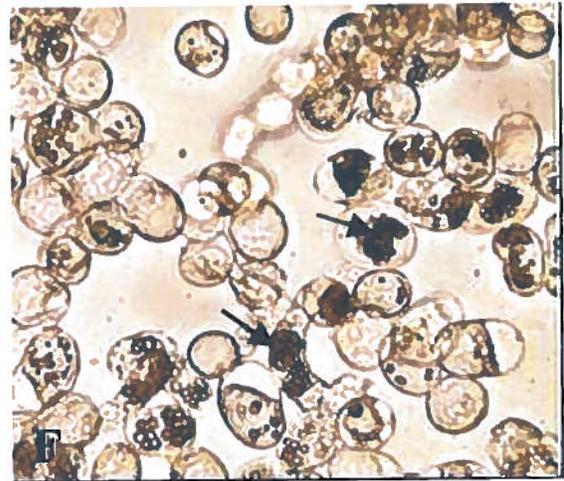
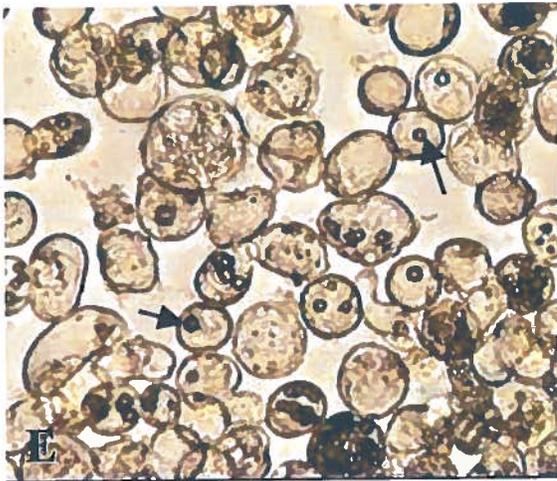
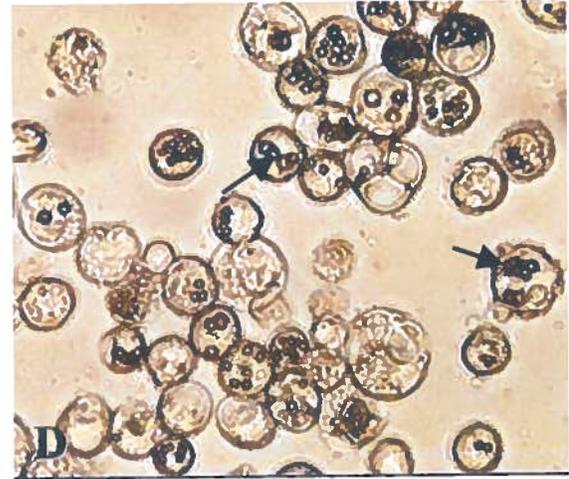
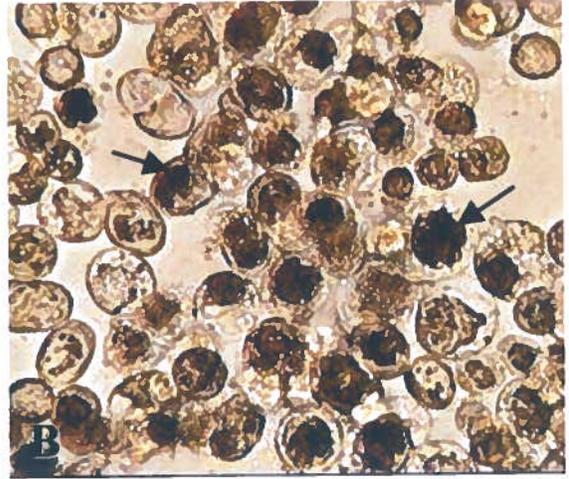
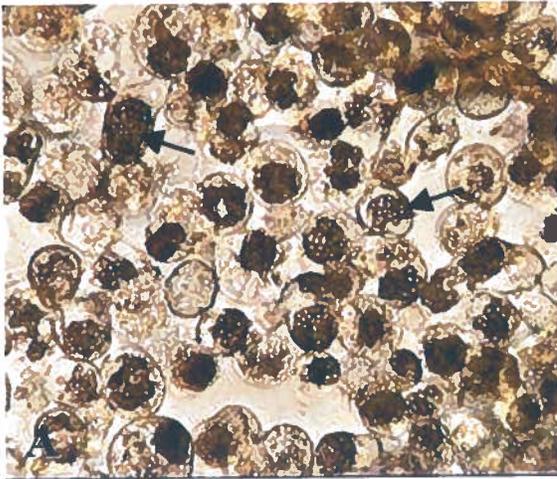
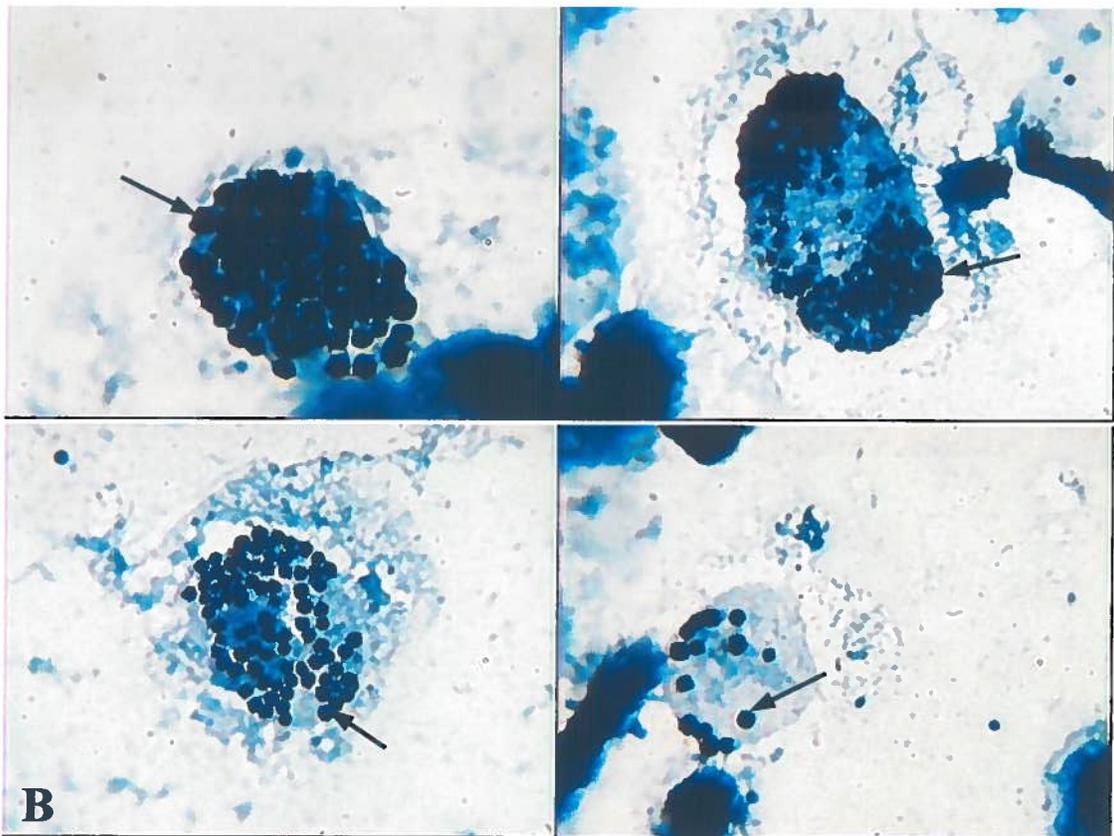
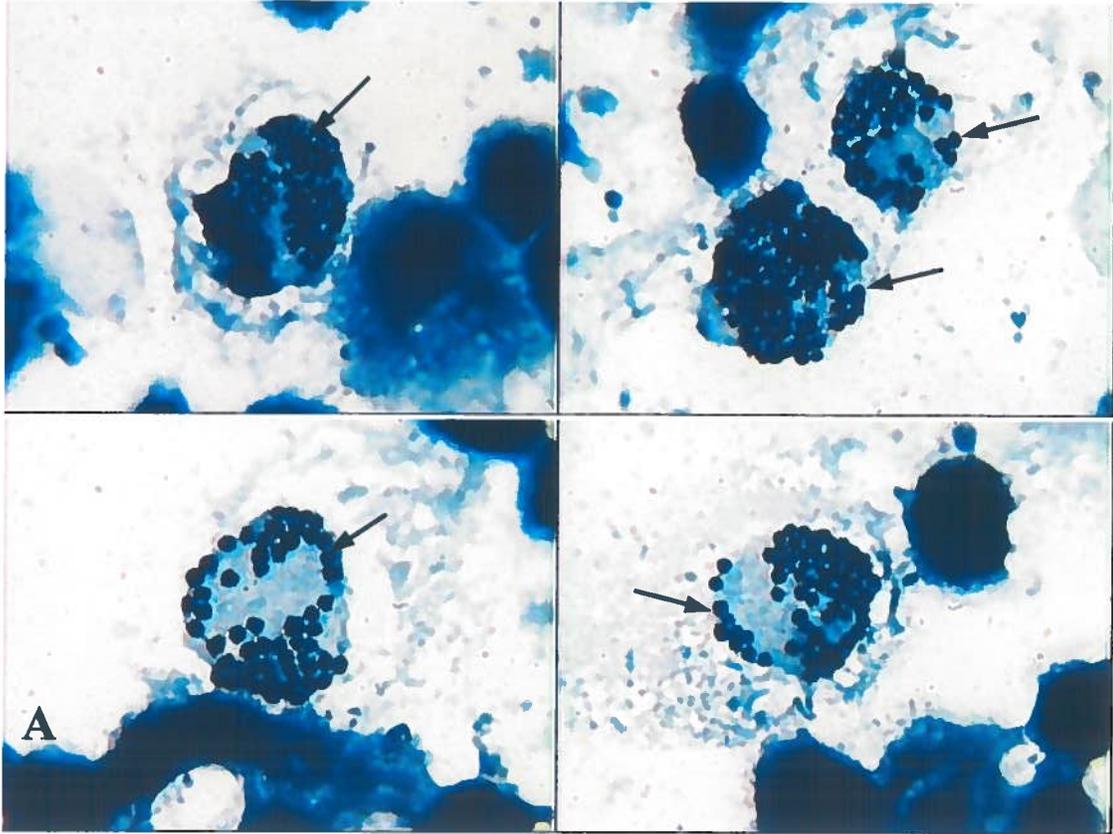


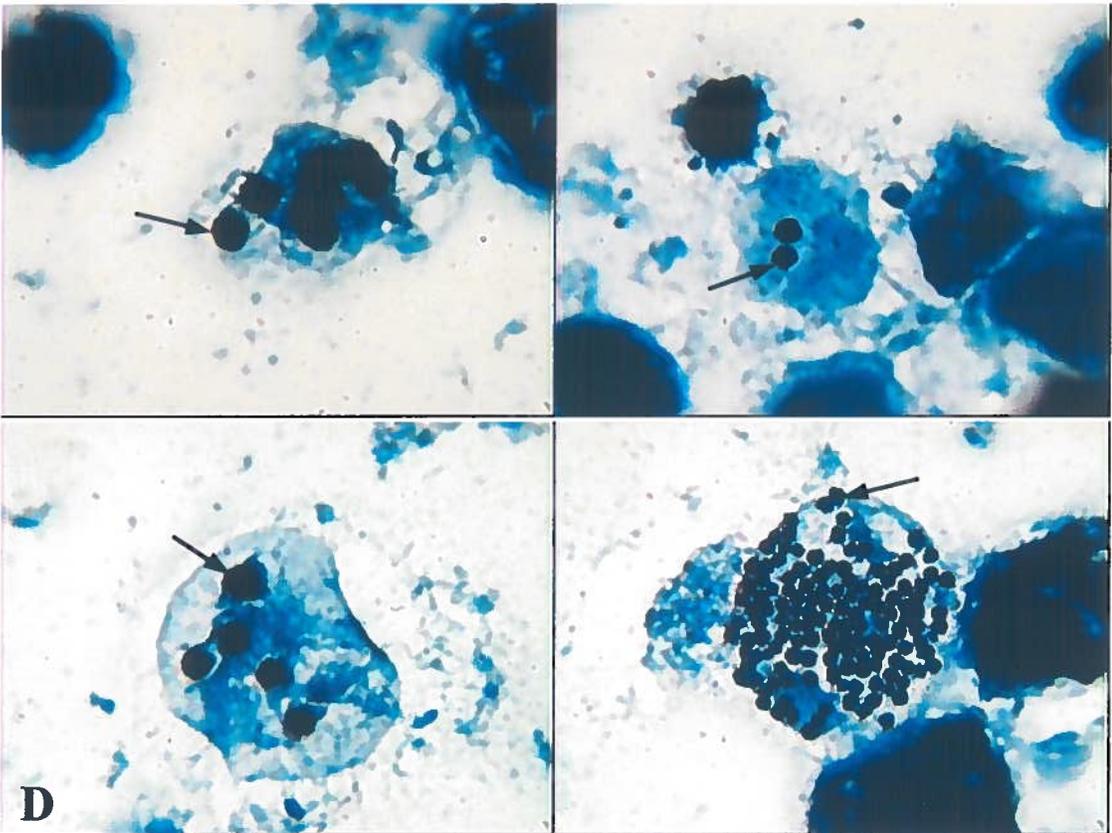
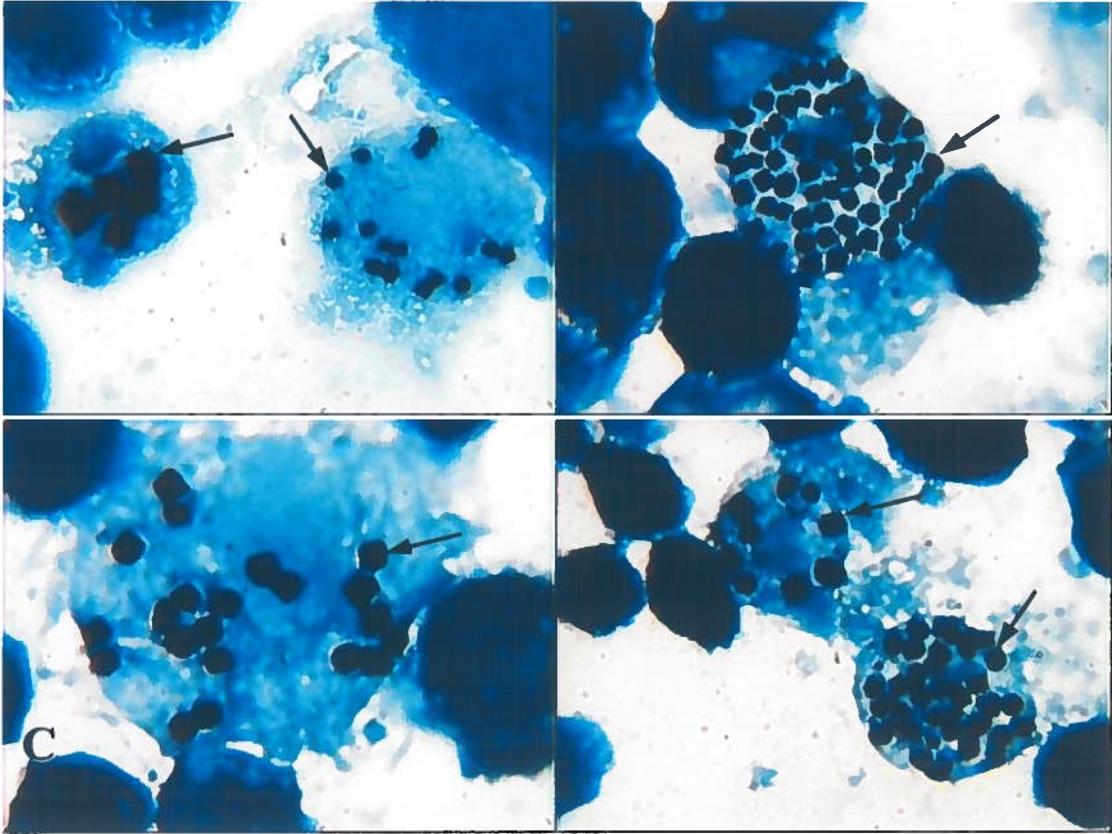
Figure 7 : Cellules Sf9 MM8-SF passage 510 infectées par du GmMVPN et colorées par la technique Buffalo Black. MI = 1. Observations en microscopie optique à 7 jours post-infection.

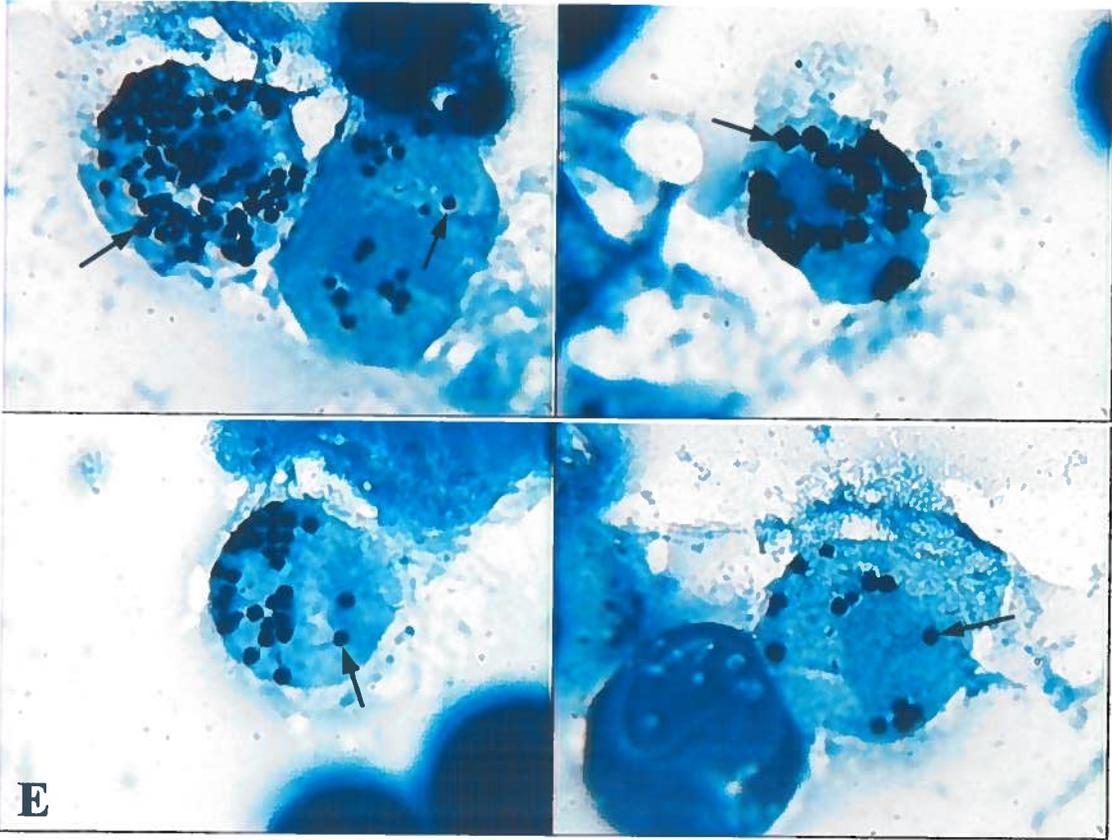
A, B, C, D et E = GmMVPN passages 1, 7, 12, 19 et 20 amplifié une fois sur larves, respectivement.

→ = polyèdres colorés en bleu marin à l'intérieur des cellules

Grossissement : 1000X







E

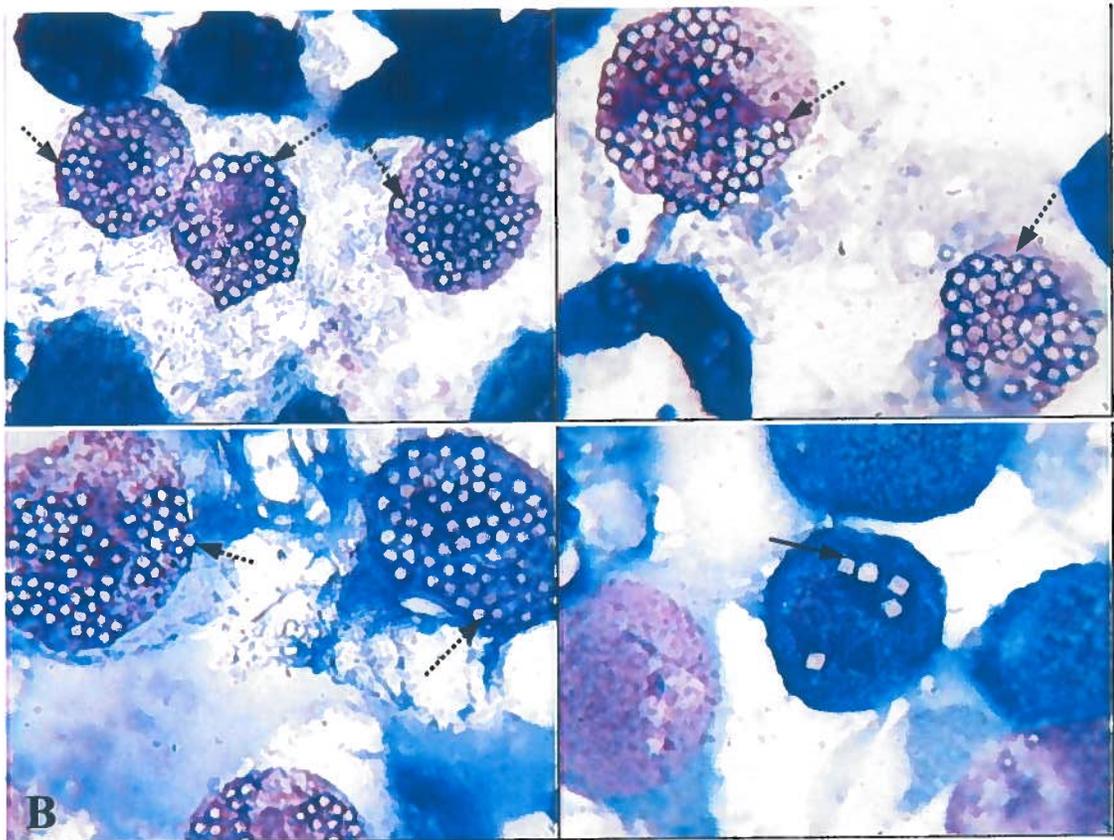
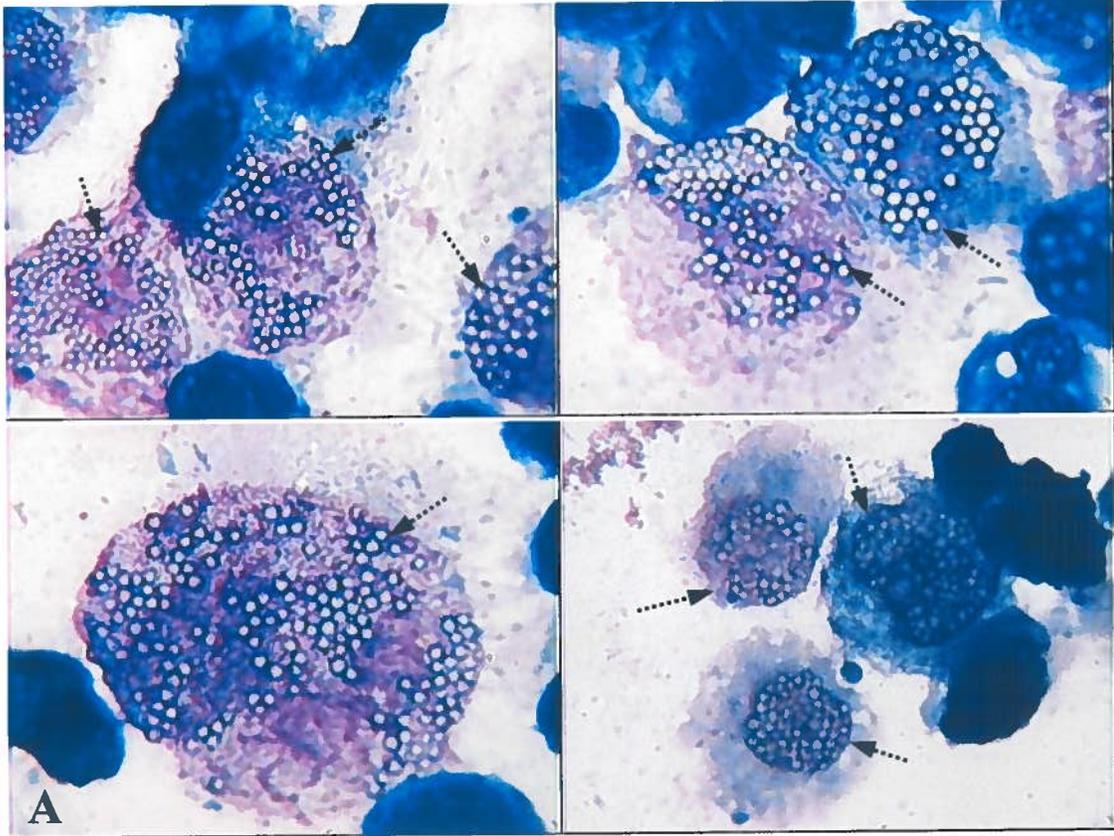
Figure 8 : Cellules Sf9 MM8-SF passage 510 infectées par du GmMVPN et colorées au Giemsa. MI = 1. Observations en microscopie optique à 7 jours post-infection.

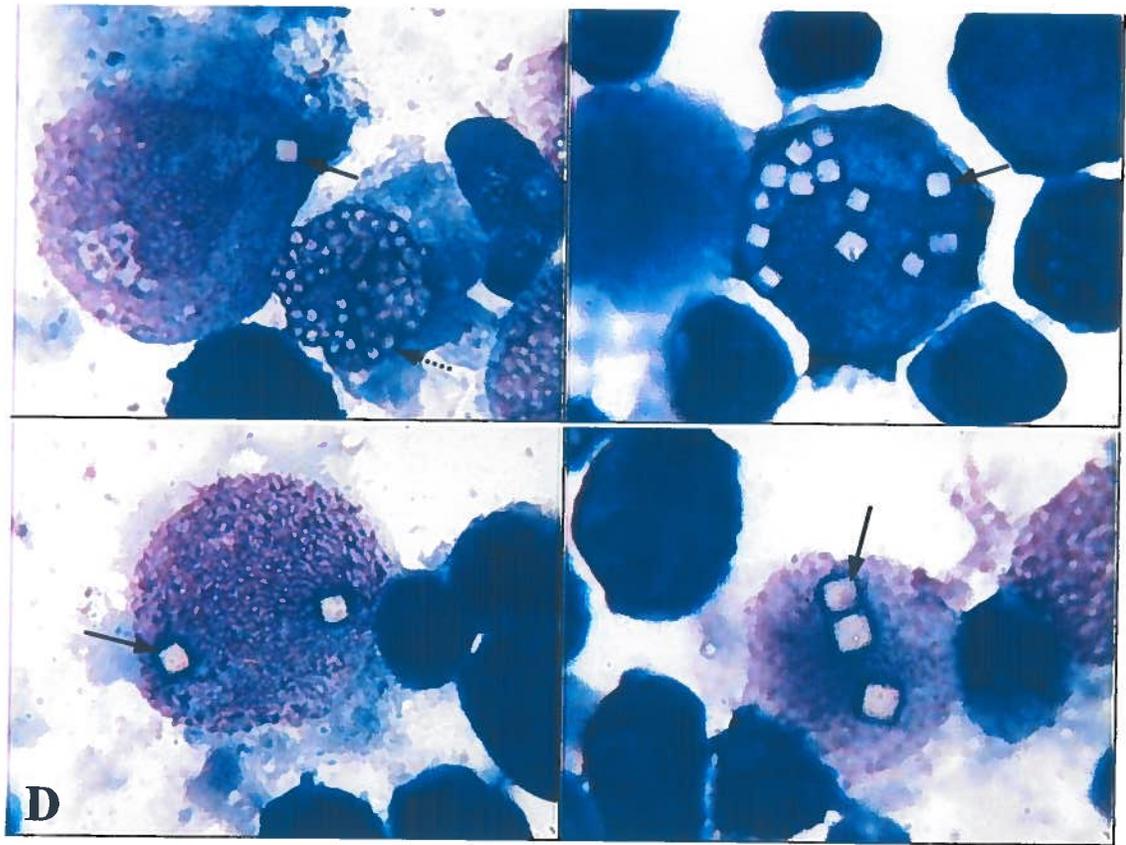
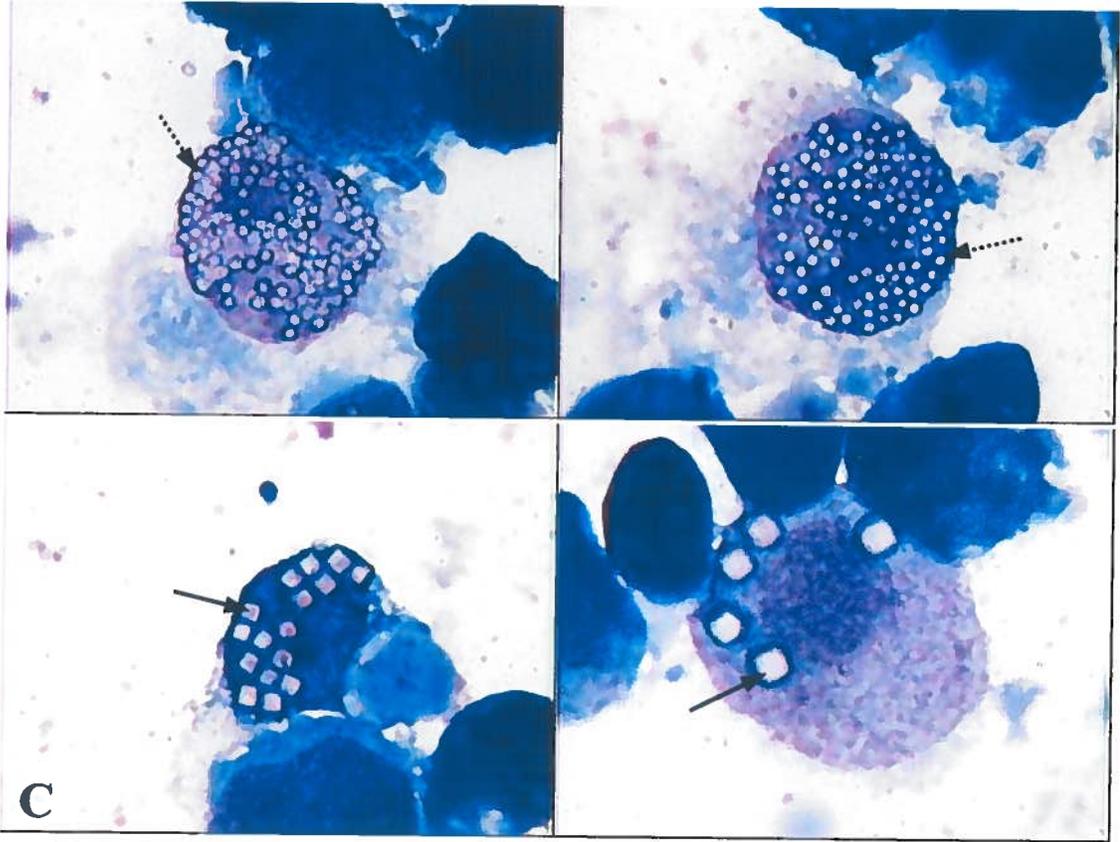
A, B, C, D et E = GmMVPN passages 1, 7, 12, 19 et 20 amplifié une fois sur larves, respectivement.

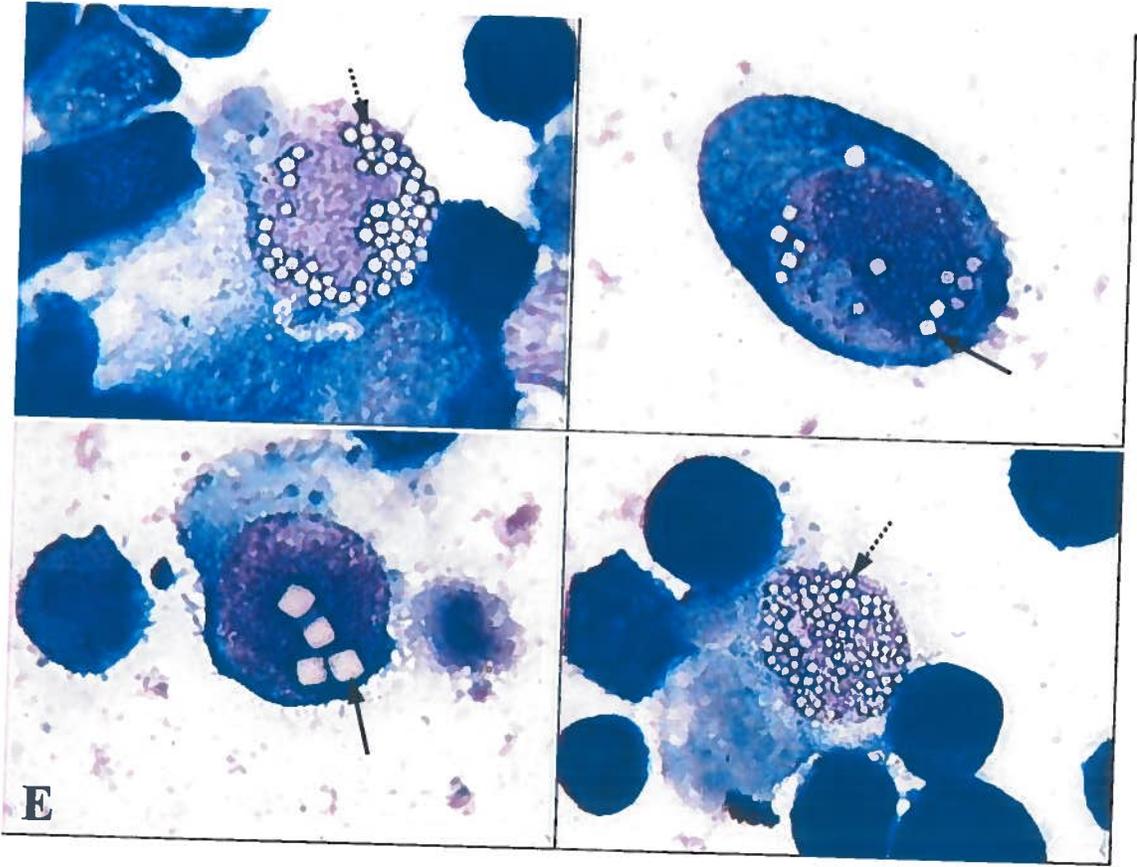
.....➤ = polyèdres de forme polyédrique à l'intérieur des cellules

————➤ = polyèdres de forme cubique à l'intérieur des cellules

Grossissement : 1000X







3.3.4. Démonstration par la technique de plages de la sélection de populations de GmMVPN produisant moins de polyèdres

Sur les tapis de cellules Sf9 infectées par une suspension de virus extracellulaires de GmMVPN passage 2, certaines plages, chacune formée à partir d'une unité virale infectieuse (ufp), étaient très grosses et contenaient beaucoup de polyèdres, soit jusqu'à 500 polyèdres par plage (figures 9A et 9B), pour une moyenne de 130 polyèdres par plage. Par contre, dans ces plages, chaque cellule infectée ne présentait en moyenne pas plus de 10 polyèdres. Ce type de plages n'était pas présent lorsque les cellules étaient infectées par GmMVPN passage 19. Au contraire, toutes les plages formées par GmMVPN passage 19 contenaient peu de polyèdres, soit parce que la plage était très petite et ne contenait pas beaucoup de cellules infectées (figures 9C et 9D), ou soit parce que la plage contenait beaucoup de cellules ne présentant pas de polyèdres au travers de cellules à l'intérieur desquelles se trouvaient des polyèdres (figure 9E). Ces plages contenaient en moyenne seulement 43 polyèdres, soit 3 fois moins que dans le cas de GmMVPN passage 2. Chaque cellule présente dans ces plages ne contenait également pas plus de 10 polyèdres. Évidemment, les suspensions de GmMVPN passage 2 formaient également des plages à l'intérieur desquelles se trouvaient peu de polyèdres, mais en moins grande proportion. Donc, lors des passages de GmMVPN, il y aurait eu sélection de populations virales produisant peu de polyèdres par plage aux dépens des populations virales produisant beaucoup de polyèdres par plage.

3.4. Effet de passages de GmMVPN sur l'infection virale

3.4.1. Pourcentage de cellules Sf9 MM8-SF infectées

Le pourcentage d'infection a été déterminé par le pourcentage de cellules Sf9 MM8-SF contenant des polyèdres, dans les fermenteurs de cellules non-infectées et dans les fermenteurs de cellules infectées par GmMVPN. Ainsi, le pourcentage d'infection était toujours nul dans les fermenteurs de cellules non-infectées (figure 10). D'un autre côté, ce pourcentage était élevé lors des passages 2 à 12 de GmMVPN, c'est-à-dire qu'en moyenne 50% des cellules étaient infectées. Par contre, à partir du 12^e passage viral, le pourcentage de cellules infectées a diminué pour se stabiliser à une valeur faible de 20% à partir du passage 14. La seule valeur qui ne suivait pas cette tendance était celle obtenue

Figure 9 : Plages de cellules Sf9 infectées par du GmMVPN.

A et B : GmMVPN passage 2

C, D et E : GmMVPN passage 19

Grossissement : 250X et 400X (encadré)

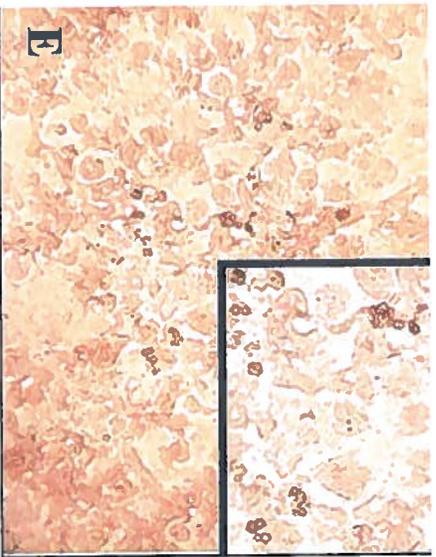
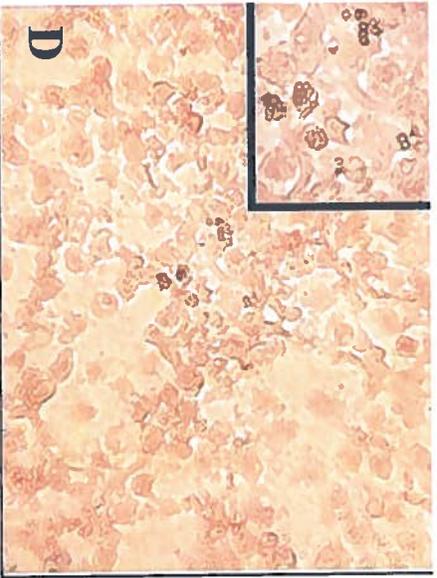
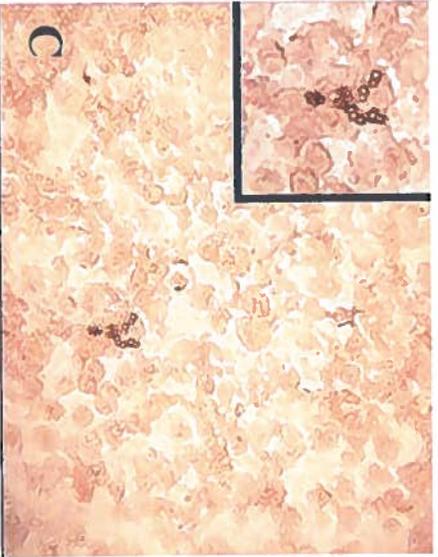
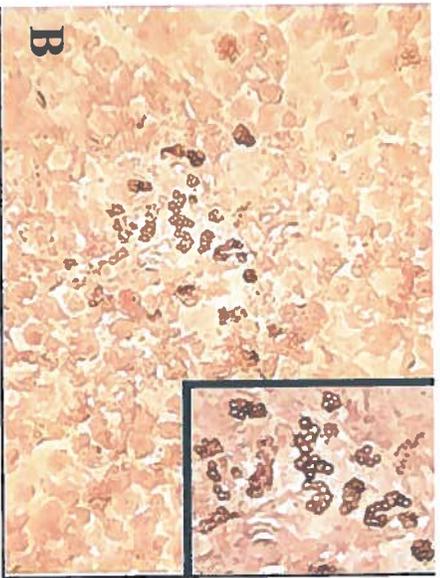
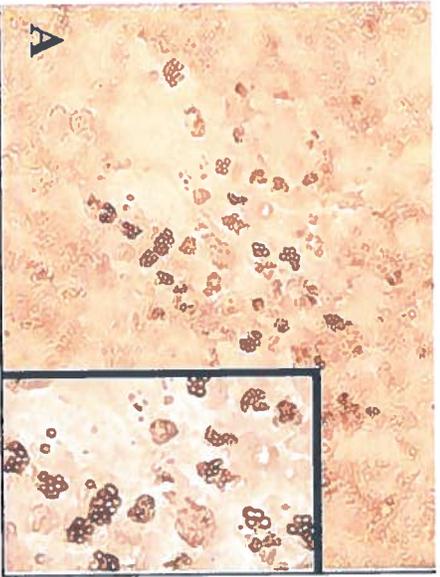
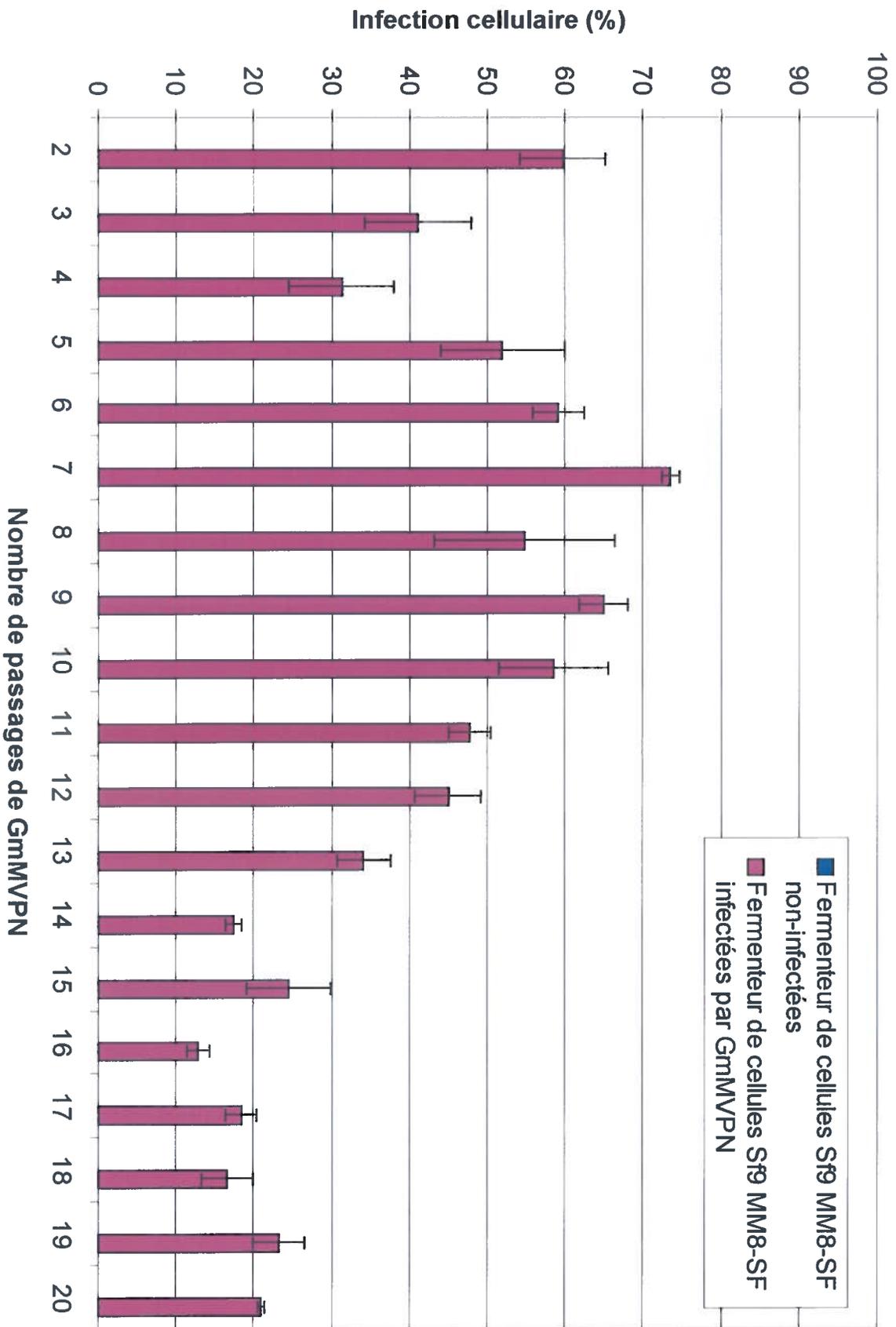


Figure 10: Effet de passages de GmMVPN sur l'infection virale, en terme de pourcentage de cellules Sf9 MM8-SF infectées. MI = 0,1. Observations à 7 jours post-infection.

Chaque valeur correspond à la moyenne de trois décomptes cellulaires. L'écart type entre ces trois répétitions a été ajouté au graphique (barres verticales avec extrémités horizontales).



au 4^e passage de GmMVPN. Finalement, le pourcentage de cellules infectées obtenu lors du passage de GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves était de 27,3%, ce qui est semblable à la valeur obtenue lors du 13^e passage de virus.

3.4.2. Observations en microscopie électronique

Par la microscopie électronique, 3 aspects différents ont été étudiés en fonction des passages de GmMVPN. Premièrement, le nombre de virions présents à l'intérieur des polyèdres a diminué considérablement en fonction des passages viraux (figure 11, 1a à 1e). En effet, la majorité des polyèdres de GmMVPN passage 2 et passage 7 (figure 11, 1a et 1b) contenaient beaucoup de virus inclus (VI) enveloppés, alors que plusieurs polyèdres de GmMVPN passage 12 en présentaient très peu et/ou contenaient des VI plus courts que ceux présents dans les polyèdres de GmMVPN passage 2 et passage 7 (figure 11, 1c). De plus, la plupart des polyèdres de GmMVPN passage 20 ne contenaient aucun virion (figure 11, 1d). Cependant, plusieurs des polyèdres de GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves contenaient, comme les polyèdres du passage 12, une faible quantité de VI courts (figure 11, 1e).

Deuxièmement, la forme de certains polyèdres a changé en fonction des passages de GmMVPN (figure 11, 2a à 2d). En effet, la majorité des polyèdres de GmMVPN passage 2 et passage 7 étaient de forme normale, c'est-à-dire de forme polyédrique (figure 11, 2a). Par contre, après plus de 12 passages viraux, plusieurs polyèdres étaient de forme anormale (figure 11, 2b) ou présentaient un contour irrégulier (figure 11, 2c et 2d).

Finalement, une modification de l'infection virale en fonction des passages de GmMVPN a pu être directement observée à l'intérieur de cellules Sf9 MM8-SF infectées (figure 11, 3a à 3d). En effet, les cellules infectées par GmMVPN passage 2 ou passage 7 contenaient des nucléocapsides simples, des virions enveloppés et beaucoup de polyèdres à l'intérieur desquels se trouvaient plusieurs virions (figure 11, 3a). De plus, la synthèse *de novo* de membrane virale était normale, démontré par la présence de membrane synthétisée *de novo* autour des VI, autour des virions enveloppés et aussi parfois libre dans le noyau. Par contre, plusieurs cellules infectées par GmMVPN passage 17, même

Figure 11 : Effet de passages de GmMVPN sur l'infection virale. Observations en microscopie électronique à 7 jours post-infection. MI = 0,1.

Figure 11, 1 : Nombre de virions (ou VI) dans les polyèdres :

a, b, c, d et e = passages de virus 2, 7, 12, 20 et 20 amplifié une fois sur larves, respectivement.

Figure 11, 2 : Forme des polyèdres :

a, b, c et d = passages de virus 2, 12, 12 et 17, respectivement.

Figure 11, 3 : Infection virale à l'intérieur d'une cellule infectée par du GmMVPN :

a, b et d = Cellule Sf9 MM8-SF infectée par du virus de passages 7, 17 et 20 amplifié une fois sur larves, respectivement.

c = Cellule de larve de *Galleria mellonella* infectée par du virus de passage 20.

Barre = 0,5 μm (1a, b, c et d; 2a, b, c et d; encadré 3b)
= 1,0 μm (1e; 3a, b, c et d)

p = polyèdre

ns = nucléocapside simple

v = virion enveloppé

vi = virus inclus

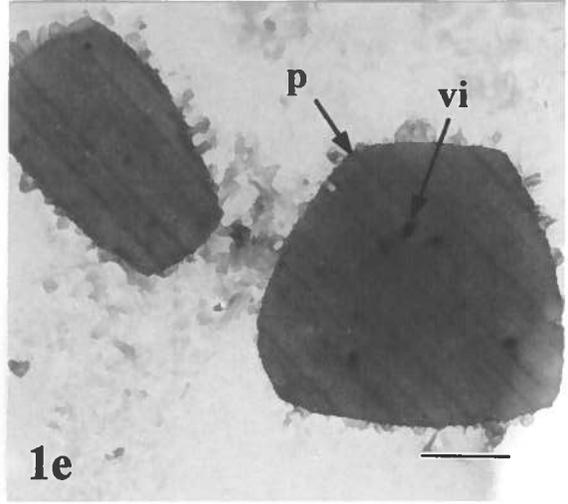
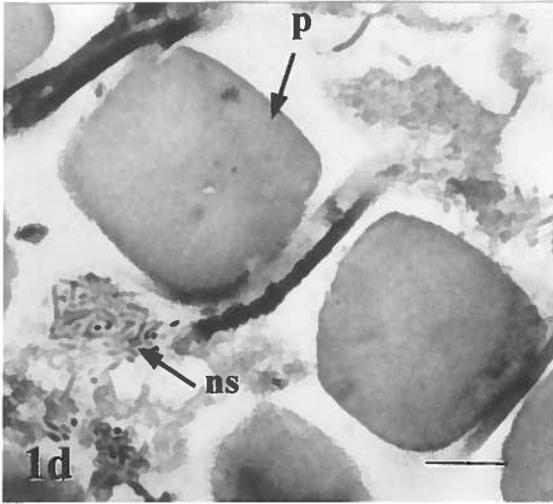
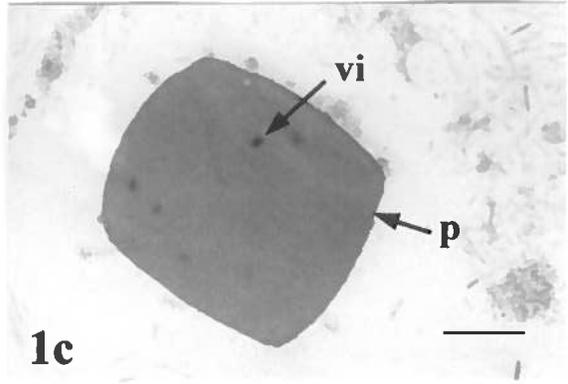
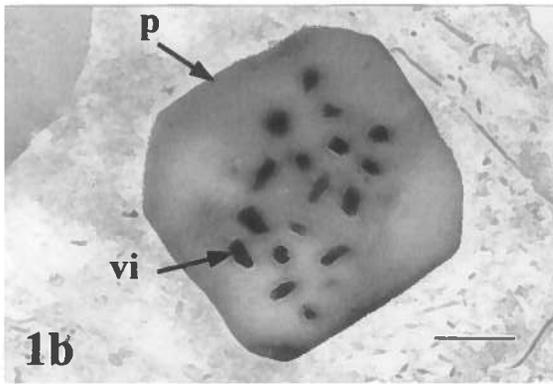
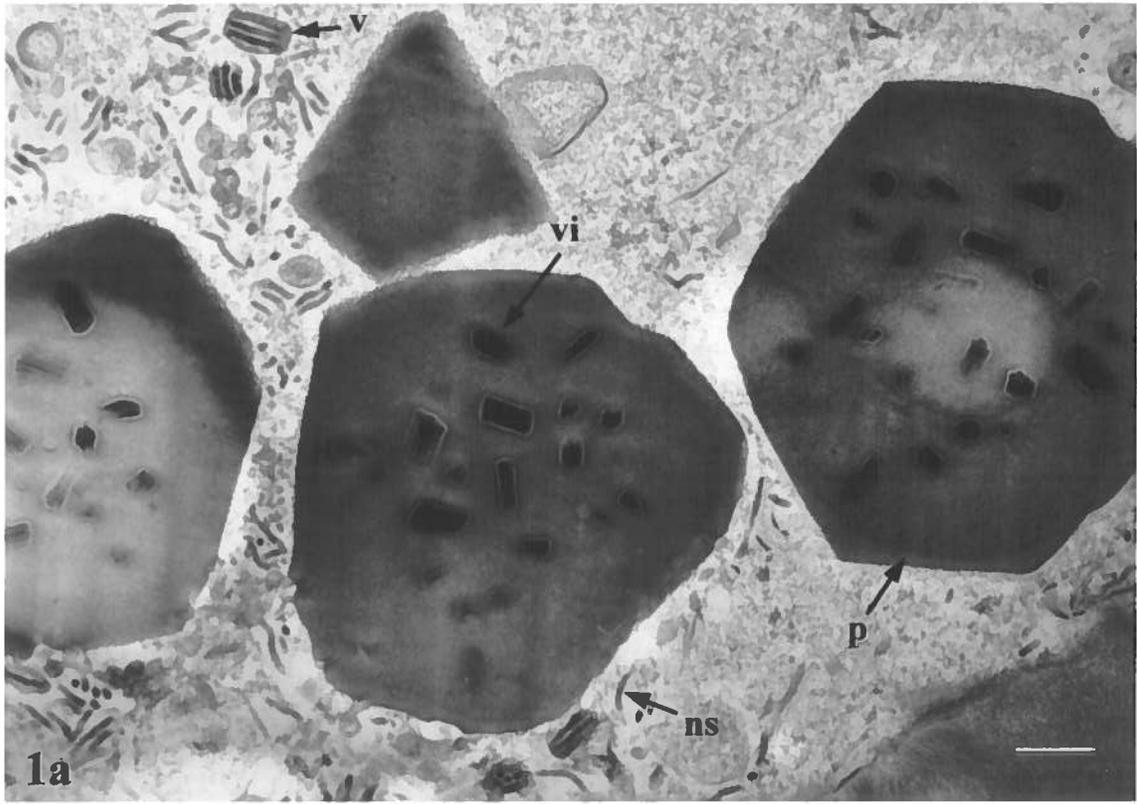
md = membrane virale synthétisée *de novo*

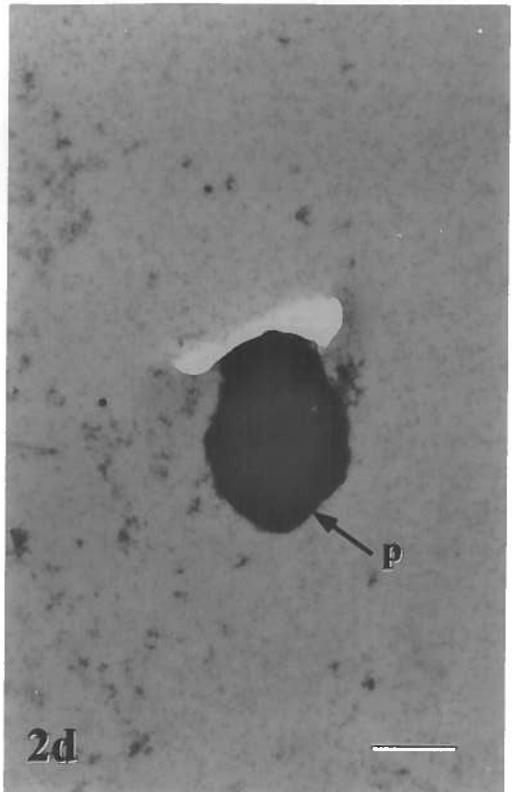
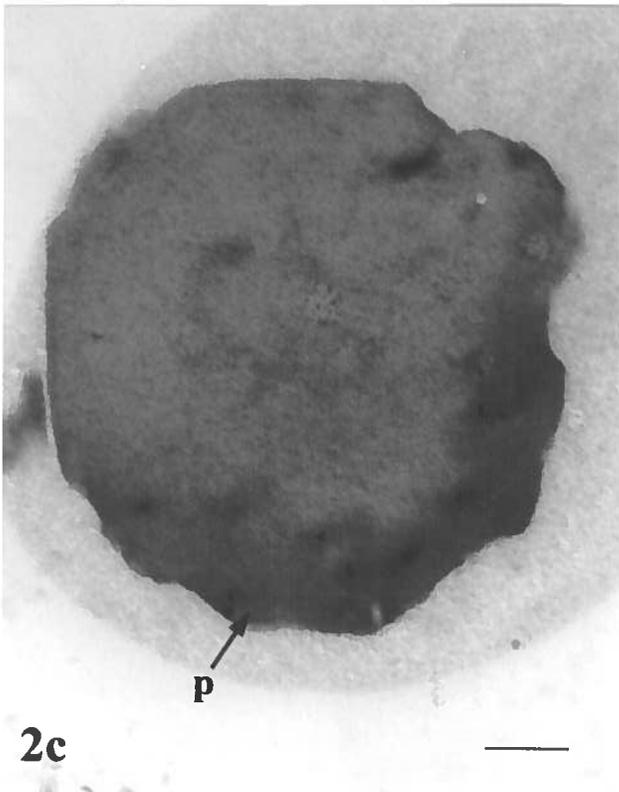
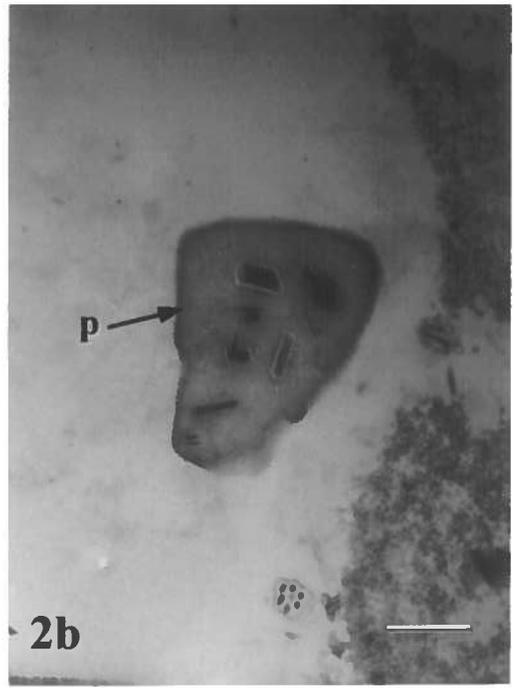
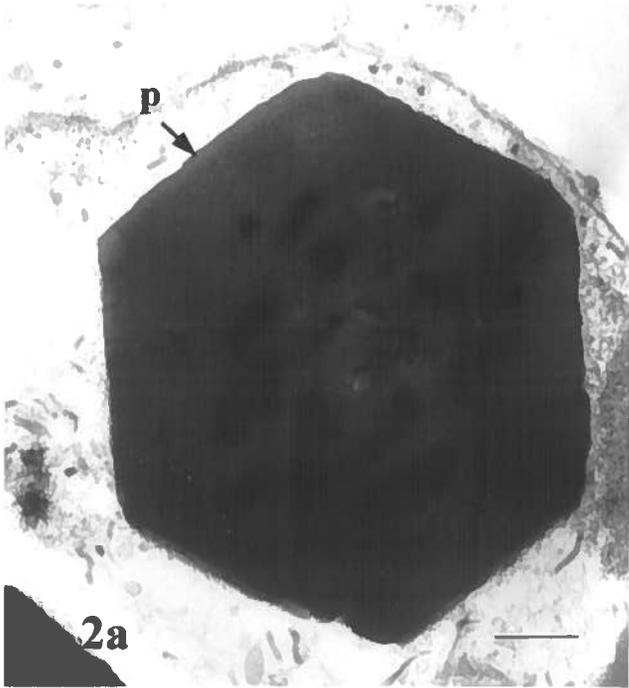
mn = membrane nucléaire

mc = membrane cytoplasmique

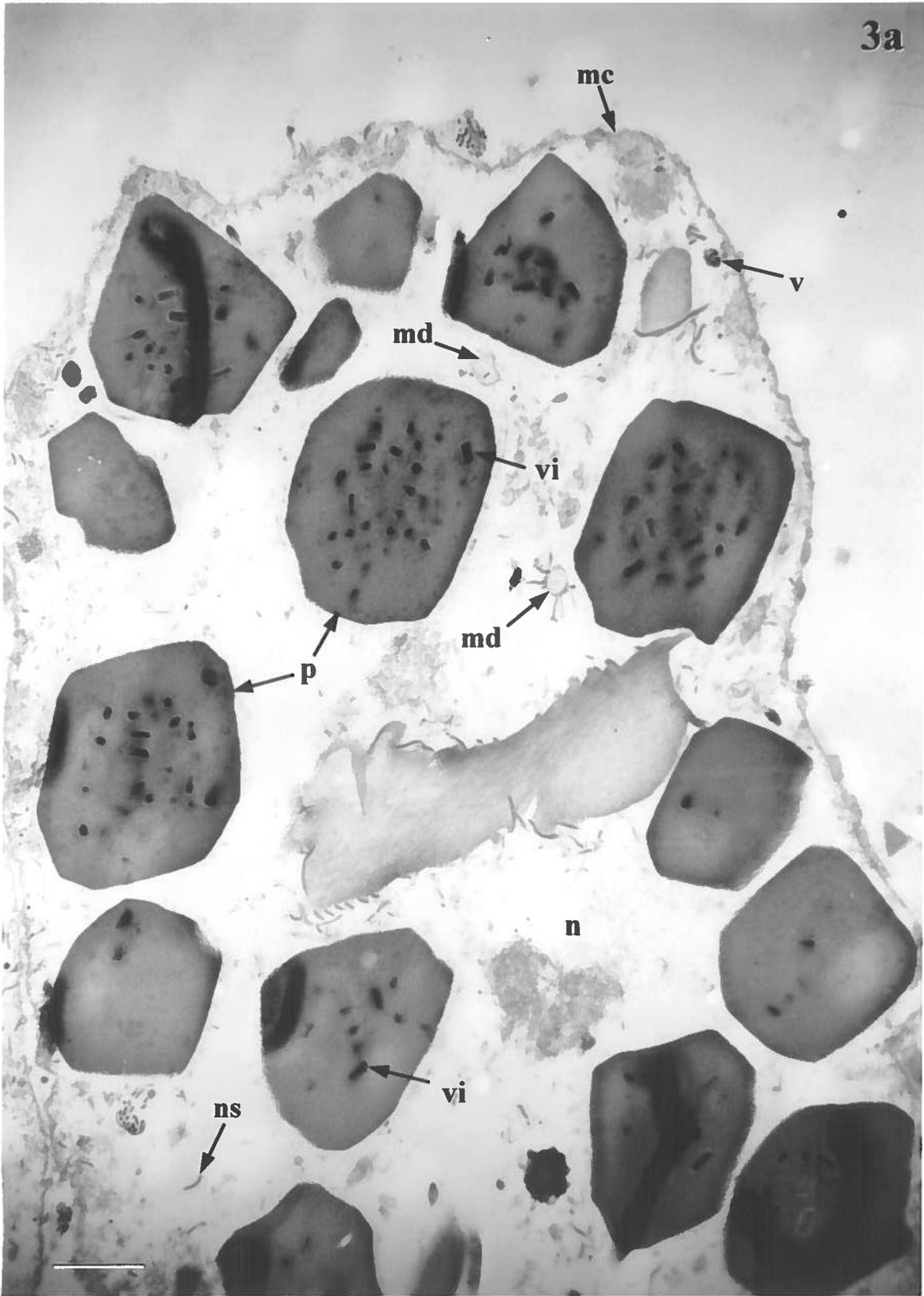
c = cytoplasme

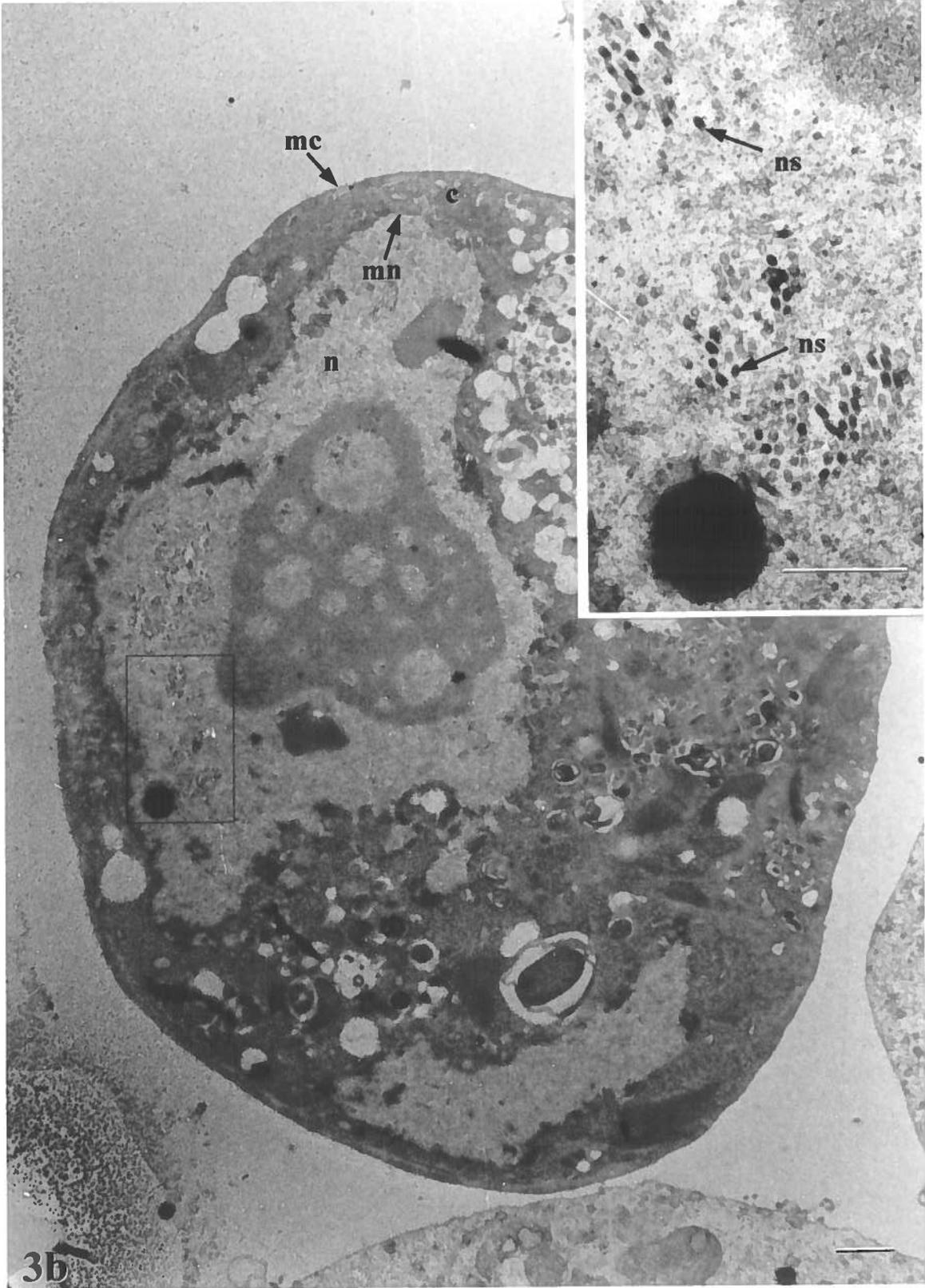
n = noyau

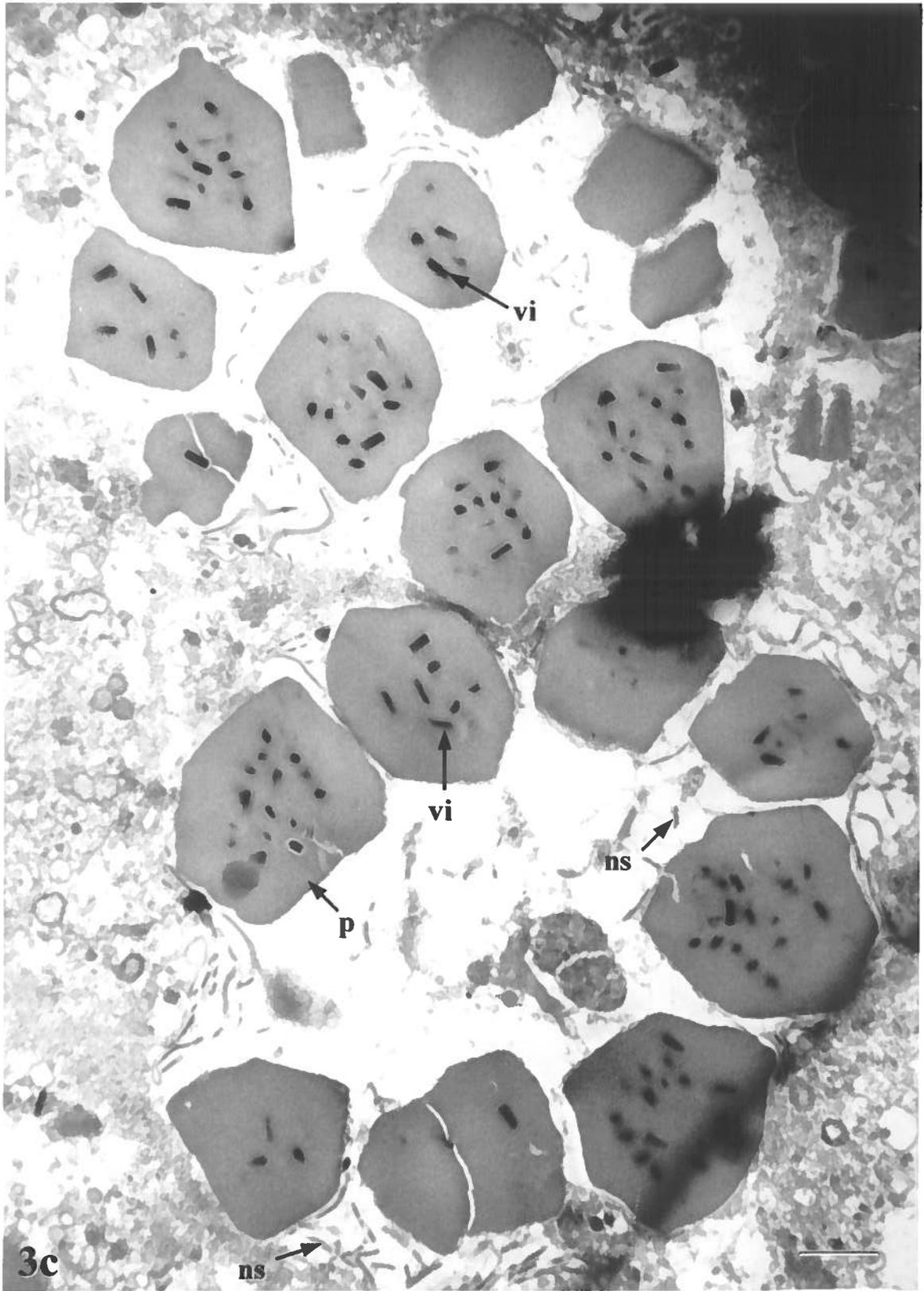




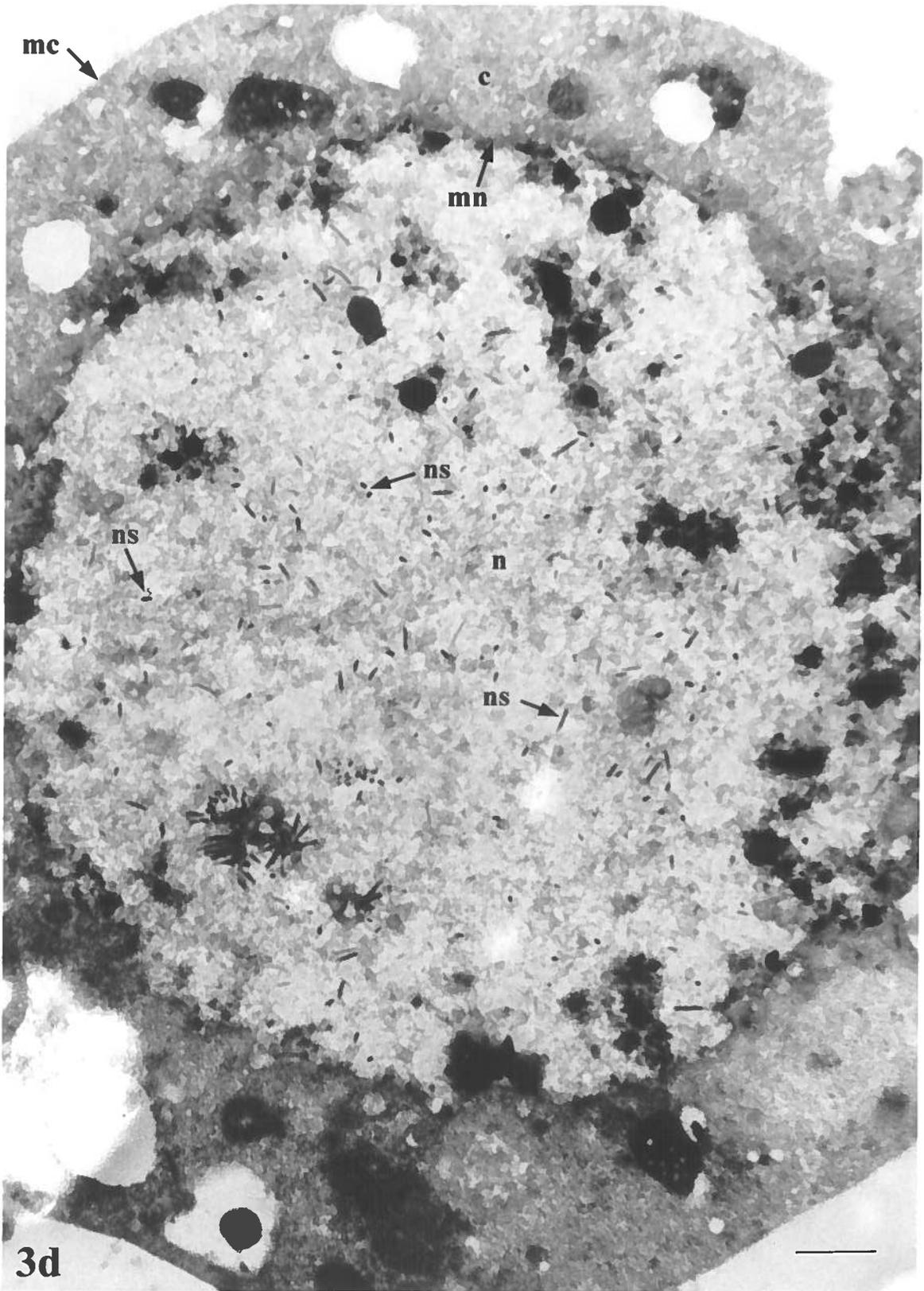
3a







3c



après 7 jours d'infection, ne contenaient aucun polyèdre, aucun virus enveloppé et aucune membrane synthétisée *de novo* (figure 11, 3b). En fait, la seule preuve d'infection virale dans ces cellules provenait de la présence de nucléocapsides simples à l'intérieur du noyau (figure 11, encadré 3b). Une amplification de GmMVPN passage 20 sur larves a seulement permis d'amplifier les caractéristiques observées dans les cellules infectées par GmMVPN passage 17 (figure 11, 3d). En effet, plusieurs cellules infectées par GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves ne contenaient aucun polyèdre, aucun virus enveloppé et aucune membrane synthétisée *de novo*, mais présentaient beaucoup de nucléocapsides simples. Par contre, plusieurs cellules de larves de *Galleria mellonella* infectées par GmMVPN passage 20 présentaient toutes les caractéristiques d'une cellule infectée par un virus MP (figure 11, 3c), comme une cellule infectée par GmMVPN passage 2 ou passage 7 (figure 11, 3a).

3.4.3. Évaluation par la technique de cytofluorométrie de la vitesse d'accumulation en phase G₂/M du cycle cellulaire des cellules infectées

En analysant le contenu en ADN de cellules par la technique de cytofluorométrie, il a déjà été démontré qu'une infection de cellules Sf9 par du AcMVPN à MI de 20 provoquait l'accumulation en phase G₂/M du cycle cellulaire des cellules infectées (Braunagel *et al.*, 1998). La cytofluorométrie est donc un bon moyen pour détecter une infection virale. Pour valider notre technique de cytofluorométrie, les mêmes conditions que celles utilisées par Braunagel *et al.* (1998) ont été testées, mais en utilisant du GmMVPN passage 1 au lieu du AcMVPN. Les résultats obtenus ont été représentés à la figure 12 (1A à 2D). Sur chacun de ces graphiques, 2 pics de fluorescence ont été obtenus. Le premier pic correspond au nombre de cellules en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire et le deuxième pic au nombre de cellules en phase G₂/M du cycle cellulaire, où les cellules contiennent 2 fois plus d'ADN que les cellules en phase G₀/G₁, et donc émettent une intensité de fluorescence (FL3) 2 fois plus élevée.

En analysant au cytomètre en flux les cellules Sf9 non-infectées incubées pendant 16h, 24h, 48h, 72h et 96h, nous avons obtenu 2 pics de fluorescence contenant à peu près le même nombre de cellules, ce qui signifie qu'environ la même quantité de cellules était en

phase G_0/G_1 et en phase G_2/M du cycle cellulaire pendant les 96 heures d'incubation (figure 12, 1A à 1E). Par contre, lorsque les cellules Sf9 étaient infectées à MI de 20 par GmMVPN passage 1 (figure 12, 2A à 2D), il n'y avait presque plus de cellules en phase G_0/G_1 du cycle cellulaire même après 16 heures d'infection. De plus, après 48 heures d'infection, toutes les cellules étaient arrêtées en phase G_2/M du cycle cellulaire. Après 72h d'infection, nous avons obtenu un 2^e pic de fluorescence plus large qu'après 48 heures d'infection, ce qui concorde avec l'accumulation de polyèdres à l'intérieur des cellules. Ces résultats sont très semblables à ceux obtenus par Braunagel *et al.*, ce qui nous a permis de valider notre méthode de cytofluorométrie.

Ensuite, nous avons vérifié si nous obtenions le même phénomène en utilisant les cellules Sf9 MM8-SF. Lorsque les cellules Sf9 MM8-SF non-infectées étaient utilisées (figure 12, 3A à 3E), autant de cellules étaient en phase G_2/M qu'en phase G_0/G_1 du cycle cellulaire même après 96h d'incubation, comme dans le cas des cellules Sf9 non-infectées. Par contre, lorsqu'infectées à MI de 20 par GmMVPN passage 1 (figure 12, 4A à 4D), ces cellules se sont accumulées en phase G_2/M , mais seulement après 72 heures d'infection, au lieu de 48 heures en utilisant les cellules Sf9. L'infection virale est donc plus rapide dans les cellules Sf9 que dans les cellules Sf9 MM8-SF.

Par la suite, les mêmes expériences ont été effectuées sur les cellules Sf9 et Sf9 MM8-SF, mais en les infectant à MI de 1. Avec les 2 lignées cellulaires, les cellules ont commencé à s'accumuler en phase G_2/M après 72h et 96h d'infection (résultats non montrés). Donc, pour vérifier si le nombre de passages de GmMVPN en culture cellulaire peut influencer la vitesse d'accumulation des cellules en phase G_2/M du cycle cellulaire, des temps d'incubation de 48h et 96h ont été choisis. Lorsque les cellules Sf9 ont été infectées pendant 48h par GmMVPN passage 2 ou passage 5 à MI de 1, plusieurs cellules étaient encore en phase G_0/G_1 du cycle cellulaire (figure 13, 1A et 1B). Par contre, lorsqu'infectées par GmMVPN passage 10 pendant 48 heures, presque toutes les cellules étaient arrêtées en phase G_2/M du cycle cellulaire et lorsqu'infectées par GmMVPN passage 15 ou passage 20 pendant 48 heures, toutes les cellules étaient déjà arrêtées en phase G_2/M du cycle cellulaire (figure 13, 1C à 1E). Après 96 heures d'incubation (figure

Figure 12: Vitesse d'accumulation en phase G₂/M du cycle cellulaire de cellules infectées par GmMVPN. Analyse du contenu en ADN des cellules par la technique de cytofluorométrie.

1 = Cellules Sf9 non-infectées.

2 = Cellules Sf9 infectées par GmMVPN passage 1. MI = 20.

3 = Cellules Sf9 MM8-SF non-infectées.

4 = Cellules Sf9 MM8-SF infectées par GmMVPN passage 1. MI = 20.

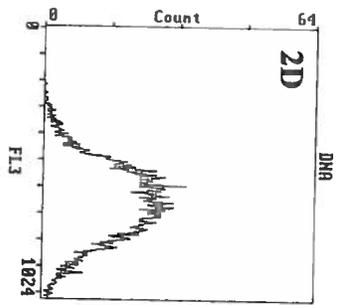
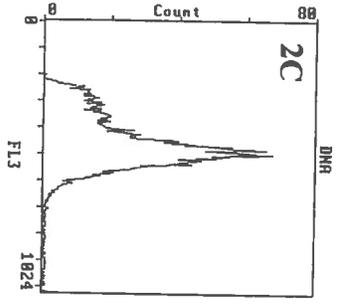
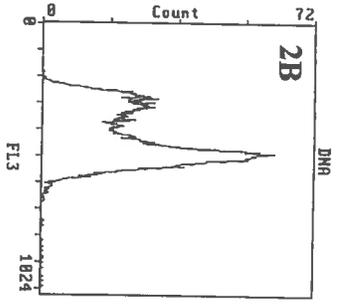
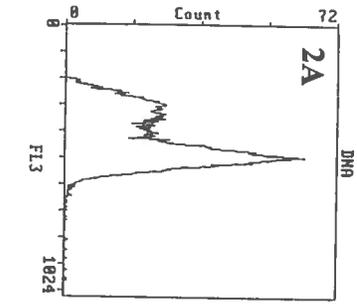
A, B, C, D et E = Observations après 16, 24, 48, 72 et 96 heures d'incubation, respectivement.

Les graphiques représentent le nombre de cellules comptées (count) ayant une intensité de fluorescence donnée captée par le 3^e détecteur de fluorescence (FL3) de l'appareil.

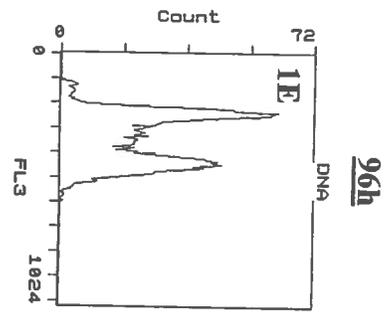
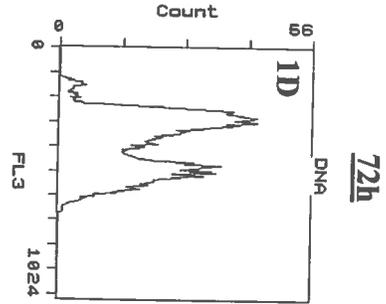
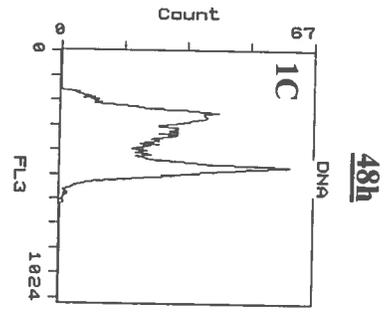
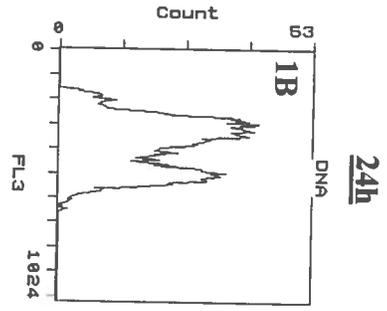
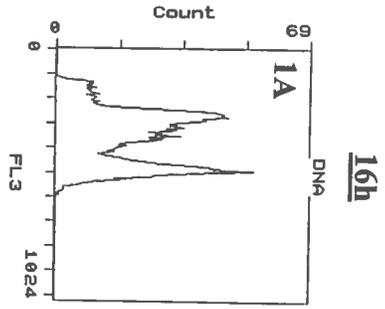
Dans chaque graphique, le premier pic de fluorescence représente le nombre de cellules en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire et le second pic de fluorescence représente le nombre de cellules en phase G₂/M du cycle cellulaire.

Les données sont obtenues à partir du décompte de 10 000 noyaux cellulaires.

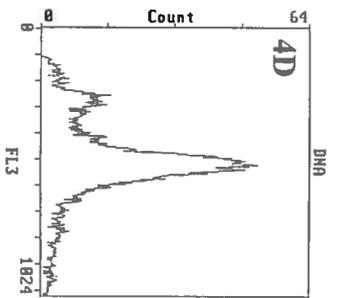
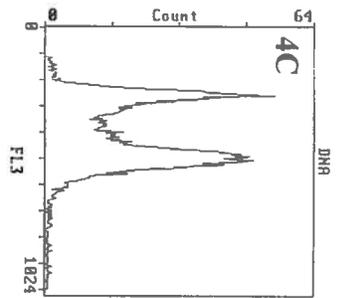
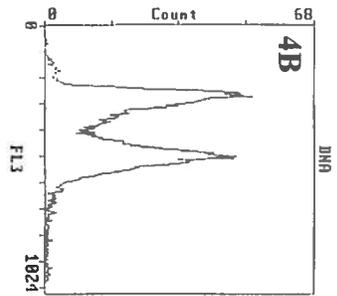
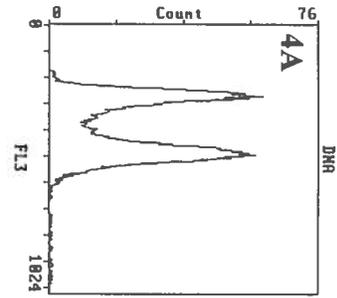
Sf9 infectées par GmMVPN passage 1



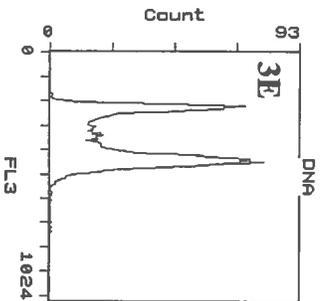
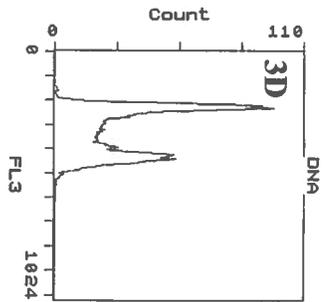
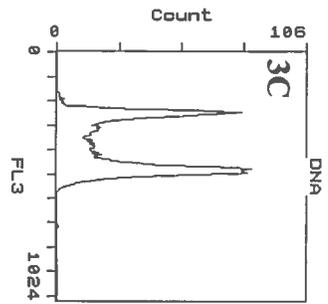
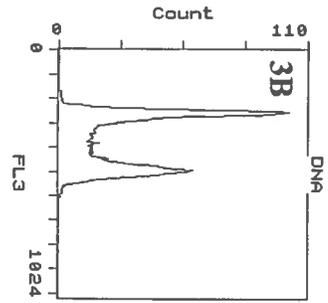
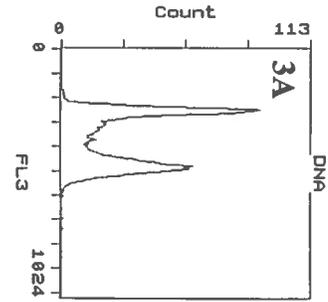
Sf9 non-infectées



Sf9 MM8-SF infectées
par GmMVPN passage 1



Sf9 MM8-SF non-infectées



16h

24h

48h

72h

96h

Figure 13: Effet de passages de GmMVPN sur l'infection virale, en terme de vitesse d'accumulation en phase G₂/M du cycle cellulaire de cellules infectées. Technique de cytofluorométrie. MI = 1.

Observations à 48 heures (1 et 3) et à 96 heures (2 et 4) post-infection.

1 et 2 = Cellules Sf9

3 et 4 = Cellules Sf9 MM8-SF

A, B, C, D et E = Infection par GmMVPN passages 2, 5, 10, 15 et 20, respectivement.

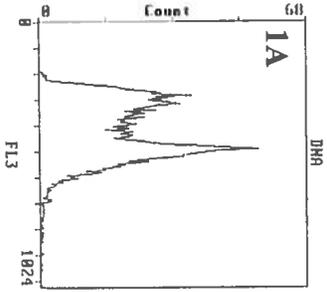
Les graphiques représentent le nombre de cellules comptées (count) ayant une intensité de fluorescence donnée captée par le 3^e détecteur de fluorescence (FL3) de l'appareil.

Dans chaque graphique, le premier pic de fluorescence représente le nombre de cellules en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire et le second pic de fluorescence représente le nombre de cellules en phase G₂/M du cycle cellulaire.

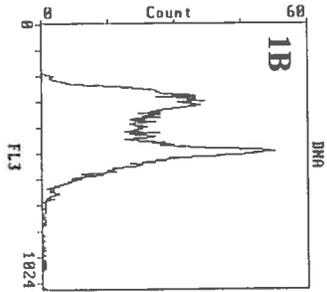
Les données sont obtenues à partir du décompte de 10 000 noyaux cellulaires.

Cellules Sf9 infectées

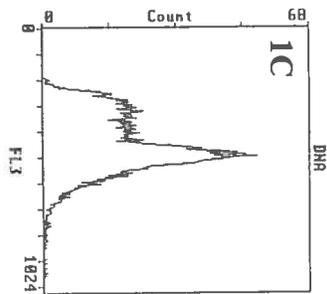
GmMVPN
Passage 2



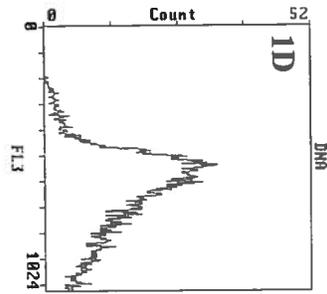
GmMVPN
Passage 5



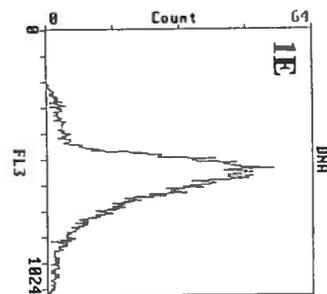
GmMVPN
Passage 10



GmMVPN
Passage 15

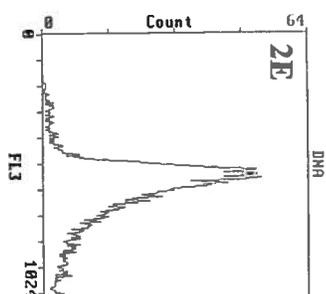
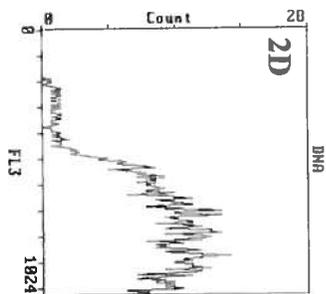
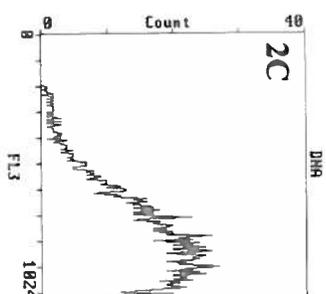
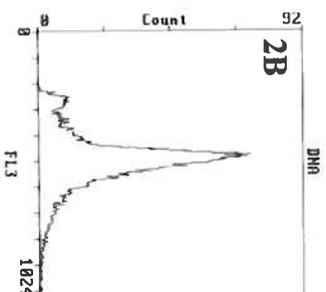
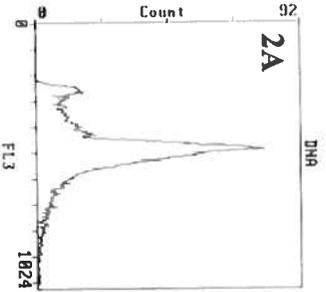


GmMVPN
Passage 20



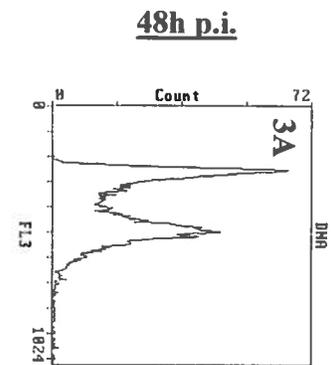
48h p.i.

96h p.i.

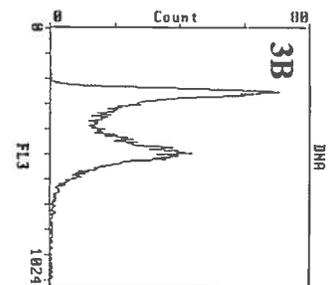


Cellules Sf9 MIM8-SF infectées

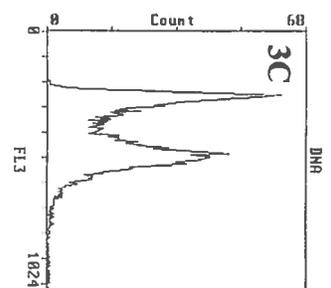
GmMVPN
Passage 2



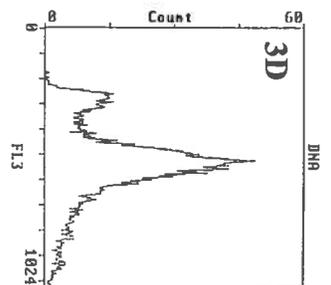
GmMVPN
Passage 5



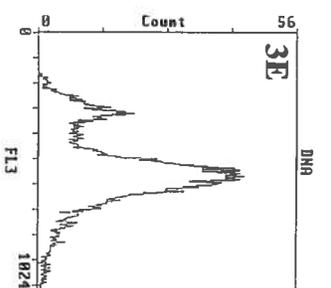
GmMVPN
Passage 10



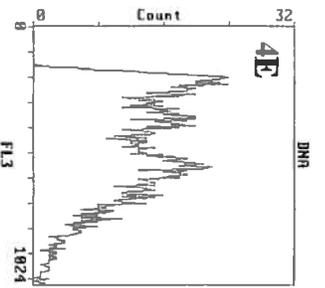
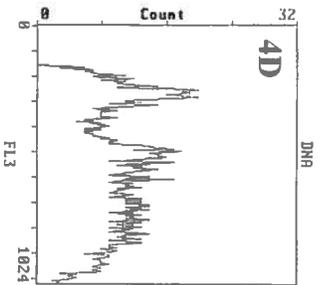
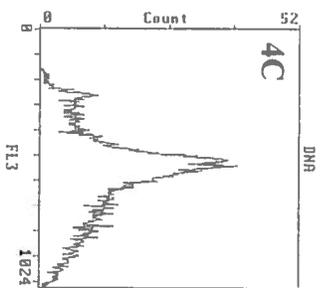
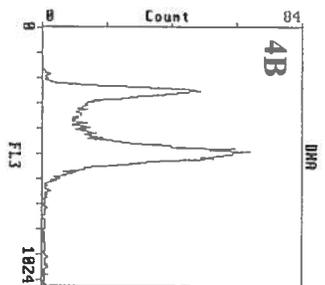
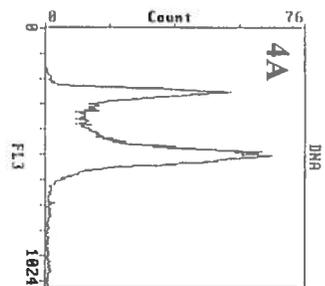
GmMVPN
Passage 15



GmMVPN
Passage 20



96h p.i.



13, 2A à 2E), la tendance était la même. En effet, alors qu'encore un peu de cellules infectées par GmMVPN passage 2 ou passage 5 pendant 96h étaient en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire, celles infectées par GmMVPN passages 10, 15 ou 20 étaient déjà toutes arrêtées en phase G₂/M du cycle cellulaire.

Lorsque les cellules Sf9 MM8-SF ont été infectées à MI de 1, nous avons observé la même tendance (figure 13, 3A à 4D). En effet, alors que les cellules Sf9 MM8-SF infectées par GmMVPN passage 2 ou passage 5 ne se sont pas accumulées en phase G₂/M du cycle cellulaire même après 96h d'incubation, celles infectées par GmMVPN passage 10 se sont arrêtées en phase G₂/M après 96h d'incubation et celles infectées par GmMVPN passage 15 ou passage 20 ont commencé à s'accumuler en phase G₂/M même après 48 heures d'incubation.

Donc, la vitesse d'accumulation en phase G₂/M du cycle cellulaire de cellules Sf9 et Sf9 MM8-SF infectées par du GmMVPN augmente considérablement en fonction des passages viraux, ce qui démontre l'accélération de la vitesse d'infection virale en fonction des passages de GmMVPN.

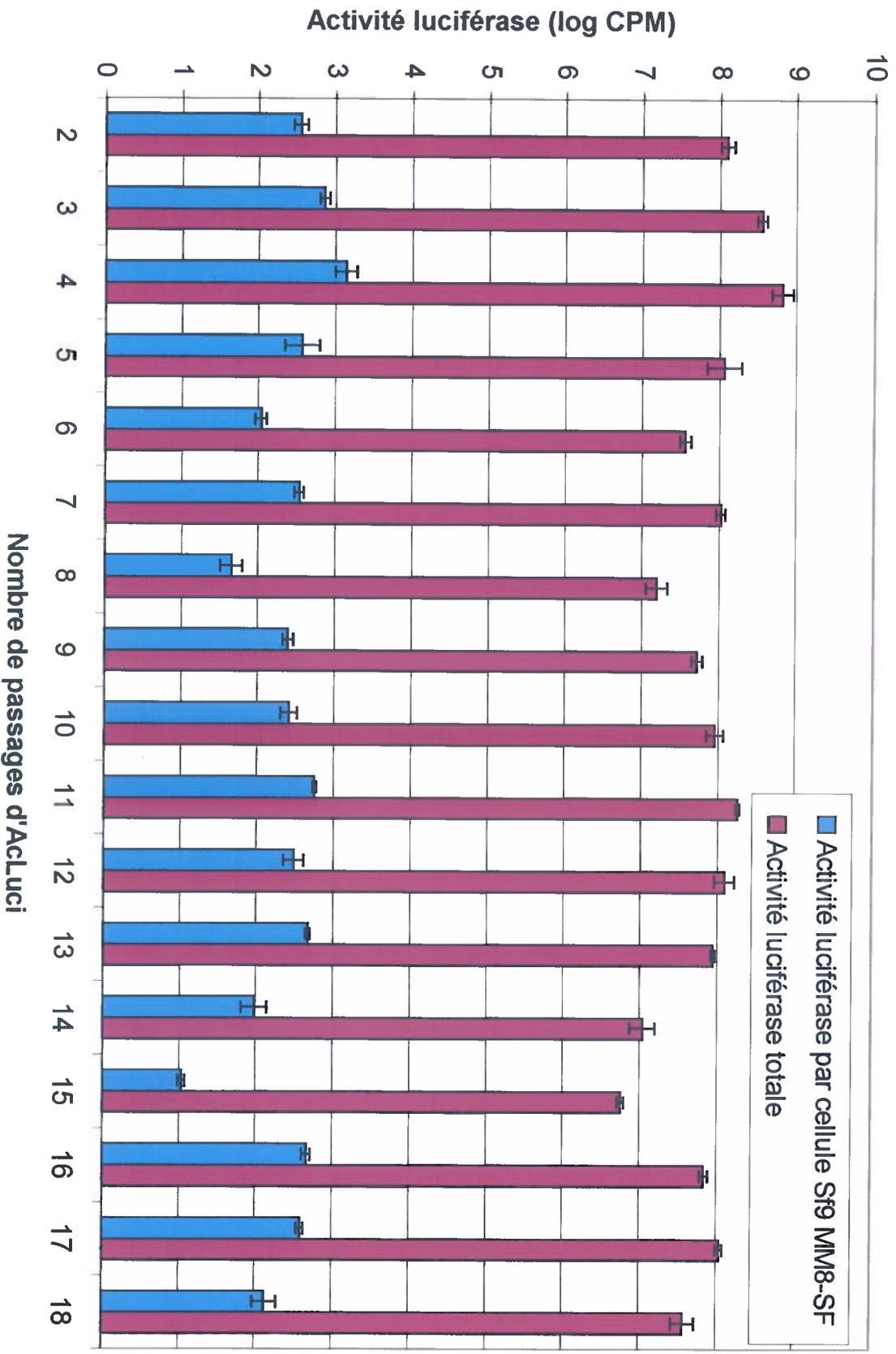
3.5. Effet de passages viraux sur l'expression de protéines

3.5.1. Expression de protéines recombinantes

L'activité luciférase totale a eu tendance à être assez stable en fonction des passages d'AcLuci, même si elle oscillait légèrement (figure 14). En effet, la valeur d'activité luciférase totale était près de la valeur de 10⁸ CPM lors de la plupart des 18 passages d'AcLuci effectués. Cependant, quelques valeurs étaient aberrantes, dont celles obtenues lors des passages 3 et 4 d'AcLuci, qui étaient significativement plus élevées que la tendance, et celles obtenues lors des passages 8, 14 et 15 d'AcLuci, qui étaient significativement plus basses que la tendance, car même leur écart type respectif se situait loin de la valeur de 10⁸ CPM. De plus, l'activité luciférase totale obtenue lors des passages 6 et 18 d'AcLuci était légèrement plus basse que la tendance. Il est à noter que toutes ces dernières valeurs étaient tout de même de 10⁵ à 10⁶ fois plus élevées que chez

Figure 14 : Effet de passages d'AcLuci sur l'expression de protéines recombinantes, en terme d'activité luciférase totale et par cellule. MI = 0,1. Observations à 7 jours post-infection.

Chaque valeur correspond à la moyenne de trois mesures d'activité luciférase. L'écart type entre ces trois répétitions a été ajouté au graphique (barres verticales avec extrémités horizontales).



les cellules Sf9 MM8-SF non-infectées, ce qui est une différence très significative (données non montrées).

L'activité luciférase par cellule Sf9 MM8-SF a également été déterminée lors de chaque passage d'AcLuci (figure 14). La même tendance a été observée. En effet, la valeur d'activité luciférase obtenue lors de la plupart des 18 passages viraux était stable à près de $10^{2.5}$ CPM/cellule. De plus, les valeurs obtenues lors des passages 3 et 4 étaient encore les plus élevées et celles obtenues lors des passages 8, 14 et 15 étaient les seules inférieures à 10^2 CPM/cellule. Les valeurs obtenues lors des passages 6 et 18 d'AcLuci étaient également un peu plus faibles que la tendance de $10^{2.5}$ CPM/cellule.

3.5.2. Expression de protéines de GmMVPN

3.5.2.1. Expression de protéines virales majeures et de nouvelles protéines virales

Une électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide 12% a été effectuée sur les protéines présentes à l'intérieur de 50 000 cellules Sf9 MM8-SF non-infectées ou infectées par les GmMVPN passages 2, 7, 12, 16, 17 ou 20 (figure 15). Les nombreuses bandes de protéines révélées ont été numérotées de 1 à 7 à la droite de la figure et représentent les protéines majeures présentes dans les cellules infectées, mais non dans les cellules témoins non-infectées. Ces bandes représentent donc des protéines virales. Comme les VPN contiennent plusieurs dizaines de protéines virales, il est évident qu'elles ne sont pas toutes présentes ici. Donc, seulement les protéines virales majeures ont pu être révélées.

Le poids moléculaire des protéines standards révélées au bleu de Coomassie 0,25% a été identifié à la gauche de la figure 15. Un graphique semi-logarithmique, représentant la relation entre le poids moléculaire des protéines standards et leur mobilité relative (Rf) par rapport à la migration totale du bleu de bromophénol, a été tracé (figure 16). La partie linéaire de la relation, correspondant à la section entre 21,5 et 45 kDa, a été utilisée pour évaluer le poids moléculaire des bandes de protéines virales révélées (Shapiro, Vinuela et Maizel, 1967; Weber et Osborn, 1969). Comme une même quantité de cellules totales (vivantes et mortes) a été déposée dans chaque puits, une modification dans l'intensité ou

l'épaisseur d'une bande de protéines démontre une modification d'expression de la protéine en question (figure 15).

Ainsi, l'expression de la protéine majeure des polyèdres, soit la polyédrine évaluée à 33,3 kDa (bande 4), a diminué significativement en fonction des passages de GmMVPN (figure 15). Une autre bande de protéines ayant diminué d'intensité en fonction des passages viraux est représentée par la bande 7. Le poids moléculaire correspondant à cette bande n'a pas pu être évalué avec précision, mais étant donné l'intensité élevée de la bande, il est fort probable que la protéine p10 soit à l'intérieur, car la p10 est une protéine hyperexprimée. Donc, si cette bande est la p10, l'expression de cette protéine aurait également diminué à partir du passage 12 de GmMVPN. Cependant, l'expression de quelques protéines virales reliées aux virions, soit la p39 évaluée à 40,3 kDa (bande 2) et les protéines de la bande 5 (p25 de la capsid, VI-E25 et FP25K) évaluées à 26 kDa, est demeurée presque stable en fonction des passages de GmMVPN (figure 15).

De plus, deux protéines virales ont été exprimées seulement à partir du passage 16 de GmMVPN (colonne f), pour devenir en concentration très importante au 20^e passage viral (colonne h). La première est une protéine évaluée à 38,8 kDa (bande 3) et la seconde n'a pas pu être évaluée avec précision, mais elle a tout de même été estimée à environ 55 à 60 kDa (bande 1). Ces protéines n'ont pas été identifiées.

L'expression de plusieurs protéines de faible poids moléculaire est demeurée plus ou moins stable en fonction des passages du virus (bandes 6). La protéine VI-E18 pourrait faire partie de ces bandes, mais aucune autre protéine importante de VPN ne correspond à ces poids moléculaires. De plus, ces bandes pourraient être des protéines cellulaires, car elles semblent présentes en faible concentration dans les cellules non-infectées (figure 15, colonne b).

Finalement, plusieurs autres protéines sont normalement exprimées par les GmMVPN, dont les protéines de capsid p80, p91 et pp78/83, la glycoprotéine d'enveloppe gp64 du virus extracellulaire, la p74 et les protéines d'enveloppe VI-E56 et E66 du virus inclus,

mais elles n'ont pas été exprimées en concentration suffisante pour former une bande de protéines distincte sur le gel de SDS-polyacrylamide.

3.5.2.2. Expression de polyédrique

Avant d'effectuer les immunobuvardages de type Western, une évaluation de la qualité des antisérums (ou sérums post-immunisation) produits chez les six cobayes immunisés a été effectuée par la technique de double immuno-diffusion.

Pour vérifier s'il y avait présence d'anticorps précipitants dans l'antisérum des cobayes immunisés, les sérums pré- et post-immunisation de chaque cobaye ont été testés contre leurs antigènes respectifs injectés (figure 17, B et D). Seulement les sérums post-immunisation (ou antisérums) de chaque cobaye ont formé un précipité avec leurs antigènes respectifs, et non les sérums pré-immunisation, ce qui signifie que tous les cobayes ont réagi aux antigènes injectés. Par contre, les antisérums des cobayes #4 et #5 ont formé une bande de précipitation très faible avec leurs antigènes, ce qui signifie que ces cobayes ont moins bien réagi à l'immunisation que les 4 autres cobayes. De plus, il est à noter qu'aucune réaction positive n'a été décelée lorsque les polyèdres non-dissous ont été utilisés (figure 17, A et C), probablement dû au fait que les polyèdres non-dissous étaient trop gros pour diffuser dans l'agarose.

Par la suite, pour vérifier si les antisérums produits étaient spécifiques aux antigènes de GmMVPN qui ont été injectés aux cobayes, l'antisérum de chaque cobaye a été testé contre différents antigènes, soit des antigènes viraux dissous, des antigènes cellulaires ou larvaires et des antigènes viraux non-dissous. Selon la figure 18, il est évident que l'antisérum de tous les cobayes a formé un précipité seulement avec les antigènes de polyèdres dissous, démontrant la spécificité des antisérums produits.

Un immunobuvardage de type Western a ensuite été effectué sur les mêmes échantillons que lors de l'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide de la section 3.5.2.1. Comme une même quantité de cellules totales (vivantes et mortes) a été déposée dans chaque puits (50 000 cellules par puits), une modification dans l'intensité ou l'épaisseur d'une bande

de protéines révélée démontre une modification d'expression de la protéine en question. Aucune bande protéique n'a été révélée lorsque les protéines ont été traitées à l'aide d'un sérum de cobaye pré-immunisation dilué 1/3000 (figure 19A). Par contre, en utilisant un antisérum dilué 1/3000 du cobaye #2, immunisé contre des polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*, quelques bandes de protéines ont été révélées dans les échantillons provenant de cellules infectées par les GmMVPN de différents passages (figure 19B). La seule bande démontrant une forte intensité était sans aucun doute la bande de la polyédrine. Nous nous attendions à ce que l'antisérum du cobaye #2 utilisé ici réagisse surtout contre la polyédrine, étant donné que cette protéine est de loin la protéine la plus abondante dans des polyèdres dissous. En fonction des passages de GmMVPN, l'intensité de la bande de polyédrine a diminué un peu au 12^e passage viral (colonne d) et a beaucoup diminué aux passages 16 à 20 de GmMVPN (colonnes e à g). Donc, l'expression de la polyédrine a diminué considérablement en fonction des passages de virus, et ce à partir du passage 12 de GmMVPN.

3.5.2.3. Expression de protéines virales

Les mêmes protéines transférées sur membrane de PVDF ont été révélées par la technique d'immunobuvardage de type Western en utilisant l'antisérum de cobaye #6 dilué 1/3000, c'est-à-dire l'antisérum du cobaye ayant le mieux réagi à l'immunisation contre les protéines de virions et de polyèdres dissous produits *in vitro* sur les cellules Sf9 MM8-SF (figure 19C). Les nombreuses bandes de protéines révélées ont été numérotées de 1 à 12 à la droite de la figure et représentent les protéines majeures présentes dans les cellules infectées, mais non dans les cellules témoins non-infectées. Ces bandes représentent donc des protéines virales. Comme les VPN contiennent plusieurs dizaines de protéines virales, il est évident qu'elles ne sont pas toutes présentes ici. Donc, seulement les protéines virales majeures ont pu être révélées. Nous nous attendions à ce que l'immunobuvardage de type Western effectué en utilisant l'antisérum de cobaye #6 (figure 19C) révèle plus de bandes virales qu'en utilisant l'antisérum de cobaye #2 (figure 19B), car le cobaye #6 a été immunisé contre des polyèdres dissous et des virions, alors que le cobaye #2 a été immunisé seulement contre des polyèdres dissous.

Le poids moléculaire des protéines standards révélées au bleu de Coomassie 0,05% a été identifié à la gauche de la figure 19C et a été évalué à l'aide d'un graphique semi-logarithmique, représentant la relation entre le poids moléculaire des protéines standards et leur mobilité relative (Rf) par rapport à la migration totale du bleu de bromophénol, très semblable à celui de la figure 16. La partie linéaire de la relation, correspondant à la section entre 21,5 et 45 kDa, a été utilisée pour évaluer le poids moléculaire des bandes de protéines virales révélées (Shapiro, Vinuela et Maizel, 1967; Weber et Osborn, 1969). Comme une même quantité de cellules totales (vivantes et mortes) a été déposée dans chaque puits (50 000 cellules par puits), une modification dans l'intensité ou l'épaisseur d'une bande de protéines démontre une modification d'expression de la protéine en question (figure 19C).

Ainsi, selon la figure 19C, l'expression des protéines structurales des polyèdres a diminué significativement en fonction des passages de GmMVPN. En effet, comme démontré par les techniques d'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (figure 15) et d'immunobuvardage de type Western en utilisant l'antisérum du cobaye #2 (figure 19B), l'expression de la polyédrine, évaluée à 33,0 kDa (bande 6 de la figure 19C), a diminué considérablement à partir du passage 12 de GmMVPN (colonne d). L'épaisseur de la bande concorde bien avec le fait que la polyédrine est une protéine hyperexprimée. L'autre bande de protéines ayant diminué d'intensité en fonction des passages viraux est représentée par la bande 12. Le poids moléculaire correspondant à cette bande n'a pas pu être évalué avec précision, mais il est fort probable que cette bande contienne la protéine p10 étant donné la forte intensité de révélation. Donc, si cette bande est la p10, l'expression de cette protéine aurait également diminué à partir du passage 12 de GmMVPN. L'autre protéine reliée aux polyèdres, soit la protéine d'enveloppe p32-36 (protéine EP), doit également être présente dans la bande 6, soit la bande contenant la polyédrine, car la polyédrine et la protéine EP ont presque le même poids moléculaire. Comme la protéine EP est exprimée en assez faible concentration dans les cellules infectées (Gombart *et al.*, 1989; Gross, Russell et Rohrmann, 1994), elle ne doit pas influencer l'intensité de la bande de polyédrine.

Par contre, l'expression de quelques protéines reliées aux virions est demeurée beaucoup plus stable en fonction des passages de GmMVPN (figure 19C). La première protéine est la p39, qui a été évaluée à 40,4 kDa (bande 5) et qui est la protéine majeure de la capsidie des virus extracellulaires (VEC) et des virus inclus (VI). Comme la p39 est la protéine majeure des nucléocapsides, il est normal que l'intensité de cette bande soit aussi élevée. Il est intéressant d'observer que la bande contenant la p39 est révélée autant ou même plus intensément que la bande de polyédrine en immunobuvardage de type Western, alors que c'est le contraire après coloration au bleu de Coomassie sur gel de SDS-polyacrylamide, probablement dû aux propriétés antigéniques très élevées de la p39 par rapport à la polyédrine (les cobayes immunisés ont mieux réagi contre la p39 que contre la polyédrine). Il est à noter que la bande 5 pourrait également contenir la protéine de tégument gp41, mais Pearson *et al.* (1988) et Blissard *et al.* (1989) avaient démontré que la p39 forme la bande de protéines la plus intensément colorée au bleu de Coomassie après l'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide effectuée sur les protéines des virions (excluant les polyèdres). Donc, la gp41 doit avoir une faible influence sur l'intensité de la bande contenant la p39 (bande 5). La seconde protéine a été estimée à 27,4 kDa (bande 7) et est probablement la VI-EC27 ayant un rôle de cycline, car c'est la seule protéine virale répertoriée ayant un poids moléculaire de 27 kDa. D'autres protéines ont été évaluées à 25,6 kDa (bande 8) et à 24,6 kDa (bande 9). Selon leurs poids moléculaires, chacune de ces 2 bandes pourrait contenir la protéine structurale de capsidie p25 et/ou la protéine VI-E25 et/ou la protéine FP25K. Dans ces 2 bandes, la présence de la protéine VI-E25 est très probable, étant donné que cette p25 forme un doublet de deux bandes séparées par 1 kDa en immunobuvardage de type Western (Russell et Rohrmann, 1993). Finalement, une bande très floue était également présente à environ 19 kDa (bande 11). Cette bande pourrait contenir la protéine d'enveloppe VI-E18 du virus inclus. Il est à noter que selon le graphique 19C, seulement les GmMVPN du passage 17 ont exprimé une quantité plus faible de protéines reliées aux virions (bandes 5, 7, 8 et 9).

Figure 15: Effet de passages de GmMVPN sur l'expression de protéines virales majeures et de nouvelles protéines virales. Technique d'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide.

Les protéines ont été séparées sur un gel de SDS-polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes avec 0,1% de SDS pendant 1h30 à 100V et ont été colorées dans 0,25% de bleu de Coomassie.

a = Standards de poids moléculaires pour SDS-PAGE de BIO-RAD, #161-0314.

b = 50 000 cellules Sf9 MM8-SF non-infectées.

c, d, e, f, g et h = 50 000 cellules Sf9 MM8-SF infectées par GmMVPN passages 2, 7, 12, 16, 17 et 20, respectivement. MI = 0,1. Sept jours post-infection.

<u>Bande</u>	<u>Identification</u>
1	protéine non identifiée
2	p39
3	protéine non identifiée
4	polyédrine
5	p25 de capside, VI-E25 et FP25K
6	VI-E18 et/ou protéines cellulaires
7	p10

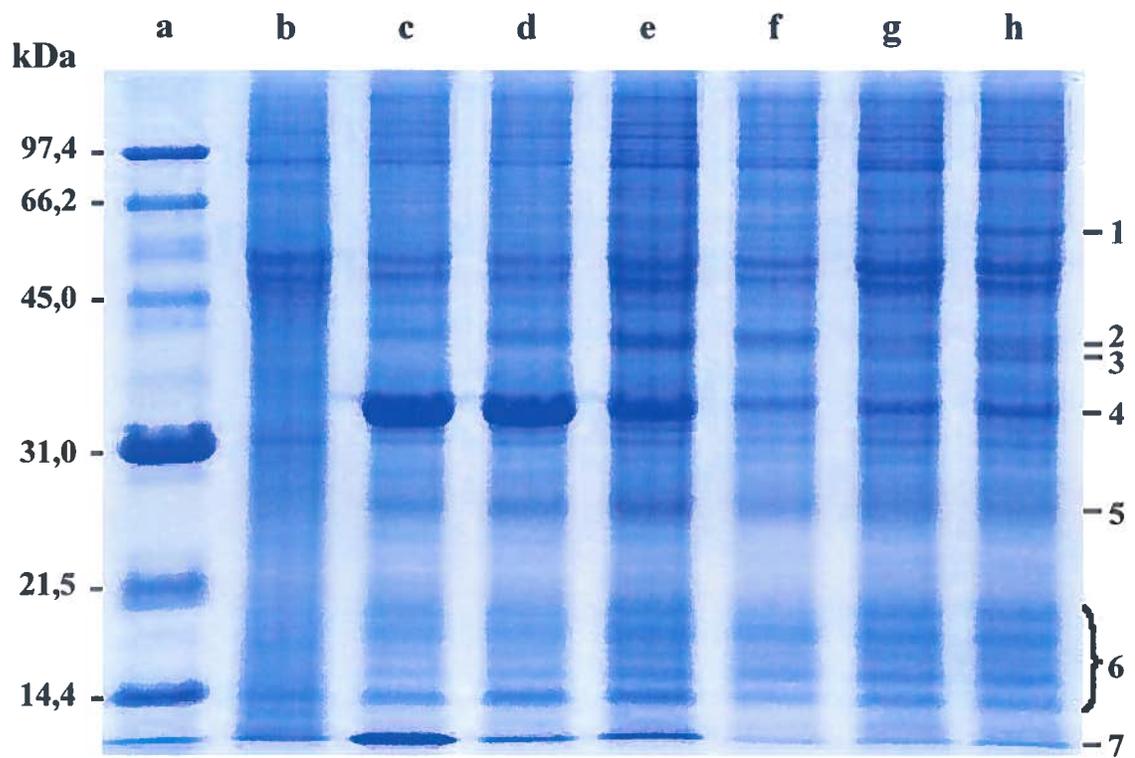


Figure 16: Relation entre le poids moléculaire des protéines standards et leur mobilité relative par rapport à la migration totale du bleu de bromophénol sur gel de SDS-polyacrylamide 12%.

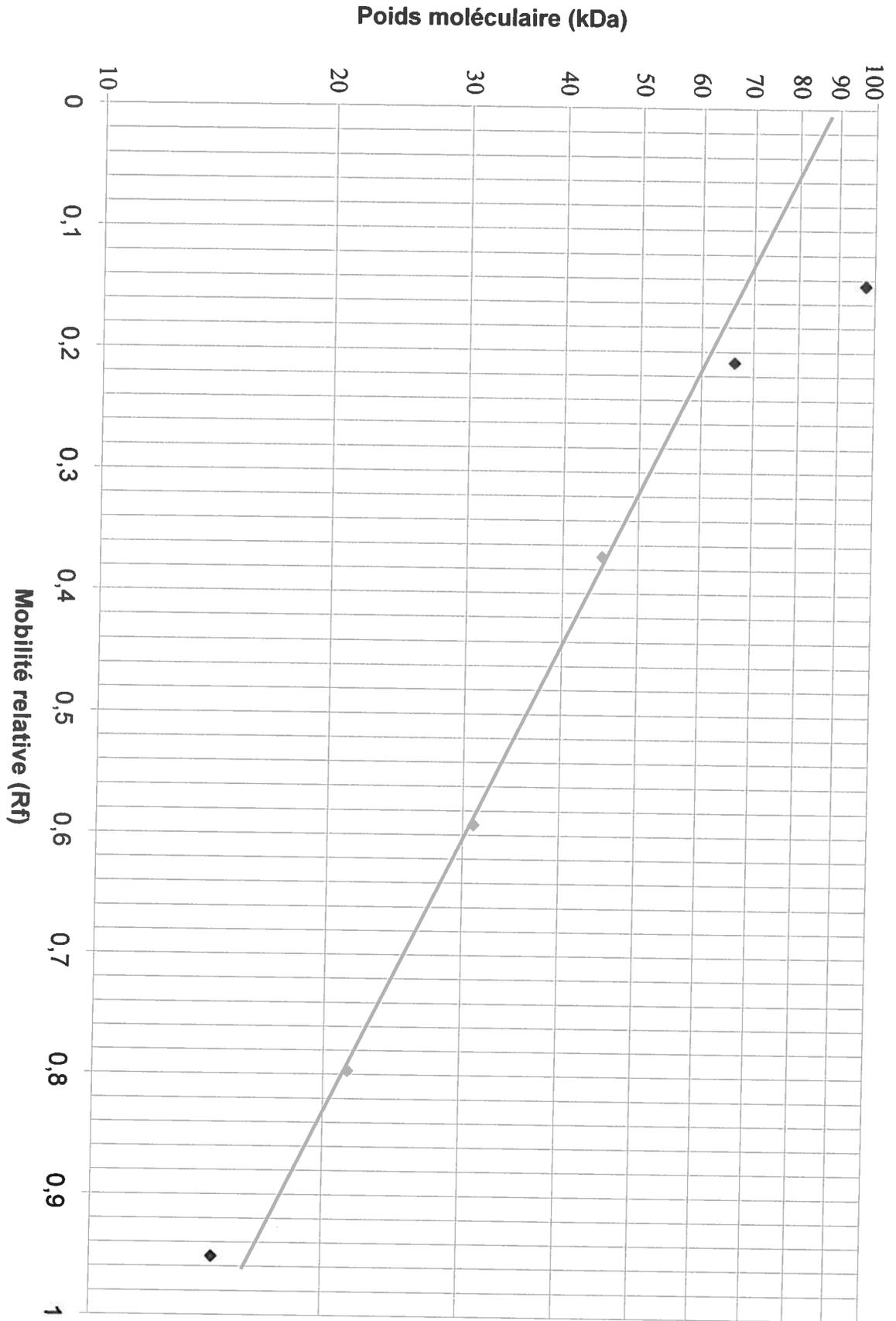


Figure 17: Vérification de la présence d'anticorps précipitants dans l'antisérum des six cobayes immunisés contre le GmMVPN. Technique de double immuno-diffusion sur agarose Seakem ME 1%.

Un exemple d'arc de précipitation, composé de complexes anticorps-antigènes précipités colorés en bleu par une solution de bleu de Coomassie 0,05%, est identifié par une flèche.

Antigènes (Ag) (puits centraux)

A : Polyèdres non-dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*.

B : Polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*.

C : Mélange de polyèdres non-dissous et de virions de GmMVPN produits *in vitro* sur la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF.

D : Mélange de polyèdres dissous et de virions de GmMVPN produits *in vitro* sur la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF.

Antisérums (AS) de cobaye testés (puits périphériques)

#1AV, #2AV et #3AV : Sérum pré-immunisation des cobayes #1, #2 et #3, respectivement.

#1AP, #2AP et #3AP : Antisérum produit par les mêmes cobayes (#1, #2 et #3, respectivement), injectés par des polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*.

#4AV, #5AV et #6AV : Sérum pré-immunisation des cobayes #4, #5 et #6, respectivement.

#4AP, #5AP et #6AP : Antisérum produit par les mêmes cobayes (#4, #5 et #6, respectivement), injectés par un mélange de polyèdres dissous et de virions de GmMVPN produits *in vitro* sur la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF.

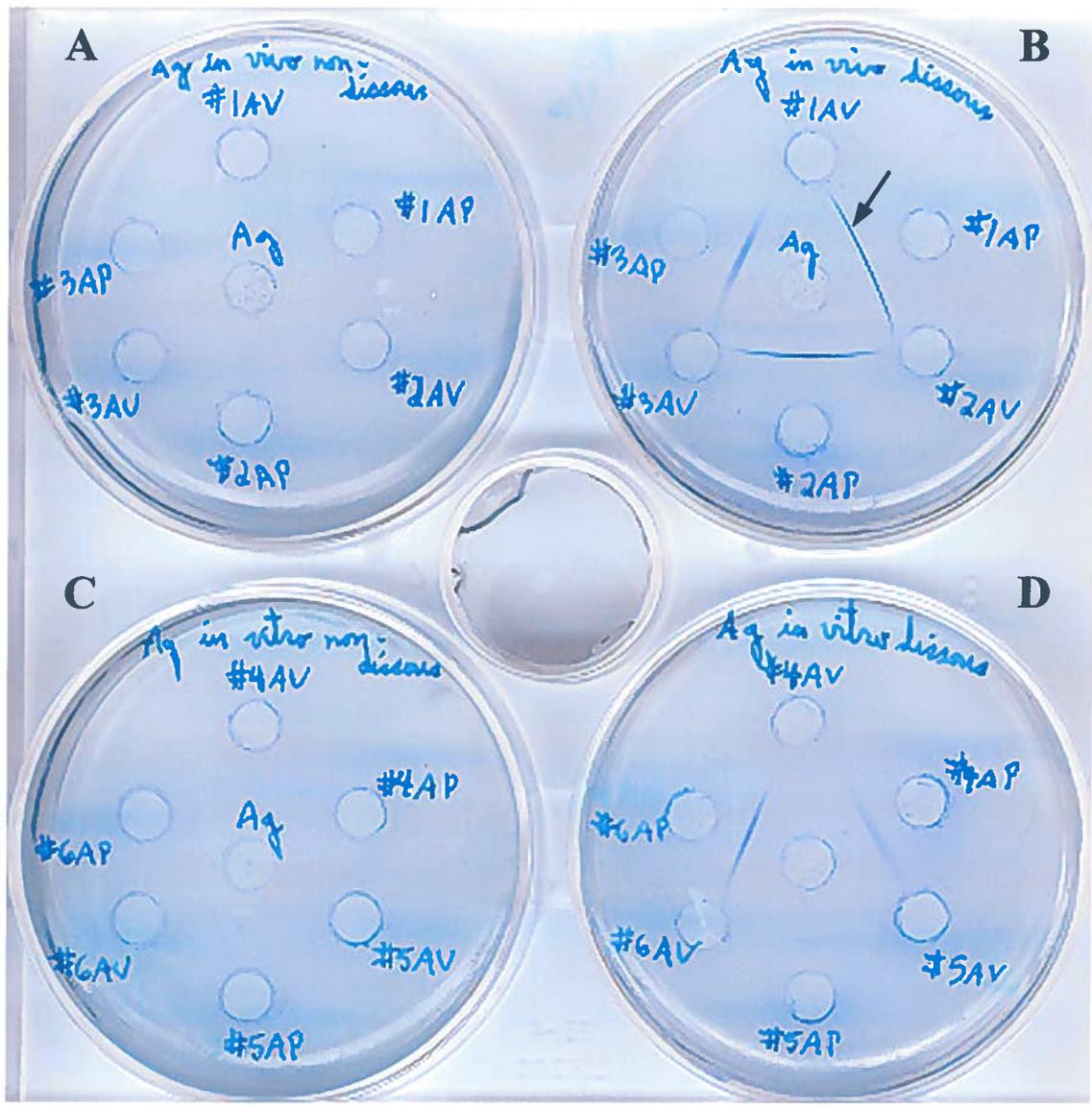


Figure 18: Vérification de la spécificité des anticorps précipitants présents dans l'antisérum des six cobayes immunisés contre le GmMVPN. Technique de double immuno-diffusion sur agarose Seakem ME 1%.

Un exemple d'arc de précipitation, composé de complexes anticorps-antigènes précipités colorés en bleu par une solution de bleu de Coomassie 0,05%, est identifié par une flèche.

Antigènes (Ag) (puits périphériques)

- Ag1 : Polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*.
- Ag2 : Broyat de larves de *Galleria mellonella* non-infectées (protéines larvaires).
- Ag3 : Polyèdres non-dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*.
- Ag4 : Mélange de polyèdres dissous et de virions de GmMVPN produits *in vitro* sur la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF.
- Ag5 : Cellules Sf9 MM8-SF non-infectées et détruites aux ultrasons (protéines cellulaires).
- Ag6 : Mélange de polyèdres non-dissous et de virions de GmMVPN produits *in vitro* sur la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF.

Antisérums (AS) de cobaye testés (puits centraux)

- A, B, et C* : Antisérums produits par les cobayes #1, #2 et #3, respectivement, immunisés contre des polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*.
- D, E et F* : Antisérums produits par les cobayes #4, #5 et #6, respectivement, immunisés contre un mélange de polyèdres dissous et de virions de GmMVPN produits *in vitro* sur la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF.

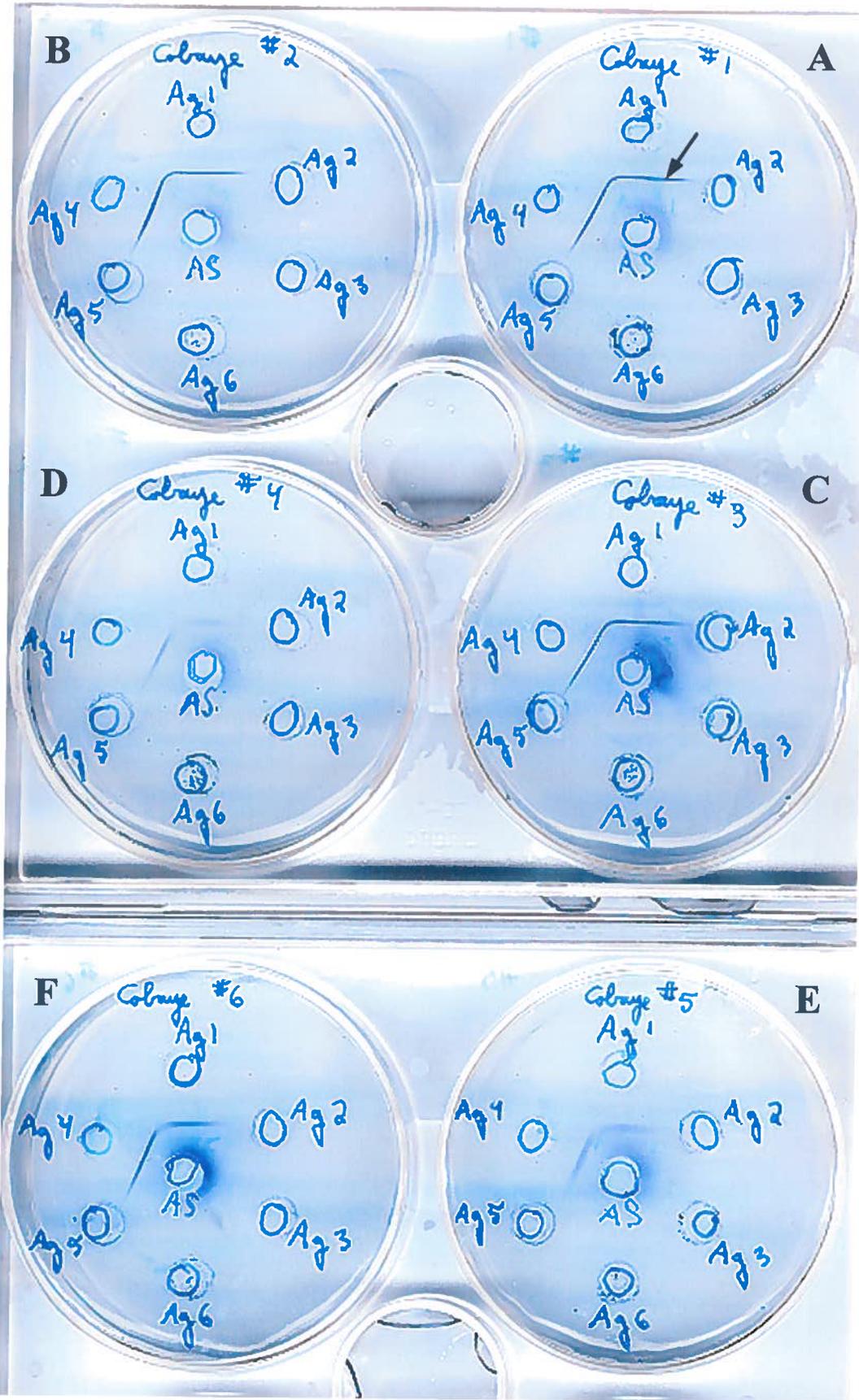


Figure 19: Effet de passages de GmMVPN sur l'expression de la polyédrine et de plusieurs autres protéines virales. Technique d'immunobuvardage de type Western.

Les protéines, séparées par la technique d'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes avec 0,1% de SDS pendant 1h30 à 100V et transférées sur membrane de PVDF pendant une nuit à 35V, ont été traitées avec un anticorps primaire de cobaye anti-protéines et un deuxième anticorps anti-IgG de cobaye couplé à la peroxydase de raifort. Les protéines ont ensuite été révélées avec le substrat de la peroxydase 4-chloro-1-naphtol 0,5 mg/mL dans 0,01% de peroxyde d'hydrogène.

Anticorps primaires anti-protéines utilisés :

- A) Sérum de cobaye pré-immunisation, dilué 1 dans 3000 (témoin négatif).
- B) Antisérum produit chez le cobaye #2, immunisé contre des polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*, dilué 1 dans 3000.
- C) Antisérum produit chez le cobaye #6, immunisé contre un mélange de polyèdres dissous et de virions de GmMVPN produits *in vitro* sur la lignée cellulaire Sf9 MM8-SF, dilué 1 dans 3000.

Échantillons :

a = 50 000 cellules Sf9 MM8-SF non-infectées.

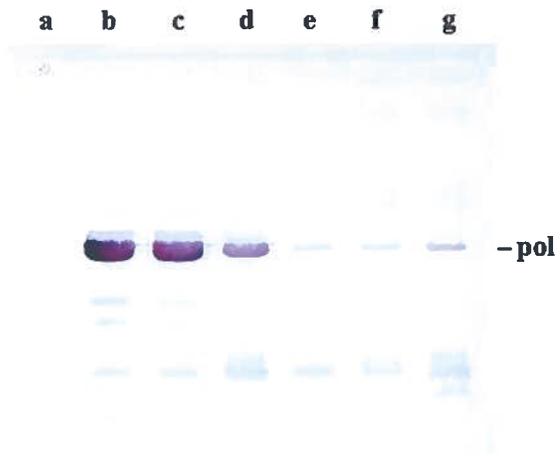
b, c, d, e, f et g = 50 000 cellules Sf9 MM8-SF infectées par GmMVPN passages 2, 7, 12, 16, 17 et 20, respectivement. MI = 0,1. Sept jours post-infection.

<u>Bande</u>	<u>Identification</u>
1	protéine non identifiée
2	p91, p80 et/ou pp78/83
3-4	gp64, p74, VI-E56 et/ou VI-E66
5	p39
6	polyédrine (pol)
7	VI-EC27
8-9	p25 de capside, VI-E25 et FP25K
10	deuxième forme de FP25K (23 kDa)
11	VI-E18
12	p10

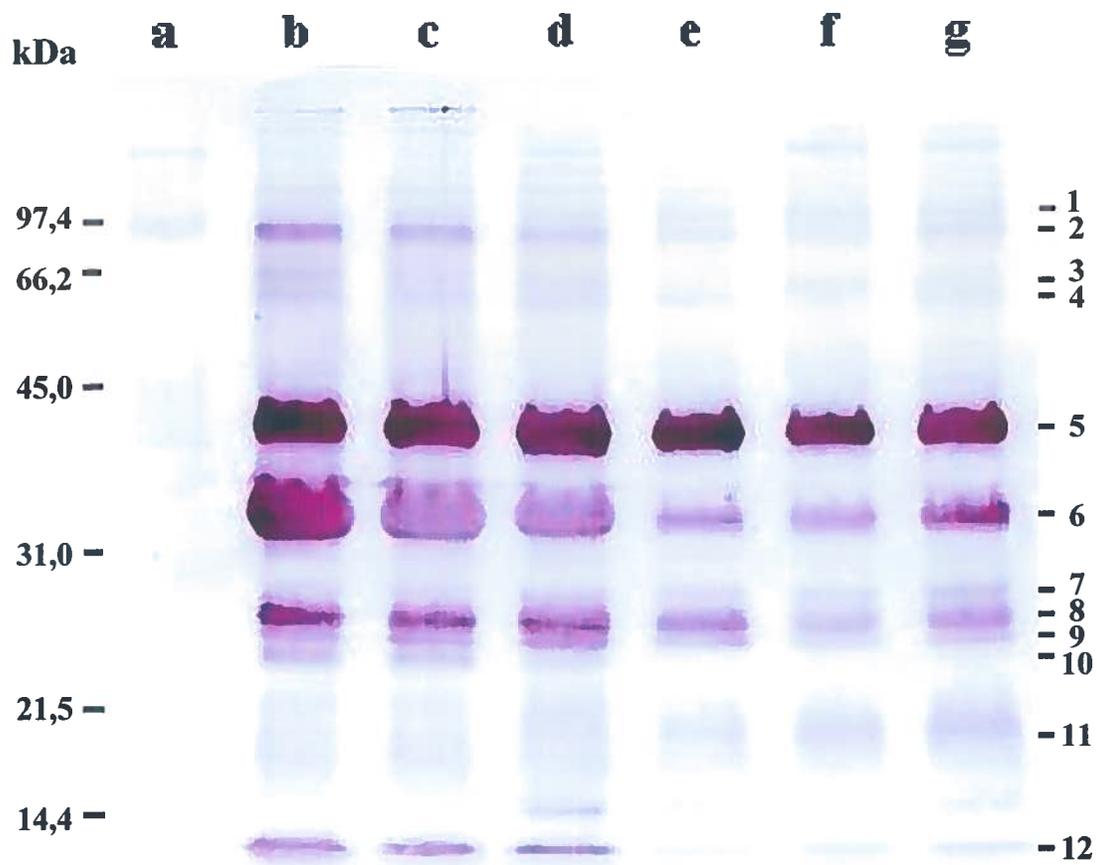
A)



B)



C)



L'expression d'une autre protéine a diminué à partir du passage 12 de GmMVPN et était même absente à partir du 16^e passage viral. Cette protéine a été évaluée à 23,2 kDa (bande 10). Étant donné que cette bande a disparu en fonction des passages de GmMVPN, il est très probable qu'elle représente la protéine de 23 kDa qui est la deuxième forme de la protéine FP25K.

Finalement, étant donné que la courbe standard (figure 16) n'était pas linéaire pour l'évaluation du poids moléculaire des protéines de hauts poids moléculaires (figure 19C, bandes 1 à 4) et que de nombreuses protéines des VPN ont des poids moléculaires élevés, l'identification des protéines présentes dans les bandes 1 à 4 de la figure 19C était difficile. En effet, les protéines de capsid p80, p91 et pp78/83, la glycoprotéine d'enveloppe gp64 du virus extracellulaire, la p74 et les protéines d'enveloppe VI-E56 et E66 du virus inclus pourraient être présentes dans les bandes 2 à 4 de la figure 19C. C'est pourquoi ces protéines virales n'ont pas été analysées.

3.5.2.4. Expression de polyédrique non-cristallisée

Pour vérifier si la diminution du nombre de polyèdres par cellule infectée en fonction des passages viraux était due à un problème de cristallisation de la polyédrique, des cellules Sf9 MM8-SF non-infectées ou infectées par GmMVPN passages 1, 7, 12 ou 19 ont été traitées en présence de l'antisérum dilué 1/100 du cobaye #2, immunisé contre les polyèdres dissous produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella* (figure 20). Cet antisérum a été utilisé étant donné qu'il a réagi principalement contre la polyédrique en immunobuvardage de type Western (figure 19B).

Alors qu'aucun dépôt brun foncé n'était présent à l'intérieur des cellules non-infectées (figure 20E), les cellules contenant beaucoup de polyèdres, comme celles infectées par GmMVPN passage 1 et passage 7, ont été colorées très fortement en brun foncé, démontrant que beaucoup de polyédrique non-cristallisée était présente dans ces cellules infectées (figure 20, A et B). Certaines cellules infectées par GmMVPN passage 12 ou passage 19 contenaient également des dépôts brun foncé, mais les cellules à l'intérieur desquelles se trouvaient moins de polyèdres n'ont généralement pas été colorées (figure

Figure 20: Effet de passages de GmMVPN sur l'expression de polyédrine non-cristallisée. Technique d'immunoperoxydase.

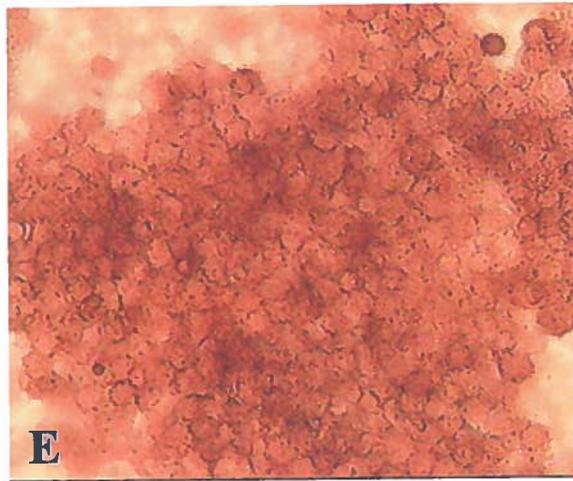
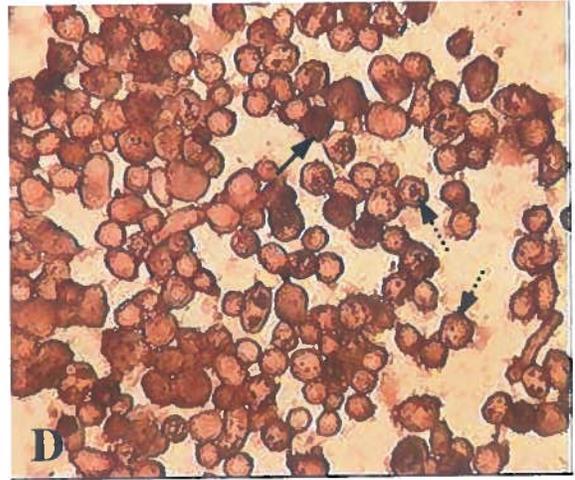
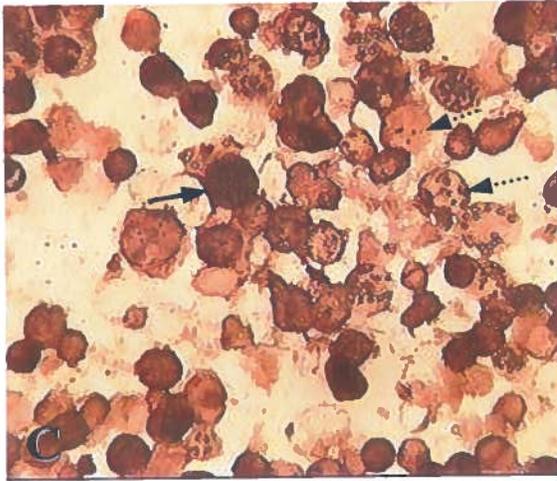
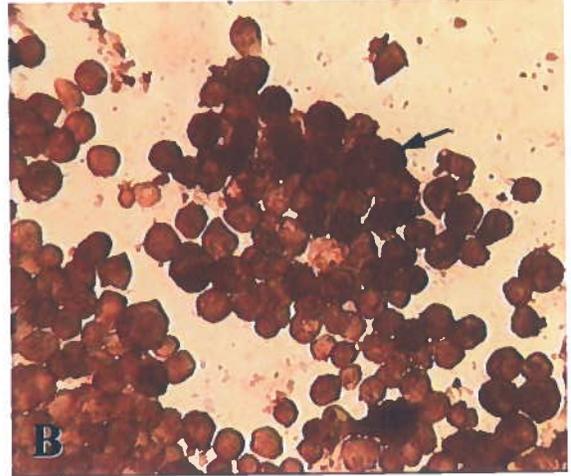
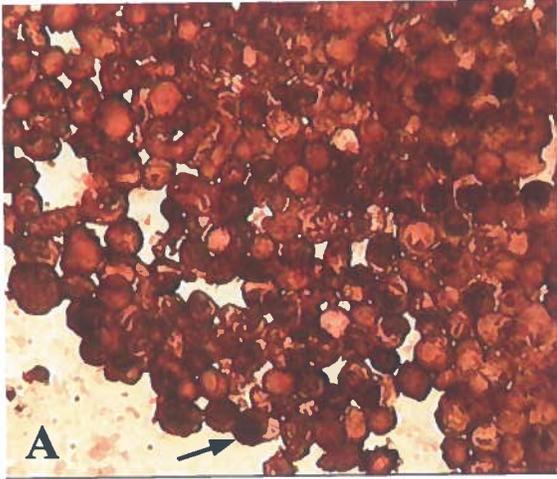
Les cellules fixées à la paraformaldéhyde 2% ont été traitées pendant 2 heures à 37°C avec un anticorps primaire de cobaye dilué 1/100 et ensuite traitées pendant 2 heures à 37°C avec un anticorps anti-IgG de cobaye conjugué à la peroxydase de raifort dilué 1/100. L'anticorps primaire utilisé a été l'antisérum provenant du cobaye #2, immunisé contre des polyèdres dissous de GmMVPN produits *in vivo* chez la larve de *Galleria mellonella*. Le substrat de la peroxydase, le tétrachlorure de diaminobenzidine 0,05% dans 0,01% de peroxyde d'hydrogène, a été utilisé pour révéler la polyédrine non-cristallisée.

A, B, C et D = Cellules Sf9 MM8-SF infectées par GmMVPN passages 1, 7, 12 et 19, respectivement. MI = 1. Huit jours post-infection.

E = Cellules Sf9 MM8-SF non-infectées.

➔ = Cellule infectée contenant des dépôts de couleur brun foncé, démontrant la présence de polyédrine non-cristallisée à l'intérieur de la cellule.

⋯➔ = Cellule infectée (présence de polyèdres) ne contenant pas de dépôt brun foncé, démontrant l'absence de polyédrine non-cristallisée à l'intérieur de la cellule.



20, C et D), ce qui signifie qu'il n'y avait pas de polyédrique non-cristallisée dans ces cellules infectées.

3.6. Effet de passages de GmMVPN sur la virulence des polyèdres envers des larves de *Galleria mellonella*

Comme le nombre de virions à l'intérieur des polyèdres a diminué en fonction des passages de GmMVPN, il nous a semblé intéressant de vérifier si cette diminution d'inclusion des virions se répercutait sur la virulence des polyèdres envers des larves de *Galleria mellonella* de 3^e ou 4^e stade.

3.6.1. Pourcentage de larves infectées

Lorsque des doses de 2, 20 et 200 x 10⁴ polyèdres ont été ingérées par larve, les pourcentages de larves infectées étaient beaucoup trop faibles pour être comparés (figure 21). Par contre, les valeurs obtenues lorsque 2x10⁷ polyèdres ont été ingérés par larve étaient assez élevées pour comparer les polyèdres des différents passages de GmMVPN. Ainsi, lorsque 2x10⁷ polyèdres de GmMVPN passage 0 ont été ingérés par larve, environ 35% des larves ont été infectées. En utilisant les polyèdres de GmMVPN passages 1, 5 et 10, cette valeur a augmenté à environ 60%, démontrant que les polyèdres produits en culture cellulaire de Sf9 MM8-SF dans les premiers passages viraux sont plus virulents envers la larve que le virus original lui-même. Par contre, les polyèdres du passage 15 étaient beaucoup moins virulents, car seulement 7% des larves ont été infectées lorsque 2x10⁷ polyèdres ont été ingérés par larve.

3.6.2. Évaluation de la DI₅₀

Pour évaluer la dose de polyèdres causant une infection de 50% des larves (DI₅₀), un graphique du pourcentage de larves infectées en fonction du nombre de polyèdres ingérés par larve a été tracé (figure 22). La valeur de chaque DI₅₀ correspond à l'endroit sur chaque droite tracée qui coupe la valeur de 50% d'infection. Ainsi, les DI₅₀ obtenues en utilisant les polyèdres de GmMVPN passages 1, 5 et 10 étaient très semblables, avec une valeur entre 1,4 et 1,9x10⁷ polyèdres/larve. Celle des polyèdres originaux était un peu plus élevée, avec une valeur de 2,7x10⁷ polyèdres/larve et celle des polyèdres du 15^e

passage viral était significativement plus élevée, avec une valeur de $1,5 \times 10^8$ polyèdres/larve. Ceci signifie que pour infecter autant de larves, il serait nécessaire d'utiliser 2 fois plus de polyèdres de GmMVPN originaux et 10 fois plus de polyèdres de GmMVPN passage 15 que de polyèdres de GmMVPN des passages 1, 5 et 10.

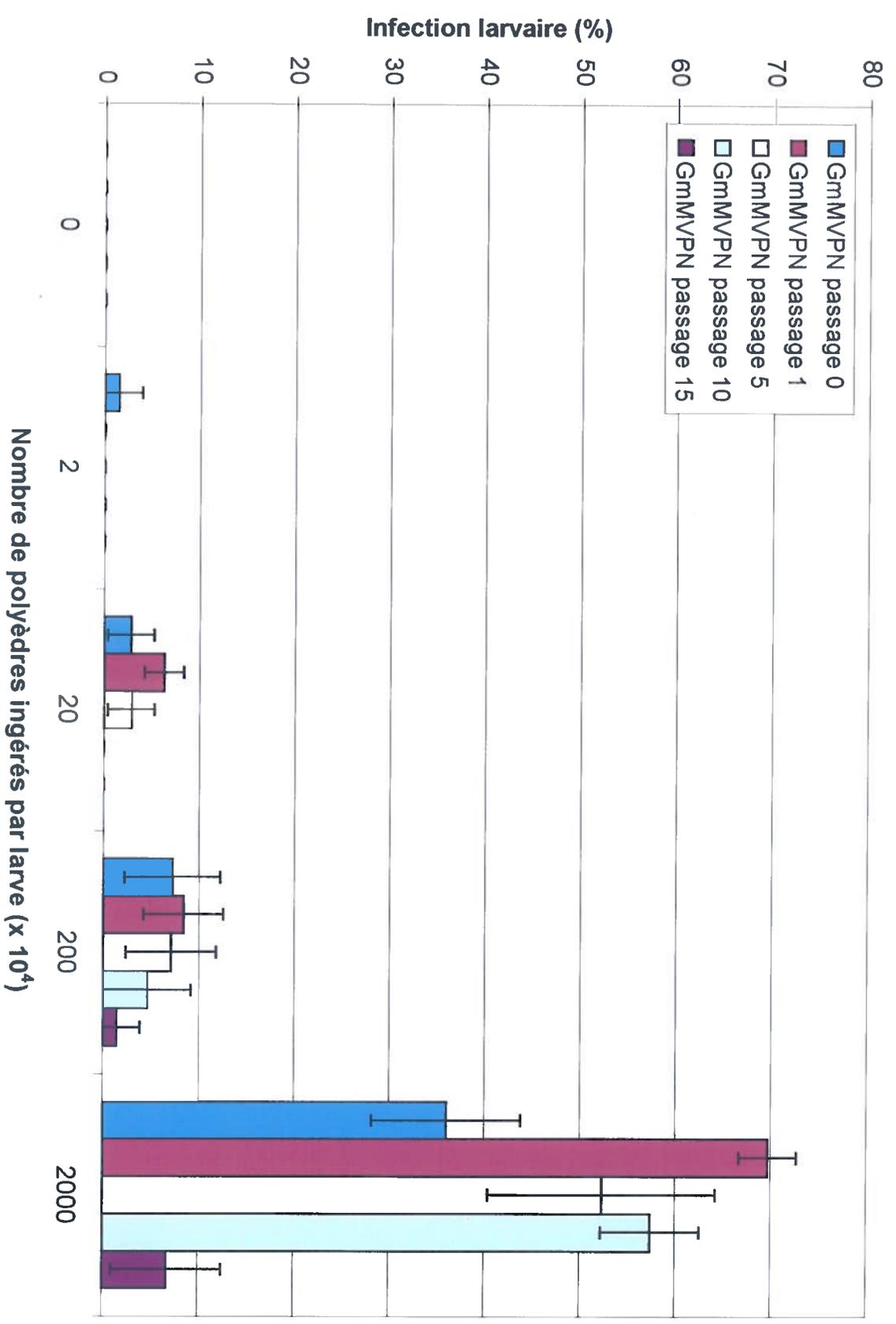
3.6.3. Évaluation de la DL_{50}

Pour évaluer la dose de polyèdres causant la mort de 50% des larves (DL_{50}), un graphique du pourcentage de larves mortes infectées en fonction du nombre de polyèdres ingérés par larve a été tracé (figure 23). L'endroit sur chaque droite tracée qui coupe la valeur de 50% de mortalité correspond à la valeur de chaque DL_{50} . Selon ce graphique, la DL_{50} obtenue en utilisant les polyèdres de GmMVPN passage 0 était de $2,75 \times 10^7$ polyèdres/larve et celle obtenue lorsque les polyèdres de GmMVPN passages 1, 5 et 10 étaient utilisés était un peu plus basse, c'est-à-dire d'une valeur de 1,43 à $1,95 \times 10^7$ polyèdres/larve. Les polyèdres de GmMVPN passages 1, 5 et 10 semblent donc environ 2 fois plus efficaces pour tuer les larves que les polyèdres originaux. Par contre, la DL_{50} obtenue en utilisant les polyèdres du 15^e passage viral était de $2,9 \times 10^8$ polyèdres/larve, ce qui est significativement plus élevé. Cela signifie qu'il faudrait utiliser de 10 à 20 fois plus de polyèdres de GmMVPN passage 15 que de polyèdres de GmMVPN des autres passages viraux pour tuer autant de larves.

3.6.4. Analyse du temps léthal

Pour analyser le temps léthal d'une dose de 2×10^7 polyèdres par larve, c'est-à-dire le temps que cette dose prend pour entraîner la mort des larves de *Galleria mellonella*, une relation entre le pourcentage des larves mortes infectées qui sont mortes dans chaque intervalle de temps d'incubation de l'épreuve biologique et le nombre de passages de GmMVPN a été tracée (figure 24). À l'aide de cette relation, une répartition de la mortalité en fonction du temps d'incubation a pu être déterminée. Par exemple, après ingestion de 2×10^7 polyèdres de GmMVPN passage 15, environ 25% des larves mortes infectées sont mortes dans l'intervalle de 11-15 jours d'incubation, environ 25% dans l'intervalle de 16-20 jours d'incubation et environ 50% après plus de 20 jours d'incubation (figure 24). Ainsi, après utilisation d'une dose de polyèdres de GmMVPN passages 0, 1 et 5, la plupart des larves

mortes infectées sont mortes pendant l'intervalle de temps de 11-15 jours. De plus, très peu de larves sont mortes durant l'intervalle de temps de plus de 20 jours en utilisant ces mêmes polyèdres. Cependant, la plupart des larves mortes infectées après ingestion des polyèdres de GmMVPN passage 10 sont mortes dans l'intervalle de temps de 16-20 jours. De plus, la plupart des larves mortes infectées après ingestion des polyèdres de GmMVPN passage 15 sont mortes dans l'intervalle de plus de 20 jours d'incubation. Ces données suggèrent qu'à partir du passage 10 de GmMVPN, le temps qu'une dose de 2×10^7 polyèdres prend pour tuer les larves de *Galleria mellonella* augmente, pour devenir très long au 15^e passage viral.



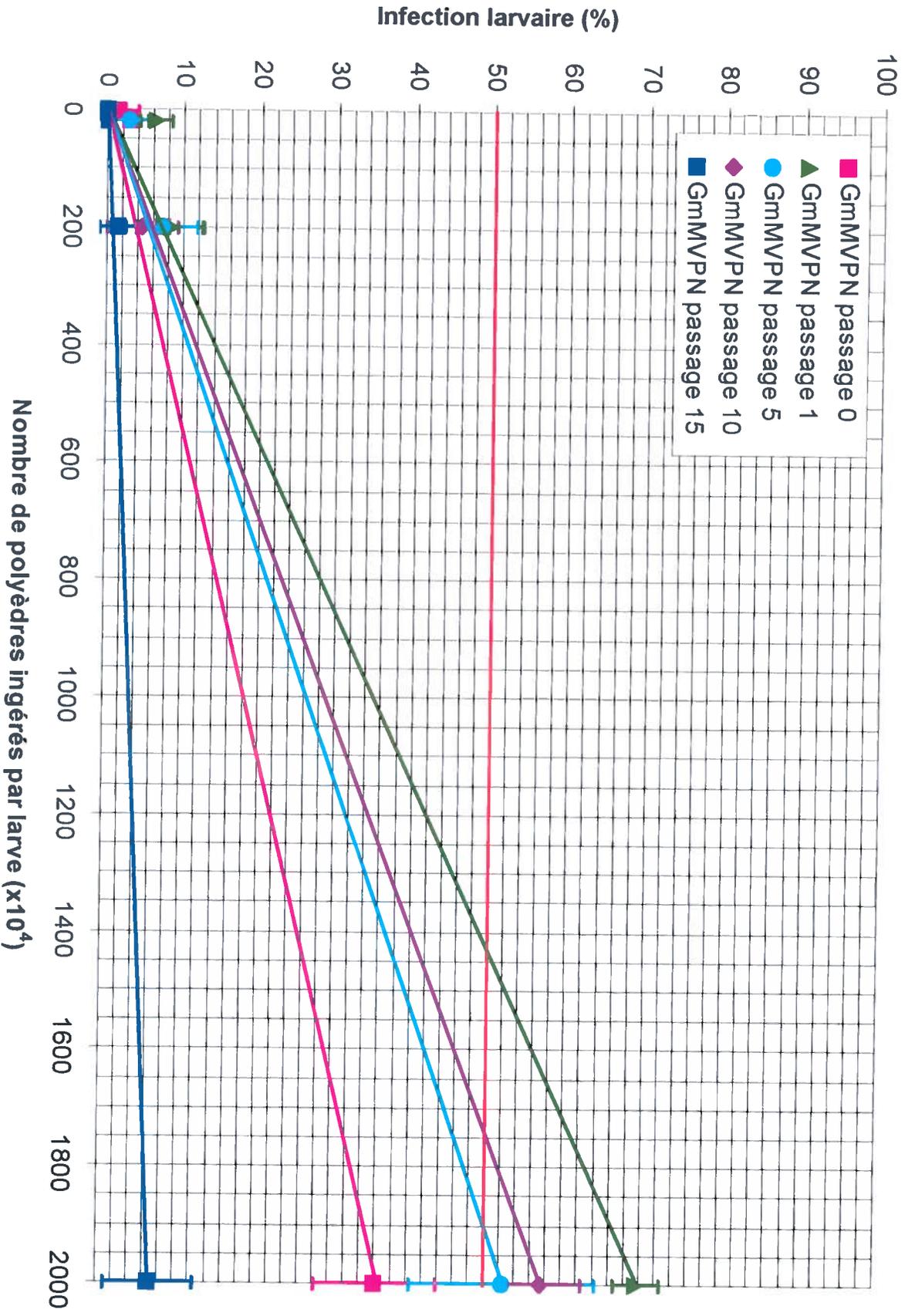


Figure 23 : Effet de passages de GmMVPN sur la virulence des polyèdres envers des larves de *Galleria mellonella*, en terme de DL_{50} (dose de polyèdres causant la mort de 50% des larves).

La valeur de la DL_{50} des polyèdres de chaque passage de GmMVPN correspond à l'endroit sur leur droite respective qui coupe la valeur de 50% de mortalité.

Chaque valeur provient de la moyenne de 3 répétitions, chacune ayant été effectuée sur 24 larves de *Galleria mellonella* de 3^e ou 4^e stade. L'écart type entre ces trois répétitions a été ajouté au graphique (barres verticales avec extrémités horizontales).

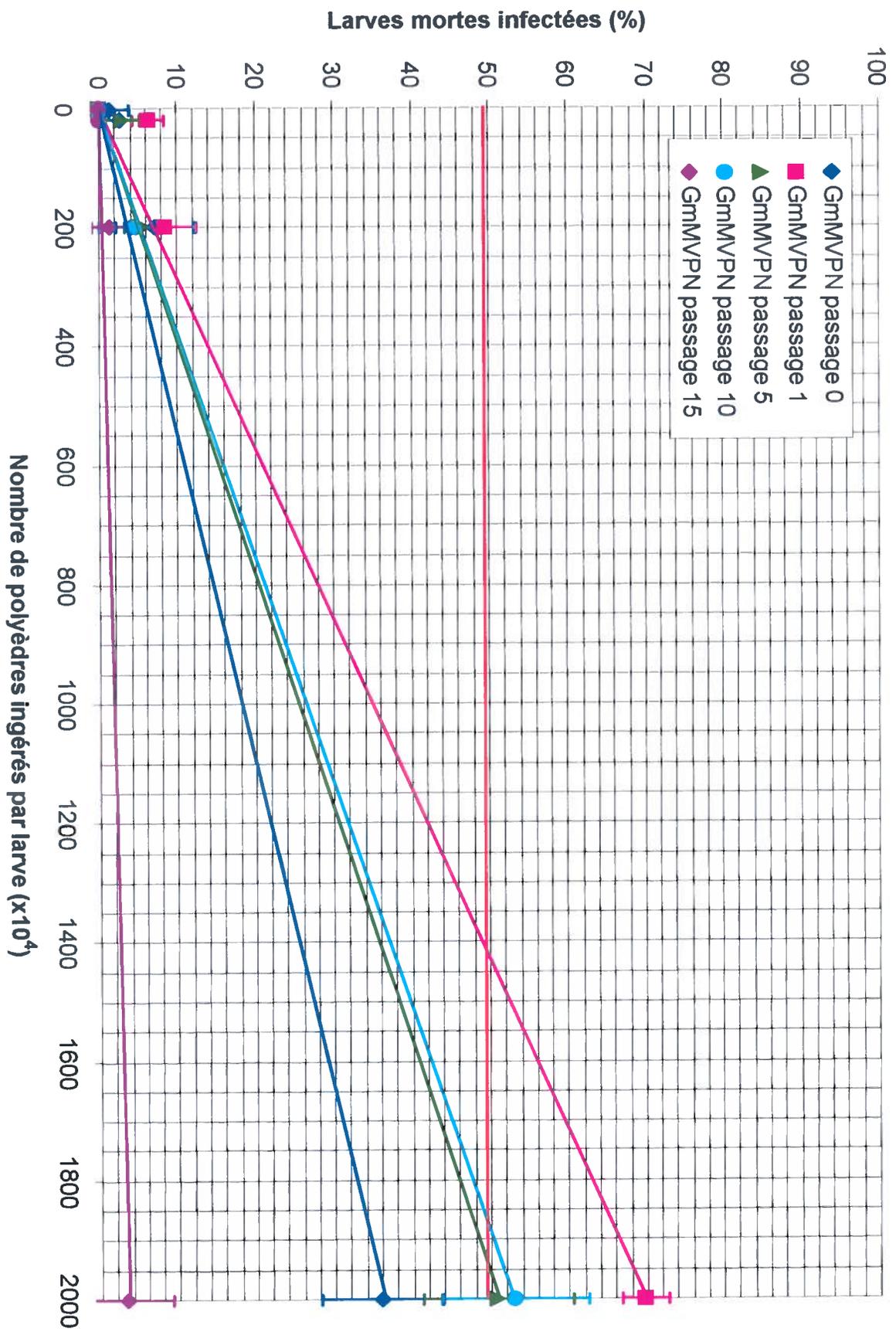
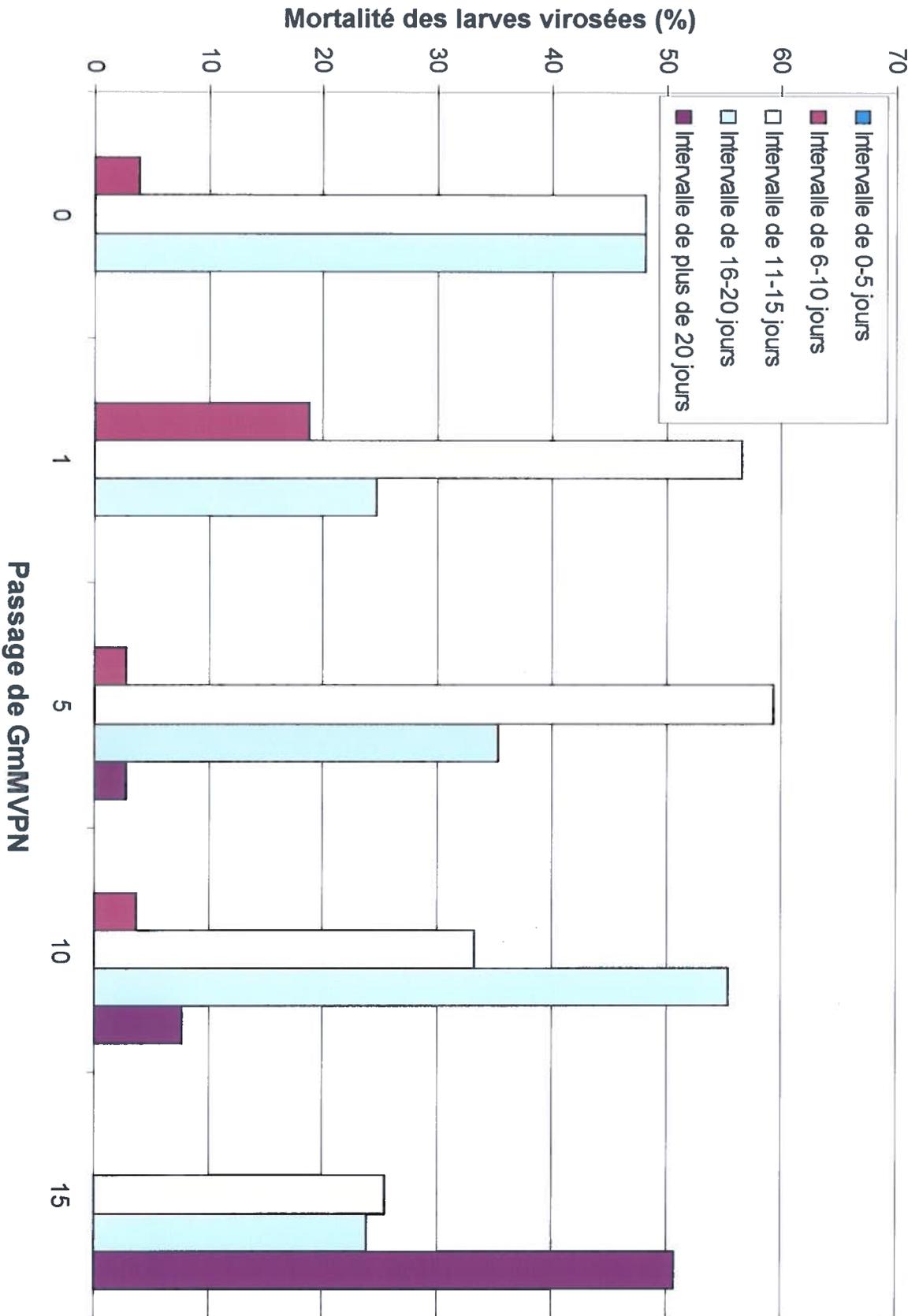


Figure 24 : Effet de passages de GmMVPN sur la virulence des polyèdres envers des larves de *Galleria mellonella*, en terme de temps léthal en utilisant une dose de 2×10^7 polyèdres par larve.

Chaque valeur correspond au pourcentage des larves mortes infectées qui sont mortes dans l'intervalle de temps d'incubation en question, après ingestion de 2×10^7 polyèdres de GmMVPN passage 0 (original), 1, 5, 10 ou 15.

Chaque valeur provient de la moyenne de 3 répétitions, chacune ayant été effectuée sur 24 larves de *Galleria mellonella* de 3^e ou 4^e stade. L'écart type entre ces trois répétitions a été ajouté au graphique (barres verticales avec extrémités horizontales).

Les larves ont été incubées pendant 20 jours, avec vérification de la mortalité à chaque jour. Les larves infectées encore vivantes après 20 jours d'incubation ont été incluses dans l'intervalle de temps de plus de 20 jours.



Chapitre 4 : Discussion

Étant donné que le génome des VPN est très susceptible aux mutations, un des plus grands problèmes lors de la production de VPN en culture cellulaire est son instabilité. Pourtant, la stabilité virale est importante en vue d'utiliser la culture cellulaire pour la production de bioinsecticides ou de protéines recombinantes. Dans ce contexte, plusieurs études ont déjà été effectuées sur la stabilité virale en fonction de passages de VPN dans un système cellulaire en présence de sérum de veau fœtal (SVF), en utilisant les VPN d'*Autographa californica* (Hink et Strauss, 1976), de *Trichoplusia ni* (MacKinnon *et al.*, 1974; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976), de *Galleria mellonella* (Fraser et Hink, 1982), de *Lymantria dispar* (Slavicek *et al.*, 1996) et de *Helicoverpa armigera* (Chakraborty et Reid, 1999). Toutes ces études ont démontré une diminution de la stabilité virale après une moyenne de 10 passages viraux, due à la sélection de mutants FP aux dépens des VPN sauvages MP. Étant donné que le SVF est un produit très dispendieux, peut contenir des facteurs cytotoxiques, est susceptible aux contaminations par les mycoplasmes et nuit à la purification de protéines recombinantes produites (Agathos, 1991), il semblait intéressant de vérifier si la stabilité virale en fonction de passages de VPN était aussi élevée dans notre système cellulaire sans SVF que dans un système cellulaire contenant du SVF.

Lors de la présente étude, les mêmes phénomènes que ceux observés auparavant dans un système cellulaire contenant du SVF ont été obtenus. En effet, en fonction des passages de GmMVPN, une baisse de production de polyèdres par millilitre de milieu de culture d'un facteur de 10 à 30 a été observée (figure 4), valeur que Hink et Strauss (1976) avaient également obtenue. Le calcul des écarts types confirme la même tendance. Par contre, cette figure ne peut nous fournir qu'une tendance de la baisse de la production de polyèdres en fonction des passages de GmMVPN, étant donné qu'elle ne tient pas compte de la qualité de la culture cellulaire et de la quantité de cellules présentes pendant l'infection virale. En effet, les valeurs obtenues lors des passages 3, 4 et 8 de GmMVPN

étaient plus basses que la tendance des 9 premiers passages viraux (figure 4), ce qui coïncide avec le fait que c'est seulement lors de ces 3 passages viraux que le pourcentage de mortalité des cellules pendant l'infection était supérieur à 30%. De plus, le nombre de cellules infectées était faible lors de ces 3 passages de GmMVPN. Les conditions optimales n'étaient donc pas présentes pour permettre une production virale optimale lors des passages 3, 4 et 8 de GmMVPN.

Pour corriger ce problème, le nombre de polyèdres par cellule infectée a été déterminé à chaque passage de GmMVPN (figure 5). Dans cette figure, la valeur obtenue à chaque passage viral suit la tendance. Cette figure est donc plus fiable que la précédente (figure 4). Ainsi, selon la figure 5, le nombre de polyèdres par cellule infectée a diminué d'une valeur de plus de 40 à une valeur de moins de 10, ce qui est en accord avec les autres études de stabilité de VPN effectuées en fonction de passages viraux dans un système cellulaire contenant du SVF (MacKinnon *et al.*, 1974; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Hink et Strauss, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976; Fraser et Hink, 1982; Slavicek *et al.* 1996; Chakraborty et Reid, 1999). La tendance est semblable même après le calcul des écarts types (figure 5). Par la microscopie optique (figure 6) et par la coloration Buffalo Black (figure 7), nous avons observé que la diminution du nombre de polyèdres par cellule infectée en fonction des passages de GmMVPN était même obtenue sur des cellules du même passage cellulaire (Sf9 MM8-SF passage 510). Donc, la diminution du nombre de polyèdres par cellule infectée lors des passages de GmMVPN n'était pas due à une baisse de susceptibilité des cellules à l'infection, mais plutôt à une modification du virus. Ceci concorde avec les résultats obtenus par Lynn (2000), qui avaient démontré que le fait de maintenir des cellules d'insectes à long terme dans un milieu de culture sans SVF n'affecte pas la susceptibilité des cellules à l'infection virale. Donc, comme le nombre de polyèdres produits par millilitre de milieu de culture et le nombre de polyèdres par cellule infectée ont diminué en fonction des passages de GmMVPN, et comme cette diminution de production de polyèdres était due à une modification du virus, il semble bien que nous ayons observé l'apparition et la sélection de mutants FP de GmMVPN lors des passages viraux dans notre système cellulaire sans SVF, ce qui concorde avec les autres études de stabilité de VPN effectuées en fonction de

passages viraux dans un système cellulaire contenant du SVF (Hink et Strauss, 1976; MacKinnon *et al.*, 1974; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976; Fraser et Hink, 1982; Slavicek *et al.*, 1996; Chakraborty et Reid, 1999). Cette sélection de mutants FP a d'ailleurs été très significative, car selon les résultats obtenus par la coloration Buffalo Black (figure 7), 82% des cellules à l'intérieur desquelles se trouvaient des polyèdres de GmMVPN passages 1 et 7 contenaient plus de 30 polyèdres, caractéristique des virus sauvages MP, alors que cette valeur a diminué à 20% au 19^e passage viral. Ces valeurs signifient que 18% des cellules à l'intérieur desquelles se trouvaient des polyèdres de GmMVPN passages 1 et 7 contenaient moins de 10 polyèdres, caractéristique des mutants FP, alors que cette valeur a augmenté à 80% au passage 19 de GmMVPN.

Slavicek *et al.* (1996) avaient observé que lors de la sélection de mutants FP en fonction de passages de VPN dans un système cellulaire contenant du SVF, le pourcentage de cellules infectées diminuait de plus de 80% à moins de 50%. Lors de passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF, nous avons également observé une diminution de l'infection virale, mais avec des valeurs plus faibles que celles observées par Slavicek *et al.* (1996). En effet, nous avons obtenu une diminution du pourcentage de cellules infectées de plus de 50% à moins de 20%, valeurs confirmées avec les écarts types calculés (figure 10). La seule valeur qui ne suivait pas cette tendance était celle obtenue au passage 4 de GmMVPN, pouvant s'expliquer par les mêmes raisons que celles spécifiées précédemment. Les pourcentages de cellules infectées différents de ceux obtenus par Slavicek *et al.* (1996) sont sûrement dus à l'utilisation d'une MI plus faible et d'un système virus/cellules différent.

D'autres modifications concernant l'infection virale ont été observées par la microscopie électronique. Ces modifications sont semblables à celles déjà observées lors de passages de VPN dans des systèmes cellulaires en présence de SVF (figure 11). En effet, en fonction des passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF, nous avons obtenu une diminution significative du nombre de virions (VI) à l'intérieur des polyèdres, comme observé auparavant (MacKinnon *et al.*, 1974; Potter, Faulkner et MacKinnon,

1976; Fraser et Hink, 1982; Slavicek *et al.*, 1996; Chakraborty et Reid, 1999). De plus, la plupart des polyèdres de GmMVPN passage 20 ne contenaient même plus de virions. Cette observation démontre un problème d'inclusion des virions à l'intérieur des polyèdres produits par des GmMVPN de passages élevés.

Fraser et Hink (1982) avaient observé que les noyaux des cellules infectées par des GmMVPN passés plusieurs fois *in vitro* contenaient très peu de membrane synthétisée *de novo*. Étant donné que cette membrane est acquise par le virus inclus (VI) et est nécessaire à l'inclusion de ces virions dans le polyèdre (Robertson, Harrap et Longworth, 1974; Knudson et Harrap, 1976), Fraser et Hink (1982) avaient suggéré que cette diminution de la synthèse de membrane *de novo* était une des causes de la diminution du nombre de VI à l'intérieur de polyèdres de mutants FP. Lors de notre étude, nous avons également observé une baisse de synthèse de membrane *de novo* et une diminution du nombre de virions enveloppés dans le noyau des cellules infectées en fonction des passages de GmMVPN (figure 11). Ces observations sont donc en accord avec la suggestion formulée par Fraser et Hink (1982).

Une autre anomalie concernant l'inclusion des virions, observée auparavant en microscopie électronique, est démontré par la présence de quelques virions courts inclus dans les polyèdres des VPN passés plusieurs fois *in vitro* (MacKinnon *et al.*, 1974; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976). Ce phénomène peut être expliqué soit par une compression, une distorsion ou un clivage des nucléocapsides lors d'une cristallisation plus compacte de la polyédrine autour des nucléocapsides, ou soit par la présence de virions contenant un génome beaucoup plus court (MacKinnon *et al.*, 1974; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976). Nous avons également observé l'inclusion de virions courts après plusieurs passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF (figure 11). De plus, nous avons observé en microscopie électronique que certains polyèdres de GmMVPN de passages élevés étaient de forme très irrégulière, démontrant que la cristallisation de ces polyèdres était affectée (figure 11). Ces observations sont en accord avec celles effectuées auparavant.

Après plusieurs passages de VPN dans un système cellulaire contenant du SVF, MacKinnon *et al.* (1974) ont également observé en microscopie électronique que des noyaux de cellules infectées contenaient des nucléocapsides, mais ne contenaient pas ou très peu de polyèdres. Nous avons également obtenu ce phénomène après 17 passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF (figure 11). De plus, en électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (figure 15) et en immunobuvardage de type Western (figure 19C), nous avons observé que des protéines reliées aux nucléocapsides, comme la p39 et la p25, étaient presque autant exprimées dans les cellules après 20 passages de GmMVPN, alors que des protéines reliées aux polyèdres, comme la polyédrine et la p10, étaient beaucoup moins exprimées dans les cellules après 20 passages viraux. En fait, seulement les virus du passage 17 ont exprimé une quantité plus faible de p39 et de p25 (figure 19C), probablement dû au fait que ce passage de GmMVPN était le premier à être effectué en F25 au lieu d'en fermenteurs de 100 mL. Cette relation entre l'expression des protéines p39, p25, p10 et polyédrine concorde avec les observations effectuées en microscopie électronique. Donc, après plusieurs passages de GmMVPN, le nombre de nucléocapsides produites dans les cellules change très peu, mais le nombre de polyèdres par cellule diminue considérablement.

Deux causes peuvent expliquer cette diminution du nombre de polyèdres par cellule infectée en fonction des passages de GmMVPN. Premièrement, la polyédrine peut être moins exprimée après plusieurs passages viraux en culture cellulaire. Deuxièmement, cette protéine peut être bien exprimée, mais sa cristallisation pour former des polyèdres peut être compromise. Par la technique d'immunoperoxydase, nous avons observé que la polyédrine était abondante dans les cellules infectées par les GmMVPN passage 1 et passage 7, démontré par la présence de nombreux polyèdres et de polyédrine non-cristallisée (figure 20, A et B). Donc, l'expression de la polyédrine était très élevée lors des 7 premiers passages viraux. Cependant, les cellules infectées par GmMVPN passage 12 et passage 19 ne contenant pas beaucoup de polyèdres n'ont pas été colorées par la technique d'immunoperoxydase (figure 20, C et D), ce qui signifie que toute la polyédrine présente dans ces cellules était cristallisée et donc que peu de polyédrine était présente dans ces cellules. Le problème de la faible production de polyèdres par les

mutants FP n'était donc pas dû à l'absence de cristallisation de cette protéine, mais bien à son expression plus faible (figure 20). Par contre, même s'il y a cristallisation de la polyédrine, elle peut être modifiée et plus compacte, comme expliqué plus haut.

Étant donné que les polyèdres produits par les VPN passés plusieurs fois *in vitro* ne contiennent pas beaucoup de virions, toutes les études de stabilité virale effectuées dans un système cellulaire en présence de SVF ont démontré que les polyèdres de ces VPN étaient moins virulents *in vivo* que les polyèdres originaux, déterminé par la DL_{50} (Chakraborty et Reid, 1999; Hink et Strauss, 1976; Fraser et Hink, 1982; MacKinnon *et al.*, 1974; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976). Lors de notre étude de stabilité de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF, nous avons observé une augmentation de la DL_{50} de 10 fois à partir du passage 15 de GmMVPN (figure 23). Ceci signifie que les polyèdres du passage 15 étaient 10 fois moins efficaces à tuer les larves de *Galleria mellonella* de 3^e ou 4^e stade que les polyèdres des 10 premiers passages viraux. Cette augmentation de la DL_{50} correspond à celle obtenue par Chakraborty et Reid (1999).

Un autre phénomène observé lors de la sélection de mutants FP est l'augmentation de la production de virus extracellulaires (VEC) de 5 à 100 fois (Fraser et Hink, 1982; Faulkner, Brown et Potter, 1976; Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976; Slavicek *et al.*, 1996). Lors de notre étude, nous avons effectivement observé une augmentation du titre viral de 10 fois en fonction des passages de GmMVPN, et ce, même en tenant compte des écarts types (figure 3). Les deux seules exceptions à cette tendance provenaient des titres viraux faibles obtenus lors des passages 4 et 8 de GmMVPN, probablement dû à un problème ponctuel de croissance de la lignée cellulaire utilisée lors de ce passage viral. En effet, c'est lors de ces deux passages viraux que nous avons obtenu le plus grand pourcentage de cellules mortes dans les fermenteurs de cellules témoins et dans les fermenteurs de cellules infectées (donnée non montrée). Par contre, après 13 passages viraux, le titre viral a retombé à un niveau plus faible, et ce, même en tenant compte des écarts types, comme Chakraborty et Reid (1999) avaient observé dans leur système cellulaire en présence de SVF. Notre étude et celle de Chakraborty et Reid (1999) sont les seules à avoir observé cette diminution du titre viral après plusieurs passages viraux. Il est

possible que lors de la sélection de mutants FP, ces mutants aient été produits en plus grande quantité pour prendre l'avantage sur la production de virus sauvages MP, augmentant ainsi le titre viral. Par contre, lorsque les mutants FP ont été sélectionnés, il n'a plus été nécessaire de produire beaucoup de virus extracellulaires, étant donné qu'il n'y avait plus de compétition avec les virus sauvages MP. Ceci expliquerait la diminution du titre viral observée après la sélection des mutants FP lors des passages viraux. Il est cependant important de noter que selon nos résultats obtenus en immunobuvardage de type Western (figure 19C) et en électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (figure 15), l'expression de protéines de nucléocapsides comme la p39 et la p25 n'a pas diminué à l'intérieur des cellules infectées en fonction des passages de GmMVPN, démontrant que la production de nucléocapsides à l'intérieur des cellules infectées était encore très élevée même après plusieurs passages viraux, même si la quantité de virus extracellulaires relâchés n'était pas aussi élevée.

Étant donné que des mutants FP sont apparus lors des passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF, nous nous attendions à retrouver par la technique de plages une majorité de plages du type FP en utilisant du GmMVPN passage 19 et une majorité de plages du type MP en utilisant du GmMVPN passage 2. Normalement, les mutants FP forment des plages à l'intérieur desquelles se trouvent un mélange de cellules contenant moins de 10 polyèdres et de cellules ne contenant pas de polyèdres, alors que les virus MP forment des plages à l'intérieur desquelles se trouvent seulement des cellules présentant plus de 30 polyèdres (Hink et Vail, 1973). Or, nous n'avons pas obtenu une différence de morphologie de plages aussi évidente entre les plages formées par les passages 2 et 19 de GmMVPN (figure 9). En effet, même si les plages provenant de GmMVPN passage 19 contenaient en moyenne moins de polyèdres que celles formées par GmMVPN passage 2, chaque cellule présente dans les plages formées par GmMVPN passage 2 ne contenait pas plus de polyèdres que chaque cellule présente dans les plages formées par GmMVPN passage 19. Ceci peut être dû à l'utilisation de l'agarose pour recouvrir les cellules Sf9. En effet, Hink et Vail (1973) ont également observé un problème dans le développement des plages lorsque l'agarose était utilisée pour recouvrir les cellules. Ils ont résolu ce problème en remplaçant l'agarose par de la méthyl cellulose.

C'est probablement ce qui devra être utilisé dans notre cas pour améliorer la technique de plage en vue de bien différencier les mutants FP des virus MP. Il n'en demeure pas moins que les GmMVPN de passage 19 ont produit en moyenne moins de polyèdres que les GmMVPN de passage 2 lors de la technique de plages, démontrant qu'il y a eu sélection de populations virales produisant moins de polyèdres lors de passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF.

Par la technique d'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide, Fraser et Hink (1982) ont observé qu'après plusieurs passages de GmMVPN, les virus exprimaient des protéines de 91,5 kDa et de 33 kDa qui n'étaient pas présentes au début des passages viraux. Par cette technique, nous avons également obtenu deux bandes de protéines supplémentaires après plusieurs passages de GmMVPN, mais ces protéines n'avaient pas les mêmes poids moléculaires que celles obtenues par Fraser et Hink (1982) (figure 15). En effet, elles ont été évaluées à 38,8 kDa et à environ 55-60 kDa. Il est évident que ces protéines sont d'origine virale, et non d'origine cellulaire, car nous avons démontré précédemment que la baisse de stabilité virale lors des passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF n'était pas due à une baisse de susceptibilité des cellules à l'infection, mais plutôt à une modification du virus. Cette observation démontre que des mutations sont apparues lors des passages viraux et ont permis l'expression de nouvelles protéines virales. Ces protéines sont différentes de celles obtenues par Fraser et Hink (1982), démontrant que certaines mutations obtenues lors des passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF étaient différentes de celles obtenues dans un système cellulaire en présence de SVF. Aucune tentative n'a été effectuée pour vérifier si ces nouvelles protéines exprimées étaient fonctionnelles et avaient des fonctions particulières.

Étant donné que nous avons constaté par coloration Giemsa la sélection de polyèdres de forme cubique par rapport aux polyèdres de forme polyédrique (figure 8), nous pouvons penser que les mutants obtenus lors de passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF étaient des mutants M5. Par contre, les mutants M5 forment habituellement seulement un gros polyèdre par cellule infectée (Brown *et al.*, 1980), alors

que nous avons souvent observé de notre côté la présence de plusieurs polyèdres cubiques et la présence de petits polyèdres cubiques par cellule infectée. De plus, trop de caractéristiques observées suggèrent que les mutants FP obtenus dans notre système cellulaire sans SVF sont des mutants modifiés dans le gène FP25K (voir ci-dessous). Finalement, aucune étude précédente n'a analysé la forme des polyèdres de différents passages de VPN par coloration au Giemsa des cellules infectées. La forme cubique des polyèdres non-colorés après coloration au Giemsa est donc peut-être une caractéristique des mutants FP mutés dans le gène FP25K.

Les observations suivantes suggèrent que les mutants FP obtenus lors de notre étude sont des mutants modifiés dans le gène FP25K. Premièrement, les mutants modifiés dans le gène FP25K expriment moins de polyédrine que les virus sauvages MP (Jarvis, Bohlmeier et Garcia Jr., 1992; Harrison, Jarvis et Summers, 1996). Or, par les techniques d'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (figure 15), d'immunobuvardage de type Western (figures 19B et 19C) et d'immunoperoxydase (figure 20), nous avons démontré la baisse d'expression de polyédrine en fonction des passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF. De plus, les virus FP mutés dans le gène FP25K expriment plus les protéines de nucléocapsides comme la p39 (Braunagel *et al.*, 1999). Or, en immunobuvardage de type Western (figure 19C) et en électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (figure 15), nous avons observé que l'expression de la protéine p39 n'avait pas diminué en fonction des passages de GmMVPN, alors que l'expression de d'autres protéines comme la polyédrine avait diminué beaucoup. Finalement, les virus sauvages MP expriment la protéine FP25K de 25 kDa et une protéine de 23 kDa à partir du gène FP25K (Braunagel *et al.*, 1999). Les virus FP mutés dans le gène FP25K n'expriment donc pas ces deux protéines. En immunobuvardage de type Western (figure 19C), nous n'avons pas pu observer une diminution de l'expression de la protéine FP25K, étant donné que deux autres protéines virales de 25 kDa sont exprimées par les VPN, soit la p25 de capsid et la VI-E25. Par contre, cet immunobuvardage de type Western nous a démontré que l'expression d'une protéine de 23 kDa était absente après plusieurs passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF. Ceci suggère que chez les mutants FP obtenus lors de notre étude, le gène FP25K a été muté, empêchant ainsi la

transcription de ce gène. Donc, il semble bien que les mutants FP obtenus lors de notre étude de stabilité virale proviennent entre autres de mutations dans le gène FP25K. Cependant, pour confirmer ceci, il serait intéressant de séquencer le gène FP25K. De plus, il n'est pas connu pour l'instant quel type de mutations dans le gène FP25K a généré l'apparition des mutants FP dans notre étude. Il est cependant fort probable que la mutation provienne de l'insertion d'ADN des cellules Sf9 MM8-SF, étant donné que la plupart des mutations apparaissant dans le gène FP25K de GmMVPN sont de ce type (Fraser, Smith et Summers, 1983; Fraser *et al.*, 1985; Beames et Summers, 1988, 1989; Bischoff et Slavicek, 1997). Le séquençage de l'ADN du gène FP25K des virus sauvages MP et des mutants FP et la comparaison de leur profil d'ADN pourront confirmer cette hypothèse.

Des mutations dans le gène FP25K peuvent expliquer la diminution du nombre de polyèdres formés par cellule, la diminution du nombre de virions à l'intérieur des polyèdres et la diminution d'expression de la polyédrine en fonction des passages de GmMVPN (Braunagel *et al.*, 1999). Par contre, elles ne peuvent expliquer la diminution d'expression de la protéine p10 en fonction des passages de GmMVPN que nous avons observée par les techniques d'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (figure 15) et d'immunobuvardage de type Western (figure 19C). En effet, Harrison, Jarvis et Summers (1996) avaient observé que la transcription de la p10 n'était pas affectée chez les virus FP mutés dans le gène FP25K. D'autres investigations devront donc être effectuées pour expliquer cette diminution d'expression de la p10 lors de ce projet. Il faudra vérifier si la protéine FP25K régule la transcription de la p10 dans notre système cellulaire sans SVF ou si une mutation supplémentaire dans un gène autre que FP25K est en cause. Cette nouvelle mutation pourrait être apparue dans un gène codant pour une protéine essentielle à l'expression de la p10. Même si nous n'avons pas encore vérifié les causes de la diminution d'expression de la p10 lors de ce projet, cette diminution d'expression de la p10 pourrait expliquer certains phénomènes observés lors des passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF. En effet, comme la p10 est essentielle à un assemblage normal des polyèdres (Williams *et al.*, 1989; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991; Gross, Russell et Rohrmann, 1994) et semble aussi aider l'enveloppe

du polyèdre (EP) à s'attacher autour du polyèdre (Williams *et al*, 1989; Russell, Pearson et Rohrmann, 1991; Gross, Russell et Rohrmann, 1994), une diminution d'expression de la p10 pourrait expliquer en partie les modifications de forme des polyèdres observées par la microscopie électronique (figure 11, 2) et par la coloration au Giemsa (figure 8).

Toutes les observations discutées plus haut étaient des caractéristiques déjà connues sur les mutants FP sélectionnés lors de passages viraux en culture cellulaire. Les mutants FP obtenus lors de passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF présentent donc des caractéristiques très semblables à celles observées chez les mutants FP obtenus dans un système cellulaire contenant du SVF. Par contre, lors de notre étude, nous avons observé des caractéristiques jamais analysées auparavant.

Premièrement, la présente étude est la première à avoir démontré une augmentation de la vitesse d'accumulation en phase G_2/M du cycle cellulaire de cellules infectées en fonction de passages de VPN (figure 13). Si nous prenons en considération qu'il y a eu sélection de mutants FP lors des passages de GmMVPN, l'accélération de la vitesse d'accumulation en phase G_2/M du cycle cellulaire des cellules infectées en fonction des passages viraux est tout à fait normale. En effet, Fraser et Hink (1982) ont observé qu'en plus de relâcher plus de virus extracellulaires (VEC), les mutants FP relâchent ces virus plus rapidement que les virus MP. Ceci permet, entre autres, la sélection des mutants FP par rapport aux virus sauvages MP en fonction des passages viraux. Donc, pour que les VEC soient relâchés plus rapidement, il faut également que les cellules infectées s'accumulent en phase G_2/M plus rapidement pour permettre une réplication virale plus rapide. La cytofluorométrie nous a donc permis d'observer une augmentation de la vitesse d'infection virale en fonction des passages de GmMVPN. Étant donné que ce phénomène a été observé autant sur les cellules Sf9 que sur les cellules Sf9 MM8-SF, nos observations sont sûres et reproductibles. Selon Belyavskiy, Braunagel et Summers (1998), cette accumulation de cellules en phase G_2/M du cycle cellulaire est en grande partie due à la présence de la protéine virale VI-EC27, une protéine de 27 kDa empêchant le cycle cellulaire de passer de la métaphase à l'anaphase et de terminer ainsi la phase de mitose (ou phase G_2/M) du cycle cellulaire. Deux raisons peuvent donc expliquer

l'accélération de l'accumulation en phase G₂/M du cycle cellulaire des cellules infectées en fonction des passages de GmMVPN. La première est que la protéine VI-EC27 est exprimée en plus grande quantité chez les mutants FP que chez les virus sauvages MP. La seconde est que la protéine VI-EC27 s'associe plus rapidement avec ses protéines kinases et peut donc exercer ses fonctions plus précocement. Selon nos résultats obtenus en immunobuvardage de type Western, l'expression de cette protéine de 27 kDa n'a pas varié en fonction des passages de GmMVPN (figure 19C, bande 7). Par conséquent, la première raison doit être rejetée. La protéine VI-EC27 exprimée par les mutants FP agit donc probablement plus vite que celle exprimée par les virus MP, permettant ainsi d'engendrer plus rapidement une réplication d'ADN viral et une transcription des gènes viraux élevés au détriment de la réplication d'ADN cellulaire et de la transcription des gènes cellulaires, mais les causes moléculaires ou biochimiques reliées à cette augmentation de la vitesse d'infection virale par les mutants FP ne sont pas connues.

Deuxièmement, toutes les études précédentes effectuées dans un système cellulaire en présence de SVF ont évalué la virulence *in vivo* des polyèdres produits en fonction des passages de VPN en déterminant seulement la DL₅₀. Lors de notre étude, nous voulions analyser plus en détails la virulence *in vivo* des polyèdres en fonction des passages de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF. Ainsi, lors des épreuves biologiques, le pourcentage de larves infectées, la DI₅₀ et le temps léthal ont été déterminés. Toutes ces analyses ont démontré le même phénomène, c'est-à-dire que la virulence des polyèdres envers des larves de *Galleria mellonella* de 3^e ou 4^e stade a diminué en fonction des passages de GmMVPN. En effet, lorsqu'une même quantité de 2x10⁷ polyèdres était utilisée, le pourcentage de larves infectées était significativement plus bas en utilisant des polyèdres de GmMVPN passage 15 que des polyèdres de GmMVPN passage 0, 1, 5 ou 10, confirmé par le calcul des écarts types (figure 21). De plus, la dose de polyèdres causant une infection de 50% des larves (DI₅₀) était significativement plus élevée lorsque des polyèdres de 15^e passage viral étaient utilisés au lieu de polyèdres de GmMVPN passage 0, 1, 5 ou 10 (figure 22). Ceci signifie qu'il fallait considérablement plus de polyèdres de GmMVPN passage 15 pour infecter le même nombre de larves. Finalement, à partir du 10^e passage viral, le temps léthal, c'est-à-dire le temps qu'une dose de 2x10⁷

polyèdres prend pour entraîner la mort des larves de *Galleria mellonella*, a commencé à augmenter, pour devenir significativement plus long lorsque des polyèdres de GmMVPN passage 15 étaient utilisés (figure 24). Donc, les polyèdres de GmMVPN de passages supérieurs à 10 ne pourraient pas être utilisés comme bioinsecticides. De plus, l'analyse du temps léthal démontre que les polyèdres de GmMVPN passage 10 sont vraiment les derniers polyèdres produits lors de passages viraux qui pourraient être utilisés comme bioinsecticides.

Ce qui est intéressant à observer, c'est que malgré le taux élevé de mutations observé chez les VPN en culture cellulaire (Burand et Summers, 1982; Kumar et Miller, 1987; Lee et Krell, 1992), et particulièrement dans le gène FP25K (Fraser, Smith et Summers, 1983; Fraser *et al.*, 1985; Beames et Summers, 1988, 1989; Harrison et Summers, 1995a, 1995b; Bischoff et Slavicek, 1997), toutes les caractéristiques mentionnées ci-dessus reliées à l'apparition de mutants FP sont seulement apparues entre les passages 10 et 12 de GmMVPN dans notre système cellulaire sans SVF. En effet, le nombre de polyèdres produits par millilitre de milieu de culture et le nombre de polyèdres par cellule infectée ont diminué à partir du passage 10 de GmMVPN, la proportion de polyèdres cubiques a augmenté considérablement à partir du 12^e passage viral, le pourcentage de cellules infectées a commencé à diminuer à partir du passage 12 de GmMVPN et l'accélération de l'accumulation en phase G₂/M du cycle cellulaire des cellules infectées a commencé à être évidente à partir du 10^e passage viral. De plus, les modifications de l'infection virale ont été observées par la microscopie électronique à partir du passage 12 de GmMVPN, l'expression de la polyédrine, de la p10 et de la protéine de 23 kDa a diminué considérablement à partir du 12^e passage viral, et finalement, 2 nouvelles protéines ont été exprimées à partir du passage 16 de GmMVPN. Par contre, l'analyse du titre viral démontre que les mutants FP ont commencé à apparaître à partir des passages 7 à 8 de GmMVPN, car le titre viral a commencé à être plus élevé à partir de ces passages viraux. Les épreuves biologiques ont cependant confirmé que les polyèdres produits lors des 10 premiers passages de GmMVPN étaient virulents *in vivo* et pourraient donc être utilisés comme bioinsecticides, même si des mutants FP étaient présents lors du 10^e passage viral.

Cette stabilité virale de 10 passages viraux est très semblable à celle obtenue lors des études de stabilité de VPN dans des systèmes cellulaires en présence de SVF. Elle est même supérieure à celle obtenue en utilisant le même virus, soit GmMVPN, dans un système cellulaire en présence de SVF. En effet, dans ce dernier système cellulaire, Fraser et Hink (1982) avaient obtenu une majorité de mutants FP après seulement 5 passages viraux. Selon Chakraborty et Reid (1999), une stabilité virale sur au moins 8 à 10 passages viraux est souhaitable pour que la production à grande échelle de bioinsecticides en bioréacteurs industriels soit possible. Cette affirmation signifie que notre système cellulaire ne contenant pas de SVF pourrait être applicable à la production massive de bioinsecticides. Donc, comme le SVF est un produit très dispendieux, peut contenir des facteurs cytotoxiques et est susceptible aux contaminations par les mycoplasmes, notre système cellulaire très simple sans SVF offre maintenant la possibilité de produire massivement des insecticides biologiques de manière très rentable et très simple à l'aide des VPN.

Nous avons aussi tenté de rétablir une production normale de polyèdres chez la population virale de GmMVPN passage 20 en injectant ces virus extracellulaires dans des larves de *Galleria mellonella*. Nous espérons ainsi rétablir les mutants FP présents dans la population de GmMVPN passage 20 en une majorité de virus sauvages MP. Lorsque les virus extracellulaires (VEC), obtenus à partir de l'hémolymphe des larves en phase virémique, ont été passés une fois à MI de 0,1 sur les cellules Sf9 MM8-SF dans des flacons de 25 cm², comme décrit à la section 2.1.2 du chapitre « Matériel et méthodes », nous avons d'abord observé que la production de polyèdres par millilitre de milieu de culture, la production de polyèdres par cellule infectée, la production de VEC et le pourcentage de cellules infectées avaient été rétablis partiellement. En effet, ces valeurs étaient très comparables à celles obtenues lors des passages 11 à 14 de GmMVPN. Étant donné qu'une population homogène de mutants FP produit seulement des mutants FP lorsqu'injectée chez des larves (Potter, Faulkner et MacKinnon, 1976; Fraser et Hink, 1982), la population de GmMVPN passage 20 devait être encore constituée d'un mélange de mutants FP et de virus sauvages MP. Une certaine proportion de virus MP aurait donc été amplifiée par un passage *in vivo* par injection. Par contre, en microscopie

électronique, la majorité des cellules Sf9 MM8-SF infectées par GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves ne contenait pas de virions enveloppés, pas de membrane synthétisée *de novo*, très peu ou pas de polyèdres, mais beaucoup de nucléocapsides simples (figure 11). De plus, lorsque les cellules contenaient des polyèdres, aucun virion ou très peu de virions courts étaient présents dans ces polyèdres. Ces observations démontrent que même si les virus MP ont été amplifiés par un passage *in vivo*, la majorité des virus présents dans la population de GmMVPN passage 20 amplifié une fois sur larves était tout de même des mutants FP. Donc, un passage *in vivo* de GmMVPN passage 20 a permis d'amplifier les virus MP et FP, mais n'a pas permis de rétablir une majorité de virus sauvages MP. Il est possible que le fait d'injecter plusieurs fois en série les virus extracellulaires de GmMVPN passage 20 dans des larves de *Galleria mellonella* puisse amplifier encore plus les virus sauvages MP. Cette hypothèse sera vérifiée prochainement. Finalement, l'observation en microscopie électronique que plusieurs cellules de larves de *Galleria mellonella* infectées par GmMVPN passage 20 contenaient plusieurs polyèdres présentant chacun plusieurs virions pourrait porter à confusion (figure 11). Cependant, lorsque des virus extracellulaires de mutants FP sont injectés à des larves, le nombre de polyèdres par cellule infectée varie selon le type de tissu infecté (Ramoska et Hink, 1974; Braunagel *et al.*, 1999). Donc, les cellules d'insectes observées en microscopie électronique provenaient peut-être de tissus infectés plus susceptibles à développer plusieurs polyèdres par cellule.

Pour ce qui est de l'expression de protéines recombinantes, nous avons premièrement observé que l'activité luciférase totale et par cellule suivaient une tendance assez stable en fonction des passages d'AcLuci dans notre système cellulaire sans SVF (figure 14). Par contre, dans les deux cas, des valeurs aberrantes ont été observées aux passages 3, 4, 6, 8, 14, 15 et 18 d'AcLuci, confirmé par des écarts types à l'extérieur de la tendance de 10^8 CPM et de $10^{2.5}$ CPM/cellule, démontrant qu'une variation d'activité luciférase totale est étroitement reliée à une variation d'activité luciférase par cellule. Par contre, la figure 14 ne tient pas compte de la viabilité des cellules et du degré d'avancement de l'infection. En effet, lors des passages 6, 8, 14, 15 et 18 d'AcLuci, le pourcentage de mortalité au 7^e jour post-infection était plus élevé que lors des autres passages viraux. Ce haut taux de

mortalité peut provenir soit de mauvaises conditions de culture, ou soit d'une infection virale plus avancée, c'est-à-dire où toutes les cellules sont mortes dû à l'infection et ont donc relâché la majorité du virus AcLuci à l'extérieur. Dans les 2 cas, il en résulte une activité luciférase plus faible, car l'activité luciférase a été mesurée à l'intérieur des cellules et non dans le surnageant. D'un autre côté, lors des passages 3 et 4 d'AcLuci, le pourcentage de mortalité au 7^e jour post-infection était plus faible et le nombre de cellules vivantes était plus élevé que lors des autres passages viraux. Comme nous avons mesuré l'activité luciférase à l'intérieur des cellules et non dans le surnageant et comme les cellules vivantes contiennent encore beaucoup de virus AcLuci par rapport aux cellules mortes, il est normal que nous ayons obtenu une plus grande activité luciférase lors des passages 3 et 4 d'AcLuci. Donc, l'expression de la luciférase, et par conséquent l'expression de protéines recombinantes, a été beaucoup plus stable en fonction des passages d'AcLuci dans notre système cellulaire sans SVF que ne le laisse paraître la figure 14.

Étant donné qu'une partie du gène de la polyédrine a été remplacée par le cadre de lecture ouvert de la luciférase de luciole lors de la construction du virus recombinant AcLuci, l'expression de cette luciférase est sous le contrôle du promoteur fort de la polyédrine (Mori *et al.*, 1992). Il est donc surprenant d'observer que l'expression de la polyédrine ait diminué après 12 passages de GmMVPN, alors que l'expression de la luciférase soit demeurée stable pendant plus de 18 passages d'AcLuci. Deux hypothèses pourraient expliquer cette stabilité d'expression de luciférase. La première est que le génome d'AcLuci n'ait subi aucune mutation lors des 18 passages viraux. Par contre, il est pratiquement impossible qu'aucune mutation ne soit apparue, étant donné que le génome des VPN subit très fréquemment des mutations en culture cellulaire (Burand et Summers, 1982; Kumar et Miller, 1987; Lee et Krell, 1992). La seconde est que le génome d'AcLuci ait été muté, mais dans une région du génome qui n'affecte pas l'expression de la luciférase, et par conséquent qui n'affecterait pas l'expression de la polyédrine chez un virus sauvage. Il serait donc vraiment surprenant que des mutations soient apparues dans le gène FP25K lors des passages d'AcLuci, car la protéine FP25K joue un rôle important dans l'expression de la polyédrine chez des virus sauvages (Jarvis, Bohlmeier et Garcia

Jr., 1992; Harrison, Jarvis et Summers, 1996). Par conséquent, si des mutations étaient apparues dans le gène FP25K d'AcLuci, l'activité luciférase aurait diminué en fonction des passages viraux, ce qui n'est pas le cas. Il est donc fort probable que des mutations soient apparues dans le génome d'AcLuci lors des passages viraux, mais pas dans le gène FP25K. Cette explication est la plus plausible, étant donné que plusieurs régions du génome de VPN autres que le gène FP25K sont susceptibles aux mutations (Burand et Summers, 1982; Miller et Miller, 1982; Kumar et Miller, 1987). Donc, la baisse d'expression de polyédrine après 12 passages de GmMVPN serait entre autres due à des mutations dans le gène FP25K, alors que la stabilité d'expression de luciférase pendant plus de 18 passages d'AcLuci serait expliquée par des mutations dans des régions du génome autres que le gène FP25K.

Ce qui est important pour nous, c'est que l'expression de la luciférase, et donc l'expression de protéines recombinantes, ait été stable pendant plus de 18 passages de virus recombinant AcLuci. Cette stabilité ne peut pas être comparée à d'autres études, car à notre connaissance, aucune publication n'a été effectuée auparavant sur la stabilité de production de protéines recombinantes en fonction de passages de VPN recombinants en culture cellulaire. Cependant, en prenant en considération qu'une stabilité virale d'au moins 8 à 10 passages viraux est souhaitable pour que la production massive de protéines recombinantes en bioréacteurs industriels soit possible (Chakraborty et Reid, 1999), nous pouvons affirmer que la production à grande échelle de luciférase est réalisable. Comme l'expression de cette luciférase permet de quantifier celle de protéines recombinantes, notre système cellulaire ne contenant pas de SVF offre donc une possibilité de production massive de protéines recombinantes.

Notre système cellulaire sans SVF offre donc un très grand potentiel en vue de produire massivement des bioinsecticides et des protéines d'intérêts médical, biologique et pharmaceutique. Il offre même une stabilité virale aussi élevée que dans un système cellulaire en présence de SVF. Étant donné que le système cellulaire utilisé lors de cette étude ne contenait pas de SVF et était probablement le plus simple et le moins dispendieux à produire parmi tous ceux disponibles, cette étude constitue un avancement

majeur vers la rentabilisation et la facilité de production massive de bioinsecticides et de protéines recombinantes à l'aide de VPN. Étant donné que cette étude a démontré une stabilité de production de protéines recombinantes et de bioinsecticides aussi élevée dans notre système cellulaire sans SVF que dans d'autres contenant du SVF, notre laboratoire pourra maintenant tester ce système cellulaire en absence de SVF dans des fermenteurs industriels de grands volumes.

Conclusion

Notre système cellulaire très simple ne contenant pas de sérum de veau fœtal (SVF) offre une stabilité de production de GmMVPN sur 10 à 12 passages viraux, ce qui concorde avec les études effectuées précédemment par d'autres équipes de recherche dans différents systèmes cellulaires contenant du SVF. Comme il a été observé auparavant dans ces systèmes cellulaires contenant du SVF, la diminution de stabilité virale après 10 passages viraux dans notre système cellulaire sans SVF était due à l'apparition de mutants FP, déterminé principalement par la production de polyèdres, de virus extracellulaires, de virions à l'intérieur des polyèdres et par l'expression de protéines. De plus, l'observation d'une diminution de l'expression de la polyédrine et d'une protéine de 23 kDa suggère que les mutants FP obtenus proviennent entre autres de mutations dans le gène FP25K de GmMVPN, ce qui concorde avec plusieurs études effectuées auparavant dans différents systèmes cellulaires en présence de SVF. Ces mutations ont entraîné une diminution de la virulence des polyèdres envers des larves de *Galleria mellonella* à partir du passage 10 de GmMVPN, démontrant une stabilité de production de bioinsecticides sur 10 passages viraux dans notre système cellulaire sans SVF.

La production de protéines recombinantes est également très stable dans notre système cellulaire sans SVF, étant donné que l'expression de la luciférase n'a pas diminué significativement sur plus de 18 passages du virus AcLuci, recombinant hybride de AcMVPN et de BmMVPN sauvages exprimant la luciférase au lieu de la polyédrine sous le contrôle du promoteur fort de la polyédrine.

Par conséquent, même si le génome des VPN est susceptible aux mutations en culture cellulaire, la production de VPN n'est pas affectée sur au moins 10 passages viraux successifs dans notre système cellulaire sans SVF, ce qui représente une stabilité virale intéressante pour la production massive de bioinsecticides et de protéines recombinantes dans des bioréacteurs industriels. De plus, notre système cellulaire sans SVF offre une

stabilité de production de VPN semblable à celle obtenue lors d'études antérieures dans plusieurs systèmes cellulaires contenant du SVF, et ce autant pour la production de bioinsecticides que pour la production de protéines recombinantes. C'est ce que nous voulions démontrer lors de cette étude.

Le SVF est un produit très dispendieux, peut contenir des facteurs cytotoxiques, est susceptible aux contaminations par les mycoplasmes et nuit à la purification des protéines recombinantes produites. De plus, le milieu de culture MM8-SF utilisé lors de ce projet ne contenait pas de SVF et pas de suppléments de lipides, et était par conséquent probablement le milieu de culture le plus simple à produire et le moins dispendieux parmi tous les milieux de culture sans SVF disponibles. Par conséquent, comme cette étude est la première à notre connaissance à avoir démontré une stabilité de production de protéines recombinantes et de bioinsecticides de VPN aussi élevée dans un système cellulaire sans SVF que dans un système cellulaire contenant du SVF, elle constitue un avancement majeur vers la rentabilisation et la simplification de la production massive de bioinsecticides et de protéines recombinantes à l'aide de baculovirus. En effet, notre système cellulaire sans SVF offre maintenant la possibilité de produire massivement des bioinsecticides et des protéines recombinantes à l'aide de baculovirus de manière très rentable et très simple, et ce avec peu de risques de contaminations par les mycoplasmes. De plus, notre système cellulaire sans SVF permet une simplification de la purification des protéines recombinantes produites par les VPN, ce qui est intéressant pour la production massive de protéines d'intérêts médicaux, pharmaceutiques et biologiques. Notre étude démontre donc que le SVF n'est pas nécessaire à une production massive de bioinsecticides et de protéines recombinantes à l'aide de baculovirus. Notre laboratoire se prépare maintenant à tester notre système cellulaire sans SVF directement dans des fermenteurs de grands volumes, en vue de produire massivement des bioinsecticides et des protéines recombinantes à l'aide de baculovirus.

Liste des références

- AGATHOS, S.N. 1991. « Mass production of viral insecticides ». In K. Maramorosch (Ed.). *Biotechnology for biological control of pests and vectors*. CRC Press, London, 1991, p. 217-235.
- AYRES, M.D., S.C. Howard, J. Kuzio, M. Lopez-Ferber et D. Possee. 1994. « The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». *Virology*, vol. 202, p. 586-605.
- BEAMES, B. et M.D. Summers. 1988. « Comparisons of host cell DNA insertions and altered transcription at the site of insertions in few polyhedra baculovirus mutants ». *Virology*, vol. 162, p. 206-220.
- BEAMES, B. et M.D. Summers. 1989. « Location and nucleotide sequence of a 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants ». *Virology*, vol. 168, p. 344-353.
- BELLONCIK, S., W.E. Akoury, et M. Cheroutre. 1997. « Importance of cholesterol for nuclear polyhedrosis virus (NPV) replication in cell cultures adapted to serum-free medium ». In K. Maramorosch et J. Mitsuhashi (Ed.). *Invertebrate cell culture : Novel directions and biotechnology applications*. Science Publishers Inc., p. 141-147.
- BELYAVSKYI, M., S.C. Braunagel et M.D. 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.
- BISCHOFF, D.S. et J.M. Slavicek. 1997. « Phenotypic and genetic analysis of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus few polyhedra mutants : mutations in the 25K FP gene may be caused by DNA replication errors ». *Journal of Virology*, vol. 71, no. 2, p. 1097-1106.
- BLISSARD, G.W., R.L. Quant-Russell, G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1989. « Nucleotide sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gene encoding p39, a major structural protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata* ». *Virology*, vol. 168, p. 354-362.
- BLISSARD, G.W. et G.F. Rohrmann. 1990. « Baculovirus diversity and molecular biology ». *Annual Review of Entomology*, vol. 35, p. 127-155.
- BLISSARD, G.W. et J.R. Wenz. 1992. « Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion ». *Journal of Virology*, vol. 66, no. 11, p. 6829-6835.

- BRAUNAGEL, S.C. et M.D. Summers. 1994. « *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids : structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles ». Virology, vol. 202, p. 315-328.
- BRAUNAGEL, S.C., H. He, P. Ramamurthy et M.D. Summers. 1996a. « Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins : ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27 ». Virology, vol. 222, no. 1, p. 100-114.
- BRAUNAGEL, S.C., D.M. Elton, H. Ma et M.D. Summers. 1996b. « Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope : ODV-E56 ». Virology, vol. 217, no. 1, p. 97-110.
- BRAUNAGEL, S.C., R. Parr, M. Belyavskiy et M.D. Summers. 1998. « *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G₂/M phase ». Virology, vol. 244, p. 195-211.
- BRAUNAGEL, S.C., J.K. Burks, G. Rosas-Acosta, R.L. Harrison, H. Ma et M.D. Summers. 1999. « Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport ». Journal of Virology, vol. 73, no. 10, p. 8559-8570.
- BROOKS, M.A. et K.R. Tsang. 1980. « Replacement of serum with cholesterol and lipids for cell lines of *Blattella germanica* ». In Vitro, vol. 16, p. 222.
- BROWN, M., P. Faulkner, M.A. Cochran et K.L. Chung. 1980. « Characterization of two morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with large cuboidal inclusion bodies ». Journal of General Virology, vol. 50, p. 309-316.
- BURAND, J.P. et M.D. Summers. 1982. « Alteration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA upon serial passage in cell culture ». Virology, vol. 119, p. 223-229.
- BURAND, J.P. 1999. « Nonoccluded baculoviruses ». In A. Granoff et R.G. Webster (Eds.). Encyclopedia of Virology. Second Edition, Volume 2. San Diego, California : Academic Press Limited, p. 1031-1034.
- BURGESS, S. 1977. « Molecular weights of lepidopteran baculovirus DNAs : derivation by electron microscopy ». Journal of General Virology, vol. 37, p. 501-510.
- CARSTENS, E.B., A. Krebs et C.E. Gallerneault. 1986. « Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra ». Journal of Virology, vol. 58, no. 2, p. 684-688.
- CHAKRABORTY, S. et S. Reid. 1999. « Serial passage of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* cell cultures ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 73, p. 303-308.

CHUNG, K.L., M. Brown et P. Faulkner. 1980. « Studies on the morphogenesis of polyhedral inclusion bodies of a baculovirus *Autographa californica* NPV ». Journal of General Virology, vol. 46, p. 335-347.

CROIZIER, G. et L. Croizier. 1977. « Évaluation du poids moléculaire de la protéine d'inclusion de divers *Baculovirus* d'insectes ». Archives of Virology, vol. 55, p. 247-250.

DOVERSKOG, M., E. Bertram, J. Ljunggren, L. Öhman, R. Sennerstam et L. Häggström. 2000. « Cell cycle progression in serum-free cultures of Sf9 insect cells : modulation by conditioned medium factors and implications for proliferation and productivity ». Biotechnol. Prog., vol. 16, p. 837-846.

FAULKNER, P. et J.F. Henderson. 1972. « Serial passage of a nuclear polyhedrosis disease virus of the cabbage looper (*Trichoplusia ni*) in the continuous tissue culture cell line ». Virology, vol. 50, p. 920-924.

FAULKNER, P., M. Brown et K.N. Potter. 1976. « Utilization of tissue culture techniques to clone an insect cell line and to characterize strains of baculovirus ». In E. Kurstak et K. Maramorosch (Ed.). *Invertebrate tissue culture : Applications in medicine, biology and agriculture*. New-York : Academic Press Inc., p. 347-360.

FAULKNER, P. et E.B. Carstens. 1986. « An overview of the structure and replication of baculoviruses ». Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 131, p. 1-19.

FAULKNER, P., J. Kuzio, G.V. Williams et J.A. Wilson. 1997. « Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo* ». Journal of General Virology, vol. 78, no. 12, p. 3091-3100.

FRASER, M.J. et W.F. Hink. 1982. « The isolation and characterization of the MP and FP plaque variants of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus ». Virology, vol. 117, p. 366-378.

FRASER, M.J., G.E. Smith et M.D. Summers. 1983. « Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses : relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses ». Journal of Virology, vol. 47, no. 2, p. 287-300.

FRASER, M.J., J.S. Brusca, G.E. Smith et M.D. Summers. 1985. « Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus ». Virology, vol. 145, p. 356-361.

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

GOMBART, A.F., M.N. Pearson, G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1989. « A baculovirus polyhedral envelope-associated protein : genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization ». Virology, vol. 169, p. 182-193.

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

GOODWIN, R.H., J.L. Vaughn, J.R. Adams et S.J. Louloudes. 1973. « The influence of insect cell lines and tissue culture media on *Baculovirus* polyhedra production ». Misc. Public Entomolog. Soc. Amer., vol. 9, p. 66-72.

GOODWIN, R.H. 1976. « Insect cell growth on serum-free media ». In Vitro, vol. 12, p. 303-304.

GOODWIN, R.H. et J.R. Adams. 1978. « Serum-free media for nutritional analysis and viral replication in lepidopteran insect cells ». In Vitro, vol. 14, p. 351.

GOODWIN, R.H. et J.R. Adams. 1980. « Liposome incorporation of factors permitting serial passage of insect viruses in lepidopteran cells grown in serum-free medium ». In Vitro, vol. 16, p. 222.

GOODWIN, R.H. 1990. « Lipid cell culture supplements ». Nature, vol. 347, p. 209-210.

GOODWIN, R.H. 1991. « Replacement of vertebrate serum with lipids and other factors in the culture of invertebrate cells, tissues, parasites, and pathogens ». In Vitro Cell. Dev. Biol., vol. 27A, p. 470-478.

GRACE, T.D.C. 1962. « Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro* ». Nature, vol. 195, p. 788-789.

GRACE, T.D.C. 1967. « Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombyx mori* ». Nature, vol. 216, p. 613.

GRANADOS, R.R. et K.A. Lawler. 1981. « *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection ». Virology, vol. 108, p. 297-308.

GROSS, C.H., R.L.Q. Russell et G.F. Rohrmann. 1994. « *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes : analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure ». Journal of General Virology, vol. 75, p. 1115-1123.

HARRISON, R.L. et M.D. Summers. 1995a. « Biosynthesis and localization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus 25K gene product ». Virology, vol. 208, p. 279-288.

HARRISON, R.L. et M.D. Summers. 1995b. « Mutations in the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production ». Journal of General Virology, vol. 76, p. 1451-1459.

- HARRISON, R.L., D.L. Jarvis et M.D. Summers. 1996. « The role of the AcMNPV 25K gene, "FP25", in baculovirus polh and p10 expression ». Virology, vol. 226, no. 1, p. 34-46.
- HINK, W.F. 1970. « Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni* ». Nature, vol. 226, p. 466-467.
- HINK, W.F. et P.V. Vail. 1973. « A plaque assay for titration of Alfalfa Looper nuclear polyhedrosis virus in a Cabbage Looper (TN-368) cell line ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 22, p. 168-174.
- HINK, W.F. et E. Strauss. 1976. « Replication and passage of Alfalfa Looper nuclear polyhedrosis virus plaque variants in cloned cell cultures and larval stages of four host species ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 27, p. 49-55.
- HINK, W.F., E.M. Strauss et D.E. Lynn. 1977. « Growth of TN-368 insect cells in serum-free media ». In Vitro, vol. 13, p. 177.
- HINK, W.F. 1991. « A serum-free medium for the culture of insect cells and production of recombinant proteins ». In Vitro Cell. Dev. Biol., vol. 27A, p. 397-401.
- HIRUMI, H., K. Hirumi et A.H. McIntosh. 1975. « Morphogenesis of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper in a continuous cabbage looper cell line ». Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 266, p. 302-326.
- HONG, T., S.C. Braunagel et M.D. Summers. 1994. « Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Virology, vol. 204, no. 1, p. 210-222.
- HONG, T., M.D. Summers et S.C. Braunagel. 1997. « N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, no. 8, p. 4050-4055.
- 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 ». Journal of Virology, vol. 67, no. 4, p. 1860-1868.
- IGNOFFO, C.M., M. Shapiro et W.F. Hink. 1971. « Replication and serial passage of infectious *Heliothis* nucleopolyhedrosis virus in an established line of *Heliothis zea* cells ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 18, p. 131-134.
- IKEDA, M. et M. Kobayashi. 1999. « Cell-cycle perturbation in Sf9 cells infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrosis ». Virology, vol. 258, no. 1, p. 176-188.

- JARVIS, D.L., D.A. Bohlmeyer et A. Garcia Jr. 1992. « Enhancement of polyhedrin nuclear localization during baculovirus infection ». Journal of Virology, vol. 66, no. 12, p. 6903-6911.
- KARBER, G. 1931. « Bertrag zur Kolllecven Behandlung Pharmakologischer Reihnenversuch ». Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., vol. 162, p. 480-483.
- KIOUKIA, N., A.W. Nienow, A.N. Emery et M. Al-Rubeai. 1995. « Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus ». Journal of Biotechnology, vol. 38, p. 243-251.
- KITAMURA, S., T. Imai et T.D.C. Grace. 1973. « Adaptation of two mosquito cell lines to medium free of calf serum ». J. Med. Entomol., vol. 10, p. 488-489.
- KNUDSON, D.L. et T.W. Tinsley. 1974. « Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda* : purification, assay of infectivity, and growth characteristics of the virus ». Journal of Virology, vol. 14, no. 4, p. 934-944.
- KNUDSON, D.L. et K.A. Harrap. 1976. « Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda* : microscopy study of the sequence of events of the virus infection ». Journal of Virology, vol. 17, no. 1, p. 254-268.
- KOIKE, M. et K. Sato. 1988. « Culture of insect cell lines originated from *Mamestra brassicae* with autoclaved serum-free medium ». In Y. Kuroda, E. Kurstak et K. Maramorosch (Eds.). *Invertebrate and fish tissue culture*. New-York : Springer-Verlag, p. 7-10.
- KOMPIER, R., N. Kislev, I. Segal et A. Kadouri. 1991. « Use of a stationary bed reactor and serum-free medium for the production of recombinant proteins in insect cells ». Enzyme Microbial Technology, vol. 13, p. 822-827.
- KRYWIENCZYK, J. et S.S. Sohi. 1967. « Immunofluorescence studies of *Bombyx mori* ovarian tissue cultures infected with nuclear-polyhedrosis virus ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 9, no. 4, p. 568-570.
- KUMAR, S. et L.K. Miller. 1987. « Effects of serial passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture ». Virus Research, vol. 7, p. 335-349.
- KUNO, G. 1983. « Cultivation of mosquito cell lines in serum-free media and their effects on dengue virus replication ». In Vitro, vol. 19, no. 9, p. 707-713.
- KUZIO, J., R. Jaques et P. Faulkner. 1989. « Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies ». Virology, vol. 173, p. 759-763.
- LAEMMLI, U.K. 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». Nature, vol. 227, p. 680-685.

- LEE, H.Y. et P.J. Krell. 1992. « Generation and analysis of defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 66, no. 7, p. 4339-4347.
- LÉRY, X., G. Charpentier et S. Belloncik. 1999. « DNA content analysis of insect cell lines by flow cytometry ». Cytotechnology, vol. 29, p. 103-113.
- LU, A. et E.B. Carstens. 1992. « Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p80 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus :a homologue of the *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus capsid-associated gene ». Virology, vol. 190, no. 1, p. 201-209.
- LUCKOW, V.A. et M.D. Summers. 1988. « Trends in the development of baculovirus expression vectors ». Bio/technology, vol. 6, p. 47-55.
- LYNN, D.E. 2000. « Effects of long- and short-term passage of insect cells in different culture media on baculovirus replication ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 76, p. 164-168.
- MACKINNON, E.A., J.F. Henderson, D.B. Stoltz et P. Faulkner. 1974. « Morphonogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage *in vitro* ». J. Ultrastructure Research, vol. 49, p. 419-435.
- MAIORELLA, B., D. Inlow, A. Shauger et D. Harano. 1988. « Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production ». Bio/technology, vol. 6, p. 1406-1410.
- MILLER, D.W. et L.K. Miller. 1982. « A virus mutant with insertion of a *copia*-like transposable element ». Nature, vol. 299, p. 562-564.
- MILLER, L.K. 1988. « Baculoviruses as gene expression vectors ». Annual Review in Microbiology, vol. 42, p. 177.
- MITSUHASHI, J. 1982. « Continuous cultures of insect cell lines in media free of sera ». Appl. Entomol. Zool., vol. 17, p. 575-581.
- MITSUHASHI, J. 1989. « Simplified medium (MTCM-1601) for insect cell lines ». Journal of Tissue Culture Methods, vol. 12, no. 3, p. 21-22.
- MITSUHASHI, J. et R.H. Goodwin. 1989. « The serum-free culture of insect cells *in vitro* ». In J. Mitsuhashi (Eds). *Invertebrate cell system applications. Volume I*. Boca Raton, Florida : CRC Press, p. 31-43.
- MONSMA, S.A., A.G.P. Oomens et G.W. Blissard. 1996. « The gp64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection ». Journal of Virology, vol. 70, no. 7, p. 4607-4616.

- MORI, H., H. Nakazawa, N. Shirai, N. Shibata, M. Sumida et F. Matsubara. 1992. « Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range ». Journal of General Virology, vol. 73, p. 1877-1880.
- MÜLLER, R., M.N. Pearson, R.L.Q. Russell et G.F. Rohrmann. 1990. « A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata* : genetic location, sequence, transcriptional mapping, and immunocytochemical characterization ». Virology, vol. 176, p. 133-144.
- MURPHY, F.A., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo et M.D. Summers (Eds.). 1995. Virus Taxonomy : Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology/Supplément 10. Wien, New York : Springer-Verlag, 586 p.
- OOMENS, A.G.P., S.A. Monsma et G.W. Blissard. 1995. « The baculovirus gp64 envelope fusion protein : synthesis, oligomerization, and processing ». Virology, vol. 209, p. 592-603.
- PEARSON, M.N., R.L. Quant-Russell, G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1988. « P39, a major baculovirus structural protein : immunocytochemical characterization and genetic location ». Virology, vol. 167, p. 407-413.
- POTTER, K.N., P. Faulkner et E.A. MacKinnon. 1976. « Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 18, no. 3, p. 1040-1050.
- QUANT, R.L., M.N. Pearson, G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1984. « Production of polyhedrin monoclonal antibodies for distinguishing two *Orgyia pseudotsugata* baculoviruses ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 48, no. 4, p. 732-736.
- QUANT-RUSSELL, R.L., M.N. Pearson, G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1987. « Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies ». Virology, vol. 160, p. 9-19.
- RAGHOW, R. et T.D.C. Grace. 1974. « Studies on a nuclear polyhedrosis virus in *Bombyx mori* cells *in vitro*. 1. Multiplication kinetics and ultrastructural studies ». Journal of Ultrastructure Research, vol. 47, p. 384-399.
- RAMOSKA, W.A. et W.F. Hink. 1974. « Electron microscope examination of two plaque variants from a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper, *Autographa californica* ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 23, p. 197-201.
- REED, L.J. et H. Muench. 1938. « A simple method of estimating fifty percent endpoints ». American Journal of Hygiene, vol. 27, p. 493-497.

- ROBERTSON, J.S., K.A. Harrap et J.F. Longworth. 1974. « Baculovirus morphogenesis: the acquisition of the virus envelope ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 23, no. 2, p. 248-251.
- RÖDER, A. 1982. « Development of a serum-free medium for cultivation of insect cells ». Naturwissenschaften, vol. 69, p. 92-93.
- ROHRMANN, G.F. 1986. « Review article : polyhedrin structure ». Journal of General Virology, vol. 67, p. 1499-1513.
- ROHRMANN, G.F. 1992. « Review article : Baculovirus structural proteins ». Journal of General Virology, vol. 73, p. 749-761.
- ROHRMANN, G.F. 1999. « Baculoviruses (*Baculoviridae*) : *Nucleopolyhedrovirus* ». In A. Granoff et R.G. Webster (Eds.). *Encyclopedia of Virology*. Second Edition, Volume 1. San Diego, California : Academic Press Limited, p. 146-152.
- RUSSELL, R.L.Q. et G.F. Rohrmann. 1990a. « A baculovirus polyhedron envelope protein : immunogold localization in infected cells and mature polyhedra ». Virology, vol. 174, p. 177-184.
- RUSSELL, R.L.Q. et G.F. Rohrmann. 1990b. « The p6.5 gene region of a nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata* : DNA sequence and transcriptional analysis of four late genes ». Journal of General Virology, vol. 71, p. 551-560.
- RUSSELL, R.L.Q., M.N. Pearson et G.F. Rohrmann. 1991. « Immunoelectron microscopic examination of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cells : time course and localization of major polyhedron-associated proteins ». Journal of General Virology, vol. 72, p. 275-283.
- RUSSELL, R.L.Q. et G.F. Rohrmann. 1993. « A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions ». Virology, vol. 195, p. 532-540.
- RUSSELL, R.L. et G.F. Rohrmann. 1997. « Characterization of p91, a protein associated with virions of an *Orgyia pseudotsugata* baculovirus ». Virology, vol. 233, no. 1, p. 210-223.
- SCHAFER, M.P., G.F. Rohrmann, U. Heine et G.S. Beaudreau. 1979. « DNA from two *Orgyia pseudotsugata* baculoviruses : molecular weight determination by means of electron microscopy and restriction endonuclease analysis ». Virology, vol. 95, p. 176-184.
- SHAPIRO, A.L., E. Vinuela et J.V. Maizel. 1967. « Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 28, no. 5, p. 815-820.

- SLAVICEK, J.M., M.J. Mercer, M.E. Kelly et N. Hayes-Plazolles. 1996. « Isolation of a baculovirus variant that exhibits enhanced polyhedra production stability during serial passage in cell culture ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 67, p. 153-160.
- STOLTZ, D.B., C. Pavan et A.B. Dacunha. 1973. « Nuclear polyhedrosis virus : a possible example of *de novo* intranuclear membrane morphogenesis ». Journal of General Virology, vol. 19, p. 145-150.
- SUMMERS, M.D. et G.E. Smith. 1978. « Baculovirus structural polypeptides ». Virology, vol. 84, p. 390-402.
- SUMMERS, M.D. et G.E. Smith. 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no. 1555.
- VAUGHN, J.L., R.H. Goodwin, G.J. Tompkins et P. McCawley. 1977. « The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae) ». In Vitro, vol. 13, no. 4, p. 213-217.
- VIALARD, J.E. et C.D. Richardson. 1993. « The 1,629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein ». Journal of Virology, vol. 67, no. 10, p. 5859-5866.
- VOLKMAN, L.E. et M.D. Summers. 1977. « *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus : comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms ». Journal of Invertebrate Pathology, vol. 30, p. 102-103.
- VOLKMAN, L.E., P.A. Goldsmith, R.T. Hess et P. Faulkner. 1984. « Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody : identification of the target antigen ». Virology, vol. 133, p. 354-362.
- VOLKMAN, L.E. et P.A. Goldsmith. 1985. « Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody : inhibition of entry by adsorptive endocytosis ». Virology, vol. 143, p. 185-195.
- VOLKMAN, L.E. 1986. « The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 131, p. 103-118.
- WEBER, K. et M. Osborn. 1969. « The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ». The Journal of Biological Chemistry, vol. 244, no. 16, p. 4406-4412.
- WHITFORD, M., S. Stewart, J. Kuzio et P. Faulkner. 1989. « Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 63, no. 3, p. 1393-1399.

- WHITFORD, M. et P. Faulkner. 1992a. « A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine ». Journal of Virology, vol. 66, no. 6, p. 3324-3329.
- WHITFORD, M. et P. Faulkner. 1992b. « Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ». Journal of Virology, vol. 66, no. 8, p. 4763-4768.
- WILKIE, G.E.I., H. Stockdale et S.V. Pirt. 1980. « Chemically-defined media for production of insect cells and viruses *in vitro* ». Develop. Biol. Standard, vol. 46, p. 29-37.
- WILLIAMS, G.V., D.Z. Rohel, J. Kuzio et P. Faulkner. 1989. « A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants ». Journal of General Virology, vol. 70, p. 187-202.
- WILSON, M.E., T.H. Mainprize, P.D. Friesen et L.K. Miller. 1987. « Location, transcription, and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide ». Journal of Virology, vol. 61, no. 3, p. 661-666.
- WOLGAMOT, G.M., C.H. Gross, R.L. Russell et G.F. Rohrmann. 1993. « Immunocytochemical characterization of p24, a baculovirus capsid-associated protein ». Journal of General Virology, vol. 74, no. 1, p. 103-107.
- WOOD, H.A. 1980. « *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced proteins in tissue culture ». Virology, vol. 102, p. 21-27.
- WOOD, H.A et R.R. Granados. 1991. « Genetically engineered baculovirus as agents for pest control ». Annual Review of Microbiology, vol. 45, p. 69-87.

Annexes

Annexe I*Préparation du milieu de culture MM8-SF(pour 1 litre)*

- 1) Dissoudre complètement les composés suivants dans 800 mL d'eau déionisée à température de la pièce :
 - 7 grammes de chlorure de sodium (NaCl) de Fisher Scientific, #S271-1
 - 0,2 gramme de chlorure de potassium (KCl) de Sigma, #P-4504
 - 0,1 gramme de chlorure de magnésium ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) de Fisher Scientific, #M33-500
 - 0,2 gramme de chlorure de calcium dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) de Fisher Scientific, #C79-500
 - 4 grammes de D-(+)-glucose anhydre de Sigma, #G-7021.

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

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

- 4) Compléter à 1 litre avec de l'eau déionisée stérile.

- 5) Ajouter 2 mL de l'antibiotique pénicilline-streptomycine 10 000µg/mL (20µg/mL final) de Gibco BRL, #15140-148.

- 6) Ajuster le pH entre 6,18 et 6,22 avec du HCl 1N ou du NaOH 1N.

- 7) Conserver à 4°C.

- 8) En culture cellulaire, aucun autre composé ne doit être ajouté au milieu MM8-SF. Par contre, lors d'une infection virale, une concentration finale de 20 $\mu\text{g/mL}$ de cholestérol doit être utilisée pour permettre la réplication virale. Pour ce faire, 20 mg de cholestérol (Sigma, #C-2044) ont été complètement dissous dans 1 mL d'éthanol 100%. Cette solution cholestérol a été diluée 1 dans 1000 dans le milieu MM8-SF lors de l'infection virale.

Annexe II***Préparation de milieu Grace+10% SVF (pour 500 mL)***

- 1) Mélanger les solutions suivantes :
 - 500 mL de milieu Grace pour culture de cellules d'insectes de Sigma, #G-8142
 - 10 mL d'hydrolysate de lactalbumine 1X (0,033 gramme au total) préparé à partir d'hydrolysate de lactalbumine en poudre de Sigma, #L-9010
 - 10 mL de yeastolate 1X (0,033 gramme au total) préparé à partir du yeastolate 50X de Gibco BRL, #18190-041
 - 50 mL de sérum de veau fœtal (SVF) (10% final) de Gibco BRL, #16140-071
 - 5 mL de L-glutamine 200 mM (2mM final) de Gibco BRL, #25030-149
 - 1 mL de l'antibiotique pénicilline-streptomycine 10 000µg/mL (20µg/mL final) de Gibco BRL, #15140-148.

- 2) Ajuster le pH entre 6,18 et 6,22 avec du HCl 1N ou du NaOH 1N.

- 3) Conserver à 4°C.

Annexe III***Préparation de la diète artificielle pour larves de Galleria mellonella***

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

Annexe IV***Liste des produits utilisés lors de ce projet (sauf ceux mentionnés aux annexes I à III)***

1) Microscopie électronique :

- Glutaraldéhyde 2,5% de Mecalab, #1156
- Tampon cacodylate 0,1M, pH 7.2, de Electron Microscopy Science, #12300
- Sucrose de BDH, #ACS888
- Tétroxyde d'osmium (OsO₄) de Mecalab, #1615
- Tampon s-collidine de M.E.C.A., #2015
- Résine SPURR de Mecalab, #3165
- Acétate d'uranyl d'Electron Microscope Scientifique, #22400
- Citrate de plomb de LADD Research, #23603.

2) Technique de double immuno-diffusion :

- Agarose Seakem ME de Mandel Scientific Company, #MC-50011
- Bleu de Coomassie brillant R-250 de Gibco-BRL, #5528UA
- Méthanol 100%
- Acide acétique glacial 100% de Fisher Scientific, #A38S-225.

3) Électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide :

- Solution SDS (sodium dodécyl sulfate) 10% de Gibco BRL, #15553-035
- 2-mercaptoéthanol de Bio-Rad Laboratories, #161-0710
- Glycérol de Gibco-BRL, #5514UA
- Bleu de bromophénol de Fisher Scientific Company, #B-392
- Tris-HCl en poudre de Gibco-BRL, #5506UA
- Tris en poudre de Gibco-BRL, #15504-020
- Glycine en poudre de Sigma, #G-4392
- Acrylamide de Boehringer Mannheim, #100-133
- N,N'- méthylènebisacrylamide de Gibco-BRL #5516UB
- Persulfate d'ammonium 10% de Gibco-BRL, #5523UA

- TEMED (N, N, N', N'- tetraméthylènediamine) de Bio-Rad Laboratories, #161-0801
- Bleu de Coomassie brillant R-250 de Gibco-BRL, #5528UA
- Méthanol 100%
- Acide acétique glacial 100% de Fisher Scientific, #A38S-225.

4) Immunobuvardage de type Western :

- Tris-HCl en poudre de Gibco-BRL, #5506UA
- Tris en poudre de Gibco-BRL, #15504-020
- Glycine en poudre, Sigma #G-4392
- Méthanol 100%
- Chlorure de sodium (NaCl) de Fisher Scientific, #S271-1
- Tween 20 (Polysorbate 20) de Fisher Scientific, #BP337-100
- Albumine bovine Fraction V (BSA) en poudre de Sigma, #A-4503
- Gélatine en poudre de Bio-Rad Laboratories, #170-6537
- Anticorps anti-IgG de cobaye conjugué à la peroxydase de raifort de Miles, Yeda Ltd., #61-208
- 4-chloro-1-naphtol de Polysciences, #9761
- Peroxyde d'hydrogène 3%
- Bleu de Coomassie brillant R-250 de Gibco-BRL, #5528UA
- Méthanol 100%
- Acide acétique glacial 100% de Fisher Scientific, #A38S-225.

5) Immunoperoxydase :

- Phosphate de sodium monobasique dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) de Fisher Scientific, #S381-500
- Phosphate de sodium dibasique anhydre (Na_2HPO_4) de Sigma, #S-9763
- Paraformaldéhyde 37% de Fisher Scientific, #F-79B
- Chlorure de sodium (NaCl) de Fisher Scientific, #S271-1
- Albumine bovine Fraction V (BSA) en poudre de Sigma #A-4503
- Tween 20 (Polysorbate 20) de Fisher Scientific #BP337-100

- Tris-HCl en poudre de Gibco-BRL, #5506UA
- Tris en poudre de Gibco-BRL, #15504-020
- Anticorps anti-IgG de cobaye conjugué à la peroxydase de raifort de Miles, Yeda Ltd., #61-208
- Tétrachlorure de diaminobenzidine Grade II (DAB) de Sigma, #D-5637
- Peroxyde d'hydrogène 3%.

6) Cytofluorométrie :

- Citrate de sodium de Gibco-BRL, #15584-014
- Détergent Igepal CA-630 de Sigma, #I-3021
- Solution bromure d'éthidium 10 mg/mL de Gibco-BRL, #15585-011
- RNase T1 à 1188 U/ μ L de Gibco-BRL, #18030-015.

7) Dissolution de polyèdres :

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

8) Technique de plages :

- Agarose Seakem ME de Mandel Scientific Company, #MC-50011
- Rouge neutre en poudre de Sigma, #N6634.

9) Coloration Buffalo Black :

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