

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

MEMOIRE PRESENTE A
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
RENEE BEDARD

REPLICATION EN CULTURE CELLULAIRE
DU VIRUS DE LA POLYEDROSE CYTOPLASMIQUE
(VPC) D'Euxoa scandens, RILEY (NOCTUIDAE,
AGROTINAE) SUIVIE PAR UNE
METHODE IMMUNOENZYMATIQUE

AOUT 1985

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Table des matières

Table des matières	i
Sommaire	ix
Liste des abréviations	xiii
Liste des figures	xv
Liste des tableaux	xxi
Chapitre premier - Revue Bibliographique	1
1. Introduction générale	2
1.1 Contrôle microbien en général	3
1.2 Contrôle viral des invertébrés	6
2. Les virus des polyédroses cytoplasmiques	15
2.1 Caractéristiques des VPC	15
2.2 Réplication des protéines et de l'ARN des VPC chez les insectes <u>in vivo</u> en microscopies (optique et électronique)	19
2.3 Réplication des protéines et de l'ARN des VPC chez les insectes <u>in vitro</u> en microscopies (optique et électronique)	27
2.4 Conclusion sur la réplication des VPC chez les insectes <u>in vivo</u> et <u>in vitro</u>	29
2.5 Caractérisation électrophorétique des protéines et de l'ARN des VPC chez les insectes	30
2.6 Transcription et traduction des VPC chez les insectes	33
2.7 Effets de certains agents physiques et chimiques sur la transcription et la traduction des VPC	43
3. Les virus iridescents	46
3.1 Caractéristiques du CIV (<u>Chilo</u> iridescent virus)	46
3.2 Réplication du CIV chez les insectes <u>in vivo</u>	49
3.3 Réplication du CIV chez les lignées cel- lulaires d'insectes cultivées <u>in vitro</u>	51
3.4 Multiplication du CIV	55

Table des matières (suite)

4. Infections mixtes impliquant des virus de polyédroses cytoplasmiques et des virus iridescents	56
5. Historique des moyens de titration des virus d'insectes	59
6. Détections immunoenzymatiques	60
6.1 Introduction sur l'emploi des méthodes immunoenzymatiques et des techniques à l'immunoperoxydase	60
6.2 Emploi général en bactériologie, en parasitologie, en pathologie et en virologie	65
Chapitre II - Matériels et Méthodes	76
1. Techniques non-immunologiques	77
1.1 Elevage de l'insecte	77
1.1.1 Technique d'élevage de <u>Euxoa messoria</u> au laboratoire	77
1.1.1.1 Les oeufs	77
1.1.1.2 Les larves	77
1.1.2 Technique d'élevage de <u>Galleria mellonella</u> au laboratoire	78
1.1.2.1 Les larves	78
1.2 Préparation des suspensions virales	79
1.2.1 Le virus de la polyédrose cytoplasmique d' <u>E. scandens</u>	79
1.2.1.1 Infection des larves d' <u>E. messoria</u>	79
1.2.1.2 Purification grossière des particules virales du VPC d' <u>E. scandens</u> à partir de larves d' <u>E. messoria</u>	80
1.2.1.3 Purification des polyèdres du VPC d' <u>E. scandens</u> à partir de larves d' <u>E. messoria</u>	80
1.2.1.4 Dissolution des polyèdres cytoplasmiques pour l'obtention des particules virales du VPC d' <u>E. scandens</u>	82

Table des matières (suite)

1.2.1.5	Purification des particules virales non-incluses du VPC d' <u>E. scandens</u> pour la production du sérum anti-virus	83
1.2.1.6	Dosage des suspensions virales du VPC d' <u>E. scandens</u> par une microméthode	83
1.2.2	Le virus iridescent cytoplasmique (CIV type 6) de <u>Chilo suppressalis</u>	86
1.2.2.1	Infection des larves de <u>Galleria mellonella</u>	86
1.2.2.2	Purification des particules virales du CIV à partir de larves de <u>Galleria mellonella</u>	87
1.2.2.3	Dosage des particules virales du CIV par densitométrie	89
1.3	Maintien des lignées cellulaires d'insectes cultivées <u>in vitro</u>	90
1.3.1	Ensemencement en boîte de culture	92
1.3.2	Ensemencement en tubes Leighton	93
1.3.3	Ensemencement sur microplaque	94
1.3.4	Dénombrement des cellules viables cultivées <u>in vitro</u>	95
1.4	Infection virale chez les lignées cellulaires d'insectes cultivées <u>in vitro</u> en microscopie optique	96
1.4.1	En tubes Leighton	96
1.4.2	Sur microplaque	97
1.5	Fixation des cellules de lignées cellulaires d'insectes cultivées <u>in vitro</u> en microscopie optique	97
1.5.1	En tubes Leighton	98
1.5.2	Sur microplaque	99
1.5.3	Conclusion suite au procédé de fixation	100
1.6	Effet de la concentration virale du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulaires d' <u>E. scandens</u> et de <u>L. dispar</u> en microscopie optique	100

Table des matières (suite)

1.7 Effet de la température d'incubation (agent physique) sur le mécanisme de la réplication du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulaires d' <u>E. scandens</u> et de <u>L. dispar</u> en microscopie optique	101
1.8 Inhibition à la cordycépine (agent chimique) de la synthèse des antigènes viraux du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulaires d' <u>E. scandens</u> et de <u>L. dispar</u> en microscopie optique	101
1.9 Infection mixte du type VPC-CIV chez la lignée cellulaire de <u>C. fumiferana</u> en microscopie optique	103
2.0 Coloration histologique employée pour la différenciation des corps d'inclusions protéiniques du VPC d' <u>E. scandens</u>	103
2. Méthodes de détection immunologique des antigènes du VPC d' <u>E. scandens</u>	105
2.1 Production d'immunsérums contre le VPC d' <u>E. scandens</u>	105
2.1.1 Types d'immunsérums contre le VPC d' <u>E. scandens</u>	105
2.1.1.1 Sérum anti-intestin de larves d' <u>E. scandens</u> infectées	105
2.1.1.2 Sérum anti-virus	106
2.1.1.3 Sérum anti-polyèdre complet	106
2.1.1.4 Sérum anti-polyèdre dissout	107
2.1.1.5 Sérum de chèvre anti-immunoglobulines de lapin	107
2.1.2 Préparation des immunsérums contre le VPC d' <u>E. scandens</u>	107
2.2 Purification des anticorps spécifiques aux antigènes du VPC d' <u>E. scandens</u>	108
2.2.1 Chromatographie d'exclusion sur gel	108
2.2.2 Evaluation de la pureté des immunoglobulines G	109
2.2.3 Calcul de la concentration sérique en immunoglobulines G	110
2.3 Conjugaison des immunoglobulines G (purifiées) à la peroxydase (HRPO)	111

Table des matières (suite)

2.3.1 Les diverses étapes menant à la formation du complexe immunoglobuline G-peroxydase	111
2.3.2 Séparation de la peroxydase libre des immunoglobulines G couplées à la peroxydase, et des immunoglobulines G libres	116
2.4 Méthodes de détection immunoenzymatique à l'immunoperoxydase (Ip) des divers antigènes viraux du VPC d' <u>E. scandens</u> en microscopie optique	116
2.4.1 Diverses méthodes de détection immunoenzymatique à l'Ip	116
2.4.1.1 Méthode directe	116
2.4.1.2 Méthode indirecte	118
2.4.2 Application des méthodes de détection (directe et indirecte) à l'Ip	121
2.4.2.1 En tubes Leighton	121
2.4.2.1.1 Préparation du matériel ...	122
2.4.2.1.2 Montage des lames	122
2.4.2.2 Sur microplaque	123
2.5 Méthode séro-immunologique (Ouchterlony)	125
2.5.1 But de la technique d'Ouchterlony	125
2.5.2 Principe de la technique d'Ouchterlony	125
2.5.3 Description et préparation du matériel utilisé lors de la technique d'Ouchterlony	126
2.5.3.1 Préparation du gel	126
2.5.3.2 Préparation des plaques	126
2.5.3.3 Préparation des antigènes et des anticorps	127
2.5.3.3.1 Extraits de larves d' <u>E. messoria</u> (saines ou infectées).....	127
2.5.3.3.2 Extraits de cellules d'insectes	127
2.5.3.3.3 Les sérums	128
2.5.4 Application de la technique d'Ouchterlony ...	128
2.5.4.1 Incubation des plaques	128

Table des matières (suite)

2.5.4.2 Lavage des plaques	129
2.5.4.3 Séchage des plaques	129
2.5.4.4 Coloration des plaques	129
3. Evaluation du nombre de polyèdres cyto- plasmiques du VPC d' <u>E. scandens</u>	131
4. Traitements mathématiques et informatiques utilisés	132
Chapitre III - Résultats	133
1. Tests d'Ouchterlony	134
2. Etude des méthodes de détection immunoenzymatique à l'Ip des divers antigènes viraux du VPC d' <u>E. scandens</u> en microscopie optique	149
2.1 Cellules d'insectes cultivées en tubes Leighton ...	149
2.2 Cellules d'insectes cultivées sur microplaque	164
2.2.1 Effet de la concentration virale du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulai- res d' <u>E. scandens</u> et de <u>L. dispar</u>	169
2.2.2 Effet de la température d'incubation (agent physique) sur le mécanisme de la réplication du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulaires d' <u>E. scandens</u> et de <u>L. dispar</u>	184
2.2.3 Effet d'un inhibiteur (cordycépine) sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulaires d' <u>E. scandens</u> et de <u>L. dispar</u>	199
2.2.3.1 Effet de la concentration en cor- dycépine sur les cinétiques d'appa- rition des divers antigènes viraux du VPC d' <u>E.s.</u> chez les lignées cel- lulaires d' <u>E. scandens</u> et de <u>L. dispar</u>	199
2.2.3.2 Effet d'une période post-infection variée sans cordycépine sur les ci- nétiques d'apparition des divers an- tigènes viraux du VPC d' <u>E.s.</u> chez les lignées cellulaires d' <u>E. scandens</u> et de <u>L. dispar</u>	210
2.2.4 Influence d'une infection mixte du type VPC-CIV chez la lignée de <u>C. fumiferana</u>	224

Table des matières

3. Evaluations du nombre de polyèdres du VPC d' <u>E. scandens</u> chez trois lignées cellulaires d'insectes à divers temps post-infection	231
4. Traitements informatisés des cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d' <u>E.s.</u>	239
4.1 Variation de la concentration du VPC	239
4.2 Variation de la température d'incubation	241
4.3 Variation de la concentration de cordycépine	243
4.4 Variation de la période post-infection sans cordycépine	245
4.5 Variation du temps post-infection	247
4.6 Variation de la concentration du CIV	247
Chapitre IV - Discussions et Conclusions	253
1. Tests d'Ouchterlony	254
2. Choix des fixateurs	257
3. Technique à l'Ip	259
3.1 Marquages immuno-spécifiques	259
3.2 Cinétiques de synthèse des divers ag viraux du VPC d' <u>E.s.</u>	262
3.2.1 Effets de concentrations virales variées en VPC	262
3.2.2 Effets de températures d'incubation variées .	266
3.2.3 Effets de concentrations inhibitrices variées en cordycépine	268
3.2.4 Effets de périodes post-infection variées avant l'application de la cordycépine	271
3.2.5 Effet d'une infection double avec des con- centrations virales variées de CIV	276
4. Production des polyèdres du VPC d' <u>E.s.</u>	279
5. Traitements mathématiques	283

Table des matières (suite)

Perspective d'avenir	290
Remerciements	293
Références	295
Annexe	317
Appendice	319

Sommaire

Au cours de ce projet de recherche, nos efforts ont porté sur l'étude du mécanisme de la réplication du virus de la polyédrose cytoplasmique (VPC) d'Euxoa scandens chez diverses lignées cellulaires d'insectes (Lymantria dispar; Euxoa scandens; Choristoneura fumiferana) sachant à priori que ce virus pourrait éventuellement être employé à grande échelle dans l'environnement comme insecticide pour minimiser les ravages occasionnés par certains insectes.

Bien que le mécanisme de la réplication du VPC d'E. scandens soit connu en partie grâce au développement et à l'utilisation récemment des trois lignées de cultures cellulaires, il demeure que ces trois lignées cellulaires répondent différemment à l'infection par ce type de virus.

Aussi dans ce travail, l'emploi d'une méthode immunologique sensible qu'est l'immunoperoxydase nous a permis d'établir les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. chez ces trois mêmes lignées influencées par de nombreux paramètres physico-chimiques en cours d'infection virale par ce virus. Entre autres, l'effet de la concentration du VPC, l'influence de la température d'incubation, l'effet de la concentration de la cordycépine (inhibiteur de synthèse) et du temps post-infection avant le contact avec la cordycépine ont été testés chez les lignées de L.d. et d'E.s.. Quels que soient les paramètres physico-chimiques impliqués, il semble que la lignée de L.d. soit plus permissive que la lignée d'E.s. à l'infection virale au VPC d'E.s.. De plus, la température optimum pour l'expression des antigènes viraux chez les deux lignées cellulaires utilisées est 28°C. Finalement, l'effet inhibiteur de

la cordycépine sur les synthèses virales augmente avec la concentration de l'inhibiteur et son application précoce en cours d'infection.

L'effet d'une infection mixte constituée du VPC d'E.s. et du CIV de Chilo suppressalis sur les cinétiques d'apparition des divers ag viraux de ce VPC a été étudié chez la lignée de C.f.. Une forme de synergisme émerge de cette association entre ces deux virus occasionnant une hausse de la synthèse des divers ag viraux du VPC d'E.s. et une augmentation de la production de polyèdres intracytoplasmiques de ce même VPC.

Il semble opportun de souligner qu'au cours de l'application de la méthode à l'Ip, l'usage individuel de divers sérums (anti-intestin de larves infectées; anti-virus purifié; anti-polyèdre complet purifié; anti-polyèdre purifié et dissout) a mis en évidence la présence de marquages immuno-spécifiques respectifs à chacun des ag viraux du VPC d'E.s. en microscopie optique (ag viraux dans leur ensemble; ag structuraux des capsides virales; ag structuraux des polyèdres) dans chacune des lignées cellulaires infectées.

Et avant même de procéder à l'exécution de cette dernière technique, il a fallu d'une part déterminer les meilleures conditions de fixation des cellules de ces diverses lignées lesquelles sont en relation étroite avec la préservation de la structure des cellules et de l'antigénicité du virus (VPC). D'autre part, il a fallu démontrer la spécificité réelle des divers sérums cités ci-haut par la technique immunologique d'Ouchterlony.

L'interprétation mathématique de certaines cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. analysées par Probit indique une différence de comportement à l'infection virale avec ce VPC respectivement chez la lignée cellulaire de L.d. et celle d'E.s..

Liste des abréviations

ab:	anticorps.
Adomet ou SAM:	adénosylméthionine.
ag:	antigène.
AMD:	actinomycine D.
BHK-21:	"Baby Hamster Kidney" lignée 21; cellules du rein de hamster nouveau-né lignée 21.
<u>B.t.</u> :	<u>Bacillus thuringiensis</u> .
C ou []:	concentration.
<u>C.f.</u> :	<u>Choristoneura fumiferana</u>
<u>C.s.</u> :	<u>Chilo suppressalis</u>
CIV:	<u>Chilo iridescent virus</u> .
DAB:	3-3' diaminobenzidine.
DAB-4HCl:	tétrahydrochlorure de diamino-3, 3' benzidine.
DI:	dose infectieuse.
DICT _{50/ml} :	dose responsable de l'infection de 50% des cellules cultivées en culture de tissus.
E.D.T.A.:	acide éthylène diamino N,N,N',N' - tétraacétique.
E.L.I.S.A.:	enzyme-linked immunosorbent assay.
<u>E.m.</u> :	<u>Euxoa messoria</u>
EPa:	souche EPa de cellules isolées à partir d'embryons d'une blatte, <u>Periplaneta americana</u> .
<u>E.s.</u> :	<u>Euxoa scandens</u>
FDNB:	1-fluoro-2-4-dinitrobenzène
FV ₃ :	virus 3 de la grenouille.
GIHID:	"Galleria Intrahemocoelic Infective Dose"; dose responsable de l'infection de 50% des frottis d'hémolymphe de larves de <u>G. mellonella</u>
HRPO:	"Horseradish Peroxidase"; peroxydase de raifort.

HU:	hydroxyurée.
If:	immunofluorescence.
Ip:	immunoperoxydase.
Kd:	kilodaltons.
<u>L.d.:</u>	<u>Lymantria dispar</u>
NTPase:	nucleoside triphosphate phosphohydrolase.
PBS:	"Phosphate Buffer Saline"; tampon phosphate et sels.
P.M.:	poids moléculaire.
p.v.:	particule virale.
qs ad:	compléter à.
RZ:	allemand: "Reinheits Zahl"; degré de pureté.
SDS:	sodium dodecyl sulfate.
TIV:	virus iridescent de Tipule.
UDO ₂₈₀ :	unité de densité optique à une longueur d'onde de 280 nm.
VDN:	virus de la denonucléose.
VPC:	virus de la polyédrose cytoplasmique.
VPN:	virus de la polyédrose nucléaire.

Liste des figures

Figure 1	Mécanisme proposé pour la formation de l'ARN simple-brin par les enzymes associées aux virions du VPC type 1	36
Figure 2	Etapas de la préparation de la peroxydase (HRPO) avant sa conjugaison aux immunoglobulines G purifiées	112
Figure 3	Procédé de conjugaison de la peroxydase (HRPO) avec les immunoglobulines G (IgGs) purifiées	113
Figure 4	Procédures expérimentales comparées entre la méthode directe et la méthode indirecte au cours de la technique à l'Ip observée en microscopie optique	117
Figure 5	Schémas des deux méthodes de détection immunoenzymatique à l'immunoperoxydase (méthode directe et méthode indirecte)	119
Figure 6	Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques nulles entre divers sérums (anti-VPC; anti-intestin; anti-polyèdre complet) non-absorbés et divers extraits de cellules d'insectes (<u>L.d.</u> ; <u>E.s.</u> ; <u>C.f.</u>) saines	136
Figure 7	Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques spécifiques entre la larve d' <u>E.m.</u> (saine et lyophilisée; surnageant de larve infectée) et certains sérums (anti-intestin; anti-VPC) non-absorbés	138

Liste des figures (suite)

- Figure 8 Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques (spécifiques; nulles; non-spécifiques) entre divers sérums (anti-VPC; anti-polyèdre dissout; anti-polyèdre complet; anti-intestin) non-absorbés et absorbés, entre diverses solutions, et le surnageant de larve d'E.m. saine 140
- Figure 9 Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques nulles entre certains sérums (anti-polyèdre complet; anti-virus) non-absorbés et la larve d'E.m. (saine et lyophilisée; surnageant de larve infectée) d'une part, et des réactions immunologiques spécifiques entre le sérum anti-intestin non-absorbé et cette même larve (saine ou infectée) d'autre part 143
- Figure 10 Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques (spécifiques; nulles) entre les sérums absorbés (anti-polyèdre complet; anti-virus) et certaines substances antigéniques (surnageant de larve d'E.m. saine ou infectée; culot de larve d'E.m.) 145
- Figure 11 Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques spécifiques entre le culot de larve d'E.m. infectée et le sérum anti-intestin (non-dilué; dilué), non-absorbé et absorbé 148
- Figure 12 Détection de l'ensemble des ag viraux du VPC d'E. scan-
dens par l'application d'IgGs anti-intestin couplées
à la HRPO et diluées 1/3 (méthode directe à l'Ip) 153

Liste des figures (suite)

Figure 13 Détection de l'ensemble des ag viraux du VPC d' <u>E. scandens</u> par l'application d'IgGs anti-intestin couplées à la HRPO et diluées 1/3 (méthode directe à l'Ip)	155
Figure 14 Détection des ag associés aux protéines polyédriques du VPC d' <u>E. scandens</u> par l'application d'IgGs anti-polyèdre complet couplées à la HRPO et non-diluées (méthode directe à l'Ip)	158
Figure 15 Détection des ag associés aux capsides virales du VPC d' <u>E. scandens</u> par l'application d'IgGs anti-virus couplées à la HRPO et non-diluées (méthode directe à l'Ip)	160
Figure 16 Détection des ag associés aux protéines polyédriques du VPC d' <u>E. scandens</u> par les applications d'un sérum anti-polyèdre complet dilué 1/40 et d'IgGs anti-IgG de lapin couplées à la HRPO et non-diluées (méthode indirecte à l'Ip)	163
Figure 17 Contrôle de la méthode directe à l'Ip par l'application d'IgGs anti-CIV couplées à la HRPO et diluées 1/10 sur des cellules de la lignée <u>L.d.</u> infectées par le VPC.....	166
Figure 18 Effet de la concentration du VPC d' <u>E. scandens</u> sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux de ce VPC chez les lignées cellulaires de <u>Lymantria dispar</u> et d' <u>Euxoa scandens</u> suivies en immunoperoxydase (concentration virale en VPC: $10^{4.7}$ DICT _{50/ml}	170

Liste des figures (suite)

Figure 19	Idem à la figure 18 (concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT _{50/ml})	173
Figure 20	Idem à la figure 18 (concentration virale en VPC: $10^{3.7}$ DICT _{50/ml}).....	176
Figure 21	Idem à la figure 18 (concentration virale en VPC: $10^{2.7}$ DICT _{50/ml})	180
Figure 22	Idem à la figure 18 (concentration virale en VPC: $10^{0.7}$ DICT _{50/ml})	183
Figure 23	Effet de la température sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulaires de <u>Lymantria dispar</u> et d' <u>Euxoa</u> <u>scandens</u> suivies en immunoperoxydase (température de 37°C	186
Figure 24	Idem à la figure 23 (température de 32°C)	189
Figure 25	Idem à la figure 23 (température de 28°C)	193
Figure 26	Idem à la figure 23 (température de 18°C)	195
Figure 27	Idem à la figure 23 (température de 10°C)	197
Figure 28	Cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d' <u>E. scandens</u> sans présence d'inhibiteur chez les lignées cellulaires de <u>Lymantria dispar</u> et d' <u>Euxoa</u> <u>scandens</u> suivies en immunoperoxydase	200

Liste des figures (suite)

Figure 29	Effet de la concentration d'un inhibiteur (cordycépine) sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulaires de <u>Lymantria dispar</u> et d' <u>Euxoa scandens</u> suivies en immunoperoxydase (concentration en cordycépine de 0.10 ug/ml).	202
Figure 30	Idem à la figure 29 (concentration en cordycépine de 0.20 ug/ml).....	205
Figure 31	Idem à la figure 29 (concentration en cordycépine de 0.40 ug/ml).....	208
Figure 32	Effet d'une période post-infection variée sans cordycépine sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulaires de <u>Lymantria dispar</u> et d' <u>Euxoa scandens</u> suivies en immunoperoxydase (période post-infection sans cordycépine de 1 heure)	212
Figure 33	Idem à la figure 32 (période post-infection sans cordycépine de 2 heures)	214
Figure 34	Idem à la figure 32 (période post-infection sans cordycépine de 6 heures)	217
Figure 35	Idem à la figure 32 (période post-infection sans cordycépine de 10 heures)	219
Figure 36	Idem à la figure 32 (période post-infection sans cordycépine de 18 heures)	222

Liste des figures (suite)

Figure 37	Effet d'une infection mixte du type VPC-CIV sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d' <u>E. scandens</u> chez la lignée cellulaire de <u>Choristoneura fumiferana</u> suivies en immunoperoxydase (concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT ₅₀ /ml et en CIV de 0.05 UDO).....	226
Figure 38	Idem à la figure 37 (concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT ₅₀ /ml et en CIV de 0.10 UDO)	227
Figure 39	Idem à la figure 37 (concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT ₅₀ /ml et en CIV de 0.50 UDO)	229
Figure 40	Coloration histologique au bleu de méthylène des cellules de la lignée de <u>Lymantria dispar</u>	232
Figure 41	Relation linéaire existant entre les données logarithmiques des temps post-infection et les données probit des pourcentages de cellules de la lignée de <u>L.d.</u> marquées à l'Ip par un sérum anti-intestin conjugué	286
Figure 42	Relation linéaire existant entre les données logarithmiques des temps post-infection et les données probit des pourcentages de cellules de la lignée d' <u>E.s.</u> marquées à l'Ip par un sérum anti-intestin conjugué	287

Liste des tableaux

Tableau 1	Groupes de virus d'insectes décrits à ce jour	7
Tableau 2	Groupes de virus pathogènes isolés chez les insectes comparés aux virus de plantes et de vertébrés	9
Tableau 3	Contrôle microbien de divers insectes nuisibles à l'environnement de certains pays	10
Tableau 4	Réplication des VPC chez les insectes-hôtes ou chez les cultures cellulaires d'insectes observée en microscopie	20
Tableau 5	Variété d'hôtes parasités par des virus cytoplasmiques du groupe icosaédrique à ADN	48
Tableau 6	Types de comportements chez diverses lignées cellulaires d'insectes infectées avec le CIV type 6 <u>in vitro</u>	53
Tableau 7	Purification des suspensions de particules virales et des polyèdres cytoplasmiques du VPC d' <u>E. scandens</u>	81
Tableau 8	Méthode de dosage des particules virales libres du VPC d' <u>E. scandens</u> (exemple d'un dosage effectué au cours de notre travail expérimental).....	85
Tableau 9	Lignées cellulaires de lépidoptères utilisées au cours du présent travail	91

Liste des tableaux (suite)

Tableau 10	Production de polyèdres du VPC d' <u>E. scandens</u> chez les lignées cellulaires d'insectes de <u>Lymantria dispar</u> et d' <u>Euxoa scandens</u> à divers temps post-infection	233
Tableau 11	Production de polyèdres du VPC d' <u>E. scandens</u> chez la lignée cellulaire d'insecte de <u>Choristoneura fumiferana</u> à divers temps post-infection	234
Tableau 12	Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez <u>L. dispar</u> et <u>E. scandens</u> infectées par du VPC à diverses concentrations	240
Tableau 13	Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez <u>L. dispar</u> et <u>E. scandens</u> infectées par du VPC à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT _{50/ml} et pour diverses températures d'incubation	242
Tableau 14	Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez <u>L. dispar</u> et <u>E. scandens</u> infectées par du VPC à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT _{50/ml} et à diverses concentrations de cordycépine appliquées à 1 heure post-infection	244
Tableau 15	Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez <u>L. dispar</u> et <u>E. scandens</u> infectées par du VPC à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT _{50/ml} et à une concentration de cordycépine de 0.20 ug/ml appliquée à divers temps post-infection.....	246

Liste des tableaux (suite)

Tableau 16	Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% de cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez <u>L. dispar</u> et <u>E. scandens</u> infectées par du VPC à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT _{50/ml} et à une concentration de cordycépine de 0.20 ug/ml pour certains temps de lecture post-infection.....	248
Tableau 17	Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez <u>C. fumiferana</u> infectée par du VPC à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT _{50/ml} et à diverses concentrations en CIV.....	249
Tableau 18	Doses infectieuses de CIV où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez <u>C. fumiferana</u> infectée par du VPC à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT _{50/ml} et à un temps de lecture post-infection de 48 heures.....	251
Tableau 19	Analyses des réactions séro-immunologiques d'Ouchterlony entre divers sérums non-absorbés et absorbés, et divers extraits ou solutions.....	255

Chapitre premier

Revue bibliographique

I-1. Introduction générale

De fortes pertes économiques dues aux ravages de diverses espèces d'insectes nuisibles dans les zones agricoles et forestières ont été soulignées en Amérique par les médias d'information. Entre autres, en 1980 aux U.S.A. a été reportée une forte défoliation d'arbres à haute futaie sur une superficie de plus de cinq millions d'acres occasionnée par la spongieuse, Lymantria dispar (Podgwaite et Mazzone, 1981). L'évaluation des pertes d'une défoliation continue par un ravageur sur ce type d'arbre s'élève même à plus de \$75.00/acre selon McCay et White (1973).

Par contre au Canada, la tordeuse du bourgeon d'épinette (Choristoneura fumiferana) est l'agent défoliant le plus destructif en Amérique du Nord. Les larves s'attaquent à divers conifères tels le sapin baumier (Abies balsamea), l'épinette blanche (Picea glauca) et l'épinette rouge (Picea rubens) (Wilson, 1981).

De plus, les vers gris ont constitué en 1976 le principal problème des producteurs de tabac des régions de l'Assomption et de Joliette au Québec. Les espèces les plus importantes s'attaquant à cette culture ont été Euxoa messoria (Harr.), E. scandens (Riley), E. ochrogaster (Guen) et Agrotis ipsilon (Hufn) (Ritchot et al., 1977).

Les insecticides chimiques employés pour palier à ces problèmes ont provoqué l'apparition de sujets résistants à ces insecticides synthétiques (Pujara et Samnotra, 1983) poussant les chercheurs à développer de nouvelles stratégies de lutte contre ces insectes. Aussi, bien qu'efficaces, ces insecticides chimiques comportent un autre inconvénient tel leur

action non-sélective pour les insectes non-cibles (Van Den Bosch et Messenger, 1973). Plus précisément, Back et al. (1983) ont souligné un manque de sélectivité du téméphos (organophosphoré) employé en milieu aquatique en 1980 contre les larves de moustiques dans le Québec subarctique (à Gagnon). Certains insecticides synthétiques appliqués à des fins de contrôle d'épizooties ont été qualifiés de polluants environnementaux dûs à leur forte rémanence dans le milieu. Par exemple, Tinsley (1976) cite la persistance du DDT employé contre les chenilles défoliatrices des plants de coton en Afrique et aux U.S.A..

Ainsi vint l'idée de mesurer l'efficacité de certains entomopathogènes en tant qu'insecticides biologiques sur des populations d'insectes. Ceci dans le but premier de minimiser les dommages occasionnés par les insectes ravageurs (Tinsley, 1976; 1978).

En ce qui a trait aux programmes de lutte appliquée dans le passé sur les territoires américains et canadiens, un bon nombre d'agents microbiens ont été testés en plein champ (Burgess et Hussey, 1971; Harper, 1976; Jaques, 1976; Burgess, 1981) ainsi que dans de nombreux autres pays dont notamment la Chine (Burgess et Hussey, 1971; Burgess, 1981; Hussey et Tinsley, 1981).

I-1.1 Contrôle microbien en général

L'emploi de pathogènes d'insectes; de virus, de bactéries, de protozoaires, de champignons et de rickettsies, peut s'avérer suffisant dans certains écosystèmes pour maintenir les populations nuisibles à un niveau tolérable tant sur le plan médical qu'économique (Kurstak, 1978).

Néanmoins, on tend à épandre plus d'agents de contrôle bactériens et viraux dans l'environnement comparativement à d'autres formes microbiennes moins sélectives pour les populations visées (Burgess, 1981) et possiblement pathogènes pour l'homme tels les rickettsies (Buckner, 1981).

Parmi les agents de contrôle utilisés aux U.S.A., Bacillus popilliae et B. lentimorphus ont été produits commercialement sous diverses étiquettes (Doom® ; Japidemic® ; Japanese Beetle Beater®) à des fins de lutte contre les ravageurs du gazon dans les états de l'est du fleuve Mississippi (Harper, 1976; Ignoffo et Anderson, 1979). Un autre insecticide très important aux U.S.A., le Bacillus thuringiensis, a été commercialisé par les laboratoires Abbott (Dipel®), par Nutrilite Products Inc. (Biotrol®), par Sandoz Inc. (Thuricide® et Teknar®), par Reuter Laboratories Inc. (B.M.C.®) et par Biochem Products (Bactimos®). Ce dernier entomopathogène bactérien a permis de restreindre le ravage occasionné par les lépidoptères sur diverses plantations telles le tabac, le chou, la laitue, le raisin, etc... (Harper, 1976; Ignoffo et Anderson, 1979) et de contrôler des populations d'insectes piqueurs telles les moustiques (Stark et Meisch, 1983).

Outre les bactéries du genre Bacillus, les baculovirus du type de la polyédrose nucléaire (VPN) ont été aussi utilisés sur plusieurs insectes aux U.S.A.. Parmi ces insectes, on a retrouvé en 1975 deux ravageurs de plants de coton soit Heliothis zea et Heliothis virescens et d'autres espèces telles la noctuelle Trichoplusia ni et Hemerocampa pseudotsugata (Harper, 1976; Hurpin, 1977).

Au Canada, les virus, les champignons, les protozoaires sont des agents de contrôle naturels des pestes forestières (Burgess, 1981). Par exemple, C. fumiferana a été contrôlée par divers agents (VPN, entomopox-virus et Nosema fumiferana); deux espèces du genre Diprion (D. hercyniae et D. sertifer) ont été contrôlées par leurs VPN respectifs; par contre, le protozoaire Nosema disstria a été apte à restabiliser la population de Malacosoma disstria (Jaques, 1976). En guise de mesure de contrôle canadienne, le B.t. a été très efficace contre l'arpen-teuse du chou, Trichoplusia ni, et contre la piéride du chou, Pieris rapae (Jaques, 1976). De plus, un VPN a été testé sur des plantations de tabac pour réduire la population d'Euxoa messoria (Jaques, 1976).

En ce qui a trait à l'emploi de protozoaires en tant que futur insecticide, seulement cinq espèces de ces derniers ont été soumises à de sérieuses études entre autres trois espèces du genre Nosema (N. locustae; N. algerae; N. pyrausta), puis deux espèces distinctes telles Mattesia trogodermiae et Vairimorpha necatrix (Ignoffo et Anderson, 1979).

Parmi les entomopathogènes les moins spécifiques, on retrouve les champignons pouvant être utilisés contre différents types d'insectes ravageurs (pucerons, mouches, etc...). Aucun insecticide fongique est disponible présentement sur le marché américain; par contre, certains sont utilisés à grande échelle en U.R.S.S. sous les sigles suivants: Aseroniya (Aschersonia aleyrodís: Ignoffo et Anderson, 1979) et Boverin (Beauveria bassiana: Ignoffo et Anderson, 1979; Ferron, 1981) employés pour le contrôle de la bête à patates (Leptinotarsa decemlineata). De 1972 à 1978 au Brésil, le champignon Metarhizium anisopliae a servi au contrôle de la

punaïse de la canne à sucre sous le nom commercial de Metaquino (Ferron, 1981). L'usage des rickettsies comme moyen de contrôle s'avère un procédé dangereux puisqu'ils ont une affinité particulière pour les tissus de vertébrés et les tissus humains. Ce dernier type de pathogène soulève donc un problème d'une importance médicale à ne pas négliger (Bucker, 1981).

I-1.2 Contrôle viral des invertébrés

L'emploi des virus dans la lutte biologique contre les insectes permet d'implanter la maladie dans la population du ravageur ou dans le milieu où il se trouve de façon à créer une épizootie maintenant l'insecte nuisible à une densité non-dommageable pour la culture ou la forêt durant de nombreuses années. L'entomopathogène viral, responsable d'une épizootie naturelle ou provoquée chez une population d'insecte donnée, peut se transmettre d'un insecte à l'autre par divers modes d'infection (per os; transmission trans-ovarienne; transmission croisée) (Smith, 1967).

Parmi les 300 à 400 espèces de virus décrits chez les insectes, ce sont les baculovirus responsables de polyédroses nucléaires et des granuloses chez les lépidoptères qui sont actuellement les plus étudiés pour la protection des cultures et des forêts (Hurpin, 1977; Tinsley et al., 1980). Ainsi, bon nombre de virus sont des parasites d'invertébrés. Il existe précisément sept familles de virus isolés à partir d'insectes (tableau 1 tiré d'Evans et Harrap, 1982). Certaines de ces familles possèdent des propriétés biochimiques et des propriétés biophysiques semblables à celles retrouvées chez les virus de vertébrés ou les virus de plantes

Tableau I

Groupes de virus d'insectes décrits à ce jour*

Group name	Dimensions (nm)	Abbreviation	Insect host order	Nucleic acid	Symmetry of particle	Inclusion body	Cryptogram
Baculoviruses			Lepidoptera	dsDNA	Helical		
(Nuclear polyhedrosis viruses	40-140 X 250-400 ^a	NPV	Hymenoptera			+	D/2:80/10-15:Ue. o/(E):I/O
Granulosis virus	30-50 X 220-320 ^b	GV	Diptera			+	
Non-occluded nuclear viruses)	120 X 220	—	Coleoptera			-	
Cytoplasmic polyhedrosis	48 - 69	CPV	Lepidoptera Hymenoptera Diptera	dsRNA	Isometric	+	R/2: 13- 18/25-30:So/S:1/0
Entomopoxviruses	320-400 X 230-250	EPV	Lepidoptera Orthoptera Coleoptera Diptera	dsDNA	Brick-shaped	+	D/2:140-240/5-6:X/..:I/O
Iridoviruses	130-180	IV	Lepidoptera Hymenoptera Coleoptera Diptera Ephemeroptera Hemiptera	dsDNA	Isometric	—	D/2:130/15-20:S S:I/I
Parvoviruses	20-24	DNV	Lepidoptera	ssDNA	Isometric	—	D/1:1.5-2.2/19-32:S S:I/O
Small RNA viruses	27-39 ^c	—	Lepidoptera Hymenoptera Coleoptera Orthoptera	ssRNA	Isometric	—	Various
Rhabdoviruses	140-180 X 70		Diptera	ssRNA	Helical	—	*/*:/*Ue/E:I/C

^a With envelope. ^b Without envelope. ^c Except "Mini" viruses 13-17 nm

* Tiré d'Evans et Harrap, 1982

(tableau 2 tiré de Tinsley, 1979). Même Burges en 1981 a publié certains tableaux mettant en évidence divers virus utilisés pour le contrôle d'insectes nuisibles (tableau 3).

Entre 150 et 200 essais ont été effectués en plein champ avec les baculovirus pendant les 20 dernières années au niveau des plantations de coton (60%), de blé (30%) et d'autres cultures telles le soya, le tabac, la tomate et le sorgho, etc... (Ignoffo et al., 1980).

Certaines études sur l'application en forêt d'un VPN dans les contrôles de la tordeuse du bourgeon d'épinette Choristoneura fumiferana ont été effectuées au Canada en 1974 (Jaques, 1976). Aux U.S.A., l'utilisation commerciale du VPN sur des plantations de coton à des fins de contrôle biologique du ver de coton Heliothis zea représente le premier insecticide viral commercialisé dans ce pays (Ignoffo, 1973) sous les noms de Elcar® (Sandoz Inc.) et de Biotrol-VHZ® (Nutrilite Products Inc.) (Ignoffo et Cough, 1981). Une recherche intensive par le Département d'Agriculture en 1974 aux U.S.A. a aboutie à l'enregistrement d'une autre formulation virale du type VPN (sigle: Gypcheck). Elle a été testée contre un défoliateur forestier puissant en Europe central et aux U.S.A.: la spongieuse (Lymantria dispar). Ce VPN à action plus lente mais plus spécifique que le B.t. envers ce ravageur forestier démontre néanmoins une certaine vulnérabilité vis-à-vis les rayons u.v. par rapport au B.t. (Lewis, 1981). Des travaux récents portent sur les VPN de cette chenille défoliatrice (L. dispar) aux U.S.A., France, Roumanie, U.R.S.S., Yougoslavie (Hurpin, 1977) et au Québec (Hébert et al., 1985). De plus, une virose du même type (polyédrose nucléaire) chez Diprion hercyniae

Tableau 2

Groupes de virus pathogènes isolés chez les insectes comparés
aux virus de plantes et de vertébrés*

Family	Nucleic acid ^a	Particle symmetry	Biochemical and biophysical similarities	
			Vertebrate viruses	Plant viruses
Baculoviridae (Baculovirus groups A,B,C)	DNA	Rod (occluded)	None	None
Poxviridae (Entomopox viruses)	DNA	"Brick" (occluded)	Orthopoxvirus Avipoxvirus Capripoxvirus Leporipoxvirus Parapoxvirus	None
Reoviridae (Cytoplasmic polyhedrosis viruses)	dsRNA	Isometric (occluded)	Reovirus Orbivirus	Plant Reoviruses
Iridoviridae (Iridovirus)	DNA	Isometric	African Swine Fever Frog Viruses 1-3 Lymphocystis virus	Fungal Algal
Parvoviridae (Densovirus)	ssDNA	Isometric	Parvovirus Adeno-associated	None
Picornaviridae (Enterovirus; unclassified groups)	RNA	Isometric	Enterovirus	Small RNA viruses (single polypeptide)
Rhabdoviridae (Sigmavirus)	RNA	Bullet/bacilliform	Vesiculovirus Lyssavirus	Plant rhabdovirus

^adsRNA, Double-stranded RNA; ssDNA, single-stranded DNA.

*Tiré de Tinsley, 1979

Tableau 3

Contrôle microbien de divers insectes nuisibles

à l'environnement de certains pays*

Introductions of pathogens since 1970 into invertebrate populations resulting in lasting control.
Further instances of examples given by Burges and Hussey (1971) are excluded

Pathogen	Pest	Degree of success	Place	Authority
GV ^a	Agrotis segetum moth	Residual effect of GV from one year to next: spread 10 m	Pakistan Denmark	Shah et al. 1979. Zethner, 1980
NPV ^a	Choristoneura fumiferana, budworm	Significant NPV and morta- lity, foliage protection for 3 years	Canada	Howse et al., 1973 Morris et al, 1974; Morris, 1977
NPV ^a	Lymantria dispar, moth	NPV spread from 10 treated ha to 300 ha by the next year, the highest mortality being > 40%	Sardinia	Magnoler, 1974
NPV ^a	Lymantria monarcha, moth	Damage insignificant in treated areas in follo- wing year: heavy else- where	Denmark Sweden	Zethner, 1976 Eidmann, 1976

a. Artificial introduction

* Tiré de Burges, 1981

Tableau 3 (Suite *)

Pathogen	Pest	Degree of success	Place	Authority
NPV ^a	Spodoptera littoralis, moth	Strong evidence of natural spread and persistence. Birds spread virus ca. 0.5 miles	Crete	McKinley, 198
NPV ^a	Trichoplusia ni, moth	Persistence and spread. Controlled subsequent generations. Respray never necessary. T.ni no longer a pest on cotton	Columbia	Bellotti and Reyes, 1980 Alvaro and Hernan, 1973
NPV, pox virus ^b	Wiseana spp., moths	Pasture management maintains control below economic levels	New Zealand	Crawford and Kalmakoff, 1977
NPV ^a	Neodiprion sawfly	Spreads rapidly, often almost eliminating populations in one year	Canada	Chapter 19, VB2
NPV ^a	Neodiprion swainel, sawfly	Sprays gave good control, lasting into following years	Canada	Chapter 19, VB3
NPV ^b	Cephalcia abietis, sawfly	Natural epizootics curb defoliation by this sawfly with 3-yearly cycles	Austria	Chapter 19, VB10

a. Artificial introduction.

b. Natural occurrence.

*Tiré de Burges, 1981

Tableau 3 (Suite*)

Pathogen	Pest	Degree of success	Place	Authority
<i>Bacillus sphaericus</i> ^a	Mosquito larvae	Recycled through larvae in a drainage ditch for 9 months	Florida	B. Hertlein, personal communication 1979
<i>Aphanomyces astaci</i> , fungus ^b	Crayfish, not a pest	Eradicated from large parts of Europe	Europe	Unestam and Weiss, 1970
<i>Lagenidium giganteum</i> , fungus ^{a,b}	Mosquitoes	Natural and artificial introductions recycled several years	Louisiana, California	Chapter 29, III
<i>Culicinomyces</i> spp., fungus ^{a,b}	Mosquitoes	Probably survived 3 years in often dry earthen drain. High initial kills at start of current trials	Australia	Sweeney, 1979
<i>Romanomermis culicivorax</i> , nematode ^a	16 potential mosquito hosts	Significant parasitism, often 90%. Still at many sites in 2nd and 3rd year	Louisiana	Petersen, 1976
<i>Diximermis peterseni</i> , nematode ^a	Mosquito larvae	Released at one site. Still produced 80% infection in 5th year	Louisiana	Petersen, 1976
<i>Heterorhabditis</i>	<i>Mastotermes darwiniensis</i> termite	Bait infected workers. Nematode transmitted to successive groups of foragers	Australia	Work of Bedding, D.E.; Pinnock personal communication

a. Artificial introduction b. Natural occurrence.

* Tiré de Burges, 1981

Tableau 3 (Suite*)

Pathogen	Pest	Degreee of success	Place	Authority
Dedalenus siricidicola, nematode ^a	Sirex spp., wood wasps	Infested logs inocu- lated with nematodes, which were spread by wasps causing 75% infec- tion in most areas	Australia	Chapter 33, III
Howardula husseyi, ^b nematode	Megaselia halterata, mushroom phorid fly	Natural infections reach 60-75% by autumn, decline in winter. Artificial use impracticable	UK	Chapter 33, IV
Riberirolia marini guadeloupensis, trematode ^a	Biomphalaria glabrata, snail	Trematode prevents egg laying: 8×10^6 trematode eggs in 15 months added to pond: most snails disappeared	Guadeloupe	Nassi et al., 1979

a. Artificial introduction. b. Natural occurrence.

* Tiré de Burges 1981

introduite d'Europe à l'occasion de l'importation de parasites au Canada, s'est propagée naturellement et a limité progressivement les dégâts aux épicéas dans l'est du Canada et dans le nord-est des U.S.A. (Bird et Elgee, 1957; Hurpin, 1977).

On a réussi à isoler divers virus responsables de polyédroses cytoplasmiques (VPC) chez 200 espèces d'insectes et ce, majoritairement chez les lépidoptères (85%) et minoritairement chez les diptères (9%), les hyménoptères (4%) et les coléoptères (2%) (Martignoni et Iwai, 1977; Burges, 1981). Entre autres, un VPC de Dendrolimus spectabilis a été commercialisé au Japon en 1977 sous le sigle de Matsukemin (Ignoffo et Anderson, 1979).

Les pathogènes viraux sont pourvus d'une grande sélectivité envers une seule espèce-cible contrairement à ce que l'on perçoit chez d'autres insecticides (chimiques, bactériens, etc...). De plus, les insecticides viraux sont facilement biodégradables dans l'environnement et sont plus sécuritaires vis-à-vis les autres organismes vivants (plantes, insectes, mammifères, homme). Aucune infection à baculovirus ou au VPC chez les mammifères a été décelée à venir à date puisque ces virus pathogènes d'insectes sont dirigés uniquement contre ces derniers insectes. Ceci rend donc leur emploi plus sécuritaire à des fins de contrôle biologique (OMS, 1973).

I-2. Les virus des polyédroses cytoplasmiques

I-2.1 Caractéristiques des VPC

L'existence d'un virus du type polyédrose cytoplasmique a été constatée en premier chez les lépidoptères Arctia caja et Arctia villica par Smith et Wyckoff en 1950. Limités aux lépidoptères généralement (Arnott et al., 1968; Assai et al., 1972; Martignoni et Iwai, 1977; Quiot et Belloncik, 1977; Sikorowski et Thompson, 1979; Yue Yun-Xian et al., 1981; Bellemare et Belloncik, 1981), certains cas de ce type de virose ont été observés chez les hyménoptères (Longworth et Spilling, 1970; Martignoni et Iwai, 1977), les diptères (Anthony et al., 1973; Bailey et al., 1975; Bailey, 1977; Martignoni et Iwai, 1977; Andréadis, 1981).

En plus, ce type d'infection virale (VPC) a été responsable d'une polyédrose cytoplasmique chez d'autres insectes tels Agrilus suvorori populneus et Melanophila picta (coléoptères: Martignoni et Iwai, 1977), puis chez Chrysopa perla et Hemerobius stigma (neuroptères: Martignoni et Iwai, 1977).

Bien que les infections avec les VPC sont largement répandues chez les insectes, il n'en demeure pas moins que Ibrahim et al. en 1978 ont mis en évidence une infection virale du type VPC chez un nématode (ver rond: classe des némathelminthes); de plus, Federici et Hazard en 1975 ont observé un crustacé d'eau douce (Simocephalus expinosus) virosé par un virus de la polyédrose cytoplasmique.

Les virus responsables des polyédroses cytoplasmiques sont pourvus de certaines propriétés telles la présence d'un génome bicaténaire

(ARN double-brin) constitué de plusieurs fragments uniques d'ARN (dix segments) non inter-reliés d'une part, et d'une ARN polymérase (transcriptase) associée aux virions d'autre part (Miura et al., 1968).

Des études récentes démontrent que plusieurs VPC en provenance de diverses espèces d'insectes contiennent aussi dix segments d'ARN génomical (Payne, 1976; Payne et Rivers, 1976) avec un poids moléculaire approximatif de 15×10^6 daltons (Fujii-Kawata et al., 1970). Selon Lewandowski et Millward (1971), ces dix segments synthétisent des polypeptides en quantités équimolaires.

Les différentes souches de VPC font partie de la famille des Reoviridae. Aussi, le VPC de Bombyx mori a été employé comme modèle descriptif de ce groupe qui forme le genre "cypovirus" (Joklik, 1981) de cette famille, dénomination non-admise encore dans la classification officielle de Matthews (1982). D'abord, Hosaka et Aizawa (1964) ont remarqué l'aspect icosaédrique de la particule virale de diamètre variant entre 60 et 70 nm (Bird, 1965; Miura et al., 1969). Le virion lui-même est pourvu de 12 projections tubulaires (spicules: 20 nm de long chacune) situées aux sommets de la capside virale lesquelles projections sont imbriquées extérieurement sur la surface de cette capside (Hosaka et Aizawa, 1964; Miura et al., 1969, Lewandowski et Traynor, 1972; Payne et Harrap, 1977). A chaque extrémité externe des spicules issues à même le nucléoïde central du virion (Miura et al., 1969) correspond une structure sphérique de 12 nm de diamètre reliée au sommet de chacune de ces projections tubulaires (Asai et al., 1972). Certains chercheurs ont même suggéré que ces spicules pouvaient servir de site d'adsorption du virus sur les cellules-hôtes

(Miyajima et Kawase, 1969; Asai et al., 1972).

En ce qui a trait à la capside des membres de la famille des Reoviridae, exception faite des VPC, elle comporte deux couches distinctes: la couche externe proprement dite et la couche interne entourant le nucléoïde central (Smith, 1967; Lewandowski et Traynor, 1972). La capside externe chez le VPC de B. mori est absente (Hosaka et Aizawa, 1964; Miura et al., 1969).

Les particules virales sont incorporées en grand nombre à l'intérieur de matrices cristallines protéiniques (polyèdres) lesquelles sont formées dans la plupart des cas dans le cytoplasme des cellules de l'intestin moyen de larves (Payne et Mertens, 1983), d'où provient le nom de polyédrose cytoplasmique (Xéros, 1952; Smith et Xéros, 1953; Payne et Harrap, 1977). Martignoni et al. (1969) ont observé la présence de polyèdres dans le cytoplasme des cellules cylindriques et des cellules à gobelet de l'intestin moyen; cependant les cellules régénératrices n'ont été point affectées. Ceci serait une des causes de la nature chronique plutôt que létale de la polyédrose cytoplasmique (Payne et Harrap, 1977). Arnott et al. (1968) ont estimé à plusieurs milliers le nombre de particules virales pouvant être incluses dans un polyèdre; cependant, pour certains types de VPC, uniquement une particule virale par polyèdre a pu être décelée notamment chez les diptères (Anthony et al., 1973).

Hosaka et Aizawa ont réussi en 1964 à dissoudre en milieu alcalin les polyèdres cytoplasmiques de la larve B. mori (Linnaeus) afin de mieux étudier la structure fine des particules virales libérées.

Cunningham et Longworth (1968) sont parvenus à extraire les particules virales à partir des polyèdres cytoplasmiques isolés chez divers lépidoptères-hôtes tels Aglais urticae, Nymphalis io, Vanessa cardui, Arctia caja, Porthetria dispar, Phalera bucephala et Euproctis chryssorrhoea. Les particules virales sont formées de 3 à 5 polypeptides viraux selon les types de VPC concernés (Payne et Rivers, 1976).

Selon Arnott et al. (1968), en ce qui se rapporte à la cinétique de la réplication des VPC, les premières manifestations de la multiplication virale telles que perçues en microscopie s'observent avec la présence de plages virogéniques instaurées dans le cytoplasme des cellules infectées. A ce stade précoce de la maladie, les stromas virogènes sont constitués majoritairement de particules virales incomplètes. Cependant à un stade plus avancé, on voit l'apparition de polyèdres cytoplasmiques au pourtour de ces plages qui n'incorporent que les particules virales complètes dans leurs matrices cristallines. Bird en 1965 avait conclu auparavant que les particules virales sont assemblées juste avant leurs inclusions au sein des polyèdres.

Les polyèdres cytoplasmiques sont de taille (dimension) et de forme variables. Aruga et al. (1963) ont remarqué que la dimension des polyèdres dépend de leurs positions au niveau de l'intestin moyen. Plus précisément, les gros polyèdres se trouvent formés dans la partie antérieure de l'intestin et les plus petits dans la partie postérieure. Diverses formes possibles de polyèdres ont été attribuées aux polyédroses cytoplasmiques telles cubiques, icosaédriques et triangulaires (Hukuhara et Hashimoto, 1966). Les polyèdres sont constitués de 4 à 6 polypeptides

viraux selon les types de VPC impliqués (Payne et Rivers, 1976). Aussi, le poids moléculaire du polypeptide majeur peut varier entre 25 et 31 kilodaltons (Payne et Tinsley, 1974; Payne et Harrap, 1977).

I-2.2 Réplication des protéines et de l'ARN des VPC chez les insectes in vivo en microscopies (optique et électronique)

Plusieurs chercheurs se sont attardés à l'étude en microscopie de la pathogénèse virale d'insectes virosés par la polyédrose cytoplasmique. Le tableau 4 énumère certains types d'insectes soumis à ce type d'infection virale in vivo et ce même tableau cite les auteurs ayant contribué à l'évolution des recherches se rapportant à la fois à l'identification du génome viral, à la morphologie et l'ultrastructure des particules virales (Xéros, 1956; Arnott et al., 1968; Hayashi et al., 1970; Sikorowski et al., 1971; Yue Yun-Xian et al., 1981), au site de la multiplication des particules virales et des polyèdres (Bird, 1965; Martignoni et al., 1969; Andréadis, 1981), à la morphologie et la dimension des polyèdres (Bailey et al., 1975; Quiot et Belloncik, 1977; Belloncik et Bellemare, 1980; Adams et Wilcox, 1982) et à l'état des tissus de larves infectées par un VPC (Boucias et Nordin, 1978).

Chez les insectes, l'infection par le VPC survient en général lors de l'ingestion orale de polyèdres par les larves. Ces polyèdres ingérés sont dissouts par les sucs alcalins de l'intestin moyen (Faust et Adams, 1966; Dadd, 1970) où les particules virales sont libérées. Lors de l'infection, les virions sont adsorbés par leurs projections spécifiquement au niveau des cellules épithéliales de l'intestin moyen (Miyajima et

Tableau 4

Réplication des VPC chez les insectes-hôtes ou chez les cultures
cellulaires d'insectes observée en microscopie

Ordres d'insectes	Types d'insectes - hôtes ou lignées cellulaires-hôtes	Systèmes <u>in vivo</u> ou Systèmes <u>in vitro</u>	Types de microscopies	Observations	Références
LEPIDOPTERES	<u>Antheraea</u> <u>eucalypti</u> Scott (Saturniidae)	<u>in vitro</u>	Contraste de phase et Microscopie électronique	Diamètre des polyèdres: 1.3 - 4.0 um. Formes des polyèdres: cubiques et/ou triangulaires et/ou hexagonales. (N.B.: L'infection au VPC a été induite par une VPC de <u>B. mori</u> phagocyté par les cellules).	Grace (1962a)
		<u>in vitro</u>	Microscopie électronique (coloration négative à l'acétate d'uranyle)	Identification du génome virale (ARN); détermination du site de libération de l'ARN au niveau des sommets de la cap- side (icosaèdre) suite à divers trai- tements chimiques (urée; perchlorate de Na).	Nishimura et Hosaka (1969)
	<u>Bombyx</u> <u>mori</u>	(libération des particules virales après dissolution des polyèdres du VPC de <u>B. mori</u> en milieu alcalin).	Microscopie électronique Technique de rotation sur des microphoto- graphies en microscopie électronique	Caractéristiques du virion. Structure virale fine.	Miura et al. (1969)

Tableau 4 (suite)

Ordres d'insectes	Types d'insectes - hôtes ou lignées cellulaires-hôtes	Systèmes <u>in vivo</u> ou Systèmes <u>in vitro</u>	Types de microscopies	Observations	Références
LEPIDOPTERES	<u>Bombyx mori</u> (suite)	<u>in vitro</u> (idem)	Microscopie électronique	Structure fine des projections. Observation des particules sphériques au sommet de ces projections.	Asai et al. (1972)
		<u>in vivo</u>	Microscopie électronique	Virions complets	Hayashi et al. (1970)
	<u>Danaus plexippus</u>	<u>in vivo</u>	Microscopie électronique	Description détaillée de la pathologie du VPC chez cette larve incluant la mor- phologie et l'ultrastructure des parti- cules virales.	Arnott et al. (1968)
	<u>Euxoa scandens</u>	<u>in vivo</u>	Microscopie électronique	Polyèdres parasphériques (2-8 um)	Quiot et Belloncik (1977)
		<u>in vivo</u> (infection di- recte chez ces larves avec des polyèdres cubi- ques isolés de la lignée cellu- laire <u>L. dispar</u>)	Microscopie photonique et Microscopie électronique	Polyèdres parasphériques	Belloncik et Bellemare (1980)

Tableau 4 (suite)

Ordres d'insectes	Types d'insectes - hôtes ou lignées cellulaires-hôtes	Systèmes <u>in vivo</u> ou Systèmes <u>in vitro</u>	Types de microscopies	Observations	Références
LEPIDOPTERES	<u>Heliothis</u> <u>armigera</u> (Hübner)	<u>in vivo</u>	Microscopie électronique	Particules virales de forme sphérique (53 X 70 um) se multipliant dans les cellules à gobelet et cylindriques.	Yue Yun-Xian et al. (1981)
	<u>Heliothis</u> <u>virescens</u>	<u>in vivo</u>	Champ clair et Contraste de phase	Présence de virions libres ou inclus dans les polyèdres au niveau de l'hémolymph de larves infectées au VPC.	Sikorowski et al. (1971)
	<u>Hemerocampa</u> <u>pseudotsugata</u>	<u>in vivo</u> (quatrième et cinquième sta- des larvaires)	Coupes ultra-minces en microscopie électronique	Formation des polyèdres dans les cel- lules à gobelet et cylindriques (études histo-chimiques et études histo- logiques).	Martignoni et al. (1969)
	<u>Hyphantria</u> <u>cunea</u>	<u>in vivo</u>	Microscopie à balayage	Augmentation de la dimension des cel- lules des tissus épithéliaux avec des protubérances à la surface des micro- villosités de l'intestin de cette larve infectée avec un VPC.	Boucias et Nordin (1978)
	<u>Lymantria</u> <u>dispar</u>	<u>in vitro</u>	Contraste de phase	Faible hypertrophie du noyau des fibro- blastes. Formation de polyèdres dans le cytoplasme des cellules.	Vago et Bergoin (1963)

Tableau 4 (suite)

Ordres d'insectes	Types d'insectes - hôtes ou lignées cellulaires-hôtes	Systèmes <u>in vivo</u> ou Systèmes <u>in vitro</u>	Types de microscopies	Observations	Références
LEPIDOPTERES	<u>Lymantria</u> <u>dispar</u> (suite)	<u>in vitro</u> (VPC d' <u>E. scandens</u> introduit dans la lignée <u>L. dispar</u>)	Contraste de phase et Microscopie électronique	Polyèdres cubiques (1-5 um)	Quiot et Belloncik (1977)
		idem	Microscopie photonique et Microscopie électronique	Polyèdres cubiques	Belloncik et Bellemare (1980)
		idem	Contraste de phase et Microscopie électronique	Signes nets de la pathogénèse virale sous forme de granulations dans les cellules et rétraction des pseudopodes cellulaires. Site de la formation des virions et des polyèdres.	Quiot et al. (1980a)
	<u>Orgyia</u> <u>leucostigma</u>	<u>in vivo</u>	Microscopie électronique	Multiplication des particules virales dans le cytoplasme	Bird (1965)
	<u>Pectinophora</u> <u>gossypiella</u>	<u>in vivo</u>	Microscopie à balayage	Forme dodécaédrique des polyèdres viraux	Adams et Wilcox (1982)

Tableau 4 (suite)

Ordres d'insectes	Types d'insectes - hôtes ou lignées cellulaires-hôtes	Systèmes <u>in vivo</u> ou Systèmes <u>in vitro</u>	Types de microscopies	Observations	Références
LEPIDOPTERES	<u>Spodoptera</u> <u>frugiperda</u>	<u>in vitro</u> (VPC de <u>Chrysodeixis</u> <u>eriosoma</u> introduit dans la lignée cel- laire <u>S. frugiperda</u>)	Microscopie électronique	Faible pourcentage de virus extracellu- laire	Longworth (1981)
	<u>Thaumatopea</u> <u>pityocampa</u>	<u>in vivo</u>	Microscopie électronique	Les particules virales sphériques (35 um de diamètre) sont infectieuses pour les cellules épithéliales de l'intestin moyen.	Xéros (1956)
	<u>Trichoplusia</u> <u>ni</u>	<u>in vitro</u>	Contraste de phase et Microscopie électronique	Virions inclus dans les polyèdres sphéri- ques (30 - 40%) ou cubiques (60 - 70%)	Granados et al. (1974)
DIPTERES	<u>Aedes</u> <u>cantator</u>	<u>in vivo</u>	Microscopie électronique	Polyèdres irréguliers incluant de nom- breuses particules virales. Le site de formation des polyèdres est divers. i.e. dans le cytoplasme des cel- lules gastriques et des cellules intesti- nales.	Andréadis (1981)
	<u>Cnephia mutata</u> et <u>Prosimulium</u> <u>mixtum</u>	<u>in vivo</u>	Microscopie électronique	Polyèdres polymorphiques (0.37 à 1.06 um de diamètre) dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen.	Bailey et al. (1975)

Kawase, 1969), puis l'acide nucléique du virus est injecté dans le cytoplasme des cellules à-travers ces projections (hypothèse de Kobayashi, 1971). Toutefois, les cellules à gobelet peuvent aussi être infectées (Martignoni et al., 1969; Iwashita, 1971). Survient ensuite la synthèse de l'ARN et des protéines structurales des virus formant des plages virogènes (Xéros, 1956) où l'assemblage des constituants structuraux a lieu. Arnott et al. (1968) ont observé que des matrices cristallines se formaient à proximité des stromas virogènes où s'effectue la synthèse des protéines structurales des polyèdres. Ces protéines cristallines incorporant de nombreuses particules virales forment les polyèdres viraux. Finalement, l'éclatement des cellules infectées survient suite à la désintégration de la membrane cytoplasmique (Kobayashi, 1971), et les polyèdres viraux sont relâchés au sein de la lumière intestinale et sont retrouvés dans les excréments de larves infectées par le VPC (Kalmakoff et Longworth, 1980). Il est important de savoir que l'infection virale au VPC ne se limite pas toujours au tractus alimentaire de l'insecte. Stoltz en 1969 a observé que les tissus adipeux de Chironomus plumosus étaient virosés par un VPC.

Le virus de la polyédrose cytoplasmique d'Euxoa scandens (Noctuidae, Agrotinae) a été isolé par l'équipe Quiot et Belloncik en 1976 à partir de larves recueillies lors d'une récolte en nature puis élevées aux laboratoires de la ferme expérimentale de l'Assomption (Gouvernement du Canada). Ces derniers chercheurs ont confirmé la localisation intracytoplasmique des polyèdres dans les cellules de l'intestin moyen infecté et ce, à la suite d'études histologiques.

L'effet du VPC sur les larves d'E. scandens résultant en une nonchalance, en une perte graduelle d'appétit, en une réduction de la taille des larves et du poids des chrysalides seraient attribuables selon Magnoler (1974) dans le cas d'expériences effectuées sur Porthetria dispar à une diminution de leur métabolisme induit par un déséquilibre humoral occasionné par la formation de polyèdres et de virus au niveau de l'intestin moyen.

Les polyèdres produits dans l'intestin d'E. scandens sont parasphériques et leurs dimensions varient entre 2 et 8 μm . Les virus sous forme d'icosaèdre mesurent environ 70 nm dans leur grand axe et sont munis de projections aux sommets (Quiot et Belloncik, 1977). Le virion est constitué de quatre polypeptides et le polyèdre en contient six. L'ARN est bicaténaire et est composé de dix segments (Grancher-Barray et al., 1981).

Bellemare et Belloncik (1981) ont réussi à évaluer les doses infectieuses médianes du VPC chez les larves d'E. scandens observant une plus grande susceptibilité du troisième stade larvaire devant l'infection virale par rapport au quatrième stade. Ces chercheurs ont même observé une augmentation de la durée de la période larvaire et une diminution du poids des chrysalides infectées par rapport aux larves-témoins. Par contre, Sikorowski et Thompson (1979) ont noté l'effet d'un VPC sur la baisse de fécondité de Heliothis virescens.

I-2.3 Réplication des protéines et de l'ARN des VPC
chez les insectes in vitro en microscopies
(optique et électronique).

Quelques rares publications font état de l'utilisation des cultures cellulaires pour l'étude de la morphogénèse des VPC (tableau 4). Les premières observations relatives au développement des VPC en culture cellulaire ont été effectuées fortuitement par Grace (1962a) sur primoculture établie à partir d'ovaires d'Antheraea eucalypti préalablement infectés (Grace, 1962a: tableau 4). Par la suite, Vago et Bergoin (1963) ont été les premiers à procéder à une infection expérimentale de VPC par inoculation de virus libres retrouvés chez Lymantria dispar à une primoculture d'origine ovarienne du même insecte. Ces derniers chercheurs ont noté que la cytopathologie des cellules infectées in vitro était identique à celle observée in vivo (tableau 4).

Plus tard, Granados et al. (1974) ont rapporté l'infection expérimentale d'une culture cellulaire continue établie à partir d'ovaires de Trichoplusia ni (tableau 4).

Certains autres chercheurs ont observé qu'en culture cellulaire les corps d'inclusions protéiniques ont une morphologie cubique bien apparente autre que celle notée in vivo (Grace, 1962b; Granados et al., 1974; Quiot et Belloncik, 1977; Belloncik et Bellemare, 1980; Longworth, 1981). Payne et Harrap en 1977 ont souligné que ces corps d'inclusions produits in vitro englobaient également de nombreuses particules virales dans le cytoplasme des cellules infectées comme ceux synthétisés in vivo.

Quiot et Belloncik (1977) et Belloncik et Bellemare (1980) ont

observé la réplication du VPC isolé chez E. scandens dans les cellules de L. dispar cultivées in vitro (tableau 4). Les polyèdres formés chez les larves d'E. scandens à la suite d'une infection virale étaient de forme parasphérique contrairement à la forme cubique exclusive des polyèdres synthétisés in vitro chez L. dispar. Selon Granados et al. (1974) et Smith (1976a), il s'agirait d'une cristallisation différente des protéines constituant les polyèdres dans ces deux systèmes cellulaires (cellules intestinales d'E. scandens - ovarioles de L. dispar) due à des conditions distinctes de l'environnement cellulaire in vivo et in vitro.

Quiot et al. (1980a) ont noté des signes nets de la pathogénèse virale sous forme de granulations dans les cellules de L. dispar infectées in vitro par le VPC d'E. scandens (tableau 4).

Récemment, Longworth en 1981 a observé en microscopie électronique l'effet d'une polyédrose cytoplasmique de Chrysodeixis eriosoma (Lépidoptère: Noctuidae) introduite expérimentalement chez une culture cellulaire de l'insecte Spodoptera frugiperda (tableau 4).

Le tableau 4 énumère aussi certains auteurs ayant contribué à des essais expérimentaux (systèmes in vitro) concernant la purification des particules virales incorporées dans les polyèdres isolés de l'intestin moyen de l'insecte-hôte B. mori (Nishimura et Hosaka, 1969; Miura et al., 1969; Asai et al., 1972). En fait, ces polyèdres ont été soumis à des traitements chimiques (alcalins) afin de libérer les particules virales.

Donc, à partir de ces essais in vitro, de nombreux chercheurs ont porté une attention particulière sur la caractérisation de ce génome

viral (Nishimura et Hosaka, 1969; Miura et al., 1969), sur la structure de ce virus et de ses projections (Asai et al., 1972), sur la forme des polyèdres cytoplasmiques (Grace, 1962b; Granados et al., 1974; Quiot et Belloncik, 1977; Belloncik et Bellemare, 1980), sur la libération de l'ARN du VPC (Nishimura et Hosaka, 1969; Asai et al., 1972) et sur le site de la formation des polyèdres (Vago et Bergoin, 1963; Quiot et al., 1980a).

I-2.4 Conclusion sur la réplication des VPC chez les insectes in vivo et in vitro.

On remarque que plusieurs insectes sont sujets à une virose du type polyédrose cytoplasmique dans la nature. Malgré l'emploi de nombreuses techniques de détection, il se pourrait que ce type d'infection virale passe inaperçu chez certains insectes-hôtes potentiels pour maintes raisons notamment à cause de la dose virale absorbée, de la résistance plus ou moins grande chez l'insecte parasité, de facteurs climatiques affectant la virulence du type de VPC impliqué.

Heureusement certains chercheurs ont réussi à procéder à des infections virales au VPC chez les lignées cellulaires d'insectes cultivées in vitro en utilisant des particules virales libres d'intestins de larves infectées avec ce virus (Granados et al., 1974; Quiot et Belloncik, 1977; Longworth, 1981). Aussi la réplication des VPC a été grandement éclaircie par le développement de ces systèmes de cultures cellulaires d'insectes.

Evidemment, il existe des lignées cellulaires qui sont plus susceptibles à l'infection virale au VPC par rapport à d'autres lignées

moins permissives. Quiot et Belloncik en 1977 ont soulevé en microscopie des taux d'infection virale au VPC relativement faible (1-40%) chez certaines cultures cellulaires d'insectes, bien que plus de 90% des cellules de L. dispar infectées au VPC d'E. scandens ont produit des polyèdres.

Aussi, afin de déceler ce type de virose (VPC) responsable chez certains hôtes (insectes ou lignées cellulaires) d'un taux d'infection faible, il serait préférable d'employer des techniques de détection très sensibles telles l'immunoperoxydase ou l'immunofluorescence.

I-2.5. Caractérisation électrophorétique des protéines et de l'ARN des VPC chez les insectes

Les premières recherches concernant les moyens d'isolement des particules virales du VPC (libres et incluses) ont été effectuées par Hayashi et Bird en 1968a (Malacosoma disstria) et par Hayashi et al. en 1970 (Bombyx mori). Ces derniers ont réussi à purifier le matériel viral au moyen de gradients de sucrose.

Hayashi et al. (1970) ont démontré que certains traitements chimiques (désoxycholate et carbonate de Na) employés pour la purification des virions ne les affectaient pas. Néanmoins, certains ont assumé que le traitement des polyèdres avec du $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ durant l'extraction des protéines pourrait dégrader certains polypeptides et être responsable de la présence de certains composés mineurs. Ces derniers pourraient représenter également des protéines trappées non-spécifiquement pendant la formation des polyèdres (Payne et Tinsley, 1974; Payne et Rivers, 1976).

Fujii-Kawata et al. en 1970 ont procédé à des analyses électrophorétiques comparées (gel de polyacrylamide) de l'ARN double-brin de réovirus de diverses sources. Ils ont mis en évidence la distribution de divers segments de poids moléculaires variés spécifique à chaque virus.

D'autres chercheurs se sont attardés aussi sur des analyses électrophorétiques comparées du génome viral de VPC entre autres Hayashi et Krywienczyk en 1972 (Malacosoma disstria et B. mori), Payne et al. en 1978 (Dendrolimus spectabilis, B. mori et L. dispar).

Payne et Tinsley en 1974 ont procédé à la purification des protéines des particules virales d'une part et celle des protéines des polyèdres du VPC isolé chez Nymphalis io (Lepidoptera: Nymphalidae) d'autre part. La mobilité électrophorétique des protéines de ce virus a permis de distinguer cinq polypeptides polyédriques et trois polypeptides associés aux particules virales. On sait à priori que cette mobilité sur gel des différents constituants polypeptidiques du VPC est reliée au poids moléculaire de chacun de ces composants.

Selon Payne en 1976, les VPC d'insectes sont différents les uns des autres par le nombre et/ou la dimension des segments du génome de l'ARN double-brin. Par exemple, le VPC isolé chez N.io et celui isolé chez Spodoptera exempta ont des segments de l'ARN différents, des protéines structurales distinctes bien que leur morphologie virale soit semblable. Payne et Rivers en 1976 ont suggéré une approche basée sur le profil électrophorétique des segments d'ARN génomique pour classer en 11 types les VPC provenant de 33 isolats de lépidoptères. Chaque segment de ce génome viral coderait probablement une protéine selon Payne et Tinsley

(1974) et selon Lewandowski et Traynor (1972).

Dans le but d'établir un lien entre le P.M. et la mobilité électrophorétique de chaque segment de l'ARN double-brin du VPC, Harley et al. (1977) ont marqué cet ARN viral avec du phosphore radioactif (^{32}P). Des mesures d'incorporation in vivo de la radioactivité dans le matériel viral chez Heliothis armigera et une purification ont été menées avant l'analyse électrophorétique de l'ARN viral- ^{32}P .

Payne et al. en 1977 ont isolé un VPC chez B. mori possédant les mêmes propriétés biochimiques et morphologiques que celles retrouvées chez le VPC type 1 (classification de Payne et Rivers en 1976). De plus, ces mêmes chercheurs ont mis en relief un VPC peu commun isolé chez Spo-doptera exempta lequel VPC (type 12) est pourvu de caractéristiques très distinctes des 11 types de VPC mentionnés en 1976 par Payne et Rivers.

Le VPC d'E. scandens a été propagé dans la lignée cellulaire de L. dispar in vitro. La comparaison des polypeptides des deux types de polyèdres produits in vivo et in vitro a été effectuée par Grancher-Barray et al. en 1981. Les six polypeptides de ces deux types de polyèdres ont la même mobilité électrophorétique i.e. possèdent le même P.M. un par rapport à l'autre; et, les particules virales libres produites in vivo sont composées de quatre polypeptides (Grancher-Barray et al., 1981).

Arella et al. en 1984 ont reporté le cheminement électrophorétique des polypeptides assignés aux polyèdres et aux particules virales du VPC d'E. scandens produits in vitro chez L. dispar. Ils ont réussi à isoler sur un gel de type polyacrylamide - SDS sept polypeptides viraux de

ce VPC lesquels ont été transférés sur une membrane nitrocellulosique. Puis ces mêmes polypeptides dont cinq assignés aux corps d'inclusions protéiniques (120 Kd, 105 Kd, 66 Kd, 46 Kd et 28 Kd) et deux autres attribués aux particules virales (112 Kd et 39 Kd) ont été tous identifiés à l'aide de la méthode de détection indirecte à l'immunoperoxydase.

I-2.6 Transcription et traduction des VPC chez les insectes

Les particules virales des VPC possèdent plusieurs activités enzymatiques nécessaires au processus de la réplication virale proprement dite. Lewandowski et al. en 1969 ont mis en évidence une ARN polymérase (transcriptase). Cet enzyme amorce in vitro la synthèse de l'ARN simple-brin à partir du génome viral double-brin du VPC de Bombyx mori en système acellulaire. En fait, la synthèse in vitro de l'ARN messager (ARN_m) simple-brin du VPC de ce dernier insecte est régularisé par cette transcriptase (Wu et al., 1980; Smith et Furuichi, 1980a; Sun et al., 1981).

En plus de cet enzyme, ce VPC type 1 contient d'autres enzymes nécessaires pour la formation de l'ARN_m complet caractérisé par la séquence $m^7G\ ppp\ A^m\ p\ G^m$ - en position terminale - 5' (coiffe). Ces enzymes sont des phosphohydrolases (Storer et al., 1974a et 1974b; Furuichi et Miura, 1975; Shimotohno et Miura, 1977), des méthyltransférases (Furuichi: 1974, 1978, 1981; Furuichi et Miura, 1975; Shimotohno et Miura, 1976; Mertens, 1979; Wertheimer et al., 1980), et des guanylyltransférases (Shimotohno et Miura, 1976; Furuichi, 1978; Smith et Furuichi, 1982a) reliées à la synthèse de cet acide ribonucléique simple-brin. Les virions et/ou les polyèdres de ce VPC seraient associés aussi à une exonucléase de l'ARN

simple-brin selon Storer et al. (1974a et 1974b) et à une protéase alcaline selon Carter et Payne (observations non-publiées; tiré de Payne et Mertens, 1983).

Shimotohno et Miura (1977) et Storer et al. (1974a et 1974b) ont trouvé qu'un nucléoside triphosphate phosphohydrolase (N ppp phosphohydrolase) associé au VPC était impliqué dans la synthèse de l'ARN_m. Le rôle primaire de cet enzyme serait la phosphohydrolyse de l'ATP en ADP lequel ADP est un composé de la terminaison-5' de l'ARN_m du VPC. De plus selon eux, cet enzyme participerait au mouvement du génome dans le virion.

L'extrémité-5' de l'ARN_m (structure d'initiation) semble associée au processus de la méthylation lequel processus survient au début de la synthèse de l'ARN_m (Furuichi et Miura en 1975). Ainsi, la transcription du VPC serait étroitement liée à la réaction de méthylation. Aussi, Furuichi (1974 et 1981) a stimulé grandement cette synthèse en ajoutant in vitro de l'adénosylméthionine (Adomet ou SAM), un donneur du groupe méthyl (-CH₃). La méthylation de l'ARN_m surviendrait possiblement, selon eux, à un stade précoce de la transcription. En plus du rôle de cet Adomet dans le processus de la méthylation de l'extrémité-5' de l'ARN_m, Furuichi en 1981 a souligné que l'Adomet serait couplée à une méthyltransférase de l'ARN_m stimulant la synthèse de ce dernier. De récentes découvertes par Wertheimer et al. en 1980 ont démontré que cette méthyltransférase de l'ARN_m du VPC de B. mori est impliquée dans le procédé d'activation de la synthèse de cet ARN_m. Il se produirait un changement séquentiel de cet enzyme par l'ARN polymérase lors de la transcription lequel changement est médié par une interaction protéine-protéine. Cette hypothèse soulève la

possibilité que la méthyltransférase et l'ARN polymérase sont organisées ensembles dans le processus de la répllication à des fins de formation d'une coiffe au tout début de la transcription. Selon Furuichi et al. en 1980, les caractéristiques structurales de l'Adomet sont importantes pour obtenir une synthèse efficace de l'ARN_m. Le lien entre l'Adomet et la méthyltransférase (complexe) activerait l'ARN polymérase dépendante du VPC au cours du processus de la répllication. Aussi lors de la synthèse de cet ARN_m, de hautes concentrations en ATP et en GTP sont nécessaires pour la formation de la structure coiffée (Payne et Mertens, 1983) (figure 1 tirée de Payne et Mertens, 1983; proposée par Furuichi, 1981).

Après des traitements physiques de purification, Dai et al. en 1982 ont observé que l'ARN polymérase et la méthyltransférase sont étroitement liées au génome ARN double-brin. Même les segments individuels du complexe génome-enzyme possèderaient selon eux les mêmes activités enzymatiques de ces deux enzymes. Plus précisément, les segment 4 de l'ARN double-brin du VPC de B. mori possède la plus forte activité enzymatique de ces deux enzymes par rapport à celle trouvée chez les autres segments. Il se pourrait que ce segment 4 joue un rôle significatif lors de la répllication du VPC (Dai et al., 1982). Récemment, Furuichi (1981) a trouvé que les ARN polymérases du VPC dirigeaient de multiples initiations abortives durant la transcription. Cela résulterait en une accumulation de petits oligonucléotides représentant la séquence en nucléotides de l'extrémité-5' de l'ARN_m.

Wu et al. en 1981a ont étudié l'effet de la méthionine sur la synthèse de l'ARN_m dans le but d'en savoir plus sur la formation de la

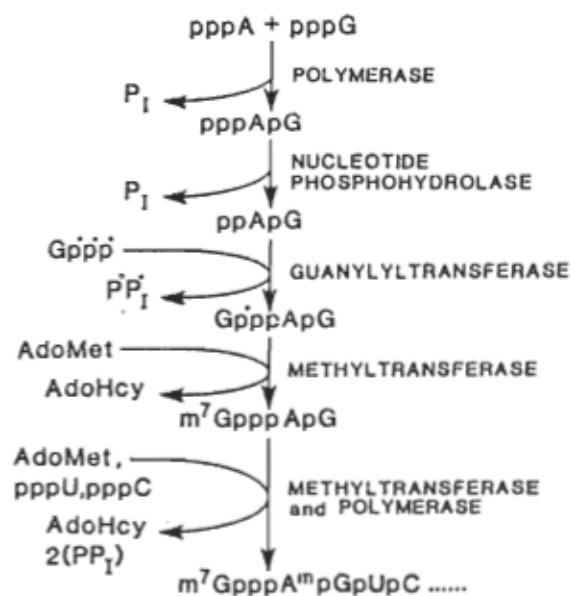


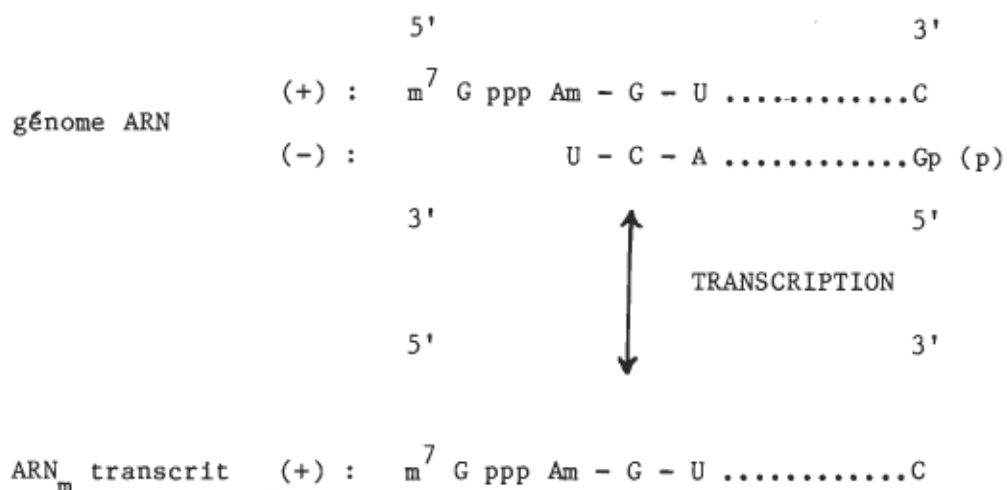
Figure 1 Mécanisme proposé pour la formation de l'ARN simple-brin par les enzymes associés aux virions du VPC type 1 (*)

* Mécanisme proposé par Furuichi 1981.

Tirée de Payne et Mertens, 1983.

coiffe de cet ARN_m et davantage sur la spécificité de la méthyltransférase. Selon eux, la méthionine (donneur de -CH₃) augmente la synthèse de l'ARN de 50% en présence de l'Adomet. Leurs résultats démontrent que la méthyltransférase associée au virion du VPC peut utiliser l'Adomet ou la méthionine (marquée avec du tritium: ³H - CH₃) comme donneur de méthyl au cours de la formation de la coiffe de l'ARN_m.

Certains chercheurs se sont attardés à séparer les dix segments du génome ARN double-brin du VPC de B. mori via l'électrophorèse (Smith et Furuichi, 1980b). Ils ont réussi à isoler les bandes (+) et (-) de chacun des segments de ce génome viral. Semble-t-il chaque segment du génome coderait son propre ARN_m in vitro (Smith et Furuichi, 1982b). Apparemment, la transcription de chaque segment débute en même temps; toutefois, le plus court segment de l'ARN est libéré plus vite que le plus long segment lors de la décapsidation (Shimotohno et Miura, 1973). Les dix segments de ce même génome viral isolé chez ce même insecte (B. mori) codent pour des polypeptides viraux spécifiques tels des gènes monocistroniques selon Kuchino et al. en 1982. Ces derniers chercheurs se sont servis d'un gel approprié (urée-agarose) pour isoler les bandes complémentaires de cet ARN double-brin. Furuichi et Miura (1973) et Miura et al. (1975) ont conclu que les dix segments génomiques de l'ARN double-brin du VPC ont la même structure terminale en position-3' portant la cytosine (C) à une extrémité d'un brin et portant l'uracyle (U) à l'extrémité de l'autre brin complémentaire. Des études portant sur le VPC de B. mori ont confirmé que le brin (+) de chaque segment du génome a la même séquence terminale en 5' et en 3' que celle de l'ARN_m viral transcrit (séquence ci-jointe):



Au cours du processus de la transcription virale, le brin non-coiffé du génome [ARN (-)] agit comme modèle lors de la synthèse de l'ARN_m dirigée par la transcriptase (Miura, 1981).

Yazaki et Miura en 1980 ont établi une relation étroite entre la structure et l'organisation du génome viral versus la synthèse de l'ARN_m. En fait, ce génome ARN double-brin du VPC de B. mori est transcrit   travers la partie basale d'une projection où les enzymes responsables de la synthèse de l'ARN_m simple-brin sont localisées. Une fois que la synthèse de cet ARN_m est complétée, ce dernier sort du virion via cette même projection. Ces chercheurs ont même démontré, à l'aide de techniques modifiées en microscopie électronique, que le génome ARN double-brin était en mouvement dans le virion lors de la synthèse de l'ARN_m.

En ce qui a trait au temps d'apparition de chaque ARN_m complété, il est proportionnel à la dimension relative de chaque segment de l'ARN_m selon Smith et Furuichi en 1982b. Leurs résultats indiquent aussi que ces

segments sont transcrits indépendamment et suggèrent que l'allongement de chaque chaîne est un facteur limitant pour la synthèse de l'ARN_m du VPC de B. mori in vitro (Smith et Furuichi, 1982b). Ces derniers chercheurs ont même mis en évidence la synthèse de guanosine-nucléoside tétraphosphates (G (5') - pppp - N) durant la transcription in vitro de ce VPC type 1 (Smith et Furuichi, 1982a).

Sun et al. en 1981 ont procédé à la synthèse des protéines structurales dans un système acellulaire dirigé par un ARN_m du VPC préalablement produit in vitro et isolé. Selon McCrae (1982) et Smith et al. (1981), il est plus facile de suivre la régulation de la synthèse des protéines du VPC en système de culture cellulaire qu'avec des mesures de translation de l'ARN_m ou de l'ARN double-brin dans les systèmes acellulaires in vitro.

Aussi, chez la lignée cellulaire d'insecte L. dispar cultivée in vitro, des infections synchronisées avec le VPC d'E. scandens ont été testées en employant du matériel radioactif (³⁵S-méthionine) dans le but d'établir les cinétiques d'apparition temporelle des divers polypeptides viraux induits ou codés de ce VPC (Arella et al., 1982a; Arella et al., 1984). L'identification de ces polypeptides a été effectuée à l'aide de la méthode de détection indirecte à l'immunoperoxydase appliquée sur une membrane nitrocellulosique sur laquelle ont été transférés ces polypeptides après leurs séparations sur un gel électrophorétique (polyacrylamide-SDS). Au cours de cette méthode indirecte à l'Ip, l'emploi individuel d'IgGs non-conjuguées anti-polyèdre et anti-particule virale d'une part et l'usage de sérum de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase

d'autre part ont permis de mettre en évidence sept polypeptides viraux du VPC d'E.s.. Par ce procédé immunoenzymatique, ces mêmes chercheurs ont noté les apparitions de cinq polypeptides reliés aux polyèdres (120 Kd, 105 Kd, 66 Kd, 46 Kd et 28 Kd) et de deux autres associés aux particules virales (112 Kd et 39 Kd) à 24 heures post-infection. Ils sont même synthétisés 72 heures plus tard (96 heures post-infection) (Arella et al., 1984). Aussi par ce même processus de détection indirecte à l'Ip mais en se servant d'IgGs non-conjuguées anti- polyèdre complet, ils ont observé un marquage spécifique au polypeptide majeur du polyèdre (28 Kd) mais à 8 heures post-infection. Arella et al. (1984) ont même souligné que la vitesse de synthèse de ce polypeptide majeur (28 Kd) a augmenté en quantité relative en fonction du temps d'infection virale avec ce VPC d'E.s.. Ces mêmes chercheurs ont soutenu que si les autres polypeptides viraux ne sont pas isolés voir même identifiés, cela est certainement dû à une co-migration de ces derniers avec d'autres polypeptides (viraux ou cellulaires) ou à cause de leurs faibles vitesses de synthèse. Ces mêmes chercheurs ont observé par analyse densitométrique que les polypeptides cellulaires sont produits en quantités égales à tout moment de l'infection virale au VPC. Ainsi, le déroulement de la synthèse des polypeptides viraux mené en culture cellulaire infectée au VPC a montré que les interactions virus-hôtes n'ont pas provoqué une diminution de la synthèse des polypeptides cellulaires pour autant.

Certains autres travaux en immunofluorescence (If), en E.L.I.S.A. (enzyme-linked immunosorbent assay) et en microscopies (optique et électronique) portent sur la séquence d'apparition des diverses protéines virales du VPC. Entre autres, Kawase et Miyajima (1969) et

Granados (1975) ont étudié la synthèse des protéines du virion et celle des polyèdres dans le cytoplasme des cellules épithéliales de l'intestin de B. mori via l'If. Au bout de 4 à 8 heures après l'infection virale, la fluorescence est apparue dans le cytoplasme des cellules en bordure de l'épithélium intestinal. La synthèse des protéines virales du VPC d'E. scandens dans la lignée cellulaire de L. dispar démontrée par la technique E.L.I.S.A. a débuté à 9 heures post-infection (Payment et al., 1982). Lors de cette expérience, les cellules en culture ont été soumises à une dose virale infectante de l'ordre de 1 DICT*_{50/ml}. Belloncik et Quiot (1976) ont mesuré l'effet de l'infection in vitro des cultures cellulaires de cette même lignée par le VPC d'E. scandens. Cette infection s'est manifestée dès la 24e heure par la présence de plages cytoplasmiques granuleuses denses aux électrons (microscopie électronique) associées aux stromas virogènes dans lesquelles se forment les particules virales. Ces derniers chercheurs ont même observé l'apparition des premiers corps d'inclusions protéiniques (cubiques) dans le cytoplasme de la lignée L. dispar à la périphérie de ces stromas virogènes à 48 heures post-infection. Quiot et al. en 1980a ont noté des signes nets de la pathogénèse virale apparents à l'examen au contraste de phase dans cette même lignée cellulaire d'insecte infectée par le VPC d'E. scandens à 24 heures post-infection. A ce niveau, l'aspect des cellules granuleuses et

* DICT_{50/ml}: dose responsable de l'infection de 50% des cellules cultivées en culture de tissus.

la présence de pseudopodes rétractés avant la constitution des premiers polyèdres représentent le type de réaction cellulaire provoquée par la pathogénèse virale de ce VPC. A ce stade de l'infection, la microscopie électronique a montré la formation de virions et de corps d'inclusions polyédriques (Quiot et al., 1980a).

Granados et al. en 1974 ont observé en contraste de phase des granules réfringents dans le cytoplasme des cellules de la lignée T.ni infectées avec le VPC de l'insecte Trichoplusia ni à 36-40 heures post-infection. A 48 heures, ils ont même discerné des polyèdres cytoplasmiques.

Longworth en 1981 a étudié la réplication du VPC de Chrysodeixis eriosoma dans la lignée cellulaire d'insecte S. frugiperda. L'apparition des premiers polyèdres en microscopie électronique a été notée par ce scientifique dans le cytoplasme de cette lignée cellulaire au bout de 2 jours post-infection avec ce VPC.

Arnott et al. en 1968 ont décelé en microscopie électronique des polyèdres dans le cytoplasme des cellules de l'intestin moyen de Danaus plexippus infectées in vivo par un VPC et ce, à un stade précoce de la maladie (48 heures post-infection). Le stroma virogène contenait seulement quelques particules virales complètes.

La morphogénèse du VPC d'Heliothis armigera a été étudiée en microscopie électronique par Yue Yun-Xian et al. en 1981. Le stroma virogène a été apparent dans le cytoplasme des cellules cylindriques et des cellules à gobelet de l'intestin de cet insecte à 24 heures post-

infection. L'apparition des polyèdres a été notée par ces chercheurs à 48 heures post-infection.

I-2.7 Effets de certains agents physiques et chimiques sur la transcription et la traduction des VPC.

En ce qui a trait aux agents physiques, l'irradiation aux rayons gamma des cellules de L. dispar (cultivées in vitro) 1 heure après l'infection virale au VPC d'E. scandens, a produit des modifications significatives sur le nombre de polyèdres produits (Bellonick et Arella, 1981). Des changements morphologiques et un taux de mortalité élevé ont été notés au niveau des cellules traitées à des intensités dépassant 10^3 rads. Aussi, des structures denses anormales ont été observées en microscopie électronique à l'intérieur des polyèdres logés dans le cytoplasme des cellules irradiées (Bellonick et Arella, 1981).

En ce qui se rapporte aux effets des agents chimiques sur la répllication des VPC, plusieurs recherches ont été publiées. Plus précisément, la synthèse de l'ARN double-brin du VPC a été suivi chez diverses chenilles telles Orgyia leucostigma (Hayashi, 1970), Malacosoma disstria (Hayashi et Donaghue, 1971), et Bombyx mori (Furusawa et Kawase, 1973) en présence de l'actinomycine D (AMD). Bien que la synthèse de l'ARN des cellules-hôtes soit inhibée par cet antibiotique (AMD), l'ARN spécifique au virus peut encore être synthétisé dans l'intestin infecté avec le VPC. Cet inhibiteur agit en s'intercalant par ses chaînes latérales polypeptidiques au niveau des résidus GC de l'ADN de la cellule-hôte où il bloque la progression de l'ARN polymérase cellulaire (Girard et Hirth, 1980).

Belloncik et Arora en 1979a et 1979b ont mesuré l'effet de la cordycépine (3'-déoxyadénosine) sur la formation des polyèdres du VPC d'E.scandens dans la lignée de L. dispar. Une concentration de 0.2 ug/ml de cet antibiotique a provoqué une inhibition très marquée de la synthèse des polyèdres (98%) dans le cytoplasme des cellules infectées. Ils ont même étudié l'effet de ce produit chimique à différents temps d'intervalle post-infection avec ce VPC: durant les 6 premières heures, il s'est produit une forte inhibition. Par contre après 18 heures, une hausse légère du nombre des polyèdres sphériques et cubiques a été observée. En fait, la cordycépine se caractérise par une inhibition compétitive de la poly (A) polymérase et bloque la polyadénylation terminale-3' des ARN_m de ce VPC (Girard et Hirth, 1980).

Zhong et al. en 1983 ont mis en évidence les effets inhibiteurs de deux produits chimiques (Poly 1:C et 2',-5'-oligo A) envers le VPC isolé chez B. mori (Linnaeus). En fait, l'injection de l'un ou l'autre de ces agents chimiques aux larves pousse ces dernières à inhiber l'effet de ce VPC de 40 à 50%. Ces derniers chercheurs ont même démontré que le Poly 1:C était capable d'induire la formation de nouvelles protéines associées à cette activité anti-virale de la larve.

Miyajima en 1978 décrit la stabilité du VPC du même insecte B.mori L. à certains traitements chimiques (chloroforme; chloroforme-n-butanol; acide éthylène diamino N,N,N',N' - tétraacétique (E.D.T.A.); CaCl₄; MgCl₂) avant le procédé de purification de ce VPC.

Wu et al. en 1981b ont observé que le chloroforme et l'alcool (30%) diminuent l'activité de l'ARN polymérase associée au virion du VPC de ce

dernier insecte (B. mori) et réduits même le pouvoir infectieux de ce virus. Par contre, le triton-X 100 rehausse l'activité enzymatique et augmente par le fait même le pouvoir infectieux de ce dernier.

Les particules virales des VPC sont stables dans les détergents tels par exemple le déoxycholate de Na à 0.5-1.0 % (Hayashi et Bird, 1968b; Hayashi et al., 1970) mais elles sont complètement dissociées avec du SDS (sodium dodecyl sulfate) à 0.5-1.0%.

Un à deux traitements avec du fluorure de carbone n'affecte pas le pouvoir infectieux des VPC (Miyajima et al., 1969), mais l'éthanol ou des traitements à la chaleur (agent physique) à 60% pendant 1 heure entraînent la libération de l'ARN viral à partir des virions (Hayashi et Bird, 1968b; Richards, 1970; Payne et Kalmakoff, 1974).

Outre les effets de divers agents sur la transcription des VPC, d'autres chercheurs ont étudié les effets d'agents chimiques sur le processus de la réplication d'autres virus d'insectes. Nous n'en citerons que deux à titre d'exemples. Dougherty et al. en 1982 ont testé l'effet inhibiteur de la rifampine sur la formation des corps d'inclusions protéiniques du VPN d'Autographa californica dans la lignée cellulaire de Trichoplusia ni - 368. Kloc et Lee en 1983 ont observé par autoradiographie en microscopie optique que la synthèse de l'ADN viral spécifique au TIV (Tipula iridescent virus) n'est pas affectée dans les cellules d'Estigme acrea exposées à une dose de 300 µg/ml d'hydroxyurée (HU). Par contre, chez les cellules normales (témoins) soumises de façon similaire à l'HU, la synthèse de l'ADN nucléaire a été diminuée de 70 à 80%.

Aussi, il nous a semblé intéressant de déterminer dans notre travail l'influence de certains facteurs physiques (température d'incubation par exemple) et de substances inhibitrices (cordycépine par exemple) sur la synthèse des antigènes viraux du VPC d'E. scandens.

I-3. Les virus iridescents

I-3.1 Caractéristiques du CIV (Chilo iridescent virus)

Les Iridoviridae constituent un vaste groupe de virus icosédriques à ADN bicaténaire linéaire (Kalmakoff, 1980) dont la taille est comprise entre 130 et 300 nm de diamètre (Kelly et Robertson, 1973). Le cycle de la réplication des virus iridescents est dépendant du noyau de la cellule-hôte dans les étapes précoces de l'infection, puis se produit une maturation intracytoplasmique du virus dans cette même cellule-hôte (Matthews, 1982).

En fait, il existe deux groupes de virus iridescents (ceux de dimension moyenne et ceux de dimension plus grande) dans la famille des Iridoviridae tels que classifiés par Davidson (1981). Les virus iridescents de grande dimension sont des agents infectieux de faible incidence chez les populations naturelles de larves (1 à 3%) (Hasan et al., 1971). Par contre, les virus iridescents de dimension moyenne se rencontrent fréquemment dans la nature. Ils sont des parasites de nombreux hôtes tels les diptères, coléoptères, lépidoptères, hyménoptères, hémiptères, mollusques et crustacés (Kelly et Robertson, 1973; Carey et al., 1978). Martignoni et Iwai en 1977 ont cité une variété d'insectes (diptères, coléoptères et lépidoptères) parasités naturellement par les

virus iridescents. Avant cela, Kelly et Robertson ont publié en 1973 une gamme d'hôtes (vertébrés, invertébrés et plantes) parasités par des virus iridescents ou par d'autres virus icosédriques à ADN semblables à ces derniers (tableau 5).

On peut répliquer des virus iridescents de dimension moyenne dans un certain nombre de lignées cellulaires d'insectes incluant Spodoptera frugiperda, Trichoplusia ni et Aedes albopictus (Kelly, 1976a; Brown et al., 1978). Le virus iridescent de Sericesthis (SIV) se multiplie dans le cytoplasme d'une lignée cellulaire d'insecte qu'est Antheraea eucalypti; la synthèse d'ADN viral se produit à l'intérieur du cytoplasme cellulaire (Bellett et Mercer, 1964).

Yule et Lee (1973) ont localisé, par des techniques immunologiques et cytologiques, les protéines virales du TIV (Tipula iridescent virus) dans les hémocytes de la larve Galleria mellonella. Ils ont détecté ces protéines virales diffuses dans le cytoplasme en premier lieu, puis à l'intérieur du viroplasma. De plus, ces mêmes chercheurs ont réussi à préciser le site de la synthèse de l'ADN viral exclusivement à l'intérieur même du viroplasma et ont proposé un développement séquentiel de l'assemblage du virion dans les hémocytes (Yule et Lee, 1973).

Les virus de cette famille sont appelés iridescents à cause de leur habilité à provoquer l'apparition d'une teinte irisée caractéristique chez l'insecte atteint. Les virus iridescents sont semblables à certains virus des animaux tels le virus de la fièvre porcine africaine (FPA) (Enjuanes et al., 1977), le virus 3 de la grenouille (FV3) (Granoff, 1969) et le virus responsable de la maladie lympho-kystique chez le poisson

Tableau 5

Variété d'hôtes parasités par des virus cytoplasmiques
du groupe icosadrique à ADN (**)

Host	Virus name	Cryptogram	Authority
Vertebrates			
Mammals			
Phacochoerus aethiopicus (wart-hog)	African swine fever	D/2:*/*:S/S/V/Ac	Baas, 1971
Potamochoerus porcus (bushpig)			
Hylochoerus meinertzhageni (giant forest hog)			
Sus scrofa (swine)			
Amphibians			
Rana pipiens (leopard frog)	None	*/*/*/*:S/S/V/*	Bernard et al. 1969
R. pipiens	Frog virus 1 + 2	*/*/*/*:S/S/V/*	Granoff, Cravell & Derlington, 1969
R. pipiens	Frog virus 3	D/2:130/*:S/S/V/*	Granoff et al. 1969
R. pipiens	Frog virus 9 - 24	*/*/*/*:S/S/V/*	Granoff et al. 1969
R. pipiens	L ₄ + L ₅	*/*/*/*:S/S/V/*	Clark et al. 1968
R. catesbeiana (bull frog)	Tadpole adenovirus (TV)	*/*/*/*:S/S/V/*	Wolf et al. 1968
R. pipiens/Diamectylus viridescens	LT 1 - 4	*/*/*/*:S/S/V/*	Clark et al. 1969
Diamectylus viridescens (naui)	T 6 - 20	*/*/*/*:S/S/V/*	Clark et al. 1969
Xenopus laevis (toad)/Diamectylus viridescens	T 21	*/*/*/*:S/S/V/*	Halls & Ruben, 1968
Reptiles			
Gehyra variegata (gecko)	None	*/*/*/*:S/S/V/*	Stebbins & Johnston, 1966
Fish			
Over 50 species, including:	Lymphocystis	D/2:*/*:S/S/V/*	Christmas & Howe, 1970
Microgobius undulatus (Atlantic croaker)			
Lepomis macrochirus (bluegill)			
Cynoscion arenarius (sand searout)			
Invertebrates			
Insects*			
Tipula paludosa (leatherjacket)	Iridescent, type 1	D/2:126/15/S/S/L/*	Glits et al. 1968
Scaphisoma pruinosum (scarab beetle)	Iridescent, type 2	D/2:130/20/S/S/L/*	Kelly, 1972a
Aedes taeniorhynchus (mosquito)	Iridescent, type 3	D/2:*/*:S/S/L/*	Matts & Lowe, 1970
Aedes cantans	Iridescent, type 4	*/*/*/*:S/S/L/*	Weiser, 1965
Aedes annulipes	Iridescent, type 5	*/*/*/*:S/S/L/*	Weiser, 1965
Chilo suppressalis (rice stem borer)	Iridescent, type 6	D/2:134/20/S/S/L/*	Kelly, 1972a
Simulium ornatum (blackfly)	Iridescent, type 7	*/*/*/*:S/S/L/*	Weiser, 1968
Culicoides sp. (midge)	Iridescent, type 8	*/*/*/*:S/S/L/*	Chapman et al. 1971
Wiseana cervinata	Iridescent, type 9	D/2:*/20/S/S/L/*	D.C. Kelly & J.S. Robertson, unpublished results
Wiseana sabulosa	Iridescent, type 10	*/*/*/*:S/S/L/*	Fowler & Robertson, 1972
Aedes stimulans	Iridescent, type 11	*/*/*/*:S/S/L/*	Anderson, 1970
Aedes cantans	Iridescent, type 12	*/*/*/*:S/S/L/*	Tinsley et al. 1971
Corethrella brachyleyi	Iridescent, type 13	*/*/*/*:S/S/L/*	Chapman et al. 1971
Aedes detritus	Iridescent, type 14	*/*/*/*:S/S/L/*	Hess et al. 1970
Aedes detritus	Iridescent, type 15	*/*/*/*:S/S/L/*	Vago et al. 1969
Coelotes zealandica	Iridescent, type 16	*/*/*/*:S/S/L/*	Kalmakoff et al. 1972
Pterostictus nadius	Iridescent, type 17	*/*/*/*:S/S/L/*	J.S. Robertson, unpublished results
Ogomyia sp.	Iridescent, type 18	*/*/*/*:S/S/L/*	J.S. Robertson, unpublished results
Odontria striata	Iridescent, type 19	*/*/*/*:S/S/L/*	J. Kalmakoff, unpublished results
Chironomus plumosus	None	D/2:*/*:S/S/L/*	Stoltz, Hilsenhoff & Strich, 1968
Molluscs			
Octopus vulgaris (common octopus)	None	*/*/*/*:S/S/L/*	Runge et al. 1971
Protozoa			
Eutima histolytica	None	*/*/*/*:S/S/L/*	Mattern, Diamond & Daniel, 1972
Higher plants			
Brassicaceae	Cauliflower mosaic virus	D/2:4:5/16/S/S/S/Ap	Shepherd, 1970
Dahlia sp.	Dahlia mosaic virus	*/*/*/*:S/S/S/Ap	Brunt, 1971
Dianthus caryophyllus	Carnation etched virus	*/*/*/*:S/S/S/*	Hollings & Stone, 1969
Lower plants			
Phycomycetes	None	*/*/*/*:S/S/E/*	Schnepp et al. 1970
Aphelidium sp.			
Algae			
Oedogonium sp.	None	*/*/*/*:S/S/T/*	Pickett-Heaps, 1972
Chorda tomentosa	None	*/*/*/*:S/S/T/*	Toth & Wilce, 1972

* The interim nomenclature system of Tinsley & Kelly (1970) for iridescent viruses has been extended to accommodate recent isolates of iridescent viruses.

* T - Thallophyta. Viruses encompass a greater range of the plant and animal kingdom than envisaged by the cryptogram committee of the International Committee on the Nomenclature for Viruses.

** Tiré de Kelly et Robertson, 1973

(Sigel et al., 1971). Conséquent à cela, les virus iridescents ne semblent pas être de candidats idéaux pour le contrôle biologique (Kalmakoff, 1980). Le virus type 6 (Chilo iridescent virus) isolé des larves Chilo suppressalis Walker est létal pour la grenouille Rana limnocharis (Ohba et Aizawa, 1981) et pour la souris (Ohba et Aizawa, 1982). Ce virus provoquerait une hépatite toxique semblable à celle provoquée chez la souris par le FV3.

I-3.2 Réplication du CIV chez les insectes in vivo

L'Iridovirus type 6 (CIV) isolé de larves de Chilo suppressalis (Lepidoptera: Pyralidae) est utilisé comme modèle d'étude des relations virus-hôtes chez les invertébrés dans certains laboratoires de Microbiologie (Université de Rouen en France; Université du Québec à Trois-Rivières, Québec).

Inoculé dans l'hémocèle de Chilo suppressalis, l'infection commence à apparaître au bout de 5 jours, d'abord dans les cellules péricardiques et dans les cellules des glandes de l'oesophage. L'infection virale se poursuit dans les tissus graisseux, les glandes à soie, les glandes salivaires, les hémocytes, les cellules de l'épiderme, les canaux alimentaires, la trachée (Smith, 1976b). Les larves de C. suppressalis en état de diapause infectées avec le CIV peuvent même survivre pendant 1 à 3 mois (Mitsuhashi, 1966).

Une infection précoce du CIV dans les larves de moustiques produit une iridescence en arrière des yeux et dans les régions thoraciques (Fukuda, 1971).

Le CIV infecte aussi les larves de l'anthonome des cultures du cotonnier Anthonomus grandis per os ou par injection (McLaughlin et al., 1972).

Le CIV est un agent fatal pour Colladonus montanus (Homoptera: Cicadellidae), le vecteur du mycoplasme des fruits à noyaux (Jensen et al., 1972).

Le CIV infecte aussi in vivo le cicadelle parasite du riz vert, Nephotettix cincticeps (Mitsubishi, 1967).

Le virus iridescent (type 6) isolé de Chilo suppressalis Walker peut se multiplier à 28°C dans les larves de Galleria mellonella (Fukaya et Nasu, 1966). Charpentier et al. en 1983 ont dépisté les premiers antigènes de la capside virale de ce CIV dans le cytoplasme des hémocytes de larves du même insecte (G. mellonella) au bout de 18 heures et ce, à l'aide de l'immunoperoxydase. Selon ces auteurs, 80 à 100% des cellules-hôtes étaient infectées au bout de 48 heures.

I-3.3 Réplication du CIV chez les lignées cellulaires d'insectes cultivées in vitro

L'infection des cultures cellulaires d'insectes par les Iridoviridae s'accompagne souvent de phénomènes cytotoxiques ou de modifications morphologiques.

Le CIV (Chilo iridescent virus) inhibe rapidement la synthèse de l'ARN, de l'ADN et des protéines cellulaires dans les lignées cellulaires d'invertébrés et de vertébrés que la lignée soit permissive ou non-permissive pour la réplication du virus (Cerutti et Devauchelle, 1980). De plus, ce même CIV induit rapidement la formation d'énormes syncytiums dans les cellules infectées (Cerutti et Devauchelle, 1979). Ces effets toxiques se manifestent lorsque les cellules sont soumises à de fortes doses virales de CIV provoquant la mort cellulaire avant même que ne débute la réplication du virus. Evidemment, la réplication du CIV fonctionne mieux à moyenne ou à faible dose virale dans les systèmes cellulaires.

Une lignée cellulaire à partir d'embryons de Nephotettix cincticeps est susceptible à l'infection virale au CIV développant des symptômes histo-pathologiques (Mitsubishi, 1967).

L'Iridovirus type 6 peut même se répliquer sur des cellules de vertébrés (rate de vipère) et bourgeonner à-travers la membrane du réticulum endoplasmique (McIntosh et Kimura, 1974).

En fait, les premières lignées cellulaires d'insectes soumises à l'infection avec le CIV dérivent d'Antheraea eucalypti (Hukuhara et Hashimoto, 1967) et d'Aedes aegypti (Kelly et Tinsley: 1974a et 1974b).

Chez A. aegypti, les premières synthèses d'acides nucléiques n'ont été décelables qu'au bout de 24 à 48 heures; les premiers virions n'apparaissent qu'à 144 heures post-infection (production lente) (Cerutti et al., 1981). Le CIV conduit à des modifications morphologiques sur les cellules d'A. aegypti, d'Antheraea eucalypti et de Culex pipiens (Belloncik et al., 1974; Kelly et Tinsley, 1974) et est responsable de la diminution rapide de la synthèse des acides nucléiques (Kelly et Tinsley, 1974b).

Grosse en 1977 a observé en microscopie électronique la présence de particules virales du CIV type 6 dans le cytoplasme des cellules EPA (dictyoptères) infectées. Ces dernières ont été isolées à partir d'embryons d'une blatte, Periplaneta americana (Landureau, 1968).

La réplication de l'Iridovirus type 6 a été menée dans d'autres lignées cellulaires d'insectes par Kelly et Tinsley (1974a), Cerutti et Devauchelle (1979), Cerutti et al. (1981) et Charpentier et al. (1983).

On distingue au moins quatre types de systèmes cellulaires (non-permissif; semi-permissif; permissif lent; permissif rapide) ayant des comportements différents devant une infection avec le CIV. Le tableau 6 indique les types de lignées cellulaires soumises à l'infection virale avec le CIV type 6 et cite le comportement respectif de chacune des lignées. Un système semi-permissif indique la synthèse d'ARN viral précoce seulement; par contre, un système permissif est un processus au niveau duquel il se produit une synthèse d'ARN, d'ADN et de protéines associées au virus suivie de l'assemblage de particules virales infectieuses. Cette synthèse peut se faire lentement ou rapidement selon les cellules d'insec-

Tableau 6

Types de comportement chez diverses lignées cellulaires d'insectes infectées avec le CIV type 6 in vitro

<u>Lignées cellulaires d'insectes</u>	<u>Systèmes</u>	<u>Références</u>
<u>Aedes albopictus</u>	non-permissif	Cerutti <u>et al.</u> , 1981
<u>Lymantria dispar</u>	semi-permissif	Cerutti et Devauchelle, 1979
<u>Antheraea eucalypti</u>	permissif (réplication complète mais <u>lente</u>)	Kelly et Tinsley, 1974a
<u>Aedes aegypti</u>	permissif (réplication complète mais <u>lente</u>)	Kelly et Tinsley, 1974a Cerutti et Devauchelle, 1979 Cerutti <u>et al.</u> , 1981 Charpentier <u>et al.</u> , 1983
<u>Spodoptera frugiperda</u>	permissif (réplication complète mais <u>lente</u>)	Charpentier <u>et al.</u> , 1983
<u>Choristoneura fumiferana</u>	permissif (réplication complète mais <u>rapide</u>)	Cerutti <u>et al.</u> , 1981 Charpentier <u>et al.</u> , 1983
<u>Periplaneta americana</u>	permissif (réplication complète <u>lente</u> ou <u>rapide</u> ?)	Grosse, 1977

Légende:

Non-permissif: Aucune synthèse d'antigène viral.
Aucune multiplication et aucune transmission du virus.

Semi-permissif: Synthèse précoce et abondante d'ARN viral dans les cellules infectées. Aucune synthèse d'antigène viral, aucune transmission de particules virales.

Permissivité complète mais lente: Synthèse d'ARN, d'ADN et de protéines virales.
Multiplication du virus.
(Augmentation progressive des antigènes viraux.)

Permissivité complète mais rapide: Idem sauf synthèse très rapide des antigènes viraux.

tes impliquées. En ce qui a trait au système non-permissif, il ne se produit aucune synthèse et aucune multiplication du virus (Cerutti et al., 1981). Cinq lignées cellulaires d'insectes semblent donc permissives au CIV type 6: celle du diptère A. aegypti, celles de trois lépidoptères C. fumiferana, S. frugiperda et A. eucalypti et celle du dictyoptère P. americana (tableau 6). De tels systèmes cellulaires ont été grandement utilisés pour étudier les interactions cellules-hôtes-CIV et notamment pour préciser l'inhibition des systèmes macromoléculaires dans les cellules infectées (Cerutti et Devauchelle, 1980 et 1982). Ces derniers auteurs en 1982 ont conclu que les protéines externes du CIV possédaient plusieurs propriétés biologiques de la particule virale entière jouant un rôle dans la formation de syncytiums et dans le phénomène de cytotoxicité.

Dans la lignée cellulaire de C. fumiferana, Arella (1983) a observé qu'une forte dose virale du CIV (0.5 ou 1.0 UDO^*_{280}) a induite un effet cytotoxique rapide sur cette lignée. En fait, cet effet se traduit par le décollement du tapis cellulaire et une diminution du nombre de cellules avec une réaction intracytoplasmique positive au Feulgen (technique de Feulgen et Rossenbeck, 1924). Cette technique leur a permis de quantifier le pourcentage de cellules infectées avec le CIV.

* UDO_{280} : unité de densité optique à une longueur d'onde de 280 nm.

I-3.4. Multiplication du CIV

Les polypeptides structuraux du CIV type 6 ont été étudiés par Barray et Devauchelle en 1979 et les activités enzymatiques associées aux particules virales l'ont été par Monnier et Devauchelle en 1976. Barray et Devauchelle (1979) ont réussi à dénombrer les polypeptides viraux du CIV par deux techniques de solubilisation. D'abord, la dissolution des particules virales avec du SDS et du B-mercaptoéthanol a permis d'observer 16 polypeptides majeurs dont les poids moléculaires sont compris entre 18,000 et 115,000. La solubilisation du virus avec du SDS et de l'urée a permis de mettre en évidence 26 polypeptides viraux de poids moléculaires compris entre 10,000 et 230,000. Monnier et Devauchelle (1976) ont mis en relief une NTPase (nucléoside triphosphate phosphohydrolase) associée aux virions purifiés du CIV. Suite à des études cytochimiques, ces chercheurs ont conclu que l'activité enzymatique de cette NTPase est partie intégrante du virion. Il semble évident aussi selon Kalmakoff (1980) que les virus iridescents ont des ARN polymérases associées aux virions pour la production de l'ARN_m.

Cerutti et Devauchelle en 1980 ont publié des résultats indiquant l'inhibition précoce des synthèses cellulaires (ARN, ADN, et des protéines) lorsque le CIV (Chilo iridescent virus) est inoculé à des lignées cellulaires de vertébrés et d'invertébrés (A. albopictus, A. aegypti et L. dispar).

Charpentier et al. (1983) ont réussi à démontrer les cinétiques d'apparition des antigènes viraux du CIV type 6 chez diverses lignées cellulaires via une méthode immunologique qu'est l'immunoperoxydase. Plus précisément, les antigènes précoces du CIV ont été décelés dans le

cytoplasme de trois lignées cellulaires d'insectes cultivées in vitro (A. aegypti; S. frugiperda; C. fumiferana) au bout de 5 à 6 heures. La détection des antigènes du virion du CIV in vitro apparaît à 22-24 heures post-infection chez A. aegypti et S. frugiperda, et au bout de 7-10 heures chez C. fumiferana.

Arella (1983) a observé en microscopie électronique l'apparition de particules matures du CIV type 6 dans le cytoplasme des cellules de C. fumiferana cultivées in vitro dès 18 heures post-infection. Il a même noté la synthèse de l'ADN viral dans le cytoplasme de cette même lignée cellulaire moins de 8 heures après l'inoculation du CIV (zones Feulgen positives).

I-4. Infections mixtes impliquant des virus de polyédroses cytoplasmiques et des virus iridescents

Plusieurs chercheurs ont décrit des infections virales mixtes chez les invertébrés, voir à ce propos les revues de littérature de la thèse du docteur Simon Garzon (1972) et du mémoire de maîtrise de Lucienne St-Amand (1982). En fait, St-Amand a souligné dans sa revue des infections multiples impliquant des virus de polyédroses cytoplasmiques et des baculovirus chez C. fumiferana et M. disstria; elle relate aussi certaines études d'infections mixtes provoquées dans les populations de Lymantria fumida.

Garzon et Kurstak en 1972 ont décrit une infection multiple du type VPN-TIV (virus de la polyédrose nucléaire - virus iridescent de Tipule) sur des cultures primaires de G. mellonella. L'infection mixte testée in vivo et in vitro montre des changements pathologiques du

cytoplasme et du noyau dans les hémocytes et dans les cellules adipeuses chez cette larve. Après 7 jours d'infection à 30°C, ils ont diagnostiqué une double infection par la présence de polyèdres dans le noyau due à la réplication intranucléaire du VPN, et par la présence de masses intracytoplasmiques associées au TIV.

Kimura et McIntosh (1975) ont provoqué une infection mixte du type CIV (Chilo iridescent virus) associé avec un VPN isolé d'Autographa californica chez la lignée cellulaire d'insecte Trichoplusia ni. Ces chercheurs ont observé une inhibition de la production de polyèdres par le VPN suite à une réplication simultanée des deux virus dans cette lignée.

Une infection virale chez la lignée cellulaire de Spodoptera frugiperda avec un iridovirus type 22 et un VPN de T.ni a été étudiée par Kelly en 1980. Ce dernier a conclu qu'une telle infection mixte a provoqué une baisse de la production des deux virus chez S. frugiperda (effet antagoniste).

Quiot et al. en 1980b ont noté que le VPC d'E. scandens a inhibé la formation de l'enveloppe du VPN du Spodoptera littoralis d'une part, et l'inclusion de ces virions d'autre part lors d'une infection multiple du type VPC-VPN chez la lignée de B. mori. Belloncik et al. en 1982b ont procédé à une infection in vivo simultanée du VPC d'E. scandens et du VPN d'A. segetum chez les larves d'E. scandens. L'effet synergétique de ces virus a été responsable de la mortalité notée chez les larves du premier et du cinquième stades larvaires.

Rubinstein et al. (1975) ont réussi à isoler un VPC par des techniques de purification adéquates à partir de larves Heliothis armigera doublement infectées par un VPC et un VPN.

En ce qui a trait aux infections mixtes du type VPC-CIV chez les invertébrés, peu de recherches ont été menées à ce niveau. Néanmoins, certains chercheurs tels Arella et al. (1982b) ont étudié un système cellulaire-virus du type C. fumiferana-VPC-CIV. Aussi suite à des expériences menées avec cette dernière lignée cellulaire d'insecte avec ce type d'infection mixte (VPC-CIV), Arella en 1983 a noté une augmentation du pourcentage des cellules contenant des polyèdres du VPC, une hausse du nombre total de polyèdres et de la proportion de polyèdres par cellule (synergisme). L'étude en microscopie optique (contraste de phase: 250 X) des infections mixtes du type VPC-CIV démontre que les polyèdres du VPC apparaissent presque'exclusivement dans les bourgeonnements cytoplasmiques (Feulgen positifs) des cellules de C. fumiferana (Arella, 1983). Ce même chercheur a observé aussi l'apparition des particules virales et des polyèdres de ce même VPC au bout de 36 heures chez cette même lignée (C. fumiferana) soumise à l'infection mixte du même type (VPC-CIV). Toujours par l'intermédiaire de la microscopie électronique, il a noté que les particules virales du CIV avaient des formes aberrantes suite à cette même infection mixte; il a remarqué aussi un nombre élevé de capsides virales vides associées au CIV dans le cytoplasme des cellules de C.f. soumises à la double infection virale. Arella et al. (1982b) ont observé que ces deux virus mélangés dans le cytoplasme de cette même lignée C.f. émergeaient d'un stroma virogène commun. De plus, pour prouver qu'il n'y avait aucune trace d'ADN viral du CIV dans les corps d'inclusions protéi-

niques du VPC, ils se sont servis de précurseurs de l'ADN radioactif soit la thymidine tritiée. Plus précisément, les cellules de C.f. ont été infectées avec un mélange VPC-CIV plus de la thymidine tritiée. Aucune radioactivité n'a été décelée dans les polyèdres du VPC d'E.s..

En guise de conclusion générale, il existe divers effets possibles associés aux infections mixtes. A vrai dire, l'évolution d'une double infection virale d'une même cellule peut être sujette soit à une forme d'indifférence (Rohrmann et al., 1980), soit à une forme d'antagonisme (Kimura et McIntosh, 1975; Kelly, 1980; Quiot et al., 1980b) ou soit à une forme de synergisme (Arella et al., 1982b; Arella, 1983) entre les deux virus impliqués dans cette infection. Et même si le site de la réplication intracellulaire individuel des deux virus concernés est différent ou semblable selon les cas (noyau et/ou cytoplasme), cela n'empêche pas que la multiplication d'un virus peut être soit non-incommodée, soit retardée ou soit stimulée par la présence de l'autre virus-parasite intranucléaire ou intracytoplasmique.

Aussi il nous a semblé opportun de mesurer l'effet d'une infection multiple du type VPC-CIV sur la synthèse des antigènes viraux chez la lignée cellulaire d'insecte C.fumiferana afin de mieux comprendre le mécanisme de cette réplication double dans le cytoplasme cellulaire de cette lignée.

I-5. Historique des moyens de titration des virus d'insectes

Plusieurs techniques ont été développées pour titrer certains virus d'insectes. Entre autres, le dosage des virus iridescents a été produit en employant des anticorps fluorescents spécifiques à ce type de

virus (Bellett et Mercer, 1964).

La technique de coloration du noyau à l'orange d'acridine a été mise au point pour doser le virus de la densonucléose (Quiot et al., 1973).

Récemment, l'évaluation de la $\text{DICT}_{50/\text{ml}}^*$ a été menée pour titrer les virus oryctes (Kelly, 1976b) et des essais sur plaques ont été employés pour le virus iridescent type 22 (Brown et al., 1977) et pour les baculovirus (Brown et Faulkner, 1977; Hink et Vail, 1973).

Aussi une méthode de titration pour les VPC a été décrite depuis peu par Belloncik et Chagnon en 1980. Cette technique simple, économique est effectuée en microculture tissulaire. Elle est basée sur la détection des polyèdres cytoplasmiques dans les cellules infectées.

I-6. Détections immunoenzymatiques

I-6.1 Introduction sur l'emploi des méthodes immunoenzymatiques et des techniques à l'immunoperoxydase

L'immunologie a assumé un rôle vital dans les techniques de diagnostic et dans l'analyse des problèmes biologiques à cause de la capacité remarquable de discrimination des anticorps (immunoglobulines humaines, immunoglobulines animales, etc...) vis-à-vis les antigènes (bactéries, parasites, virus, acides nucléiques, etc...). Il ne faut

* $\text{DICT}_{50/\text{ml}}$: dose responsable de l'infection de 50% des cellules cultivées en culture de tissus.

surtout pas omettre que le développement bénéfique de techniques appropriées a permis de mieux comprendre le comportement physico-chimique du complexe antigène-anticorps (ag-ab). Les interactions spécifiques entre les ab et leurs ag homologues constituent la base de la localisation de ces ag dans ou sur les cellules ou tissus telle qu'obtenue par l'immunofluorescence (If), par l'immunoferritine et par l'immunoperoxydase (Ip), ainsi que du titrage des ag libres ou des ab obtenu via l'E.L.I.S.A. (enzyme-linked immunosorbent assay). Ces quatre méthodes immunologiques se différencient les unes des autres par le type de marqueur du complexe ag-ab employé et par le type de substrat utilisé s'il y a lieu.

La première méthode (If) emploie une molécule fluorescente couplée aux ab, qui sera visible par l'examen à l'ultraviolet. La particule fluorescente peut être de l'isothiocyanate de fluorescéine, de la rhodamine, etc... (Wang et al., 1975). L'immunoferritine utilise une molécule dense aux électrons, la ferritine, comme marqueur du complexe ag-ab. Ce dernier marqueur possède un noyau lourd qui arrête les électrons émis par le faisceau du microscope électronique. Aussi, les points sombres sur l'image indiquent la présence et la localisation des ag étudiés.

L'Ip et l'E.L.I.S.A. se caractérisent par des techniques immunologiques n'employant que des enzymes comme marqueurs du complexe ag-ab. Différents enzymes peuvent servir en tant que marqueurs immunoenzymatiques tels la peroxydase, le cytochrome C, la phosphatase alcaline, la glucose oxydase. Parmi ces derniers, la peroxydase est un marqueur pouvant être impliqué dans ces deux types de méthode de détection (Ip et

E.L.I.S.A.); par contre, la phosphatase alcaline n'est employée que dans la technique E.L.I.S.A.. Aussi, l'enzyme (marqueur) est détecté en utilisant un substrat bien particulier respectif à chacune de ces deux techniques de détection. Plus précisément au cours de la technique à l'Ip, l'enzyme est décelé en utilisant un substrat bien soluble qui sera polymérisé en un produit insoluble précipitant sur le site d'action enzymatique (cellules, tissus, etc...). Un des substrats employés par exemple avec l'Ip est le DAB (3-3' diaminobenzidine). Cependant avec l'E.L.I.S.A., on emploie un substrat incolore (p-nitrophényl phosphate par exemple) qui réagit avec l'enzyme (phosphatase alcaline par exemple) de manière à former un complexe soluble. Aussi, ce produit de réaction soluble est coloré dans la solution. Donc, l'E.L.I.S.A. s'avère un moyen rapide et efficace pour doser des antigènes en provenance de spécimens (cellules, tissus entiers, etc...) broyés. Grâce à cette méthode de dosage, il a été établi des courbes standards lesquelles servent comme références. A vrai dire, l'Ip et l'E.L.I.S.A. sont des méthodes de choix pour l'obtention d'informations tant qualitatives que quantitatives à partir des spécimens infectés (hémostases, cellules, tissus, etc...). De façon plus détaillée, l'aspect et la localisation du marquage (intracytoplasmique; intranucléaire; membranaire; etc...) via l'Ip et le typage d'un sérum donné via l'E.L.I.S.A. s'avèrent des mesures qualitatives de détection d'une part. Par contre, le pourcentage de constituants antigéniques (antigènes précis; cellules; protéines; etc...) marqués à l'Ip et le dosage précis en mg d'ab ou d'ag (à partir d'un sérum donné ou d'homogénats d'origines diverses) via l'E.L.I.S.A. sont des mesures quantitatives de détection d'autre part.

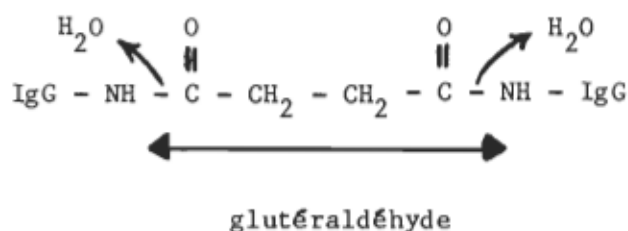
En guise de conclusion, l'Ip est une méthode très employée par rapport aux autres vue la grande activité enzymatique de la peroxydase. En plus, le poids moléculaire moindre de cette dernière facilite grandement l'entrée intracytoplasmique cellulaire du complexe anticorps-peroxydase. L'avantage de l'emploi de l'Ip par rapport à l'E.L.I.S.A. est que celle-là peut être utilisée en microscopie optique et en microscopie électronique. En ce qui a trait à l'If, cette dernière n'est employée qu'en microscopie optique tandis que l'immunoferrritine est utilisée uniquement en microscopie électronique.

La technique à l'immunoperoxydase (Ip) s'avère une méthode de choix pour l'identification rapide de plusieurs agents microbiens (bactéries, virus, parasites) responsables de maladies chez les humains, mammifères, invertébrés, etc...

En fait, la technique à l'Ip permet de déceler en microscopie optique et en microscopie électronique la présence d'antigènes à l'aide d'immunoglobulines très spécifiques (Kurstak et Kurstak, 1974) dirigées contre ces derniers et couplées à un enzyme (peroxydase). En plus, cet enzyme peut être détecté en utilisant un substrat soluble, comme par exemple le 3-3' diaminobenzidine (DAB), qui est polymérisé en un produit insoluble et coloré en présence du peroxyde (H_2O_2) précipitant sur le site d'action enzymatique. Effectivement, la polymérisation du DAB oxydé forme un polymère brun (phénazine) correspondant au marquage observé en microscopie dans ou sur les cellules.

Le procédé de couplage entre les immunoglobulines (IgGs: anticorps) spécifiques et l'enzyme (HRPO: peroxydase de Raifort) a subi

diverses mises au point avant d'atteindre un niveau de conjugaison adéquat. Certains chercheurs (Kurstak, 1971; Kurstak et al., 1977) ont appliqué une méthode de conjugaison en une seule étape tout en utilisant des réactifs bifonctionnels (deux groupes aldéhydes: glutéraldéhyde par exemple). Ces réactifs réagissent avec les groupes aminés des protéines. Le désavantage d'un tel procédé a été la formation de nombreux polymères IgG-IgG et HRPO-HRPO indésirables produits suite à une liaison chimique entre la glutéraldéhyde et deux IgGs (ou deux HRPO_s):



Avraméas et Ternynck (1971) sont parvenus à améliorer le processus de couplage IgG-HRPO en employant les mêmes réactifs bifonctionnels mais appliqué en deux étapes. D'abord, l'agent couplant (réactif bifonctionnel) a été mis en contact avec l'enzyme avant de procéder à l'élimination de molécules d'agent couplant libres par dialyse. Au cours de la deuxième étape, le complexe agent couplant-enzyme a été mis en présence d'IgGs. Malgré cela, des groupes aldéhydes libres sur le marqueur peuvent se fixer aux tissus de manière non-spécifique selon Kurstak et al. (1975 et 1977).

La méthode de conjugaison la plus efficace à date est celle de Nakane et Kawaoi en 1974. Voici brièvement les étapes de cette technique:

- 1) Blocage des groupes aminés et des groupes hydroxyles de la peroxydase de Raifort (HRPO) avec le fluorodinitrobenzène (FDNB) afin d'éviter la formation de polymères de peroxydase par la suite.
- 2) Formation des groupes aldéhydes sur la portion carbohydrate de la HRPO avec le sodium m-periodate (NaIO_4).
- 3) Liaison des groupes aldéhydes de la HRPO aux groupes aminés des IgGs lors du couplage HRPO-IgG (liaison unidirectionnelle et efficace).
- 4) Transformation des liaisons ioniques formées entre HRPO-IgG en des liens covalents par réduction des bases de Schiff avec le borohydrure de sodium (NaBH_4).

I-6.2 Emploi général en bactériologie, en parasitologie, en pathologie et en virologie

La technique de l'Ip s'avère une méthode immunologique couramment employée dans les centres de recherches privés ou universitaires, dans les milieux hospitaliers, etc..., comme moyen de diagnostic de maladies diverses et dans l'analyse des problèmes microbiologiques, biologiques.

Effectivement son emploi général en bactériologie, en parasitologie, en pathologie (humaine et animale) et en virologie (vertébrés et invertébrés) la rend une méthode à usages multiples tant en microscopie optique qu'électronique.

En effet, l'Ip est une technique de choix pour l'identification

rapide de certains agents bactériens (exemple: Bacteroides fragilis) responsables de foyers purulents (abcès) dans la cavité intra-abdominale des humains (Hsu et al., 1979).

Buschbaum et al. (1981) sont parvenus à dépister des microbes responsables de pneumonies atypiques (Legionella pneumophila: maladie des légionnaires) via l'Ip chez certains patients. Cette dernière technique a même permis de mettre en évidence quatre sérotypes de Legionella pneumophila.

L'Ip trouve aussi une application avantageuse dans le diagnostic de maladies parasitaires occasionnées par le Toxoplasma gondii responsable de graves répercussions sur le fœtus humain (Kurstak et al., 1973), par le Trichomonas vaginalis responsable d'infestations génitales (O'Hara et al., 1980). Même le dépistage des anticorps spécifiques contre un ver parasite (schistosome) a été mené à partir de sérums de patients parasités par ce ver (Vullo et al., 1979).

Dans le domaine de la virologie, la technique des anticorps conjugués à l'enzyme "peroxydase" (Ip) a été appliquée avec succès pour le diagnostic rapide et spécifique des infections virales humaines (exemple: infections chroniques du type herpès) et pour le dépistage des virus oncogènes (Kurstak et Kurstak, 1974). Plus précisément, cette technique a permis d'obtenir d'excellents résultats lors du diagnostic des infections génitales dues au virus Herpes simplex type 2 et au cytomégalo virus dont l'importance, en tant qu'agents de maladies vénériennes, n'est pas à négliger (Kurstak et Kurstak, 1977). Cette technique a aussi permis de démontrer la présence des antigènes du virus Herpes simplex dans le

cas d'une encéphalite humaine (Kumanishi et Hirano, 1978).

Haikin et al. (1979) se sont servis de cette technique pour déceler des IgGs spécifiques aux antigènes de la membrane fibroblastique induits par le virus de la varicelle-zoster responsable de la varicelle chez l'homme.

De plus, le marquage immunologique de l'antigène du virus junin (clone XJ-3) via l'Ip s'est avéré un outil utile et rapide pour le diagnostic virologique de l'agent responsable de la fièvre hémorragique de l'Argentine (Lascano et al., 1981).

Charpentier et al. en 1982 ont aussi employé cette technique afin de détecter les antigènes de l'enveloppe du virus Chikungunya (agent de la fièvre hémorragique thaïlandaise) sur des cultures de rein d'hamster nouveau-né (cellules BHK-21) tant en microscopie optique qu'électronique.

Schmidt et al. (1981) ont décelé les antigènes du virus de la rubéole sur le même type de cellules (BHK-21) mises en culture en employant l'Ip comme procédé de détection immunologique. Kurstak et al. en 1982 se sont servis de cette méthode pour diagnostiquer les maladies à herpèsvirus et à rotavirus. Ce dernier type de virus est responsable de gastroentérites souvent mortelles enregistrées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

L'Ip est employée aussi pour dépister des virus humains transmis par les insectes piqueurs. Entre autres, l'antigène du virus sindbis (alphavirus) a été localisé dans le cytoplasme et sur la membrane plasmique des cellules d'Aedes albopictus (vecteur de la maladie) (Stollar

et al., 1979).

Plusieurs revues se référant à l'emploi de l'Ip comme mesure de détection immunologique en pathologie virale humaine ont été produites entres autres par Kurstak et Morisset (1974), par Kurstak et al. (1977), par Wicker (1977).

Même en médecine vétérinaire, l'Ip est une méthode immunoenzymatique employée très couramment pour le diagnostic de maladies d'origines virales. La localisation des antigènes du virus Aujeszky (Bartoszcze et Roszkowski, 1979) et celle des antigènes viraux du buffalopoxvirus (Grover et al., 1980) ont été effectuées dans les fibroblastes d'embryons de poulets (cultures cellulaires) via l'Ip. De plus, l'étude de la multiplication du virus de la peste bovine (paramyxovirus) dans les cultures cellulaires de rein de boeuf via cette même technique a permis de mesurer l'effet cytopathologique provoqué par une telle infection virale (Krishnaswamy et al., 1981).

Ciampor et al. (1981) ont réussi à localiser la synthèse des protéines (haemagglutinines) du virus influenza aviaire dans les cellules fibroblastiques de souris (cellules L) en employant l'Ip. Même la détection de l'acide nucléique viral de l'hépatite B du canard et l'accumulation de l'antigène viral dans les cellules pancréatiques et rénales de canards infectés congénitalement avec ce virus ont été mises en évidence par cette technique (Halpern et al., 1983).

En ce qui a trait à la virologie des insectes, les antigènes de deux iridovirus ont été décelés par l'Ip: les antigènes du TIV (Tipula

iridescent virus) dans les larves de Galleria mellonella infectées par ce virus d'une part (Garzon, 1972) et les antigènes du CIV (Chilo iridescent virus) dans les hémocytes de larves de G. mellonella infectées d'autre part (Ohba et Aizawa, 1980). De plus, la synthèse des antigènes du VDN (virus de la densonucléose) dans les cellules du même insecte (G. mellonella) a été observée par cette même méthode immunoenzymatique (Kurstak et al., 1969 et 1970).

Aussi, les antigènes du VPN d'Autographa californica ont été mis en évidence par cette technique immunologique employée par Summers et al., 1978. Ces derniers ont étudié les cinétiques d'apparition de ces antigènes viraux dans diverses lignées cellulaires d'insectes telles Trichoplusia ni-368-10, Trichoplusia ni-368-13, Bombyx mori, Manduca sexta, Mamestra brassicae et Carpocapsa pomonella. Chez les deux premières lignées (T.ni-368-10 et T.ni-368-13), les ag du VPN associés à la capside virale ont été décelés 6 à 8 heures post-infection dans le cytoplasme de ces deux lignées cellulaires. Ces antigènes se sont dirigés vers le noyau à 10 heures post-infection. La protéine majeure du polyèdre (polyédrine) a été synthétisée à 12 heures post-infection soit 2 heures après l'apparition des particules virales libres non-incluses chez ces deux mêmes lignées. A cette période, près de 75% des cellules de T.ni -368-10 étaient marquées à l'Ip de façon légèrement plus intense dans le noyau que dans le cytoplasme (i.e. 75% de ces cellules étaient accaparées par la présence des ag de la capside virale du VPN d'A. californica tant intranucléaire qu'intracytoplasmique). Par contre, la formation de la polyédrine induite par ce virus n'a été observée que dans quelques cellules (moins de 1%). Selon Summers et al. (1978), cette polyédrine proprement dite n'est

donc pas nécessaire à la synthèse des particules virales libres infectantes de ce VPN. En fait, la synthèse de ces dernières a commencé à décliner lors du début de la production de cette polyédrique (cytoplasmique et nucléaire) soit entre 12 et 14 heures post-infection. Aussi à 15 heures post-infection, un marquage intense correspondant à la formation du stroma virogène est apparu dans le noyau en même temps que le marquage cytoplasmique diminuait grandement (réduction de la formation cytoplasmique des antigènes de la capsid virale du VPN). Dans la lignée de T.ni-368-10, le VPN d'A. californica a induit la formation de ce stroma virogène dans 86% des cellules à 15 heures post-infection et n'a induit que dans 20% des cellules la synthèse de la protéine majeure du polyèdre. A 18 heures post-infection, ces mêmes chercheurs ont détecté la formation de cette polyédrique dans le noyau de cette même lignée T.ni-368-10 (60% des cellules). De plus, ils ont observé la présence de polyèdres nucléaires dans 30% de ces cellules pour une même période post-infection. Des essais expérimentaux semblables menés avec la lignée T.ni-368-13 ont abouti à des conclusions similaires à celles obtenues avec T.ni-368-10. Toujours chez ces deux mêmes lignées, à mesure que la période post-infection devenait importante, la formation des polyèdres nucléaires augmentait. Conséquemment à cela, l'intensité du marquage cytoplasmique et celle du noyau ont diminué dues à l'inclusion polyédrique des antigènes de la capsid virale du VPN d'une part, et dues à l'incorporation de la polyédrique dans la matrice cristalline des polyèdres d'autre part. Bien que la vitesse d'apparition des polyèdres est en relation directe avec celle de la formation de la polyédrique dans les cellules de T.ni-368-10, il en est autrement dans les cellules de T.ni-368-13. En fait, chez cette

dernière lignée cellulaire d'insecte, la vitesse d'apparition des polyèdres a été moindre que celle de la synthèse de la polyédrine. Comme la formation de cette dernière s'effectue en même temps dans ces deux lignées, il existe probablement un facteur intracellulaire propre à la cellule infectée impliqué dans le phénomène de cristallisation des polyèdres qui pousse ces deux types de cellules à produire des quantités différentes de polyèdres et à des temps bien particuliers selon ces chercheurs (Summers et al., 1978). Ces derniers se sont servis encore de la technique à l'Ip comme moyen de détection directe et de quantification des antigènes de la capsid virale de ce même VPN d'A. californica dans la lignée cellulaire de B. mori. Cette technique leur a permis de mettre en évidence la synthèse de ces ag viraux et celle du virus infectant proprement dit dans 90% des cellules de cette lignée (B. mori) à 42 heures post-infection. Ces mêmes chercheurs ont noté que ce virus n'a induit la formation de la polyédrine que dans 1% et moins de ces mêmes cellules. Ainsi, la réplication de ce VPN dans la lignée de B. mori s'est produite sans que ne s'effectue une synthèse importante de la protéine majeure du polyèdre (polyédrine).

L'effet du VPN d'A. californica a été testé à l'Ip dans trois autres lignées cellulaires d'insectes (M. sexta, M. brassicae et C. pomonella) par cette même équipe scientifique. Des résultats semblables à ceux obtenus avec les lignées de T.ni-368-10 et de T.ni-368-13 ont été notés dans la lignée de M. sexta à 18 heures post-infection. Cependant, la lignée de M. brassicae semble très permissive à l'infection avec ce VPN puisque la synthèse des deux ag étudiés (ag de la capsid virale et la polyédrine) a été plus élevée que celle observée dans les lignées de T.ni-

368-10, de T.ni-368-13 et de M. sexta. Par contre, la lignée de C. pomonella s'est avérée une lignée très résistante à l'infection virale au VPN d'A. californica puisqu'aucune synthèse d'antigène viral a été décelée même à 42 heures post-infection.

Certains entomopathogènes (virus Nodamura; virus iridescent de Chilo suppressalis et virus de la polyédrose cytoplasmique d'Euxoa scandens) ont été mis en évidence par l'Ip soit à partir de frottis d'hémolymphe de larves de G. mellonella infectées avec le virus Nodamura et le CIV ou à partir de lignées cellulaires d'insectes infectées avec le CIV (Aedes aegypti; Choristoneura fumiferana; Spodoptera frugiperda) et avec le VPC (Euxoa scandens; Lymantria dispar) (Charpentier et al., 1983). Les antigènes de la capside virale du CIV ont été décelés très tôt dans les hémocytes de larves de G. mellonella tels que vus en microscopie optique (Charpentier et al., 1980). En fait, un marquage à l'Ip a été observé dans le cytoplasme de ces cellules à 18 heures post-infection; et, 80 à 100% de ces mêmes cellules sont marquées après 48 heures d'infection virale. A ce niveau, un marquage spécifique d'un aspect granuleux a été localisé dans certaines zones cytoplasmiques (Charpentier et al., 1985: soumis pour publication). En plus, ces mêmes chercheurs ont observé en microscopie électronique le marquage à l'Ip du viroplasma dans les hémocytes de larves de G. mellonella infectées à 48 heures post-infection avec ce même CIV; par contre, les virions n'ont été décelés qu'au bout de 10 jours avec le même procédé de détection à l'Ip. Ces derniers chercheurs se sont encore servis de cette dernière technique pour étudier les cinétiques d'apparition des antigènes de la capside virale du CIV dans certaines lignées cellulaires d'insectes telles A. aegypti, C. fumiferana

et S. frugiperda. Dans la lignée d'A. aegypti infectée avec ce CIV, il est apparu un premier marquage spécifique correspondant à la localisation cytoplasmique de ces ag à 22-24 heures post-infection (à 21°C et 28°C). A 28°C, ce CIV a induit la formation des ag associés à la capside virale dans 50-80% des cellules d'A. aegypti au bout de 24-48 heures; par contre à 21°C, la synthèse de ces mêmes ag n'a été observée que dans 36% des cellules après 48 heures post-infection. Des résultats similaires ont été notés dans la lignée de S. frugiperda infectée avec ce même CIV. Par contre, une infection du même type dans la lignée de C. fumiferana a mené à l'apparition précoce (7-10 heures) d'un marquage spécifique correspondant à la présence cytoplasmique de ces ag associés à la capside virale. Le pourcentage des cellules positives pour ces ag viraux cytoplasmiques a augmenté avec la température d'incubation: soit 30% (18°C), 45% (21°C), 85% (28°C) respectivement et ce, à 48 heures post-infection. Ainsi dans les essais in vitro menés avec ces trois lignées cellulaires d'insectes, le pourcentage des cellules marquées et l'intensité du marquage cytoplasmique augmentent donc avec la température d'incubation selon Charpentier et al., 1985 (soumis pour publication). Ces mêmes chercheurs se sont attardés aussi à la détection des ag viraux non-associés à la capside virale (ag précoces) de ce même CIV via l'Ip dans les mêmes lignées cellulaires d'insectes cultivées in vitro (A. aegypti; C. fumiferana; S. frugiperda). L'apparition d'ag précoces est survenue 5 à 7 heures post-infection chez ces trois lignées cellulaires quelle que soit la température d'incubation testée (18°C; 21°C; 28°C; 31°C). Néanmoins, l'intensité du marquage cytoplasmique est plus prononcée à 28°C. L'Ip s'est donc avérée une technique valable pour classer les lignées cellulai-

res d'insectes en regard avec leur permissivité individuelle devant l'infection au CIV. A vrai dire, Charpentier et al., 1985 (soumis pour publication) ont différencié trois types de systèmes cellulaires en ce qui concerne la répllication du CIV: un système permissif rapide, des systèmes permissifs lents et des systèmes non-permissifs. Ces derniers chercheurs ont soutenu d'après leurs résultats expérimentaux que les lignées d'A. aegypti et de S. frugiperda étaient permissives au CIV puisque ce dernier s'est répliqué complètement mais de façon lente dans ces deux lignées. Par contre, C. fumiferana a été considérée comme une lignée très permissive au CIV due à la répllication complète et rapide de ce virus dans cette lignée. Néanmoins, les lignées d'A. albopictus et de L. dispar ont été considérées comme des lignées non-permissives au CIV puisqu'aucune synthèse des ag de ce virus a été décelée à l'Ip même à 48 heures post-infection (Charpentier et al., 1985: soumis pour publication).

Outre l'emploi de l'Ip comme procédé de détection immunologique en virologie des insectes, d'autres techniques telles l'E.L.I.S.A. et l'If ont été appliquées par d'autres scientifiques. Kelly et al., 1978 ont procédé à la discrimination entre cinq virus iridescents de divers types (21; 22; 23; 25; 28) dans les larves de G. mellonella via l'E.L.I.S.A.. Payment et al. en 1982 ont aussi employé cette méthode afin d'évaluer la spécificité d'anticorps (anti-sérum) du VPC d'E. scandens envers certains virus d'insectes variés. En fait, l'emploi d'IgGs spécifiques au VPC d'E. scandens a été testé sur divers homogénats (larves entières, intestins, excréments) provenant de certains autres insectes infectés par leurs VPC respectifs (Malacosoma disstria, B. mori, C. fumiferana) ou par le CIV (G. mellonella). Aucune réaction non-spécifique a été décelée. Ces

derniers chercheurs se sont servis encore de cette technique (E.L.I.S.A.) comme mesure de détection des protéines virales (antigènes) du VPC d'E. scandens dans la lignée de L. dispar cultivée in vitro. Ces antigènes viraux ont été décelés à 9 heures post-infection à une dose virale du VPC de $1 \text{ DICT}_{50}/\text{ml}$. Kawase et Miyajima en 1969 ont démontré la présence des protéines du VPC et celle des polyèdres dans le cytoplasme de l'intestin moyen de B. mori via l'If.

Au cours de notre projet de recherche, on s'est attardé à mesurer via l'Ip les cinétiques d'apparition des divers constituants antigéniques du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires telles L. dispar, E. scandens et C. fumiferana.

D'abord, on a testé l'influence de la concentration virale en VPC et celle de la température sur les apparitions en Ip des divers ag viraux de ce VPC chez les lignées de L. dispar et d'E. scandens. Puis l'étude de l'effet d'un inhibiteur sur les apparitions en Ip de ces mêmes ag viraux chez ces deux mêmes lignées cellulaires a été aussi effectuée.

De plus, on a procédé à l'étude d'une infection mixte du type VPC-CIV chez la lignée de C. fumiferana tout en employant l'Ip comme méthode de détection immunologique des ag viraux du VPC d'E. scandens.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II-1. Techniques non-immunologiques

II-1.1 Elevage de l'insecte

II-1.1.1 Technique d'élevage d'Euxoa messoria au laboratoire

II-1.1.1.1 Les oeufs

Les adultes d'E. messoria ramassés sur le terrain donnent des oeufs viables dans des cages destinées à la ponte. Ces oeufs sont placés dans des fioles stériles par le personnel du laboratoire de virologie de l'I.A.F.. Au préalable, ces derniers subissent un procédé de désinfection à l'hypochlorure de Na 0.5% pendant 10 minutes avant un lavage à l'eau distillée et un séchage à l'air sur un filtre dans un entonnoir de type Büchner. Puis, ces oeufs traités sont acheminés au laboratoire de microbiologie de l'U.Q.T.R. afin de subir un conditionnement servant à l'élevage aseptique d'E. messoria. Ces derniers sont incubés dans une chambre de croissance de type Convion (123 L. Controlled Environments Manitoba) à une température de 28°C et sont soumis à une photopériode de 10 heures et à un taux d'humidité de 50 à 70%.

II-1.1.1.2. Les larves

Dès l'émergence des larves, celles-ci sont transférées à l'aide d'un fin pinceau stérile dans des boîtes de Pétri (10 larves/boîte) contenant une parcelle de diète (Hink et Byers, 1976). Cette diète artificielle se compose d'un mélange de substances chimiques et de produits naturels (Appendice, table 1). Cependant, à cause de ses propriétés anti-virales (Vail et al., 1968), le formol est remplacé par

l'hydrochlorure de tétracycline.

Les conditions d'élevage des larves telles la température, l'humidité et la photopériode sont les mêmes que celles pour l'incubation des oeufs.

Les jeunes larves du troisième stade sont transférées dans des petites fioles en verre pré-stérilisées contenant une parcelle de diète à raison de 2 à 3 larves par fiole. La diète est remplacée à toutes les semaines. La manipulation des larves s'effectue à l'aide de pinces désinfectées dans une solution composée d'acide acétique 5% dans l'éthanol 70%, tel que recommandée par Hink et Byers (1976).

II-1.1.2 Technique d'élevage de *Galleria mellonella* au laboratoire

II-1.1.2.1 Les larves

La souche de l'insecte *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) que nous utilisons provient du laboratoire de microbiologie de l'U.Q.T.R. (Québec).

L'élevage aseptique de cette larve est réalisée au moyen de chambres stérilisées à l'autoclave (Castle Steam Sterilizer, Sybron, Pointe-Claire, Québec) portées dans un incubateur (Fisher Isotemp Incubator, Senior Model) à une température de 30°C.

Les larves sont nourries au moyen d'un milieu nutritif composé des éléments suivants: miel pur (50 ml), glycérine (50 ml), pablum (165 g), farine de maïs (25 g) et levure de bière (5 g) (Beck, 1960). Avant usage, on stérilise à l'autoclave (10 minutes, 100 °C) ce milieu

nutritif une fois bien homogénéisé dans un plat en aluminium (Fosset et Chastang, 1963).

II-1.2 Préparation des suspensions virales

II-1.2.1 Le virus de la polyédrose cytoplasmique d'*E. scandens*

Le VPC d'*E. scandens* fut isolé en 1976 par Quiot et Belloncik à partir d'une population de larves d'*E. scandens*, Riley (Noctuidae, Agrotinae) à la ferme expérimentale de l'Assomption (Québec).

II-1.2.1.1. Infection des larves d'*E. messoria*

Pour la production du virus (VPC), les larves d'*E. messoria* du 3^e ou du 4^e stade larvaire sont maintenues en élevage individuel (1 larve par chambre pré-stérilisée).

L'inoculum viral (solution de 3×10^7 polyèdres/ml) en provenance du laboratoire de virologie de l'I.A.F. est déposé et séché à l'air sur une rondelle de laitue saine. En fait, 0.1 ml de cette suspension virale est appliqué sur chaque portion de laitue (0.2 cm de diamètre) produite au préalable à l'aide de l'extrémité d'une pipette Pasteur. Une seule portion de laitue contaminée par larve est utilisée. Lorsque la totalité de la laitue est mangée, soit au bout de 24 à 48 heures, on continue à nourrir les larves avec la diète synthétique (Appendice, table 1).

Un examen à l'état frais est effectué à partir des excréments d'une larve du septième stade infectée au VPC comme mesure de détection rapide des polyèdres intestinaux. Une fois cette constatation faite, on

congèle les larves infectées à -70°C jusqu'au moment de leur utilisation.

II-1.2.1.2 Purification grossière des particules virales du VPC d'E. scandens à partir de larves d'E. messoria

Les larves complètes d'E. messoria infectées sont sorties du congélateur et sont broyées dans un broyeur de tissus en verre borosilicaté Wheaton (Fisher Scientific Company, N.J., U.S.A.) à raison d'une larve par ml de milieu de Grace complet (Appendice, table 3). La préparation des suspensions de particules virales du VPC d'E. scandens est décrite au tableau 7. Plus précisément, les débris larvaires sont éliminés par filtration grossière sur huit couches de gaze de coton. Le filtrat est centrifugé à 6,000 RPM pendant 10 minutes (centrifugeuse Sorvall RC5-B, rotor SS-34).

Le surnageant renfermant les particules virales libres du VPC est dilué (1/4 V/V) dans du milieu de Grace stérile (Appendice, table 2) et est stérilisé par filtration sur membrane millipore $0.45\ \mu\text{m}$ (Millipore Corporation, Bedford, Mass., U.S.A.). Cette suspension de virus non-inclus est conservée à -70°C jusqu'au moment de leur utilisation. De même, les culots de polyèdres sont congelés à la même température jusqu'au moment de leur purification sur gradient de saccharose.

II-1.2.1.3. Purification des polyèdres du VPC d'E. scandens à partir de larves d'E. messoria

La purification des polyèdres est menée sur un gradient de densité de saccharose en employant des techniques modifiées proposées par Hayashi et Bird (1970) et Payne et Tinsley (1974).

Tableau 7

Purification des suspensions de particules virales
et des polyèdres cytoplasmiques
du VPC d'E. scandens

1 larve d'E. messoria infectée par le VPC d'E. scandens
et broyée dans 1 ml de milieu de Grace*



Broyat filtré à-travers huit épaisseurs de gaze de coton



Centrifugation à 4°C
6,000 RPM 10 minutes

Pool de surnageant (15 ml)
congelé à -70°C

Culots de polyèdres
congelés à -70°C



Purification des
particules virales
libres sur gradient
continu de saccha-
rose/tampon tris-HCl
0.05 M pH 7.0
(section II-1.2.1.5)

Microtitration des
particules virales
libres
(section II-1.2.1.6)

Purification des polyèdres
sur gradient de densité de
saccharose/tampon tris-HCl
0.05 M pH 7.0
(section II-1.2.1.3)

* milieu de Grace: milieu de préservation (Appendice, table 2) des virus
non-inclus contenus dans le surnageant.

Les culots de polyèdres décongelés sont traités d'abord avec une solution de SDS (sodium dodecyl sulfate) 0.1% dans le tampon tris-HCl 0.05 M pH 7.0 (Appendice, table 5a) pendant 60 minutes à 22°C. On procède par la suite à l'élimination du détergent (SDS) par trois centrifugations successives à 10,000 g de 10 minutes chacune (Sorvall RC5-B, rotor SS-34). A la fin de chaque centrifugation, les culots sont resuspendus dans le tampon tris-HCl. Pour cela, ils sont recouverts du tampon pour la nuit à 4°C et la suspension de polyèdres est homogénéisée au vortex, puis on procède à la centrifugation suivante. A la fin du cycle on dépose la suspension obtenue de la dernière centrifugation (4 ml/tube) sur un gradient discontinu de saccharose (6 ml de chaque concentration de 40-60-70% par tube) dans le tampon tris-HCl 0.05 M pH 7.0. On centrifuge ce gradient à 18,000 g pendant 45 minutes (Sorvall RC5-B, rotor SS-34) et on prélève les polyèdres à l'interface 60-70% du gradient de saccharose. Finalement, les polyèdres sont encore suspendus dans le même tampon tris-HCl avant de procéder à chacune des trois autres centrifugations menées à 10,000 g pendant 30 minutes chacune. Puis ces polyèdres sont congelés à -70°C. La purification de ces polyèdres est effectuée par le personnel du laboratoire de virologie de l'I.A.F. (Institut Armand-Frappier).

II-1.2.1.4 Dissolution des polyèdres cytoplasmiques pour l'obtention des particules virales du VPC d'E. scandens

Les polyèdres du VPC d'E. scandens isolés selon le procédé suivi au tableau 7 et purifiés selon la méthode décrite à la section II-1.2.1.3. sont soumis à une dégradation alcaline du type $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ (0.2 M) pH 10.8 d'une durée de 15 minutes. Une centrifugation subséquente permet de

séparer les protéines des polyèdres dissouts des particules virales libres de ce VPC. La purification de ces particules virales du VPC est effectuée aussi au laboratoire de virologie de l'I.A.F..

II-1.2.1.5 Purification des particules virales non-incluses du VPC d'E. scandens pour la production du sérum anti-virus

Les particules virales non-incluses du VPC d'E. scandens sont purifiées sur un gradient continu de saccharose tel que décrit dans la thèse de Maximilien Arella (1983) aux pages 43 et 44. Ces dernières particules virales sont éventuellement administrées à un lapin dans le but de produire un sérum anti-virus.

II-1.2.1.6 Dosage des suspensions virales du VPC d'E. scandens par une microméthode

La technique de microtitration des particules virales libres du VPC d'E. scandens chez la lignée cellulaire de L. dispar fut mise au point par Belloncik et Chagnon en 1980. Elle se base sur la détection des polyèdres cytoplasmiques dans les cellules infectées.

D'abord, on procède à l'ensemencement cellulaire de la lignée de L. d. sur une plaque de microtitration stérile de 96 puits (Falcon, Becton Dickinson Labware, Oxnard, U.S.A.) à raison de 150 μ l d'une suspension cellulaire de 2×10^5 cellules/ml par puits à l'aide d'une micropipette stérile. Au sujet du procédé de dénombrement cellulaire, voir la technique décrite à la section II-1.3.4. Puis la plaque proprement dite est incubée à 28°C pendant 24 heures. Par la suite, diverses

dilutions virales à partir de la solution-mère du VPC purifiée à la section II-1.2.1.2. sont ajoutées aux tapis cellulaires à raison de 25 μ l de solution virale par puits. Chaque dilution est ajoutée dans huit puits distincts. Suite à une incubation de la plaque à 28°C pendant 7 jours, on procède à l'observation des polyèdres cytoplasmiques des cellules infectées par un balayage au microscope inversé (Olympus Tokyo, modèle: 205-542, Carsen, Montréal) à 200 X. Un puits est considéré infecté si au moins une cellule de ce puits contient un polyèdre. Aussi les résultats microscopiques à partir de cette plaque de microtitration sont enregistrés pour chacune des dilutions virales. Le titre de l'inoculum viral est calculé selon la méthode de Karber (Karber, 1931) et est exprimé comme suit: $10^{X*} \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$ (tableau 8).

Le titre du surnageant du VPC d'E. scandens est de $10^{5.6} \text{ DICT}_{*50/\text{ml}}$ selon cette méthode de dosage. Cette suspension virale ainsi dosée sert à toutes nos séries d'expériences menées ultérieurement.

* $\text{DICT}_{50/\text{ml}}$: dose responsable de l'infection de 50% des cellules cultivées en culture de tissus.

Tableau 8

Méthode de dosage* des particules virales libres du VPC d'E. scandens
(exemple d'un dosage effectué au cours de notre travail expérimental)

Résultats microscopiques provenant d'une plaque
de microtitration incubée pendant 7 jours

Cellules-témoins	T	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	Dilutions virales
	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	
	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	
	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

8/8	8/8	8/8	6/8	6/8	4/8	4/8	2/8	2/8	0/8	0/8	Nombre des réponses positives à chaque dilution virale
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--

Tableau récapitulatif des résultats

	Log des dilutions virales du VPC	Nombre de réponses positives	Nombre des réponses positives Total des réponses positives (8)	Sommation du rapport des réponses positives (S)
	- 9	0	0/8 = 0.00	
	- 8	2	2/8 = 0.25	
	- 7	2	2/8 = 0.25	
	- 6	4	4/8 = 0.50	
	- 5	4	4/8 = 0.50	
	- 4	6	6/8 = 0.75	
	- 3	6	6/8 = 0.75	
Dilution logarithmique la plus concentrée en VPC (m)	- 2	8	8/8 = 1.00	4.0

Δ = Différence entre les dilutions logarithmiques successives = 1.0

Selon Kärber**, la dose infectieuse (DI) de 50% des cellules est:

$$\begin{aligned}\log DI_{50} &= m - \Delta (S - 0.5) \\ &= -2 - (1.0) (4.0 - 0.5) \\ &= -2 - 3.5\end{aligned}$$

$$\log DI_{50} = -5.5, \text{ donc } DI_{50} = 10^{-5.5}$$

N.B. : Un puits (+) est caractérisé par la présence d'une cellule du champ total contenant au moins un polyèdre cytoplasmique. Un puits (-) ne renferme que des cellules saines identiques aux cellules-témoins.

* Méthode de dosage mise au point par Belloncik et Chagnon (1980).

** Kärber, 1931.

II-1.2.2 Le virus iridescent cytoplasmique (CIV type 6) de Chilo suppressalis

L'iridovirus type 6 (CIV) fut isolé au Japon par Fukaya et Nasu (1966) à partir de larves du lépidoptère Chilo suppressalis (Walker), insecte s'attaquant à la tige du riz.

II-1.2.2.1 Infection des larves de Galleria mellonella

Pour les inoculations avec le CIV, les larves de G. mellonella du 3^e et 4^e stades larvaires sont retirées du milieu nutritif décrit à la section II-1.1.2.1.

L'injection du CIV est faite aseptiquement dans la cavité viscérale par voie intra-péritonéale à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml (Plastipak, Fisher Scientific Company, N.J., U.S.A.) équipée d'une aiguille hypodermique de 0.46 mm de diamètre (Becton, Dickinson and Co., Mississauga, Ontario, Canada). Cette seringue permet d'introduire de façon précise dans la cavité viscérale 0.01 ml de la suspension virale en CIV (60 ug de particules virales). Cette suspension est préalablement stérilisée par filtration sur Millipore de 0.45 um dans du milieu de culture de Grace (Appendice, table 2). En fait, ce milieu de culture empêche l'agrégation des particules virales du CIV sur le filtre Millipore (Millipore Corporation, Bedford, Mass., U.S.A.) (Devauchelle, communication personnelle). Après l'injection de la suspension virale du CIV aux larves, ces dernières sont déposées en lots dans des flacons de verre aérés (1 larve/cm³ d'air) renfermant du milieu nutritif (section II-1.1.2.1.). Ces flacons sont ensuite placés dans un incubateur (Fisher

Isotemp® Incubator, Senior Model) à 30°C. Après une période de 10 à 12 jours post-infection, les larves d'un aspect bleuté correspondant à la multiplication du CIV sont congelées à -70°C avant de procéder à l'extraction de ce CIV type 6.

II-1.2.2.2 Purification des particules virales du CIV à partir de larves de *Galleria mellonella*

Les techniques d'extraction et de purification du CIV type 6 employées sont celles de Kelly et Tinsley (1972).

A partir de larves infectées et décongelées, on procède au broyage de ces dernières à raison d'une larve par 10 ml de tampon phosphate 0.005 M pH 7.0 (Appendice, table 6). La molarité de ce tampon est faible due à la fragilité du virus dans les sels (M. Cerutti, 1978). Par la suite, le broyat est filtré sur huit épaisseurs de gaze de coton pour éliminer les débris de tissus larvaires. Le filtrat est soumis à deux cycles de centrifugation à basse et à haute vitesses de la façon suivante:

o Cycle à basse vitesse (IEC Clinical Centrifuge, Damon/IEC

Division, modèle 428-10915, Mass., U.S.A.):

- On procède à la centrifugation du filtrat à 4,000 RPM pendant 10 minutes de façon à faire sédimenter les gros débris larvaires au fond du tube.

o Cycle à haute vitesse (Centrifugeuse Sorvall RC5-B, rotor SS-34):

- On procède à la centrifugation du surnageant récupéré au cycle précédent à 14,000 RPM pendant 30 minutes à 4°C.
- On conserve les culots bleutés; ces derniers sont recouverts de tampon phosphate 0.005 M pH 7.0 (tampon-CIV) pour la nuit à 4°C à raison de 5 ml/culot.

Dans un second temps, on procède le lendemain matin à la recentrifugation des culots suspendus dans le tampon-CIV et conservés à 4°C. Au cours de cette deuxième étape de purification virale, on ajoute un certain volume de tampon-CIV à chacun des tubes (1 culot/tube) de façon à ce que le volume total par tube soit identique à celui employé au cours des premiers cycles de centrifugation menés la veille. A ce niveau, les culots réfrigérés sont resuspendus dans le tampon-CIV (40 ml/culot) par le procédé d'homogénéisation sur vortex. Les suspensions virales obtenues sont soumises aux mêmes cycles (deux) de centrifugation cités ci-haut. A partir des culots dissouts dans le même tampon (5 ml/culot), on forme un pool d'une même suspension virale en CIV. Cette dernière est déposée sur gradient discontinu de sucrose de 20-40-60% en tant que dernière étape de purification du CIV. Pour chacune de ces solutions le sucrose est dissout dans le tampon-CIV. Plus précisément, 10 ml de chacune de ces solutions est introduit dans un tube à centrifugation en polycarbonate (Ingraham Bell, Wilmington, Delaware, U.S.A.). On dépose 3 ml de la suspension virale en CIV à purifier (i.e. 10% du volume total des solutions de sucrose) par gradient discontinu avant de procéder à la centrifugation à

15,000 RPM de 1 heure (Sorvall RC5-B, rotor SS-34). Par la suite on prélève la bande virale à l'interface 40-60% des couches de sucrose. Il faut surtout éviter à cette étape d'entraîner du matériel indésirable des autres bandes. Par la suite on procède à la dialyse de l'échantillon viral du CIV purifié contre le tampon-CIV (Appendice, table 6). Le volume final du matériel après dialyse sera de 40 ml.

II-1.2.2.3 Dosage des particules virales du CIV par densitométrie

Le CIV fut quantifié par spectrophotométrie en termes d'unités de densité optique (UDO) à 280 nm tel que suggéré par Monnier et Devauchelle en 1976. Selon ce critère, il est établi que 1 UDO₂₈₀ (trajet optique de 1 cm) donne 60 ug de particules virales ou de protéines par ml. En tant que valeur de dose infectieuse, 1 UDO₂₈₀ correspond à $10^{4.4}$ GIHID_{*50/ml} selon Charpentier et al., 1983.

La valeur de la densité optique du matériel de CIV dialysé (section aI-1.2.2.2.) est de 1.11 UDO₂₈₀ tel que lu sur spectrophotomètre à u.v.-visible, double faisceau (Pye Unicam SP-8-100, Angleterre). Le volume total de cet échantillon viral dialysé (40 ml) est centrifugé sur Sorvall à 15,000 g pendant 1 heure de façon à enlever le tampon-CIV. Le

* GIHID_{50/ml}: dose responsable de l'infection de 50% des frottis d'hémolymphe de larves de G. mellonella.

culot très concentré en particules virales de CIV est suspendu dans 2 ml de milieu de C.f. complet (Appendice, table 4). En agissant de la sorte, on concentre la suspension virale du CIV de 20 fois ramenant le titre viral à 22.2 UDO₂₈₀. On procède par la suite à de faibles dilutions de cette suspension virale-mère dans le milieu de C.f. complet (Appendice, table 4) avant de les filtrer sur millipore 0.45 µm. Les diverses suspensions virales filtrées sont congelées à -70°C avant usage, et sont utilisées ultérieurement lors des infections multiples du type VPC-CIV chez la lignée cellulaire de Choristoneura fumiferana menées sur microplaque.

II-1.3 Maintien des lignées cellulaires d'insectes cultivées in vitro

Les lignées cellulaires de lépidoptères utilisées sont décrites au tableau 9. D'abord, la lignée cellulaire (SCLD-135) établie à partir du lépidoptère L. dispar (Quiot, 1976) est maintenue dans le milieu de Grace (Grace, 1962b) (Appendice, table 2) additionné de sérum de veau foetal (Gibco, Grand Island, N.Y., U.S.A.) à une concentration de 20% (milieu de Grace complet: Appendice, table 3) et d'antibiotiques.

La lignée cellulaire (IAF Es-1) en provenance d'ovaires de chrysalides du lépidoptère E. scandens (Belloncik et al., 1982a) est aussi entretenue dans le milieu de Grace complet.

Puis, la lignée cellulaire d'insecte Choristoneura fumiferana (IPR1 Cf-124: Sohi, 1968) cultivée aussi in vitro estensemencée dans le milieu de C.f. complet (Appendice, table 4).

Tableau 9

Lignées cellulaires de lépidoptères utilisées
au cours du présent travail

<u>Lignées cellulaires</u> <u>de</u> <u>lépidoptères</u>	<u>Désignation</u>	<u>Morphologie</u> <u>et</u> <u>Provenance</u>	<u>Milieu de culture</u> <u>et</u> <u>Température</u> <u>d'ensemencement</u>	<u>Références</u>
<u>Lymantria dispar</u>	SCLD-135	Rondes: ovaires	Grace complet à 28°C	Quiot, 1976
<u>Euxoa scandens</u>	IAF.Es-1	Rondes: ovaires de chrysalides	Grace complet à 28°C	Belloncik et al., 1982a
<u>Choristoneura fumiferana</u>	IPR1.Cf-124	Allongées (fibroblastiques) de larves de <u>C.f.</u>	<u>C.f.</u> complet à 28°C	Sohi, 1968

Ces trois lignées cellulaires d'insectes sont soient entretenues dans des boîtes de culture de 25 cm² (Corning, N.Y., U.S.A.), soient ensemencées en tubes Leighton (Canlab, Mont-Royal, Montréal) ou sur microplaque (Falcon, Becton Dickinson Labware, Oxnard, U.S.A.) sous une hotte stérile à flot lamellaire (Envirco: Subsidiary of Bio-Dynamics Inc., Albuquerque, New Mexico, modèle 10276) et ce, dépendamment du type d'expérimentation visé. Ces cultures cellulaires servant de cellules-hôtes du VPC d'E. scandens dans l'étude du mécanisme de la répllication de ce virus sont cultivées à 28°C dans un incubateur (National Weinicke Company, Portland, Oregon).

II-1.3.1 Ensemencement en boîte de culture

Ce type d'ensemencement permet d'entretenir et de maintenir en vie une lignée cellulaire quelconque cultivée in vitro. En fait, à partir d'une boîte de culture-mère stérile (fiolle Corning, 25 cm²) où les cellules forment un tapis cellulaire confluent suite à un examen au microscope inversé (Olympus Tokyo, modèle 205542, Carsen, Montréal), on exécute une technique de repiquage sous la hotte stérile. Cela afin de permettre la multiplication des cellules-filles dans d'autres boîtes stériles. En premier lieu, il s'agit de brasser délicatement la boîte de culture-mère de façon à suspendre les cellules dans le milieu de culture. Puis, à l'aide d'une pipette stérile (Corning, N.Y., U.S.A.) on y prélève un volume de 5 ml de cellules en suspension de façon à déposer 1 ml de cette dernière dans quatre autres boîtes de culture-filles stériles. A chacune de ces dernières, on ajoute 4 ml de milieu de culture complet (milieu de Grace ou milieu de C.f.) respectif à chaque lignée cellulaire

pour obtenir un volume total de 5 ml par boîte. Il s'agit par la suite de brasser délicatement ces boîtes fraîchement ensemencées pour avoir un mélange homogène des cellules cultivées dans le milieu de culture. Elles sont par la suite incubées à 28°C (température optimale de croissance des trois lignées cellulaires d'insectes citées à la section II-1.3).

II-1.3.2 Ensemencement en tubes Leighton

La technique d'ensemencement utilisée pour la culture en tubes Leighton permet surtout de déterminer les meilleures conditions d'infection virale du VPC d'E. scandens sur les lignées (E. scandens et L. dispar) et celles de la fixation cellulaire dans les essais préliminaires.

Au laboratoire, on dispose de tubes Leighton (Canlab, Mont-Royal, Montréal) réutilisables. Une lamelle (Wheaton Scientific, Millville, N.J., U.S.A.) dégraissée à l'acétone sur laquelle se fixeront les cellules ensemencées est mise dans chaque tube avant de procéder à la stérilisation à l'autoclave (20 minutes à 121°C) de ces tubes.

A partir d'une boîte de culture fraîchement divisée de 24 heures, on décroche le tapis cellulaire en grattant à l'aide d'un rateau stérile les cellules accrochées au fond de la boîte. Une fois les cellules remises en suspension dans le milieu de culture, on procède par la suite au dénombrement des cellules viables (section II-1.3.4) et à une dilution subséquente de ces dernières dans du milieu de culture adéquat afin d'obtenir une concentration cellulaire de 6×10^5 cellules/ml. Puis, on y prélève 5 ml de cette suspension cellulaire avec une pipette stérile de façon à transférer 0.5 ml de cette dernière suspension (6×10^5 cellu-

les/ml) dans 10 tubes Leighton stériles distinctement. Pour chacun des tubes on complète par la suite à 2 ml avec du milieu de culture complet. Aussi avant d'insérer ces tubes sur un support spécial, on s'assure que les lamelles soient bien déposées à plat au fond de tous les tubes. Cela afin que les cellules en suspension s'y accrochent uniformément. On porte finalement le support des tubes dans un incubateur (National Weinicke Company) à 28°C (température optimale de croissance des trois lignées cellulaires citées à la section II-1.3).

II-1.3.3 Ensemencement sur microplaque

La technique d'ensemencement sur microplaque permet de procéder à des études quantitatives et qualitatives menées sur certains systèmes cellulaires-virus tels E. scandens-VPC, L. dispar-VPC, C. fumiferana-VPC, C. fumiferana-CIV, et C. fumiferana-VPC-CIV.

A partir d'une boîte de culture fraîchement divisée de 24 heures, on décroche le tapis cellulaire en grattant à l'aide d'un rateau stérile les cellules au fond de cette boîte. Puis, on procède au dénombrement de ces cellules viables (section II-1.3.4) remises en suspension et on dilue cette dernière suspension dénombrée avec du milieu de culture stérile frais de façon à obtenir une concentration cellulaire de 2×10^5 cellules/ml. On procède par la suite à l'ensemencement cellulaire d'une lignée sur microplaque à raison de 175 µl de la suspension cellulaire par puits à l'aide d'une micropipette autoclavable (Flow Laboratories, Miss., Ontario). Finalement, on dépose ces microplaques ensemencées dans un incubateur à 28°C pour permettre la croissance rapide des trois lignées

cellulaires cultivées in vitro.

II-1.3.4 Dénombrement des cellules viables cultivées in vitro

A partir d'une lignée cellulaire cultivée en boîte de culture Corning (25 cm²) et fraîchement divisée de 24 heures, on remet en suspension les cellules accrochées au fond de la boîte en les décrochant à l'aide d'un rateau stérile. On prend soin de brasser délicatement cette boîte pour distribuer également toutes les cellules dans le milieu. Et on procède à une série d'aspirations successives avec une pipette stérile de manière à obtenir une suspension cellulaire homogène.

La technique de dénombrement des cellules viables s'effectue comme suit: à une partie de la suspension homogène produite ci-haut, on ajoute deux parties de colorant de violet de crystal 0.1% (1/3 V/V) (Appendice, table 7).

Ce mélange s'observe au microscope optique (Wild of Canada Limited, modèle M20-62366, Ottawa, Ontario) à 100 X dans un hémacytomètre (American Optical Company, Buffalo, N.Y., U.S.A.). Les cellules vivantes sont colorées en violet et leur nombre par ml est donné selon la formule suivante:

$$\text{Nombre de cellules/ml} = M \times \text{facteur de dilution} \times V$$

$$M = N/4$$

N = total des cellules logées dans les 4 grands carrés de l'hémacytomètre.

$$\text{facteur de dilution} = 3$$

V = volume d'un grand carré fait
1/10,000 de ml.

Nombre de cellules/ml	=	N/4 X 3 X 1/1/10,000
" " " " "	=	N/4 X 3 X 10,000
" " " " "	=	N/4 X 30,000

II-1.4 Infection virale chez les lignées cellulaires d'insectes cultivées in vitro en microscopie optique

Quel que soit le type d'ensemencement cellulaire, on procède à l'infection virale des cellules jeunes de 24 heures cultivées à 28°C. Ce laps de temps est nécessaire pour permettre aux cellules de former un tapis cellulaire au fond du récipient stérile (puits d'une microplaque) ou sur un support stérile amovible (lamelle d'un tube Leighton). Les expériences portant sur l'infection virale au VPC de certaines lignées cellulaires d'insectes (L.d.; E.s.; C.f.) sont soumises toutes à des essais contrôlés impliquant des systèmes cellulaires non-infectés (cellules-témoins).

II-1.4.1 En tubes Leighton

Lors de l'infection des cultures cellulaires (E.s. et L.d.) préalablement ensemencées (section II-1.3.2), on vide le contenu des tubes. Ensuite, on ajoute 0.1 ml de la suspension virale de VPC d'E. scandens ($10^{5.6}$ DICT₅₀/ml) dans chaque tube Leighton. On laisse le virus (VPC) en contact avec les cellules pendant une période de 2 heures à 28°C. Après cela, on vide de façon stérile le contenu des tubes et on

ajoute à chacun 2 ml de milieu de culture de Grace complet. On réincube ces mêmes tubes à 28°C pour laisser se continuer la multiplication virale du VPC chez les lignées d'E. scandens et de L. dispar.

Ce type d'infection virale mené en tubes Leighton suscite une observation étroite en microscopie optique à l'aide d'un microscope inversé (Wild of Canada Limited, modèle M20-62366, Ottawa, Ontario) à 450 X.

Il est à noter que le temps d'infection débute au moment de la mise en contact du virus avec les cellules quel que soit le type d'ensemencement cellulaire impliqué.

II-1.4.2. Sur microplaque

Les cellules cultivées sur un tel système sont facilement observables aussi au microscope inversé (Wild of Canada Limited) mais à 200 X. Suite à l'ensemencement cellulaire sur microplaque décrit à la section II-1.3.3., on ajoute 25 µl d'une suspension virale (VPC ou CIV) testée à chacun des puits de cellules jeunes de 24 heures. La période d'infection commence au moment de la mise en contact du virus (VPC et/ou CIV) avec les cellules (E.s.; L.d.; C.f.). Suite à la procédure d'infection virale, les microplaques sont incubées à 28°C avant le procédé de fixation cellulaire proprement dit.

II-1.5. Fixation des cellules de lignées cellulaires d'insectes cultivées in vitro en microscopie optique

Le procédé de fixation des cellules (témoins ou infectées) varie

selon le type de système cellulaire-virus impliqué et selon le mode d'ensemencement appliqué au cours de l'expérimentation.

Le processus de fixation proprement dit est un procédé physico-chimique qui préserve l'intégrité de la structure et des propriétés biochimiques de la cellule. L'emploi d'un fixateur donné ou d'un mélange de fixateurs (méthanol et/ou acétone; paraformaldéhyde; glutéraldéhyde; etc...) permet donc de maintenir dans un état de conservation les structures (cellulaires, virales) et les antigènes impliqués.

Aussi, le type de fixateur utilisé, la concentration et la température de ce dernier et le temps de fixation choisis sont autant de paramètres à déterminer au cours des essais préliminaires et sont fonctions du complexe cellule-antigène impliqué.

II-1.5.1 En tubes Leighton

A divers temps après infection, on procède à la fixation proprement dite. On retire la lamelle du tube à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée à une extrémité. Elle est ensuite déposée dans un récipient dans lequel on ajoute un certain volume de fixateur de façon à recouvrir la lamelle.

Ici, on teste l'effet de 2 fixateurs distincts sur la préservation des antigènes viraux soit l'acétone à -20°C pendant 2 minutes, soit la paraformaldéhyde 0.5% (Appendice, table 8a) à 21°C pendant 10 minutes. Suite au procédé de fixation à la paraformaldéhyde, on effectue un lavage des cellules: 2 bains consécutifs de 30 minutes chacun avec du tampon

phosphate de sodium 0.1 M pH 7.4 (Appendice, table 9a).

Lorsque les cellules sont fixées sur les lamelles respectives à chaque lignée, on laisse ces lamelles s'assécher à l'air avant de les déposer dans des récipients bien identifiés et conservés à la température de la pièce.

II-1.5.2 Sur microplaque

D'abord, on retire le milieu de culture des puits prêts à fixer à l'aide d'une pipette Pasteur sous la hotte à flot lamellaire stérile. On laisse intact les autres puits (sains et infectés) de la même microplaque qui sont encore en cours d'expérimentation.

La fixation des cellules qui tapissent le fond des puits d'une microplaque est effectuée en se servant d'un fixateur "paraformaldéhyde" à 0.5% ou 1% (Appendice, table 8) appliqué pendant 10 minutes à 21°C. On retire par la suite ce fixateur à l'aide d'une pipette Pasteur. Chaque puits fixé est soumis à une série de lavages constituée de 2 bains de 30 minutes chacun avec du tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 7.4 (Appendice, table 9a) afin d'enlever toute trace de fixateur.

Au préalable on a testé l'effet de certains autres fixateurs tels l'acétone et le méthanol. L'acétone s'avère un agent chimique destructif de la matière plastique (polystyrène) d'une microplaque en dissolvant ce matériel. Par contre le méthanol entraîne la formation de précipités indésirables de protéines lors de la fixation.

Finalement on a opté pour la paraformaldéhyde suite aux premiers résultats obtenus et aux travaux de Singer (1974) et de Charpentier et al. (1982).

II-1.5.3 Conclusion suite au procédé de fixation

Une fois que les cellules (témoins ou infectées) sont fixées au fond d'un récipient (puits d'une microplaque) ou sur un support amovible (lamelle d'un tube Leighton), elles sont en mesure de se conserver longtemps sans perdre leur caractère physique (forme; organites intracytoplasmiques ou intranucléaires; nombre de cellules; etc...) et leur antigénicité. Sur le matériel fixé, on applique une méthode de détection immunologique (immunoperoxydase) afin d'étudier le mécanisme de la réplication du VPC d'E. scandens.

On procède aussi à la coloration histologique (section II-2.0) sur le matériel fixé en tubes Leighton et sur microplaque afin de mettre en évidence les corps d'inclusions protéiniques de ce VPC.

II-1.6 Effet de la concentration virale du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires d'E. scandens et de L. dispar en microscopie optique

L'effet de la concentration virale du VPC d'E. scandens est testé chez les lignées d'E. scandens et de L. dispar ensemencées sur microplaque (section II-1.3.3).

Plus précisément, les diverses doses virales employées ($10^{4.7}$ DICT_{50/ml}; $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}; $10^{3.7}$ DICT_{50/ml}; $10^{2.7}$ DICT_{50/ml}; $10^{0.7}$ DICT_{50/ml}) sont produites suite à des dilutions de l'inoculum viral-stock ($10^{5.6}$ DICT_{50/ml}: section II-1.2.1.6) avec du milieu de Grace complet (Appendice, table 3).

Les processus d'infection virale et de fixation des cellules sur microplaque sont décrits aux sections II-1.4.2 et II-1.5.2 respectivement.

II-1.7 Effet de la température d'incubation (agent physique) sur le mécanisme de la réplication du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires d'E. scandens et de L. dispar en microscopie optique

On étudie l'effet de la température d'incubation variée (10°C; 18°C; 28°C; 32°C; 37°C) sur la transcription du VPC d'E. scandens chez les lignées d'E. scandens et de L. dispar.

D'abord, les cellules sont ensemencées sur microplaque et cultivées à 28°C pendant 24 heures avant d'être infectées avec une même concentration de VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}). Une fois les cellules infectées, les microplaques sont incubées aux diverses températures citées ci-haut pendant l'infection.

La méthode de fixation des cellules sur microplaque est celle décrite à la section II-1.5.2.

II-1.8 Inhibition à la cordycépine (agent chimique) de la synthèse des antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires d'E. scandens et de L. dispar en microscopie optique.

Les procédures d'inhibition de la synthèse des antigènes viraux du VPC d'E. scandens avec la cordycépine (Sigma, St-Louis, U.S.A.) sont effectuées sur les cellules d'insectes d'E. scandens et de L. dispar, et sont menées sur microplaque.

La méthode d'ensemencement cellulaire et celle d'infection

virale employées sont décrites aux sections II-1.3.3 et II-1.4.2. respectivement.

A ce niveau, on mesure l'effet de la concentration variée en cordycépine (3'-déoxyadénosine) (0.10 µg/ml; 0.20 µg/ml; 0.40 µg/ml) sur la synthèse des antigènes viraux d'une même dose virale du VPC d'E. scandens ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}) pour une période d'adsorption virale d'une heure sans cordycépine. On obtient les 3 concentrations finales en cordycépine sur microplaque suite à des dilutions effectuées à partir d'une solution-mère en cordycépine de 100 µg/ml.

De plus, en vue de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de la cordycépine sur le VPC d'E. scandens, on mesure aussi l'effet d'une période post-infection variée (1 heure; 2 heures; 6 heures; 10 heures; 18 heures) sans cordycépine chez les mêmes lignées cellulaires citées ci-haut soumises à une même concentration de VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}), et lorsqu'on applique après ces divers temps post-infection une même concentration de cordycépine (0.20 µg/ml).

Comme mesure de contrôle, pour les cellules-témoins on remplace la suspension virale (VPC) et la solution de l'inhibiteur (cordycépine) par du milieu de Grace complet (Appendice, table 3). Et on teste en plus l'effet seul du VPC d'E. scandens sans cordycépine pour tous les temps de contact testés. Comme autre mesure de contrôle, l'effet seul de la cordycépine est mesuré aussi.

La méthode de fixation employée est celle décrite à la section II-1.5.2..

II-1.9 Infection mixte du type VPC-CIV chez la lignée cellulaire de *C. fumiferana* en microscopie optique

En ce qui a trait au procédé d'infection virale proprement dit sur microplaque, pour chaque puits à infecter on ajoute 25 µl de la suspension virale du VPC d'*E. scandens* et 25 µl de la suspension virale du CIV de *Chilo suppressalis*. A ce propos, on mesure l'effet de la concentration virale variée en CIV (0.05 UDO; 0.10 UDO; 0.50 UDO) pour une même dose de VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}).

On obtient ces 3 doses virales (finales) du CIV sur microplaque suite à des dilutions effectuées à partir d'une suspension virale-stock du CIV de 22.2 UDO (section II-1.2.2.3) avec du milieu de *C.f.* complet (Appendice, table 4).

Pour les cellules-témoins et pour les cellules infectées par un seul des deux virus, on remplace la ou les suspension(s) virale(s) (CIV et/ou VPC) par du milieu de culture *C.f.* complet.

La méthode de fixation employée sur microplaque est celle décrite à la section II-1.5.2..

II-2.0 Coloration histologique employée pour la différenciation des corps d'inclusions protéiniques du VPC d'*E. scandens*

La coloration au bleu de méthylène (Sigma Chemical Cie., St-Louis, U.S.A.) à 1% nous permet d'observer les polyèdres cytoplasmiques du VPC d'*E. scandens* dans les lignées cellulaires d'*E. scandens*, de *L. dispar* et de *C. fumiferana* cultivées et infectées in vitro.

Dans les puits d'une microplaque ou sur les lamelles de tubes Leighton, on procède à la coloration histologique avec le bleu de méthylène 1% (2 minutes, 21°C) des cellules fixées. Par la suite, on enlève le surplus de colorant avec de l'eau distillée.

II-2. Méthodes de détection immunologique des antigènes du VPC d'E. scandens

II-2.1 Production d'immunsérums contre le VPC d'E. scandens

Les immunsérums dirigés contre les antigènes du VPC d'E. scandens sont produits par inoculation sous-cutanée à des lapins. La réponse immunitaire est favorisée par addition d'adjuvant complet de Freund (Difco Laboratories, Détroit, Michigan, U.S.A.).

En fait, le lapin reçoit par voie sous-cutanée en 15 points d'injection dans la région dorsale rasée 4 ml d'une émulsion composée de volumes égaux de suspension virale (section II-2.1.1) et d'adjuvant complet de Freund. Cette émulsion est administrée au lapin à l'aide d'une seringue de 10 ml munie d'une aiguille de 0.64 mm de diamètre. Ce processus est effectué 3 fois à raison d'une fois tous les 15 jours.

On laisse passer un délai de 2 semaines avant d'effectuer la première ponction cardiaque sur le lapin afin de déterminer le taux en anticorps (ab). Si le titre en ab, déterminé par la technique d'Ouchterlony, est bas, on effectue des injections de rappel par voie intra-veineuse au niveau de l'oreille du lapin à raison de 2 ml de la même suspension virale sans adjuvant. On procède par la suite à une ponction cardiaque au bout d'une semaine.

II-2.1.1 Types d'immunsérums contre le VPC d'E. scandens

II-2.1.1.1 Sérum anti-intestin de larves d'E. scandens infectées

Une suspension virale produite suite au broyage d'un intestin de

larve d'E. scandens infectée avec le VPC dans 1 ml de milieu de Grace complet (Appendice, table 3) est inoculée à un lapin selon le procédé décrit à la section II-2.1 .

L'immunsérum produit est constitué d'une gamme d'immunoglobulines dirigées contre divers antigènes tels les antigènes associés aux larves, les antigènes des capsides virales du VPC, les protéines virales non-structurales c'est-à-dire les protéines nécessaires à la multiplication du virus et les protéines des polyèdres du VPC proprement dit.

II-2.1.1.2 Sérum anti-virus

Une suspension de particules virales libres du VPC d'E. scandens est produite suite au processus de purification de ces particules virales tel que décrit dans la thèse de Maximilien Arella (1983) (section II-1.2.1.5). Une portion de cette suspension filtrée est inoculée au lapin de la manière énoncée à la section II-2.1 . Le sérum prélevé est constitué d'immunoglobulines, entre autres les immunoglobulines G (IgGs) anti-particules virales libres du VPC d'E.s. .

II-2.1.1.3 Sérum anti-polyèdre complet

La suspension virale à injecter nécessaire à la production d'un sérum anti-polyèdre complet provient de la suspension de culots de polyèdres du VPC d'E. scandens isolée (section II-1.2.1.2) et purifiée selon la méthode décrite en II-1.2.1.3 .

II-2.1.1.4 Sérum anti-polyèdre dissout

Les culots de polyèdres du VPC d'E. scandens isolés à la section II-1.2.1.2 et purifiés selon la méthode décrite en II-1.2.1.3 sont soumis à une dégradation alcaline à l'aide de $\text{NaHCO}_3 - \text{Na}_2\text{CO}_3$ (0.2 M) pH 10.8 d'une durée de 15 minutes. Une centrifugation subséquente permet de séparer les protéines des polyèdres dissouts des particules virales libres de ce VPC. Puis cette suspension virale constituée de protéines de polyèdres dissouts du VPC d'E. scandens est injectée à un lapin (section II-2.1) pour produire un sérum riche en ab dirigés contre les ag protéiniques de ces polyèdres dissouts.

II-2.1.1.5 Sérum de chèvre anti-immunoglobulines de lapin

Un sérum de chèvre riche en immunoglobulines (sérum commercialisé par Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada) est chromatographié sur une colonne de Séphadex G-150 pour obtenir un sérum pur en immunoglobulines G (IgGs) anti-immunoglobulines de lapin.

II-2.1.2 Préparation des immunsérums contre le VPC d'E. scandens

Pour tout type d'immunsérum produit chez le lapin, on prélève le sang de cet animal par ponction cardiaque à raison de 20 à 50 ml par lapin et ce, à l'aide d'une seringue de 50 ml munie d'une aiguille de 0.64 mm de diamètre. On laisse coaguler le sang à la température de la pièce pendant 1 heure. Puis pour faciliter une meilleure exsudation du sérum, on détache de la paroi du tube le caillot en formation à l'aide d'une pipette Pasteur avant de déposer le tout à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, le

sérum décanté est centrifugé à 3,000 RPM durant 20 minutes afin d'éliminer les globules rouges restants. Par la suite, on filtre le sérum sur millipore 0.45 um avant de le congeler à -70°C . Tout sérum préparé de la sorte est prêt à être chromatographié sur colonne (section II-2.2.1) afin de purifier les IgGs.

II-2.2 Purification des anticorps spécifiques aux antigènes du VPC d'E. scandens

Les divers sérums prélevés de lapins (section II-2.1.1) et même le sérum de chèvre commercial anti-Igs de lapin (Cedarlane Labo. Ltd) sont chromatographiés sur colonne G-150 afin de purifier les IgGs. En fait, le passage de ces sérums sur le gel de Séphadex G-150 permet de séparer les diverses protéines sériques (IgA, IgM, albumine, hémoglobine, etc...) des IgGs.

La séparation de ces divers constituants protéiniques du sérum repose sur la forme et le poids moléculaire des diverses molécules au cours d'un tel procédé chromatographique d'exclusion sur gel.

II-2.2.1 Chromatographie d'exclusion sur gel

Le gel de Séphadex G-150 (molécules de dextran modifiées) (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) est mis à gonfler pendant 5 jours à 21°C à raison de 10 g de gel par 400 ml de tampon phosphate de sodium 0.05 M pH 6.9 additionné de 0.1 M de NaCl (Appendice, table 9b). Pendant ce temps, on monte une colonne à chromatographie de 40 cm de haut par 2.5 cm de diamètre (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden)

laquelle est placée à 4°C. Puis on remplit la colonne avec ce gel dégazéifié. On dégazéifie afin d'éviter l'apparition de bulles d'air dans le gel à 4°C.

Une fois le gel bien tassé, on applique 2.5 ml d'un sérum donné (sections II-2.1.1 et II-2.1.2) au bas de la colonne de façon à ce que les protéines sériques soient entraînées dans une chromatographie ascendante sur cette colonne de Séphadex G-150 (volume en gel de 200 ml).

Les fractions sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions (Fraction Collector Frac-100, Pharmacia Fine Chemicals) selon un débit d'un ml aux 15 minutes.

II-2.2.2 Evaluation de la pureté des immunoglobulines G

On lit l'absorbance de chaque fraction au spectrophotomètre u.v.-visible (Pye Unicam, SP-8-100, Angleterre) aux longueurs d'onde suivantes: à 278 nm (absorption maximale des IgGs) et à 251 nm (absorption minimale des IgGs) (Kurstak et al., 1977).

On conserve les fractions dont le rapport 278/251 s'échelonne de 2.5 à 3.0 (rapport d'absorption des IgGs). Les autres protéines sériques indésirables ont un rapport d'absorption 278/251 de 1.0 à 1.5. Aussi, les fractions constituées d'IgGs pures sont dialysées à 4°C avec du tampon carbonate de Na 0.01 M pH 9.5 (Appendice, table 11) avant de procéder au couplage de ces IgGs avec la peroxydase (Sigma Chemical Company, St-Louis, U.S.A.).

II-2.2.3 Calcul de la concentration sérique en immunoglobulines G

Le calcul de la concentration moyenne des IgGs purs s'effectue selon l'équation suivante:

Somme des D.O.* à 278 nm dont le R** est de 2.5 à 3.0

[] moyenne des
IgGs₂₇₈ (mg/ml)=
(avant dialyse)

Volume total (ml) des fractions dosées
à 278 nm (avant dialyse)

1 cm X 1.5 D.O./mg IgGs***

La loi de Beer-Lambert donne l'équation suivante:

Absorption=densité optique=extinction= .C.d.

ϵ = coefficient d'extinction moléculaire (varie avec le λ)

[] ou C= concentration des IgGs

d= distance parcourue par la lumière dans la solution

C= D.O. mesuré à 278 nm = 1.5 D.O.

 ϵ .d.

mg IgGs

Par contre le calcul de la concentration totale des IgGs purs s'effectue comme suit:

[] totale des IgGs ₂₇₈ (mg/ml) (après dialyse)	=	[] moyenne des IgGs ₂₇₈ (mg/ml)	X	Volume (ml) des fractions d'IgGs pures non-dialysées ----- Volume (ml) des fractions d'IgGs pures dialysées
--	---	---	---	---

* D.O.: densité optique.

** R : rapport des absorbances 278/251 pour une fraction donnée.

*** : La concentration des IgGs est estimée par le coefficient d'extinction (Williams et chase, 1967).

Un exemple de calcul des valeurs de concentrations (moyenne et totale) des IgGs purifiées (avant et après dialyse) du sérum anti-virus est cité en Annexe 1.

II-2.3 Conjugaison des immunoglobulines G (purifiées) à la peroxydase (HRPO)

La méthode de conjugaison utilisée est celle de Nakane et Kawaoi (1974) (section I-6.1).

II-2.3.1 Les diverses étapes menant à la formation du complexe immunoglobuline G-peroxydase

Voici les détails de la technique schématisés aux figures 2 et 3:

- 1- Dissoudre 15 mg de HRPO (Type VI, Sigma Chemical Company, St-Louis, U.S.A.; RZ approximatif de 3.0) dans 3 ml d'une solution de 0.3 M de bicarbonate de Na à pH 8.1 (Appendice, table 10a).
- 2- On y ajoute 0.3 ml d'une solution de 1% de FDNB (1-fluoro-2-4 dinitrobenzène) (Sigma Chemical Company, St-Louis, U.S.A.) dans l'éthanol absolu (Appendice, table 10b) (figure 2). Le FDNB agit en tant que bloqueur des groupes aminés (α et ϵ) et des groupes hydroxyles de la HRPO afin d'éviter la formation de polymères de cet enzyme. Le mélange est agité légèrement sur une plaque rotatrice (Gyrotory Shaker - Model G2, New Brunswick Co.) pendant 1 heure à 21°C.

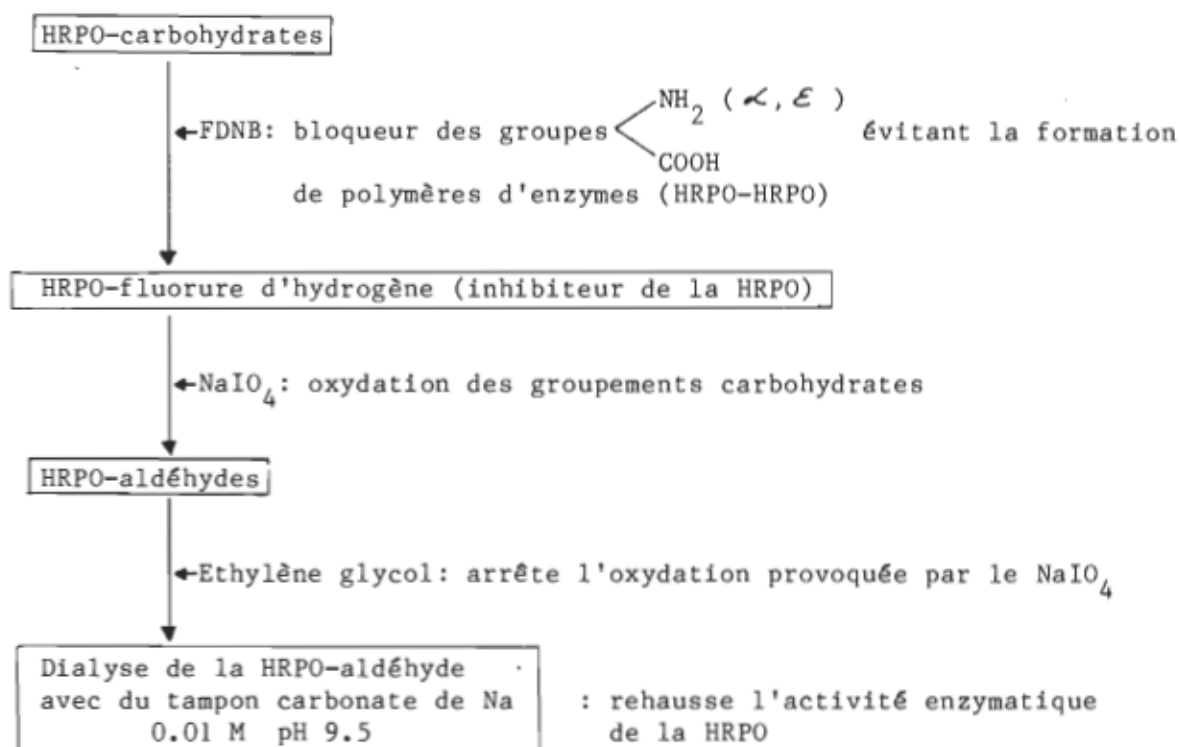


Figure 2 Etapes* de la préparation de la peroxydase (HRPO) avant sa conjugaison aux immunoglobulines G purifiées

* Les étapes de cette préparation de la HRPO furent mises au point par Nakane et Kawaoi (1974).

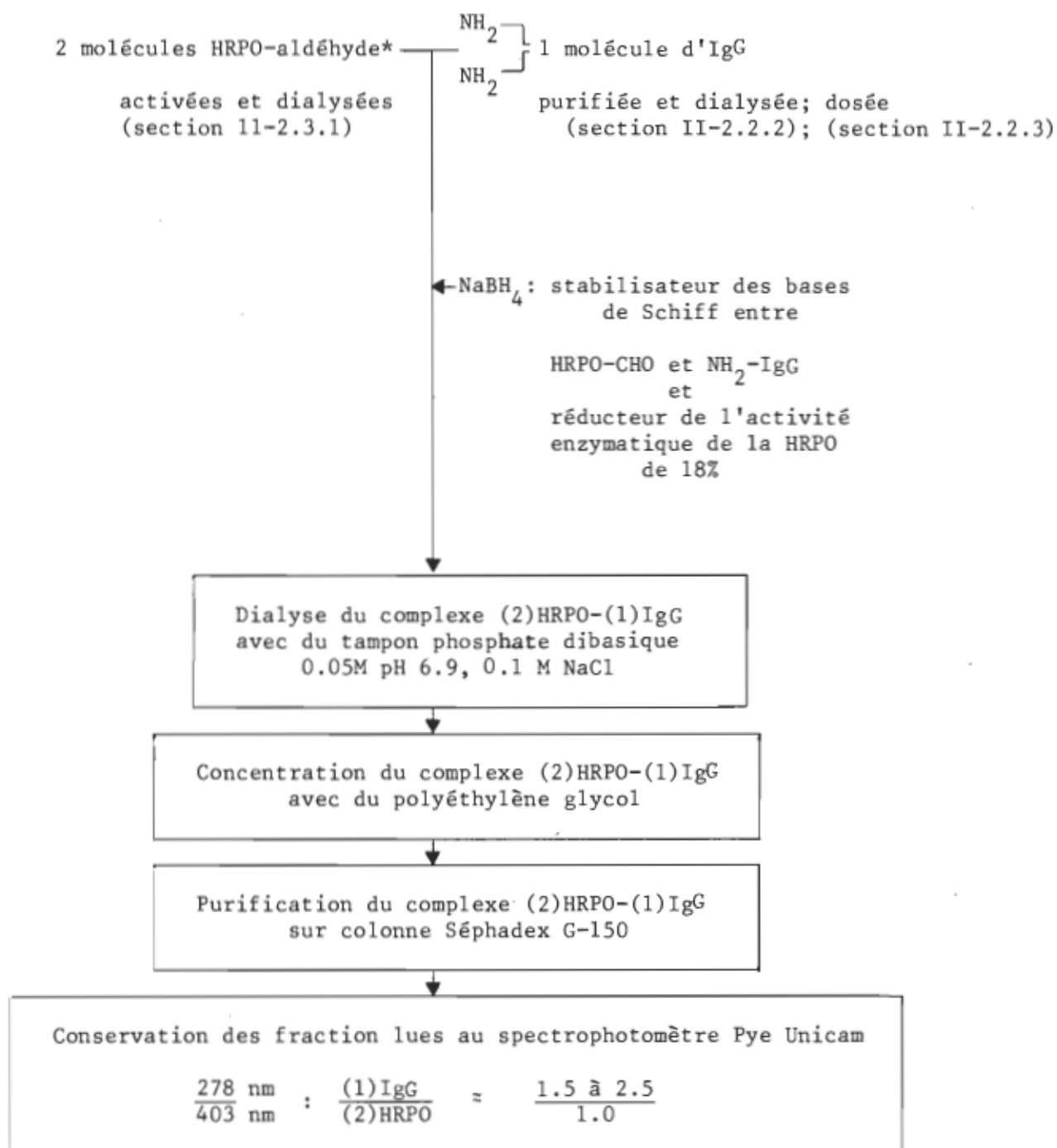


Figure 3 Procédé** de conjugaison de la peroxydase (HRPO)
avec les immunoglobulines G (IgGs) purifiées

* : Groupement aldéhyde: -CHO

** : Procédé de conjugaison mis au point par Nakane et Kawaoi (1974).

3- Au mélange précédent, on ajoute 3 ml d'une solution de 0.04 M de sodium m-periodate (NaIO_4) (Sigma Chemical Company, St-Louis, U.S.A.) dans l'eau distillée (Appendice, table 10c) (figure 2). Les groupements carbohydrates de la HRPO sont oxydés en groupements aldéhydes par le NaIO_4 après une agitation légère de 30 minutes à 21°C sur la même plaque rotatrice.

4- La réaction précédente (oxydation) est arrêtée par l'addition de 3 ml d'une solution de 0.16 M d'éthylène glycol (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J.) dans l'eau distillée (Appendice, table 10d) (figure 2) après une agitation légère de 1 heure à 21°C sur la plaque rotatrice.

5- Le mélange est dialysé 3 fois à 4°C avec 250 ml de tampon carbonate de Na 0.01 M pH 9.5 (Appendice, table 11) (figure 2) à chaque dialyse d'une durée de 3 heures.

Les étapes 3 à 5 sont menées à la noirceur. En fait, le mélange est contenu dans un récipient (erlenmeyer) recouvert de papier aluminium pour éviter des réactions indésirables du sodium-m-periodate (NaIO_4).

6- La peroxydase (HRPO) activée est mélangée avec la suspension d'IgGs purifiée, dialysée (section II-2.2.2) et dosée (section II-2.2.3) à raison de 2 molécules de HRPO par 1 molécule d'IgG pure (figure 3).

Par exemple comme la concentration de HRPO est de 1.6 mg HRPO/ml de la solution préparée ci-haut (étapes 1 à 5) (15 mg HRPO/9.3 ml), on est en mesure de coupler 1 mg de HRPO à 2 mg d'IgGs (rapport 1:2) purifiées, dialysées et dosées.

Ce mélange constitué de la HRPO et des IgGs est agité légèrement sur une plaque rotatrice pendant 3 heures à 21°C afin de favoriser le couplage.

- 7- On ajoute au mélange précédent une quantité de NaBH_4 (Sigma Chemical Company, St-Louis, U.S.A.) identique à celle de la HRPO (1/1 P/P) (figure 3). On laisse reposer le tout à 4°C toute la nuit pour que les bases de Schiff formées après la conjugaison se stabilisent en présence de ce NaBH_4 .
- 8- On dialyse le complexe IgG-HRPO contre du tampon phosphate de sodium 0.05 M pH 6.9 additionné de 0.1 M de NaCl (Appendice, table 9b) (figure 3).
- 9- On concentre de 10 fois la solution précédente avec du polyéthylène glycol (Fisher Scientific Co., N.J., U.S.A.) (figure 3). Il s'agit de déposer le boudin de dialyse dans un récipient rempli d'une solution de PEG (polyéthylène glycol) dans l'eau distillée.
- 10- On procède comme étape finale à la purification du complexe IgG-HRPO sur colonne Séphadex G-150 (section II-2.3.2) (figure 3).

II-2.3.2 Séparation de la peroxydase libre des immunoglobulines G couplées à la peroxydase, et des immunoglobulines G libres

2.5 ml du mélange constitué de conjugués IgG-HRPO, de la peroxydase libre et des IgGs libres est appliqué pour chaque cycle de chromatographie sur une colonne Séphadex G-150 telle que décrite à la section II-2.2.1 . Les fractions recueillies sont lues au spectrophotomètre (Pye Unicam SP-8-100) à 278 et 403 nm. Le premier pic représente les IgGs (absorption maximale à 278 nm) couplées à la HRPO lequel enzyme absorbe à 403 nm. Cette dernière absorption (403 nm) caractérisant la HRPO et son intensité correspond à la quantité de porphyrine (Shannon et al., 1966). Le deuxième pic représente la HRPO libre. En fait, on conserve les fractions à -70°C dont le rapport des absorbances 278/403 s'échelonne de 1.5 à 2.5/1.0 (figure 3).

II-2.4 Méthodes de détection immunoenzymatique à l'immunoperoxydase (Ip) des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens en microscopie optique

II-2.4.1 Diverses méthodes de détection immunoenzymatique à l'Ip

II-2.4.1.1 Méthode directe

On applique directement des IgGs marquées à la HRPO sur des cellules infectées ou non (figure 4). On laisse le temps à ces IgG-HRPO de se fixer spécifiquement aux ag présents (soit 2 heures à 37°C) avant de procéder à une série de lavages avec le tampon phosphate pH 7.4-7.5 (tampon PBS: Appendice, table 12). Cette dernière étape permet d'enlever toute trace d'IgGs couplées à la HRPO non-fixées aux ag viraux du VPC.

Méthode directe
à l'IP

Méthode indirecte
à l'Ip

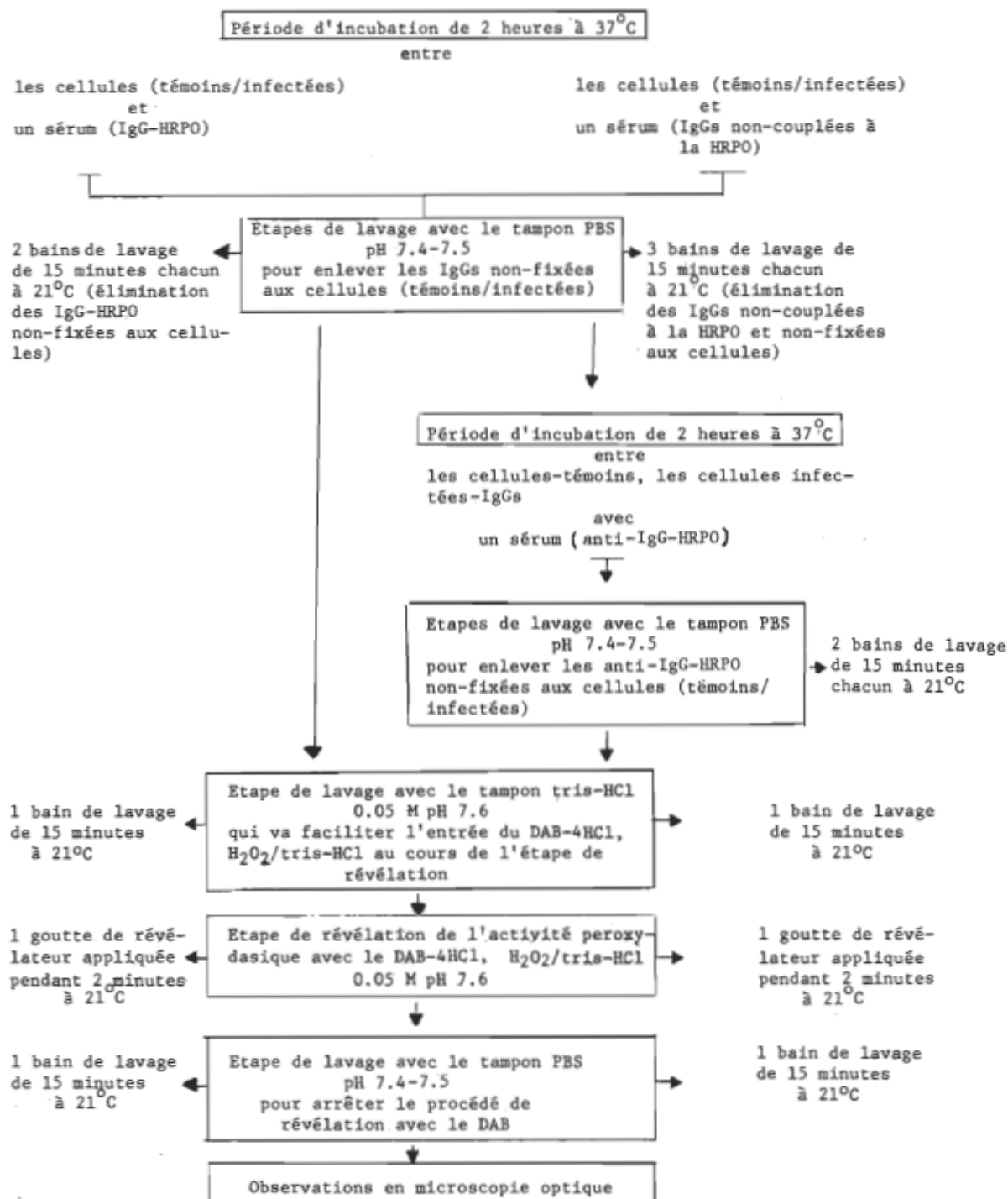


Figure 4 Procédures expérimentales comparées entre la méthode directe et la méthode indirecte au cours de la technique à l'Ip observée en microscopie optique.

Par la suite, on procède au lavage de ces cellules avec un tampon tris-HCl* 0.05 M pH 7.6 (Appendice, table 5b) pour permettre l'entrée facile du révélateur DAB-4HCl**, H_2O_2 /tris-HCl au cours de l'étape de révélation et pour de meilleures conditions de révélation de l'activité enzymatique. Puis on procède à la révélation de cette activité peroxydasique en appliquant sur les cellules infectées et sur les cellules saines (témoins) une solution filtrée de tétrahydrochlorure de diamino-3,3' benzidine (DAB) (Sigma Chemical Company, St-Louis, U.S.A.) à 0.05% dissoute dans le tampon tris-HCl 0.05 M pH 7.6 auquel on ajoute juste avant usage de l'eau oxygénée (H_2O_2) (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J.) à une concentration finale dans la solution de 0.01% (Graham et Karnovsky, 1966). La solution de ce révélateur telle que citée en Appendice, table 13 est diluée 10 fois avant usage. Ce révélateur est appliqué sur les cellules pendant 2 minutes à $21^{\circ}C$. L'effet de ce dernier est arrêté par un bain de lavage de 15 minutes avec du tampon PBS (figure 4). Cette même méthode directe à l'Ip est schématisée à la figure 5.

II-2.4.1.2. Méthode indirecte

La méthode indirecte est plus sensible que la méthode précédente. D'abord, on applique des IgGs non-couplées à la HRPO sur des cellules d'insectes (saines et infectées) cultivées in vitro. Le contact

*tris-HCl: tris (hydroxyméthyl aminométhane)

**DAB-4HCl: tétrahydrochlorure de diamino-3,3' benzidine

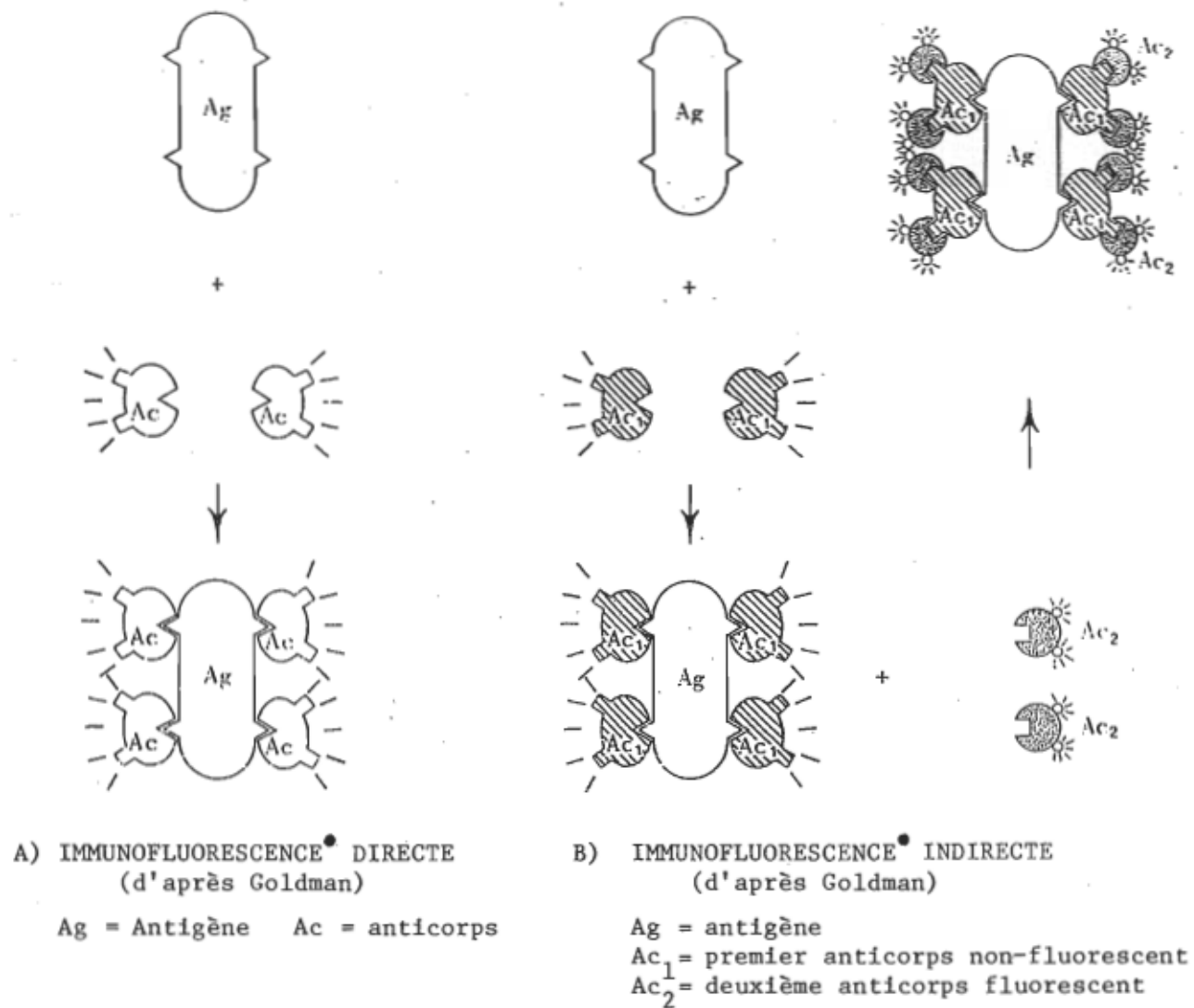


Figure 5. Schémas* des deux méthodes de détection immunoenzymatique à l'immunoperoxydase (méthode directe et méthode indirecte).

- Le principe de la méthode à l'immunofluorescence est identique à celui de la méthode à l'immunoperoxydase.

* Schémas tirés de Faure, 1977.

entre anticorps et antigènes est de 2 heures à 37°C (figure 4). Ensuite on procède à une série de lavages de ces cellules avec du tampon PBS pH 7.4-7.5 (3 bains de 15 minutes chacun) pour éliminer les IgGs (non-conjuguées à la HRPO) non-fixées à leurs ag viraux respectifs. Puis les cellules sont réincubées à 37°C pendant 2 autres heures avec un sérum anti-IgG-HRPO spécifique aux premières IgGs appliquées. Cela dans le but de former un complexe Ag-IgG-anti-IgG-HRPO dans les cellules infectées seulement. On effectue par la suite une série de lavages de ces cellules avec du tampon PBS pH 7.4-7.5 (2 bains de 15 minutes chacun) pour enlever les anti-IgG-HRPO non-fixées aux cellules.

Les autres étapes subséquentes (étape de lavage avec le tampon tris-HCl; étape de révélation avec le DAB-4HCl, H_2O_2 /tris-HCl; étape de lavage avec le tampon PBS) sont les mêmes que celles employées au cours de la méthode directe et sont énoncées aussi à la figure 4.

Cette même méthode indirecte à l'Ip est schématisée aussi à la figure 5.

II-2.4.2 Application des méthodes de détection (directe et indirecte) à l'Ip

II-2.4.2.1 En tubes Leighton

Les lignées cellulaires d'E. scandens et de L. dispar ensemencées (section II-1.3.2) et infectées avec le VPC d'E. scandens (section II-1.4.1) dans les tubes Leighton stériles sont fixées selon le protocole décrit à la section II-1.5.1 . Ces cellules (saines et infectées) fixées sur des supports amovibles (lamelles) distincts sont soumises à maintes incubations à 37°C avec divers sérums i.e. avec des IgGs spécifiques à chacun des ag viraux de ce VPC d'E. scandens. Cela afin de déterminer les bonnes concentrations sériques à employer au cours des méthodes de détection à l'Ip (méthode directe et indirecte). On applique individuellement au cours de la méthode directe divers sérums (anti-intestin de larves infectées; anti-polyèdre complet; anti-virus) purifiés (section II-2.2) et couplés à la HRPO (section II-2.3) sur les cellules d'insectes d'E. scandens et de L. dispar.

Chez ces mêmes lignées cellulaires, on applique individuellement dans un premier temps au cours de la méthode indirecte divers sérums (anti-intestin de larves infectées; anti-polyèdre complet; anti-virus) et dans un deuxième temps un sérum commercial (anti-Ig) purifié (section II-2.2) et couplé à la HRPO (section II-2.3).

Les dilutions sériques respectives à chaque sérum employé au cours de ces deux méthodes de détection (directe et indirecte) sont précisées dans la partie "Résultats" (section III-2.1).

II-2.4.2.1.1 Préparation du matériel

Les lamelles des tubes Leighton sont déposées sur un Parafilm placé au fond d'une boîte de Pétri (Fisher Scientific Co., N.J., U.S.A.) humidifiée. Cette chambre humide est réalisée en déposant dans le fond de cette boîte deux ouates imbibées d'eau distillée de chaque côté du Parafilm. Cela empêche l'évaporation du sérum au cours de la période d'incubation de 2 heures.

Il est important d'appliquer le sérum (conjugué ou non) sur le côté de la lamelle où sont fixées les cellules avant de procéder à la (aux) période(s) d'incubation(s) sérique(s) de 2 heures à 37°C pour chaque sérum testé (méthode directe ou méthode indirecte à l'Ip). Il en est de même lors de l'étape de révélation de l'activité peroxydasique avec le DAB-4HCl, H₂O₂/tris-HCl. Le bon côté où se trouvent les cellules est indiqué par la présence d'une goutte de vernis à ongle coloré (Cutex) déposée à une des extrémités de la lamelle.

Au cours des périodes de lavage, les lamelles sont rincées dans des récipients en verre.

II-2.4.2.1.2 Montage des lames

Avant de fixer la lamelle sur un lame de 75 X 25 mm (Fisher Scientific Company, N.J., U.S.A.), on procède au trempage de cette lamelle dans divers bains de clarification:

- 2 bains d'eau distillée
- 1 bain d'acétone
- 1 bain d'acétone-xylène (50/50 V/V)
- 1 bain de xylène

Puis on applique une mince goutte de résine de montage (Eukitt, Freiburg, West-Germany) sur la lame avant de déposer la lamelle (côté des cellules) directement sur cette goutte de manière à ce que la résine se répande uniformément entre la lame et la lamelle.

Les lames montées sont observées au microscope optique (Wild of Canada Limited, modèle M20-62366, Ottawa, Ontario) à 200 et 450 X.

II-2.4.2.2 Sur microplaque

Les lignées cellulaires d'insectes d'E. scandens, de L. dispar et de C. fumiferana ensemencées (section II-1.3.3) et infectées (section II-1.4.2) directement dans les puits de microplaque sont fixées selon le protocole décrit à la section II-1.5.2 .

Ces diverses lignées d'insectes ensemencées sur microplaque sont soumises à maintes incubations à 37°C avec divers sérums au cours des deux méthodes de détection à l'Ip décrites aux sections II-2.4.1.1 et II-2.4.1.2 .

On emploie au cours de la méthode directe un sérum (anti-intestin de larves infectées) purifié (section II-2.2) et couplé à la HRPO (section II-2.3) sur ces trois lignées cellulaires d'insectes infectées avec le VPC d'E. scandens. Il est bon de rappeler que la lignée de C. fumiferana est soumise à une infection multiple du type VPC-CIV.

Aussi, on met en évidence certains ag viraux de ce VPC chez ces mêmes lignées au cours de la méthode indirecte en appliquant individuellement dans un premier temps divers sérums (anti-polyèdre dissout; anti-virus purifié) et dans un second temps un sérum commercial (anti-Ig) purifié (section II-2.2) et couplé à la HRPO (section II-2.3).

Les dilutions sériques respectives à chaque sérum employé lors de ces deux méthodes de détection (directe et indirecte) sont précisées dans la partie "Résultats" (section III-2.2).

Tout matériel (sérum; révélateur; tampons de lavage) employé au cours de ces deux mêmes méthodes à l'Ip est appliqué directement dans les puits d'une microplaque à l'aide d'une pipette Pasteur. Aussi ce même matériel y est retiré rapidement à l'aide d'une pipette Pasteur reliée à une pompe à vide.

Les cellules fixées au fond de ces puits et marquées ou non à l'Ip sont observées au microscope inversé (Olympus Tokyo, modèle 205542, Carsen, Montréal) à 200 X. On détermine les pourcentages de cellules marquées sur un total de 100 cellules par champ cellulaire.

II-2.5 Méthode séro-immunologique (Ouchterlony)

II-2.5.1 But de la technique d'Ouchterlony

On emploie la méthode de détection d'Ouchterlony afin de déterminer les types de réactions (spécifiques; non-spécifiques; nulles) entre divers sérums (anti-intestin de larves infectées avec le VPC; anti-polyèdre du VPC complet; anti-polyèdre du VPC dissout; anti-virus de la polyédrose cytoplasmique purifié) non-absorbés et absorbés et divers extraits ou solutions (cellules saines de L.d., d'E.s. et de C.f.; larves d'E. messoria saines et infectées; milieu de culture de Grace; tampon PBS).

Au cours de cette technique d'Ouchterlony, l'emploi de sérums absorbés permet de déterminer la réelle spécificité de ces derniers envers leurs ag homologues. Cette même méthode de détection sert aussi comme mesure de contrôle des sérums non-absorbés employés dans ce projet d'étude au cours de la technique à l'Ip (section III-2). Ces derniers sérums sont en contact avec des cellules d'insectes (L.d.; E.s.; C.f.) saines et infectées avec le VPC d'E.s. et/ou le CIV de C.s. .

II-2.5.2 Principe de la technique d'Ouchterlony

La technique d'Ouchterlony consiste à laisser diffuser l'un vers l'autre, à-travers un gel et à partir de réservoirs séparés, une ou des substances antigéniques (virus; constituants larvaires; cellules d'insectes) et une ou des substances sériques diverses (section II-2.5.1.). Dans les conditions d'équilibre optimum Ag-Ab, la précipitation à l'intérieur

du gel du ou des complexe(s) formé(s) se traduit par la présence d'un ou de plusieurs arcs de précipitation (Ouchterlony, 1958).

II-2.5.3 Description et préparation du matériel utilisé lors de la technique d'Ouchterlony

II-2.5.3.1 Préparation du gel

Une solution d'agarose à 1% dans un tampon PBS pH 7.4-7.5 (Appendice, table 13) est produite en chauffant dans un bain-marie cette solution jusqu'à ce qu'elle devienne limpide.

L'emploi du PBS sans CaCl_2 sert pour éviter la précipitation du gel par la chaleur. Aussi, l'addition d'un poids d'azide de sodium (.005 M) permet de contrer la formation de champignons dans ce même gel.

II-2.5.3.2 Préparation des plaques

Dans cette microtechnique utilisée, le gel est inséré entre une lame porte-objet de 75 mm X 25 mm et une matrice de plexiglass. Cette dernière est perforée au préalable d'un puits central entouré de six puits latéraux équidistants destinés à recevoir soit les antigènes ou soit les anticorps testés. Les puits (sept) en forme de cônes ont un diamètre de 3.5 mm à la partie supérieure et de 2.0 mm à la partie inférieure. La distance entre chacun des puits est de 7 mm.

Dans un premier temps, à chaque extrémité de la lame porte-objet trois couches de ruban adhésif noir ("electric tape") sont installées. Puis dans un second temps, 0.5 ml de gel très chaud est coulé sur chaque

lame préalablement déposée sur une plaque chauffante à 30°C et au niveau. Par la suite ce gel est recouvert avec la matrice de plexiglass en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air.

II-2.5.3.3 Préparation des antigènes et des anticorps

II-2.5.3.3.1 Extraits de larves d'E. messoria (saines ou infectées)

Le surnageant de larves d'E. messoria (saines ou infectées au VPC d'E.s.) et le culot de ces mêmes larves (saines ou infectées) sont obtenus de la façon suivante. Suite à la trituration de ces dernières (saines ou infectées) dans un broyeur de tissus en verre borosilicaté Wheaton (Fisher Scientific Company, N.J., U.S.A.) à raison de 2 g de ces larves par 18 ml de milieu de culture de Grace (10% P/V), on procède à la centrifugation des débris larvaires (sains ou infectés) à 5,000 RPM pendant 15 minutes (Centrifugeuse Sorvall RC5-B, rotor SS-34). Le décantage subséquent de chacun des deux tubes permet de séparer les surnageants des culots.

II-2.5.3.3.2 Extraits de cellules d'insectes

Les cellules d'insectes testées (L.d.; E.s.; C.f.) subissent un processus d'éclatement avant leur insertion dans les puits distincts. Ces cellules fraîchement ensemencées de 24 heures sont suspendues dans le tampon PBS avant d'être décongelées et congelées à -70°C trois fois de suite.

II-2.5.3.3.3 Les sérums

Un sérum normal de lapin et non-absorbé est testé comme témoin. Aussi les autres sérums cités à la section II-2.5.1. sont testés sous la forme non-absorbée d'une part et sous la forme absorbée d'autre part. On procède à l'absorption de ces sérums de la façon suivante. Chacun de ces derniers est absorbé avec des larves saines d'E. messoria lyophilisées à raison de 30 mg de ces larves par 1 ml de sérum donné. Le mélange larve-sérum est incubé à 37°C pendant 1 heure avant d'être centrifugé à 5,000 RPM pendant 10 minutes (Centrifugeuse Sorvall RC5-B, rotor SS-34). Cette dernière étape permet d'enlever les débris larvaires du sérum absorbé ainsi que les précipités des réactions immunologiques. Cette absorption a pour but de rendre le sérum plus spécifique en éliminant de celui-ci les anticorps réagissant avec les antigènes des tissus de la larve saine.

A noter que la lyophilisation des larves saines d'E. messoria d'une durée de 3 jours est menée sur un appareil de type Virtis (Research Equipment Gardiner, New-York) au niveau duquel on introduit un tube scellé contenant ces larves saines préalablement congelées.

II-2.5.4 Application de la technique d'Ouchterlony

II-2.5.4.1 Incubation des plaques

A l'aide d'une seringue de 1 ml munie d'une aiguille hypodermique de 0.46 mm de diamètre, on remplit chaque puits avec un ag ou un ab donné jusqu'à ce qu'un ménisque convexe apparaisse. Puis les plaques sont

placées dans une chambre humide à la température ambiante (21°C) pour une période de 48 à 72 heures afin que s'effectue la diffusion.

A noter que le type et la localisation du matériel introduit dans chacun des puits sont spécifiés et schématisés dans la partie "Résultats" (section III-1).

II-2.5.4.2 Lavage des plaques

Une fois la période d'incubation du matériel (antigénique, sérique) effectuée, on procède au lavage des gels. On lave les plaques avec une solution d'eau physiologique (NaCl 0.9%) laquelle est renouvelée trois fois pour une période minimale de 12 heures. Par la suite on soulève la matrice de plexiglass minutieusement en la faisant glisser sur la surface du gel de manière à la séparer complètement de celui-ci.

II-2.5.4.3 Séchage des plaques

Le gel adhérent à la surface de la lame porte-objet est recouvert par la suite d'une feuille de papier filtre Whatman #1 préalablement humidifiée. Ceci afin d'éviter une craquelure du gel lors du séchage effectué à 37°C pendant 24 heures.

II-2.5.4.4 Coloration des plaques

Les plaques séchées sont trempées dans le bleu de Coomassie (Appendice, table 14a) durant 10 à 15 minutes. Puis on enlève l'excès de colorant à l'eau de robinet avant de soumettre ces mêmes plaques à la

solution de décoloration (Appendice, table 14b) pendant 1 minute environ. Finalement, on laisse sécher les plaques à la température ambiante (21°C) avant d'observer les résultats et d'en tirer les conclusions.

II-3. Evaluation du nombre de polyèdres cytoplasmiques
du VPC d'E. scandens

Le pourcentage des cellules contenant des polyèdres (%) et la moyenne de polyèdres par cellule ayant des polyèdres (m) sont mesurés à divers temps post-infection chez les lignées de L.d. et d'E.s. soumises à une infection simple au VPC et chez celle de C.f. atteinte d'une infection multiple du type de VPC-CIV.

Les évaluations du nombre de polyèdres chez ces trois lignées cellulaires ensemencées sur microplaque sont effectuées une fois la technique à l'Ip (méthodes directe et indirecte) complétée sur ces dernières cellules infectées. Plus précisément, une fois le décompte des pourcentages de cellules marquées à l'Ip terminé, on procède à la coloration au bleu de méthylène (1%) de ces mêmes cellules fixées. Cela dans le but d'évaluer le nombre de polyèdres. Aussi ces valeurs sont déterminées à la suite d'un examen microscopique à 200 X mené sur microplaque.

II-4. Traitements mathématiques et informatiques utilisés

L'une des transformations parmi les plus employées en expérimentation biologique où les relations entre la dose et la réponse obtenue sont du type "TOUT ou RIEN" (Quantal responses) est l'analyse PROBIT (Mather, 1965; Brown et Pal, 1973; Hewlett et Plackett, 1979). Le programme informatisé effectuant cette analyse, répond à l'appellation: PROB 2. Elaboré par Richard J. Daum (1969), ce programme établit une relation linéaire pondérée entre le résultat du pouvoir infectieux exprimé en Probit et le logarithme de la "dose", en employant la "Maximum Likelihood Procedure" décrite par Finney (1971).

Il semble opportun de souligner que le pouvoir infectieux du VPC d'E. scandens tel qu'étudié au cours de ce projet de recherche est en relation étroite avec le pourcentage de cellules marquées par la méthode de détection immunoenzymatique à l'Ip. Aussi le programme d'analyses informatisées "PROB 2" utilisé permet donc la transformation du pourcentage de ces cellules marquées en échelle Probit. Ce même programme est disponible au centre de calcul des services informatiques de l'Université du Québec à Trois-Rivières (U.Q.T.R.).

Chapitre III

Résultats

III-1. Tests d'Ouchterlony

Chaque sérum obtenu chez le lapin après immunisation contre les divers ag viraux du VPC d'E.s. est testé par la méthode séro-immunologique "Ouchterlony".

A partir de la technique de détection d'Ouchterlony, on n'observe aucune réaction immunologique entre certains sérums (anti-VPC 1/10: figure 6a; anti-intestin 1/5: figure 6b; anti-polyèdre complet 1/5: figure 6c) non-absorbés et les divers extraits de cellules d'insectes (L.d.; E.s.; C.f.) saines.

Ces mêmes sérums dilués et non-absorbés sont testés aussi contre un extrait de larve saine d'E.m. lyophilisée (figure 7a). Ici on observe deux arcs de précipitation formés entre le sérum anti-intestin 1/5 (puits 5) et 1/10 (puits 6) et cet extrait de larve saine. Non seulement on note ces deux mêmes arcs de précipitation lorsque ces mêmes sérums sont testés contre le surnageant de larve d'E.m. infectée (figure 7b) mais on observe en plus deux autres arcs de précipitation formés entre le sérum anti-VPC 1/10 (puits 3) et 1/20 (puits 4) et ce surnageant de larve infectée.

La figure 8a schématise certaines réactions immunologiques entre les divers sérums non-absorbés cités ci-haut en plus du sérum anti-polyèdre du VPC dissout non-absorbé aussi, avec le tampon PBS sans CaCl_2 , avec le milieu de culture de Grace, et avec le surnageant de larve d'E.m. saine. Ici on remarque un arc de précipitation entre le sérum anti-VPC

Légende de la figure 6

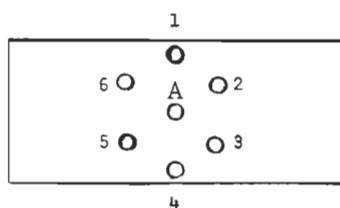


Figure 6a

Puits central (A) : sérum anti-VPC 1/10 non-absorbé.

Puits latéraux (1): cellules saines de C.f. non-diluées.

(2): " " " " " " " " " " " " 1/5 .

(3): cellules saines d'E.s. non-diluées.

(4): " " " " " " " " " " " " 1/5.

(5): cellules saines de L.d. non-diluées.

(6): " " " " " " " " " " " " 1/5.

Figure 6b

Puits central (A) : sérum anti-intestin 1/5 non-absorbé.

Puits latéraux (1-6): idem à la figure 6a.

Figure 6c

Puits central (A) : sérum anti-polyèdre complet 1/5 non-absorbé.

Puits latéraux (1-6): idem à la figure 6a.

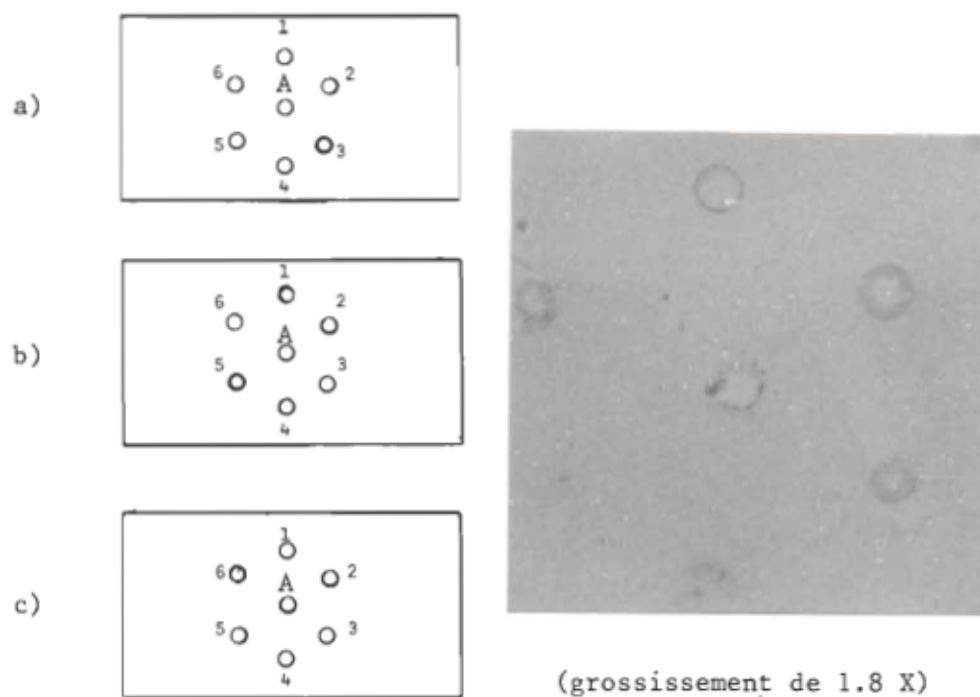


Figure 6

Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques nulles entre divers sérums (anti-VPC; anti-intestin; anti-polyèdre complet) non-absorbés et divers extraits de cellules d'insectes (L.d.; E.s.; C.f.) saines.

Légende de la figure 7

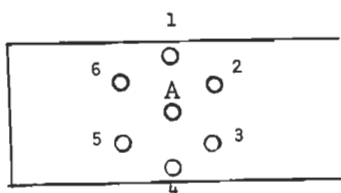


Figure 7a

- Puits central (A): larve saine d'E.m. lyophilisée.
- Puits latéraux (1): sérum anti-polyèdre complet 1/5 non-absorbé.
- (2): " " " " " " " " " " " " " " 1/10 non-absorbé.
- (3): sérum anti-VPC 1/10 non-absorbé.
- (4): " " " " " " " " 1/20 non-absorbé.
- (5): sérum anti-intestin 1/5 non-absorbé.
- (6): " " " " " " " " " " " " " " 1/10 non-absorbé.

Figure 7b

- Puits central (A): surnageant de larve d'E.m. infectée.
- Puits latéraux (1-6): idem à la figure 7a.

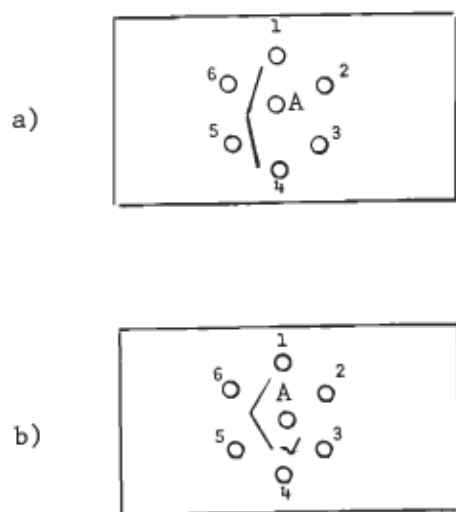


Figure 7

Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques spécifiques entre la larve d'E.m. (saine et lyophilisée; sur-nageant de larve infectée) et certains sérums (anti-intestin; anti-VPC) non-absorbés.

Légende de la figure 8

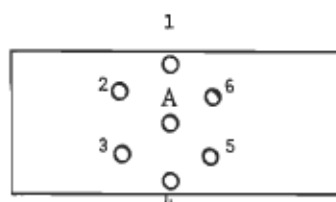


Figure 8a

- Puits central (A): surnageant de larve d'E.m. saine.
- Puits latéraux (1): sérum anti-VPC 1/5 non absorbé.
 (2): sérum anti-polyèdre dissout 1/50 non-absorbé.
 (3): sérum anti-polyèdre complet non-dilué et non-absorbé.
 (4): sérum anti-intestin non-dilué et non-absorbé.
 (5): PBS sans CaCl_2 .
 (6): milieu de culture de Grace.

Figure 8b

- Puits central (A): surnageant de larve d'E.m. saine.
- Puits latéraux(1-6): idem à la figure 8a sauf les sérums (1-4) sont absorbés.

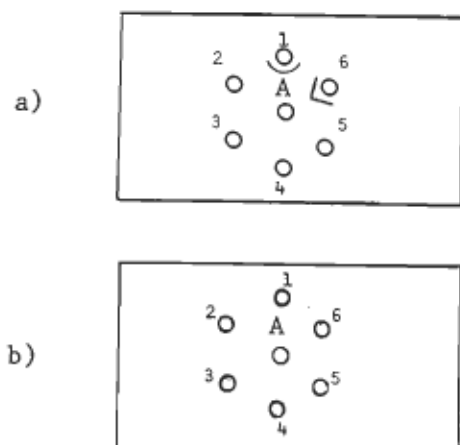


Figure 8 Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques (spécifiques; nulles; non-spécifiques) entre divers sérums (anti-VPC; anti-polyèdre dissout; anti-polyèdre complet; anti-intestin) non-absorbés et absorbés, entre diverses solutions, et le surnageant de larve d'E.m. saine.

1/5 non-absorbé (puits 1) et le surnageant de cette larve saine. Puis un autre arc de précipitation entre le milieu de culture de Grace (puits 6) et ce même surnageant. A la figure 8b tous les constituants des puits (central et latéraux) sont identiques à ceux de la figure 8a sauf que tous les sérums (puits 1-4) sont absorbés. Là on ne note aucune réaction immunologique. La figure 9a ne démontre aussi aucune réaction immunologique entre la larve saine d'E.m. lyophilisée (non-diluée et diluée), entre le surnageant de cette larve E.m. infectée (non-diluée et diluée), et un sérum anti-polyèdre complet 1/5 non-absorbé. Il en est de même à la figure 9b où cette même larve lyophilisée (non-diluée et diluée) et le surnageant de cette même larve infectée (non-diluée et diluée) réagissent avec un sérum anti-VPC 1/10 non-absorbé. Cependant lorsqu'ils sont confrontés avec un sérum anti-intestin 1/5 non-absorbé (figure 9c), on note des arcs de précipitation qui se joignent les uns des autres formant un cercle complet.

La figure 10a schématise certaines réactions immunologiques entre le surnageant de larve d'E.m. (saine et infectée), entre le culot de cette même larve infectée, entre le milieu de culture de Grace (non-dilué et dilué), entre le tampon PBS sans CaCl_2 , et un sérum anti-polyèdre complet non-dilué et absorbé. On observe un arc de précipitation entre le surnageant de larve d'E.m. infectée (puits 3) et ce sérum anti-polyèdre complet absorbé. Et on remarque un autre arc de précipitation entre le culot de cette larve infectée (puits 4) et ce même sérum. A la figure 10b tous les constituants des puits latéraux sont identiques à ceux de la figure 10a quoique dans le puits central se trouve un sérum anti-VPC 1/10 absorbé. Là on note aucune réaction immunologique.

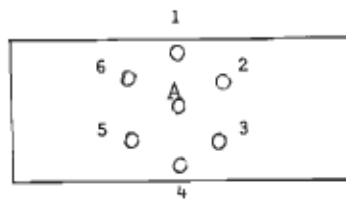


Figure 9a

Puits central (A) : sérum anti-polyèdre complet 1/5 non-absorbé.

Puits latéraux (1): larve saine d'E.m. lyophilisée et non-diluée.

(2): surnageant de larve d'E.m. infectée et non-diluée.

(3): larve saine d'E.m. lyophilisée et diluée
1/5.

(4): surnageant de larve d'E.m. infectée et diluée 1/5.

(5): larve saine d'E.m. lyophilisée et diluée
1/10.

(6): surnageant de larve d'E.m. infectée et diluée 1/10.

Figure 9b

Puits central (A) : sérum anti-VPC 1/10 non-absorbé.

Puits latéraux (1-6): idem à la figure 9a.

Figure 9c

Puits central (A) : sérum anti-intestin 1/5 non-absorbé.

Puits latéraux (1-6): idem à la figure 9a.

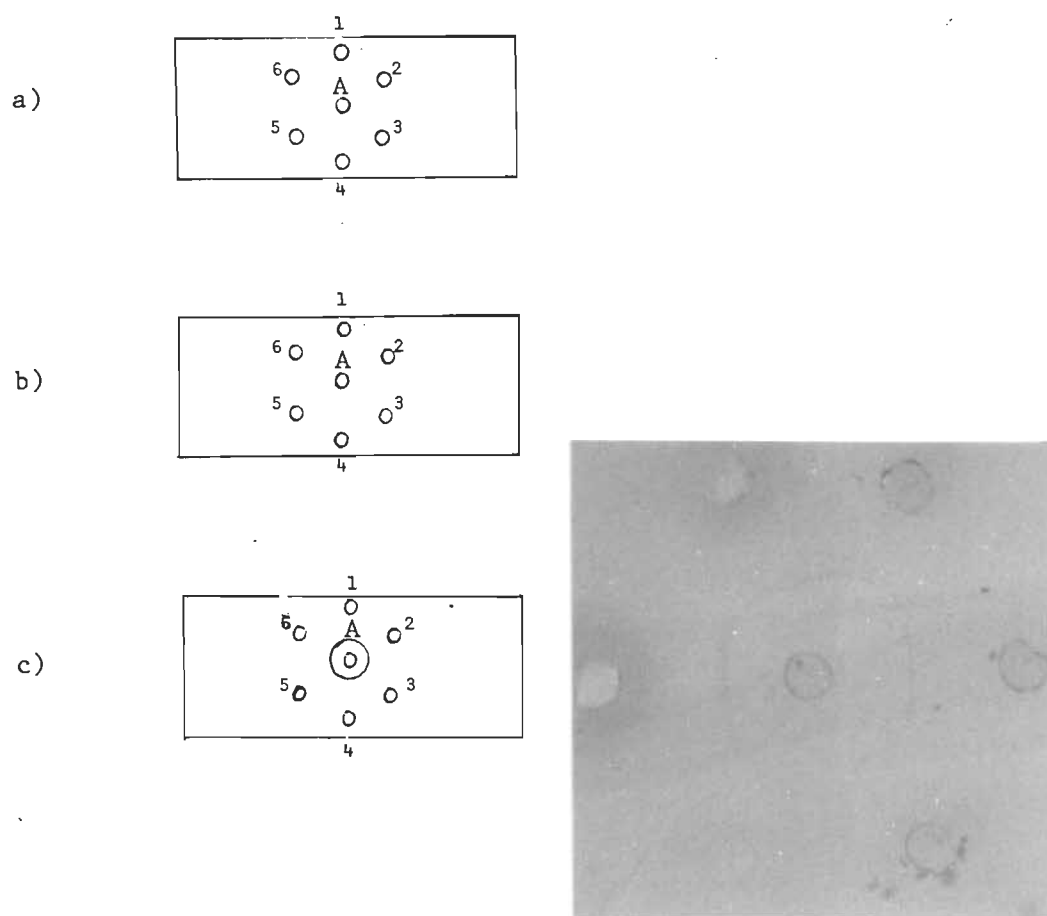


Figure 9 Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques nulles entre certains sérums (anti-polyèdre complet; anti-virus) non-absorbés et la larve d'E.m. (saine et lyophilisée; surnageant de larve infectée) d'une part, et des réactions immunologiques spécifiques entre le sérum anti-intestin non-absorbé et cette même larve (saine ou infectée) d'autre part.

Légende de la figure 10

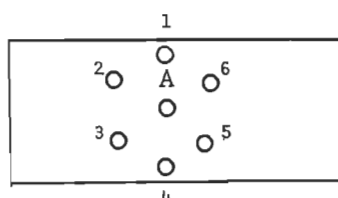


Figure 10a

Puits central	(A):	sérum anti-polyèdre complet non-dilué et absorbé.
Puits latéraux	(1):	surageant de larve d' <u>E.m.</u> saine et non-diluée.
	(2):	milieu de culture de Grace.
	(3):	surageant de larve d' <u>E.m.</u> infectée et non-diluée.
	(4):	culot de larve d' <u>E.m.</u> infectée et non-diluée.
	(5):	PBS sans CaCl_2 .
	(6):	milieu de culture de Grace dilué 1/2.

Figure 10b

Puits central	(A):	sérum anti-VPC 1/10 absorbé.
Puits latéraux	(1-6):	idem à la figure 10a.

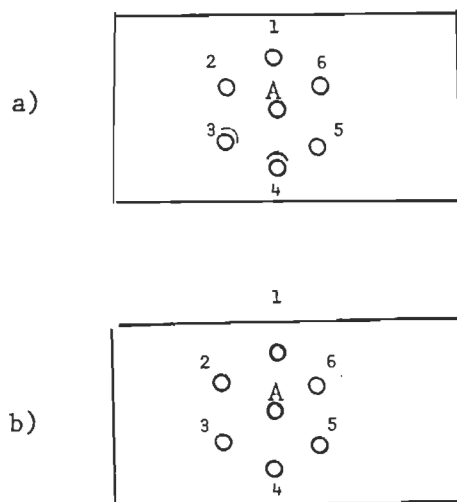


Figure 10 Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques (spécifiques; nulles) entre les sérums absorbés (anti-polyèdre complet; anti-virus) et certaines substances antigéniques (surnageant de larve d'E.m. saine ou infectée; culot de larve d'E.m. infectée).

La figure 11a démontre certaines réactions immunologiques entre le sérum anti-intestin (non-dilué; dilué) non-absorbé, entre le tampon PBS sans CaCl_2 , entre le milieu de culture de Grace, et un extrait de culot de larve d'E.m. infectée et non-diluée. On observe trois arcs de précipitation entre ce dernier sérum non-absorbé et cet extrait de culot de larve d'E.m. infectée. On obtient également des réactions immunologiques entre ce même extrait de culot et ce même sérum anti-intestin (non-dilué; dilué) mais absorbé. Cependant le nombre d'arcs de précipitation est moindre (figure 11b).

Pour conclure, un sérum normal non-absorbé est confronté à un extrait de culot de larve d'E.m. infectée et au surnageant de cette même larve infectée. On n'observe aucune réaction immunologique. Ces derniers tests ne sont pas illustrés dans ce projet de recherche.

Légende de la figure 11

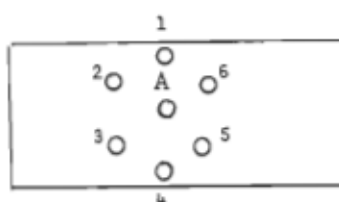


Figure 11a

- Puits central (A): culot de larve d'E.m. infectée et non-diluée.
- Puits latéraux (1): sérum anti-intestin non-dilué et non-absorbé.
 (2): sérum anti-intestin dilué 1/20 et non-absorbé.
 (3): sérum anti-intestin dilué 1/40 et non-absorbé.
 (4): sérum anti-intestin dilué 1/80 et non-absorbé.
 (5): PBS sans CaCl_2 .
 (6): milieu de culture de Grace.

Figure 11b

- Puits central (A): culot de larve d'E.m. infectée et non-diluée.
- Puits latéraux (1-6): idem à la figure 11a sauf les sérums (1-4) sont absorbés.

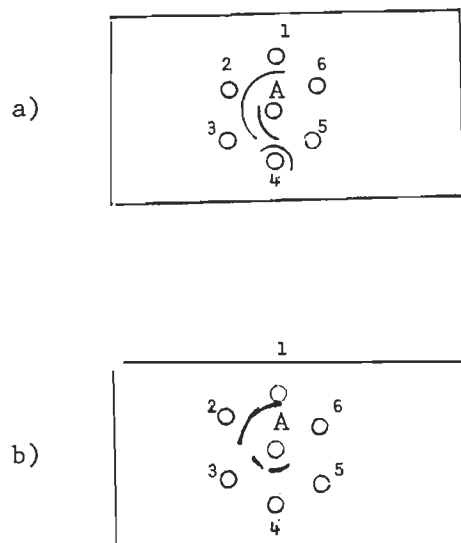


Figure 11 Tests d'Ouchterlony démontrant des réactions immunologiques spécifiques entre le culot de larve d'E.m. infectée et le sérum anti-intestin (non-dilué ; dilué), non-absorbé et absorbé.

III-2. Etude des méthodes de détection immunoenzymatique à l'Ip des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens en microscopie optique

On emploie deux méthodes de détection à l'Ip (méthode directe et méthode indirecte) des divers antigènes (ag) viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires d'insectes d'E. scandens, de L. dispar et de C. fumiferana. En fait ces deux méthodes nous permettent de mesurer précisément les cinétiques d'apparition de ces ag viraux du VPC d'E. scandens chez ces lignées par la présence de marquages brunâtres. Tout marquage est un indice révélateur de la présence de ces ag viraux chez les cellules infectées.

III-2.1 Cellules d'insectes cultivées en tubes Leighton

L'application de la technique à l'Ip nous permet de déceler la présence de certains ag viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de L. dispar et d'E. scandens ensemencées en tubes Leighton. Un des buts des infections cellulaires dans ces tubes sont de bien visualiser les marquages et de prendre de bonnes microphotographies.

Dans un premier temps, il faut déterminer les meilleures conditions de fixation des cellules. Lesquelles conditions sont nécessaires pour une meilleure préservation des structures cellulaires, virales, tout en conservant l'antigénicité des protéines virales. Les deux seuls fixateurs testés sont l'acétone (-20°C, 2 minutes) et la paraformaldéhyde à 0.5% (21°C, 10 minutes). A ce niveau, l'acétone est le fixateur de choix de ces deux lignées cellulaires ensemencées sur lamelles en tubes Leighton. Après observation au microscope inversé, l'aspect arrondi des cellules (L.d.: Quiot, 1976; E.s.: Belloncik

et al., 1982) en temps normal demeure intact suite au procédé de fixation à l'acétone. De plus, le tapis cellulaire de ces deux lignées est aussi abondant après qu'avant la fixation à l'acétone. Et il y a peu ou pas de formation de précipités sur les lamelles. Cependant, suite à l'emploi de la paraformaldéhyde à 0.5%, la forme de ces cellules est anormale de par la présence d'une mauvaise fixation aux substrats et des déformations par rapport à la forme arrondie ou fibroblastique classique. Aussi on observe une moins bonne adhérence de ces cellules sur la lamelle. En effet, bien que le tapis cellulaire de chaque lignée soit abondant avant de procéder à la fixation, les cellules sont clairsemées sur la lamelle après cette fixation. A vrai dire, les cellules ont tendance à s'agglomérer en amas flottant dans la solution de fixation. De plus, la présence de précipités indésirables sur les lamelles nous pousse à mettre de côté le fixateur à la paraformaldéhyde.

Au cours de la méthode de détection directe à l'Ip, l'emploi de divers sérums nous permet de détecter la présence de certains ag viraux du VPC d'E. scandens chez ces deux mêmes lignées cellulaires citées ci-haut et fixées à l'acétone. En fait, des IgGs anti-intestin de larves infectées conjuguées à la HRPO et diluées 1/3, des IgGs anti-polyèdre complet conjuguées et non-diluées et des IgGs anti-virus conjuguées et non-diluées, sont employées individuellement lors de la méthode directe à l'Ip.

o Sérum anti-intestin

Ce sérum est composé d'une variété d'IgGs dirigées à la fois contre les ag associés aux larves, contre les ag des capsides virales du

VPC, contre les protéines virales non-structurales i.e. les protéines nécessaires à la multiplication de ce VPC, et les protéines des polyèdres de ce même virus.

L'application d'IgGs anti-intestin couplées à la HRP0 et diluées 1/3 chez les lignées de L.d. et d'E.s. démontre la localisation des divers ag détectés par ce sérum aux figures 12 et 13 respectivement. Plus précisément à la figure 12a, on observe des cellules de la lignée L.d. non-infectées. Sur ces cellules-témoins on ne note aucun marquage avec le sérum anti-intestin.

A la figure 12b, on observe des cellules infectées depuis 24 heures avec une concentration virale de $10^{5.6}$ $\text{DICT}_{50/\text{ml}}$ en VPC d'E.s.. Ici les cellules infectées sont marquées de façon prononcée avec l'usage d'un tel sérum. Plus précisément, on observe dans le cytoplasme un marquage granulaire, des zones de marquage diffus avec des granulations à l'intérieur de ces zones et finalement un marquage autour des polyèdres et à leur périphérie (ou surface). La figure 12c représente les cellules infectées depuis 36 heures avec une même concentration virale en VPC. Ici les divers types de marquage sont les mêmes que ceux observés à la figure 12b bien que l'intensité en soit plus faible.

Cette même méthode directe à l'Ip est aussi appliquée sur des cellules de la lignée E.s. non-infectées (figure 13a) et infectées à une même concentration virale en VPC ($10^{5.6}$ $\text{DICT}_{50/\text{ml}}$) à des temps post-infection de 24 heures (figure 13b) et de 48 heures (figure 13c). Les divers marquages observés aux figures 13b et 13c sont les mêmes que ceux observés aux figures 12b et 12c avec toutefois de légères variations

Légende de la figure 12

Figure 12a

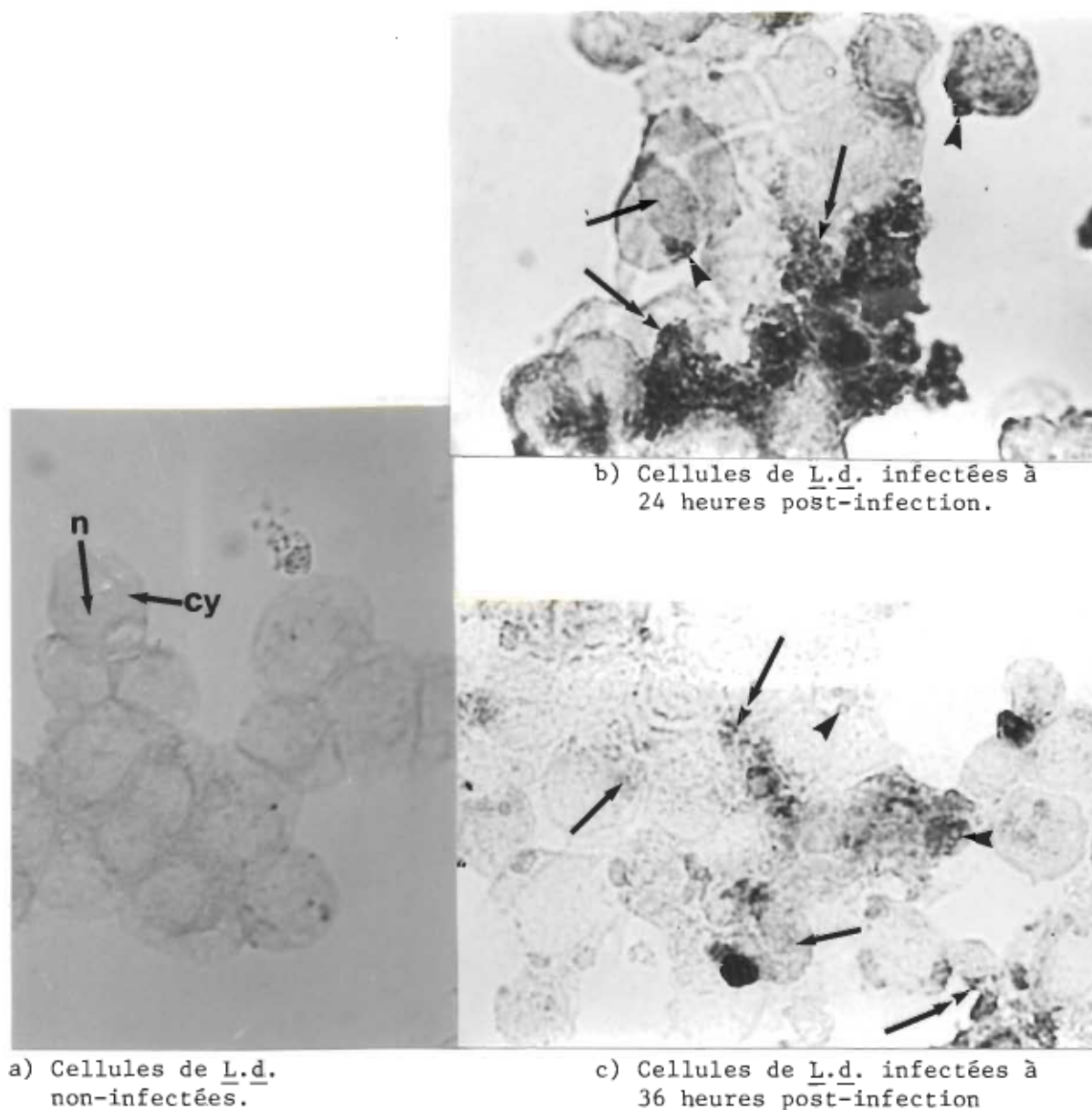
On note chez les cellules de L.d. non-infectées avec le VPC une absence de marquage. On distingue le noyau (n) et le cytoplasme (cy) d'une cellule saine.

Figure 12b

On note la présence d'un marquage diffus avec des granulations (\longrightarrow) dans le cytoplasme de cette même lignée infectée depuis 24 heures. Dans ce même champ on observe aussi un marquage cytoplasmique granulaire ($\longrightarrow \blacktriangleright$) et un marquage autour et à la périphérie (ou surface) des polyèdres intracytoplasmiques (\blacktriangleright).

Figure 12c

Là aussi, on remarque la présence d'un marquage cytoplasmique diffus avec des granulations (\longrightarrow), d'un marquage cytoplasmique granulaire ($\longrightarrow \blacktriangleright$) et d'un marquage autour et à la périphérie (ou surface) des polyèdres intracytoplasmiques (\blacktriangleright) chez les cellules de la même lignée infectées depuis 36 heures.



- o Infection des cellules avec une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ DICT_{50/ml}.
- o Température d'incubation à 28°C.
- o Fixation des cellules à l'acétone (-20°C, 2 minutes).
- o Grossissement total de 1350 X.

Figure 12

Détection de l'ensemble des ag viraux du VPC d'E. scandens par l'application d'IgGs anti-intestin couplées à la HRP0 et diluées 1/3 (méthode directe à l'Ip).

Légende de la figure 13

Figure 13a

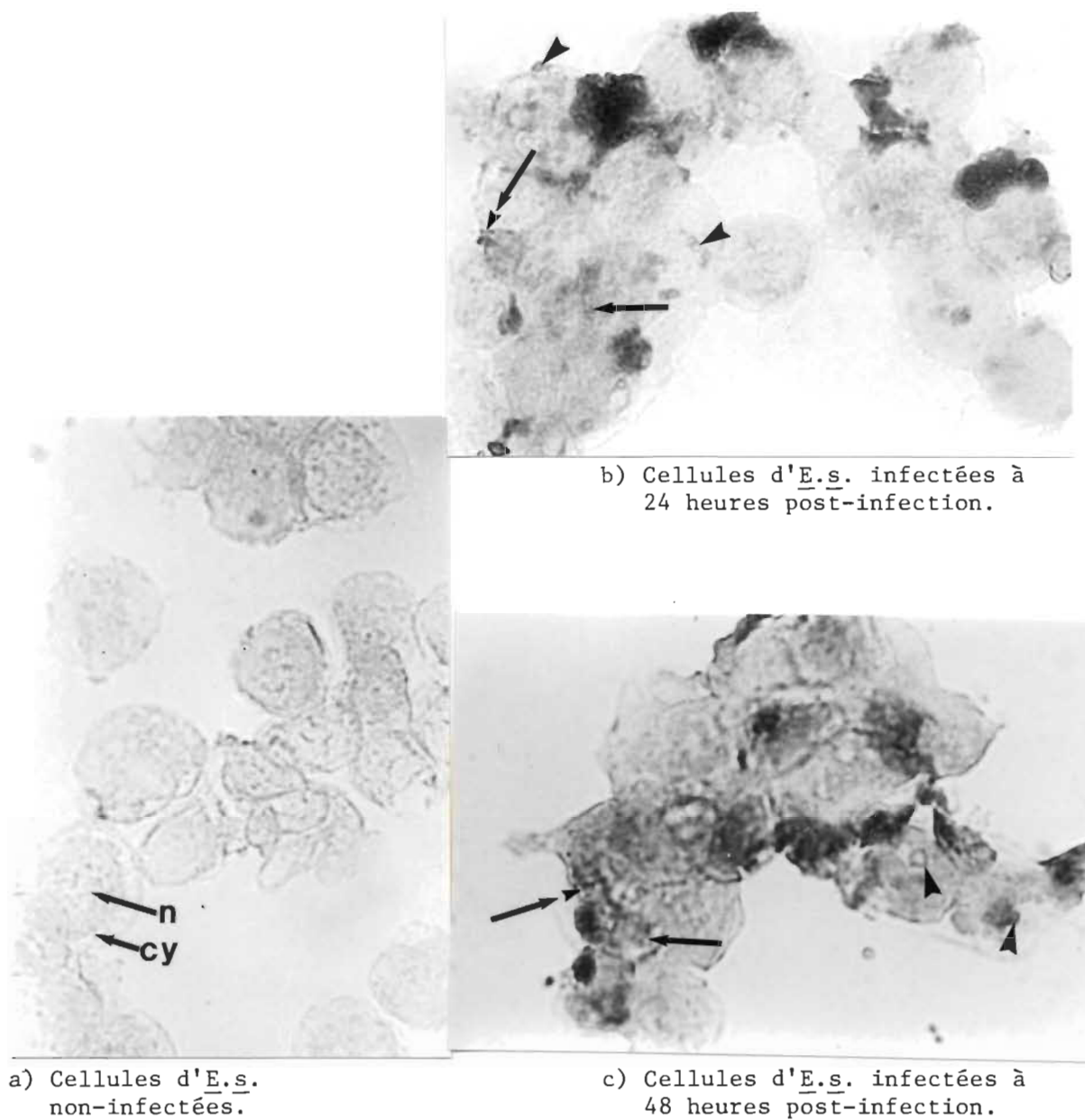
On note chez les cellules d'E.s. non-infectées avec le VPC une absence de marquage. On distingue le noyau (n) et le cytoplasme (cy) d'une cellule saine.

Figure 13b

On note la présence d'un marquage diffus avec des granulations (—→) dans le cytoplasme de cette même lignée infectée depuis 24 heures. Dans ce même champ on observe aussi un marquage cytoplasmique granulaire (—→▶) et un marquage autour et à la périphérie (ou surface) des polyèdres intracytoplasmiques (▶).

Figure 13c

Là aussi, on remarque la présence d'un marquage cytoplasmique diffus avec des granulations (—→), d'un marquage cytoplasmique granulaire (—→▶) et d'un marquage autour et à la périphérie (ou surface) des polyèdres intracytoplasmiques (▶) chez les cellules de cette même lignée infectées depuis 48 heures.



- o Infection des cellules avec une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ DICT₅₀/ml.
- o Température d'incubation à 28°C.
- o Fixation des cellules à l'acétone (-20°C, 2 minutes).
- o Grossissement total de 1350 X.

Figure 13

Détection de l'ensemble des ag viraux du VPC d'E. scandens par l'application d'IgGs anti-intestin couplées à la HRPO et diluées 1/3 (méthode directe à l'Ip).

d'intensité de marquage d'une lignée à l'autre.

o Sérum anti-polyèdre complet

Les cellules d'insectes infectées avec une même concentration virale en VPC ($10^{5.6}$ DICT₅₀/ml) sont marquées de façon moins intense avec le sérum anti-polyèdre complet qu'avec le sérum anti-intestin.

En guise d'exemple visuel, la figure 14b représente des cellules d'E.s. infectées à 36 heures post-infection et marquées à l'Ip démontrant des marquages brunâtres intracytoplasmiques plutôt diffus d'une part et un marquage précis autour des polyèdres d'autre part. Il semble opportun de souligner que l'intensité du marquage au pourtour d'un même polyèdre diffère parfois vue la forme tridimensionnelle de ce dernier dans le cytoplasme des cellules et la répartition non-uniforme du marquage autour de celui-ci est dépendant de l'accessibilité aux anticorps marqués. Contrairement à cela, les cellules saines de cette même lignée (figure 14a) ne démontrent aucun marquage évident, ni la présence de polyèdres d'ailleurs.

o Sérum anti-virus



Les cellules d'insectes infectées avec une même concentration virale en VPC ($10^{5.6}$ DICT₅₀/ml) sont marquées aussi de manière moins intense avec le sérum anti-virus purifié qu'avec le sérum anti-intestin. En guise de résultats qualitatifs, la figure 15b correspond à la lignée de L.d. soumise à cette même concentration virale et marquée à l'Ip démontrant un marquage granulaire. La figure 15a représente des cellules de la même lignée mais saines et on y note l'absence de marquage caractéris-

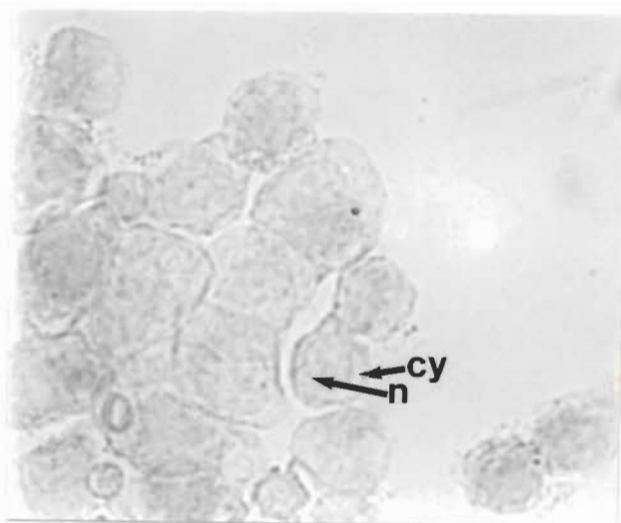
Légende de la figure 14

Figure 14a

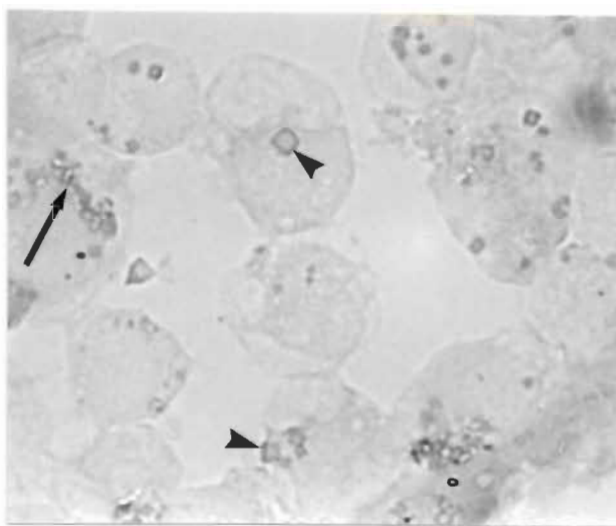
On note, chez les cellules d'E.s. non-infectées avec le VPC, une absence de marquage. On distingue le noyau (n) et le cytoplasme (cy) d'une cellule saine.

Figure 14b

On note la présence d'un marquage cytoplasmique diffus avec des granulations () et d'un marquage autour et à la périphérie (ou surface) des polyèdres intracytoplasmiques () chez les cellules de cette même lignée infectées depuis 36 heures.



a) Cellules d'E. s. non-infectées.



b) Cellules d'E. s. infectées à 36 heures post-infection.

- o Infection des cellules avec une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ DICT₅₀/ml.
- o Température d'incubation à 28°C.
- o Fixation des cellules à l'acétone (-20°C, 2 minutes).
- o Grossissement total de 1350 X.

Figure 14

Détection des ag associés aux protéines polyédriques du VPC d'E. scandens par l'application d'IgGs anti-polyèdre complet couplées à la HRPO et non-diluées (méthode directe à l'Ip).

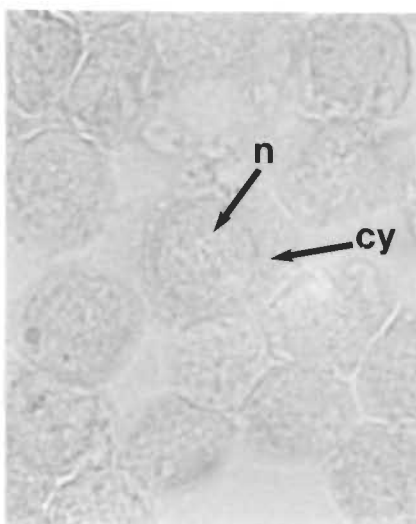
Légende de la figure 15

Figure 15a

On note chez les cellules de L.d. non-infectées avec le VPC une absence de marquage. On distingue le noyau (n) et le cytoplasme (cy) d'une cellule saine.

Figure 15b

On note la présence d'un marquage granulaire (—► ►) dans le cytoplasme de cette même lignée infectée depuis 18 heures.



a) Cellules de L.d. non-infectées.



b) Cellules de L.d. infectées
à 18 heures post-infection.

- o Infection des cellules avec une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ DICT₅₀/ml.
- o Température d'incubation à 28°C.
- o Fixation des cellules à l'acétone (-20°C, 2 minutes).
- o Grossissement total de 1350 X.

Figure 15

Détection des ag associés aux capsides virales du VPC d'E. scandens par l'application d'IgGs anti-virus couplées à la HRPO et non-diluées (méthode directe à l'Ip).

tique.

Au cours de la méthode de détection indirecte à l'Ip, l'emploi de divers sérums nous permet de détecter la présence des mêmes ag viraux du VPC d'E. scandens chez ces deux lignées cellulaires (L.d.; E.s.) fixées à l'acétone. En fait, on teste individuellement un sérum anti-intestin dilué 1/20, un sérum anti-polyèdre complet dilué 1/40 et un sérum anti-virus dilué 1/10. A ce propos dans un second temps, l'application d'IgGs de sérum de chèvre anti-IgG de lapin conjuguées à la HRPO et non-diluées permet de mettre en évidence certaines IgGs de lapin qui sont déjà fixées à leurs antigènes homologues. Lors de l'emploi de cette méthode à l'Ip, quel que soit le sérum (anti-intestin; anti-polyèdre complet; anti-virus) utilisé comme agent de dépistage de certains ag viraux du VPC d'E.s. chez les lignées d'E.s. et de L.d., on obtient les mêmes types de marquage que ceux obtenus avec les sérums respectifs employés dans la méthode directe à l'Ip. C'est pourquoi on n'inclut dans ce mémoire que des résultats qualitatifs obtenus suite à l'application du sérum anti-polyèdre complet avec cette technique indirecte.

La figure 16 représente la lignée de L.d. infectée ou non avec une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ $\text{DICT}_{50/\text{ml}}$ à certains temps post-infection. La figure 16a représente des cellules de L.d. non-infectées. On y note une absence de marquage. Aux figures 16b et 16c, on observe des cellules infectées respectivement depuis 48 heures et 7 jours avec une même concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ $\text{DICT}_{50/\text{ml}}$.

En ce qui a trait à ces cellules infectées, elles sont marquées de façon moins intense avec ce sérum anti-polyèdre complet qu'avec le

Légende de la figure 16

Figure 16a

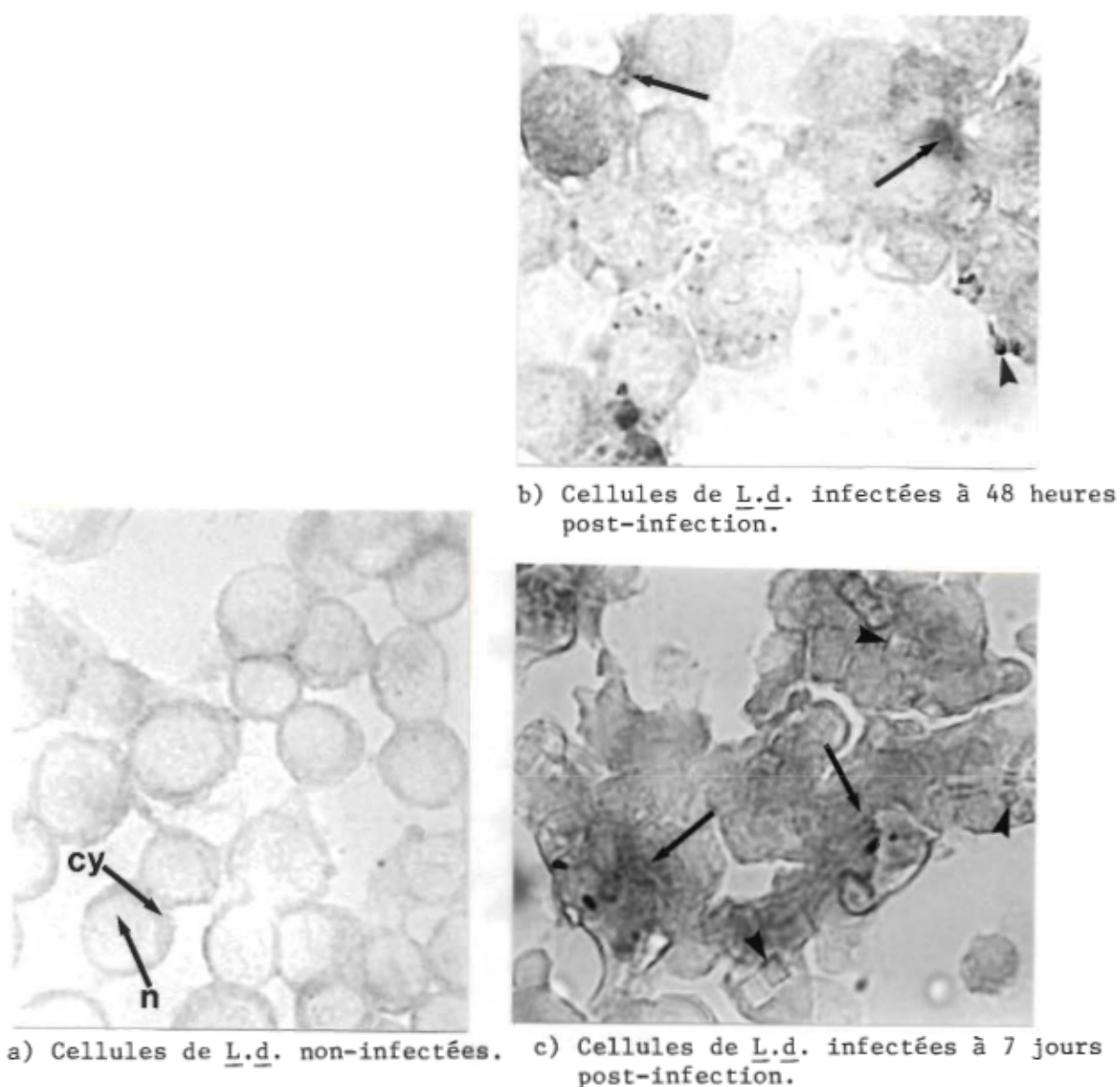
On note chez les cellules de L.d. non-infectées avec le VPC une absence de marquage. On distingue le noyau (n) et le cytoplasme (cy) d'une cellule saine.

Figure 16b

On note la présence d'un marquage diffus avec des granulations (→) et d'un marquage autour et à la périphérie (ou surface) des polyèdres (➤) dans le cytoplasme cellulaire de cette même lignée infectée depuis 48 heures.

Figure 16c

Là aussi, on remarque la présence d'un marquage diffus avec des granulations (→) et d'un marquage autour et à la périphérie (ou surface) des polyèdres (➤) dans le cytoplasme cellulaire de cette même lignée infectée depuis 7 jours.



- o Infection des cellules avec une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ DICT₅₀/ml.
- o Température d'incubation à 28°C.
- o Fixation des cellules à l'acétone (-20°C, 2 minutes).
- o Grossissement total de 1350 X.

Figure 16

Détection des ag associés aux protéines polyédriques du VPC d'E. scandens par les applications d'un sérum anti-polyèdre complet dilué 1/40 et d'IgGs anti-IgG de lapin couplées à la HRPO et non-diluées (méthode indirecte à l'I_p).

sérum anti-intestin. Au niveau de ces figures (16b et 16c), on observe un marquage intracytoplasmique diffus d'une part et un marquage plus ou moins uniforme autour des polyèdres.

Pour conclure, on procède à une variété de contrôles qualifiant la technique à l'Ip comme une méthode très sensible. On emploie des IgGs de sérum normal couplées à la HRPO sur des cellules saines et infectées au VPC d'E. scandens. A ce niveau, aucun marquage apparent en résulte. De plus comme mesure de contrôle supplémentaire, on applique des IgGs anti-CIV conjuguées à ce même enzyme et diluées 1/10 sur la lignée de L.d. soumise encore à une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ DICT₅₀/ml à 36 heures post-infection (figure 17). Ici aucun marquage n'est apparent aussi. De plus, on applique des IgGs anti-VPC conjuguées neutralisées par le VPC sur les mêmes lignées cellulaires (L.d.; E.s.) infectées avec le VPC d'E.s.. Là aussi on obtient aucun marquage évident. Puis l'usage du DAB seul sans sérum nous permet de ne détecter aucune trace de peroxydase endogène chez ces mêmes lignées.

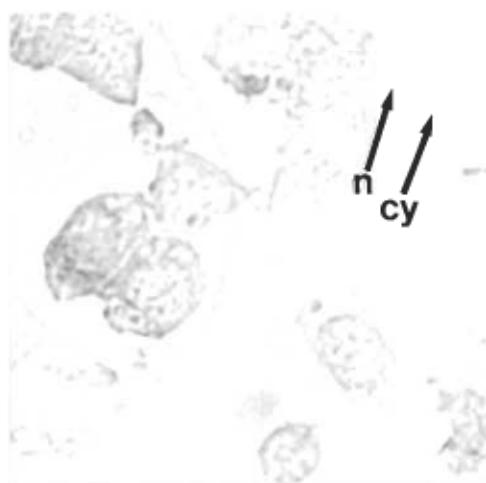
Il est bon de souligner que quelle que soit la méthode de détection (directe ou indirecte) à l'Ip employée comme mesure de dépistage des divers ag viraux du VPC d'E.s. chez les lignées d'E.s. et de L.d., on observe pas de coloration dans aucun des cas dans le noyau. En fait le marquage est uniquement cytoplasmique.

III-2.2 Cellules d'insectes cultivées sur microplaque

Il faut d'abord déterminer les meilleures conditions de préservation des cellules ensemencées sur microplaque avant d'appliquer la

Légende de la figure 17

On note l'absence de marquage dans le cytoplasme et le noyau des cellules de la lignée L.d. infectées avec le VPC et sur lesquelles on a appliqué des IgGs anti-CIV couplées à la HRPO et diluées 1/10. On distingue le noyau (n) et le cytoplasme (cy) d'une cellule infectée.



Cellules de L.d. infectées à
36 heures post-infection.

- o Infection des cellules avec une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$.
- o Température d'incubation à 28°C .
- o Fixation des cellules à l'acétone (-20°C , 2 minutes).
- o Grossissement total de 1350 X .

Figure 17

Contrôle de la méthode directe à l'Ip par l'application d'IgGs anti-CIY couplées à la HRPO et diluées 1/10 sur des cellules de la lignée L.d. infectées par le VPC.

méthode de détection immunoenzymatique à l'Ip. La paraformaldéhyde est expérimentée à deux concentrations différentes (0.5% et 1.0%) durant 10 minutes à 21°C. A 0.5%, les cellules sont moins bien fixées au fond des puits d'une microplaque puisqu'elles se retrouvent surtout dans le surnageant. Suite à l'observation au microscope inversé, on note la présence de nombreux précipités au fond de ces mêmes puits. Par contre ces mêmes cellules restent fixées en tapis uniforme au fond de ces puits avec une solution à 1% de ce même fixateur. A une telle concentration, les cellules conservent leurs formes normales et on ne note pas la présence de nombreux précipités. Le méthanol est testé aussi. L'emploi de ce dernier est délaissé puisqu'il entraîne la formation de granules intracellulaires (précipités protéiniques).

Un autre fixateur tel l'acétone est aussi rejeté puisqu'il dissout la matière plastique des microplaques. Aussi la paraformaldéhyde à 1% (10 minutes, 21°C) est le fixateur de choix appliqué en série sur tous les essais effectués sur microplaque au cours de ce projet d'étude.

Le but premier de cette recherche menée sur microplaque est de déterminer les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. chez certaines lignées cellulaires d'insectes (E.s.; L.d.; C.f.). Nous étudions chez ces lignées l'influence de plusieurs paramètres physico-chimiques sur l'infection virale. Entre autres, l'effet de la concentration de VPC, l'influence de la température d'incubation et l'effet de la concentration de la cordycépine sur les cinétiques d'apparition des divers ag viraux de ce même virus, sont testés chez les lignées d'E.s. et de

L.d.. De plus, l'effet d'une infection mixte du type VPC-CIV sur les cinétiques d'apparition de ces mêmes ag viraux du VPC d'E.s. est étudié cependant chez la lignée de C.f.. Au cours de chacune de ces études expérimentales, toutes les cinétiques associées à la synthèse des divers ag viraux de ce VPC sont établies à partir des deux méthodes de détection à l'Ip soit la méthode directe d'une part et la méthode indirecte d'autre part.

Au cours de la méthode directe à l'Ip, des IgGs anti-intestin de larves infectées couplées à la HRPO et diluées 1/3 sont appliquées sur ces trois lignées cellulaires saines et infectées.

Par contre lors de la méthode indirecte à l'Ip, deux sérums distincts sont utilisés individuellement. Plus précisément, un sérum anti-virus dilué 1/5 et un sérum anti-polyèdre dissout dilué 1/100 d'une part, puis dans un second temps, l'application d'IgGs de sérum de chèvre anti-IgG de lapin conjuguées à la HRPO et non-diluées permet de mettre en évidence certaines IgGs de lapin qui sont fixées à leurs ag homologues.

Les différents types de marquage obtenus, à partir de ces deux méthodes de détection à l'Ip et des divers sérums employés, sont les mêmes que ceux observés chez ces mêmes cellules d'insectes ensemencées en tubes Leighton (section II-2.1). Cependant il est à noter que les résultats qualitatifs se rapportant aux types de marquage obtenus suite à l'application du sérum anti-polyèdre dissout sont les mêmes que ceux obtenus suite à l'emploi du sérum anti-polyèdre complet (figure 14).

En guise de résultats quantitatifs pour chacune des cinétiques on obtient le pourcentage de cellules marquées à l'Ip en fonction du temps

post-infection. Ces diverses cinétiques nous permettent de mettre en relief l'influence de la lignée cellulaire, de la concentration virale, de la température d'incubation, d'un inhibiteur de synthèse (cordycépine), et d'une infection mixte sur la synthèse des divers ag viraux du VPC d'E.s.. Noter que la majorité des marquages débutent à 7 heures post-infection car avant le nombre de cellules marquées est trop faible.

III-2.2.1 Effet de la concentration virale du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires d'E. scandens et de L. dispar

En guise de résultats quantitatifs obtenus en Ip, les figures 18 à 22 représentent quelques cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dépistés à l'aide des divers sérums selon la concentration virale infectante chez les lignées cellulaires de L.d. et d'E.s..

Les diverses concentrations testées sont de $10^{4.7} \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$ (figure 18), de $10^{4.0} \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$ (figure 19), de $10^{3.7} \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$ (figure 20), de $10^{2.7} \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$ (figure 21) et de $10^{0.7} \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$ (figure 22).

Les effets de ces cinq concentrations virales à 28°C chez ces deux lignées cellulaires sont suivis par les deux méthodes de détection (directe et indirecte) à l'Ip (section III-2.2).

Effet d'une concentration virale en VPC de $10^{4.7} \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$

L. dispar

La figure 18a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.7} \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$.

CONCENTRATION VIRALE EN VPC: $10^{4.7}$ DICT₅₀/ml

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées: ——— Anti-virus purifié: - - - Anti-polyèdre dissout:

A) Lymantria dispar

B) Euxoa scandens

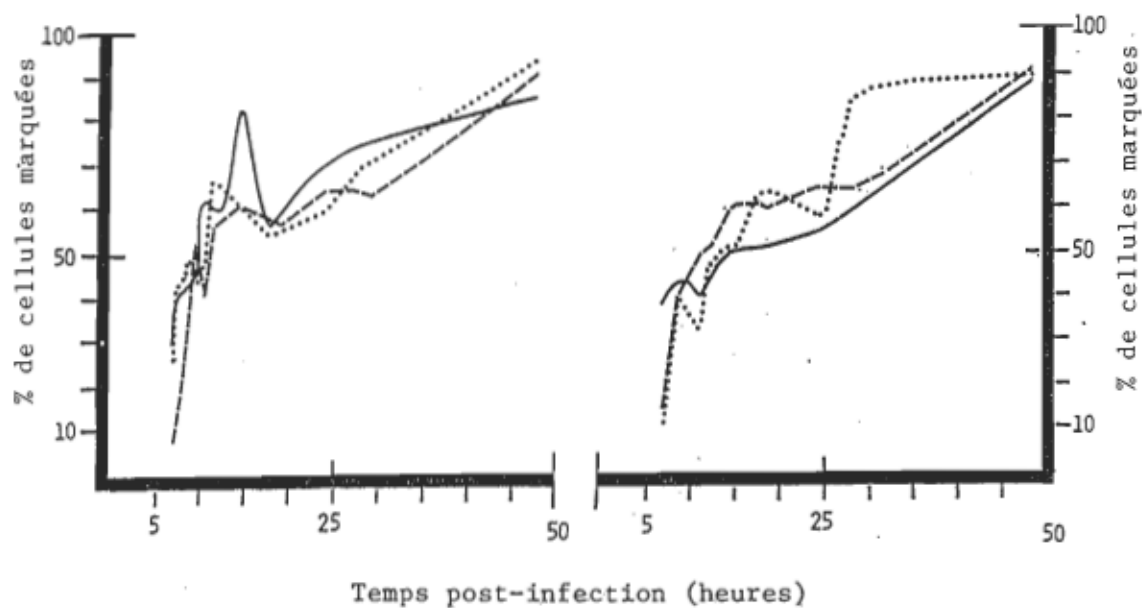


Figure 18

Effet de la concentration du VPC d'E. scandens sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux de ce VPC chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées par les divers sérums sont importants. Par exemple, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 30 à 60% alors que celui de cellules marquées par le sérum anti-virus est de 8 à 57% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 26 à 67%. Par la suite, il se produit une phase de fléchissement des pourcentages de cellules marquées par ces mêmes sérums. Puis survient une étape de progression lente et régulière atteignant des pourcentages finaux très élevés puisque 86% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin, que 91% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 94% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

E. scandens

La figure 18b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à cette même concentration virale de $10^{4.7}$ DICT₅₀/ml.

L'allure des trois cinétiques d'apparition de ces mêmes ag viraux obtenues avec les trois sérums différents chez cette lignée démontre le même schéma général de détection de ces ag que celui de la lignée de L.d. (figure 18a). A ce niveau, quoique les pourcentages de cellules marquées par les divers sérums varient sensiblement à un temps post-infection donné, il n'en demeure pas moins que les pourcentages finaux à 48 heures post-infection sont les mêmes.

Effet d'une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}

L. dispar

La figure 19a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux diminuent par rapport à ceux observés chez cette même lignée cellulaire infectée avec une concentration virale plus forte en VPC de $10^{4.7}$ DICT_{50/ml} (figure 18a). Par exemple, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des antigènes viraux est de 18 à 43% alors que le pourcentage de ces cellules marquées par un sérum anti-virus passe de 12 à 58% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 16 à 62%. Cependant les taux de détection en termes de pourcentages de ces cellules marquées en début d'infection sont les mêmes c'est-à-dire élevés.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, on observe le fléchissement des pourcentages de cellules marquées pour les ag viraux dans leur ensemble et pour les ag associés aux capsides virales alors que ceux relatifs aux ag associés aux protéines polyédriques sont stables. Une régression moindre des pourcentages relatifs aux ag associés à ces protéines polyédriques se produit plus tard.

Finalement, il y a une progression lente et régulière de ces pourcentages pour atteindre des pourcentages finaux très élevés puisque

CONCENTRATION VIRALE EN VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Température: 28°C

Anti-intestin : ——— Anti-virus: - - - Anti-polyèdre:
de larves infectées purifié dissout

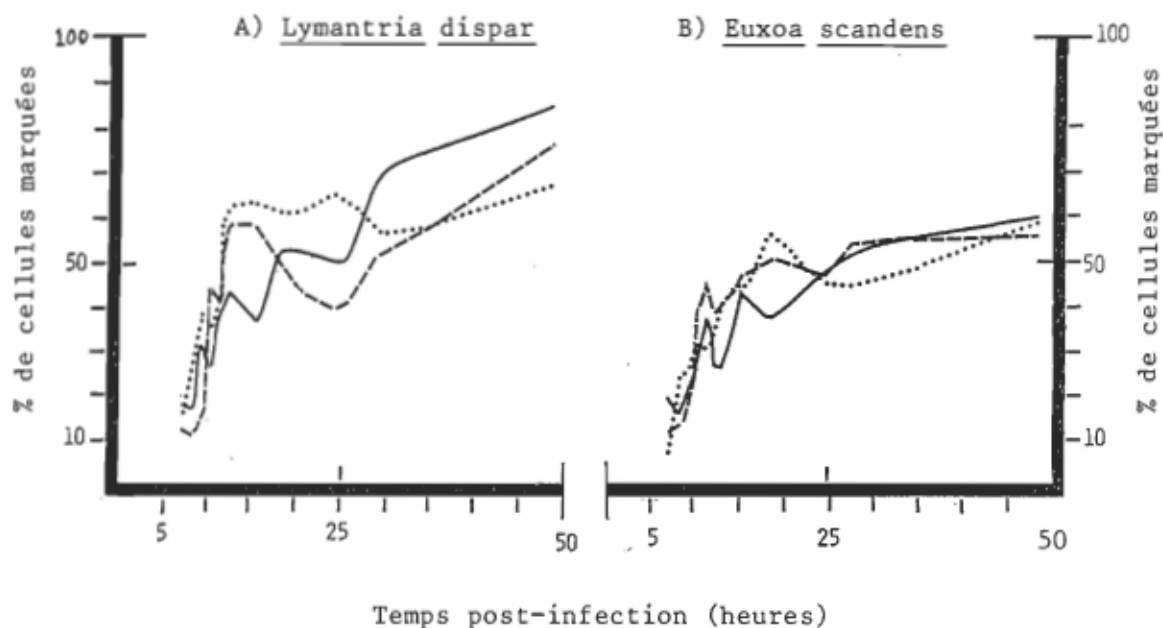


Figure 19

Effet de la concentration du VPC d'*E. scandens* sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux de ce VPC chez les lignées cellulaires de *Lymantria dispar* et d'*Euxoa scandens* suivies en immunoperoxydase.

85% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin, que 76% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 67% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

E. scandens

La figure 19b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à cette même concentration virale de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux du VPC et les vitesses d'augmentation de ces pourcentages sont sensiblement les mêmes que ceux observés chez la lignée de L.d. soumise à cette même concentration virale en VPC (figure 19a).

Le schéma général se distingue cependant au niveau de la phase intermédiaire d'infection. En effet, les pourcentages de cellules marquées pour les ag viraux dans leur ensemble et pour les ag associés aux protéines polyédriques sont plus faibles alors que ceux relatifs aux ag associés aux capsides virales sont plus élevés. Par la suite on note une phase de fléchissement des pourcentages relatifs aux divers ag viraux moins importante que celle observée chez la lignée de L.d. (figure 19a). Puis se manifeste une phase de progression très lente et régulière de ces pourcentages pour atteindre des pourcentages finaux élevés puisque 60% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin, que 56% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 59% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection. Mais ces pourcentages finaux

sont légèrement moins élevés que ceux obtenus chez la lignée de L.d. infectée avec la même concentration virale.

Effet d'une concentration virale en VPC de $10^{3.7}$ DICT_{50/ml}

L. dispar

La figure 20a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{3.7}$ DICT_{50/ml}.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces ag viraux diminuent par rapport à ceux observés chez cette même lignée cellulaire infectée avec une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}. Par exemple, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 15 à 33%, alors que le pourcentage de ces mêmes cellules marquées par un sérum anti-virus est de 15 à 22% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 10 à 34%. Cependant les vitesses précoces de synthèse des divers ag sont les mêmes que celles notées chez cette lignée infectée avec une concentration plus élevée par exemple $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}.

Aussi au cours de la phase intermédiaire d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour les ag associés aux capsides virales et aux protéines polyédriques sont beaucoup moindres que ceux observés chez la même lignée cellulaire soumise à la concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}. Contrairement à ceux relatifs aux ag viraux dans leur ensemble qui sont les mêmes. En fait il se manifeste une

CONCENTRATION VIRALE EN VPC: $10^{3.7}$ DICT_{50/ml}

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées : ——— Anti-virus purifié : - - - - Anti-polyèdre dissout : ·····

A) Lymantria dispar

B) Euxoa scandens

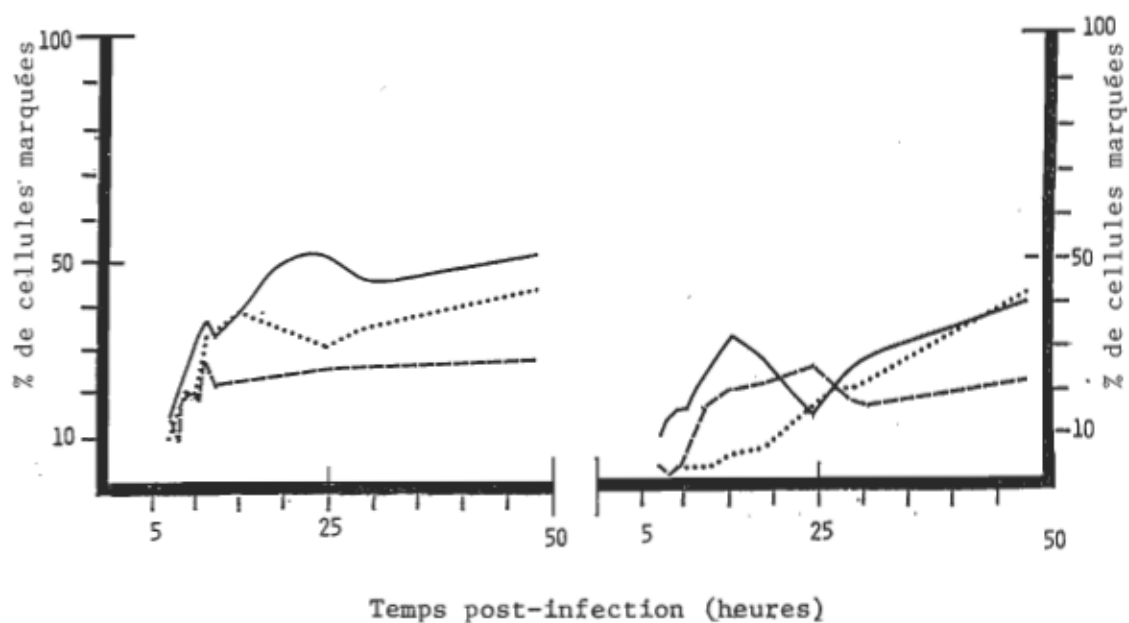


Figure 20

Effet de la concentration du VPC d'*E. scandens* sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux de ce VPC chez les lignées cellulaires de *Lymantria dispar* et d'*Euxoa scandens* suivies en immunoperoxydase.

progression lente des pourcentages de cellules marquées pour ces derniers ag quoique celle se rapportant aux ag associés aux capsides virales est très lente. Puis on observe une phase de fléchissement des pourcentages de cellules marquées pour les ag viraux dans leur ensemble et pour les ag associés aux protéines polyédriques.

Par la suite, on note une progression plus lente et régulière des pourcentages de cellules marquées pour atteindre des pourcentages finaux élevés puisque 52% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin et que 44% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection. Cependant on remarque une phase de plateau des pourcentages de cellules marquées pour les ag associés aux capsides virales au cours de cette même période post-infection. Ainsi, on note que 28% des cellules sont marquées par le sérum anti-virus à 48 heures post-infection.

E. scandens

La figure 20b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à cette même concentration virale de $10^{3.7}$ DICT₅₀/ml.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces ag viraux et les vitesses de synthèse de ces derniers sont moindres que ceux notés chez la lignée de L.d. soumise à une même concentration virale en VPC (figure 20a). Par exemple, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux est de 10 à 24% alors que le

pourcentage de ces mêmes cellules marquées par un sérum anti-virus est de 3 à 16%. Par contre celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre passe de 3 à 6% de 10 heures à 15 heures* post-infection.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, il se manifeste une phase de fléchissement plus grande des pourcentages de cellules marquées pour certains ag viraux (les ag viraux dans leur ensemble et les ag associés aux capsides virales) chez cette lignée cellulaire par rapport à l'autre lignée (L.d.) soumise à une même concentration virale en VPC de $10^{3.7}$ $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$. Pendant que la cinétique d'apparition des ag associés aux protéines polyédriques est en phase de progression lente mais régulière.

Puis au cours de la phase tardive d'infection, on remarque une phase de progression lente et régulière pour atteindre des pourcentages finaux élevés puisque 41% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin, que 23% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 43% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection. A vrai dire, les pourcentages finaux pour ces ag sont légèrement inférieurs à ceux observés chez la lignée de L.d. infectée par la même concentration virale en VPC (figure 20a).

* Période post-infection est de 10 heures à 15 heures car il y a contamination dans les puits se référant aux cellules infectées au cours de la période post-infection précédente soit 7 heures à 9 heures.

Effet d'une concentration virale en VPC DE $10^{2.7}$ DICT_{50/ml}

L. dispar

La figure 21a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{2.7}$ DICT_{50/ml}.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour les ag viraux sont moindres que ceux notés chez cette même lignée soumise à une concentration virale en VPC plus élevée par exemple $10^{3.7}$ DICT_{50/ml}. Aussi de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux est de 4 à 22% alors que le pourcentage de ces mêmes cellules marquées par un sérum anti-virus passe de 2 à 24% et que celui correspondant aux cellules marquées par un sérum anti-polyèdre s'échelonne de 8* à 9%.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces ag viraux sont encore moindres comparative-ment à ceux observés chez cette même lignée (L.d.) soumise à une concentration virale en VPC plus élevée (figure 20a).

Au cours de la phase tardive d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces mêmes ag sont encore inférieurs à ceux visualisés à la figure 20a pour cette même période post-infection. A ce stade,

* résultat à 11 heures puisqu'il n'y a pas de données aux heures précédentes dues à des contaminations bactériennes dans les puits cellulaires infectés antérieurement.

CONCENTRATION VIRALE EN VPC: $10^{2.7}$ DICT_{50/ml}

Température: 28°C

Anti-intestin
de larves infectées: —

Anti-virus
purifié: - - - -

Anti-polyèdre:

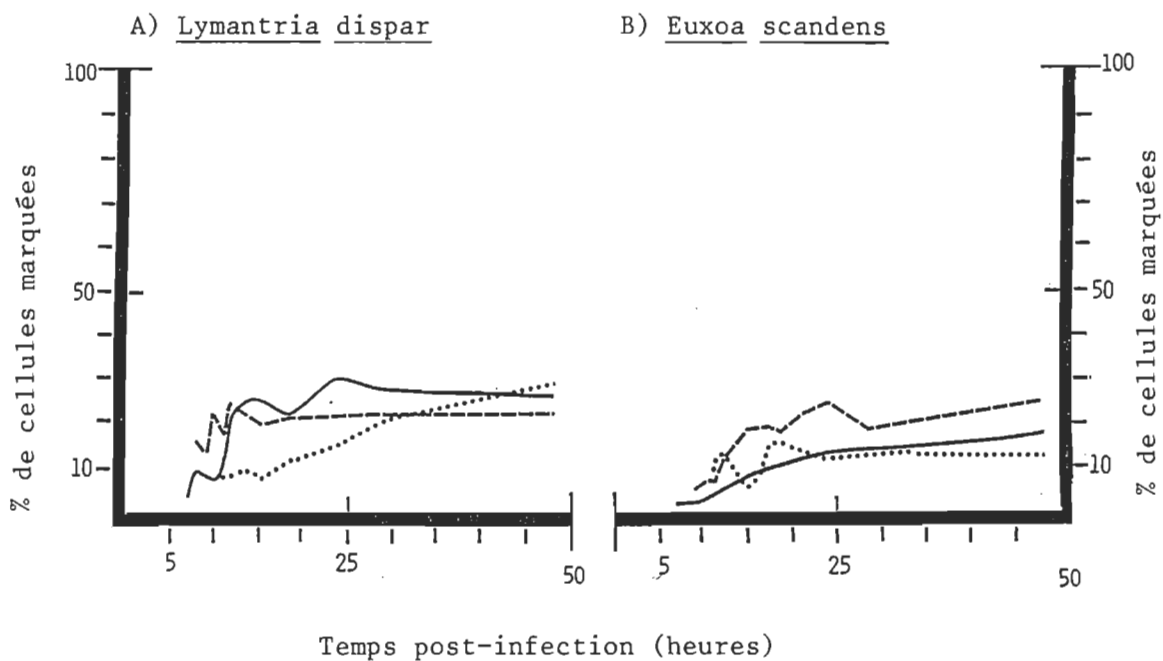


Figure 21 Effet de la concentration du VPC d'*E. scandens* sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux de ce VPC chez les lignées cellulaires de *Lymantria dispar* et d'*Euxoa scandens* suivies en immunoperoxydase.

il se produit une phase de progression très lente et régulière des pourcentages de cellules marquées pour les ag associés aux protéines polyédriques puisqu'il n'y a que 29% des cellules marquées par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection. Au cours de cette même période d'infection les pourcentages relatifs à l'ensemble des ag viraux et aux ag associés aux capsides virales sont à un stade de plateau et respectivement 27% et 23% des cellules sont marquées par leurs sérums homologues à un même temps post-infection (48 heures).

E. scandens

La figure 21b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à cette même concentration virale de $10^{2.7}$ DICT₅₀/ml.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour certains ag (les ag viraux dans leur ensemble et les ag associés aux capsides virales) sont inférieurs à ceux notés chez la lignée de L.d. soumise à une même concentration virale en VPC (figure 21a). Cependant les pourcentages relatifs aux ag associés aux protéines polyédriques sont supérieurs.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour l'ensemble des ag viraux et pour les ag associés aux protéines polyédriques sont moindres que ceux observés chez la lignée de L.d. soumise à une même concentration virale en VPC (figure 21a). Cependant les pourcentages relatifs aux ag associés aux capsides virales sont supérieurs.

Au cours de la phase tardive d'infection, il y a progression lente et régulière des pourcentages de cellules marquées pour les ag associés à ces capsides virales et pour les ag viraux dans leur ensemble pour atteindre des pourcentages finaux peu élevés puisqu'il n'y a respectivement que 25% et 18% des cellules marquées par leurs sérums homologues à 48 heures post-infection. Cependant les pourcentages relatifs aux ag associés aux protéines polyédriques sont à une phase de plateau et 13% des cellules sont marquées par un sérum anti-polyèdre à des temps post-infection tardifs.

Effet d'une concentration virale en VPC de $10^{0.7}$ DICT_{50/ml}

L. dispar

La figure 22a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{0.7}$ DICT_{50/ml}.

Au cours des diverses périodes post-infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux du VPC sont très inférieurs à ceux observés chez la même lignée soumise à une concentration virale en VPC plus élevée telle $10^{2.7}$ DICT_{50/ml} par exemple (figure 21a).

E. scandens

La figure 22b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à cette même concentration virale de $10^{0.7}$ DICT_{50/ml}.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour certains ag (les ag associés aux capsides virales

CONCENTRATION VIRALE EN VPC: $10^{0.7}$ DICT_{50/ml}

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées: ——— Anti-virus purifié: ——— Anti-polyèdre dissout:

A) Lymantria dispar

B) Euxoa scandens

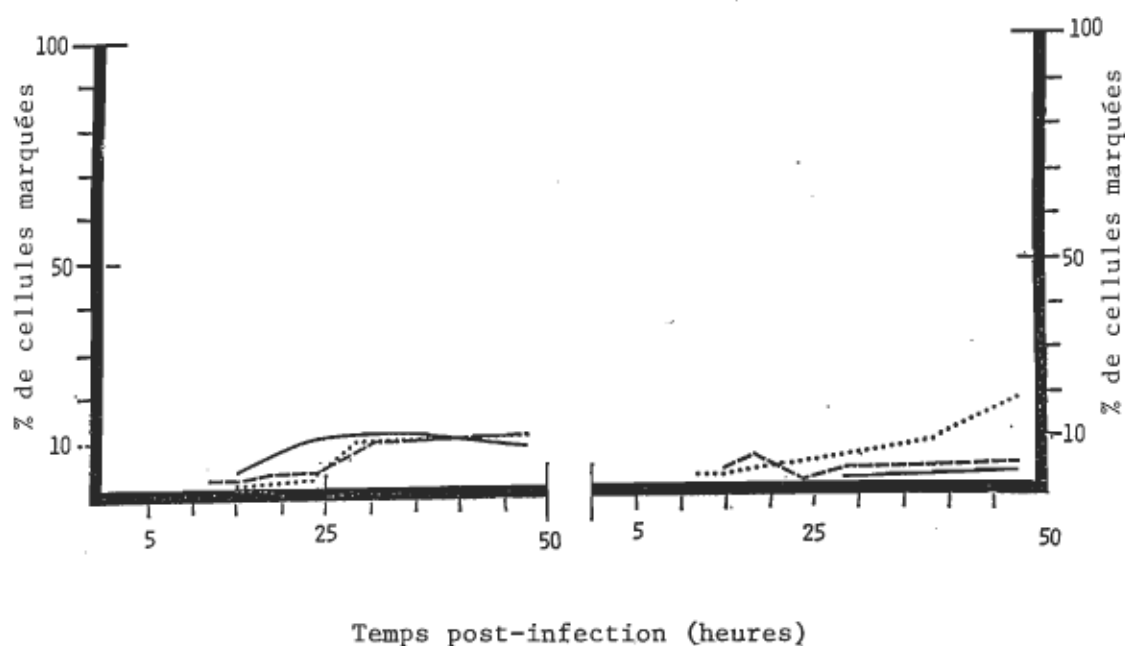


Figure 22

Effet de la concentration du VPC d'E. scandens sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux de ce VPC chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

et ceux associés aux protéines polyédriques) sont légèrement plus élevés chez cette lignée par rapport à ceux observés chez l'autre lignée (L.d.) infectée à une même concentration virale en VPC (figure 22a). Néanmoins lors des phases intermédiaire et tardive post-infection les pourcentages relatifs aux divers ag y sont inférieurs.

III-2.2.2 Effet de la température d'incubation (agent physique) sur le mécanisme de la réplication du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires d'E. scandens et de L. dispar

En guise de résultats quantitatifs obtenus en Ip, les figures 23 à 27 représentent quelques cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dépistés à l'aide des divers sérums selon la température d'incubation impliquée chez les lignées cellulaires de L.d. et d'E.s..

Les diverses températures d'incubation testées sont de 37°C (figure 23), de 32°C (figure 24), et de 28°C (figure 25), de 18°C (figure 26) et de 10°C (figure 27).

Les effets de ces cinq températures d'incubation diverses sont mesurés chez ces deux lignées cellulaires infectées avec une même concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml.

Aussi les cinétiques d'apparition des divers ag étudiés sont suivies par les deux méthodes de détection (directe et indirecte) à l'Ip (section III-2.2).

Effet de la température d'incubation de 37°CL. dispar

La figure 23a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et incubée à une température de 37°C.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont légèrement supérieurs à ceux obtenus chez cette même lignée infectée avec la même concentration à une température de 32°C (figure 24a). Par exemple, au moment de la phase précoce d'infection, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux est de 14 à 20% alors que le pourcentage de ces mêmes cellules marquées par un sérum anti-virus passe de 12 à 38% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 14 à 35%. Cependant on y constate des fluctuations des pourcentages de cellules marquées.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, on observe un fléchissement accentué des pourcentages de cellules marquées des divers ag étudiés. Plus tard il se produit une progression lente et régulière des pourcentages relatifs aux capsides virales pour atteindre un pourcentage final de 42% des cellules marquées par un sérum anti-virus à 28 heures*

* Cette lignée a présenté des problèmes de culture à une température aussi élevée (37°C) ce qui a eu pour conséquence de nous empêcher d'obtenir des observations après 28 heures d'incubation à cette température.

TEMPERATURE: 37°C

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Anti-intestin de larves infectées : ——— Anti-virus purifié : — — — Anti-polyèdre dissout :

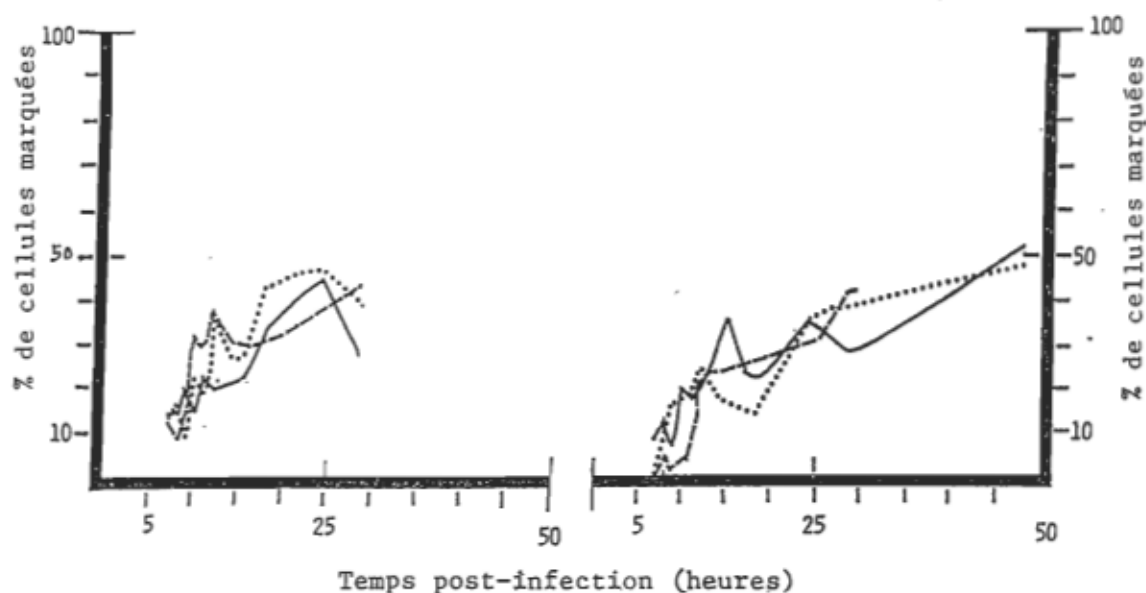
A) Lymantria disparB) Euxoa scandens

Figure 23

Effet de la température sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

post-infection. Au cours de cette même période post-infection, il y a une progression plus rapide des pourcentages relatifs aux ag viraux dans leur ensemble et aux ag associés aux protéines polyédriques atteignant respectivement des pourcentages maximum de 44% et de 46% des cellules marquées par leurs sérums homologues à 24 heures post-infection. Pour ensuite fléchir à des temps post-infection plus tardifs.

E. scandens

La figure 23b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et incubée à une même température (37°C).

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont plus bas que ceux notés chez l'autre lignée (L.d.) infectée à une même concentration virale en VPC et soumise à une même température d'incubation (figure 23a). Cependant on y constate encore des fluctuations des pourcentages de cellules marquées au cours de l'infection.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, on note un fléchissement plus accentué des pourcentages de cellules marquées pour les ag associés aux protéines polyédriques bien que l'on observe une fluctuation des pourcentages de cellules marquées pour les ag viraux dans leur ensemble. A cette même période post-infection, on remarque aussi une progression lente et régulière des pourcentages relatifs aux antigènes des capsides virales pour atteindre un pourcentage final de 41% de cellules marquées par un sérum anti-virus à 28 heures post-infection. Plus tard,

on note une augmentation lente et régulière des pourcentages relatifs aux ag viraux dans leur ensemble et aux ag associés aux protéines polyédriques atteignant respectivement des pourcentages de 52% et de 47% des cellules marquées par leurs sérums homologues à 48 heures post-infection.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux chez cette lignée E.s. incubée à 37°C sont supérieurs à ceux obtenus chez cette même lignée infectée avec la même concentration à une température de 32°C (figure 24b). Quoiqu'ils sont inférieurs à ceux obtenus chez cette lignée incubée à 28°C (figure 25b).

Effet de la température d'incubation de 32°C

L. dispar

La figure 24a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et incubée à une température de 32°C.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux sont inférieurs à ceux obtenus chez cette même lignée infectée avec la même concentration à une température de 28°C (figure 25a). Par exemple, au moment de la phase précoce d'infection (figure 24a) de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 9 à 26% alors que le pourcentage de ces mêmes cellules marquées par un sérum anti-virus est de 10 à 31% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne

TEMPERATURE: 32°C

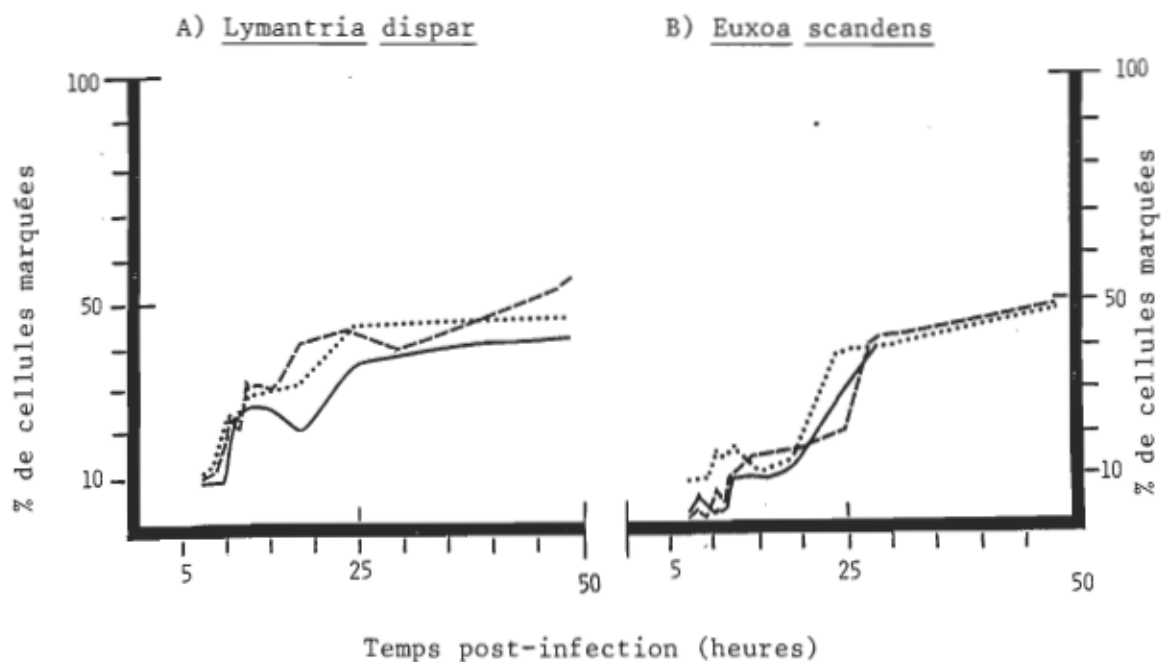
Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/mlAnti-intestin
de larves infectées: —Anti-virus
purifié: - - - -Anti-polyèdre:
dissout:

Figure 24 Effet de la température sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

de 11 à 29%. Cependant les vitesses de synthèse en terme d'augmentation des pourcentages de cellules marquées sont sensiblement les mêmes.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, on note une progression lente et régulière des pourcentages de cellules marquées pour les ag associés aux capsides virales et pour les ag associés aux protéines polyédriques bien qu'il se produit un fléchissement des pourcentages relatifs aux ag viraux dans leur ensemble. Cependant à une période d'infection plus tardive, on remarque une phase de plateau des pourcentages de cellules marquées pour les ag associés aux protéines polyédriques et pour les ag viraux dans leur ensemble puisque respectivement 46% et 42% des cellules sont marquées par leurs sérums homologues à 48 heures post-infection. Pendant ce temps, il y a une progression lente et régulière des pourcentages relatifs aux capsides virales puisque 55% des cellules sont marquées par un sérum anti-virus à un même temps post-infection.

E. scandens

La figure 24b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et incubée à une même température (32°C).

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont de beaucoup inférieurs à ceux observés chez la lignée de L.d. infectée à une même concentration virale en VPC et soumise à une même température d'incubation (figure 24a).

Cependant les taux de détection en termes de pourcentages de cellules marquées sont très variables.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, ces mêmes pourcentages sont encore inférieurs chez cette lignée E.s. par rapport à ceux observés chez l'autre lignée (figure 24a). On remarque une progression rapide et régulière des pourcentages relatifs aux divers ag viraux chez cette même lignée (E.s.) au cours de cette même période post-infection. Bien qu'elle soit plus lente et toujours régulière en ce qui a trait aux pourcentages relatifs aux capsides virales et aux ag associés aux protéines polyédriques à une période post-infection plus tardive.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux chez la lignée d'E.s. incubée à 32°C sont très inférieurs à ceux obtenus chez cette même lignée incubée à 28°C (figure 25b).

Effet de la température d'incubation de 28°C

Quelle que soit la période post-infection en cours et quelle que soit la lignée infectée (L.d. ou E.s.) incubée à des températures supérieures (32°C; 37°C) ou inférieures (10°C; 18°C) à celle de 28°C, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux sont toujours inférieurs à ceux obtenus chez ces lignées infectées et incubées à 28°C.

Il est bon de souligner que cette température de 28°C est la température optimale de croissance des cellules de ces deux lignées lesquelles sont à des conditions idéales favorisant l'infection virale avec ce VPC d'E.s..

L. dispar

La figure 25a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et incubée à une température de 28°C.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont très importants, de même que les vitesses de synthèse en terme d'augmentation des pourcentages de cellules marquées sont élevées. Par exemple, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 18 à 39% alors que le pourcentage de ces mêmes cellules marquées par un sérum anti-virus passe de 9 à 47% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 13 à 58%.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, on observe le fléchissement des pourcentages de cellules marquées pour les ag viraux dans leur ensemble et pour les ag associés aux capsides virales alors que ceux relatifs aux ag associés aux protéines polyédriques sont stables. Une régression moindre des pourcentages relatifs aux ag associés à ces protéines polyédriques se produit plus tard.

Finalement, il y a une progression lente et régulière des pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux pour atteindre des pourcentages finaux très élevés puisque 68% des cellules sont marquées par des sérums anti-intestin et anti-virus et que 61% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection. En guise de conclusion, le comportement de ces trois cinétiques d'apparition de ces ag

TEMPERATURE: 28°C

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Anti-intestin : ——— Anti-virus : — — — Anti-polyèdre :
de larves infectées : purifié : dissout :

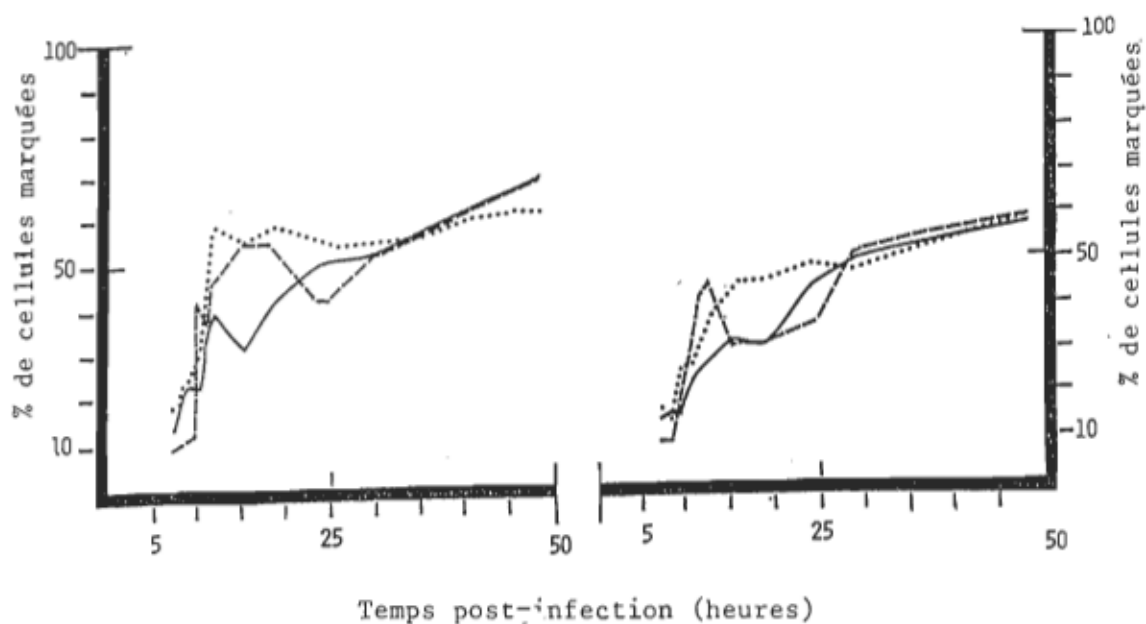
A) Lymantria disparB) Euxoa scandens

Figure 25

Effet de la température sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

viraux est le même que celui présenté à la figure 19a où cette même lignée L.d. est soumise aux mêmes conditions physico-chimiques.

E. scandens

La figure 25b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et incubée à une même température (28°C).

Là encore, le comportement de ces diverses cinétiques d'apparition de ces ag viraux est le même que celui présenté à la figure 19b où cette même lignée E.s. est sujette aux mêmes conditions physico-chimiques. Voir à ce propos la description plus détaillée du cheminement de la synthèse de ces ag viraux énoncée à la section III-2.2.1 .

Effet de la température d'incubation de 18°C

L. dispar

La figure 26a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et incubée à une température de 18°C.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont très inférieurs à ceux obtenus chez cette même lignée infectée avec la même concentration virale à une température de 28°C (figure 25a).

E. scandens

La figure 26b représente les cinétiques d'apparition des divers

TEMPERATURE: 18°C

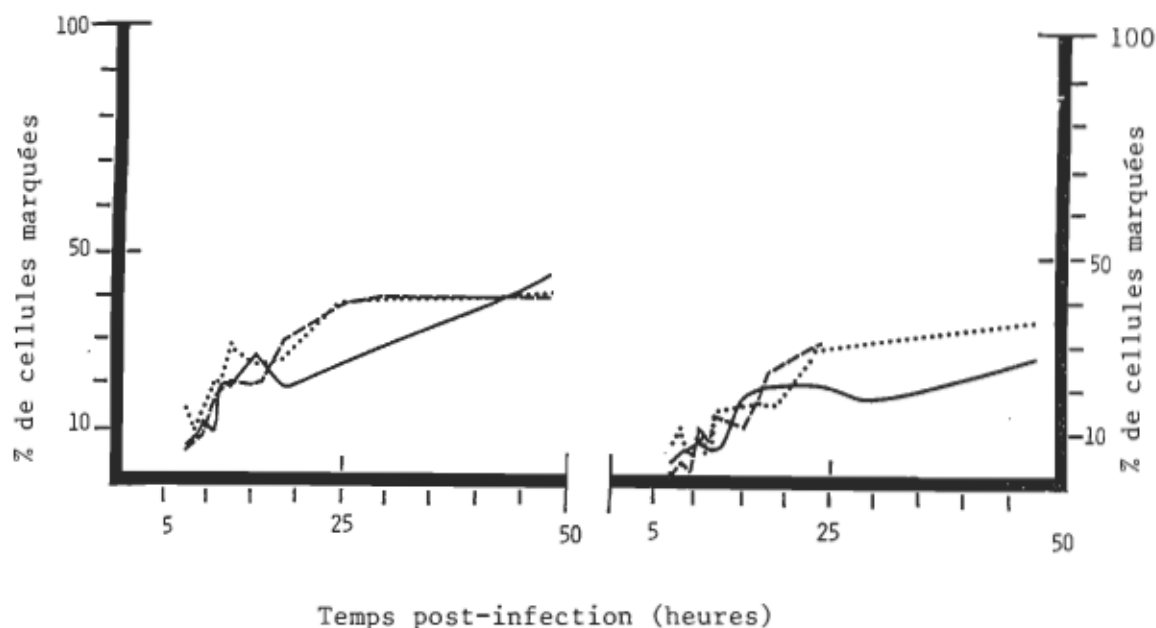
Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/mlAnti-intestin
de larves infectées: —Anti-virus
purifié: - - -Anti-polyèdre:
dissout:A) Lymantria disparB) Euxoa scandens

Figure 26 Effet de la température sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et incubée à une même température (18°C).

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages des cellules marquées pour ces divers ag viraux sont plus bas que ceux notés chez l'autre lignée (L.d.) infectée à une même concentration virale en VPC et soumise à une même température de 18°C (figure 26a). Aussi les vitesses de synthèse en terme d'augmentation des pourcentages de cellules marquées varient.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, ces mêmes pourcentages y sont encore inférieurs par rapport à ceux observés chez l'autre lignée (figure 26a). On remarque aussi une progression lente et régulière des pourcentages relatifs aux divers ag viraux étudiés chez cette lignée E.s. et ce, à des temps post-infection tardifs.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux chez la lignée d'E.s. incubée à 18°C sont très inférieurs à ceux obtenus chez cette même lignée incubée à 28°C (figure 25b).

Effet de la température d'incubation de 10°C

L. dispar

La figure 27a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et incubée à une température de 10°C.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcen-

TEMPERATURE: 10°C

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}

Anti-intestin de larves infectées : ——— Anti-virus purifié : - - - Anti-polyèdre dissout :

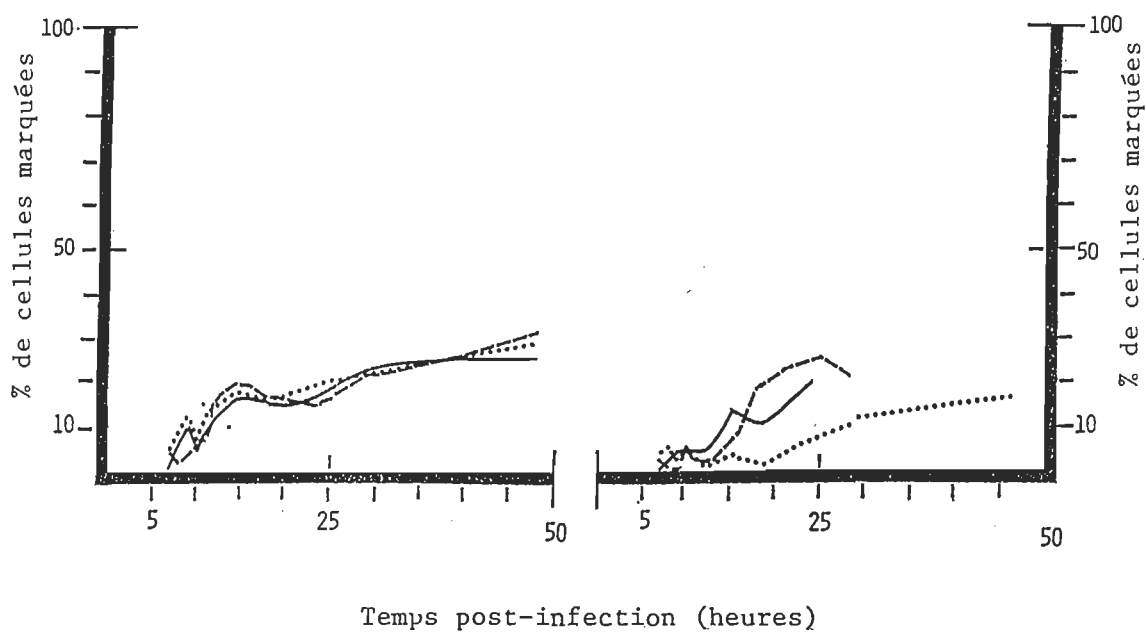
A) Lymantria disparB) Euxoa scandens

Figure 27

Effet de la température sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

tages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont inférieurs à ceux obtenus chez cette même lignée infectée avec la même concentration virale à une température de 18°C (figure 26a).

E. scandens

La figure 27b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et incubée à une même température (10°C).

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages des cellules marquées pour ces divers ag viraux sont plus bas que ceux notés chez l'autre lignée (L.d.) infectée à une même concentration virale en VPC et soumise à une température de 10°C (figure 27a). Aussi les vitesses de détection en terme d'augmentation des pourcentages de cellules marquées varient.

Au cours de la période post-infection tardive, les pourcentages de ces cellules marquées pour l'ensemble des ag viraux et pour les ag associés aux protéines polyédriques sont encore inférieurs à ceux observés chez l'autre lignée (L.d.) soumise aux mêmes conditions physico-chimiques (figure 27a). Par contre, les pourcentages relatifs aux ag associés aux capsides virales y sont supérieurs.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux chez la lignée d'E.s. incubée à 10°C sont inférieurs à ceux obtenus chez cette même lignée incubée à 18°C (figure 26b).

III-2.2.3 Effet d'un inhibiteur (cordycépine) sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires d'E. scandens et de L. dispar

III-2.2.3.1 Effet de la concentration en cordycépine sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E.s. chez les lignées cellulaires d'E. scandens et de L. dispar

En guise de résultats quantitatifs obtenus en Ip, les figures 29 à 31 représentent quelques cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dépistés à l'aide des divers sérums selon la concentration en cordycépine impliquée chez les lignées cellulaires de L.d. et d'E.s..

Les diverses concentrations de cet inhibiteur testées telles 0.10 ug/ml (figure 29), 0.20 ug/ml (figure 30), et 0.40 ug/ml (figure 31) sont appliquées après un temps d'infection virale sans cordycépine de 1 heure. Les effets de ces trois concentrations en cordycépine à 28°C sont mesurés chez les deux lignées cellulaires soumises à une même concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}. Ces mêmes effets sont suivis par les deux méthodes de détection (directe et indirecte) à l'Ip (section III-2.2).

Aussi toutes les expériences à ce propos sont contrôlées en testant d'une part l'effet seul de la concentration virale en VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}) sans cordycépine chez les deux lignées cellulaires (figure 28), et d'autre part en testant l'effet seul de la cordycépine sur les deux mêmes lignées. Ce dernier test ne donne aucun marquage quels que soient le sérum conjugué et la lignée cellulaire utilisés.

CONCENTRATION VIRALE EN VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Température: 28°C

Anti-intestin
de larves infectées: ———

Anti-virus
purifié: - - - -

Anti-polyèdre
dissout:

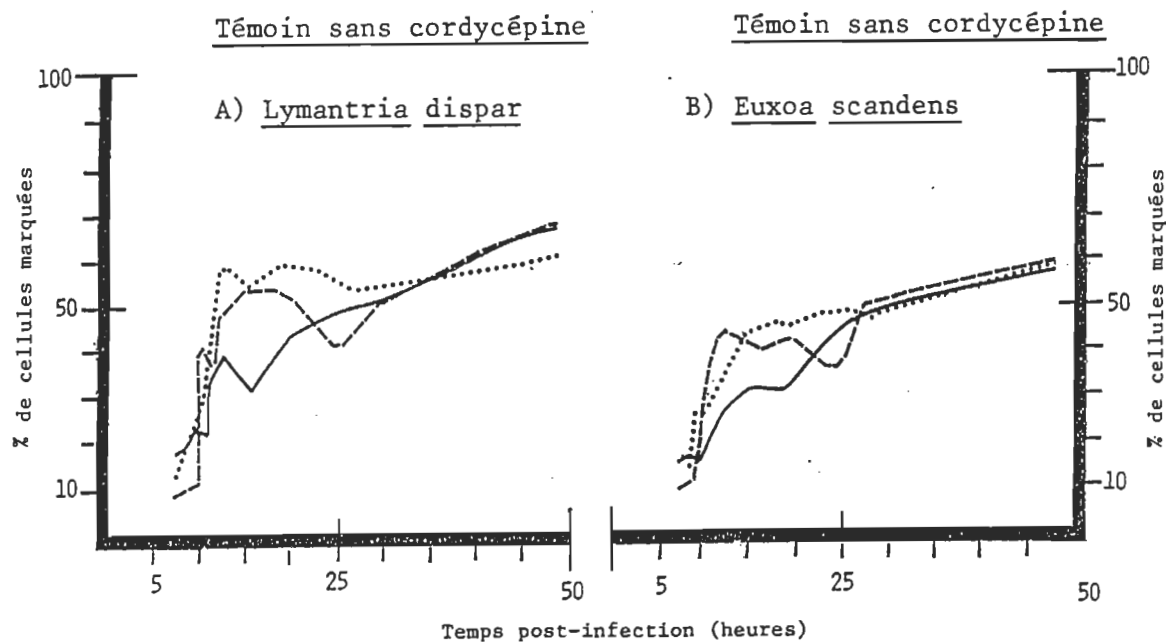


Figure 28 Cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'*E. scandens* sans présence d'inhibiteur chez les lignées cellulaires de *Lymantria dispar* et d'*Euxoa scandens* suivies en immunoperoxydase.

Effet d'une concentration en cordycépine de 0.10 ug/ml

L. dispar

La figure 29a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et à une concentration en cordycépine de 0.10 ug/ml à une période post-infection de 1 heure.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus chez la lignée de L.d.-témoin infectée sans cordycépine (figure 28a). Par exemple, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 11 à 30% alors que celui de cellules marquées par le sérum anti-virus est de 8 à 46% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 14 à 40%. Par la suite, il se produit une phase de fléchissement des pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux. Au moment de cette même période post-infection intermédiaire, ces mêmes pourcentages sont inférieurs à ceux obtenus chez la même lignée-témoin infectée sans cordycépine (figure 28a). Puis survient une étape de progression lente et régulière des pourcentages de cellules marquées atteignant des pourcentages finaux élevés de 46% des cellules marquées par un sérum anti-intestin, de 53% des cellules marquées par un sérum anti-virus et de 54% des cellules marquées par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

CONCENTRATION DE LA CORDYCEPINE: 0.10 ug/ml

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Temps d'infection virale sans cordycépine: 1 heure

Température: 28°C

Anti-intestin
de larves infectées: —

Anti-virus
purifié: - - -

Anti-polyèdre
dissout:

A) Lymantria dispar

B) Euxoa scandens

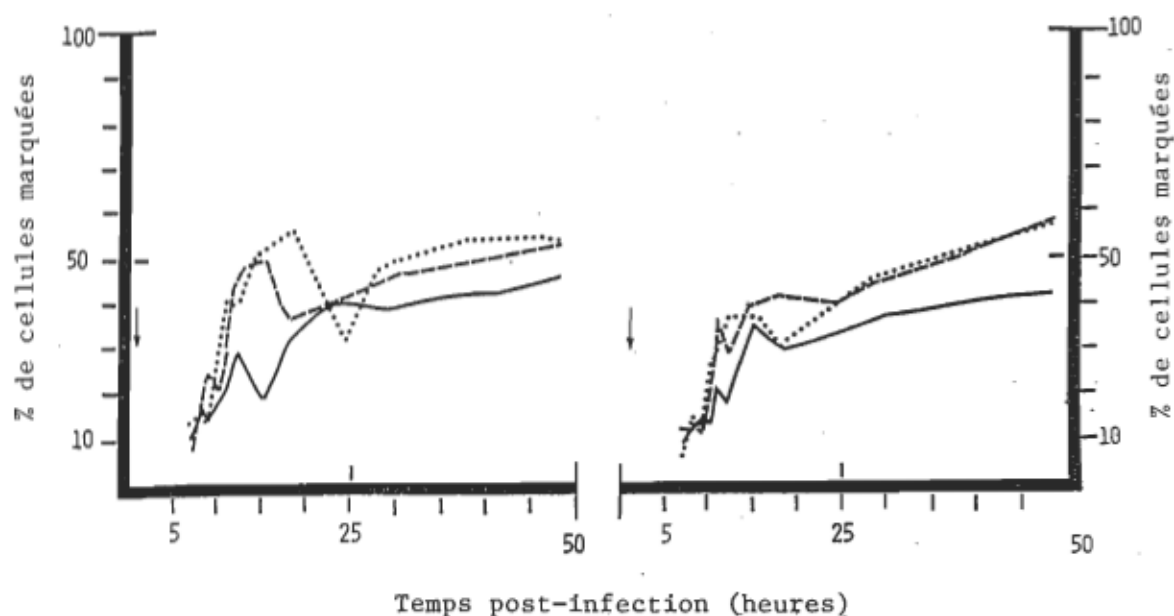


Figure 29

Effet de la concentration d'un inhibiteur (cordycépine) sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'*E. scandens* chez les lignées cellulaires de *Lymantria dispar* et d'*Euxoa scandens* suivies en immunoperoxydase.

E. scandens

La figure 29b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et à une même concentration en cordycépine à une période post-infection de 1 heure.

Au cours de la phase précoce d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus chez la lignée d'E.s.-témoin infectée sans cordycépine (figure 28b). Il en est de même par rapport à l'autre lignée (L.d.) infectée par le VPC et inhibée par ce même inhibiteur (figure 29a). Aussi les vitesses de synthèse en terme d'augmentation des pourcentages de cellules marquées sont les mêmes.

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, les pourcentages de cellules marquées pour les ag viraux dans leur ensemble et pour les ag associés aux capsides virales sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus chez la lignée d'E.s.-témoin infectée sans cordycépine (figure 28b). Cependant ceux relatifs aux ag associés aux protéines polyédriques y sont inférieurs. Comparativement à l'autre lignée (L. dispar) soumise aux mêmes conditions physico-chimiques (figure 29a) les pourcentages de cellules marquées chez cette lignée E.s. sont à des pourcentages plus bas au cours de cette même période post-infection. A ce niveau, on remarque de plus une phase de fléchissement générale des pourcentages relatifs aux divers ag viraux. Puis se manifeste aussi une phase de progression lente et régulière de ces pourcentages pour atteindre des pourcentages finaux élevés puisque 42% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin,

que 58% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 57% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

Effet d'une concentration en cordycépine de 0.20 µg/ml

L. dispar

La figure 30a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à une concentration en cordycépine de 0.20 µg/ml à une période post-infection de 1 heure.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont très inférieurs à ceux observés chez la lignée de L.d.-témoin infectée sans cordycépine (figure 28a), de même chez cette même lignée infectée mais inhibée avec une concentration en cordycépine plus faible telle 0.10 µg/ml (figure 29a).

Par exemple, au cours de la phase précoce d'infection, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 5 à 11% alors que celui de cellules marquées par le sérum anti-virus est de 2 à 12% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 6 à 22%.

Puis il se produit aussi une phase de fléchissement des pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux au moment de la période post-infection intermédiaire. Puis survient aussi une étape de progression lente et régulière de ces pourcentages atteignant des pourcen-

CONCENTRATION DE LA CORDYCEPINE: 0.20 ug/ml

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Temps d'infection virale sans cordycépine: 1 heure

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées : ——— Anti-virus purifié : — — — Anti-polyèdre dissout :

A) Lymantria dispar

B) Euxoa scandens

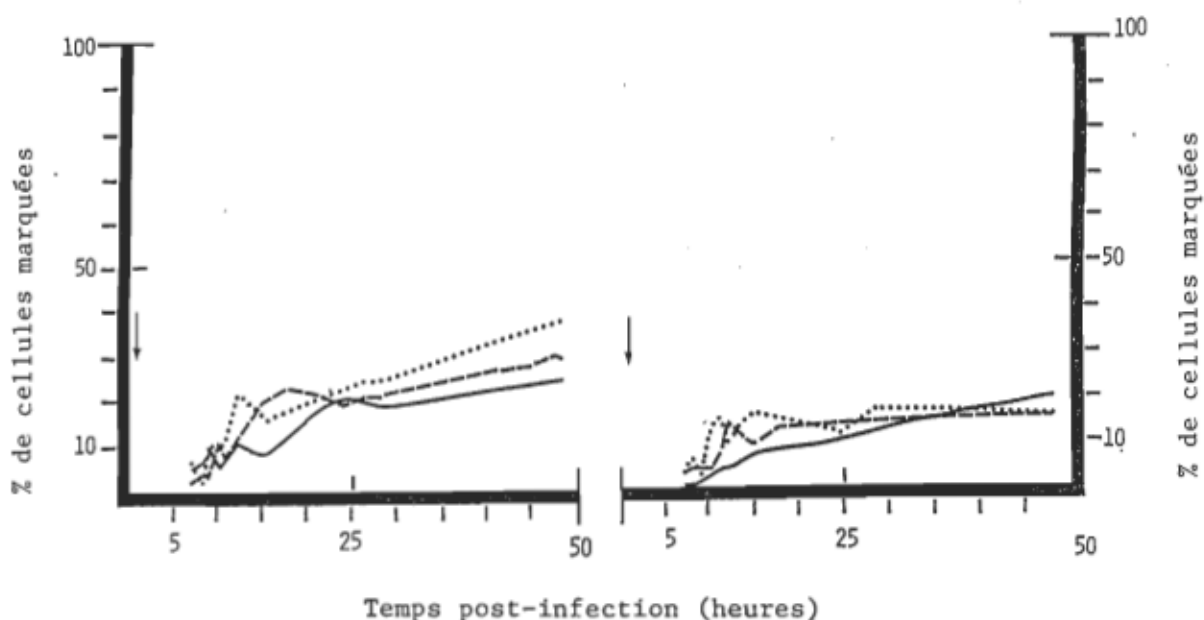


Figure 30

Effet de la concentration d'un inhibiteur (cordycépine) sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'*E. scandens* chez les lignées cellulaires de *Lymantria dispar* et d'*Euxoa scandens* suivies en immunoperoxydase.

tages finaux moins élevés que ceux obtenus chez cette même lignée (L.d.) inhibée avec une concentration en cordycépine de 0.10 ug/ml (figure 29a). C'est-à-dire 25% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin, que 30% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 38% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

E. scandens

La figure 30b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et à une même concentration en cordycépine à une période post-infection de 1 heure.

Quelle que soit la période post-infection en cours, là aussi les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont très inférieurs à ceux observés chez la lignée d'E.s.-témoin infectée sans cordycépine (figure 28b), de même que chez cette même lignée infectée mais inhibée avec une concentration en cordycépine plus faible telle 0.10 ug/ml (figure 29b). Par contre ces pourcentages sont légèrement plus bas que ceux obtenus chez l'autre lignée (figure 30a) soumise aux mêmes conditions physico-chimiques que la lignée d'E.s. (figure 30b).

Par exemple, au cours de la phase précoce d'infection, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 0 à 4% alors que celui de cellules marquées par un sérum anti-virus est de 3 à 14% et que celui correspondant aux cellules marquées par un sérum anti-polyèdre s'échelonne de 3 à 10%.

Puis il se produit une phase de plateau des pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux au cours de la période post-infection tardive pour atteindre des pourcentages finaux peu élevés. Et ce puisque 20% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin et que 15% des cellules le sont par des sérums anti-virus et anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

Effet d'une concentration en cordycépine de 0.40 µg/ml

L. dispar

La figure 31a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à une concentration en cordycépine de 0.40 µg/ml à une période post-infection de 1 heure.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux sont de beaucoup inférieurs à ceux observés chez la lignée de L.d.-témoin infectée sans cordycépine (figure 28a). Ils sont également légèrement inférieurs à ceux observés chez cette même lignée infectée mais inhibée avec une concentration en cordycépine plus faible telle 0.20 µg/ml (figure 30a).

Par exemple, au cours de la phase précoce d'infection, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 2 à 7% alors que celui de cellules marquées par le sérum anti-virus est de 3 à 7% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 4 à 6%. Puis survient une phase de plateau des pourcen-

CONCENTRATION DE LA CORDYCEPINE: 0.40 ug/ml

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Temps d'infection virale sans cordycépine: 1 heure

Température: 28°C

Anti-intestin
de larves infectées: —

Anti-virus:
purifié: ----

Anti-polyèdre:
dissout:

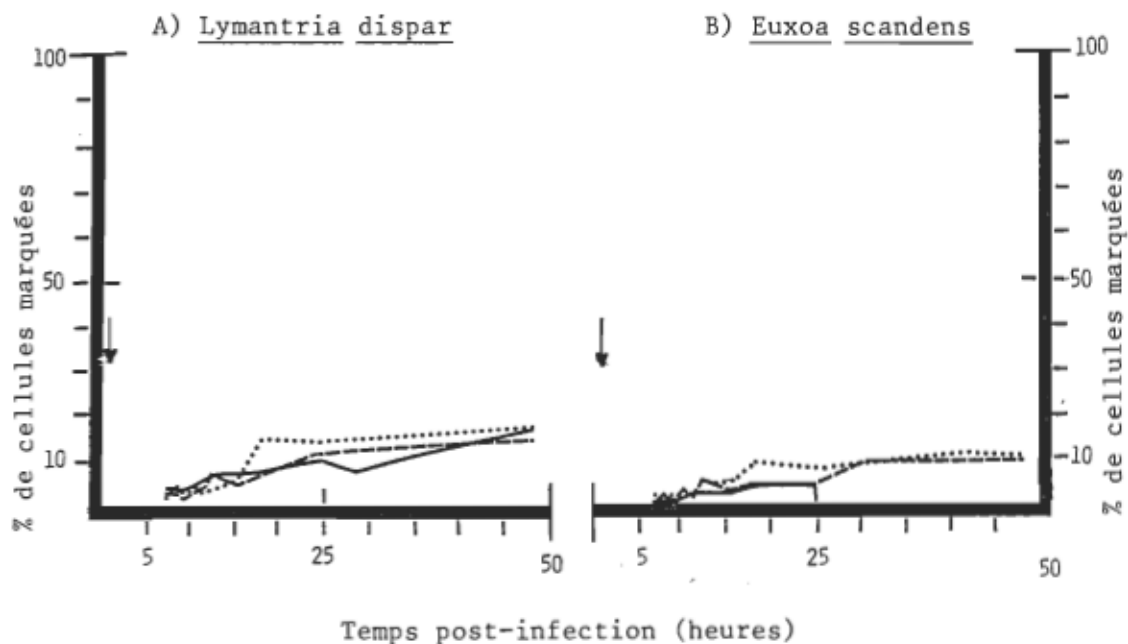


Figure 31 Effet de la concentration d'un inhibiteur (cordycépine) sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immuno-peroxydase.

tages de cellules marquées pour ces divers ag viraux au cours de la période post-infection tardive pour atteindre des pourcentages finaux très bas. Puisque 17% des cellules sont marquées par des sérums anti-intestin et anti-polyèdre et que 14% des cellules le sont par un sérum anti-virus à 48 heures post-infection.

E. scandens

La figure 31b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et à une même concentration en cordycépine à une période post-infection de 1 heure.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux sont là encore de beaucoup inférieurs à ceux obtenus chez la lignée d'E.s.-témoin infectée sans cordycépine (figure 28b). Ils sont également légèrement inférieurs à ceux obtenus chez l'autre lignée (L.d.) infectée et inhibée par cette même cordycépine à la même concentration (figure 31a). Il en est de même chez la lignée d'E.s. infectée et inhibée avec une concentration de cet antibiotique plus faible telle 0.20 ug/ml (figure 30b).

L'allure des trois cinétiques d'apparition de ces mêmes ag viraux du VPC d'E.s. chez la lignée d'E.s. (figure 31b) démontre le même schéma général de détection des ag que celui observé chez l'autre lignée (L.d.) (figure 31a).

III-2.2.3.2 Effet d'une période post-infection variée sans cordycépine sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E.s. chez les lignées cellulaires d'E. scandens et de L. dispar

En guise de résultats quantitatifs obtenus en Ip, les figures 32 à 36 représentent quelques cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dépistés à l'aide des divers sérums chez les lignées cellulaires de L.d. et d'E.s. infectées avec ce VPC et soumises à une période post-infection variée sans cordycépine avant que le processus d'inhibition avec cet antibiotique ne débute.

Les diverses périodes post-infection testées telles 1 heure (figure 32), 2 heures (figure 33), 6 heures (figure 34), 10 heures (figure 35), et 18 heures (figure 36) le sont chez ces deux lignées cellulaires infectées à une même concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml. Ces lignées cellulaires sont inhibées plus tard avec une concentration en cordycépine de 0.20 ug/ml.

Aussi, toutes ces expériences menées à 28°C sont contrôlées en testant l'effet seul du VPC chez ces deux mêmes lignées non-inhibées par cet antibiotique (figure 28) d'une part, et en testant l'effet seul de la cordycépine chez ces mêmes lignées non-infectées par ce VPC d'autre part. Ce dernier test ne donne aucun marquage quels que soient le sérum conjugué et la lignée cellulaire utilisés. De plus, tous ces effets étudiés sont suivis par les deux méthodes de détection (directe et indirecte) à l'Ip (section III-2.2).

Effet d'une période post-infection de 1 heure sans cordycépine

L. dispar

La figure 32a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à une concentration en cordycépine de 0.20 ug/ml à une période post-infection de 1 heure.

Il est bon de souligner que l'allure des trois cinétiques d'apparition de ces ag viraux du VPC démontrée en cette figure 32a est identique à celle représentée à la figure 30a puisqu'il s'agit de la même lignée (L.d.) soumise aux mêmes conditions physico-chimiques. Aussi pour avoir une description plus détaillée de ces cinétiques présentées à la figure 32a, se référer à la section précédente III-2.2.3.1 .

E. scandens

La figure 32b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et à une même concentration en cordycépine à une même période post-infection de 1 heure.

Il est bon de souligner que l'allure des trois cinétiques d'apparition de ces mêmes ag viraux du VPC démontrée en cette figure 32b est identique à celle représentée à la figure 30b puisqu'il s'agit de la même lignée (E.s.) soumise aux mêmes conditions physico-chimiques. Aussi pour avoir une description plus détaillée de ces cinétiques présentées à la figure 32b, se référer à la section précédente III-2.2.3.1 .

TEMPS D'INFECTION VIRALE SANS CORDYCEPINE: 1 heure

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Concentration de la cordycépine: 0.20 ug/ml

Température: 28°C

Anti-intestin
de larves infectées: ———

Anti-virus
purifié: — — —

Anti-polyèdre:
dissout:

A) Lymantria dispar

B) Euxoa scandens

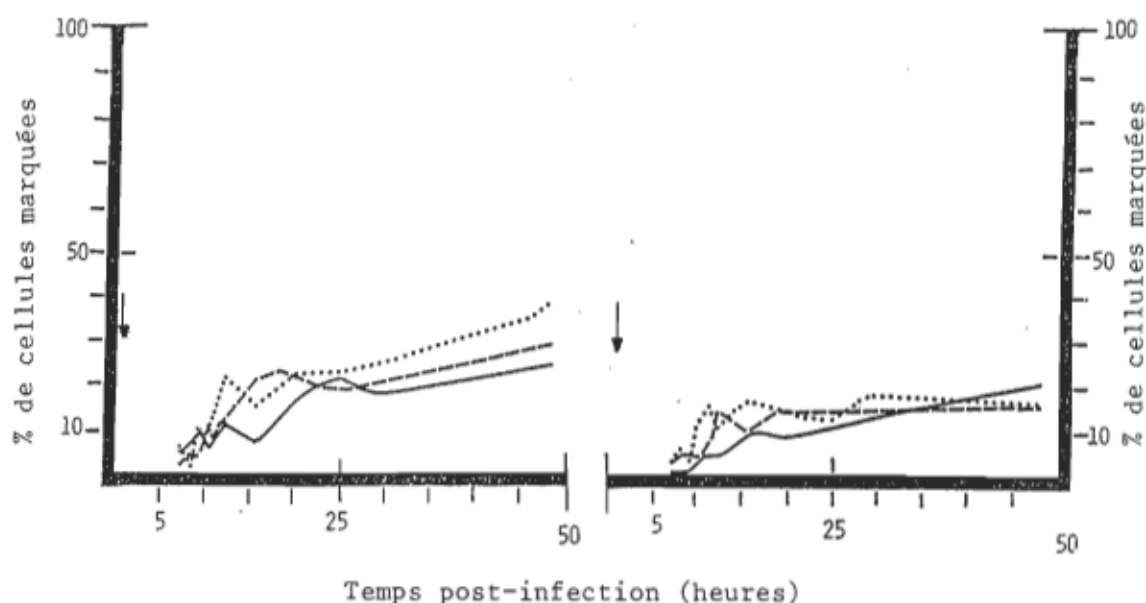


Figure 32 Effet d'une période post-infection variée sans cordycépine sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'*E. scandens* chez les lignées cellulaires de *Lymantria dispar* et d'*Euxoa scandens* suivies en immunoperoxydase.

Effet d'une période post-infection de 2 heures sans cordycépine

L. dispar

La figure 33a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à une concentration en cordycépine de 0.20 µg/ml à une période post-infection de 2 heures.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont encore inférieurs à ceux obtenus chez la même lignée-témoin infectée sans cordycépine (figure 28a). Quoiqu'ils sont légèrement plus élevés que ceux obtenus chez cette même lignée infectée et inhibée par la même concentration en cordycépine mais à une période post-infection de 1 heure (figure 32a).

Par exemple, au cours de la phase précoce d'infection, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 5 à 22% alors que celui de cellules marquées par le sérum anti-virus est de 4 à 14% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 2 à 29%.

Aussi il se produit une phase de fléchissement des pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux au moment de la période post-infection intermédiaire.

Puis survient aussi une étape de progression lente et régulière de ces pourcentages atteignant des pourcentages finaux plus élevés que ceux présentés à la figure 32a. Puisque 40% des cellules sont marquées

TEMPS D'INFECTION VIRALE SANS CORDYCEPINE: 2 HEURES

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Concentration de la cordycépine: 0.20 ug/ml

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées : ——— Anti-virus purifié : ——— Anti-polyèdre dissout :

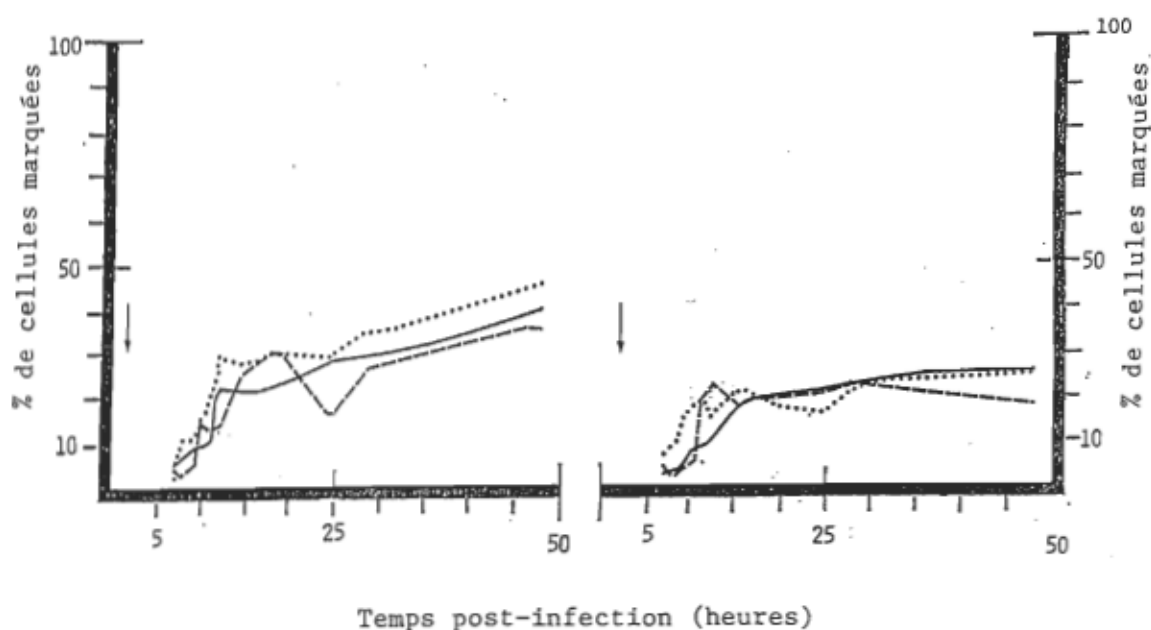
A) Lymantria disparB) Euxoa scandens

Figure 33

Effet d'une période post-infection variée sans cordycépine sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

par un sérum anti-intestin, que 35% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 44% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

E. scandens

La figure 33b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et à une même concentration en cordycépine à une même période post-infection de 2 heures.

Quelque soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont encore inférieurs à ceux obtenus chez la même lignée-témoin infectée sans cordycépine (figure 28b). Quoiqu'ils sont légèrement plus élevés que ceux obtenus chez cette même lignée infectée et inhibée par la même concentration en cordycépine mais à une période post-infection de 1 heure (figure 32b). Par contre ces taux sont inférieurs à ceux notés chez l'autre lignée (L.d.) (figure 33a) soumise aux mêmes conditions physico-chimiques que la lignée d'E.s. (figure 33b).

Effet d'une période post-infection de 6 heures sans cordycépine

L. dispar

La figure 34a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à une concentration en cordycépine de 0.20 µg/ml à une période post-infection de 6 heures.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont encore inférieurs à ceux obtenus chez la même lignée-témoin infectée sans cordycépine (figure 28a). Quoiqu'ils sont plus élevés que ceux obtenus chez cette même lignée infectée et inhibée par la même concentration en cordycépine mais à une période post-infection de 1 heure (figure 32a) et de 2 heures (figure 33a).

Par exemple, au cours de la phase précoce d'infection, de 7 heures à 12 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux passe de 14 à 28% alors que celui de cellules marquées par le sérum anti-virus est de 7 à 38% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 4 à 24%.

Aussi il se produit une phase de fléchissement plus légère des pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux au moment de la période post-infection intermédiaire. Puis survient une étape de progression lente et régulière de ces pourcentages atteignant des pourcentages finaux encore plus élevés que ceux présentés aux figures 32a et 33a. Puisque 61% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin, que 46%

TEMPS D'INFECTION VIRALE SANS CORDYCEPINE: 6 heures

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Concentration de la cordycépine: 0.20 ug/ml

Température: 28°C

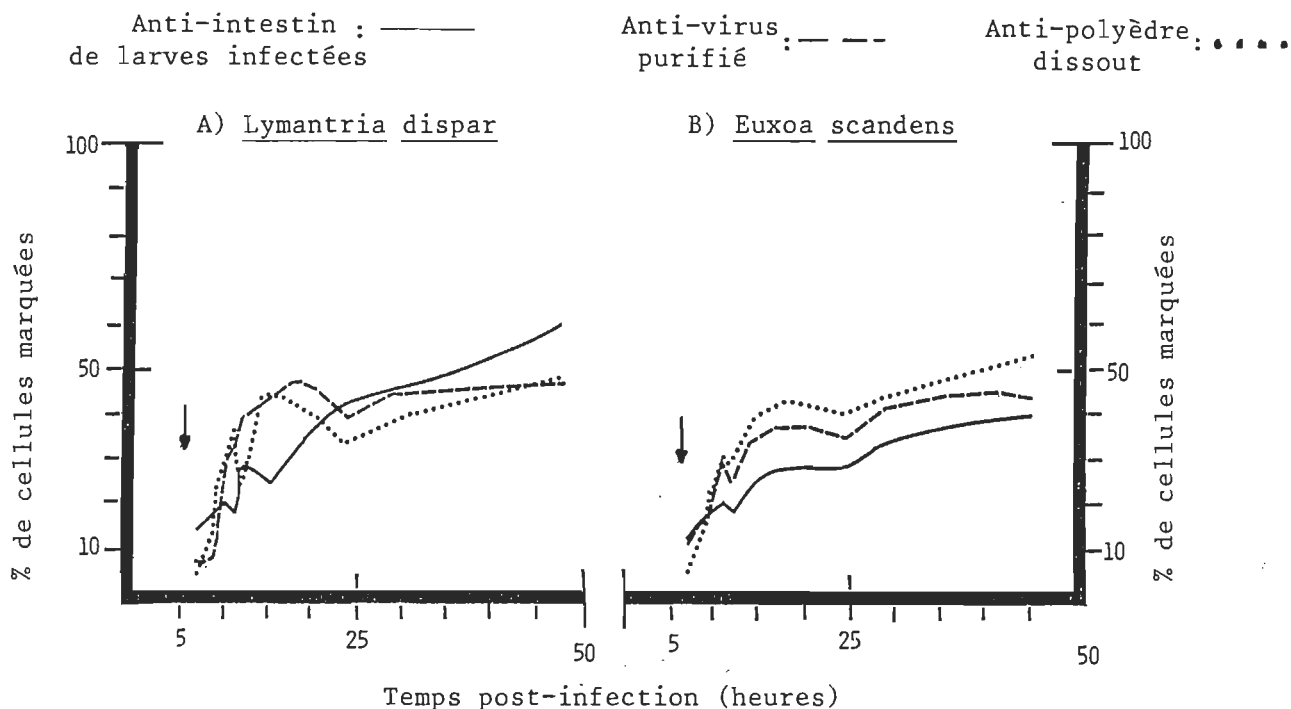


Figure 34 Effet d'une période post-infection variée sans cordycépine sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 48% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

E. scandens

La figure 34b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et à une même concentration en cordycépine à une même période post-infection de 6 heures.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont encore inférieurs à ceux obtenus chez la même lignée-témoin infectée sans cordycépine (figure 28b). Ils sont très élevés par rapport à ceux obtenus chez cette même lignée infectée et inhibée par la même concentration en cordycépine mais à une période post-infection de 1 heure (figure 32b) et de 2 heures (figure 33b). Par contre ces pourcentages sont encore inférieurs à ceux notés chez l'autre lignée (L.d.) (figure 34a) soumise aux mêmes conditions physico-chimiques que la lignée d'E.s. (figure 34b).

Effet d'une période post-infection de 10 heures sans cordycépine

L. dispar

La figure 35a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et à une concentration en cordycépine de 0.20 ug/ml à une période post-infection de 10 heures.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcen-

TEMPS D'INFECTION VIRALE SANS CORDYCEPINE: 10 HEURES

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Concentration de la cordycépine: 0.20 ug/ml

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées : ——— Anti-virus purifié : --- Anti-polyèdre dissout :

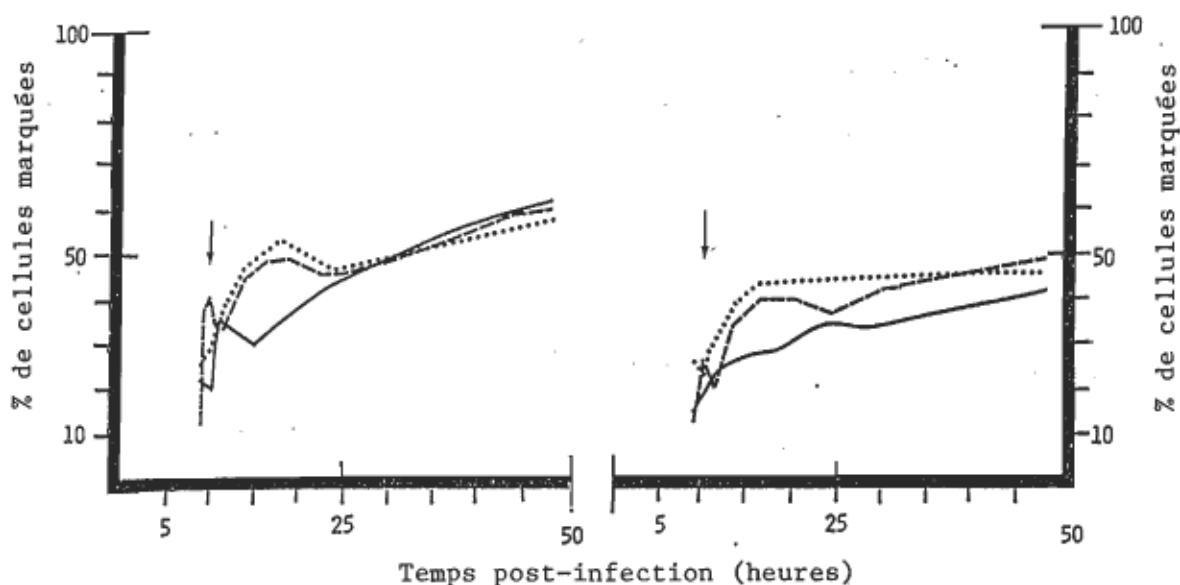
A) Lymantria disparB) Euxoa scandens

Figure 35

Effet d'une période post-infection variée sans cordycépine sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

tages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont légèrement inférieurs à ceux observés chez la même lignée cellulaire-témoin infectée sans cordycépine (figure 28a). Par contre ces pourcentages sont plus élevés que ceux obtenus chez cette même lignée infectée et inhibée par la même concentration en cordycépine mais à une période post-infection de 6 heures (figure 34a).

Par exemple, au cours de la phase précoce d'infection, de 9 heures à 15 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux est de 22 à 30% alors que celui de cellules marquées par un sérum anti-virus passe de 12 à 47% et que celui correspondant aux cellules marquées par un sérum anti-polyèdre s'échelonne de 25 à 49%.

Plus tard, il survient une phase de fléchissement légère des pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux. Puis on observe une étape de progression plus rapide mais régulière de ces pourcentages atteignant des pourcentages finaux encore plus élevés que ceux présentés à la figure 34a. Puisque 61% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin, que 60% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 58% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

E. scandens

La figure 35b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et à une même concentration en cordycépine à une même pério-

de post-infection de 10 heures.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont inférieurs à ceux obtenus chez la même lignée-témoin infectée sans cordycépine (figure 28b). Et ils sont légèrement plus élevés que ceux obtenus chez cette même lignée infectée et inhibée par la même concentration en cordycépine mais à une période post-infection de 6 heures (figure 34b). Par contre ces pourcentages sont inférieurs à ceux obtenus chez l'autre lignée (L.d.) (figure 35a) soumise aux mêmes conditions physico-chimiques que la lignée d'E.s. (figure 35b).

Effet d'une période post-infection de 18 heures sans cordycépine

L. dispar

La figure 36a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à une concentration en cordycépine de 0.20 µg/ml à une période post-infection de 18 heures.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont sensiblement les mêmes que ceux observés chez la même lignée-témoin infectée sans cordycépine (figure 28a). Par contre ces pourcentages sont légèrement plus élevés que ceux notés chez cette même lignée infectée et inhibée par la même concentration en cordycépine mais à une période post-infection de 10 heures (figure 35a).

Par exemple, au cours de la phase précoce d'infection, de

TEMPS D'INFECTION VIRALE SANS CORDYCEPINE: 18 heures

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Concentration de la cordycépine: 0.20 ug/ml

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées: — Anti-virus purifié: - - - - Anti-polyèdre dissout:

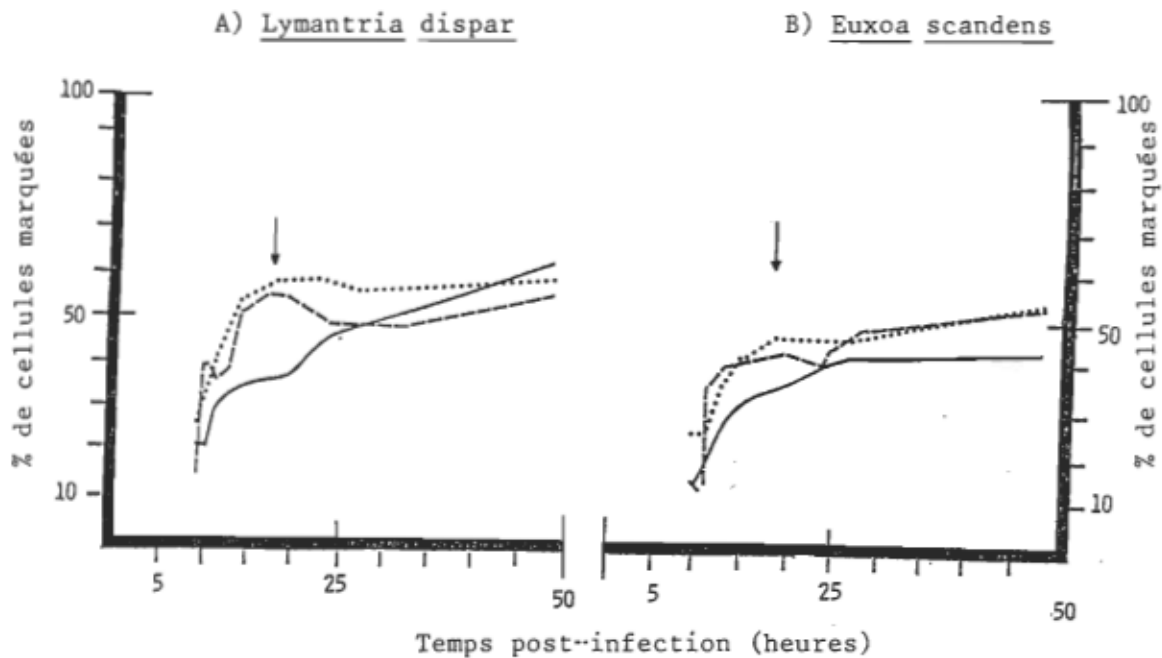


Figure 36

Effet d'une période post-infection variée sans cordycépine sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires de Lymantria dispar et d'Euxoa scandens suivies en immunoperoxydase.

9 heures à 15 heures post-infection, le pourcentage de cellules marquées par un sérum dirigé contre l'ensemble des ag viraux est de 21 à 35% alors que celui de cellules marquées par le sérum anti-virus passe de 14 à 53% et que celui correspondant aux cellules marquées par le sérum anti-polyèdre s'échelonne de 26 à 55%.

Puis survient une phase de fléchissement des pourcentages de cellules marquées pour les ag associés aux protéines polyédriques et pour les ag associés aux capsides virales pendant que ceux se rapportant aux ag viraux dans leur ensemble s'élèvent graduellement.

Finalement on observe une étape de progression lente et régulière de ces pourcentages atteignant des pourcentages finaux élevés puisque 63% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin, que 55% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 59% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 48 heures post-infection.

E. scandens

La figure 36b représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée d'E.s. soumise à une même concentration virale en VPC et à une même concentration en cordycépine à une même période post-infection de 18 heures.

Là aussi quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour ces divers ag viraux sont sensiblement les mêmes que ceux observés chez la même lignée-témoin infectée sans cordycépine (figure 28b). Et ils sont légèrement supérieurs à ceux observés chez cette même lignée infectée et inhibée par la même concentration

en cordycépine mais à une période post-infection de 10 heures (figure 35b). Par contre, ces pourcentages sont inférieurs à ceux observés chez l'autre lignée (L.d.) (figure 36a) soumise aux mêmes conditions physico-chimiques que la lignée d'E.s. (figure 36b).

III-2.2.4 Influence d'une infection mixte du type VPC-CIV chez la lignée de *C. fumiferana*

En guise de résultats quantitatifs obtenus en Ip, les figures 37 à 39 représentent quelques cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dépistés à l'aide des divers sérums à diverses concentrations virales en VPC et en CIV chez la lignée cellulaire de C. fumiferana.

Plus précisément, on teste l'effet de la concentration virale en CIV variée chez cette même lignée cellulaire soumise en plus à une même concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml. Les diverses concentrations virales en CIV testées sont de 0.05 UDO (figure 37a), de 0.10 UDO (figure 38a), et de 0.50 UDO (figure 39a).

Aussi toutes ces expériences sont contrôlées en mesurant l'influence seule de la concentration virale en VPC (figures: 37b; 38b; 39b) d'une part et celle de la seule concentration virale en CIV d'autre part et ce, sans l'intervention de l'autre virus chez la lignée de C.f.. Ce dernier test ne donne aucun marquage quel que soit le sérum conjugué utilisé.

De plus, les effets de ces infections (simples ou multiples) à 28°C sont aussi suivis par les deux méthodes de détection (directe et indirecte) à l'Ip (section III-2.2).

Effet d'une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et d'une autre en CIV de 0.05 UDO

La figure 37a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de C.f. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et d'une autre en CIV de 0.05 UDO.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux du VPC d'E.s. chez cette même lignée sujette à une infection multiple du type VPC-CIV (figure 37a) sont plus élevés que ceux obtenus chez cette même lignée soumise à l'effet seul du VPC (figure 37b).

En fait pendant tout le cheminement des cinétiques démontrées à la figure 37a, on observe une progression lente et régulière de ces pourcentages atteignant des pourcentages finaux peu élevés. Et ce puisque 36% des cellules sont marquées par un sérum anti-virus et que 39% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 96 heures* post-infection tandis que 40% des cellules le sont par un sérum anti-intestin à 102 heures post-infection.

Effet d'une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et d'une autre en CIV de 0.10 UDO

La figure 38a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de C.f. soumise à une même concentration virale en VPC mais à une concentration virale plus élevée en CIV telle 0.10 UDO.

* Résultats de pourcentages de cellules marquées par les sérums anti-virus et anti-polyèdre sont manquants au-delà de 96 heures post-infection (figure 37a) dûs aux contaminations bactériennes dans les puits au cours de cette expérience.

CONCENTRATION VIRALE EN CIV: 0.05 UDO

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées : ——— Anti-virus purifié : --- Anti-polyèdre dissout :

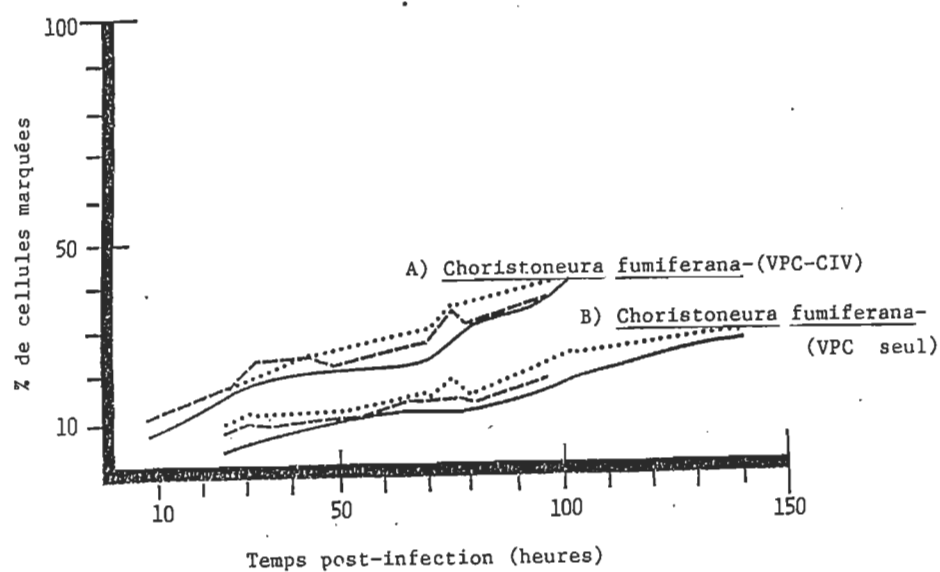


Figure 37

Effet d'une infection mixte du type VPC-CIV sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'*E. scandens* chez la lignée cellulaire de *Choristoneura fumiferana* suivies en immunoperoxydase.

CONCENTRATION VIRALE EN CIV: 0.10 UDO

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées: — Anti-virus purifié: --- Anti-polyèdre dissout:

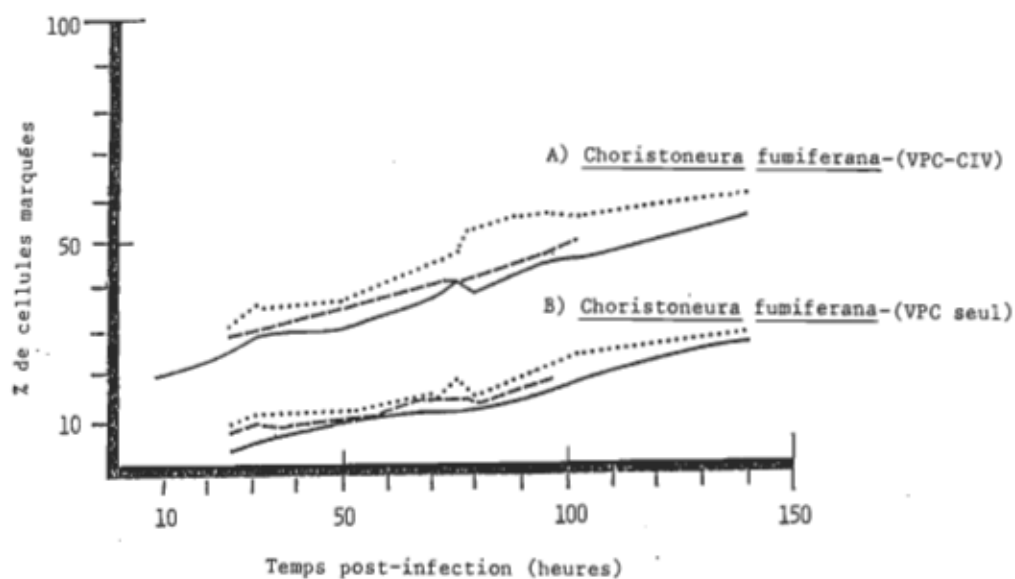


Figure 38

Effet d'une infection mixte du type VPC-CIV sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'*E. scandens* chez la lignée cellulaire de *Choristoneura fumiferana* suivies en immunoperoxydase.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux du VPC d'E.s. chez cette même lignée sujette à une infection multiple du type VPC-CIV (figure 38a) sont encore plus élevés que ceux obtenus chez cette même lignée soumise à l'effet seul du VPC (figure 38b). Il en est de même par rapport à cette lignée C.f. coinfectée mais par une concentration virale plus faible en CIV telle 0.05 UDO (figure 37a).

En fait pendant tout le cheminement des cinétiques démontrées à la figure 38a, on observe aussi une progression lente et régulière de ces pourcentages atteignant des pourcentages finaux élevés. Puisque 50% des cellules sont marquées par un sérum anti-virus à 102 heures* post-infection tandis que 55% des cellules le sont par un sérum anti-intestin et que 59% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 140 heures post-infection.

Effet d'une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}
et d'une autre en CIV de 0.50 UDO

La figure 39a représente les cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC chez la lignée de C.f. soumise à une même concentration virale en VPC mais à une concentration virale très élevée en CIV de 0.50 UDO.

* Résultats de pourcentages de cellules marquées par le sérum anti-virus sont manquants au-delà de 102 heures post-infection (figure 38a) dûs aux contaminations bactériennes dans les puits au cours de cette expérience.

CONCENTRATION VIRALE EN CIV: 0.50 UDO

Concentration virale en VPC: $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml

Température: 28°C

Anti-intestin de larves infectées: — Anti-virus purifié: --- Anti-polyèdre dissout:

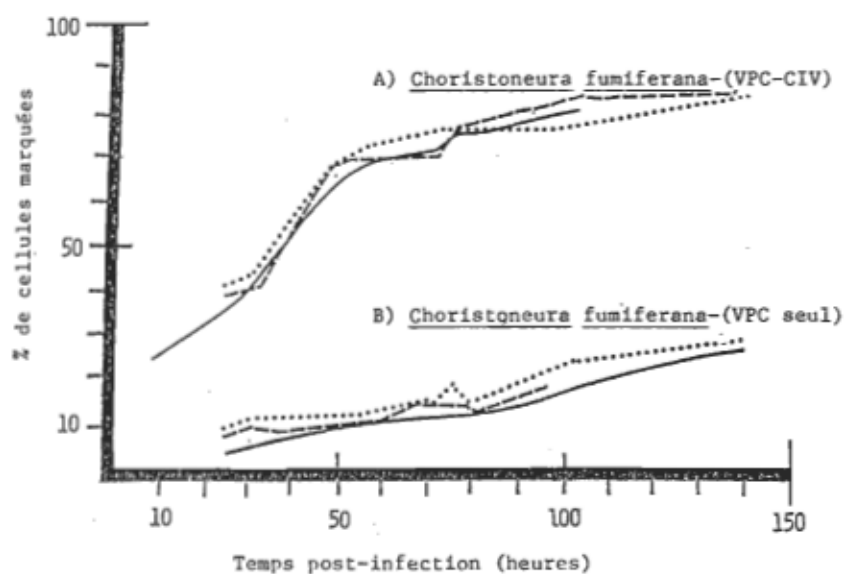


Figure 39

Effet d'une infection mixte du type VPC-CIV sur les cinétiques d'apparition des divers antigènes viraux du VPC d'*E. scandens* chez la lignée cellulaire de *Choristoneura fumiferana* suivies en immunoperoxydase.

Quelle que soit la période post-infection en cours, les pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux du VPC d'E.s. chez cette même lignée sujette à une infection multiple du type VPC-CIV (figure 39a) sont de beaucoup élevés par rapport à ceux obtenus chez cette même lignée soumise à l'effet seul du VPC (figure 39b). Il en est de même par rapport à cette lignée C.f. coinfectede mais par une concentration virale plus faible en CIV telle 0.10 UDO (figure 38a).

En fait pendant tout le cheminement des cinétiques démontrées à la figure 39a, on observe une progression rapide de ces pourcentages de cellules marquées pour les divers ag viraux du VPC d'E.s. au cours de la phase précoce d'infection. Puis il se produit une phase de plateau de ces pourcentages à des périodes post-infection plus tardives.

Les pourcentages finaux de ces cellules marquées sont très élevés puisque 80% des cellules sont marquées par un sérum anti-intestin à 102 heures^{*} post-infection tandis que 85% des cellules le sont par un sérum anti-virus et que 83% des cellules le sont par un sérum anti-polyèdre à 140 heures post-infection.

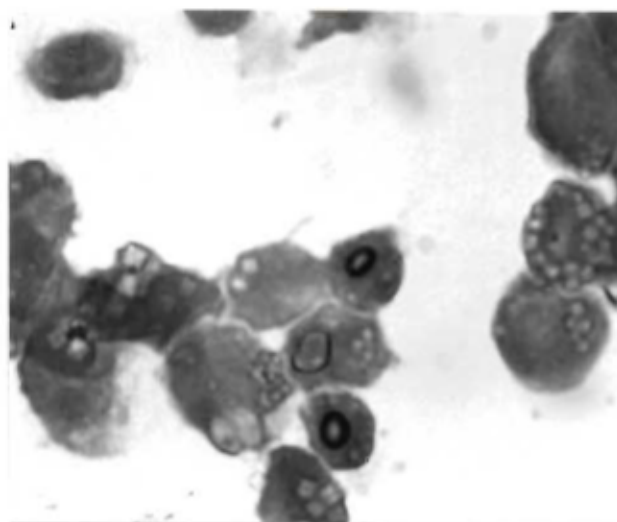
* Résultats de pourcentages de cellules marquées par le sérum anti-intestin sont manquants au-delà de 102 heures post-infection (figure 39a) dûs aux contaminations bactériennes dans les puits au cours de cette expérience.

III-3 Evaluation du nombre de polyèdres du VPC d'E. scandens chez trois lignées cellulaires d'insectes à divers temps post-infection

La coloration histologique avec le bleu de méthylène (1%) nous permet d'observer en microscopie optique les polyèdres cytoplasmiques du VPC d'E. scandens chez les lignées cellulaires d'E.s., de L.d. et de C.f. cultivées et infectées in vitro (section II-2.0).

La figure 40 représente la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ DICT_{50/ml} à 7 jours post-infection. On remarque l'aspect hypertrophié de ces cellules infectées. A noter la forme cubique des polyèdres de dimensions variées dans le cytoplasme de ces mêmes cellules. On note aussi que le nombre de polyèdres diffère d'une cellule à l'autre. Une telle observation au microscope optique démontre donc la présence des polyèdres intracytoplasmiques du VPC d'E.s. chez cette lignée cellulaire (L.d.). Aussi cela nous permet d'évaluer le nombre de ces polyèdres intracytoplasmiques chez ces trois lignées cellulaires ensemencées sur microplaque et infectées par le VPC et/ou le CIV à divers temps post-infection.

En effet, le pourcentage de cellules contenant des polyèdres (%) et la moyenne de polyèdres par cellule ayant des polyèdres (m) sont mesurés à divers temps post-infection chez les lignées de L.d. et d'E.s. soumises à une infection simple au VPC (tableau 10) et chez celle de C.f. atteinte d'une infection multiple du type VPC-CIV (tableau 11). Les résultats incluent dans ces deux tableaux sont l'objet d'observations menées au microscope inversé à 200 X.



Cellules de la lignée de L.d. infectées avec une concentration virale en VPC de $10^{5.6}$ DICT_{50/ml} à 7 jours post-infection (grossissement de 1350 X).



Idem à la figure du haut sauf le champ cellulaire est différent.

Figure 40

Coloration histologique au bleu de méthylène des cellules de la lignée de Lymantria dispar.

Tableau 10

Production de polyèdres du VPC d'*E. scandens*
chez les lignées cellulaires d'insectes de *Lymantria dispar* et d'*Euxoa scandens*
à divers temps post-infection

Concentrations virales en VPC	Concentrations de cordycépine	Périodes post-infection sans cordycépine	Températures d'incubation	<i>Lymantria dispar</i> (*)						<i>Euxoa scandens</i> (*)					
				24 hrs	28 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs	24 hrs	28 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs
				X m	X m	X m	X m	X m	X m	X m	X m	X m	X m	X m	X m
10 ^{0.7} DICT ₅₀ /ml			28°C	no	no	no				no	no	no			
10 ^{2.7} "			28 "	no	no	no				no	no	no			
10 ^{3.7} "			28 "	no	no	no				no	no	no			
10 ^{4.0} "			28 "	no	no	43	10.9	47 7.4	52 9.0	78 9.6	no	no	40	4.7	46 6.8
10 ^{4.7} "			28 "	no	no	75	15.6				no	no	72	12.1	cb 70 6.3
10 ^{4.0} "	0.10 ug/ml	1 heure	28 "	no	no	35	4.8				no	no	24	4.0	
10 ^{4.0} "	0.20 "	1 "	28 "	no	no	7	4.0				no	no	no		
10 ^{4.0} "	0.40 "	1 "	28 "	no	no	no					no	no	no		
10 ^{4.0} "	0.20 "	2 heures	28 "	no	no	4	2.5				no	no	4	2.2	
10 ^{4.0} "	0.20 "	6 "	28 "	no	no	12	2.2				no	no	7	1.5	
10 ^{4.0} "	0.20 "	10 "	28 "	no	no	14	1.8	17 2.8	cb 36 3.4		no	no	8	3.1	16 2.0
10 ^{4.0} "	0.20 "	18 "	28 "	no	no	17	2.2	20 3.0	cb 46 2.5		no	no	15	2.3	21 2.0
10 ^{4.0} "			10 "	no	no	no					no	no	no		
10 ^{4.0} "			18 "	no	no	5	2.0				no	no	3	1.3	
10 ^{4.0} "			28 "	no	no	41	9.5				no	no	39	3.0	
10 ^{4.0} "			32 "	no	no	13	1.1				no	no	12	1.2	
10 ^{4.0} "			37 "	no	no	no					no	no	no		

Légende:

no : non-observable.

cb : contamination bactérienne (pas de résultats).

X : le pourcentage de cellules contenant des polyèdres s'effectue sur un total de 100 cellules par champ cellulaire.

m : la moyenne de polyèdres par cellule ayant des polyèdres s'effectue sur un total de 30 cellules par champ cellulaire.

(*) Les cellules de *L.d.* et d'*E.s.* ensemencées sur microplaque s'observent au microscope inversé à 200 x.

Tableau 11

Production de polyèdres du VPC d'*E. scandens*
chez la lignée cellulaire d'insecte de
Choristoneura fumiferana à divers temps post-infection

			<i>Choristoneura fumiferana</i> (*)									
			24 hrs x m	30 hrs x m	48 hrs x m	70 hrs x m	75 hrs x m	78 hrs x m	96 hrs x m	102 hrs m	140 hrs m	
Concentrations virales en VPC	Concentrations virales en CIV	Températures d'incubation										
$10^{4.0}$ DICT ₅₀ /ml		28°C	no	no	no	no	no	no	no	no	no	
$10^{4.0}$ DICT ₅₀ /ml	0.05 UDO	28°C	no	no	no	4 3.2	6 7.5	7 7.0	9 8.3	10 8.0	cb	
$10^{4.0}$ DICT ₅₀ /ml	0.10 UDO	28°C	no	no	no	5 9.6	10 6.8	10 8.9	15 11.2	15 10.9	16 15.2	
$10^{4.0}$ DICT ₅₀ /ml	0.50 UDO	28°C	7 2.0	8 3.1	12 3.6	14 5.6	16 6.6	16 7.0	19 10.1	20 12.0	48 15.1	

Légende

n = non-observable.

cb = contamination bactérienne (pas de résultats).

x = le pourcentage de cellules contenant des polyèdres s'effectue sur un total de 100 cellules par champ cellulaire.

m = la moyenne de polyèdres par cellule ayant des polyèdres s'effectue sur un total de 30 cellules par champ cellulaire.

(*) Les cellules de *C.f.* ensemencées sur microplaque s'observent au microscope inversé à 200X.

En premier lieu, le tableau 10 compare entre les lignées de L.d. et d'E.s. ces deux sortes de mesure représentées respectivement en valeur de % et de m, et effectuées pour les temps post-infection de 24 heures, 28 heures, 48 heures, 72 heures, 96 heures et 120 heures. Si on se réfère au tableau 10, les polyèdres du VPC d'E.s. ne se détectent pas chez ces lignées infectées avec ce VPC à 24 heures et 28 heures post-infection et ce, tels que soient les paramètres physico-chimiques en cours.

En ce qui se rapporte à l'effet de la concentration de ce VPC, les pourcentages de cellules contenant des polyèdres au cours de certaines heures post-infection (48 heures; 72 heures; 96 heures; 120 heures) sont sensiblement les mêmes chez ces deux lignées soumises à 28°C à de mêmes concentrations virales en VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}; $10^{4.7}$ DICT_{50/ml}). Cependant, les moyennes de polyèdres par cellule ayant des polyèdres sont supérieures chez la lignée de L.d. soumise à ces deux concentrations virales en VPC par rapport à l'autre lignée. Par exemple, on note une moyenne de 10.9 polyèdres par cellule ayant des polyèdres chez L.d. comparativement à 4.7 polyèdres par cellule ayant des polyèdres chez E.s. soumises toutes les deux à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} à 48 heures post-infection. A noter qu'à des concentrations virales plus faibles ($10^{0.7}$ DICT_{50/ml}; $10^{2.7}$ DICT_{50/ml}; $10^{3.7}$ DICT_{50/ml}), on ne détecte pas de polyèdres intracytoplasmiques à ce même temps post-infection tant chez l'une que chez l'autre lignée infectée.

L'effet de la concentration en cordycépine agit aussi sur la production de polyèdres dans le cytoplasme de la lignée L.d. soumise à une même concentration virale en VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}) et à une concentration

en cordycépine variée (0.10 µg/ml; 0.20 µg/ml). En fait une concentration de cet inhibiteur de 0.20 µg/ml (%: 7; m: 4.0) entraîne une baisse plus forte de la production de polyèdres du VPC chez cette lignée (L.d.) par rapport à une concentration de ce même inhibiteur plus faible telle 0.10 µg/ml (%: 35; m: 4.8) et ce, à 48 heures post-infection. A noter qu'on ne détecte plus de polyèdres intracytoplasmiques chez la lignée de L.d. inhibée avec une concentration en cordycépine de 0.40 µg/ml et chez l'autre lignée (E.s.) inhibée de même mais avec des concentrations de 0.20 µg/ml et de 0.40 µg/ml et ce, à un même temps post-infection (48 heures).

L'effet d'une période post-infection variée sans cordycépine influence également la baisse de la production de polyèdres intracytoplasmiques chez ces deux mêmes lignées cellulaires infectées par une même concentration virale au VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}) et traitées avec une même concentration en cordycépine (0.20 µg/ml) (tableau 10). A vrai dire, au cours de certaines périodes post-infection sans cordycépine (10 heures; 18 heures), on observe une baisse de cette production de polyèdres plus forte chez ces deux lignées à des temps post-infection courts (48 heures; 72 heures) qu'à un temps post-infection tardif tel 120 heures. Lors de ces périodes d'infection courtes, les deux types de mesure (% et m) sont sensiblement les mêmes tant chez l'une que chez l'autre lignée. Cependant à 120 heures post-infection, la baisse de la production des polyèdres est plus forte chez la lignée d'E.s. par rapport à l'autre lignée (L.d.). Finalement à des périodes post-infection sans cordycépine de 2 heures et de 6 heures, la baisse de la production de ces polyèdres est très importante chez ces deux mêmes lignées infectées à 48 heures post-infection.

L'effet de la température influence aussi la production de polyèdres intracytoplasmiques chez ces deux mêmes lignées soumises à une même concentration virale en VPC ($104.0 \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$). A vrai dire les cellules de ces lignées infectées et incubées à des températures supérieures (32°C) ou inférieures (18°C) à 28°C ont des taux de production de polyèdres très inférieurs à ceux notés chez ces deux mêmes lignées incubées à 28°C et ce, pour un temps d'infection de 48 heures (tableau 10). Aux températures de 10°C et de 37°C , on ne détecte pas de polyèdres intracytoplasmiques à ce même temps post-infection (48 heures) chez ces deux mêmes lignées.

En second lieu, le tableau 11 indique les données respectives aux deux types de mesure (% et m) à partir de la lignée de C. fumiferana atteinte d'une infection mixte du type VPC-CIV. Premièrement, les pourcentages de cellules contenant des polyèdres augmentent au fur et à mesure que le temps post-infection devient important et ce, quelle que soit la concentration virale en CIV impliquée (0.05 UDO; 0.10 UDO; 0.50 UDO) pour une même concentration virale en VPC ($104.0 \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$). Cependant il est à son plus haut taux (48%) lorsque cette lignée est soumise à une concentration très élevée en CIV (0.50 UDO) et à cette même concentration virale de VPC à un temps post-infection très tardif tel 140 heures. Ces mêmes pourcentages augmentent aussi au fur et à mesure que la concentration virale en CIV devient importante et ce, pour les divers temps post-infection.

En ce qui se rapporte aux valeurs de moyennes de polyèdres par cellule ayant des polyèdres, elles sont faibles à des temps post-infection

courts (24 heures; 30 heures; 48 heures) chez cette lignée (C.f.) atteinte d'une double infection dont la concentration virale en CIV est très élevée (0.50 UDO). A des temps post-infection intermédiaires et tardifs, ces valeurs s'élèvent graduellement. Sous l'effet de cette même infection mixte dont la concentration virale en CIV est 5 fois plus faible (0.10 UDO), les valeurs de moyenne de polyèdres par cellule ayant des polyèdres y sont sensiblement les mêmes. Sous l'effet d'une concentration virale en CIV 10 fois moindre (0.05 UDO) ces mêmes valeurs y sont inférieures dans la majorité des cas.

Il est bon de souligner que l'on ne détecte pas de polyèdres intracytoplasmiques chez la lignée de C.f. soumise à une simple infection avec le VPC quel que soit le temps post-infection en cours. Ceci dit même à 140 heures post-infection.

III-4. Traitements informatisés des cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s.

L'analyse PROBIT est utilisée pour traiter les diverses cinétiques d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. chez les lignées de L.d., d'E.s. et de C.f. soumises chacune à des conditions physico-chimiques particulières. Pour l'ensemble des analyses effectuées, on dresse une série de tableaux compilatifs des temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% de ces cellules d'insectes marquées à l'Ip, à diverses températures d'incubation, concentrations de virus, concentrations de cordycépine et lignées cellulaires (tableaux 12 à 17 inclusivement).

On dresse aussi un tableau compilatif des doses infectieuses de CIV en densité optique donnant en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées de même à l'Ip chez la lignée de C. fumiferana soumise à une infection multiple du type VPC-CIV (tableau 18).

III-4.1 Variation de la concentration du VPC

Le tableau 12 compile les valeurs des temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez L. dispar et E. scandens soumises à diverses concentrations en VPC ($10^{3.7}$ DICT_{50/ml}; $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}; $10^{4.7}$ DICT_{50/ml}).

Quel que soit le sérum conjugué impliqué, on constate que les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% et de 95% des cellules de L.d. ou d'E.s. sont plus courts à une concentration infectante en VPC très élevée ($10^{4.7}$ DICT_{50/ml}).

Tableau 12

Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus
50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums
chez L. dispar et E. scandens infectées par du VPC à
diverses concentrations en VPC

Lignées cellulaires d'insectes	Concentrations en VPC	Anti-intestin de larves infectées		Anti-virus purifié		Anti-polyèdre dissout	
		TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%
<u>L. dispar</u>	$10^{3.7}$ DICT _{50/ml}	29	746	415	488,467	55	2,581
	$10^{4.0}$ DICT _{50/ml}	18	107	20	195	15	206
	$10^{4.7}$ DICT _{50/ml}	10	96	14	73	11	115
<u>E. scandens</u>	$10^{3.7}$ DICT _{50/ml}	102	6,431	114	2,387	56	227
	$10^{4.0}$ DICT _{50/ml}	27	364	24	357	26	372
	$10^{4.7}$ DICT _{50/ml}	14	259	13	85	14	64

. TPI : temps post-infection en heures.

. DICT_{50/ml} : dose responsable de l'infection de 50% des cellules cultivées en culture de tissus.

Quelle que soit la concentration en VPC impliquée, on constate dans la majorité des cas que:

- o les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% et de 95% des cellules de L.d. par le sérum anti-intestin de larves infectées au VPC sont plus courts par rapport à ceux obtenus pour les sérums anti-virus purifié et anti-polyèdre dissout.
- o les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% et de 95% des cellules d'E.s. par le sérum anti-polyèdre dissout sont plus courts par rapport aux deux autres sérums conjugués.

III-4.2 Variation de la température d'incubation

Le tableau 13 compile les valeurs des temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez L. dispar et E. scandens soumises à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et pour diverses températures d'incubation (10°C; 18°C; 28°C; 32°C; 37°C).

Quel que soit le sérum conjugué impliqué, on constate dans la majorité des cas que les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% et de 95% des cellules de L.d. ou d'E.s. sont plus courts à une température d'incubation de 28°C.

Quelle que soit la température d'incubation impliquée, on constate dans la majorité des cas que les temps post-infection où l'on

Tableau 13

Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95%
des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez L. dispar et
E. scandens infectées par du VPC à une concentration en VPC de
 $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et pour diverses
températures d'incubations

Lignées cellulaires d'insectes	Températures d'incubation	Anti-intestin de larves infectées		Anti-virus purifié		Anti-polyèdre dissout	
		TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%
<u>L. dispar</u>	10°C	125	2,360	97	1,297	121	2,712
	18°C	58	756	48	504	59	1,516
	28°C	25	265	22	210	20	263
	32°C	56	968	34	381	42	759
	37°C	48	886	33	470	30	283
<u>E. scandens</u>	10°C	50	224	47	184	541	20,076
	18°C	108	1,621	34	127	74	935
	28°C	33	341	28	355	27	377
	32°C	38	139	43	180	50	475
	37°C	47	570	32	118	50	576

. TPI: temps post-infection en heures.

obtient le marquage à l'Ip de 50% et de 95% des cellules de L.d. ou d'E.s. marquées par un sérum anti-virus purifié sont légèrement plus courts par rapport à ceux obtenus pour les sérums anti-intestin de larves infectées et anti-polyèdre dissout.

III-4.3 Variation de la concentration de cordycépine

Le tableau 14 compile les valeurs des temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez L. dispar et E. scandens soumises à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et à diverses concentrations de cordycépine (0.10 ug/ml; 0.20 ug/ml; 0.40 ug/ml) appliquées à 1 heure post-infection.

Quel que soit le sérum conjugué impliqué, on constate dans la majorité des cas que les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% et de 95% des cellules de L.d. ou d'E.s. sont plus longs à une concentration forte en cordycépine (0.40 ug/ml). Cependant dans la totalité des cas, les valeurs de ces temps post-infection sont plus courtes à une concentration faible de ce même antibiotique (0.10 ug/ml).

Tableau 14

Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95%
des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez L. dispar et
E. scandens infectées par du VPC à une concentration en VPC de
 $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à diverses concentrations de
cordycépine appliquées à 1 heure
post-infection

Lignées cellulaires d'insectes	Concentrations de cordycépine à 1 heure post-infection	Anti-intestin de larves infectées		Anti-virus purifié		Anti-polyèdre dissout	
		TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%
<u>L. dispar</u>	0.10 ug/ml	48	957	31	699	28	606
	0.20 ug/ml	160	4,083	88	1,200	78	1,225
	0.40 ug/ml	396	13,560	361	10,466	215	4,731
<u>E. scandens</u>	0.10 ug/ml	52	870	31	334	33	358
	0.20 ug/ml	141	1,411	381	20,161	836	202,170
	0.40 ug/ml	709	19,794	607	17,416	548	19,127

. TPI: temps post-infection en heures.

III-4.4 Variation de la période post-infection sans cordycépine

Le tableau 15 compile les valeurs des temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez L. dispar et E. scandens soumises à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et à une concentration de cordycépine de 0.20 µg/ml appliquée à divers temps post-infection (1 heure; 2 heures; 6 heures; 10 heures; 18 heures).

Quel que soit le sérum conjugué impliqué, on constate dans la majorité des cas que:

- o les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% des cellules de L.d. ou d'E.s. sont plus courts si la cordycépine est appliquée à un temps post-infection long.
- o les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 95% des cellules de L.d. ou d'E.s. sont très variables selon le temps post-infection sans cordycépine écoulé. Par exemple, chez les cellules marquées par le sérum anti-intestin de larves infectées on note les valeurs des temps post-infection pour obtenir 95% de marquage les plus élevées chez L.d. à un temps post-infection de 1 heure sans cordycépine (TPI* 95%: 4,083) bien qu'il soit à 10 heures chez E.s. (TPI 95%: 18,894).

* TPI: temps post-infection en heures.

Tableau 15

Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95%
des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez L. dispar
et E. scandens infectées par du VPC à une concentration en
VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et à une concentration de
cordycépine de 0.20 ug/ml appliquée à
divers temps post-infection

Lignées cellulaires d'insectes	Période post- infection sans cordycépine	Anti-intestin de larves infectées		Anti-virus purifié		Anti-polyèdre dissout	
		TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%
<u>L. dispar</u>	1 heure	160	4,083	88	1,200	78	1,225
	2 heures	61	745	77	1,215	50	657
	6 heures	33	331	34	502	39	653
	10 heures	41	1,903	31	1,624	30	2,397
	18 heures	36	970	30	4,146	22	4,373
<u>E. scandens</u>	1 heure	141	1,411	381	20,161	836	202,170
	2 heures	94	1,250	202	11,402	406	110,473
	6 heures	76	2,773	47	1,089	32	369
	10 heures	115	18,894	65	7,338	69	60,413
	18 heures	56	1,979	46	2,517	40	3,403

. TPI: temps post-infection en heures.

III- 4.5 Variation du temps post-infection

Le tableau 16 compile les valeurs des temps post-infection en culture de tissus donnant 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez L. dispar et E. scandens soumises à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à une concentration de cordycépine de 0.20 µg/ml pour certains temps de lecture post-infection (15 heures et 24 heures).

Quel que soit le sérum conjugué impliqué, on constate que:

- o les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% des cellules sont plus courts chez la lignée de L.d. par rapport à l'autre lignée (E.s.) que ce soit à 15 heures ou 24 heures (heures de lecture des résultats).
- o les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 95% des cellules sont plus courts dans la majorité des cas chez la lignée de L.d. par rapport à l'autre lignée aux mêmes temps de lecture post-infection. A vrai dire, les valeurs correspondant à 95% de marquage sont moindres chez cette dernière lignée (E.s.) à un temps d'observation post-infection de 24 heures auquel les cellules de cette lignée sont marquées à l'Ip par les sérums anti-intestin de larves infectées et anti-polyèdre dissout.

III-4.6 Variation de la concentration du CIV

Le tableau 17 compile les valeurs des temps post-infection où

Tableau 16

Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95%
des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez L. dispar
et E. scandens infectées par du VPC à une concentration en
VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et à une concentration de
cordycépine de 0.20 ug/ml pour certains
temps de lecteur post-infection

Lignées cellulaires d'insectes	Temps de lecture post-infection	Anti-intestin de larves infectées		Anti-virus purifié		Anti-polyèdre dissout	
		TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%
<u>L. dispar</u>	15 heures	60	17,087	13	1,894	11	858
	24 heures	20	15,311	17	1,967	14	3,027
<u>E. scandens</u>	15 heures	69	19,172	27	2,801	24	6,264
	24 heures	35	5,752	33	9,703	16	855

. TPI: temps post-infection en heures.

Tableau 17

Temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95%
des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez *C. fumiferana*
infectée par du VPC à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml
et à diverses concentrations en CIV

Lignée cellulaire d'insecte	Concentrations en CIV	Anti-intestin de larves infectées		Anti-virus purifié		Anti-polyèdre dissout	
		TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%	TPI 50%	TPI 95%
<i>C. fumiferana</i>	0.05 UDO	266	11,417	328	39,060	187	6,121
	0.10 UDO	157	23,268	126	11,207	82	3,649
	0.50 UDO	31	345	34	247	32	317

. TPI: temps post-infection en heures.

. UDO: unité de densité optique (280 nm).

l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez C. fumiferana soumise à une concentration en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à diverses concentrations en CIV (0.05 UDO; 0.10 UDO; 0.50 UDO).

Quel que soit le sérum conjugué impliqué, on constate que les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% et de 95% des cellules de C.f. sont plus courts à une concentration forte en CIV (0.50 UDO). Suite à l'effet d'une telle concentration virale en CIV, on note que les valeurs de TPI 50% sont semblables quel que soit le sérum impliqué, celles de TPI 95% sont également du même ordre de grandeur. Cependant à des concentrations plus faibles en CIV (0.05 UDO et 0.10 UDO), on constate que les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% et de 95% des cellules de cette même lignée (C.f.) par un sérum anti-polyèdre dissout sont plus courts par rapport à ceux obtenus pour les deux autres sérums (anti-intestin et anti-virus).

Le tableau 18 compile les valeurs de doses infectieuses de CIV en densité optique donnant en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums chez la lignée de C.f. soumise à une même concentration en VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}) et à diverses concentrations en CIV et à un temps de lecture post-infection de 48 heures.

Les doses infectieuses de CIV pour lesquelles on observe le marquage à l'Ip contre les ag viraux du VPC de 50% des cellules de C.f. à un temps de lecture post-infection de 48 heures sont sensiblement les mêmes quel que soit le sérum conjugué impliqué. Il en est de même en ce qui se rapporte aux valeurs des doses permettant d'obtenir 95% de marquage

Tableau 18

Doses infectieuses de CIV où l'on obtient en culture de tissus
 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip par divers sérums
 chez *C. fumiferana* infectée par du VPC à une concentration
 en VPC de $10^{4.0}$ DICT₅₀/ml et à un temps de lecture
 post-infection de 48 heures

Lignée cellulaire d'insecte	Temps de lecture post-infection	Anti-intestin de larves infectées		Anti-virus purifié		Anti-polyèdre dissout	
		DICT 50%	DICT 95%	DICT 50%	DICT 95%	DICT 50%	DICT 95%
<u>C. fumiferana</u>	48 heures	0.247	5.58	0.211	4.45	0.198	5.34

. DICT (50% et 95%): dose infectieuse de CIV en densité optique donnant 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip.

à l'Ip chez les cellules de cette même lignée soumises aux mêmes conditions physico-chimiques.

Chapitre IV

Discussions et Conclusions

IV-1. Tests d'Ouchterlony

D'après le tableau 19 donnant les résultats des tests immunologiques en Ouchterlony présentés à la section III-1., on conclut que les divers sérums non-absorbés utilisés lors de la technique à l'Ip au cours de ce projet d'étude sont conformes à la règle immunologique de la spécificité. En effet, les divers sérums non-absorbés (anti-intestin de larves infectées, anti-virus purifié, anti-polyèdre complet et anti-polyèdre dissout) présentent des affinités particulières ou non avec les constituants antigéniques de la larve d'E.m. et/ou du VPC d'E.s. proprement dit. Cependant, il importe de noter que ces mêmes sérums non-absorbés ne réagissent nullement contre les cellules non-infectées des diverses lignées cellulaires d'insectes (L.d.; E.s.; C.f.) étudiées dans ce travail (tableau 19).

Aussi cette technique d'Ouchterlony nous permet de démontrer la spécificité réelle de ces mêmes sérums (non-absorbés et absorbés) envers les constituants antigéniques larvaires et/ou viraux.

D'abord, le sérum anti-intestin de larves infectées non-absorbé réagit autant avec les constituants antigéniques de la larve d'E.m. saine et lyophilisée qu'avec ceux du virus de la polyédrose cytoplasmique (VPC). Ce même sérum une fois absorbé ne réagit qu'avec les constituants antigéniques de ce même VPC puisque le procédé d'absorption entre ce sérum et la larve d'E.m. saine (lyophilisée) a permis d'enlever complètement les IgGs spécifiques aux ag larvaires. En effet après absorption, il n'y a plus aucune réaction envers l'extrait de larves saines en Ouchterlony bien que des réactions subsistent contre l'extrait de larves infectées.

Tableau 19

Analyses des réactions séro-immunologiques d'Ouchterlony entre divers sérums non-absorbés et absorbés, et divers extraits ou solutions

		Extraits			Solutions	
		Extraits de cellules (L.d., E.g. C.f.)	Extraits de larves d'E.m. saines et lyophilisées	Extraits de larves d'E.m. infectées	Milieu de culture de Grace	Tampon PBS sans CaCl_2
Sérums non-absorbés	Anti-intestin de larves infectées	-	+	+		
	Anti-virus purifié	-	+	+		
	Anti-polyèdre complet	-	-	+		
	Anti-polyèdre dissout		-	+		
	Sérum normal			-		
Sérums absorbés	Anti-intestin de larves infectées		-	+		
	Anti-virus purifié		-	-		
	Anti-polyèdre complet		-	+	-	-
	Anti-polyèdre dissout		-	pas fait		
Solutions	Milieu de culture de Grace		+	-		
	Tampon PBS sans CaCl_2		-	-		

Légende: +: réaction positive
-: réaction négative

Le sérum anti-virus non-absorbé réagit autant avec les constituants antigéniques de la larve d'E.m. saine ou infectée. A l'état absorbé, ce dernier sérum ne réagit plus ni avec les constituants antigéniques de cette même larve saine, ni avec ceux de cette même larve infectée. Dans le dernier cas négatif, il aurait fallu concentrer le sérum absorbé (anti-VPC 1/10) avant de le tester en Ouchterlony.

En ce qui se rapporte au sérum anti-polyèdre complet non-absorbé, ce dernier ne réagit pas avec les constituants antigéniques de la larve d'E.m. saine et lyophilisée quoiqu'il réagit avec ceux de cette même larve infectée. Aussi ce dernier sérum absorbé démontre toujours une affinité particulière envers certains constituants antigéniques présents dans cette même larve infectée sans nul doute principalement les constituants antigéniques des polyèdres. Il en est de même pour le sérum anti-polyèdre dissout non-absorbé envers les extraits de larves saines et infectées. A l'état absorbé, il est évident que ce dernier sérum ne réagit pas non plus avec l'extrait de larve saine. Le test immunologique entre ce même sérum absorbé et l'extrait de larves infectées n'a pas été fait puisque le volume de ce dernier sérum était restreint.

Aussi par la technique d'Ouchterlony, on procède à certains contrôles. Entre autres, la présence de réactions immunologiques nulles entre le sérum normal non-absorbé et l'extrait de larves d'E.m. infectées. Il en est de même entre le tampon PBS sans CaCl_2 et les extraits de cette même larve saine et infectée. Aussi il ne se présente pas non plus de réactions immunologiques entre ce même tampon et le sérum anti-polyèdre complet absorbé. Il ne se présente non plus aucune réaction entre ce der-

nier sérum non-absorbé et le milieu de culture de Grace. Cependant, il s'est démontré toutefois de faibles réactions positives entre ce milieu de culture de Grace et l'extrait de larve d'E.m. saine, cela s'expliquerait par un phénomène de précipitation des protéines par les sels de ce milieu au cours de la période d'incubation; de plus ces lignes n'étaient pas nettes contrairement aux lignes de précipitations immuno-spécifiques. Aucune réaction cependant entre ce milieu de culture et l'extrait de larves infectées n'est décelée.

A la suite de telles analyses immunologiques concluantes, on peut ainsi appliquer les divers sérums non-absorbés spécifiques aux divers ag viraux du VPC d'E.s. sur les divers systèmes cellulaires-virus étudiés dans ce projet d'étude via l'Ip puisqu'il n'y a aucune réaction immunologique non-spécifique de ces divers sérums non-absorbés envers les constituants des cellules non-infectées des diverses lignées cellulaires d'insectes. Et que ceux-ci réagissent spécifiquement contre certains constituants antigéniques d'origine virale telles que démontrées par les réactions des sérums absorbés.

IV-2. Choix des fixateurs

Avant l'application de la technique à l'Ip employée dans ce travail sur les systèmes cellulaires infectés ou non, il importe de déterminer les meilleures conditions de fixation en relation avec la préservation de la structure des diverses cellules (L.d.; E.s.; C.f.) et de celle de l'antigénicité du virus (VPC d'E.s.). Aussi, il semble opportun de souligner que le type de fixateur, sa concentration, la température où s'ef-

fectue la fixation et le temps d'application du fixateur, sont des paramètres physico-chimiques devant être précisés en culture cellulaire (d'insecte par exemple) avant l'application d'une méthode de détection immunologique (Ip par exemple) des ag viraux.

Dans notre projet de recherche, on fixe à l'acétone (-20°C , 2 minutes) les cellules d'insectesensemencées sur lamelles de tubes Leighton quoique cellesensemencées dans les puits d'une microplaque le sont à la paraformaldéhyde à 1% (21°C , 10 minutes). Sachant à priori que les constituants cellulaires et viraux impliqués sont les mêmes dans l'un ou dans l'autre cas, on peut conclure que le type de fixateur de choix à employer varie aussi selon le type de support sur lequel seront fixées les cellules. Par exemple, l'acétone ne pourra être employée avec un support de plastique puisqu'elle le dissout et on devra trouver un bon fixateur de remplacement. Ainsi donc, le fixateur de choix permettant une adhésion forte entre le support (lamelle de verre; puits en polystyrène) et les cellules d'insectes en culture diffère donc d'un support à l'autre. En ce qui se rapporte aux temps d'apparition des ag viraux dans le cytoplasme des cellules, ils sont sensiblement les mêmes que les cellules soient fixées à l'acétone ou à la paraformaldéhyde.

Certains autres chercheurs se sont attardés à préciser les meilleures conditions expérimentales de fixation. Entre autres, Singer (1974) a procédé à l'analyse en microscopie optique et électronique de l'effet de divers fixateurs (acétone; formaldéhyde; glutéraldéhyde) sur la réaction immunologique à l'immunocytochrome-C (marquage) des cellules de rein d'humain nouveau-né (cellules NB) infectées avec le parvovirus (ag H-1) à 24 heures post-infection. Charpentier et al. (1982) ont employé divers

fixateurs (acétone-méthanol: -20°C , 10 minutes; glutéraldéhyde à 2.5%: 4°C , 1 heure; periodate-lysine-paraformaldéhyde: 4°C , 1 heure) aussi en microscopie optique sur la réaction immunologique à l'Ip des cellules de rein d'hamster nouveau-né (cellules BHK-21) infectées avec le virus Chikungunya.

Au cours de ce travail, le fixateur de choix des cellules ensemencées en tubes Leighton est l'acétone (-20°C , 2 minutes) et celui des cellules ensemencées sur microplaque est la paraformaldéhyde à 1% (21°C , 10 minutes). Nous avons obtenu des résultats comparables à ceux de ces auteurs en employant la paraformaldéhyde à 1% nécessaire dans notre cas. Cela puisqu'avec l'emploi d'une concentration plus faible de ce fixateur (0.5%), on a noté une mauvaise adhésion des cellules sur l'un ou l'autre des supports employés, une forme anormale des cellules sur les lamelles des tubes Leighton et la présence de précipités au fond des puits des microplaques.

IV-3. Technique à l'Ip

IV-3.1 Marquages immuno-spécifiques

Quel que soit le type de méthode (directe ou indirecte) à l'Ip impliqué dans ce travail, on s'aperçoit que la détection immunoenzymatique des divers ag viraux du VPC d'E.s. par leurs sérums (non-absorbés) respectifs est également valable avec l'une ou l'autre méthode.

Ainsi, on met en évidence divers types de marquage intracytoplasmique selon les sérums appliqués lors de l'Ip. On peut penser que le sérum anti-intestin responsable d'un marquage diffus avec des granulations dans le cytoplasme des cellules infectées, d'un marquage cytoplasmique

granulaire, et d'un marquage autour et à la périphérie des polyèdres intracytoplasmiques décelerait les ag associés aux protéines non-structurales et structurales du VPC d'E.s. dans leur ensemble.

En ce qui se rapporte au sérum anti-virus, ce dernier engendrant un marquage cytoplasmique granulaire dépisterait très probablement les ag associés aux protéines structurales de la capsid virale du VPC d'E.s..

Cependant les sérums anti-polyèdre complet et anti-polyèdre dissout responsables dans le cytoplasme des cellules infectées d'un marquage diffus avec des granulations et d'un marquage autour et à la périphérie des polyèdres intracytoplasmiques mettrait en évidence les ag associés aux protéines structurales du polyèdre complet d'une part et ceux du polyèdre dissout d'autre part.

Il est bon de souligner que l'intensité du marquage intracytoplasmique varie selon le temps post-infection quelle que soit la lignée cellulaire impliquée. En fait, au fur et à mesure que le temps post-infection augmente, l'application du sérum anti-intestin conjugué (par exemple) nous permettant de déceler en grande partie les ag associés aux protéines non-structurales et structurales du VPC d'E.s. atteint un maximum de marquage puis le marquage subit une atténuation pour augmenter par la suite plus tardivement lors de l'infection. En effet, au cours des temps d'infection intermédiaires et avancés, un certain pourcentage des ag associés aux protéines structurales des capsides virales s'incorporent dans les polyèdres ainsi que des ag associés aux protéines structurales à l'intérieur des polyèdres en formation ne sont plus détectés par ce même

sérum anti-intestin conjugué n'étant plus accessibles à leurs IgGs homologues.

On remarque visuellement une atténuation de l'intensité du marquage plus prononcée chez les cellules de la lignée de L.d. (figures 6b à 6c) par rapport aux cellules de l'autre lignée (figures 7b à 7c) infectées avec la même concentration virale en VPC après un intervalle d'infection identique et marquées par ce même sérum (anti-intestin - HRP0). Aussi comme le nombre de polyèdres produits chez ces deux lignées est plus élevé chez L.d. que chez E.s. (tableau 10), il est logique que le phénomène d'incorporation des ag structuraux des capsides virales dans les polyèdres soit plus important chez L.d. que chez l'autre lignée. Il y a donc également une synthèse plus grande des diverses protéines virales dans cette première lignée (L.d.) par rapport à la seconde (E.s.).

De plus, les diverses méthodes de détection (directe et indirecte) à l'Ip appliquées sur diverses lignées cellulaires (L.d.; E.s.; C.f.) soumises ou non à une infection simple (VPC ou CIV) ou multiple (VPC-CIV) s'avèrent toutes deux spécifiques selon une série de contrôles effectuée en ce sens. D'abord des mesures de contrôle appliquant le DAB seul sans sérum nous permettent de conclure qu'aucune des cellules des diverses lignées cellulaires étudiées ne contient de la peroxydase endogène ayant pu nuire à la validité de nos résultats expérimentaux. Puis, l'application individuelle de divers sérums conjugués (normal; anti-CIV; anti-VPC neutralisé par le VPC) sur ces mêmes cellules d'insectes infectées par le VPC permettent de qualifier la technique à l'Ip comme spécifique. Cela puisque ces derniers contrôles se sont tous avérés

négatifs. Les cellules non-infectées ne sont également pas marquées non plus à l'Ip quel que soit le sérum conjugué impliqué.

En conclusion, on pourrait poursuivre cette étude en microscopie électronique afin de préciser le site de synthèse des divers ag viraux du VPC d'E.s. dans le cytoplasme de ces cellules d'insectes infectées avec ce VPC et marquées avec ces mêmes immuno-marqueurs (à l'Ip). On pourrait éventuellement appliquer une autre technique de détection telle la méthode à l'or colloïdale et de la protéine A (Roth, 1982) sur les mêmes systèmes cellulaires-virus. Et subséquemment comparer les résultats qualitatifs obtenus à partir de l'une ou l'autre méthode.

IV-3.2. Cinétiques de synthèse des divers ag viraux du VPC d'E.s.

IV-3.2.1 Effets de concentrations virales variées en VPC

A partir des cinétiques présentées aux figures 18 à 22 inclusivement, on note que les temps d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dans le cytoplasme des cellules des deux lignées cellulaires (L.d. et E.s.) soumises à des concentrations virales en VPC élevées ($10^{3.7}$ DICT_{50/ml}; $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}; $10^{4.7}$ DICT_{50/ml}) sont de 7 heures post-infection dans la majorité des cas. Cependant lorsque ces mêmes cellules sont infectées par une concentration virale en VPC plus faible ($10^{2.7}$ DICT_{50/ml}) bien que les ag viraux dans leur ensemble apparaissent toujours à ce même temps post-infection (7 heures), il n'en demeure pas moins que ceux associés aux protéines structurales des capsides virales sont produits 1 heure plus tard chez L.d. et 2 heures plus tard chez

l'autre lignée (E.s.). En ce qui se rapporte aux ag associés aux protéines structurales des polyèdres, ces derniers sont synthétisés 4 heures plus tard i.e. à 11 heures post-infection tant chez l'une que chez l'autre lignée soumises à cette même concentration de $10^{2.7}$ DICT_{50/ml}. Lorsque ces mêmes lignées sont infectées par une concentration virale en VPC moindre ($10^{0.7}$ DICT_{50/ml}), les divers ag viraux du VPC sont synthétisés encore plus tard. A vrai dire, les temps d'apparition des divers ag viraux chez ces mêmes cellules soumises à une telle concentration diffèrent les uns des autres tant chez l'une que chez l'autre lignée. Par exemple, les ag viraux dans leur ensemble y sont détectés à 15 heures post-infection chez L.d. tandis qu'ils le sont à 28 heures post-infection chez E.s..

On peut conclure qu'au cours de la phase précoce d'infection, il se produit une synthèse rapide des divers ag viraux du VPC à des taux de détection variables en terme de pourcentage de cellules marquées chez ces lignées cellulaires infectées par des suspensions virales titrant $10^{3.7}$ DICT_{50/ml}, de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et de $10^{4.7}$ DICT_{50/ml}. Cependant lorsque ces mêmes lignées sont soumises à des concentrations virales en VPC plus faibles, la synthèse de ces mêmes ag viraux dans le cytoplasme des cellules de ces lignées diminue de plus en plus au fur et à mesure que la concentration virale en VPC diminue.

Au cours de la phase intermédiaire post-infection, il semble intéressant de souligner un phénomène qui se manifeste à l'occasion lorsque ces deux mêmes lignées sont soumises à certaines concentrations virales en VPC. C'est-à-dire au moment où survient une phase de fléchissement des

pourcentages de cellules marquées pour les ag associés aux protéines structurales des capsides virales et que coïncide à ce même moment une phase de progression continue et régulière des pourcentages de ces mêmes cellules marquées pour les ag relatifs aux protéines structurales des polyèdres. Ce phénomène s'expliquerait par le fait que les ag associés aux protéines structurales des capsides virales s'incorporent dans les polyèdres devenant ainsi inaccessibles à leurs IgGs homologues (anti-virus). Cependant ceux associés aux protéines structurales des polyèdres sont soit plus facilement détectables par leurs IgGs respectives (anti-polyèdre dissout) ou soit qu'ils sont synthétisés d'une façon continue compensant ainsi pour ceux qui sont incorporés dans les polyèdres lesquels deviennent ainsi inaccessibles aux anticorps. Cette seconde hypothèse nous semblant plus probable. Ce phénomène est surtout mis en évidence lorsque ces deux mêmes lignées sont infectées par des concentrations virales en VPC de $10^{3.7}$ DICT_{50/ml} et de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}. A ce niveau, le phénomène d'incorporation des structures antigéniques des capsides virales dans les polyèdres est fort apparent chez la lignée de L.d. (début d'incorporation: 15 heures) par rapport à l'autre lignée (début d'incorporation: 18 heures) soumises toutes deux à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}. Cependant lorsque ces dernières lignées sont infectées par une concentration en VPC de $10^{3.7}$ DICT_{50/ml}, le phénomène d'incorporation est plus visible chez la lignée E.s. (début à 24 heures) par rapport à l'autre lignée (début à 10 heures). A des concentrations virales en VPC plus élevées ($10^{4.7}$ DICT_{50/ml}) ou plus basses ($10^{0.7}$ DICT_{50/ml}; $10^{2.7}$ DICT_{50/ml}), on n'est pas en mesure d'observer ce phénomène d'incor-

poration des ag structuraux des capsides virales du VPC d'E.s. dans les corps d'inclusions protéiniques avec les moyens immunoenzymatiques à l'Ip employés dans ce projet d'étude. Il est probable qu'avec l'usage de concentrations élevées en VPC se produise une synthèse plus continue et/ou plus importante des protéines des capsides virales facilement détectables par leurs IgGs homologues.

En guise de conclusion, il importe de mentionner aussi que les effets individuels des cinq concentrations virales en VPC chez les lignées cellulaires de L.d. et d'E.s. suivis à l'Ip (figures 18 à 22 inclusive-ment) démontrent que la lignée de L.d. est plus permissive que l'autre lignée devant l'une ou l'autre des concentrations testées quant à l'expression des divers ag viraux et au pourcentage de cellules les exprimant. En effet puisque le pourcentage des cellules marquées par les divers sérums est toujours plus élevé chez la lignée de L.d. que chez l'autre lignée quelle que soit la concentration virale en VPC impliquée. Ainsi donc le pourcentage de ces mêmes cellules marquées par ces mêmes sérums est proportionnel à la concentration virale en VPC testée tant chez l'une que chez l'autre lignée cellulaire.

Lors de travaux subséquents, il serait intéressant de tester les effets de concentrations en VPC plus élevées que celles employées dans le présent travail dans les mêmes systèmes cellulaires à l'aide de la même méthode de détection à l'Ip (microscopie optique). Cela dans le but de percevoir s'il y a inhibition, plafonnement ou hausse continue dans la synthèse des divers ag viraux du VPC d'E.s. chez ces mêmes lignées infectées.

IV-3.2.2 Effets de températures d'incubation variées

A partir des cinétiques présentées aux figures 23 à 27 inclusivement, on note que les temps d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dans le cytoplasme des cellules des lignées de L.d. et d'E.s. soumises à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} sont tous à 7 heures post-infection mais à des taux de détection différents quelle que soit la température d'incubation impliquée.

Aussi, quelle que soit la période post-infection en cours et quelle que soit la lignée infectée (L.d. ou E.s.) incubée à des températures supérieures (32°C et 37°C) ou inférieures (10°C et 18°C) à celle de 28°C, les synthèses des divers ag viraux associés aux diverses protéines structurales du VPC d'E.s. sont toujours inférieures à celles obtenues chez ces mêmes lignées infectées de même mais incubées à 28°C. Cela s'expliquerait peut-être par le fait que les cellules de ces lignées incubées à leurs températures optimales de croissance (28°C) sont mieux disposées à fournir les éléments essentiels (acides aminés, bases puriques et pyrimidiques, etc...) dans l'environnement intracytoplasmique nécessaires à la synthèse rapide de ces divers ag viraux. D'ailleurs, cette température correspond aussi à la température maximale de croissance du virus (VPC d'E.s.). Effectivement la figure 25 démontre clairement que les pourcentages de ces cellules marquées par les sérums sont à leur plus haut taux de détection lorsque ces mêmes cellules sont incubées à la température de 28°C.

Il semble intéressant de souligner le même phénomène d'incorporation des ag structuraux des capsides virales dans les polyèdres du VPC

d'E.s. qui se manifeste encore à l'occasion chez ces mêmes lignées infectées au cours de la phase intermédiaire d'infection selon la température d'incubation impliquée. Ce phénomène est surtout mis en évidence lorsque ces mêmes lignées infectées sont incubées à des températures de 32°C, de 28°C et de 18°C. A la température de 32°C, ce phénomène est visible uniquement chez la lignée de L.d. à partir de 24 heures post-infection. A la température de 28°C, ce phénomène est fort apparent tant chez la lignée de L.d. (début d'incorporation: 15 heures) que chez l'autre lignée (début d'incorporation: 12 heures) quoiqu'il l'est moins à 18°C chez ces deux mêmes lignées (début d'incorporation: 12 heures).

Aux températures extrêmes testées (10°C et 37°C), on n'est pas en mesure d'observer ce phénomène d'incorporation des ag structuraux des capsides virales dans les corps d'inclusions protéiniques. Il se produit probablement un effet inhibiteur occasionné à de telles températures sur le mécanisme de la répllication du virus (VPC) à un point tel que peu d'ag structuraux de ces capsides virales s'introduisent dans les polyèdres. Il est plus probable que ce phénomène est inexistant à ces températures extrêmes dû à l'absence de formation de ces polyèdres tant chez l'une que chez l'autre lignée infectée à 48 heures post-infection (tableau 10).

En guise de conclusion, il importe de mentionner aussi que les effets individuels des cinq températures d'incubation chez les lignées cellulaires de L.d. et d'E.s. suivis à l'Ip (figures 23 à 27) démontrent que la lignée de L.d. est plus permissive à l'infection au VPC que l'autre lignée à l'une ou l'autre des températures testées. Evidemment puisque le pourcentage des cellules marquées par les divers sérums est toujours plus

élevé chez la lignée de L.d. que chez l'autre lignée quelle que soit la température impliquée. A vrai dire, on observe une diminution de la synthèse des divers ag viraux du VPC d'E.s. tant chez l'une que chez l'autre lignée infectée et incubée à des températures supérieures (32°C et 37°C) ou inférieures (10°C et 18°C) à leurs températures optimales de croissance (28°C).

D'autres chercheurs tels Tripier et al. (1977) ont étudié en microscopie électronique l'effet de certaines températures sur la morphogénèse du FV₃ sur des fibroblastes d'embryons de poussins. Après une période de latence courte observée à la température de croissance optimale du FV₃ à 29°C, ils ont noté à partir de 5 heures à 15 heures post-infection une hausse de façon exponentielle du nombre de virions. Cependant, lorsque ces mêmes cellules fibroblastiques infectées de même ont été incubées à 37°C, aucune particule virale infectante n'a été produite. De plus, M. Arella (1983) a étudié les synthèses de polypeptides viraux dans les cellules de L.d. infectées par le VPC à diverses températures ainsi que la formation de polyèdres. Ses résultats confirment les nôtres obtenus par une autre technique.

IV-3.2.3 Effets de concentrations inhibitrices variées en cordycépine

A partir des cinétiques présentées aux figures 29 à 31 inclusivement, on note que les temps d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dans le cytoplasme des cellules des lignées de L.d. et d'E.s. soumises à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} sont tous à 7 heures post-infection.

On peut conclure qu'au cours de la phase précoce d'infection, il se produit une synthèse rapide des divers ag viraux associés aux diverses protéines structurales du VPC d'E.s. à des vitesses variables chez les deux lignées cellulaires inhibées à 1 heure post-infection avec une concentration en cordycépine de 0.10 ug/ml (figure 29). Cependant soumises à des concentrations plus élevées en cordycépine (0.20 ug/ml; 0.40 ug/ml), la vitesse de synthèse de ces mêmes ag viraux chez ces mêmes lignées diminue au fur et à mesure que la concentration inhibitrice de cet antibiotique s'élève. Cela comparativement aux résultats obtenus à partir de ces deux lignées-témoins sans cordycépine (figure 28).

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, il importe de souligner encore le phénomène d'incorporation des ag structuraux des capsides virales qui se manifeste toujours chez ces deux lignées selon la concentration en cordycépine impliquée. Ce phénomène d'incorporation est fort apparent chez L.d. inhibée avec une concentration de 0.10 ug/ml (début d'incorporation: 15 heures) quoiqu'il le soit légèrement chez E.s. inhibée de même (début d'incorporation: 10 heures) ou inhibée avec une concentration de 0.40 ug/ml (début d'incorporation: 12 heures). Néanmoins, on n'est pas en mesure de constater la présence d'un tel phénomène lorsque la lignée de L.d. est fortement inhibée avec une concentration en antibiotique de 0.40 ug/ml. Toutefois, le phénomène d'incorporation des ag structuraux des capsides virales demeure assez visible tant chez l'une que chez l'autre lignée soumises à une concentration en cordycépine de 0.20 ug/ml.

En guise de conclusion, il importe de mentionner aussi que les effets individuels des trois concentrations inhibitrices en cordycépine

chez les lignées de L.d. et d'E.s. suivis à l'Ip (figures 29 à 31) démontrent que la lignée de L.d. est plus permissive que l'autre lignée devant l'inhibition à la cordycépine quelle que soit sa concentration impliquée. Evidemment puisque le pourcentage des cellules marquées par les divers sérums est toujours plus élevé chez la lignée de L.d. par rapport à l'autre lignée quelle que soit la concentration en cordycépine testée. Ainsi donc le pourcentage de ces mêmes cellules marquées par ces mêmes sérums est inversement proportionnel à la concentration inhibitrice en cordycépine. Il va sans dire que la cordycépine en tant qu'inhibiteur compétitif de la poly(A) polymérase bloquant par le fait même la polyadénylation terminale-3' des ARN_m (Girard et Hirth, 1980) cellulaires sans doute essentiels dans les événements précoces de la répllication du VPC d'E.s.

D'autres travaux portent sur l'effet inhibiteur de la synthèse de virus. Entre autres, Tripiér et al. (1977) ont réussi à déterminer à l'aide de la microscopie électronique les exigences métaboliques nécessaires à la morphogénèse du FV₃ introduit dans les cellules fibroblastiques d'embryons de poussins en ajoutant certains inhibiteurs de synthèse de ce virus. Entre autres, le cycloheximide a bloqué la synthèse des protéines virales entraînant une inhibition des différentes étapes de la morphogénèse du FV₃. Cela puisqu'il n'y a pas eu une augmentation du nombre de virions durant l'incubation en présence de cet inhibiteur. Puis l'actinomycine D a bloqué la synthèse de l'ARN viral entraînant la formation d'un nombre élevé de particules virales immatures (capsides vides) observées à l'intérieur ou à l'extérieur des viroplasmies. Finalement sous l'effet de la cytosine arabinoside, aucune particule virale ni de capside mature ou

immature n'est apparue.

IV-3.2.4 Effets de périodes post-infection variées avant l'application de la cordycépine

A partir des cinétiques présentées aux figures 32 à 36 inclusivement, on note que les temps d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dans le cytoplasme des cellules des lignées de L.d. et d'E.s. soumises à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à une concentration inhibitrice en cordycépine de 0.20 ug/ml appliquée à divers temps d'infection sont de 7 heures post-infection quelle que soit la période post-infection sans cordycépine impliquée. Si nous avons procédé à des temps de fixation plus précoces que 9 heures au cours des périodes post-infection de 10 heures (figure 35) et de 18 heures (figure 36) avant l'application de la cordycépine, on aurait pu percevoir plus tôt (7 heures post-infection) la synthèse des divers ag viraux mais à des taux inférieurs à ceux obtenus à 9 heures post-infection tels que présentés aux figures 35 et 36.

On peut conclure qu'au cours de la phase précoce d'infection, il se produit une synthèse rapide des divers ag viraux à des vitesses variables chez ces mêmes cellules infectées de même et inhibées de même à des temps d'infection virale sans cordycépine de 6 heures, de 10 heures et de 18 heures post-infection. Cette synthèse rapide équivaut à celle observée chez les mêmes lignées infectées mais non-inhibées (figure 28). Cependant la vitesse de synthèse des divers ag viraux chez ces deux lignées diminue au fur et à mesure que le temps d'infection virale sans cordycépine se raccourcit (1 heure; 2 heures).

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, il importe de souligner encore le phénomène d'incorporation des ag associés aux protéines structurales des capsides virales dans les polyèdres qui se manifeste toujours de façon plus ou moins intensive selon le temps d'infection virale sans cordycépine impliqué. Chez la lignée de L.d. inhibée après un temps d'infection virale sans cordycépine de 18 heures post-infection, on remarque que ce phénomène d'incorporation survient au même temps post-infection (18 heures) que celui observé chez cette même lignée non-inhibée quoique la durée d'incorporation est plus longue.

Au cours des autres temps d'infection virale sans cordycépine appliqués chez cette même lignée (L.d.), ce phénomène d'incorporation survient aussi aux environs du même temps post-infection soit 18 heures. Aussi ce phénomène est autant apparent chez cette dernière lignée inhibée à des temps d'infection virale sans cordycépine de 2 heures et de 18 heures que chez cette même lignée non-inhibée (figure 28). Ce phénomène n'est point apparent à un temps d'infection virale sans cordycépine de 6 heures.

Chez la lignée d'E.s. inhibée après des temps d'infection virale sans cordycépine de 6 heures, de 10 heures et de 18 heures, on remarque que le phénomène d'incorporation des ag structuraux des capsides virales dans les polyèdres survient généralement à 18-20 heures post-infection à un temps autre que celui observé chez cette même lignée non-inhibée (12 heures). On remarque que le phénomène d'incorporation des ag structuraux des capsides virales est aussi manifeste chez cette dernière lignée que chez l'autre lignée (L.d.) inhibées toutes deux à des temps d'infec-

tion virale sans cordycépine de 6 heures, de 10 heures et de 18 heures. De plus, on remarque que le phénomène d'incorporation se produit plus tard chez la lignée d'E.s. inhibée (début d'incorporation: 18-20 heures) que chez cette même lignée non-inhibée (début d'incorporation: 12 heures). Cependant chez cette même lignée d'E.s. inhibée à des temps d'infection virale sans cordycépine de 1 heure et de 2 heures, on note que le phénomène d'incorporation survient plus tôt que celui observé à des temps d'infection virale sans cordycépine plus longs (6 heures; 10 heures; 18 heures) soit à 12 heures post-infection quoiqu'il survient au même temps chez cette lignée non-inhibée (figure 28). Toutefois le phénomène d'incorporation des ag structuraux des capsides virales dans les polyèdres est plus apparent chez cette lignée (E.s.) non-inhibée que chez cette même lignée inhibée à diverses périodes post-infection.

En guise de conclusion, il importe de mentionner aussi que les effets individuels des cinq périodes post-infection sans cordycépine chez les lignées cellulaires de L.d. et d'E.s. suivis à l'Ip (figures 32 à 36) démontrent que la lignée de L.d. est plus permissive que l'autre lignée devant l'inhibition à la cordycépine quel que soit le temps d'application de cet antibiotique impliqué. Evidemment puisque le pourcentage des cellules marquées par les divers sérums est toujours plus élevé chez la lignée de L.d. que chez l'autre lignée quel que soit le temps d'application de la cordycépine testé. Ainsi donc le pourcentage de ces mêmes cellules marquées par ces mêmes sérums est directement proportionnel au temps d'infection virale sans cordycépine.

Il va sans dire que le temps d'application d'une même concentra-

tion inhibitrice en cordycépine (0.20 ug/ml) agit sur la synthèse des divers ag viraux du VPC d'E.s.. De telle sorte que plus vite est appliqué cet antibiotique, plus vite on remarque un retard dans la synthèse des divers ag viraux et vice versa.

Il est bon de mentionner qu'Arella (1983) a aussi procédé à des essais expérimentaux traitant de l'effet de certains inhibiteurs de synthèse du VPC d'E.s. (cordycépine entre autres) appliqués à divers temps post-infection chez la lignée de L.d. infectée par ce VPC. Tout en préconisant une autre méthode de détection telle l'If laquelle fut appliquée sur les polypeptides viraux séparés au préalable sur gel électrophorétique. Nos propres résultats sont en concordance avec ceux obtenus par ce dernier auteur (Arella, 1983) même s'il a testé l'effet d'une tout autre concentration en cordycépine soit 20 ug/ml sur le VPC d'E.s. uniquement chez la lignée de L.d.. Il a noté que cette concentration en inhibiteur appliquée à des temps d'infection virale de 0 et de 8 heures inhibe la formation des polypeptides du VPC d'E.s.. Appliquée plus tard soit à 24 heures ou 48 heures post-infection, la présence de la cordycépine ne semble pas influencer l'apparition de ces mêmes polypeptides viraux.

Il serait intéressant de tester des temps d'infection virale sans cordycépine plus longs que ceux utilisés dans ce travail en employant des concentrations en cordycépine plus élevées.

En guise de conclusion générale, nos résultats expérimentaux se rapportant aux temps d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. (7 heures post-infection) chez les lignées d'E.s. et de L.d. concordent

avec ceux soulevés par d'autres chercheurs. Entre autres, Payment et al. (1982) ont noté grâce à la technique E.L.I.S.A. un début de synthèse des protéines virales de ce même VPC à 9 heures post-infection chez la lignée de L.d. soumise à une concentration virale en VPC de $1.0 \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$. Nos observations sont aussi en accord avec ceux tirés d'Arella et al. (1984). Ces derniers auteurs ont identifié par Ip après séparation sur gel électrophorétique le polypeptide majeur du polyèdre (28 Kd) chez L.d.. Ce polypeptide majeur fut produit à 8 heures post-infection. Arella et al. (1984) ont réussi à identifier par cette même technique six autres polypeptides viraux du VPC d'E.s. chez cette même lignée. Ils ont été mis en évidence à 24 heures post-infection à 22°C ou 28°C .

Dans notre cas, on a orienté notre recherche dans le but de déterminer s'il y a lieu les différences dans les temps d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. tant chez la lignée de L.d. que chez celle d'E.s.. D'après nos résultats expérimentaux, on peut conclure que les divers ag viraux de ce virus apparaissent dans la majorité des cas tous en même temps (7 heures post-infection) à des taux de détection variables tant chez l'une que chez l'autre lignée. Cependant, lorsque ces dernières lignées sont soumises à des conditions expérimentales de faibles concentrations virales en VPC ($10^{2.7} \text{ DICT}_{50/\text{ml}}$; $10^{0.7} \text{ DICT}$), on observe un retard dans l'apparition de ces mêmes ag viraux (figures 21 et 22).

Eventuellement, il serait intéressant de déterminer les temps exacts d'incorporation des ag associés aux protéines structurales des capsides virales dans les polyèdres en microscopie électronique tout en employant chez ces mêmes types de cellules infectées par le VPC d'E.s. la méthode de détection à l'Ip.

IV-3.2.5 Effet d'une infection double avec des concentrations virales variées de CIV

A partir des cinétiques présentées aux figures 37a à 39a inclusivement, on note que les temps d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. dans le cytoplasme des cellules de la lignée de C.f. soumise à une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et à une concentration virale variée en CIV sont variables les uns des autres selon la concentration virale en CIV impliquée.

Sous l'effet d'une concentration virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et d'une concentration virale en CIV de 0.05 UDO (figure 37a), les ag viraux dans leur ensemble et ceux des protéines structurales des capsides virales sont synthétisés à 8 heures post-infection quoique ceux relatifs aux protéines structurales des polyèdres le sont à 24 heures post-infection. A noter que les deux premiers ag apparaissent plus tôt lorsque cette même lignée est soumise à cette infection multiple que lorsqu'elle l'est à la simple infection avec le VPC. Quoique les ag associés aux protéines structurales des polyèdres sont produits en même temps mais à des taux de détection différents.

Sous l'effet d'une concentration virale en VPC identique et d'une concentration virale en CIV plus élevée (0.10 UDO) uniquement les ag viraux dans leur ensemble apparaissent à 8 heures post-infection chez cette même lignée infectée doublement quoique les autres ag sont synthétisés plus tard (24 heures post-infection).

Sous l'effet d'une concentration virale en VPC identique et d'une concentration virale en CIV plus élevée que la précédente (0.50 UDO), les

temps d'apparition des divers ag viraux du VPC d'E.s. sont les mêmes que ceux notés chez cette même lignée atteinte d'une infection double du même type tels que décrits antérieurement.

Lorsque l'on compare les effets individuels de ces trois concentrations en CIV pour une même concentration virale en VPC chez cette lignée de C.f., il semble se produire à une concentration en CIV de 0.05 UDO une faible stimulation apparaissant précocement de la synthèse de certains ag viraux du VPC d'E.s.. Cependant en présence de concentrations plus fortes en CIV (0.10 UDO; 0.50 UDO), une stimulation retardée mais intense de la synthèse de la majorité des ag viraux est notée. Cependant quelle que soit la concentration en CIV impliquée, les ag viraux dans leur ensemble sont toujours détectés à 8 heures post-infection comparativement à ce que l'on observe chez cette même lignée infectée simplement par le VPC à 24 heures post-infection.

Au cours de la phase précoce d'infection, la vitesse de synthèse des divers ag viraux est semblable que la lignée de C.f. soit infectée par une concentration en CIV de 0.05 UDO ou par celle de 0.10 UDO. Cette même vitesse de synthèse est légèrement plus accrue que celle observée chez cette même lignée soumise à une infection simple au VPC. Cependant lorsque la lignée de C.f. est atteinte par une concentration plus élevée en CIV de 0.50 UDO, on observe une vitesse de synthèse très accentuée par rapport aux autres tirées des deux autres concentrations virales en CIV au cours de cette même période post-infection (phase précoce).

Au cours de la phase intermédiaire d'infection, on observe en général un plafonnement de la synthèse de ces mêmes ag viraux du VPC d'E.s. chez cette lignée (C.f.) quelle que soit la concentration virale en CIV impliquée.

En ce qui se rapporte au phénomène d'incorporation des ag associés aux protéines structurales des capsides virales dans les polyèdres, ce dernier phénomène se manifeste légèrement chez la lignée de C.f. soumise à une infection simple au VPC soit aux environs de 30 heures et de 75 heures post-infection. Cependant soumise à une double infection (VPC-CIV) avec une concentration en CIV de 0.05 UDO, on remarque le phénomène d'incorporation plus accentué à 45 heures post-infection. Sous l'effet de la même infection double avec une concentration en CIV plus élevée (0.10 UDO), on observe chez la lignée de C.f. de façon discrète le phénomène d'incorporation à 75 heures post-infection cependant lorsque coinfectede avec une concentration en CIV de 0.50 UDO le phénomène est plus apparent dans ce cas à 50 heures post-infection.

En guise de conclusion, il importe de mentionner aussi que les effets des trois concentrations stimulatrices en CIV chez la lignée de C.f. tels que détectés par les marquages en Ip (figures 37a à 39a) démontrent clairement que la lignée de C.f. est plus permissive au VPC lors d'une infection multiple du type VPC-CIV par rapport à une infection simple au VPC. Evidemment puisque le pourcentage des cellules marquées par les divers sérums est plus élevé lorsque cette même lignée est infectée avec une concentration en CIV très élevée (0.50 UDO) quelle que soit la période post-infection en cours. Ainsi donc le pourcentage de ces mêmes cellules marquées par ces mêmes sérums chez la lignée de C.f. soumise à une double infection du type VPC-CIV est directement proportionnel à la concentration virale en CIV.

Il va sans dire que l'association des deux virus (VPC-CIV) en-

gendre la stimulation de la synthèse des divers ag viraux du VPC d'E.s. . Il se produit un effet de synergisme entre ces deux virus lequel est responsable de la synthèse accrue des divers ag viraux du VPC d'E.s. chez la lignée de C.f.. Cet effet de synergisme est d'autant plus apparent lorsque cette lignée infectée doublement est atteinte par la concentration virale en CIV de 0.50 UDO.

En ce qui se rapporte aux autres recherches effectuées sur les mêmes systèmes cellulaires-virus (C.f.-VPC-CIV), Arella en 1983 a observé en microscopie électronique dans le cytoplasme des cellules de cette lignée (C.f.) l'apparition temporelle des particules virales et des polyèdres du VPC d'E.s. coinfectées avec le CIV à partir de 36 heures post-infection. Donc nos résultats expérimentaux sont en concordance avec ceux de ce dernier auteur.

IV-4. Production des polyèdres du VPC d'E.s.

Selon nos résultats expérimentaux (tableau 10), on peut conclure que les temps d'apparition initiaux des polyèdres intracytoplasmiques du VPC d'E.s. (48 heures post-infection) sont similaires tant chez l'une que chez l'autre lignée lorsque ces dernières sont soumises aux mêmes concentrations virales en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml} et de $10^{4.7}$ DICT_{50/ml}. En ce qui se rapporte à la lignée de L.d., Quiot et Belloncik (1977) ont détecté les premiers polyèdres très petits dans le cytoplasme des cellules de cette lignée après 18 et 36 heures d'infection. Ils ont noté que les polyèdres ont atteint leur taille maximum après 48 heures d'infection dans plus de 90% des cellules infectées par le VPC d'E.s. (contraste de pha-

se). Si ces résultats diffèrent légèrement des nôtres, on peut attribuer cela à la concentration virale différente testée dans l'un comme dans l'autre cas.

Bien que le pourcentage des cellules contenant des polyèdres s'équivaut tant chez la lignée de L.d. que chez la lignée d'E.s., il n'en demeure pas moins que la moyenne de polyèdres par cellule ayant des polyèdres est plus élevée chez L.d. que chez l'autre lignée quelles que soient la concentration en VPC productrice et la période post-infection impliquées (tableau 10). Confirmant ainsi la permissivité plus grande de cette lignée déjà démontrée par la technique à l'Ip.

La température d'incubation influencerait aussi la production des polyèdres intracytoplasmiques de ce même VPC chez les lignées de L.d. et d'E.s. (tableau 10). On note l'absence de polyèdres après 48 heures d'incubation à 10°C et 37°C et la présence de quelques polyèdres dans un faible pourcentage de cellules incubées à 18°C. On remarque une hausse de la production de ces polyèdres chez ces deux mêmes lignées incubées à 32°C. Cependant à 28°C, la production de ces derniers est à son maximum chez ces mêmes lignées. Bien que le pourcentage des cellules contenant des polyèdres est identique tant chez l'une que chez l'autre lignée quelle que soit la température d'incubation impliquée, il n'en demeure pas moins que la lignée de L.d. est plus permissive que l'autre lignée devant l'infection virale au VPC d'E.s.. Effectivement puisque les cellules productrices de polyèdres de la lignée de L.d. rassemblent trois fois plus de polyèdres que celles de la lignée d'E.s. incubées à la température optimale de croissance (28°C) de ces deux types de cellules.

Les travaux d'Arella (1983) indiquent contrairement aux nôtres une inhibition de la formation de ces mêmes polyèdres à des températures de 32°C et de 37°C, et un très faible pourcentage des cellules de L.d. productrices à 10°C. A cette basse température, il a réussi à observer de faibles quantités du polypeptide majeur des polyèdres (28 Kd) dès 24 heures post-infection toujours chez la lignée de L.d. infectée avec le VPC d'E.s.. Ce même chercheur apporte certains arguments scientifiques pouvant expliquer le phénomène d'inhibition de la formation des polyèdres de ce virus provoqué seulement à certaines températures. Selon lui, les températures non-optimales de croissance du VPC d'E.s. affecterait la transcription ou la traduction des gènes viraux. Ces mêmes températures agissant directement sur l'ARN polymérase de ce VPC et sur les facteurs enzymatiques de la formation de la coiffe 5'-terminale de ce même VPC.

La cordycépine inhiberait aussi selon nos résultats décrits au tableau 10 la formation des polyèdres du VPC d'E.s. tant chez l'une que chez l'autre lignée mais à des degrés variés selon la concentration en cordycépine impliquée. Le degré d'inhibition est donc en relation étroite avec la concentration inhibitrice en cordycépine testée. Cependant la lignée d'E.s. semble plus affectée que l'autre lignée puisque sous l'effet d'une concentration en cordycépine de 0.20 ug/ml, on ne décèle aucunement la présence de polyèdres chez la lignée d'E.s. contrairement à l'autre lignée (L.d.) où l'on note l'existence de 7% de cellules productrices de polyèdres.

Nos résultats sont en concordance avec ceux d'Arella (1983) puisque ce dernier a démontré dans le cadre de son projet de recherche de

doctorat que la cordycépine se révèle aussi un inhibiteur de la formation des polyèdres intracytoplasmiques du VPC d'E.s. chez la lignée de L.d.. Selon ce chercheur, l'inhibition de la production de ces mêmes polyèdres provoquée par la présence de la cordycépine à un stade précoce d'infection s'expliquerait par l'intervention d'un facteur intrinsèque cellulaire régissant l'apparition des polyèdres du VPC d'E.s..

Selon nos résultats présentés au tableau 10, on peut conclure aussi qu'une même concentration inhibitrice en cordycépine (0.20 ug/ml) appliquée à divers temps post-infection semble influencer la production des polyèdres chez les deux lignées cellulaires de L.d. et d'E.s. soumises à une même concentration virale en VPC ($10^{4.0}$ DICT₅₀/ml). Plus précocement au cours de l'infection est appliquée la cordycépine, plus on remarque l'effet inhibiteur de la synthèse des polyèdres tant chez l'une que chez l'autre lignée. A ce niveau, on remarque que la lignée de L.d. semble plus permissive que l'autre lignée soumises toutes deux aux mêmes conditions physico-chimiques à des périodes post-infection sans cordycépine de 10 heures et de 18 heures respectivement.

D'autres chercheurs tels Belloncik et Arora (1979) ont démontré aussi l'effet inhibiteur de ce même antibiotique (0.20 ug/ml) appliqué à différents temps d'intervalle post-infection. Ils ont observé en microscopie électronique une inhibition forte de la synthèse des polyèdres du VPC d'E.s. durant les 6 premières heures chez la lignée de L.d.. Lorsque l'inhibiteur est appliqué à 18 heures post-infection, ils ont noté une hausse légère du nombre de ces polyèdres intracytoplasmiques chez cette même lignée.

L'effet d'une infection multiple du type VPC-CIV semble stimuler la production des polyèdres du VPC d'E.s. chez la lignée de C.f.. En effet, le CIV augmente le pourcentage des cellules de cette lignée renfermant les polyèdres et la moyenne de polyèdres par cellule ayant des polyèdres quelle que soit la concentration en CIV impliquée (tableau 11). Effectivement lorsque ces mêmes cellules sont soumises à l'infection simple au VPC, on ne détecte pas de polyèdres au cours des divers temps post-infection étudiés. Les taux de production des polyèdres sont fonctions de la concentration virale en CIV impliquée chez la lignée de C.f. soumise à la double infection. Tout comme Arella (1983), nous sommes en présence d'une forme de synergisme entre ces deux virus provoquant une augmentation de la production des polyèdres proportionnelle à la concentration stimulatrice en CIV. Cependant ce dernier auteur a démontré que la dose virale en CIV de 0.10 UDO était responsable d'une plus forte augmentation de la production des polyèdres que celle de 0.50 UDO contrairement à ce que nous avons obtenu (tableau 11). Ces derniers résultats diffèrent peut-être par rapport à la concentration virale en VPC testée n'étant pas la même ($10^{6.23}$ DICT_{50/ml}) que celle utilisée dans ce travail ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}), contrairement à la suspension cellulaire (2×10^5 cellules/ml) employée dans l'un comme dans l'autre projet de recherche au cours de cet essai expérimental.

IV-5. Traitements mathématiques

A partir des analyses informatisées effectuées, certaines constatations ont été établies. Entre autres, il semble exister une différence de comportement à l'infection virale au VPC chez les deux lignées

cellulaires de L.d. et d'E.s.. Selon le tableau 12, les temps post-infection où l'on obtient en culture de tissus 50% et 95% des cellules marquées à l'Ip sont plus courts dans la majorité des cas chez la lignée de L.d. par rapport à l'autre lignée quelle que soit la concentration en VPC impliquée. Par exemple, lorsque ces deux types de lignées sont infectées par une concentration de ce virus de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}, 50% des cellules de L.d. sont marquées par un sérum anti-intestin à 18 heures post-infection alors qu'un même pourcentage des cellules d'E.s. le sont à 27 heures post-infection. Cependant lorsque ces deux mêmes lignées sont soumises à une concentration virale en VPC plus forte ($10^{4.7}$ DICT_{50/ml}), 50% des cellules de L.d. et d'E.s. sont marquées par ce sérum à 10 heures et 14 heures post-infection respectivement. Même si l'on perçoit encore dans ce dernier cas la différence de comportement à l'infection virale chez ces deux lignées, l'augmentation de la concentration virale en VPC provoque toutefois une diminution des temps post-infection nécessaires au marquage de 50% de ces deux types de cellules tant chez une lignée que chez l'autre. Il en est de même en ce qui se rapporte aux temps post-infection nécessaires au marquage de 95% des cellules de L.d. et d'E.s.. On peut relever en plus à partir de ce tableau 12 que les temps post-infection les plus courts où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% et de 95% de ces deux types de cellules sont déterminés par le sérum anti-intestin chez L.d. et par le sérum anti-polyèdre dissout chez E.s..

Afin de pousser plus loin l'interprétation mathématique des résultats d'analyse informatisée se rapportant à la variation de la concentration virale en VPC chez ces deux mêmes lignées, on a porté sur papier Probit les valeurs de temps post-infection en log en fonction des pourcen-

tages de cellules marquées à l'Ip sur échelle Probit tels qu'obtenus sur le programme informatisé (section II-4). On s'est cependant limité à l'interprétation de deux concentrations diverses en VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml} ; $10^{4.7}$ DICT_{50/ml}) tant chez l'une que chez l'autre lignée infectées et marquées par un sérum anti-intestin. Les figures 41 et 42 se réfèrent respectivement aux lignées de L.d. et d'E.s.. Au niveau de ces deux figures, on remarque tant chez l'une que chez l'autre lignée une relation linéaire existante entre le log du temps post-infection et le Probit du pourcentage des cellules marquées à l'Ip. On peut conclure que la dose virale de $10^{4.7}$ DICT_{50/ml} a réellement un pouvoir plus infectieux comparativement à l'autre dose virale ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}) puisque les temps nécessaires par exemple pour obtenir un marquage à l'Ip de 50% ou de 95% des cellules de l'une ou l'autre lignée sont plus courts lorsque ces dernières sont soumises à la dose virale la plus élevée ($10^{4.7}$ DICT_{50/ml}) (figures 41 et 42). Aussi, si l'on compare les effets individuels de ces deux doses virales chez ces deux lignées, il semble que la lignée de L.d. est plus permissive devant l'infection virale quelle que soit la concentration virale impliquée ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml} ou $10^{4.7}$ DICT_{50/ml}). Puisque pour un même temps post-infection (log du temps post-infection de 1.5 par exemple) des pourcentages de cellules marquées de 70% chez L.d. et de 54% chez E.s. sont déterminés lorsque ces dernières lignées sont soumises à une même dose virale en VPC de $10^{4.0}$ DICT_{50/ml}. A noter que ces deux figures intégrées dans cette étude sont à titre d'exemples. On pourrait agir de la sorte sur les résultats tirés des expériences portant sur la variation de la température d'incubation, de la variation de la concentration inhibitrice en cordycépine, de la variation de la concentration stimula-

Figure 41

Relation linéaire existant entre les données logarithmiques des temps post-infection et les données probit des pourcentages de cellules de la lignée de L.d. marquées à l'Ip par un sérum anti-intestin conjugué.

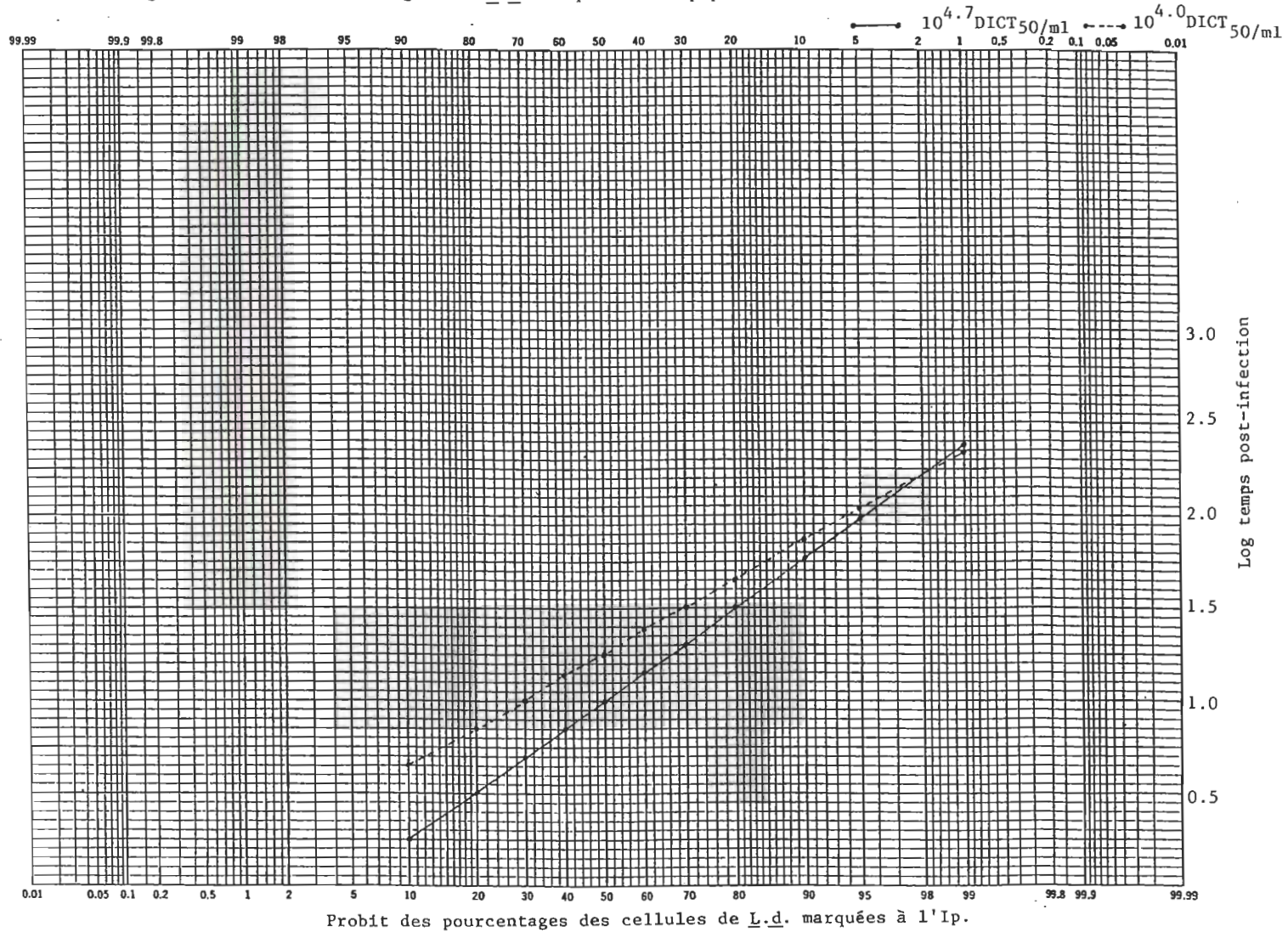
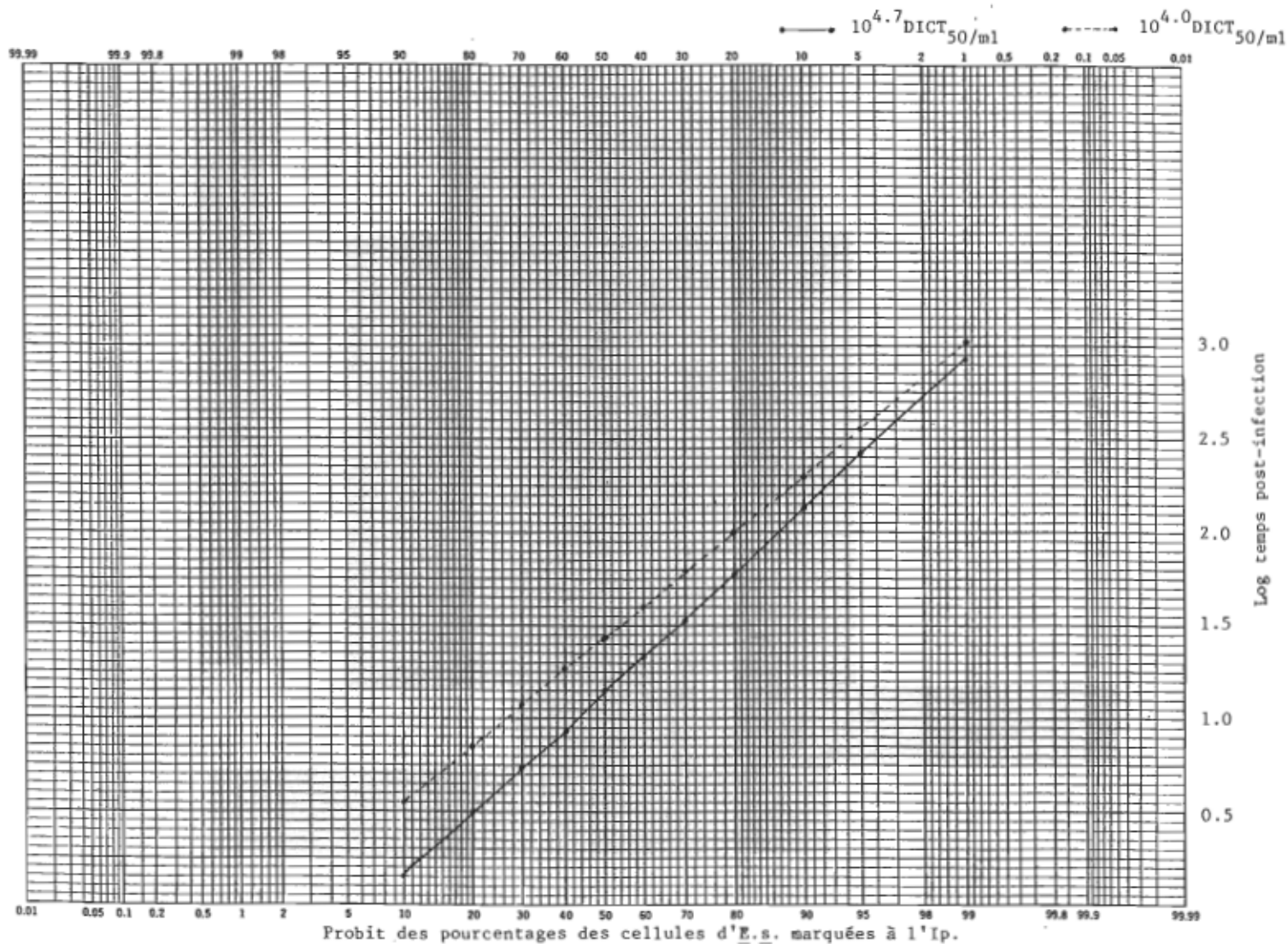


Figure 42

Relation linéaire existant entre les données logarithmiques des temps post-infection et les données probit des pourcentages de cellules de la lignée d'E.s. marquées à l'Ip par un sérum anti-intestin conjugué.



trice du CIV, etc... .

Il semble important de souligner aussi une différence de comportement à l'inhibition de la cordycépine chez les deux lignées de L.d. et d'E.s. infectées et par la suite inhibées avec cet antibiotique à diverses périodes post-infection. En effet, les temps post-infection où l'on obtient le marquage à l'Ip de 95% des cellules de ces deux types de lignées inhibées par la cordycépine appliquée sont très variables d'une lignée à l'autre lorsque le marquage est effectué par un sérum en particulier à divers temps post-infection.

Il semble important de mentionner aussi une autre variation de comportement entre ces deux mêmes lignées soumises à une même concentration virale en VPC ($10^{4.0}$ DICT_{50/ml}) et à une même concentration de cordycépine (0.20 ug/ml). Quel que soit le sérum marqué impliqué, les temps post-infection avant l'application de la cordycépine où l'on obtient le marquage à l'Ip de 50% des cellules sont plus courts chez L.d. par rapport à l'autre lignée quelles que soient les heures de lecture des résultats (15 heures ou 24 heures) (tableau 16).

En guise de conclusion, un autre étudiant gradué en la personne de Jean Lacoursière (1984) s'est attardé aussi à l'interprétation mathématique mais très poussée de ses résultats expérimentaux traités au préalable sur le même programme informatique employé dans le présent mémoire. Ses recherches ont portées sur l'étude du potentiel larvicide du B. thuringiensis sérovariété israelensis (insecticide expérimental: TEKNAR) sur deux groupes de mouches noires (Simulium decorum et Prosimulium gr. mixture).

Il est intéressant de constater que de telles analyses puissent s'appliquer à des données semi-quantitatives permettant de retirer d'expériences de marquage en I_p plus de renseignements que l'on en retire normalement.

Perspective d'avenir

L'emploi de la méthode de détection immunoenzymatique par l'Ip nous permet donc de détecter en microscopie optique les divers ag viraux du VPC d'E.s. chez les lignées cellulaires d'invertébrés d'Euxoa scandens, de Lymantria dispar et de Choristoneura fumiferana cultivées. Cette méthode sensible nous permet d'établir en plus les cinétiques d'apparition des divers ag viraux de ce même virus.

Comme l'Ip s'avère avant tout une méthode qualitative et semi-quantitative, notre étude pourrait être complétée par l'E.L.I.S.A. . Cette dernière technique servirait à quantifier précisément en terme de ug/g de cellules les divers ag viraux synthétisés dans les cellules-cibles. On pourrait procéder à des travaux supplémentaires en microscopie électronique en se servant de l'Ip et/ou d'une autre méthode immunologique telle la technique à l'or colloïdale et à la protéine A afin de mieux comprendre le mécanisme intrinsèque de la réplication de ce virus.

Il serait également intéressant dans un avenir prochain d'appliquer la technique immunologique à l'Ip sur d'autres systèmes cellulaires-virus à des fins de dépistage d'autres viroses d'insectes (granuloses, entomopox, etc...).

On pourrait éventuellement se servir de cette technique dans le but de diagnostiquer des larves atteintes en nature. Et de déterminer s'il s'agit d'un virus à réplication nucléaire ou cytoplasmique ou d'un tout autre microorganisme (bactérie, protozoaire, etc...).

L'application de cette méthode sur le terrain nous permettrait de voir notamment les fréquences d'infection naturelle d'une part, et de

mesurer l'efficacité de traitements insecticides viraux dans l'environnement contre les pestes nuisibles.

Cette technique pourrait également nous permettre de déceler l'accumulation ou la réplication des virus utilisés comme insecticides chez des espèces non-cibles (mammifères, amphibiens, insectes de d'autres espèces que celles visées, etc...).

On voit donc qu'en virologie des invertébrés un vaste champ s'ouvre pour l'utilisation de cette technique.

Remerciements

Je remercie sincèrement tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de maîtrise soient:

Le Dr. Guy Charpentier, directeur de ce projet pour l'intérêt, l'appui et la disponibilité qu'il a manifesté tout au long de cet ouvrage. Ses conseils judicieux et ses critiques positives m'ont facilité la tâche tout en élargissant mes connaissances.

Les Drs. Jacques Boisvert et Serge Belloncik, pour leurs suggestions pertinentes au cours de la réalisation de ce projet.

Madame Chantal Alarie, pour sa précieuse collaboration et son encouragement soutenu.

Mesdames Micheline Boulianne et Françoise Caron, pour leurs précieuses aide-technique.

Monsieur Jean Lacoursière, pour sa participation active aux procédures d'entrée de mes données expérimentales sur ordinateur à des fins d'analyse mathématique.

Monsieur Michel Tessier, pour la supervision de l'orthographe de cet ouvrage.

Certains organismes gouvernementaux "CRNSG" et "FCAC", pour leurs supports financiers.

Références

- ADAMS, J.R. et T.A. WILCOX (1982). Scanning electron microscopical comparisons of insect virus occlusion bodies prepared by several techniques. J. Invertebr. Pathol. 40: 12-20.
- ANDREADIS, T.G. (1981). A new cytoplasmic polyhedrosis virus from the salt-marsh mosquito, Aedes cantator (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol. 37: 160-167.
- ANTHONY, D.W., E.I. HAZARD et S.W. CROSBY (1973). A virus disease in Anopheles quadrimaculatus. J. Invertebr. Pathol. 22: 1-5.
- ARELLA, M. (1983). Réplication en culture cellulaire du virus de la polyédrose cytoplasmique (VPC) d'Euxoa scandens, Riley, (Noctuidae, Agrotinae). Thèse de Ph. D. en Virologie, Institut Armand-Frappier, Laval-des-Rapides (Canada), XVII-227 p.
- ARELLA, M., S. BELLONCIK et G. DEVAUCHELLE (1982a). Studies on the replication of a cytoplasmic polyhedrosis virus in cell cultures. IIIrd. International Colloquium on Invertebrate Pathology, September 6-10, Brighton (England).
- ARELLA, M., S. BELLONCIK et G. DEVAUCHELLE (1982b). Coinfection of a lepidopteran cell line with cytoplasmic polyhedrosis virus and Chilo iridescent virus. In Vitro 18 (3): 298.
- ARELLA, M., S. BELLONCIK et G. DEVAUCHELLE (1983). Dual infection of a lepidopteran cell line with the cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) and the Chilo iridescent virus (CIV). Ann. Virol. 134 E: 455-463.
- ARELLA, M., S. BELLONCIK et G. DEVAUCHELLE (1984). Protein synthesis in a Lymantria dispar cell line infected by cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Virol. 52 (3): 1024-1027.
- ARNOTT, H.J., K.M. SMITH et S.L. FULLILOVE (1968). Ultrastructure of a cytoplasmic polyhedrosis virus affecting the monarch butterfly, Danaus plexippus. J. Ultrastruct. Res. 24: 479-507.
- ARUGA, H., N. YOSHITAKE et H. WATANABE (1963). Some factors controlling the size of the cytoplasmic polyhedron of Bombyx mori L. . J. Invertebr. Pathol. 5: 72-77.
- ASAI, J., F. KAWAMOTO et S. KAWASE (1972). On the structure of the cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol. 19: 279-280.
- AVRAMEAS, S. et T. TERNYNCK (1971). Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. Immunochemistry 8: 1175-1179.

- BACK, C., A. LEBLANC et A. AUBIN (1983). Effets sur la dérive des insectes aquatiques d'un traitement au téméphos contre les larves de moustiques dans le Québec subarctique. The Canadian Entomologist 115: 703-712.
- BAILEY, C.H. (1977). Field and laboratory observations on a cytoplasmic polyhedrosis virus of blackflies (Diptera: Simuliidae). J. Invertebr. Pathol. 29: 69-73.
- BAILEY, C.H., M. SHAPIRO et R.R. GRANADOS (1975). A cytoplasmic polyhedrosis virus from the larval blackflies Cnephia mutata and Prosimulium mixtum (Diptera: Simuliidae). J. Invertebr. Pathol. 25: 273-274.
- BARRAY, S. et G. DEVAUCHELLE (1979). Etude des polypeptides de structure du virus iridescent de Chilo suppressalis (Iridovirus type 6) Can. J. Microbiol. 25 (7): 841-849.
- BARTOSZCZE, M. et J. ROSZKOWSKI (1979). The use of the indirect immunoperoxidase method for the detection of Aujeszky's disease virus in cell culture. Zbl. Vet. Med. B 26: 253-256.
- BECK, S.D. (1960). Growth and development of the greater wax moth Galleria mellonella (Lepidoptera). Wisconsin Acad. Sci. 49: 138-148.
- BELLEMARE, N. et S. BELLONCIK (1981). Etudes au laboratoire des effets d'une polyédrose cytoplasmique sur le vers gris blanc Euxoa scandens (Lépidoptère: Noctuidae, Agrotinae). Ann. Soc. Ent. Québec 26: 28-40.
- BELLETT, A.J.D. et E.H. MERCER (1964). The multiplication of Sericesthis iridescent virus in cell cultures from Antheraea eucalypti Scott. I. Quantitative experiments. Virology 25: 22-32.
- BELLONICK, S. et M. ARELLA (1981). Production of cytoplasmic polyhedrosis virus. Polyhedra in a gamma irradiated Lymantria dispar cell line. Arch. Virol. 68: 303-308.
- BELLONICK, S. et D.J.S. ARORA (1979a). Effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on the formation of polyhedra of cytoplasmic polyhedrosis virus. Abstracts of the 79th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, May 4-8, Los Angeles (California, U.S.A.).
- BELLONCIK, S. et D.J.S. ARORA (1979b). Formation in vitro des polyèdres du virus de la polyédrose cytoplasmique d'Euxoa scandens en présence de la cordycépine. Résumé des communications du 47e Congrès de l'Association Canadienne et Française pour l'Avancement des Sciences (ACFAS), 9-11 mai, Montréal (Canada), 46 (1): 134.

- BELLONCIK, S. et N. BELLEMARE (1980). Polyèdres du virus de la polyédrose cytoplasmique d'Euxoa scandens [Lep.: Noctuidae]. Produits in vivo et sur cellules cultivées in vitro. Etudes comparatives. Entomophaga 25(2): 199-207.
- BELLONCIK, S. et A. CHAGNON (1980). Titration of a cytoplasmic polyhedrosis virus by a tissue microculture assay - Some applications. Intervirology 13: 28-32.
- BELLONCIK, S., G. DEVAUCHELLE et D. PREVOST (1974). Uptake and penetration of Chilo iridescent virus (CIV) in the abortive infection of mosquitoes cells in vitro. Proceedings 8th International Congress on Electron Microscopy, Canberra (Australie): 636-637.
- BELLONCIK, S. et J.M. QUIOT (1976). Utilisation de la microscopie électronique pour l'étude in vivo et in vitro d'un nouveau réovirus de type polyédrie cytoplasmique. Société de microscopie du Canada III: 100-101.
- BELLONCIK, S., J.M. QUIOT, M. ARELLA et J. LECOMTE (1982a). Establishment of a continuous cell line of Euxoa scandens (Lepidoptera: Noctuidae: Agrotinae). Abstract 32nd Annual Meeting of the Tissue Culture Association publié dans In Vitro 18: 261-330.
- BELLONCIK, S., E.W. RUD et L. ST-AMAND (1982b). Efficacy of simultaneous and sequential treatments of cytoplasmic polyhedrosis virus, nuclear polyhedrosis virus and permethrin on Euxoa scandens (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. IIIrd. International Colloquium on Invertebrate Pathology, September 6-10, Brighton (England): 219.
- BIRD, F.T. (1965). On the morphology and development of insect cytoplasmic polyhedrosis virus particles. Can. J. Microbiol. 11: 497-501.
- BIRD, F.T. et D.E. ELGEE (1957). A virus disease and introduced parasites as factors controlling the European spruce sawfly, Diprion hercyniae (Htg.) in central New-Brunswick. The Can. Entomol. 89: 371-378.
- BOUCIAS, D.G. et G.L. NORDIN (1978). A scanning electron microscope study of Hyphantria cunea CPV-infected midgut tissue. J. Invertebr. Pathol. 32(2): 229-233.
- BROWN, M. et P.A. FAULKNER (1977). A plaque assay of nuclear polyhedrosis viruses using a solid overlay. J. Gen. Virol. 36: 361-364.
- BROWN, D.A., T. LESCOTT, K.A. HARRAP et D.C. KELLY (1978). The replication and titration of iridescent virus type 22 in Spodoptera frugiperda cells. J. Gen. Virol. 38: 175-178.
- BROWN, A.W. et R.C. PAL (1973). Résistance des arthropodes aux insecticides. Organisation Mondiale de la Santé. Genève.

- BUCKER, G.E. (1981). Identification of bacteria found in insects. pp.8-33 dans H.D. Burges (éditeur), Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980, Academic Press Inc., London (England), 949 p.
- BURGES H.D. (1981). Strategy for the microbial control of pests in 1980 and beyond. pp. 798-836 dans H.D. Burges (éditeur), Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980, Academic Press Inc., London (England), 949 p.
- BURGES, H.D. et N.W. HUSSEY (1971). Microbial control insects and mites, Academic Press Inc., London (England), XXII-861 p.
- BUSCHBAUM, P.A., T. CLEARY, M. SALDANA et A. CASTRO (1981). Immunoperoxidase staining for the serotype. Specific demonstration of Legionella pneumophila. The New England Journal of Medicine. 304(10): 613.
- CAREY, G.P., T. LESCOTT, J.S. ROBERTSON, L.K. SPENCER et D.C. KELLY (1978). Three African isolates of small iridescent viruses. Virology 85: 307-309.
- CERUTTI, M. (1978). Interaction entre l'iridovirus de type 6 et différents systèmes cellulaires. Thèse de doctorat de 3e cycle en Biologie expérimentale, Faculté des Sciences, Université de Rouen, France, 147 p.
- CERUTTI, M. et G. DEVAUCHELLE (1979). Cell fusion induced by an invertebrate virus. Arch. Virol. 61: 149-155.
- CERUTTI, M. et G. DEVAUCHELLE (1980). Inhibition of macromolecular synthesis in cells infected with an invertebrate virus (Iridovirus type 6 or CIV). Arch. Virol. 63: 297-303.
- CERUTTI, M. et G. DEVAUCHELLE (1982). Isolation and reconstitution of Chilo iridescent virus membrane. Arch. Virol. 74: 145-155.
- CERUTTI, M., J. GUERILLON, M. ARELLA et G. DEVAUCHELLE (1981). Réplication de l'iridovirus de type 6 (CIV) dans différentes lignées cellulaires. C. R. Acad. Sc. Paris 292: 797-802.
- CHARPENTIER, G., R. BEDARD, P. BORDELEAU, S. BELLONCIK et G. DEVAUCHELLE (1983). Detection of entomopathogens by immunoenzymatic techniques (technical problems and some applications). Immunological Communications 12(1): 52.
- CHARPENTIER, G., P. BORDELEAU-CLOUTIER, C. MASSICOTTE-ROUSSEAU, J. GUERILLON et G. DEVAUCHELLE (1985). Immunoperoxidase detection of Chilo suppressalis iridescent virus antigens in insect cells and tissues. (article soumis pour publication aux Annales de Virologie de l'Institut Pasteur).

- CHARPENTIER, G., S. GARZON et E. KURSTAK (1982). Détection des antigènes de l'enveloppe du virus Chikungunya par la technique à l'immuno-peroxydase. Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 133E: 223-239.
- CHARPENTIER, G., J. GUERILLON et G. DEVAUCHELLE (1980). Immunoenzymatic detection of CIV. Abstracts of the 80th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, May 11-16, Miami Beach, Florida (U.S.A.).
- CIAMPOR, F., E.V. SIDORENKO, N.V. TAIKOVA et M. BYSTRICKA (1981). Ultrastructural localization by immunoperoxidase of influenza virus antigens in abortive infection of L cells. Acta Virol. 25: 381-389.
- CUNNINGHAM, J.C. et J.F. LONGWORTH (1968). The identification of some cytoplasmic polyhedrosis viruses. J. Invertebr. Pathol. 11: 196-202.
- DADD, R.H. (1970). Digestion in insects. Chem. Zool. 5: 117-145.
- DAI, R.M., A.Z. WU, X.R. SHEN, L. QIAN et Y.K. SUN (1982). Isolation of genome-enzyme complex from cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm Bombyx mori. Scientia Sinica Series B 25(1): 29.
- DAUM, R.J. (1969). A revision of two computer programs for Probits Analysis. Bulletin of the Entomology Society of America 16(1): 10-15.
- DOUGHERTY, E.M., R.M. WEIMER, J.L. VAUGHN et C.F. REICHELDERFER (1982). Rifampin inhibition of the occluded virus form of a nuclear polyhedrosis virus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 22(3): 527-530.
- ENJUANES, L., I. CUBERO et E. VINUELA (1977). Sensitivity of macrophages from different species to African swine fever virus (ASFV). J. Gen. Virol. 34: 455-462.
- EVANS, H.F. et K.A. HARRAP (1982). Persistence of insect viruses. The Society for General Microbiology Symposium 33: 57-96.
- FAURE, M. (1977). Les bases de l'immunofluorescence. pp. 18-19 dans M. Faure, P. Dupouey et M.J. Morelec (éditeurs), Les techniques de l'immunofluorescence et les réactions immunoenzymatiques. Cours de l'Institut Pasteur, Maloine S.A., Paris, 566 p.
- FAUST, R.M. et J.R. ADAMS (1966). The silicon content of nuclear and cytoplasmic viral inclusion bodies causing polyhedrosis in lepidoptera. J. Invertebr. Pathol. 8: 526-530.
- FEDERICI, B.A. et E.I. HAZARD (1975). Iridovirus and cytoplasmic polyhedrosis virus in the freshwater daphnid Simocephalus expinosus. Nature 254: 327-328.

- FERRON, P. (1981). Pest control by the fungi *Beauveria* et *Metarhizium*. pp. 465-482 dans H.D. Burges (éditeur), *Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980*, Academic Press Inc., London (England), 949 p.
- FEULGEN, R. et H. ROSSENBECK (1924). Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nucleinsäure vom typus der thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopisch präparaten. Physiol. Chem. 135: 203-212.
- FINNEY, D.J. (1971). *Probit Analysis*. Third edition, Cambridge University Press, Great Britain, 333 p.
- FOSSET, J. et S. CHASTANG (1963). L'élevage aseptique d'insectes, complément d'un service de culture de tissus. Ann. Epiph. 14: 35-38.
- FUJII-KAWATA, I., K. MIURA et M. FUKU (1970). Segments of genome of viruses containing double-stranded ribonucleic acids. J. Mol. Biol. 51: 247-253.
- FUKAYA, M. et S. NASU (1966). A *Chilo* iridescent virus from the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera, Pyralidae). Appl. Entomol. Zool. 1(2): 69-72.
- FUKUDA, T. (1971). *Per os* transmission of *Chilo* iridescent virus to mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 18: 152-153.
- FURUICHI, Y. (1974). Methylation-coupled transcription by virus-associated transcriptase of cytoplasmic polyhedrosis virus containing double-stranded RNA. Nucleic Acids Res. 1: 809-822.
- FURUICHI, Y. (1978). Pretranscriptional capping in the biosynthesis of cytoplasmic polyhedrosis virus mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 1086-1090.
- FURUICHI, Y. (1981). Allosteric stimulatory effect of S-adenosylmethionine on the RNA polymerase in cytoplasmic polyhedrosis virus. A model for the positive control of eukaryotic transcription. J. Biol. Chem. 256(1): 483-493.
- FURUICHI, Y. et K.I. MIURA (1973). Identity of the 3'-terminal sequences in ten genome segments of silkworm cytoplasmic polyhedrosis virus. Virology 55: 418-425.
- FURUICHI, Y. et K.I. MIURA (1975). A blocked structure at the 5'-terminus of messenger RNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. Nature 253: 374-375.

- FURUICHI, Y., A.M. WERTHEIMER, Y.S. WU et R.T. BORCHARDT (1980). A possible involvement of messenger RNA methyltransferases in the initiation of RNA synthesis by cytoplasmic polyhedrosis virus of Bombyx mori. J. Supramol. Struct. 9 (suppl.4): 288.
- FURUSAWA, K. (1973). Virus-specific RNA synthesis in the midgut of silkworm, Bombyx mori, infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 22: 335-344.
- GARZON, S. (1972). Morphogénèse de virus à ADN d'invertébrés au cours d'infections simples ou multiples. Thèse de Ph.D., Faculté de médecine, Université de Montréal (Canada), XXI-288 p.
- GARZON, S. et E. KURSTAK (1972). Infection double inhabituelle de cellules d'un arthropode par le virus de la polyédrie nucléaire et le virus irisant de Tipula. C. R. Acad. Sci. 275: 507-509.
- GIRARD, M. et L. HIRTH (1980). Virologie générale et moléculaire, Doin Editeurs, Paris (France), VIII-486 p.
- GRACE, T.D.C. (1962a). The development of a cytoplasmic polyhedrosis virus in insect cells grow in vitro. Virology 18: 33-42.
- GRACE, T.D.C. (1962b). Establishment of four strains of cells from insect grow in vitro. Nature 195: 788-789.
- GRAHAM, R.C. et M.S. KARNOVSKY (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 14: 291-305.
- GRANADOS, R.R. (1975). Multiplication of a cytoplasmic polyhedrosis virus in insect tissue cultures. Abstracts of the IIIrd International Congress for Virology, Madrid (Espagne): 98.
- GRANADOS, R.R., W.J. MCCARTHY et M. NAUGHTON (1974). Replication of a cytoplasmic polyhedrosis virus in a established cell line of Trichoplusia ni cells. Virology 59: 584-586.
- GRANCHER-BARRAY, S., J. BOISVERT et S. BELLONCIK (1981). Electrophoretic characterization of proteins and RNA of cytoplasmic polyhedrosis virus from Euxoa scandens. Arch. Virol. 70: 55-61.
- GRANOFF, A. (1969). Viruses of amphibia. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 50: 117-145.
- GROSSE, J. (1977). Contribution à l'étude des antigènes du C.I.V. (Chilo iridescent virus type 6). Thèse de doctorat de 3e cycle, Faculté des Sciences, Université de Rouen, France, 98 p.

- GROVER, Y.P., R. PANDEY et V.K. SHARMA (1980). Indirect immunoperoxidase and peroxidase-anti-peroxidase studies on the detection of buffalopoxvirus antigens in cell culture. Indian Journal of Exp. Biology 18(4): 427-429.
- HAIKIN, H., S. LEVENTON-KRISS et I. SAROV (1979). Antibody to varicella-zoster virus-induced membrane antigen: immunoperoxidase assay with air-dried target cells. The Journal of Infectious Diseases 140(4): 601-604.
- HALPERN, M.S., J.M. ENGLAND, D.T. DEERY, D.J. PETCU, W.S. MASON et K.L. MOLNAR-KIMBER (1983). Viral nucleic acid synthesis and antigen accumulation in pancreas and kidney of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 4865-4869.
- HARLEY, E.H., R. RUBINSTEIN, M. LOSMAN et D. LUTTON (1977). Molecular weights of the RNA genome segments of a cytoplasmic polyhedrosis virus determined by a new comparative approach. Virology 76: 210-216.
- HARPER, J.D. (1976). Major developmental and applied programs for microbial control of invertebrates in the United States. Proc. Int. Colloq. Invertebr. Pathol. VI: 69-73.
- HASAN, S., C. VAGO et G. KUHL (1971). Infection of Aedes detritus Hal. with a mosquito iridescent virus. Bull. World Health Org. 45: 268-269.
- HAYASHI, Y. (1970). RNA in midgut of tussock moth, Orgyia leucostigma, infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. Can. J. Microbiol. 16: 1101-1107.
- HAYASHI, Y. et F.T. BIRD (1968a). The use of sucrose gradients in the isolation of cytoplasmic polyhedrosis virus particles. J. Invertebr. Pathol. 11: 40-44.
- HAYASHI, Y. et F.T. BIRD (1968b). Properties of a cytoplasmic polyhedrosis virus from the white-marked tussock moth. J. Invertebr. Pathol. 12: 140.
- HAYASHI, Y. et F.T. BIRD (1970). The isolation of cytoplasmic polyhedrosis virus from the white-marked tussock moth (Orgyia leucostigma, Smith). Can. J. Microbiol. 16: 695-701.
- HAYASHI, Y. et T.D. DONAGHUE (1971). Cytoplasmic polyhedrosis virus: RNA synthesized in vivo and in vitro in infected midgut. Biochemical and Biophysical Research Communications 42(2): 214-221.
- HAYASHI, Y., T. KAWARABATA et F.T. BIRD (1970). Isolation of a cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol. 16: 378-384.

- HAYASHI, Y. et J. KRYWIENCZYK (1972). Electrophoretic fractionation of cytoplasmic polyhedrosis virus genome. J. Invertebr. Pathol. 19: 160-162.
- HEBERT, C., J.P. BOURASSA, G. CHARPENTIER et S. GARZON (1985). Observations sur le développement d'une épizootie virale (VPN) chez les larves de Lymantria dispar à Cap-de-la-Madeleine, Québec. (article soumis pour publication à The Canadian Entomologist).
- HEWLETT, P.S. et R.L. PLACKETT (1979). The interpretation of quantal responses in biology. University Park Press, Baltimore, 82 p.
- HINK, C.F. et J.R. BYERS (1976). Biosystematics of the genus Euxoa (Lepidoptera: Noctuidae) V. Rearing procedures, and life cycles of 36 species. The Can. Entomol. 108: 1345-1357.
- HINK, W.F. et P.V. VAIL (1973). A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus on a cabbage looper (Tn-368) cell line. J. Invertebr. Pathol. 22: 168-174.
- HOSAKA, Y. et K. AIZAWA (1964). The fine structure of the cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm (Bombyx mori L.). J. Insect Pathol. 6: 53-59.
- HSU, P.C., B.H. MINSHEW, B.L. WILLIAMS et E.S. LENNARD (1979). Use of an immunoperoxidase method for identification of Bacteroides fragilis. Journal of Clinical Microbiology: 285-289.
- HUKUHARA, T. et Y. HASHIMOTO (1966). Studies of two strains of cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 8: 184-192.
- HUKUHARA, T. et Y. HASHIMOTO (1967). Multiplication of Tipula and Chilo iridescent viruses in cells of Antheraea eucalypti. J. Invertebr. Pathol. 9: 278-281.
- HURPIN, B. (1977). Emploi des virus dans la lutte biologique contre les insectes. Réunion de la Société Française de Microbiologie (Section de Virologie) ayant pour titre "Virus d'invertébrés", Institut Pasteur, Paris, jeudi 3 novembre.
- HUSSEY, N.W. et T.W. TINSLEY (1981). Impressions of insects pathology in the people's republic of China. pp.785-795 dans H.D. Burges (éditeur), Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980, Academic Press Inc., London (England), 949 p.
- IBRAHIM, I.K.A., M.M. JOSHI et J.P. HOLLIS (1978). Swarming disease of nematodes: host range and evidence for a cytoplasmic polyhedrosis virus in Tylenchorhynchus martini. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 45(2): 233-238.

- IGNOFFO, C.M. (1973). Effects of entomopathogens. Annals of the New York Academy of Sciences 217: 141-172.
- IGNOFFO, C.M. et R.F. ANDERSON (1979). Bioinsecticides. pp. 1-28 dans H.J. Peppler (éditeur), Microbial technology 2ⁿ ed., Academic Press Inc., New York (U.S.A.), vol.1.
- IGNOFFO, C.M. et T.L. COUGH (1981). The nucleo-polyhedrosis virus of Heliothis species as a microbial insecticide. pp.330-362 dans H.D. Burges (éditeur), Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980, Academic Press Inc., London (England), 949 p.
- IGNOFFO, C.M., C. GARCIA, D.L. HOSTETTER et R.E. PINNELL (1980). Transplanting: a method of introducing an insect virus into an ecosystem. Environmental Entomology 9: 153-154.
- IWASHITA, Y. (1971). Histopathology of cytoplasmic polyhedrosis. pp. 79-101 dans H. Aruga et Y. Tanada (éditeurs), The cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, University of Tokyo Press, Tokyo (Japon).
- JAQUES, R.P. (1976). Usage of microbial agents for insect control in Canada. Proc. Int. Colloq. Invertebr. Pathol. VI: 64-68.
- JENSEN, D.D., T. HUKUHARA et Y. TANADA (1972). Lethality of Chilo iridescent virus to Colladonus montana leafhopper. J. Invertebr. Pathol. 19: 276-278.
- JOKLIK, W.H. (1981). Structure and function of the reovirus genome. Microbiol. Rev. 45: 483-501.
- KALMAKOFF, J. (1980). Cytoplasmic polyhedrosis and iridescent viruses. pp. 43-44 dans J. Kalmakoff et J.F. Longworth (éditeurs), Microbial control of insect pests. Q.W. Ruscoe, Science Information Division, DSIR, Wellington (New Zealand), XIII-102 p.
- KALMAKOFF, J. et J.F. LONGWORTH (éditeurs). (1980). Microbial control of insect pests. Q.W. Ruscoe, Science Information Division, DSIR, Wellington (New Zealand), XIII-102 p.
- KÄRBER, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exp. Path. Pharmacol. 162: 680-687.
- KAWASE, S. et S. MIYAJIMA (1969). Immunofluorescence studies on the multiplication of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol. 13: 330-336.
- KELLY, D.C. (1976a). Iridescent virus type 22 replication in Aedes albopictus cells in culture. J. Invertebr. Pathol. 27: 415-418.

- KELLY, D.C. (1976b). Oryctes virus replication: electron microscopic observations on infected moth and mosquito cells. Virology 69: 596-606.
- KELLY, D.C. (1980). Suppression of baculovirus and iridescent virus replication in dually infected cells. Microbiologica 3: 177-185.
- KELLY, D.C. (1981). Non-occluded viruses. pp. 39-60 dans E.W. Davidson (éditeur), Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases, Allanheld & Osmun Co. Publishers Inc., Totowa, New Jersey (U.S.A.), XIV-562 p.
- KELLY, D.C., M.L. EDWARDS et J.S. ROBERTSON (1978). The use of enzyme-linked immunosorbent assay to detect and discriminate between, small iridescent viruses. Ann. Appl. Biol. 90: 369-374.
- KELLY, D.C. et J.S. ROBERTSON (1973). Icosahedral cytoplasmic deoxyribonucleic acid viruses. J. Gen. Virol. 20: 17-41.
- KELLY, D.C. et T.W. TINSLEY (1972). The proteins of iridescent viruses types 2 and 6. J. Invertebr. Pathol. 19: 273-275.
- KELLY, D.C. et T.W. TINSLEY (1974a). Iridescent virus replication: a microscope study of Aedes aegypti and Antheraea eucalypti cells in culture infected with iridescent virus types 2 and 6. Microbios 9: 75-93.
- KELLY, D.C. et T.W. TINSLEY (1974b). Iridescent virus replication: pattern of nucleic acid synthesis in insect cells infected with iridescent virus types 2 and 6. J. Invertebr. Pathol. 24: 169-178.
- KIMURA, M. et A.H. McINTOSH (1975). Dual infection of the Trichoplusia ni cell line with the Chilo iridescent virus (CIV) and Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. pp. 391-394 dans E. Kurstak et K. Maramorosch (éditeurs), Invertebrate tissue culture, Academic Press Inc., New York (U.S.A.), XVII-398 p.
- KLOC, M. et P.E. LEE (1983). The effect of hydroxyurea on DNA synthesis of Tipula iridescent virus and Estigmene acrea cells. Can. J. Microbiol. 29: 254-260.
- KOBAYASHI, M. (1971). pp. 103-128 dans H. Aruga et Y. Tanada (éditeurs), The cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, University of Tokyo Press, Tokyo (Japan).
- KRISHNASWAMY, S., B.S. KESHAVAMURTHY et S. SUNDARARAJAN (1981). The use of the direct immunoperoxidase test to detect the multiplication of rinderpest virus in bovine kidney cell culture. Veterinary Microbiology 6: 23-29.

- KUCHINO, Y., S. NISHIMURA, R.E. SMITH et Y. FURUICHI (1982). Homologous terminal sequences in the double-stranded RNA genome segments of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm Bombyx mori. J. Virol. 44(2): 538-543.
- KUMANISHI, T. et A. HIRANO (1978). An immunoperoxidase study on Herpes simplex virus encephalitis. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 37(6): 790-795.
- KURSTAK, E. (1971). The immunoperoxidase technique: localization of viral antigens in cells. pp. 423-444 dans K. Maramorosch et H. Koprowski (éditeurs), Methods in virology vol.V, Academic Press Inc., New York (U.S.A.), XVII-530 p.
- KURSTAK, E. (1978). Microbial insecticides. Viral and bacterial insecticides: safety considerations. pp. 265-269 dans M.W. Loutit et J.A.R. Miles (éditeurs), Microbial Ecology, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (U.S.A.), XXII-452 p.
- KURSTAK, E., S. BELLONCIK et S. GARZON (1970). Immunoperoxydase ultra-structurale: localisation d'antigènes du virus de la denso-nucléose (VDN) basée sur les propriétés structurales de la peroxydase. C. R. Acad. Sc. Paris 271: 2426-2429.
- KURSTAK, E., J.R. COTE et S. BELLONCIK (1969). Etude de la synthèse et de la localisation des antigènes du virus de la denso-nucléose (VDN) à l'aide d'anticorps conjugués à l'enzyme peroxydase (nouvelle méthode d'immunoperoxydase). C. R. Acad. Sc. Paris 268: 2309-2312.
- KURSTAK, E. et C. KURSTAK (1974). Application of the immunoperoxidase technique in virology and cancer virology; light and electron microscopy. pp. 3-30 dans E. Kurstak et R. Morisset (éditeurs), Viral immunodiagnosis, Academic Press Inc., New York, (U.S.A.), XIV-334 p.
- KURSTAK, E. et C. KURSTAK (éditeurs) (1977). Comparative diagnosis of viral diseases. II Human and related viruses part B, Academic Press Inc., New York (U.S.A.), vol. II, XVI-555 p.
- KURSTAK, E. et R. MORISSET (éditeurs) (1974). Viral immunodiagnosis, Academic Press Inc., New York (U.S.A.), XIV-334 p.
- KURSTAK, C., R. MORISSET et E. KURSTAK (1982). Emploi de tests d'immunoperoxydase pour le diagnostic rapide des infections à herpesvirus et rotavirus. Ann. Virol. 133E: 187-190.
- KURSTAK, E., P. TIJSEN et C. KURSTAK (1977). Immunoperoxidase technique in diagnostic virology and research: principles and applications. pp. 403-448 dans E. Kurstak et C. Kurstak (éditeurs), Comparative diagnosis of viral diseases. II. Human and related viruses, part B, Academic Press Inc., (U.S.A.), XVI-555 p.

- KURSTAK, E., P. TIJSSSEN, C. KURSTAK et R. MORISSET (1975). Progress in the application of new immunoenzymatic methods in virology. Annals of the New York Academy of Sciences 254: 369-384.
- KURSTAK, E., P. VIENS, R. MORISSET, C. KURSTAK et G. CHARPENTIER (1973). Application de la technique d'immunoperoxydase à la coloration sélective immunospécifique du Toxoplasma gondii (possibilité de diagnostic). C. R. Acad. Sc. Paris 276: 2345-2347.
- LACOURSIERE, J. (1984). Etude des principaux facteurs influençant la pathogénicité de Bacillus thuringiensis Sérovariété israelensis envers les larves de mouches noires (Diptères: Simuliidae). Mémoire de M.Sc., Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 168 p.
- LANDUREAU, J.C. (1968). Cultures in vitro de cellules embryonnaires de blattes (insectes dictyoptères). II. Obtention de lignées cellulaires à multiplication continue. Exp. Cell. Res. 50: 323-327.
- LASCANO, E.F., M.I. BERRIA et N.A. CANDURRA (1981). Diagnosis of junin virus in cell cultures by immunoperoxidase staining. Arch. Virol. 70: 79-82.
- LEWANDOWSKI, L.J., J. KALMAKOFF et Y. TANADA (1969). Characterization of a ribonucleic acid polymerase activity associated with purified cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, Bombyx mori. J. Virol. 4: 857-865.
- LEWANDOWSKI, L.J. et S. MILLWARD (1971). Characterization of the genome of cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Virol. 7: 434-437.
- LEWANDOWSKI, L.J. et B.L. TRAYNOR (1972). Comparison of the structure and polypeptide composition of three double-stranded ribonucleic acid-containing viruses (diplornaviruses): cytoplasmic polyhedrosis virus, wound tumor virus and reovirus. J. Virol. 10: 1053-1070.
- LEWIS, F.B. (1981). Control of the gypsy moth by a baculovirus. pp. 363-377 dans H.D. Burges (éditeurs), Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980, Academic Press Inc., London (England), 949 p.
- LONGWORTH, J.F. (1981). The replication of a cytoplasmic polyhedrosis virus from Chrysodeixis eriosoma (Lepidoptera: Noctuidae) in Spodoptera frugiperda cells. J. Invertebr. Pathol. 37(1): 54-61.
- LONGWORTH, J.F. et C.R. SPILLING (1970). A cytoplasmic polyhedrosis of larch sawfly, Anoplonyx destructor. J. Invertebr. Pathol. 15: 276-284.
- MAGNOLER, A. (1974). Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on larval and post-larval stages of the gypsy moth, Porthetria dispar. J. Invertebr. Pathol. 23: 263-274.

- MARTIGNONI, M.E. et P.J. IWAI (1977). A catalog of viral diseases of insects and mites. USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. PNW-40: 28 p.
- MARTIGNONI, M.E., P.J. IWAI, K.M. HUGHES et R.B. ADDISON (1969). A cytoplasmic polyhedrosis of Hemeracampa pseudotsugata. J. Invertebr. Pathol. 13: 15-18.
- MATHER, K. (1965). Analyse statistique en Biologie. Gauthier-Villars, Paris, 327 p.
- MATTHEWS, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Intervirology 17: 1-199.
- McCAY, R.E. et W.B. WHITE (1973). Economic analysis of the gypsy moth problem in the northeast I. Applied to commercial forest stands. USDA Forest Service Research Paper NE-275: 9 p.
- McCRAE, M.A. (1982). Coding assignments for the genes of a cytoplasmic polyhedrosis virus. IIIrd. International Colloquium on Invertebrate Pathology, September 6-10, Brighton (England).
- McINTOSH, A. et M. KIMURA (1974). Replication of the insect Chilo iridescent virus in poikilothermic vertebrate cell line. Intervirology 4: 257-263.
- McLAUGHLIN, R.E., H.A. SCOTT et M.R. BELL (1972). Infection of the boll weevil by Chilo iridescent virus. J. Invertebr. Pathol. 19: 285-290.
- MERTENS, P.P.C. (1979). A study of the transcription and translation (in vitro) of the genome of cytoplasmic polyhedrosis viruses types 1 and 2. D. Phil. thesis, University of Oxford, Angleterre.
- MITSUHASHI, J. (1966). Multiplication of Chilo iridescent virus in the Chilo suppressalis tissues cultivated in vitro (Lepidoptera: Pyralidae). Appl. Entomol. Zool. 1: 199-201.
- MITSUHASHI, J. (1967). Infection of the green rice leafhopper, Nephotettix cincticeps by Chilo iridescent virus. J. Invertebr. Pathol. 9: 432-437.
- MIURA, K.I. (1981). The cap structure of eukaryotic messenger RNA as a mark of a strand carrying protein information. Adv. Biophys. 14: 205.
- MIURA, K.I., I. FUJII-KAWATA, H. IWATA et S. KAWASE (1969). Electron microscopic observations of a cytoplasmic polyhedrosis virus from the silkworm. J. Invertebr. Pathol. 14: 262-265.
- MIURA, K.I., I. FUJII-KAWATA, T. SAKAKI, M. FUKE et S. KAWASE (1968). Double-stranded ribonucleic acid from cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm. J. Virol. 2: 1211-1222.

- MIURA, K., Y. FURUICHI, K. SHIMOTOHNO, T. WUSHIBARA, K. WATANABE et M. SUGUIRA (1975). Structure and post-transcriptional modifications in viral RNA. pp. 153-160 dans A.L. Haenni et G. Beaud (éditeurs), Abstract of Colloque on In Vitro Transcription and Translation of Virus Genomes, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Paris (France), 425 p.
- MIYAJIMA, S. (1978). Stability of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm Bombyx mori Linnaeus, to some chemical treatments. Jap. J. Appl. Entomol. Zool. 22(1): 22-25.
- MIYAJIMA, S. et S. KAWASE (1969). Haemagglutination with cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, Bombyx mori. Virology 39: 347-348.
- MIYAJIMA, S., I. KIMURA et S. KAWASE (1969). Purification of a cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol. 13: 296.
- MONNIER, C. et G. DEVAUCHELLE (1976). Enzyme activities associated with an invertebrate iridovirus: nucleotide phosphohydrolase activity associated with iridescent virus type 6 (CIV). J. Virol. 19: 180-186.
- NAKANE, P.K. et A. KAWAOI (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 22(12): 1084-1091.
- NISHIMURA, A. et Y. HOSAKA (1969). Electron microscopic study of RNA of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm. Virology, 38: 550-558.
- O'HARA, C.M., W.A. GARDNER Jr. et B.D. BENNETT (1980). Immunoperoxidase staining of Trichomonas vaginalis in cytologic material. Acta Cytological Journal 24(5): 448-451.
- OHBA, M. et K. AIZAWA (1980). Immunoperoxidase stain for detection of an insect virus in host cells. Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu 26: 175-176.
- OHBA, M. et K. AIZAWA (1981). Lethal toxicity of arthropod iridoviruses to an amphibian, Rana limnocharis. Arch. Virol. 68: 153-156.
- OHBA, M. et K. AIZAWA (1982). Mammalian toxicity of an insect iridovirus. Acta Virologica 26: 165-168.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (1973). Utilisation des virus dans la lutte contre les insectes nuisibles et vecteurs de la maladie. Organisation Mondiale de la Santé. Série de rapports techniques no. 531, Genève, 50 p.
- OUCHTERLONY, O. (1958). Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 5: 1-78.

- PAYMENT, P., D.J.S. ARORA et S. BELLONCIK (1982). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 40: 55-60.
- PAYNE, C.C. (1976). Biochemical and serological studies of a cytoplasmic polyhedrosis virus from Arctia caja: a naturally-occurring mixture of two virus types. J. Gen. Virol. 30: 357-369.
- PAYNE, C.C. et K.A. HARRAP (1977). Cytoplasmic polyhedrosis viruses. pp. 105-129 dans K. Maramorosch (éditeur), The atlas of insect and plant viruses, Academic Press Inc., New York (U.S.A.), vol. 8, XIX-478 p.
- PAYNE, C.C. et J. KALMAKOFF (1974). A radioimmunoassay for the cytoplasmic polyhedrosis virus from Bombyx mori. Intervirology 4: 365.
- PAYNE, C.C. et P.P.C. MERTENS (1983). Cytoplasmic polyhedrosis virus. pp. 425-504 dans W.K. Joklik (éditeur), The reoviridae, Plenum Press, New York (U.S.A.), XV-571 p.
- PAYNE, C.C., P.P.C. MERTENS et K. KATAGIRI (1978). A comparative study of three closely related cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 32(3): 310-318.
- PAYNE, C.C., M. PIASECHA-SERAFIN et B. RILLEY (1977). The properties of two recent isolates of cytoplasmic polyhedrosis virus. Intervirology 8: 155-163.
- PAYNE, C.C. et C.F. RIVERS (1976). A provisional classification of cytoplasmic polyhedrosis virus based on the sizes of the RNA genome segments. J. Gen. Virol. 33: 71-85.
- PAYNE, C.C. et T.W. TINSLEY (1974). The structural proteins and RNA components of a cytoplasmic virus from Nymphalis io (Lepidoptera: Nymphalidae). J. Gen. Virol. 25: 291-302.
- PODGWAITE, J.D. et H.M. MAZZONE (1981). Development of insect viruses as pesticides: the case of the gypsy moth (Lymantria dispar) in north America. Protection Ecology 3: 219-227.
- PUJARA, P.K. et K.G. SAMNOTRA (1983). The impact of fenitrothion (OMS H31) spraying on malaria prevalence in an area of India with Anopheles culicifacies resistant to DDT, lindane and malathion. Mosquito News 43: 484-488.
- QUIOT, J.M. (1976). Etablissement d'une lignée cellulaire (SCLD 135) à partir d'ovaires du lépidoptère Lymantria dispar L.. C. R. Acad. Sci. Paris 282: 465-468.
- QUIOT, J.M. et S. BELLONCIK (1977). Caractérisation d'une polyédrose cytoplasmique chez le lépidoptère Euxoa scandens. Riley (Noctuidae, Agrotinae). Etudes in vivo et in vitro. Arch. Virol. 55: 145-153.

- QUIOT, J.M., F. ODIER, M. BERGOIN et C. VAGO (1973). Etude de la pathogénèse et titrage d'un virus de denonucléose en culture de cellules de lépidoptères. C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 276: 2997-2999.
- QUIOT, J.M., C. VAGO et S. BELLONCIK (1980a). Réaction anti-virale par bourgeonnement cellulaire. Etude de culture de cellules de lépidoptères infectées par un réovirus de polyédrose cytoplasmique. C. R. Acad. Sci. Paris 291: 481-483.
- QUIOT, J.M., C. VAGO et M. FCHOUKCHRY (1980b). Etude expérimentale sur cultures de tissus de lépidoptères, de l'interaction de deux virus d'invertébrés. C. R. Acad. Sci. Paris 290: 199-201.
- RICHARDS, W.C. (1970). Disruption of a cytoplasmic polyhedrosis virus by ethanol. J. Invertebr. Pathol. 15: 457.
- RITCHOT, C., G. RIOUX, M.A. RICHARD, M. O'C RIVARD, M. LETENDRE, J.M. BEAUSOLEIL et C. MORIN (1977). Principaux insectes des cultures au Québec en 1976. Ann. Soc. Entomol. Québec 22: 128-131.
- ROHRMANN, G.F., T.J. BAILEY, R.R. BECKER et G.S. BEAUDREAU (1980). Comparison of the structure of C-and N-polyhedrins from two occluded viruses pathogenic for Orgyia pseudotsugata. J. Virol. 34: 360.
- ROTH, J. (1982). The protein A-gold (pAg) technique - A qualitative and quantitative approach for antigen localization on thin sections. pp. 107-133 dans G.R. Bullock and P. Petrusz, Techniques in immunochemistry, vol. 1, Academic Press Inc., XII-306 p.
- RUBINSTEIN, R., L. STANNARD et A. POLSON (1975). Isolation of a cytoplasmic polyhedrosis virus by physical and immunological techniques. Preparative Biochemistry 5(1): 79-90.
- SCHMIDT, N.J., H.H. HO et J. CHIN (1981). Application of immunoperoxidase staining to more rapid detection and identification of rubella virus isolates. Journal of Clinical Microbiology 13(4): 627-630.
- SHANNON, L.M., E. KAY et J. Y. LEW (1966). Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. J. Biol. Chem. 241: 2166-2172.
- SHIMOTOHNO, K. et K. MIURA (1973). Transcription of double-stranded RNA in cytoplasmic polyhedrosis virus in vitro. Virology 53(1): 283-286.
- SHIMOTOHNO, K. et K. MIURA (1976). The process of formation of the 5'-terminal modified structure in messenger RNA of cytoplasmic polyhedrosis virus. F. E. B. S. Lett. 64: 204.

- SHIMOTOHNO, K. et K. MIURA (1977). Nucleoside triphosphate phosphohydrolase associated with cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Bioch. 81: 371-379.
- SIGEL, M.M., D. LOPEZ, A.R. BEASLEY et L.A. CALIGURI (1971). Virus-cell interaction in lymphocystis disease of fish. pp. 124-145 dans M. Sanders et J. August (éditeurs), Viruses affecting man and animals, Warren H. Green Publishers, Saint-Louis (U.S.A.).
- SIKOROWSKI, P.P., G.L. ANDREWS et J.R. BROOME (1971). Presence of cytoplasmic polyhedrosis virus in the hemolymph of Heliothis virescens larvae and adults. J. Invertebr. Pathol. 18: 167-168.
- SIKOROWSKI, P.P. et A.C. THOMPSON (1979). Effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on diapausing Heliothis virescens. J. Invertebr. Pathol. 33(1): 66-70.
- SINGER, I.I. (1974). The intracellular localization of parvovirus (H-1) antigens using immunocytochrome-C. pp. 101-123 dans E. Kurstak et R. Morisset (éditeurs), Viral immunodiagnosis, Academic Press Inc., New York (U.S.A.), XIV-334 pp.
- SMITH, K.M. (1967). Further aspects of the relationships between insects and viruses. pp. 172-194 dans K.M. Smith (éditeur), Insect virology, Academic Press Inc., New York (U.S.A.), XII-256 p.
- SMITH, K.M. (1976a). The polyhedroses-cytoplasmic polyhedroses (CPV). pp. 42-59 dans K.M. Smith (éditeur), Virus-insect relationships, Longman, New York (U.S.A.), VIII-291 p.
- SMITH, K.M. (1976b). The iridescent viruses. pp. 95-145 dans K.M. Smith (éditeur), Virus-insect relationships, Longman, New York (U.S.A.), XII-291 p.
- SMITH, R.E. et Y. FURUICHI (1980a). Gene mapping of cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm by the full length mRNA prepared under optimized conditions of transcription in vitro. Virology 103(2): 279-290.
- SMITH, R.E. et Y. FURUICHI (1980b). Separation of full length transcripts and genome RNA plus and minus strands from cytoplasmic polyhedrosis virus of Bombyx mori. J. Supramol. Struct. 9 (suppl. 4): 288.
- SMITH, R.E. et Y. FURUICHI (1982a). A unique class of compound, guanosine-nucleoside tetraphosphate G(5') pppp(5')N, synthesized during the in vitro transcription of cytoplasmic polyhedrosis virus of Bombyx mori. Journal of Biological Chemistry 257(1): 485-494.
- SMITH, R.E. et Y. FURUICHI (1982b). The double-stranded RNA genome segments of cytoplasmic polyhedrosis virus are independent transcribed. J. Virol. 41(1): 326-329.

- SMITH, R.E., M.A. MORGAN et Y. FURUICHI (1981). Separation of the plus and minus strands of cytoplasmic polyhedrosis virus and human reovirus double-stranded genome RNAs by gel electrophoresis. Nucleic Acid Research 9(20): 5269-5286.
- SMITH, K.M. et R.W.G. WYCKOFF (1950). Structure within polyedra associated with viruses disease. Nature 166: 861.
- SMITH, K.M. et N. XEROS (1953). Studies on the cross-transmission of polyhedral viruses: experiments with a new virus from Pyrameis cardui, the painted lady butterfly. Parasitol. 43: 178-185.
- SOHI, S.S. (1968). In vitro cultivation of Choristoneura fumiferana (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae) tissues. Can J. of Zoology 46: 11-13.
- ST-AMAND, L. (1982). Etude de l'interaction entre infections virales sur Euxoa scandens. Mémoire de maîtrise en Virologie, Institut Armand-Frappier, Laval-des-Rapides (Canada), XIV-190 p.
- STARK, P.M. et M.V. MEISCH (1983). Efficacy of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against Psorophora columbiae and Anopheles quadrimaculatus in Arkansas ricelands. Mosquito News 43: 59-62.
- STOLLAR, U., K. HARRAP, V. THOMAS et N. SARVER (1979). Observations related to cytopathic effect in Aedes albopictus cells infected with sindbis virus. pp. 277-296 dans E. Kurstak (éditeur), Arctic and tropical arboviruses, Academic Press Inc., New York (U.S.A.), X-327 p.
- STOLTZ, D.B. (1969). Observations on naturally occurring viruses in larvae of the midge, Chironomus plumosus. Ph.D. thesis, McMaster University, Hamilton, Ontario.
- STORER, G.B., M.G. SHEPHERD et J. KALMAKOFF (1974a). Enzyme activities associated with cytoplasmic polyhedrosis virus from Bombyx mori. I. Nucleotide phosphohydrolase and nuclease activities. Intervirology 2: 87.
- STORER, G.B., M.G. SHEPHERD et J. KALMAKOFF (1974b). Enzyme activities associated with cytoplasmic polyhedrosis virus from Bombyx mori. II. Comparative studies. Intervirology 2: 193.
- SUMMERS, M.D., L.E. VOLKMAN et C.H. HSIEH (1978). Immunoperoxidase detection of baculovirus antigens in insect cells. J. Gen. Virol. 40: 545-557.
- SUN Y.K., A.Z WU, R.-M. DAI et X.-R. SHEN (1981). Synthesis of structural proteins in a cell free system directed by silkworm cytoplasmic polyhedrosis virus mRNA synthesized in vitro. Scientia Sinica XXIV(5): 684-691.

- TINSLEY, T.W. (1976). Viruses to kill pests. Pesticides 10(12): 41-43.
- TINSLEY, T.W. (1978). Use of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. pp. 199-210 dans M. Pollard (éditeur), Perspectives in virology, vol. 10, Raven Press, New York (U.S.A.), XXVIII-248 p.
- TINSLEY, T.W. (1979). The potential of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. Annual Review Entomology 24: 63-87.
- TINSLEY, T.W., P.F. ENTWISTLE et J.S. ROBERTSON (1980). Advances in insect pest-control. I. Insect pathogenic viruses. Commonwealth Forestry Review 59(3): 327-336.
- TRAPIER, F., J. BRAUNWALD, L.J. MARKOVIC et A. KIRN (1977). Frog virus 3 morphogenesis: effect of temperature and metabolic inhibitors. Journal of General Virology 37: 39-52.
- VAGO, C. et M. BERGOIN (1963). Développement des virus à corps d'inclusions du lépidoptère, Lymantria dispar, en cultures cellulaires. Entomophaga, 8: 253-261.
- VAIL, P.V., T.J. HENNEBERRY, A.N. KISHABA et K.Y. ARAKAWA (1968). Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the cabbage cooper. J. Invertebr. Pathol. 10: 84-93.
- VAN DEN BOSCH, R. et P.S. MESSENGER (1973). Biological control. Intext Educational Publishers, New York (U.S.A.), XII-180 p.
- VULLO, V., U. FERONE, A. ACETI, I. ILARDI et S. DELIA (1979). L'immuno-perossidasi indiretta nella diagnosi biologica delle parassitosi umane. Estratto dal "Boll. Ist. Sieroter. Milanes" 58(2): 141-147.
- WANG, C.H., D.L. WILLIS et W.D. LONELAND (1975). Radiotracer methodology in the biological environmental and physical sciences, W.D. McElroy et C.P. Swanson (éditeurs), Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey (U.S.A.), XV-480 p.
- WERTHEIMER, A.M., S.Y. CHEN, R.T. BORCHARDT et Y. FURUICHI (1980). S-Adenosylmethionine and its analogs. Structural features correlated with synthesis and methylation of mRNAs of cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Biol. Chem. 255(12): 5924-5930.
- WICKER, R. (1977). Etude des antigènes viraux. Application de l'immunofluorescence et des réactions immuno-enzymatiques aux recherches en biologie et en pathologie. pp. 427-436 dans M. Faure, P. Dupouey et M.J. Morelec (éditeurs), Les techniques de base. Les techniques de l'immunofluorescence et les réactions immuno-enzymatiques, Cours de l'Institut Pasteur, Maloine, S.A., Paris (France), 566 p.
- WILLIAMS, C.A. et M.W. CHASE (éditeurs) (1967). Methods in immunology and immunochemistry, vol. I, Academic Press Inc., New York (U.S.A.),

- WILLIAMS, C.A. et M.W. CHASE (éditeurs) (1967). Methods in immunology and immunochemistry, vol. I, Academic Press Inc., New York (U.S.A.), 479 p.
- WILSON, G.G. (1981). Nosema fumiferanae, a natural pathogen of a forest pest: potential for pest management. pp. 595-601 dans H.D. Burges (éditeur), Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980, Academic Press Inc., London (England), 949 p.
- WU, A.Z., R.M. DAI, X.R. SHEN et Y.K. SUN (1980). Studies on double-stranded RNA viruses. IV. In vitro synthesis of the mRNA of cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm Bombyx mori. Acta Microbiologica Sinica 20(3): 257-262.
- WU, A.Z., R.M. DAI, X.R. SHEN et Y.K. SUN (1981a). [3H methyl] methionine as possible methyl donor for formation of 5'-terminus of in vitro synthesized mRNA of cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm Bombyx mori. Scientia Sinica XXIV(12): 1737-1742.
- WU, A.Z., R.M. DAI, X.R. SHEN, J.Y. SHEN, Y.K. SUN, X.F. HU et Y.J. QIAN (1981b). Studies on cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm Bombyx mori. V. Relationship between the RNA-polymerase and infectivity. Acta Microbiologica Sinica 21(1): 73-76.
- XEROS, N. (1952). Cytoplasmic polyhedral virus diseases. Nature 170: 1073.
- XEROS, N. (1956). The virogenic stroma in nuclear and cytoplasmic polyhedrosis. Nature 178: 412-413.
- YAZAKI, K. et K. MIURA (1980): Relation of the structure of cytoplasmic polyhedrosis virus and the synthesis of its messenger RNA. Virology 105: 467-479.
- YUE, Y.X., Y.L. WU, Z.Y. CHEN, M.Q. CHEN et T.M. SU (1981). Morphogenesis of the cytoplasmic polyhedrosis virus of the cotton bollworm, Heliothis armigera (Hübner). Acta Entomologica Sinica 24(4): 475-477.
- YULE, B.G. et P.E. LEE (1973). A cytological and immunological study of Tipula iridescent virus infected Galleria mellonella larval hemocytes. Virology 51: 409-423.
- ZHONG, W., Z.R. HUANG, Y.L. LU, X.Y. LIU et Y.C. LOU (1983). Inhibitory effect of Poly I:C and 2',5'-oligo (A) on cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm, Bombyx mori L.. Kexue Tongbao 28(5): 687-690.

Annexe

Annexe 1

Exemple de calcul* des valeurs de concentrations (moyenne et totale)
des IgGs purifiées (avant et après dialyse des fractions)
d'un sérum anti-virus

Données de lecture de densité optique (D.O.) sur spectrophotomètre Pye Unicam des fractions d'IgGs pures du sérum anti-virus collectées à la suite d'une chromatographie d'exclusion sur gel Séphadex G-150				
Fractions conservées dont le rapport 278/251 est de 2.5 à 3.0	Volume des fractions (ml)	D.O. des fractions à 278 nm	D.O. des fractions à 251 nm	Rapport 278/251 (2.5 à 3.0)
23	1	1.88	0.72	2.61
24	2	2.96	1.18	2.51
25	2	3.56	1.38	2.58
26	2	3.68	1.32	2.79
27	2	3.44	1.20	2.87
28	2	2.88	1.04	2.77
29	2	2.22	0.88	2.52
30	1	1.42	0.51	2.78
31	1	0.92	0.35	2.62
Volume total des fractions (avant dialyse)	15 ml			
Volume total des fractions (après dialyse)	28 ml			
Somme des D.O. à 278 nm		22.96		

a)
$$\left[\right] \text{moyenne des IgGs}_{278} \text{ (mg/ml) (avant dialyse)} = \frac{22.96 \text{ D.O.}}{15 \text{ ml}}$$

$1 \times 1.5 \text{ D.O./mg IgGs}^{**}$

$\left[\right] \text{moyenne des IgGs}_{278} \text{ non-dialysées} = 1 \text{ mg IgGs/ml}$

b)
$$\left[\right] \text{totale des IgGs}_{278} \text{ (mg/ml) (après dialyse)} = 1 \text{ mg IgGs/ml} \times \frac{15 \text{ ml}}{28 \text{ ml}}$$

$\left[\right] \text{totale des IgGs}_{278} \text{ dialysées} = 0.54 \text{ mg/ml}$
--

* Le calcul des valeurs de concentrations (moyenne et totale) des IgGs est effectué de la sorte pour tous les IgGs spécifiques aux antigènes du VPC d'E. scandens.

** Absorption d'un mg d'IgGs établie selon la loi de Beer-Lambert (section II-2.2.3.).

Appendice

Table 1

Diète synthétique servant à l'élevage d'E. messoria1. Composition

A) Haricots blancs hydratés	854 g
Levure de bière	128 g
Germe de blé	200 g
B) Acide ascorbique	13 g
Acide sorbique	4 g
Hydrochlorure de tétracycline	150 g
Méthyl-p-hydroxybenzoate (Nipagine)	8 g
C) Agar	100 g
Eau distillée stérile	2 l

2. Préparation

- a) Autoclaver les haricots, la levure de bière ainsi que le germe de blé dans des contenants individuels pour une période de 20 minutes.
- b) Dissoudre l'agar dans environ le tiers du volume d'eau (récipient de 3 litres).
- c) Mélanger l'acide ascorbique, l'a. sorbique et la Nipagine dans environ 100 ml d'eau.
- d) Broyer les haricots blancs hydratés et le germe de blé avec le reste de l'eau et avec le mélange préparé en c). Ajouter l'hydrochlorure de tétracycline, et ajouter finalement l'agar fondu encore liquide en alternant avec la levure de bière.

Table 2

Composition du milieu de Grace stérile*

Grace's insect tissue culture media

	Liquid (1X) ¹ 350-1590	Modified Liquid (1X) ² 350-1945		Liquid (1X) 350-1590	Modified Liquid (1X) 350-1945
COMPONENT	mg/L	mg/L	COMPONENT	mg/L	mg/L
INORGANIC SALTS:			VITAMINS:		
CaCl ₂ (anhyd.)	750.00 ^a	750.00 ^a	Biotin	0.01	0.01
KCl	4100.00 ^b	4100.00 ^b	D-Ca pantothenate	0.02	0.02
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2280.00	2280.00	Choline chloride	0.20	0.20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2780.00	2780.00	Folic acid	0.02	0.02
NaHCO ₃	350.00	350.00	i-Inositol	0.02	0.02
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1013.00	1013.00	Niacin	0.02	0.02
OTHER COMPONENTS:			Para-aminobenzoic acid	0.02	0.02
Alpha-Ketoglutaric acid	370.00	370.00	Pyridoxine HCL	0.02	0.02
Fructose	400.00	400.00	Riboflavin	0.02	0.02
Fumaric acid	55.00	55.00	Thiamine HCL	0.02	0.02
D-Glucose	700.00	700.00	SERUM COMPONENTS:		
Malic acid	670.00	670.00	Bovine Albumin Fraction V	--	1%
Succinic acid	60.00	60.00	Fetal Bovine Serum	--	7%
Sucrose	26680.00	26680.00	Whole Egg Ultrafiltrate	--	10%
AMINO ACIDS:			¹ Grace, T.C.C., "Establishment of Four Strains of Cells Tissues Grown in Vitro." Nature, Vol. 195, No. 4843, pp (August 25, 1962). Dept. of Microbiology, John Curtin S Medical Research, Canberra and Division of Entomology, Canberra		
S - Alanine	200.00	200.00	² Yunker, Vaughn and Cory, Science 155, 1565 (1967).		
L - Alanine	225.00	225.00	^a Reduced from 1000 mg/L upon recommendation of Dr. James Vaughn, USDA, Beltsville, Md.		
L - Arginine HCL	700.00	700.00	^b Increased from 2240 mg/L, pers. comm. with Dr. Vaughn.		
L - Asparagine	350.00	350.00	^c pH adjusted to pH 6.0 to achieve and maintain solubilit		
L - Aspartic acid	350.00	350.00	Note: Lobster hemolymph (Homarus americanus), Cat. No. 6260 may be used in lieu of insect hemolymph.		
L - Cystine	22.00	22.00			
L - Glutamic acid	600.00	600.00			
L - Glutamine	600.00	600.00			
Glycine	650.00	650.00			
L - Histidine	2500.00	2500.00			
L - Isoleucine	50.00	50.00			
L - Leucine	75.00	75.00			
L - Lysine HCL	625.00	625.00			
L - Methionine	50.00	50.00			
L - Phenylalanine	150.00	150.00			
L - Proline	350.00	350.00			
DL- Serine	1100.00	1100.00			
L - Threonine	175.00	175.00			
L - Tryptophan	100.00	100.00			
L - Tyrosine	50.00	50.00			
L - Valine	100.00	100.00			

¹Grace, T.C.C., "Establishment of Four Strains of Cells from Insect Tissues Grown in Vitro." *Nature*, Vol. 195, No. 4843, pp. 788-789 (August 25, 1962). Dept. of Microbiology, John Curtin School of Medical Research, Canberra and Division of Entomology, C.S.I.R.O., Canberra

²Yunker, Vaughn and Cory, *Science* 155, 1565 (1967).

^aReduced from 1000 mg/L upon recommendation of Dr. James Vaughn, USDA, Beltsville, Md.

^bIncreased from 2240 mg/L, pers. comm. with Dr. Vaughn.

^cpH adjusted to pH 6.0 to achieve and maintain solubility.

Note: Lobster hemolymph (*Homarus americanus*), Cat. No. 260-6260 may be used in lieu of insect hemolymph.

* Produit vendu par Gibco (Grand Island, N.Y., U.S.A.)

Table 3

Milieu de Grace complet*

80 ml de milieu de Grace stérile (table 2).
20 ml de sérum de veau foetal stérile (Gibco, N.Y., U.S.A.).
1 ml d'antibiotiques: Pénicilline 80 UI.
Streptomycine 80 ug.

*Ce milieu est préparé sous une hotte stérile (Envirco, Subsidiary of Bio-Dynamics Inc., modèle 10276, Albuquerque, New Mexico).

Table 4

Milieu de C.f. complet*

80 ml de milieu de Grace stérile (table 2).
10 ml de sérum de veau foetal stérile (Gibco, N.Y., U.S.A.).
10 ml d'une solution de tryptose broth** à 2.5% filtrée.
1 ml d'antibiotiques: Pénicilline 80 UI
 Streptomycine 80 ug

* Ce milieu est préparé sous une hotte stérile (Envirco, Subsidiary of Bio-Dynamics Inc., modèle 10276, Albuquerque, New Mexico).

**Le produit tryptose broth est vendu par Difco (Détroit, Michigan, U.S.A.).

Table 5

a) Tampon tris-HCl* 0.05 M pH 7.0

- 6.057 g tris-HCl dans 500 ml d'eau distillée.
- Titrer avec du HCl 1N jusqu'à l'obtention d'un pH 7.0 avant de compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

b) Tampon tris-HCl* 0.05 M pH 7.6

- idem au procédé de la table 5a sauf titrer avec du HCl 1N jusqu'à l'obtention d'un pH 7.6.

* tris-HCl: tris (hydroxyméthyl aminométhane) (Bio-Rad Labo., Richmond, Californie).

Table 6

Tampon phosphate 0.005M pH 7.0 (tampon-CIV)

169 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

433 mg Na_2HPO_4

qs ad 1 litre avec de l'eau distillée.

Table 7

Colorant de violet de crystal 0.1%

0.1 g de violet de crystal dans 100 ml d'une solution d'acide citrique 0.1 M (21 g d'a. citrique/litre d'eau distillée).

Table 8

a) Solution de paraformaldéhyde 0.5%

- 6.25 ml d'une solution de paraformaldéhyde 8% dans l'eau distillée.
- 50 ml de tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 7.4 qs ad 100 ml d'eau distillée.

b) Solution de paraformaldéhyde 1%

- 12.50 ml d'une solution de paraformaldéhyde 8% dans l'eau distillée.
- 50 ml de tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 7.4 qs ad 100 ml d'eau distillée.

Table 9

a) Tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 7.4

Solution A: 14.196 g Na_2HPO_4 qs ad 1 litre d'eau distillée.

Solution B: 13.799 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ qs ad 1 litre d'eau distillée

A 150 ml de la solution A, on ajoute 500 ml de la solution B.

b) Tampon phosphate de sodium 0.05 M pH 6.9, 0.1 M NaCl

Solution A: 7.098 g Na_2HPO_4 qs ad 1 litre d'eau distillée.

Solution B: 6.899 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ qs ad 1 litre d'eau distillée.

A 950 ml de la solution B, ajouter 1 litre de la solution A.
A cette solution titrée à un pH 6.9, ajouter du NaCl de manière
à obtenir une concentration finale en NaCl de 0.1 M (5.84 g de
NaCl dans 1 litre de tampon).

Table 10

Diverses solutions utilisées au cours de la préparation*
de la peroxydase (HRPO) avant sa conjugaison aux IgGs purifiées.

a) Solution de bicarbonate de Na 0.3 M pH 8.1

2.5203 g NaHCO_3 qs ad 100 ml d'eau distillée.

b) Solution de FDNB (1-fluoro-2-4-dinitrobenzène) 1% P/P dans l'alcool absolu

Sur la balance, on tare un tube déposé dans un bécher.
On ajoute dans celui-là 0.1g de FDNB et 9.9 g d'éthanol absolu.

c) Solution de NaIO_4 (sodium m-périodate) 0.04 M

0.8556 g NaIO_4 qs ad 100 ml d'eau distillée.

d) Solution d'éthylène glycol 0.16 M

0.9 ml d'éthylène glycol qs ad 100 ml d'eau distillée.

Densité de l'éthylène glycol: 1.111g/ml.
Concentration de 0.16 M en éthylène glycol:
0.99312g/100 ml.

0.9 ml de ce produit correspond à 0.99312 g.

* Etapes de la préparation de la HRPO citées à la section II-2.3.1.

Table 11

Tampon carbonate de Na 0.01 M pH 9.5

Solution A: 1.0599 g Na_2CO_3 qs ad 1 litre d'eau distillée.

Solution B: 0.8400 g NaHCO_3 qs ad 1 litre d'eau distillée.

A 900 ml de la solution A, ajouter 1 litre
de la solution B.

Table 12

Tampon PBS (phosphate-buffered saline) pH 7.4-7.5

Solution A:

8.00 g	NaCl
0.20 g	KCl
1.15 g	Na_2HPO_4
0.20 g	KH_2PO_4
800 ml	eau distillée

Solution B:

0.132g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
100 ml	eau distillée

Solution C:

0.100g	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
100 ml	eau distillée

- Mélanger la solution B avec la solution A, et ajouter la solution C au mélange précédent.

- Ajuster le pH à 7.4-7.5 avec du NaOH 1 N.

Table 13

Solution de DAB-4HCl* 0.05%, H₂O₂ 0.01%

- Ajouter 0.05 g de DAB-4HCl à 10 ml de tampon tris-HCl 0.05 M pH 7.6 (table 5b). Cette solution est mélangée à l'aide d'un barreau aimanté.
- Filtrer la solution précédente à l'aide d'un filtre Whatman # 1 (Whatman Limited, England).
- Ajouter juste avant usage de cette solution filtrée 0.033 ml d'une solution à 3% de H₂O₂ pour obtenir une concentration finale de 0.01% en H₂O₂.

N.B.: La solution de DAB-4HCl préparée de la sorte est concentrée 10 X et se conserve des semaines à -70°C.

* DAB-4HCl: tétrahydrochlorure de diamino-3,3' benzidine
(Sigma Chemical Company, St-Louis, U.S.A.)

Table 14

Solutions de coloration et de décoloration des plaques
employées lors de la technique d'Ouchterlony.

a) Solution de coloration: Bleu de Coomassie

425 ml	éthanol
55 ml	acide acétique glacial
25 ml	glycérine
0.125 g	colorant (Bleu de Coomassie)

qs ad 1 litre avec de l'eau distillée.

b) Solution de décoloration

25 ml	éthanol
10 ml	acide acétique
100 ml	eau distillée