

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ A
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIERES

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

PAR
DANIEL DESMARTEAUX

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE D'UN ISOLAT DU VIRUS DE LA POLYÉDROSE
NUCLÉAIRE DE LA SPONGIEUSE (*LYMANTRIA DISPAR* L.).

SEPTEMBRE 1989

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.

A Alex San,
Isabelle,
Denise et
Joseph.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	i
SOMMAIRE	vi
REMERCIEMENTS	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ANNEXES	xiv
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	xv
 INTRODUCTION	 1
 CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	 4
I.1 Les Baculovirus.....	4
I.1.1 Historique.....	4
I.1.2 Taxonomie et morphologie des VPN.....	7
I.1.3 Acides nucléiques des VPN.....	11
I.1.3.1 Réitération de séquences d'ADN.....	12
I.1.3.2 éléments génétiques mobiles (transposons).....	13
I.1.3.3 Régulation des gènes des VPN.....	14
I.1.3.4 Modifications post-transcriptionnelles...	15
I.1.3.5 Homologie.....	16

II.3 Microscopie électronique.....	57
II.4 Purification de l'ADN viral.....	59
II.4.1 Profil électrophorétique comparatif de l'ADN....	60
II.5 Clonage moléculaire du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR.....	62
II.5.1 Établissement des banques de fragments de restriction de l'ADN du VPNLd.....	62
II.5.1.1 Transfert de type Southern de l'ADN plasmidique.....	66
II.5.2 Amplification enzymatique du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR.....	67
II.5.2.1 Clonage des fragments sous-molaires.....	68
II.5.3 Marquage radioactif de l'ADN.....	72
II.5.4 Criblage des plasmides recombinants.....	73
II.6 Caractérisation du gène de la polyédrine du VPNLd.TR.	75
II.6.1 Profil électrophorétique comparatif des fragments du gène codant pour la polyédrine des VPNLd.TR et VPNLd.US.....	75
II.6.2 Séquencage du gène de la polyédrine du VPNLd.TR.....	76
II.7 Méthode de diagnostic.....	79
II.7.1 Préparation des échantillons de terrain.....	79
II.7.2 Préparation des sondes et hybridation.....	80
II.7.3 Évaluation de la spécificité des sondes.....	80
II.7.4 Évaluation de la sensibilité de la méthode.....	80
II.7.5 Évaluation de la dispersion géographique du VPNLd dans les populations de spongieuses répertoriées.....	81

II.8 évaluation de la latence et de la persistance du VPNLd	82
II.8.1 Chez les larves.....	82
II.8.2 Chez les oeufs.....	82
CHAPITRE III. RÉSULTATS	84
III.1 Infection <i>in vitro</i> et permissivité cellulaire.....	84
III.1.1 Mise en évidence d'une infection virale intracytoplasmique chez les cellules Es-263..	84
III.1.2 Permissivité cellulaire et conditions d'infection <i>in vitro</i> au VPNLd.....	90
III.2 Caractérisation de l'ADN du VPNLd.TR.....	95
III.2.1 Profils de restriction de l'ADN du VPNLd.TR.....	95
III.3 Caractérisation du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR.....	100
III.3.1 Comparaison du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR et du VPNLd.US amplifiés par PCR.....	100
III.3.2 Clonage moléculaire du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR.....	106
III.3.3 Positionnement et orientation des constituants du clone 54.....	114
III.3.4 Séquence partielle du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR.....	117
III.4 Méthode de diagnostic utilisant une sonde spécifique couplée à des échantillons cibles pré-amplifiés.....	120
III.4.1 Spécificité des sondes moléculaires utilisées.....	120
III.4.2 Sensibilité de la méthode couplée.....	125
III.4.3 Diagnostic de la virose au VPNLd.....	129

III.4.4 évaluation de la latence et de la persistance du VPNLd chez les oeufs de <i>Lymantria dispar</i>	134
III.4.5 Purification de l'ADN viral du VPNLd à l'aide du Lysozyme.....	137
DISCUSSION.....	141
CONCLUSION.....	157
BIBLIOGRAPHIE.....	161
ANNEXES.....	187

SOMMAIRE

Le virus de la polyédrose nucléaire (VPN) peut avoir une utilité certaine dans la lutte biologique contre les insectes défoliateurs d'essences économiquement importantes, telle la spongieuse (Lymantria dispar L.). Considérant le VPNLd comme un moyen de contrôle potentiel des invasions cycliques de la spongieuse au Québec, il nous a semblé pertinent d'orienter nos efforts sur la caractérisation de l'isolat du VPNLd provenant de la région de Trois-Rivières, Québec (VPNLd.TR).

Des analyses de restriction de l'ADN du VPNLd.TR, ainsi qu'une souche ontarienne (VPNLd.ONT) et une souche américaine (VPNLd.US), ont permis de constater de l'hétérogénéité génétique entre ces différents isolats du virus. La comparaison des séquences partielles du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR et du VPNLd.US nous a permis d'identifier des différences mineures entre ces deux isolats. Nos résultats indiquent de plus que le gène de la polyédrine de notre isolat est présent en deux copies inversement orientées dans l'ADN viral.

Nos travaux ont aussi abouti à l'élaboration d'une méthode de diagnostic spécifique et sensible à la détection de moins de 100 molécules d'ADN viral cible par l'utilisation

d'une sonde moléculaire couplée à des échantillons pré-amplifiés par 35 cycles de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Enfin, la lignée cellulaire Cf-124 a permis un premier passage du VPNLd.TR en culture in vitro.

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier le Dr Guy Charpentier, directeur du projet, ainsi que le Dr Maximilien Arella, co-directeur, pour la confiance qu'ils m'ont accordé et l'intérêt soutenu qu'ils ont porté à cette étude. Je suis reconnaissant à mes directeurs de recherche qui m'ont permis de participer à des congrès d'envergure internationale, leur soutien financier ainsi que les critiques et corrections pertinentes du mémoire.

Je tiens aussi à remercier le Dr Jean-Pierre Bourassa de l'U.Q.T.R., ainsi que le Dr Dave Perry du Centre Forestier des Laurentides pour la documentation, le matériel et les conseils sur l'élevage de larves de spongieuses. Mes remerciements vont également au Dr Serge Belloncik pour m'avoir accordé l'accès aux laboratoires du Centre de Recherche en Virologie de l'Institut Armand Frappier.

Je suis très reconnaissant envers le personnel technique de l'U.Q.T.R. et du Centre de Recherche en Virologie de l'I.A.F., particulièrement envers mademoiselle Micheline Letarte pour sa disponibilité et la qualité de l'information qu'elle a su me transmettre, et envers mademoiselle Liette Laganière pour son dévouement et sa participation.

J'adresse mes remerciements à Pierre Lepage, Michel Nadeau, Liem Thanh Truong, Abderrazzak Merzouki, Joël Heppell, Martin Nadeau, pour leur aide et amitié extrêmement appréciées et enrichissantes.

Je remercie sincèrement monsieur André Larue pour la révision orthographique du mémoire, ainsi que monsieur André Levac pour la qualité des photographies.

Enfin, je tiens à remercier Isabelle et Alex San, pour le calme, la patience et le respect qu'elles m'ont témoignées tout au long de la rédaction de ce mémoire.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I. VARIATION DES PARAMETRES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES CONDITIONS D'INFECTION <u>IN VITRO</u> AU VPnLd.	94
--	----

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Morphologie du Virus de la Polyédrose Nucléaire de <u>Lymantria dispar</u> (VPNLd).	9
FIGURE 2. Sites d'échantillonnage des larves, cocons et masses d'oeufs de <u>Lymantria dispar</u>	34
FIGURE 3. Microphotographie d'un corps d'inclusion intact du VPNLd.TR et de particules virales libres purifiées sur gradient linéaire de sucrose 25-60% après solubilisation des corps d'inclusion.....	44
FIGURE 4. Description schématique de la disposition des stimulateurs chimiques utilisés lors de l'infection <u>in vitro</u> des lignées cellulaires Ld, Es, Cf et BmN4 sur une plaque de microtitrage de 96 puits.	54
FIGURE 5. Représentation schématique du plasmide pIBI31....	63
FIGURE 6. Représentation schématique des cycles de la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	70
FIGURE 7. Microphotographie d'un virus contaminant le cytoplasme des cellules de la lignée <u>E.s.</u> -263.	86
FIGURE 8. électrophorégramme des bandes d'ADN du VPNLd purifié à partir d'échantillons de larves virosées de la région de Trois-Rivières.	88

- FIGURE 9. évolution in vitro de l'infection du
VPNLd.TR chez les cellules de la lignée
Cf-124 (grossissement 320 X).92
- FIGURE 10. Profil électrophorétique des fragments d'ADN
après digestion entière à l'aide des endonu-
cléases de restriction EcoRI et HindIII, du
VPN de Lymantria dispar de souches US (1),
TR (2) et ONT (3).96
- FIGURE 11. Profil électrophorétique des fragments d'ADN
du VPNLd de souche US (1), TR (2), et ONT (3),
après digestion entière à l'aide des endonu-
cléases de restriction BamHI, BglII et PstI.....98
- FIGURE 12. Amplification du gène codant pour la
polyédrine des VPNLd.TR et VPNLd.US
par 35 cycles de réaction de polymé-
risation en chaîne (PCR).102
- FIGURE 13. Autoradiogramme et électrophorégramme
correspondant du profil de restriction
comparatif entre les fragments du gène
de la polyédrine des VPNLd.TR et VPNLd.US
amplifiés par PCR.104
- FIGURE 14. Criblage du fragment correspondant au gène
de la polyédrine sur l'ADN total du VPNLd.TR
coupé par l'endonucléase de restriction PstI...108
- FIGURE 15. Criblage des plasmides recombinants du
gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR.....110
- FIGURE 16. Profil de restriction du clone 54 (C54).112
- FIGURE 17. Positionnement et orientation du fragment d'ADN
contenant le gène de la polyédrine du VPNLd
inséré au site PstI du pIBI31.115

FIGURE 18. Séquence nucléotidique partielle du gène de la polyédrine du virus de la polyédrose nucléaire de <u>Lymantria dispar</u> , souche Trois-Rivières (VPNLd.TR).	118
FIGURE 19. évaluation de la spécificité des sondes moléculaires utilisées pour le développement d'une méthode de diagnostic... ..	121
FIGURE 20. électrophorégramme des plasmides H2 et H3 utilisés comme sondes contrôles lors des essais de diagnostic... ..	123
FIGURE 21. évaluation de la sensibilité de la méthode de diagnostic utilisant une sonde spécifique couplée à des échantillons pré-amplifiés par PCR.	127
FIGURE 22. Détection de l'ADN du VPNLd par hybridation aux sondes moléculaires	130
FIGURE 23. Carte relatant la dispersion géographique du VPNLd dans les populations de spongieuses échantillonnées en 1987 et 1988.....	132
FIGURE 24. évaluation de la latence et de la persistance du VPNLd chez les oeufs de <u>Lymantria dispar</u> à l'aide de sondes moléculaires couplées au PCR..	135
FIGURE 25A ADN du VPNLd purifié à l'aide de protéinase K (K), lysozyme (L) et SDS 5% (S), à partir du broyat d'un lot commun de trois larves virosées.	139
FIGURE 25B évaluation de la limite de détection de la sonde TR6 hybridée à des dilutions d'ADN viral préparé à l'aide de protéinase K (K), lysozyme (L) ou SDS 5% (S)	139

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1. Liste des pathologies virales naturelles de la <i>spongieuse</i>	185
ANNEXE 2. Milieu de Grace (1962).....	186
ANNEXE 3. Milieu TC-10 (5 L.)	187
ANNEXE 4. Fixateur Carnoy	188
ANNEXE 5. Technique de coloration des polyèdres.....	189
ANNEXE 6. Milieu LB (Luria-Bertani)	190
ANNEXE 7. Graphique des taux de viabilité/mortalité des cellules (Ld, Es, Cf).	191
ANNEXE 8. Tampons réactionnels.....	192

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ABRÉVIATIONSSYMBOLES

ADN	: Acide désoxyribonucléique	μ	: micro 10^{-6}
ARN	: Acide ribonucléique	n	: nano 10^{-9}
ARNm	: ARN messenger	p	: pico 10^{-12}
ARNr	: ARN ribosomal		
ARNt	: ARN de transfert		
BAP	: Phosphatase alcaline bactérienne		
Bm	: <u>Bombyx mori</u>		
Cf	: <u>Choristoneura fumiferana</u>		
CPM	: émission radioactive/min. (counts per minute)		
dA	: Désoxyadénine		
dC	: Désoxycytosine		
ddNTP	: Didésoxynucléoside 5' triphosphaté		
DEAE	: Diéthylaminoéthyle		
dG	: Désoxyguanine		
DMSO	: Diméthyle sulfoxyde		
DNP	: Désoxynucléoprotéine		
dNTP	: Désoxynucléoside 5' triphosphaté		
dT	: Désoxythymine		
EDTA	: Acide éthylènediaminetétraacétique		
Es	: <u>Euxoa scandens</u>		
gp	: Glycoprotéine		

IPTG	:	Isopropyle- β -D-thiogalactopyranoside
Kpb	:	Kilopaires de bases
Ld	:	<u>Lymantria dispar</u>
mA	:	milliampère
nt	:	nucléotide
p (p10)	:	protéine (10 KDa)
PCR	:	Réaction de polymérisation en chaîne
PEG	:	Polyéthylène glycol
PFU	:	Unité formant des plages
RNase A	:	Ribonucléase A
rrh	:	Régions répétitives homologues
S	:	Coefficient de sédimentation (Svedberg)
SDS	:	Dodecyl-sulfate de sodium
SVF	:	Serum foetal de veau
TCA	:	Acide trichloroacétique
TEA	:	Tris-EDTA-Acétate
Tm	:	Température de transition (melting temperature)
U	:	Unité
U.V.	:	Ultra-violet
VG	:	Virus de la Granulose
VPC	:	Virus de la Polyédrose Cytoplasmique (CPV)
VPN	:	Virus de la Polyédrose Nucléaire
15mer	:	Pentadécamère

INTRODUCTION

L'idée de l'emploi de micro-organismes contre les insectes nuisibles a pris corps au milieu du XIX^e siècle, en partie grâce aux travaux de Le Conte, Hagen, Pasteur, Metchnikoff, et plus tard d'Herelle . Il s'agissait alors de l'utilisation de champignons inférieurs et de bactéries . Vers 1920 , un certain nombre de chercheurs tels que White et Glaser en Amérique , Paillot et Acqua en Europe et Ishimori au Japon , ont formé par leurs travaux une ébauche de la virologie entomologique (Vago 1961) .

Depuis, l'essor particulier des techniques d'étude des entomopathogènes et la conscientisation populaire des problèmes environnementaux, ont fait naître une foule de projets de recherche destinés à pallier aux inconvénients de l'utilisation abondante des pesticides chimiques. L'une des alternatives proposées était l'emploi des pathogènes naturels des espèces cibles d'insectes.

Parmi ces entomopathogènes, au sein de la famille des Baculoviridae, le Virus de la Polyédrose Nucléaire (VPN) était envisagé comme moyen de contrôle potentiel de plus de 500 espèces d'insectes, dont la spongieuse (Lymantria dispar).

Bien que présente au Québec depuis plus d'une cinquantaine d'année, la spongieuse s'est progressivement adaptée à nos forêts causant, en 1985 seulement, la défoliation de plus de 8 000 km² du territoire situé en périphérie de Montréal.

C'est d'ailleurs dans la perspective de prévention des invasions cycliques de la spongieuse au Québec, que la caractérisation de l'isolat du VPN de L. dispar de la région de Trois-Rivières (VPNLD.TR) a été entreprise.

Au cours de nos travaux, nous avons effectué des essais d'infection sur culture cellulaire à l'aide du VPNLD.TR afin de trouver une lignée permissive à la réplication du virus. Successivement, nous avons comparé la structure génomique du VPNLD.TR à celles d'isolats du virus provenant de l'Ontario (VPNLD.ONT) et des états-Unis (VPNLD.US), dans le but d'établir l'identité propre de l'isolat local. Aussi, le gène codant pour la protéine majeure du VPNLD.TR, la polyédrine, a été partiellement séquencé et comparé à la séquence connue du gène codant pour la polyédrine du VPNLD.US.

De plus, nous avons mis au point de nouvelles techniques de purification, à l'aide du lysozyme, et de détection de l'ADN viral, par hybridation d'une sonde moléculaire spécifique. Quelques extraits ont été amplifiés par PCR afin d'accroître la sensibilité de l'hybridation moléculaire. Ces travaux serviront de premier jalon pour procurer les outils nécessaires à la production, l'exploitation et la sélection de variants du VPnLd potentiellement mieux adaptés pour lutter contre la spongieuse.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Les Baculovirus

I.1.1 Historique: Le résumé des étapes historiques concernant les baculovirus présenté ici, fait référence à l'excellente revue du sujet publiée par Granados et Federici (1986). A l'origine , les polyédroses observées chez les lépidoptères étaient nommées "jaunisses" (Gelbsucht) hérité de la description qu'en fit Maria Sibilla Merian en 1679 dans son livre sur la métamorphose des chenilles ¹. Suivant la progression des sciences et des technologies , Maestri et Cornelia (1856) furent les premiers à observer les corpuscules cristallins réfringents dans l'hémolymphe et les tissus d'une larve virosée du ver à soie (Bombyx mori) .

1 Meriam M.S. Der Raupen Wunderbare Verwandlung , und sonderbare blumennahrung , Graff ,Nürnberg 1679 p.3 "The miraculous metamorphosis of caterpillars and their unique flower nutrition" (Granados R.R. ,Federici B.A.,1986)

En 1873 , Boyle, un chercheur autrichien , a été le premier à postuler la nature protéique de ces cristaux qu'il nomma "polyedrische körnchen" signifiant granules polyédriques . De plus, il observa les propriétés physico-chimiques des granules sous l'influence de solvants organiques, d'acides forts et de solutions alcalines. Cependant, la relation entre l'agent causal et la maladie n'a été établie qu'en 1893 par Washtl et Kornauth qui reconnurent une signification diagnostique à la présence des polyèdres.

A ce sujet, ce n'est qu'en 1909 que les termes polyèdres (polyhedron) et polyédrose (polyederkrankheit) ont été introduits au vocabulaire par Wahl. Ce chercheur fut le premier à démontrer une infection systémique sur Lymantria monacha L. à l'aide d'une suspension de polyèdres. Il observa aussi que ces polyèdres se développent toujours dans le noyau quelque soit la cellule infectée .

L'insuffisance de précision quant au matériel d'identification et la méconnaissance des agents viraux marquèrent les années suivantes par la confusion. Glaser et Chapman (1912) attribuèrent la maladie du dépérissement (Wilt disease) chez Lymantria dispar à un agent causal bactérien : le Gyrococcus sp.. C'est pourtant ce même Glaser qui postula en 1918 que la liquéfaction des tissus de larves infectées était probablement due à l'action cytolytique d'un virus par

l'accumulation et non par l'élaboration d'enzymes protéolytiques. En effet, il démontra l'absence d'hydrolyse de gélatine inoculée à l'aide d'un filtrat concentré de virus.

C'est en 1918-1919 que les travaux d'Acqua en Italie, suivis de ceux de Paillot en France, démontrèrent la théorie des virus filtrables. Cette théorie a été successivement vérifiée par Komarek et Breindl en 1924 par l'observation évidente d'un mouvement brownien à l'intérieur des polyèdres après coloration des corpuscules viraux basophiles, qui devaient être en fait des particules virales logées à l'intérieur d'une enveloppe protéique.

Dès 1950, suite à des travaux de microscopie électronique, la distinction morphologique fondamentale entre le Virus de la Polyédrose Cytoplasmique (CPV) et le Virus de la Polyédrose Nucléaire (VPN) était acquise (Smith et Wyckoff, 1950; Croizier, 1984). La forme circulaire de l'ADN des VPN est reconnue, quant à elle, depuis les travaux de Summers et Anderson (1973), et Burges (1977).

A l'heure actuelle, les baculovirus sont étudiés et quelques-uns utilisés en fonction de deux champs d'exploitation : les insecticides biologiques (Payne, 1982), et les vecteurs d'expression de gènes étrangers (Luckow et Summers,

1988). Quatre sous-groupes de la famille des Baculoviridae sont maintenant répertoriés (Tinsley, 1985; Cunningham, 1988)

Sous-groupe A: les Virus de la Polyédrose Nucléaire (VPN)

Sous-groupe B: les Granulovirus (VG) responsables de la granulose (Vago et al., 1974; Matthews, 1980, 1982)

Sous-groupe C: virus non inclus d'Dryctes rhinoceros (OV)

"Sous-groupe D" "calyx viruses" associés au système reproducteur d'hyménoptères parasites. Il est toutefois possible que ce dernier soit un polydnavirus, c'est la raison pour laquelle il n'est pas mentionné dans la nomenclature actuelle.

I.1.2 Taxonomie et morphologie des VPN: Les Virus de la Polyédrose Nucléaire (VPN), anciennement Borrelinavirus, appartiennent au sous-groupe A de la famille des Baculoviridae, terme dérivant du latin "baculum" (bâtonnet) en raison de la forme de la particule virale (Fig.1) (Fenner, 1976; Matthews, 1982).

Les VPN sont composés d'une nucléocapside constituée d'un complexe ADN-protéine; la désoxyribonucléoprotéine (DNP) (Kelly, 1985) occupant un noyau central de 32 nm de diamètre et étant associé de façon hétérogène à l'ADN (Burley et al., 1982). La nucléocapside de forme cylindrique a des dimensions d'environ 35-40 x 200-350 nm. Cette nucléocapside loge seule

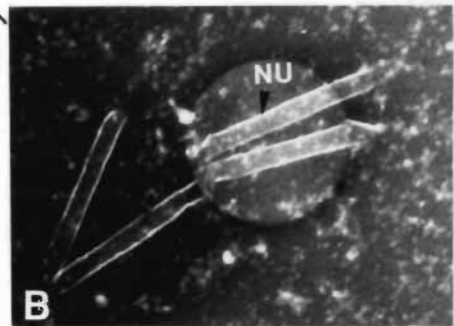
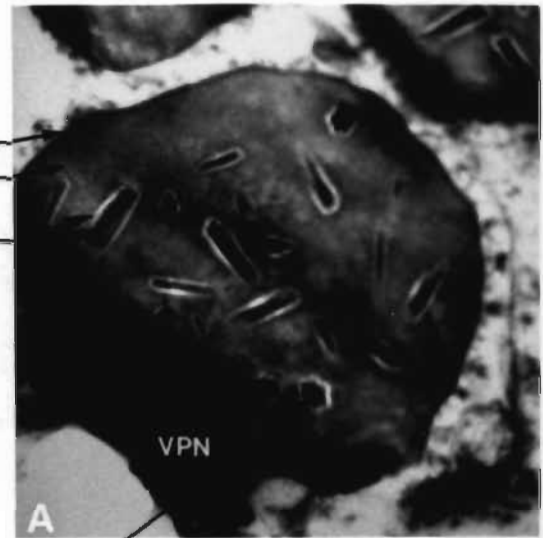
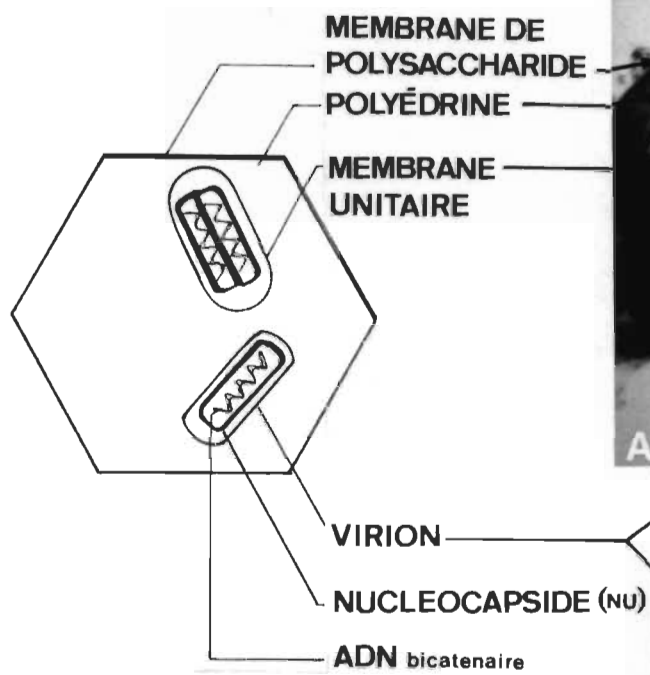
ou par groupe à l'intérieur d'une enveloppe lipoprotéique (Kelly, 1982) de type membrane unitaire formant un virion bacilliforme d'environ 40-110 x 200-400 nm (Matthews, 1980, 1982) dont l'une des extrémités présente des treillis caractéristiques de capsomères (Harrap, 1972; Beaton et Filshie, 1976; Faulkner et Carstens, 1986). La caractéristique principale de ce virus d'insecte est que les particules virales (virions) sont incluses dans une masse protéique paracristalline (Whitt et Manning, 1988) de forme polyédrique (Federici, 1986) entourée d'une fine membrane d'hydrates de carbone (Hess et Falcon, 1978; Chung et al., 1980; Whitt et Manning, 1988), que l'on nomme corps d'inclusion ou polyèdre.

Le polyèdre est synthétisé par le virus de façon tardive lors du cycle d'infection. La dimension de ces corps d'inclusion varie de 1,0 à 15 µm (Granados, 1980). Ils peuvent contenir plusieurs nucléocapsides enveloppées de façon unitaire ou par groupe (Heimpel et Adams, 1966; Tompkins et al., 1969) définissant ainsi les morphotypes SNPV et MNPV pour "single nucleocapsid NPVs" et "multiple nucleocapsid NPVs" respectivement (Kelly, 1985). Enfin il a été démontré chez le VPN de Trichoplusia ni que la charge de surface des polyèdres est négative, ce qui implique une meilleure résistance des polyèdres contre l'attaque enzymatique et la dissociation du polymère protéique (Small et Moore, 1987). Cette étude n'a été ni confirmée ni infirmée par d'autres chercheurs.

FIGURE 1: Morphologie du Virus de la Polyédrose Nucléaire
de Lymantria dispar (VPNLd).

A Polyèdre en coupe transversale
(grossissement 25 333X)

B Particules virales (grossissement 85 625X)



Cependant, il serait plausible de croire que la charge portée en surface des polyèdres serait négative pour tous les baculovirus inclus, du moins au sein du même sous-groupe, car le rôle protecteur des polyèdres des différents baculovirus est identique.

I.1.3 Acides nucléiques du VPN: Le VPN est un virus à ADN bicaténaire circulaire superhélicoïdal (Matthews, 1982). Généralement, l'ADN extrait de particules virales des VPN est circulaire (Kelly, 1985). Cependant il a été rapporté qu'il existe trois formes structurales de même poids moléculaire : la forme linéaire, circulaire relâchée et la forme circulaire covalente ou superhélicoïdale (Summers, 1982).

Concernant les données physico-chimiques de l'ADN du VPNLd, Smith et al. (1988) ont calculé une taille moyenne du génome de 166,6 Kb soit une masse moléculaire de 110 MDa. McCarthy et al. (1979) rapportent eux que la masse moléculaire approximative se situe entre 85 et 96 x 10⁶ Daltons selon la méthode d'évaluation employée. Brièvement, ces derniers auteurs situent le coefficient de sédimentation de l'ADN circulaire à 66,8 ± 2S et à 56,8 ± 2S pour l'espèce linéaire. La température de transition (T_m) de l'ADN a été évaluée à 81,2 ± 0,7°C et le contenu en G+C à environ 62% compte tenu de la T_m, ce qui est d'ailleurs très élevé par rapport aux autres baculovirus.

De ces données, seule la masse moléculaire obtenue semble démontrer une différence significative par rapport à la masse obtenue antérieurement pour l'ADN du même isolat (McCarthy et al., 1979; Kelly, 1976, Bud et Kelly 1977, Harrap et al., 1977).

Chez les baculovirus, l'ADN ne semble pas être associé à des histones (Kelly, 1985), ce qui expliquerait l'absence de structures nucléosomales. Concernant le mode d'encapsulation du génome des VPNs, Bud et Kelly (1980) proposent le repliement de l'ADN de façon parallèle à l'axe longitudinal de la nucléocapside. De cette façon les brins de DNP seraient parallèlement orientés au sens de torsion des sous-unités de la capside virale (Kelly, 1985) aboutissant à la structure cylindrique caractéristique de la nucléocapside.

I.1.3.1 Réitération de séquences d'ADN: La présence de séquences réitérées à l'intérieur du génome des baculovirus a été démontré à l'origine chez quatre VPN infectant Spodoptera spp. (Kelly, 1977). Depuis, la présence de régions répétitives homologues (rrh) a été observée chez les VPN d'Autographa californica (VPNAc) et de Choristoneura fumiferana (VPNCf) (Guarino et al., 1986; Arif, 1986; Kumar et Miller, 1987). Ces régions sont caractérisées par leur richesse en sites reconnus par l'endonucléase EcoRI et contiendraient des séquences palindromiques hautement conservées

(Guarino et al., 1986), dont la séquence consensus pour les rrh 1-5 du VPNAc : TTTAC(A/G)AGTAGAATTCTAC(T/G)(C/T)GTAAA.

McClintock et Dougherty (1988) ont quant à eux démontré la présence de quatre rrh chez le VPNLd caractérisés par une quantité plus faible de sites EcoRI. Le rôle des rrh est encore mal connu. Il a été suggéré que ces régions pourraient servir d'origine de réplication pour l'ADN (Cochran et Faulkner, 1983), et qu'elles seraient impliquées dans les processus d'insertion et de reduplication de séquences et d'acquisition d'éléments génétiques mobiles (transposons) lors de passages continus en culture de cellules (Faulkner et Carstens, 1986).

I.1.3.2 éléments génétiques mobiles (transposons): A ce sujet, c'est McClintock qui, en 1948, fut le premier à détecter la présence d'un élément génétique mobile. Il s'agissait alors du transposon Ac (activateur) de Zea mays L. (Hauser et al., 1988). C'est à la suite des travaux de Fraser (1986) sur l'analyse du génome des mutants FP (few polyhedra) que l'on s'intéressa à la présence d'éléments transposables chez les Baculovirus (Devauchelle, 1988). Depuis, plusieurs auteurs dont Carbonell et collaborateurs (1985) et Beames et Summers (1988) ont émis l'hypothèse que la capacité des VPN d'intégrer et transmettre de l'information génétique sous forme de transposon pourrait contribuer autant à la diver-

sification du génome viral que du génome de l'hôte. Enfin, il est important de souligner que plusieurs gènes de résistance sont localisés sur des transposons (Esser et Dohmen, 1987).

I.1.3.3 Régulation des gènes des VPN: Friesen et Miller (1985) ont suggéré quatre phases temporelles distinctes de l'expression génétique chez les baculovirus : la phase précoce immédiate (α), la phase précoce (β) accompagnant le début de l'étape de répllication de l'ADN viral, et les phases tardives gamma (γ) et delta (δ) référant, pour chaque type de gènes impliqués, à des temps d'expression de 2, 6, 12 et plus de 12-15 h respectivement. De plus, l'activité d'une ARN polymérase-ADN dépendante du VPNAc a été mise en évidence par les travaux de Fuchs et collaborateurs (1983), laquelle serait responsable de la transcription des gènes tardifs. Chez certains virus à ADN, dont les baculovirus, l'expression des gènes tardifs dépend de deux facteurs simultanés : l'activation *trans* des protéines précoces, et l'activation *cis* des séquences d'ADN dans la région du promoteur des gènes tardifs (Guarino et Summers, 1988). Il a été démontré, à l'aide d'expériences de transcription du promoteur TK-HSV chez l'oocyte de Xenopus, que l'effet *cis* est indépendant de l'orientation mais dépendant de la distance au promoteur (Koltunow et al., 1987). Il semble que les gènes précoces immédiats (α) sont exprimés en absence de synthèse protéique

virale de novo . Selon les mêmes auteurs (1986, 1987) la présence du gène précoce IE-1 (Immediate-early gene) est prérequis pour l'expression de certains gènes précoces de type β . Lorsque le produit de IE-1 est limitant, un facteur nommé IE-N interviendrait comme stimulateur du gène IE-1 afin d'en augmenter son expression (Carson et al., 1988). Crawford et Miller (1988) ont quant à eux découvert qu'une protéine de 28 kDa, codée par le gène ETL (Long Fragment EcoRI T), est directement ou indirectement nécessaire à l'expression de plusieurs gènes chez VPNAc. Ils ont aussi observé une similarité significative entre la région promotrice du produit de transcription de ETL et la séquence "leader" du gène IE-1 du VPNAc.

I.1.3.4 Modifications post-transcriptionnelles: Il a été démontré que les ARNm du VPNAc sont épissés lors de l'infection (Chisholm et Henner, 1988). De plus, la synthèse des ARNm viraux tardifs se distinguent de la synthèse des ARNm précoces par sa dépendance à la réplication virale de l'ADN (Thiem et Miller, 1989). Ceci implique que la cascade des événements conduisant à la production des protéines tardives est directement liée à la synthèse nucléotidique et qu'en présence d'un inhibiteur de la synthèse d'ADN, l'aphidicoline par exemple, la synthèse protéique serait inhibée.

I.1.3.5 Homologie: L'hétérogénéité génotypique des baculovirus semble très répandue lorsque sont comparés différents isolats de terrain (Smith et Crook, 1988; Burges, 1986) sur la base de leurs profils de restriction ou de leurs séquences nucléotidiques. Kelly (1977) a rapporté une homologie variant de 15 à 75% entre les génomes de quatre VPN spécifiques de Spodoptera sp.. De plus, il a été observé une homologie entre de longs segments de génomes du VPNAc et du VPNOp (Leisy et al., 1984), du VPNAc et du VPNCf (Arif et al., 1985) et entre le VPNAc et le VPNH_z (Knell et Summers, 1984). Les résultats de Jewell et Miller (1980), rapportés par Smith et Summers (1982), ne démontrent qu'une homologie d'environ 1% entre l'ADN du VPNAc et celui du VPNLd. Il est reconnu que des régions codantes pour la polyédrine et la protéine P10 sont très bien conservées chez le groupe de VPN infectant les lépidoptères (Faulkner et Carstens, 1986; Rohrmann, 1986). A l'opposé, le pourcentage d'homologie entre les Baculovirus de type S et M est faible, il est de 0,2% dans le cas des polyédroses SNPV et MNPV de Trichoplusia ni (Jewell et Miller, 1980). Mis à part l'homologie intra-groupe, il a été démontré que le VPNAc et le virus de la Granulose de Pieris rapae (PrVG) présentent un faible degré d'homologie (Dwyer et Granados, 1988). Le VPNAc aurait de plus une séquence de 250 pb correspondant à 50,1% d'homologie avec le gène (L) codant pour l'ARN polymérase du virus de la stomatite vésiculeuse (Crawford et Miller, 1988).

Arella et al. (1988) ont, quant à eux, démontré l'absence d'homologie de séquences entre celle de la polyédrine du Virus de la Polyédrose Cytoplasmique de Bombyx mori (BmCPV) et celles de différents VPN.

I.2 Cycle de réplication viral: La littérature fait état, pour la réplication du VPNAc, de deux modèles principaux dont l'un triphasique (Granados et Federici, 1986) et l'autre biphasique (Luckow et Summers, 1988).

I.2.1 In vivo: Le cycle se déroule ainsi: l'hôte à l'état larvaire ingurgite les polyèdres imprégnant une source alimentaire. Ces polyèdres sont dissous dans le tube digestif au contact des sucs alcalins (Whitt et Manning, 1987) accompagnés de l'activité protéolytique d'une enzyme liée à la polyédrine (Maskel et DiCapua, 1988), la protéase alcaline, codée par l'ADN viral (McCarthy et DiCapua, 1979). La solubilisation de la matrice protéique libère les virions. Ces derniers pénètrent les cellules de l'épithélium gastrique interne par fusion à la membrane plasmique (Volkman et al., 1986) et sont décapsidés lors de leur pénétration dans le noyau au travers des pores de la membrane nucléaire. La période de pénétration du VPNLd lors de l'infection de larves de Lymantria dispar est évaluée à 120 minutes (Granados et Federici, 1986).

L'étape suivante est représentée par le stade réplcatif du virus (transcription-traduction) et l'apparition d'une région nucléaire dense aux électrons, similaire à un réseau de chromatine, que l'on nomme stroma virogène et qui est associé au site d'assemblage de la nucléocapside (Granados et Federici, 1986). Le phénomène de réplcation chez les baculovirus impliquerait l'induction d'une ADN polymérase-ADN dépendante de type gamma produite par le virus même (Flore et al., 1987). La nature de la régulation temporelle du gène précoce de l'ADN polymérase des baculovirus impliquerait une régulation complexe en partie liée à la réplcation de l'ADN viral ou à l'activité même de son ADN polymérase (Tomalski et al., 1988).

Les nouveaux virions encapsidés acquièrent une enveloppe par synthèse de novo et une portion de ces derniers est incluse dans un polyèdre (Stoltz et al., 1973). D'autres particules virales émergent du noyau par bourgeonnement de la membrane nucléaire et acquièrent une enveloppe protéique par bourgeonnement à travers la membrane plasmique des cellules basales de l'épithélium externe du tube digestif (Granados, 1980; Granados et Lawler, 1981; Miller, 1981). Quelquefois, des virions sont observés à l'intérieur de vacuoles, ce qui démontre la possibilité de viropexie lors du phénomène d'infection secondaire (Kelly, 1982). Le virus ainsi libéré dans l'hémocoèle de l'insecte hôte sera responsable de l'infection

secondaire. L'infection virale provoque une très forte élévation de l'activité glycolytique et du processus de dégradation et de restructuration des tissus (Laliberté, 1978). De plus, certains travaux ont suggéré l'intensification de la peroxydation des lipides membranaires de cellules infectées permettant la perméabilisation des membranes à l'envahisseur (Shternshis, 1987). Les tissus infectés sont lysés et la cuticule fragilisée de l'insecte se brise par le poids des liquides, permettant la dissémination du virus inclus dans l'environnement.

1.2.2 In vitro: La cinétique répllicative du VPN en culture de cellules est similaire à celle décrite pour les larves. A l'origine l'infection est causée par la présence de particules virales libres non-incluses. Les polyèdres insolubles à pH neutre ne sont pas infectieux pour les cellules en culture maintenues à des pH de 6,5-7,0 (Vago et Bergoin, 1963).

Parmi les facteurs affectant la répllication du VPN in vitro, on note: la température (Kelly, 1981; Knudson et al., 1974), le pH (Dougherty et al., 1981), la composition du milieu de culture (Dougherty et al., 1981; Goodwin et Adams, 1980), le type de cellules (Lynn et Hink, 1980), la densité de cellules (Knudson et Tinsley, 1974) et le taux de division cellulaire (Volkman et Summers, 1975).

Il a été observé que la pénétration des baculovirus à l'intérieur de cellules de L. dispar et de I. ni est effectuée par l'attachement de l'enveloppe à des sites récepteurs membranaires des cellules et que l'entrée se fait par viropexie (Miltenberger, 1980). L'apparition de structures fibrillaires associées au stroma virogène et aux nucléocapsides dans le noyau des cellules infectées a aussi été observé (Gao Shang-Yin, 1981). Il est postulé que ces structures seraient impliquées dans le procédé d'enveloppement du virus.

Plusieurs auteurs ont observé une augmentation de l'activité de l'ADN polymérase, de la thymidine kinase, de la désoxyribonucléase et de la protéine kinase dans les cellules infectées par des baculovirus (Kelly, 1981; Miller et al., 1981; Wang et Kelly, 1983; Wang et al., 1983; Moore et al., 1987).

Certaines aberrations de l'ADN des baculovirus sont citées dans la littérature comme étant dues à l'insertion de séquences d'ADN d'origine cellulaire à l'intérieur du génome viral lors de la répllication en culture de cellules (Miller et Miller, 1982; Fraser et al., 1983; Carstens, 1987). Cela provoquerait un changement phénotypique exprimé lors de la formation des corps d'inclusion suite à des passages continus en culture (Mackinnon et al., 1974; Potter et al., 1976; Fraser et Hink, 1982).

La décroissance du nombre de polyèdres produits par noyau de cellule infectée serait associée, selon plusieurs auteurs, à ce type d'altération (Croizier et Quiot, 1981; Miller et Miller, 1982; Fraser et al., 1983). Fraser et Hink (1982) rapportent à ce sujet un mutant FP (few polyhedra) du VPN de Galleria melonella (VPNGm) déficient lors de la synthèse des protéines de la nucléocapside. Ces mêmes auteurs suggèrent que l'étape d'encapsidation du virus est prérequis pour l'inclusion. Wood (1980) quant à lui, a isolé un mutant déficient du VPNAc incapable de synthétiser efficacement la polyédrine. Cependant, quelques mutants FP présentent l'avantage de produire plus de virions libres que l'espèce sauvage (Kumar et Miller, 1987). Récemment, il a été démontré que le gène codant pour une protéine de 25 kDa chez le VPNAc est absent chez le mutant FP (Beames et Summers, 1989).

Selon le spectre d'hôte du virus et de l'isolat utilisé, les lignées cellulaires seront considérées permissives à l'infection, semi-permissives (démontrant des signes d'infection sans apparition de polyèdres, dG à un cycle de réplication virale abortive) et non-permissives en absence de quelque effet cytopathique ou de production des protéines majeures du VPN (revue : Granados, 1980).

I.3 Protéines structurales des VPN : Le profil électrophorétique des protéines de différents baculovirus suggère une composition complexe mais unique pour chacun d'eux (Summers et Smith, 1978) variant de 35 à 100 peptides différents, dont 95 répertoriés chez le VPNLd (Singh et al., 1983). Selon Vlak et Rohrmann (1985), plusieurs de ces peptides seraient des produits de la décomposition causée par la protéase alcaline. Maskel et DiCapua (1988) ont d'ailleurs observé la capacité de la protéase du VPNLd de briser les liens maintenant la p-nitroaniline à la phénylalanine. Aussi, cette multiplicité pourrait être due au traitement différentiel d'une même protéine (Pearson et al., 1988).

Il a été démontré la présence de 29 protéines structurales différentes chez le VPNLd isolé en absence d'activité de la protéase alcaline (Stiles B. et al., 1983; McClintock et al., 1986). Ces polypeptides sont synthétisés plus lentement et sur une période prolongée par rapport à ceux du VPNAc (McClintock et al., 1983, 1986). La masse moléculaire approximative de ces peptides varie de 16,6 à 133,0 kDa dont un prédominant de 30,5 kDa correspondant à la polyédrine. Dix-huit d'entre eux sont rapportés comme étant glycosylés et/ou phosphorylés (McClintock, 1986). Chez les baculovirus, approximativement 50% des polypeptides sont associés à la nucléocapside et l'autre moitié à l'enveloppe (Tinsley, 1985).

Des polypeptides structuraux d'intérêt chez les VPN, nous en retrouvons un de 25 kDa caractérisant le type sauvage du VPNAc cultivé sur des cellules de Spodoptera frugiperda absent chez le mutant FP du même virus (Beames et Summers, 1989). La p26, dont la partie codante est localisée en amont du gène exprimant la p10 (décrit à la section I.3.1.2) et en aval de l'une des *rrh*, pourrait être impliquée dans le phénomène de stimulation de l'expression des gènes précoces (Bicknell et al., 1987).

La phosphoprotéine p34 ainsi que la p32 sont des protéines uniques, différentes de la protéine majeure du corps d'inclusion (Polyédrique), associées par des liaisons thiol à la membrane d'hydrates de carbone entourant le polyèdre (Whitt et Manning, 1988). En relation avec ces dernières, une lipoprotéine de 93-126 kDa présente dans la matrice (granule) du VG de Pseudaletia unipuncta contiendrait un facteur synergique (SF) responsable de l'attachement spécifique du virus aux récepteurs cellulaires (Nakagaki et al., 1987). Dans le même ordre d'idée, Volkman et Goldsmith (1985) repris par Volkman (1986), suggèrent qu'une phosphoglycoprotéine de 65 kDa similaire, par ses propriétés physico-chimiques, aux peplomères appartenant à d'autres virus jouerait un rôle prépondérant dans les mécanismes d'infection i.e., dans l'adsorption et/ou pénétration du VPNAc.

Pearson et al. (1988) ont dernièrement observé la réaction croisée d'un anticorps monoclonal dirigé contre la p39 du VPN d'Orqyia pseudotsugata à des protéines associées aux chromosomes condensés de cellules hôtes en phase mitotique. Les auteurs suggèrent qu'en plus d'être un composant majeur des formes incluses et non-incluses des baculovirus, la p39 serait impliquée dans l'organisation de la structure condensée de l'ADN cellulaire.

Thiem et Miller (1989) ont observé un polypeptide de PM identique chez le VPNAc constituant la protéine majeure de la capside virale qu'ils ont nommé vp39 pour "virus structural protein 39". Enfin, Whitford et collaborateurs (1989) ont récemment identifié une glycoprotéine abondante en surface de l'enveloppe du VPNAc, la gp67, pour laquelle on suppose l'ancrage à l'aide de terminaisons C acétylés.

I.3.1 Polyédrine et protéine p10: Dans la perspective d'emploi de portions génomiques pour la fabrication de vecteurs d'expression efficaces de gènes étrangers, deux gènes fortement exprimés font l'objet d'intenses recherches: soit les gènes codant pour la polyédrine et pour une protéine de 10 kDa, nommée p10. L'intérêt de ces gènes réside surtout dans la puissance de leurs promoteurs respectifs .

I.3.1.1 Polyédrique: La polyédrique est une protéine majeure codée par le virus même (Van Der Beek et al., 1980; Rohrmann, 1986). Ce polypeptide structural des corps d'inclusion est exprimé tardivement lors du cycle d'infection par un gène unique ininterrompu (Rohrmann, 1986) non-essentiel à la réplication virale (Smith, 1983) et d'une taille de 735 pb chez le VPNLd (Smith et al., 1988). Il a été rapporté qu'une séquence conservée située à 8 pb en aval du signal de transcription était essentielle à l'expression de ce gène (Rankin et al., 1988).

D'après les travaux de Possee et Howard (1987), le promoteur du gène codant pour la polyédrique serait logé dans un fragment d'une longueur maximale de 69 pb s'étendant de 20 pb en amont jusqu'à 49 pb en aval du site CAP de l'ARN. Malgré l'importance de la région promotrice, peu d'informations sont disponibles sur les facteurs impliqués dans le taux de transcription élevé observé pour ce gène (Howard et al., 1986). On sait cependant que le promoteur puissant du gène de la polyédrique, tout comme celui de la p10, est riche en nucléotides A-T, en ce point conforme aux autres promoteurs eucaryotes (Hooft Van Iddekinge et al., 1983; Kuzio et al., 1984; Lübbert et al., 1981). Il semble de plus que le taux d'expression des gènes substituant la polyédrique dans le vecteur d'expression est fonction de cette région (Matsuura et al., 1987).

Concernant l'intégrité structurale de la polyédrine, Vlak et Rohrmann (1985) postulent que la cristallisation de la protéine dépend de la formation de liens entre les résidus acides (Asp et Glu) et basiques (Arg et Lys) représentant chacun 15% des acides aminés constituant la polyédrine. Egawa et Summers (1972) et Whitt et Manning (1987, 1988) proposent respectivement l'implication d'interactions hydrophobes, électrostatiques et ioniques (cations bivalents) dans le procédé d'organisation de la matrice.

I.3.1.2 Protéine p10: En plus de la polyédrine, les VPN ont la capacité d'exprimer fortement une protéine de 10 kDa nommée p10 (Rohrmann, 1986). Cette protéine non structurale aurait une fonction liée à l'apparition de structures fibrillaires viroinduites dans les cellules virosées (Croizier et al., 1987) et pourrait être impliquée dans l'élaboration des structures du cytosquelette des cellules hôtes (Quant-Russell et al., 1987). Le gène codant pour cette protéine est localisé à l'intérieur du fragment EcoRI P de l'ADN du VPNAc (Vlak et al., 1988; Kuzio et al., 1984). La séquence du gène codant pour p10 et des régions adjacentes (Kuzio et al. 1984; Leisy et al., 1986; Aifu Liu et al., 1986) démontre une intégrité des régions riches en nucléotides A-T et une séquence consensus retrouvée aussi sur le gène de la polyédrine (Weyer et Possee, 1988).

Il apparait enfin, que le promoteur du gène codant pour p10 peut être inactivé par la méthylation spécifique du site 5'-mCCGG-3' (Doerfler, 1986).

Gonnet et Devauchelle (1987) ont démontré par leurs travaux que le promoteur du gène codant pour la protéine p10 peut être utilisé, comme le gène de la polyédrine, pour permettre l'expression d'ADN étranger. Chez le VPNLd, aucune protéine de PM similaire n'a été observée (McClintock et al., 1986b).

I.4 Modifications post-traductionnelles: Les modifications des protéines synthétisées par les baculovirus en culture de cellules d'insectes sont très similaires à celles observées sur cellules de mammifères et sur cellules végétales, avec cependant quelques différences au niveau de la glycosylation (Miller 1988, Bustos et al. 1988). Selon Furlong et al. (1988), l'absence d'acide sialique et les quantités négligeables de galactosyltransférase et de sialyltransférase dans les cellules d'insectes seraient en partie responsables de ces différences. Chez les baculovirus en cellules d'insectes, les modifications post-traductionnelles suivantes ont été observées: (1) la protéolyse, (2) la glycosylation, (3) la phosphorylation, (4) la formation de complexes oligomériques (Miller, 1988), (5) la myristylation et (6) la palmitoylation (Devauchelle, 1988).

I.5 Utilité et utilisations potentielles des baculovirus:

Traditionnellement, les baculovirus sont considérés comme des agents très utiles pour le contrôle des pestes agricoles et sylvicoles (Shieh et Bohmfalk, 1980; Alam et al., 1987; Payne, 1987). En principe, 30% des insectes ravageurs peuvent être contrôlés à l'aide des baculovirus (Hüber, 1988; Tramper et Vlak 1987). Aussi, il a été évalué qu'en théorie 80% des insecticides couramment utilisés en agriculture pourraient être remplacés par l'emploi des baculovirus (Tramper et Vlak, 1987). Dans la perspective de commercialisation du baculovirus, il a été démontré toute l'importance de maîtriser les méthodes de production du virus afin d'améliorer et de stabiliser l'aspect quantitatif et qualitatif du produit et permettre l'amenuisement des coûts de production (Groner, 1987).

L'utilisation des baculovirus comme vecteurs d'expression de gènes étrangers est l'un des attraits du virus les plus documentés. Depuis la mise sous brevet du vecteur d'expression (Summers, 1984) et de la méthode de production de polypeptides exogènes à l'aide de ce vecteur (Miller, 1985), nombre de gènes ont été exprimés par un baculovirus recombinant en culture de cellules d'insectes (Luckow et Summers, 1988).

Parmi les gènes insérés en aval du promoteur du gène de la polyédrine et exprimés par le virus recombinant, notons; les gènes codant pour l'interferon β , l'interferon α (Smith et al., 1983; Maeda et al., 1985), la β -galactosidase (Pennock et al., 1984), la protéine *c-myc* humaine (Miyamoto et al., 1985), l'interleukine 2 humaine (Smith et al., 1985), l'hémagglutinine et le complexe polymérase du virus de l'influenza (Kuroda et al., 1986; Possee, 1986), la nucléoprotéine de l'arena-virus causant la chorioméningite lymphocytaire (Matsuura et al., 1986, 1987), les antigènes de capside d'un rotavirus (Doerfler, 1986), la TPA humaine (Tissue Plasminogen Activator) (Furlong et al., 1988), la phaseoline du cotyledon de *Phaseolus vulgaris* (Bustos et al., 1988), différentes protéines du HIV (Luckow et Summers, 1988), la protéine de capside VP1 du HAV (Harmon et al., 1988) et de l'enveloppe du HBV (Price et al., 1988), la GRP humaine (Gastrin-Releasing Peptide) (Lebacqz-Verheyden et al., 1988) et la *v-sis*/PDGF-B (Platelet-Derived Growth Factor-B chain) (Giese et al., 1989).

Les raisons majeures d'une telle utilisation du vecteur "baculo" réfèrent à la quantité des protéines produites, pouvant atteindre plusieurs milligrammes par litre de culture cellulaire, et la qualité satisfaisante des protéines modifiées (Devauchelle, 1988) par rapport aux protéines natives.

Les baculovirus sont également utiles à la recherche fondamentale sur les mécanismes moléculaires des cellules d'insectes (Doerfler, 1986) et présentent un potentiel d'utilisation comme moyen d'évaluer la stabilité dans l'environnement de gènes manipulés génétiquement (Newmark, 1986; Doerfler, 1986).

I.6 L'hôte - *Lymantria dispar* (Lepidoptera : Lymantriidae):

La souche virale visée par cette étude infecte naturellement certaines populations d'un lépidoptère polyphage actif au sud du Québec depuis 1924 (Agriculture Canada, 1985). La spongieuse, *Lymantria dispar* anciennement *Porthetria dispar* L., est d'origine européenne. Elle a été introduite à Midford dans le Massachusetts en 1869 par le naturaliste français Léopold Trouvelot (Jobin, 1979). L'insecte ravageur devait accidentellement s'échapper en 1870 pour atteindre une aire de distribution de plus de 8 000 km² en 1985 principalement en périphérie de Montréal (Martineau, 1985). Au Québec la spongieuse, bien adaptée à nos conditions climatiques, poursuit lentement l'extension de son aire de distribution, de l'ouest depuis la frontière ontarienne, jusqu'à La Pérade au nord-est (M.E.R. Québec, 1987).

Ignoffo et al. (1983) rapportent des différences morphologiques et génétiques entre les lignées européenne et asiatique de l'insecte. Des différences similaires ont été acquises par la lignée occidentale originant de France, depuis son introduction et sa dispersion en Amérique du Nord, suite à des croisements interspécifiques avec d'autres Lymantriidae tels: *Euproctis chrysorrhoea* (brown tail moth) et *Leucoma* (*Stilpnotia*) *salicis* (satin moth). Ces différences résulteraient en une perte de susceptibilité de l'insecte envers certains entomopathogènes.

I.7 Conditions d'épizootie au VPN: Principalement, deux hypothèses sont évoquées pour tenter d'expliquer le développement d'épizooties virales au VPN: (1) la présence d'un virus latent activé par un stress externe et (2) la persistance d'un virus dans une population larvaire dont l'impact serait fonction de la densité de l'hôte (Hébert, 1983). La première hypothèse cependant demeure encore très controversée.

Il a toutefois été vérifié que les paramètres structuraux, tels la hauteur et l'aire d'expansion du feuillage par rapport au réservoir de virus, ont un effet sur la susceptibilité de l'hôte envers le VPN (Richter et al., 1987). Ainsi, la mobilité des larves et le choix des sources alimentaires affecterait la fréquence de l'épizootie au VPN (Rossiter, 1987). En relation avec ces données, Lance et al. (1987) rapportent que la mobilité des larves de spongieuse et la variété de leur source d'alimentation augmentent avec la densité de la population. Ces derniers ont aussi observé qu'une densité de population larvaire élevée entraînait une augmentation du taux d'ingestion. Cette observation démontre l'importance de la transmission horizontale à l'intérieur d'une population virosée. Conséquence de la complexité des épizooties causées par le VPN, Entwistle et al. (1988) proposent de cerner les déplacements et la transmission spatio-temporelle à l'aide d'un virus génétiquement marqué.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

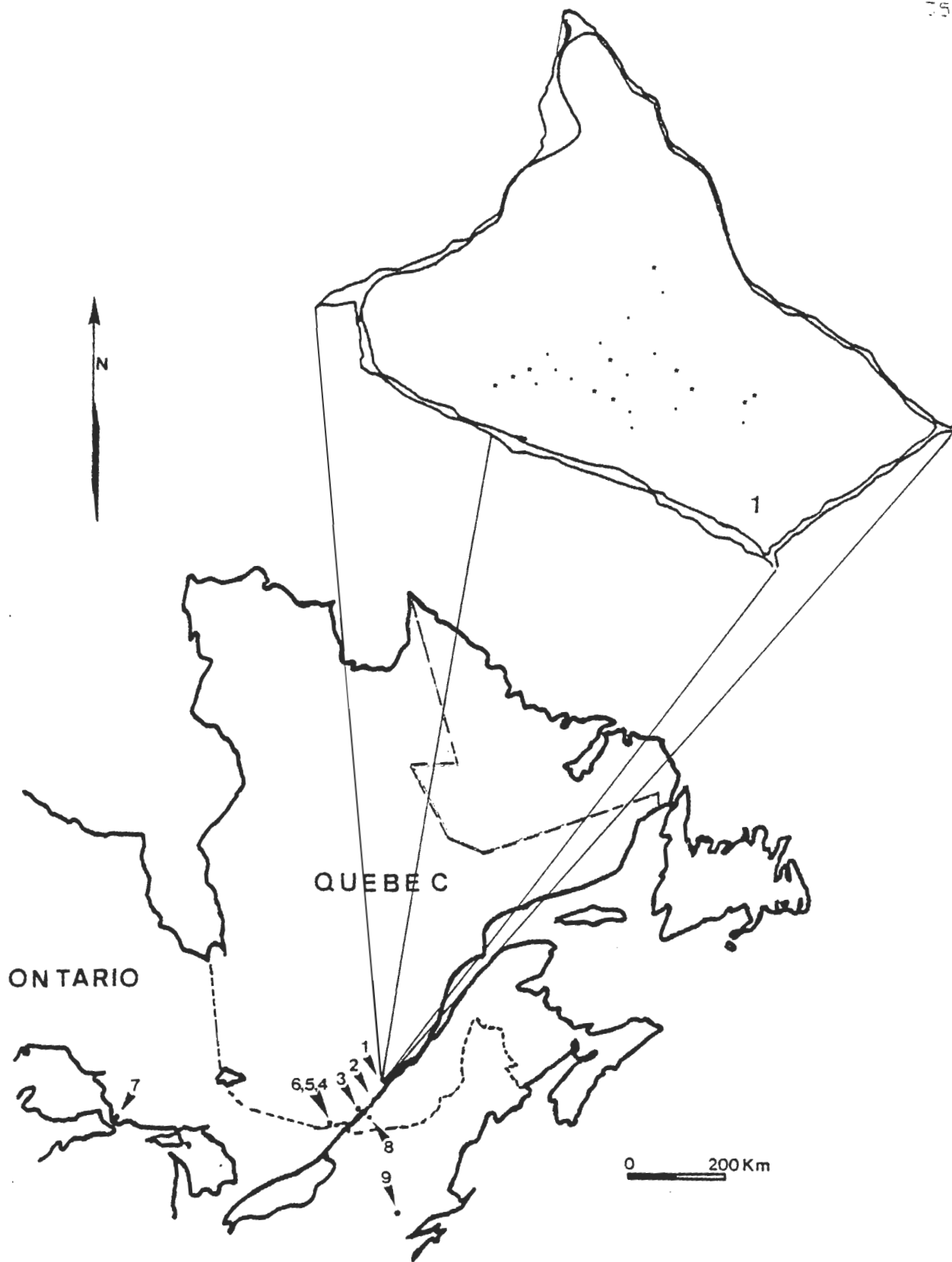
II.1 Production de l'inoculum viral: La production de l'isolat du virus de la polyédrose nucléaire provenant de larves virosées de la région de Trois-Rivières (VPNLd.TR) est effectuée par l'inoculation de larves saines de Lymantria dispar pour lesquelles l'observation de signes pathologiques et la détection du virus par microscopie optique des échantillons larvaires se sont avérées négatives.

II.1.1 échantillonnage et traitement des larves :

Une première partie des échantillons nécessaires pour les étapes subséquentes est constituée de larves, de cocons et de masses d'oeufs prélevés des sites d'échantillonnage de Cap-de-la-Madeleine, Trois-Rivières (46°22'30''N : 72°36'40''O), de Repentigny, l'Assomption (45°43'06''N : 73°29'12''O), et des régions du Québec ayant été répertoriées par le M.E.R. (Ministère de l'énergie et ressources, Québec, 1986, 1987) comme foyer endémique depuis 1985 (fig.1).

FIGURE 2 : Sites d'échantillonnage des larves, cocons et masses d'oeufs de Lymantria dispar.

- 1) Cap de la Madeleine (Trois-Rivières)
 - * Peupliers
 - . Chênes rouges
- 2) Berthier
- 3) Repentigny
- 4) Montebello
- 5) Papineauville
- 6) Gatineau
- 7) Sault Ste-Marie
- 8) Mont St-Hilaire
- 9) États-Unis (New York)



Les larves sont échantillonnées dans les différentes régions sur une base hebdomadaire de la mi-mai à la mi-juin, correspondant à la période d'émergence et de maturation des larves de l'insecte. Les prélèvements sont effectués sous des abris artificiels de papier noir fixés à 1,5 m du sol aux troncs des essences préférées de l'insecte, tels le peuplier, le bouleau et l'érable, selon la méthode préconisée par Odell et Godwin (1979) et utilisée par Hébert (1983).

Jusqu'au troisième stade, les larves sont entretenues en boîte de Petri de 35 mm (IAF Production Inc., Laval, Québec) par groupe de dix ou en cage (Frigoseal) par groupe de cent en conditions de température, d'humidité et photopériode respectives de 25°C, 60% et 16:8 (Hébert et al., soumis pour publ.). A tous les jours des feuilles fraîches de peupliers ou des cubes de diète (Vasiljevic et Injac, 1971), d'un volume de 1 cm³ pour dix larves, leur sont fournis.

A partir du troisième stade, les larves sont isolées en pilulier de verre et replacées dans les conditions énumérées ci-haut pour une période d'observation de 24 heures. De façon ponctuelle, quelques larves sont broyées individuellement à l'intérieur de microtubes Eppendorf de 1,5 ml (Elkay Products Inc., Shrewsbury, USA) contenant 500 µl d'eau distillée et déionisée, à l'aide d'un piston de plastique stérile. Un volume de 10 µl de chaque broyat est prélevé et déposé

sur une lame de verre propre. Les frottis sont ensuite séchés à l'air libre puis colorés par immersion sur plaque chauffante à 40°C pendant 5 min. à l'aide de Buffalo black (Sikorowski et al., 1971; Elleman et al., 1980) préparé selon la procédure décrite à l'annexe 5.

Après un lavage rapide à l'eau distillée, les lames sont séchées à l'air et observées à immersion en microscopie photonique (Laborlux 12, Leitz, Wetzlar, Allemagne) afin de détecter la présence caractéristique de polyèdres. Les larves saines sont rapidement inoculées avec le VPNLd.TR selon les méthodes décrites à la section II.1.3. Des coupes ultrafines sont effectuées, selon la méthode décrite à la section II.3, sur les larves présentant des signes pathologiques, tels le noircissement de la cuticule, la diminution d'appétit ou la paralysie.

II.1.1.1 échantillonnage et traitement des masses

d'oeufs: Les masses d'oeufs sont échantillonnées à la mi-août, correspondant à la fin de la période de ponte de la *spongieuse*. Ces masses d'oeufs, ancrées à l'écorce des arbres, sont prélevées à l'aide d'un couteau à lame fine et déposées dans des contenants propres pré-identifiés par les dates et le nom des régions d'échantillonnage. Elles sont ensuite conservées à 4°C pour une diapause obligatoire de cinq mois (Vasiljevic et Injac, 1971).

Quelques-unes sont conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation lors de l'évaluation de la dispersion géographique, de la latence et de la persistance du VPnLd (sections II.7 et II.8).

Suivant la période de diapause, l'excédent de poils abdominaux de la femelle couvrant les masses d'oeufs est soustrait à l'aide d'un petit pinceau humidifié d'eau distillée stérile. Cette étape est effectuée sous la loupe binoculaire à un grossissement de 10X .

La stérilisation de surface des oeufs est effectuée par immersion d'une durée maximum de 3 min. dans une solution d'hypochlorite de sodium 1% (Léonard et Doane, 1966). Cette étape est suivie de trois lavages successifs à l'eau distillée stérile. Les oeufs sont ensuite déposés en boîtes de Petri par groupe de cent et sont conservés à l'incubateur de type Conviron (Controlled Environments Ltd., Manitoba, Canada) dans des conditions se rapprochant le plus fidèlement possible aux conditions naturelles de température (24°C), d'humidité (30-50%) et de photopériode (14:10) jusqu'à éclosion, selon les paramètres établis par Hébert (1983). Les larves écloses sont soumises à l'infection expérimentale.

II.1.2 Élevage et production alternative: Afin de produire la plus grande quantité possible de virus, nous avons prévu de constituer un élevage temporaire de larves à partir de masses d'oeufs qui nous ont généreusement été fournies par le Dr. David Perry du Centre de recherche en Foresterie des Laurentides (C.F.L.) de Québec. Les masses d'oeufs, débarrassées des poils abdominaux et pré-stérilisées à la formaldéhyde (Odell et al., 1985), sont déposées à l'incubateur de type Conviron (Controlled Environments Ltd, Manitoba, Canada), jusqu'à éclosion, dans les conditions déjà énumérées à la section II.1.1. Après éclosion, les larves sont transférées sur diète artificielle de Bell (Odell et al., 1985) fournie par le C.F.L.. Les larves de premier et deuxième stade, manipulées à l'aide d'un petit pinceau, sont transférées une fois la semaine sur une diète fraîchement préparée. Enfin, les larves de troisième stade sont traitées dans les conditions sus-décrites et sont rapidement inoculées à l'aide du VPNLd.TR.

II.1.3 Infection expérimentale des larves: Afin d'obtenir une infection optimum des larves à l'aide de quantités restreintes d'inoculum viral, quatre facteurs doivent être pris en considération :

- (1) la concentration minimale de l'inoculum viral utilisé pour l'obtention d'un rendement d'infection optimum.

- (2) les voies d'infection (*per os* ou injection).
- (3) les barrières naturelles d'infection telles les sucs digestifs insuffisamment alcalins et la membrane péri-trophique (Granados, 1980).
- (4) les facteurs endogènes de l'hôte ayant une influence sur la réplication virale.

II.1.3.1 Préparation de l'inoculum viral: Un volume de 5 ml d'une solution contenant 10^8 polyèdres/ml de VPNLd purifiés à partir de larves virosées, provenant de la région de Trois-Rivières, constitue notre stock de virus initial.

Un premier volume de 1 ml de cette solution est prélevé stérilement sous la hotte à flux laminaire (Baker Company Inc., Maine, USA). Le titre de polyèdres est ensuite ajusté à $7,5 \times 10^6$ /ml par l'addition de 12,3 ml d'une solution de chitinase 1% (Shapiro et al., 1987) et d'acide borique 1% à pH 5,0 (Shapiro et Bell, 1982) pour un volume final de 13,3 ml. La préparation est conservée à -20°C par aliquotes de 1 ml jusqu'à l'utilisation lors de l'infection *per os* des larves.

Un second volume de 1 ml est prélevé stérilement et centrifugé dans un microtube de 1,5 ml sur centrifugeuse de table Eppendorf modèle 5415 (Brinkmann, Westbury, USA) à 15 000 g pendant 10 minutes. Le culot de polyèdres débarrassé

du surnageant est solubilisé pendant 30 min. à 37°C dans 100 µl de tampon DAS modifié (Dilute Alkaline Saline: Whitt et Manning, 1987) constitué de NaHCO_3 - Na_2CO_3 100 mM, NaCl 50 mM, et Na_4 -EDTA 2 mM (Anachemia, Montréal, Québec) à pH 10,5. L'alcalinité de la préparation de virions est ensuite neutralisée par l'ajout de cinq volumes (500 µl) de tampon Tris-HCl 100 mM à pH 7,0 (Whitt et Manning, 1987). La suspension est enfin diluée dans un volume final de 10 ml, répartie en aliquotes et conservée à -20°C jusqu'à son utilisation lors de l'infection par microinjection (section II.1.3.3) .

II.1.3.2 Infection par voie orale (*per os*): Sur la base du taux de croissance tissulaire des larves, et sachant que le taux de division cellulaire a une influence sur la réplication virale, tous les individus de l'élevage et de l'échantillon de la région de Trois-Rivières ayant atteint le troisième stade larvaire ou ayant un poids moyen de 500 mg sont infectés par voie orale selon le procédé décrit par Hedlund et Yendol (1974).

Les larves sont déposées dans des boîtes de Petri par groupes de cinq en présence d'un cube de diète de 0,5 cm³ imprégné à l'aide de 10 µl de la suspension de polyèdres préparée précédemment, pour une concentration finale de $1,5 \times 10^5$ polyèdres/cm³ (Hedlund et Yendol, 1974; Shapiro et Robertson, 1986).

Tout au long de la période d'observation, les excréments sont récupérés et conservés à -20°C .




Suite à l'apparition des premiers symptômes pathologiques, l'hémolymphe de cinquante larves est prélevée par ponction intrahemocoelique individuelle à l'aide d'une seringue de 1 cm^3 et d'une aiguille fine de type 30G½ (Becton-Dickinson & Co., Rutherford, USA). Les fractions d'hémolymphe sont recueillies dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Le nombre de polyèdres/ml est déterminé en microscopie photographique (Leitz, Wetzlar, Allemagne) à un grossissement de 400x, à l'aide d'un hématimètre Neubauer (Reichert Scientific Instruments, Buffalo, USA). La suspension est finalement ajustée à 10^6 polyèdres/ml dans l'eau distillée et déionisée stérile et conservée à -70°C .

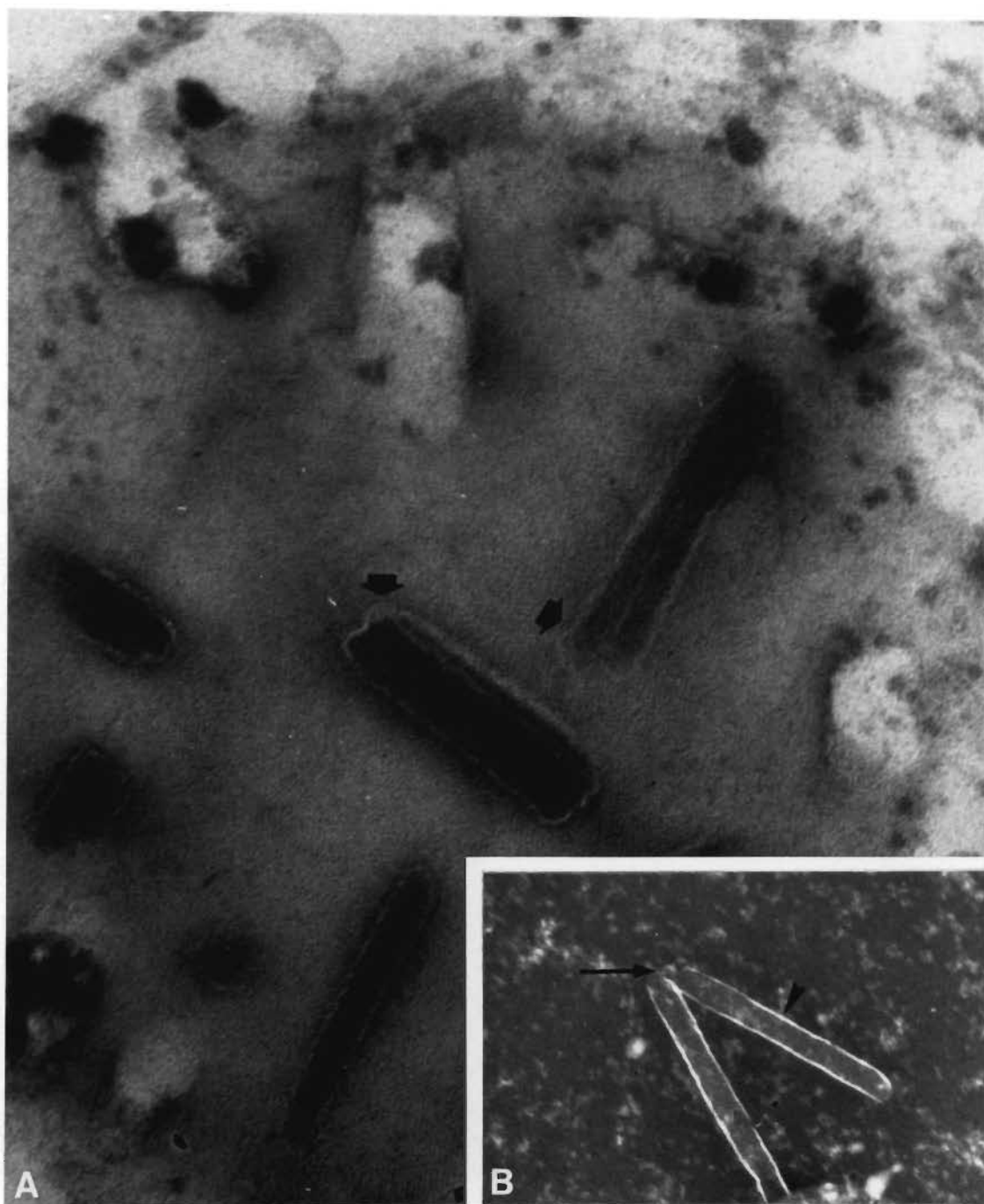
II.1.3.3 Infection par microinjection: Les larves de quatrième et cinquième stade ou ayant un poids moyen supérieur à 500 mg sont infectées par injection intrahemocoelique de 100 μl d'une suspension de virions préparée telle qu'indiquée à la section II.1.3.1, à l'aide d'une seringue à tuberculine de 1 cm^3 et d'une aiguille fine de type 30G½. Elles sont ensuite retournées en conditions d'élevage, isolées des larves saines, jusqu'à l'apparition des symptômes pathologiques (e.g. 4 jours), et sont congelées à -20°C jusqu'à utilisation.

II.1.3.4 Récolte du virus inclus et non-inclus: Deux lots de 25 larves infectées expérimentalement *per os* sont homogénéisés dans 25 ml de tampon NaHCO_3 - NaCl 100 mM à pH 10,5, pendant 2 min. (Zethner et al., 1979; Lynn et Hink, 1980) dans une chambre à homogénéisation Sorvall de type Omni-Mixer 17105 (Dupont Instruments, Newtown, USA). L'homogénat est filtré sur trois épaisseurs de coton fromage stérile puis centrifugé 1 min. à basse vitesse (1000 g) dans des tubes Corex de 30 ml sur centrifugeuse Sorvall RC5C (Dupont Instruments, Newtown, USA).

Débarrassées des débris larvaires, des fractions de 2 ml de surnageant sont déposées sur gradients linéaires de sucrose 25-60% dans des tubes de polycarbonate de 40 ml (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA) et centrifugées à 99 000 g pendant 180 min. sur ultracentrifugeuse Beckman modèle LC-50, utilisant un rotor SW 27 (Harrap et al., 1977). Les virions situés approximativement au tiers de la surface du gradient sont récoltés par ponction verticale à l'aide d'une seringue de 10cc, dilués dans cinq volumes d'eau distillée stérile et sédimentés à 80 000 g pendant 90 min.. Cette zone contient les virions libres (Fig.3b). Les polyèdres non-solubilisés sont récoltés au culot à l'aide d'une spatule stérile et conservés à -20°C dans un volume égal de tampon Tris-HCl 100 mM, Na_4 -EDTA 25 mM, pH 7,0 pour une étape de solubilisation subséquente (Fig.3a).

FIGURE 3 : Microphotographies d'un corps d'inclusion intact du VPNLd.TR et de particules virales libres purifiées sur gradient linéaire de sucrose 25-60 % après solubilisation.

- A  Virions polyploïdes du VPNLd (115 776 X)
- B  Particules virales bacilliformes (137 000 X)
-  Extrémité en forme de capuchon caractéristique



Les culots de virions purifiés sont enfin resuspendus par aliquotes de 1 ml d'eau distillée et déionisée stérile et conservés en microtubes à -20°C jusqu'à l'étape d'extraction et de purification de l'ADN viral et d'infection in vitro.

II.2 Cultures cellulaires: Les lignées établies de cellules ovariennes des lépidoptères : Lymantria dispar (Ld-135 : Quiot 1976) et Euxoa scandens (IAFEs-1 : Belloncik et al., 1982), ainsi que les cellules fibroblastiques de Choristoneura fumiferana (Cf-124 Ti : Bilimoria et Sohi, 1977), sont entretenues par sous-cultures régulières aux cinq jours dans du milieu de Grace stérile à pH 6,2 (Grace, 1962; Annexe 2) supplémenté de 10% de sérum foetal de veau (SVF) (Watanabe, 1987) et de 0,2% de Gentamycine. Pour les cellules Cf, le milieu est additionné de 0,25% de tryptose (Gibco Laboratories, Madison, USA) stérilisé par filtration sur membrane de 0,2 µm Uniflo (Schleicher & Shuell, Keene, USA). La lignée cellulaire de Bombyx mori (Bm-36 : Hink, 1979) est quant à elle entretenue dans du milieu TC-10 à pH 6,2 (Gardiner et Stockdales, 1975) en présence de 10% SVF et 0,2% Gentamycine (Annexe 3).

II.2.1 évaluation des taux de viabilité/mortalité des

cellules: A tous les jours, sur une période de 15 jours avant les essais d'infection in vitro, le dénombrement des cellules viables et mortes est effectué pour chacune des lignées selon l'épreuve d'exclusion du colorant (Payment et Pavilanis, 1980).

Un volume de 0,4 ml de suspension homogène de cellules est prélevé et mélangé par aspiration à 0,1 ml de colorant vital Trypan bleu (solution à 1%). Le mélange coloré est déposé sur hématimètre Neubauer (Reichert Scientific Inst., Buffalo, USA) et observé à un grossissement de 400x en microscopie photonique. Le comptage des cellules viables (incolores) et des cellules mortes (colorées) est effectué en parallèle à l'aide d'un pointeur manuel. Le comptage est réalisée en triplicata.

II.2.2 Infection in vitro: La première étape consiste à identifier les lignées cellulaires permissives ou semi-permissives à une infection au VPNLd. Pour ce faire, des volumes de 100 µl de suspension cellulaire de chaque lignée, dont le nombre est ajusté à 5×10^4 cellules viables/ml, sont déposés dans dix puits à fond plat de plateaux à microtitrage stériles de 96 puits (Linbro, Flow Laboratories Inc., McLean, USA). Trois plateaux, chacun comprenant une série de neuf puits pour chaque lignée cellulaire testée et un puits témoin, sont utilisés pour la mise en culture. Une fois le transfert accompli, les plateaux sont laissés sous la hotte laminaire pour une période de 15-30 min. afin de permettre aux cellules d'adhérer au fond. Suivant cette étape, les plateaux sont déposés à l'incubateur (Hotpack, Philadelphie, USA) à 28°C jusqu'à environ 1 heure avant la période de dédoublement des cellules évaluée sur la courbe de viabilité/mortalité cellulaire (Annexe 7).

Approximativement 24 heures après la mise en culture des cellules, le milieu de culture est soustrait des séries de neuf puits et substitué par 100 µl des dilutions respectives de 1:10, 1:100 et 1:1000 d'hémolymphe extraite de larves virosées et préparée comme suit: (1) hémolymphe de larves virosées (2) hémolymphe de larves virosées filtrée sur membrane Millipore 0,45 µ (Quiot, 1975)

(3) hémolymphe de larves virosées mélangée à volume égal avec un tampon Na_2CO_3 - NaHCO_3 100 mM, pH 10,5, et filtrée. Les plateaux sont fixés et agités à 30 rotations par minute sur une plaque agitatrice (TekPro, American Dade, Miami, USA) à 28°C pour une période de contact "cellules-virus" de 60 minutes. L'inoculum viral est soustrait de chacun des puits et remplacé par 200 μl de milieu de culture frais. Les plateaux sont conservés à 28°C pour des observations quotidiennes sur une période de 7 jours.

II.2.3 évaluation de la permissivité cellulaire au VPnLd:

A tous les jours, durant une semaine, les cellules infectées sont observées en microscopie photonique inversée à 320 X sur microscope Leitz modèle Labovet (Leitz, Wetzlar, Allemagne) avec et sans contraste de phase. Au cours des observations, les facteurs suivants sont relevés et comparés aux caractéristiques des cellules témoins:

- .la forme et la taille des cellules infectées comparées à celles des cellules témoins.
- .le ratio noyau/cytoplasme en termes de volume.
- .les conditions inhabituelles des cellules (granulation, vacuolisation, accumulation de débris cellulaires).
- .l'apparition de masses réfringentes (polyèdres) à l'intérieur des noyaux cellulaires.

Au septième jour, la mise en évidence des cellules démontrant la présence de polyèdres est réalisée par la coloration de Vago et Amargier (Vago et al., 1969).

Des coupes ultrafines sont effectuées, selon la méthode décrite à la section II.3, sur les cellules présentant des anomalies structurales ou pour lesquelles on a relevé des effets cytopathiques caractérisant l'infection au VPN.

II.2.3.1 Titration de l'inoculum viral: Un volume de 3 ml des virions purifiés précédemment (section II.1.3.4), ajusté à 5,5 ml, est centrifugé à 80 000 g pendant 90 min. (Harrap et al., 1977) sur ultra-centrifugeuse (Beckman L5-50) dans des tubes de polycarbonate de 6 ml (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA) utilisant un rotor SW-50.1. Le culot de virus est resuspendu dans 3 ml de milieu de Grace (Annexe 2). Des dilutions de 10^0 à 10^{-9} sont effectuées sur la suspension virale. Chacune de ces dilutions est employée pour l'infection in vitro des cellules Cf-124 pour lesquelles les effets cytopathiques sont les plus évidents.

Pour chaque dilution, une infection est réalisée en triplicata, selon la méthode décrite en II.2.2, sur une plaque à microtitrage stérile contenant 5×10^4 cellules/puits qui sont mises en culture depuis 24 heures.

A cinq jours post-infection, la $DICT_{50}$ (Dose Infectieuse sur Culture de Tissus) est évaluée selon la méthode de Reed et Muench (1938) décrite par Summers et Smith (1987).

Le nombre d'unité formant des plages/ml (PFU/ml) est quant à lui calculé à l'aide de la conversion suivante: $DICT_{50}/ml \times 0,69$ (McCarthy et al., 1980; Summers et Smith, 1987)

II.2.3.2 Variation des paramètres physiques: Afin d'induire un stress climatique (Hébert, 1983), quatre séries de chaque lignée cellulaire d'une densité de 5×10^4 cellules/ml sont conservées dans 5 ml de milieu frais dans des fioles ayant une surface de 25 cm^2 (Corning Lab. Sciences Co., New York, USA) à des températures respectives de 4° , 28° et 37°C pendant 24 heures. Les trois premières séries sont infectées à l'aide de 1 ml d'inoculum viral titrant à 2×10^4 PFU/ml selon les conditions décrites à la section II.2.2 .

Suite à la période d'adsorption, le surnageant infectieux est éliminé et le tapis cellulaire lavé à l'aide de 5 ml de milieu de culture.

Les cellules sont ensuite décollées à l'aide de 3 ml de milieu frais et transférées en tubes Leighton par aliquotes de 1 ml.

Les tubes placés sur des portoirs identifiés selon les températures pré-infection sont conservés à 28°C pour les cinq jours suivants, durant lesquels des observations sont effectuées.

Au terme de l'expérience, les lamelles de chaque tube, auxquelles les cellules infectées ont adhéré, sont prélevées puis fixées au Carnoy (Annexe 4) à 4°C, et colorées selon la méthode prescrite à la section II.2.3. La quatrième série de chaque lignée cellulaire est utilisée comme témoin non infecté.

Une seconde expérience consiste à vérifier l'effet de stimulation par un stress climatique en conservant trois autres séries de lignées cellulaires infectées au préalable dans les conditions standards (60 min d'adsorption à 28°C) et transférées en tubes Leighton à des températures de 4°, 28° et 37°C pour les cinq jours suivants. Une série témoin de chaque lignée cellulaire non-infectée est conservée aux mêmes températures. La même expérience est reprise en faisant varier les temps d'adsorption dans l'ordre suivant : 60 min., 120 min. et 5 jours. Des observations sont effectuées en microscopie photonique inversée et des colorations sont réalisées au terme de la période de cinq jours.

II.2.3.3 Variation des paramètres chimiques:

Une densité de 5×10^4 cellules/ml/puits de chaque lignée cellulaire est mise en culture sur plaque à microtitrage stérile et placée à l'incubateur à 28°C pour une période de 24 à 36 heures avant infection. La période de pré-culture des cellules avant infection dépend du temps de dédoublement de chaque lignée. Les cellules sont ensuite infectées à l'aide de l'inoculum viral titrant $2,0 \times 10^6$ PFU/ml ou transfectées avec 100 ng d'ADN viral nu (section II.4) dilué dans le milieu de culture correspondant aux besoins nutritionnels de chaque lignée (Grace ou TC-10), auquel nous avons ajouté différentes concentrations de stimulateurs chimiques de l'infection virale. Les détails et les concentrations des stimulateurs utilisés sont résumés à la figure 4. Après un temps de contact de 60 min. en agitation douce à 28°C, le surnageant est substitué par du milieu frais.

FIGURE 4 : Description schématique de la disposition des stimulateurs chimiques utilisés lors de l'infection in vitro des lignées cellulaires Ld, Es, Cf, et BmN4 sur une plaque de microtitrage de 96 puits.

Le groupe d'essai est défini par le type d'inoculum utilisé (ADN ou virion), la concentration ou la quantité de stimulateur ajouté au milieu de culture (a,b,c) et le type de stimulateur :

- Stimulateurs de l'incorporation des acides nucléiques (McIntosh, 1975; Chisholm et Symonds, 1988)
- ▤ Stimulateurs insolubles du contact virus-cellules (Dubes et al., 1964)
- ▤ Polycations (Kaplan et al., 1967; Voght, 1967; Nguyen, 1968)
- ▤ Acide aminé (Goodwin et Adams, 1980)
- Stimulateur d'échange ionique transmembranaire.

Les cellules infectées en présence de stimulateurs chimiques (groupe essai) sont comparées aux cellules non infectées et entretenues dans du milieu contenant un stimulateur (s) et aux cellules témoins non infectées(t) et infectées(t.) entretenues dans du milieu sans stimulateur (ss).

STIMULATEURS	GROUPE ESSAI					GROUPE TEMOIN					
	(mg/l)	(mM)	(%)			(s)		(ss)			

Le taux d'infection par cellule infectée ou transfectée en présence de stimulateurs est évalué et comparé à celui des cellules témoins infectées ou transfectées en absence de stimulateurs. Le nombre moyen de cellules infectées ou transfectées est évalué par comptage sur hématimètre (Hink et al., 1977) et calculé selon la formule prescrite par Sohi et al. (1981):

$$\text{Polyèdres/cellules} = (\text{Polyèdres/ml})/(\text{cellules infectées/ml})$$

II.3 Microscopie électronique: Plusieurs tissus de larves présentant des symptômes de virose au VPN sont fixés à la glutaraldéhyde et au tétroxyde d'osmium dans un tampon phosphate de sodium à 0,06 M , pH 7,2 à la température ambiante. Les coupes ultrafines sont préparées suivant les procédures employées par Charpentier et al. (1987), après inclusion à l'Araldite 502, puis colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Reynolds, 1963). Les observations sont effectuées au microscope électronique Philips modèle 300 (Philips,Eindhoven,Hollande).

D'autres coupes ultrafines sont réalisées, selon la méthode décrite par Alain (1985), sur les cellules infectées expérimentalement en conditions in vitro. Suivant le cinquième jour d'infection, des coupes sont réalisées après une double fixation des cellules. La première fixation est effectuée à l'aide de la glutaraldéhyde 2,5% dans un tampon cacodylate 0,05M à pH 7,2 pendant 120 min. à la température de la pièce. Les cellules sont ensuite décollées des contenants de culture par grattage à l'aide d'un policeman, puis portées au culot par centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes. Cette étape est suivie de trois lavages des culots solides avec un tampon cacodylate contenant 3% de saccharose. La seconde fixation est effectuée à l'aide d'une solution de tétroxyde d'osmium à 1,5% dans un tampon collidine 0,07M à pH 7,4 contenant 3% de saccharose, pendant une à deux heures à la

température ambiante. Après une déshydratation croissante dans des bains d'acétone 25-100% , les culots de cellules sont imprégnés pendant une nuit dans un mélange acétone-Vestopal W utilisé en présence de perbenzoate de butyle tertiaire 1% (p/p), servant d'initiateur, et de 1% (p/p) d'une solution 6% de naphtéate de cobalt dans du styrène, servant d'activateur. Suivant cette étape, les culots sont imprégnés dans un nouveau bain de Vestopal W pur pendant deux heures, puis divisées en blocs de 1mm^3 , et placés à 60°C pendant 40 heures afin de permettre la polymérisation du Vestopal W.

Les coupes sont enfin réalisées sur microtome Ultratome III (LKB, Stockholm-Bromma 1, Suède) et colorées à l'acétate d'uranyle 5% dans l'éthanol, puis au citrate de plomb. Les échantillons sont observés au microscope électronique modèle EM 200 (Philips, Eindhoven, Hollande).

II.4 Purification de l'ADN viral: Deux méthodes sont employées. La première consiste à libérer l'ADN des virions purifiés précédemment (section II.1.3.4) à l'aide de protéinase K. La protéinase K (BRL, Gaithersburg, USA) est ajoutée à la solution de virions purifiés à une concentration finale de 200 µg/ml ainsi que 1/10 vol. de dodécyl-sulfate de sodium à 5% (SDS), le tout est brièvement passé au vortex et incubé à 37°C pendant 60 min.. L'échantillon d'ADN est ensuite débarrassé des protéines par des extractions respectives à volume égal de phénol saturé en Tris-HCl 0,01M pH 7,4, de phénol-chloroforme 1:1 saturé en Tris-HCl, et de chloroforme-alcool isoamylique 24:1. L'ADN est finalement précipité à -70°C pendant 30 min. en présence de 1 vol. d'acétate d'ammonium 5 M. (NH₄OAc) et de 2 vol. d'éthanol froid 100% (IBI, New Haven, USA), suivi d'une centrifugation à 15 000 g pendant 30 min sur microcentrifugeuse de table Eppendorf modèle 5415. Après des lavages à l'éthanol froid 70%, l'ADN viral est resuspendu dans 100 µl d'eau distillée et déionisée stérile et dialysé dans une membrane Spectra/Por de 10 mm (Spectrum Medical Industries Inc., Los Angeles, USA) contre 200 ml de tampon Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, en agitation sur plaque magnétique à 4°C pendant 12 heures.

La seconde méthode consiste au remplacement de la protéinase K par 200 µg/ml de lysozyme (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA). L'échantillon est incubé sur glace 15 min. avant d'être incubé à 37°C en présence de SDS.

II.4.1 Profil électrophorétique comparatif de l'ADN: Des quantités de 0,5 - 1,0 µg d'ADN purifié des isolats de VPNLd provenant des états-Unis, de l'Ontario et de Trois-Rivières (Québec) sont complètement digérées à l'aide des endonucléases de restriction EcoRI, HindIII, BamHI, BglII et PstI (BRL, Gaithersburg, USA), lesquelles sont couramment utilisées pour l'analyse des sites de restriction du VPNLd (Stiles et al., 1983; McClintock et Dougherty, 1988; Smith et al., 1988). L'ADN est incubé à 37°C pendant 60 min. en présence de 2 U. d'enzyme et de 2 µl de tampon correspondant (Annexe B), pour un volume réactionnel final ne dépassant pas 20 µl. Les échantillons digérés sont déposés dans les puits d'un gel horizontal d'agarose 0,8% - TEA 1X en présence de tampon de chargement 6X (Maniatis et al., 1982). La migration électrophorétique des fragments d'ADN sur gel est réalisée sur un appareil à électrophorèse de type submergé de 2,5 l. (IBI, New Haven, USA) pendant 6 heures à 50 mA. Le gel est ensuite coloré 15 min. dans un tampon TEA 1X contenant 50 µl de bromure d'éthidium concentré.

Enfin, le profil des ADN fragmentés est observé aux U.V. (U.V. Transilluminator: Fotodyne Inc., New Berlin, USA) à 254 nm et photographié sur pellicule monochrome Polaroid type 665 (Polaroid Corporation, Cambridge, USA). Le profil des fragments d'ADN obtenu pour chaque enzyme est comparé entre les différents isolats en utilisant comme référence les marqueurs de taille appropriés, dont le marqueur 1Kb (BRL, Gaithersburg, - USA) et le marqueur du bactériophage Lambda digéré par HindIII (P-L Biochemicals, Milwaukee, USA).

II.5 Clonage moléculaire du gène codant pour la polyédrine du

VPNLd.TR: Le clonage moléculaire du gène codant pour la polyédrine de l'isolat du VPNLd de la région de Trois-Rivières (VPNLd.TR) est réalisé selon le principe d'inactivation insertionnelle d'un gène situé sur le plasmide bactérien utilisé comme vecteur de clonage, tel que décrit par Maniatis et collaborateurs (1982).

II.5.1 établissement de banques de fragments de restric-

tion de l'ADN du VPNLd: Des quantités de 500 ng d'ADN viral sont digérées séparément à l'aide des endonucléases HindIII, BglII et PstI (BRL) dans des conditions identiques à celles utilisées à la section II.4.1. Parallèlement, des quantités de 500 ng du plasmide bactérien pIBI31 (IBI, New Haven, USA) sont entièrement digérées, par réactions individuelles, à l'aide des enzymes de restriction HindIII, BamHI et PstI dans les mêmes conditions (Fig.5). Afin d'éviter la recircularisation du vecteur lors de l'étape de ligation, les plasmides ouverts sont déphosphorylés selon le protocole standard (IBI, 1987) par réaction avec 1 U. de phosphatase alcaline bactérienne (BAP). Le clonage sélectif des fragments d'ADN viraux générés par chaque enzyme sera réalisé après séparation de ces derniers par électrophorèse sur gel d'agarose 0,4% TEA, ayant une température de fusion inférieure à celle de l'agarose 0,8%, suivi d'une élution par l'utilisation de la méthode GENECLEAN (Bio 101 Inc., Califor-

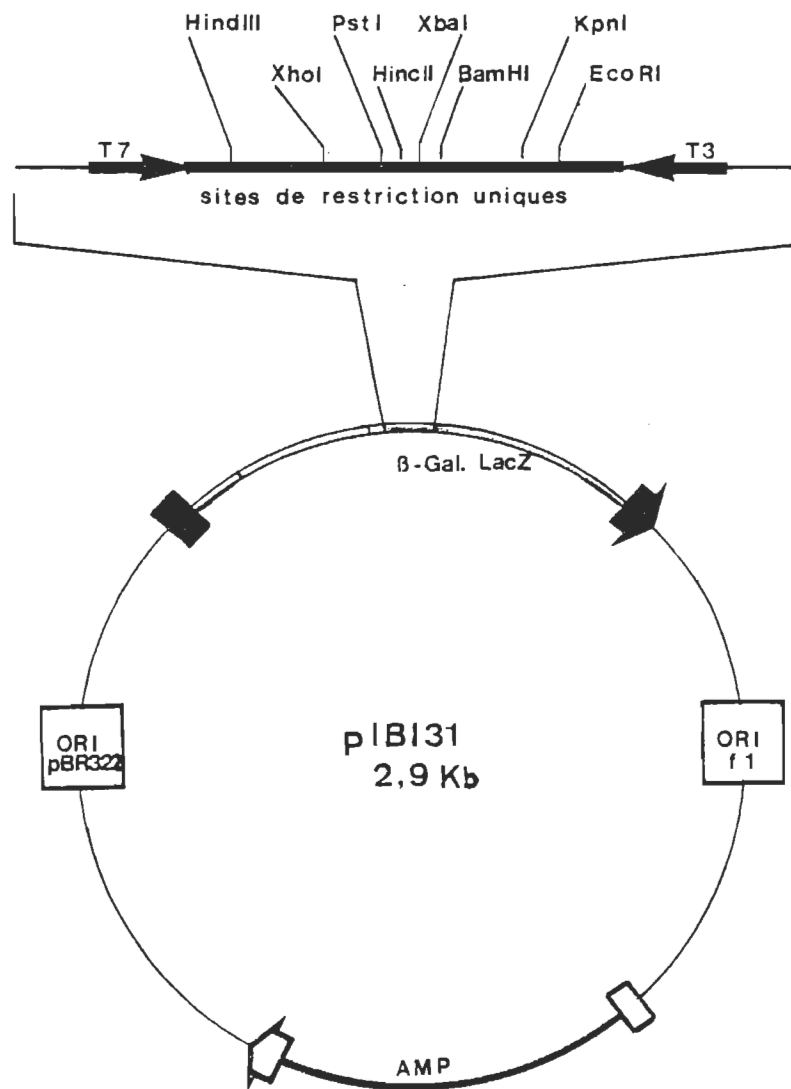
FIGURE 5 : Représentation schématique du plasmide pIBI31.

ORI origine de répllication

AMP gène de résistance à l'ampicilline

LacZ operon Lac de E. coli (gène de la β -galactosidase)

T3
T7
promoteurs de l'ARN polymérase des phages T3 et T7



nie,USA). Les fragments générés par BglII sont clonés à l'intérieur du site compatible BamHI du plasmide pIBI31.

La réaction de ligation des fragments élués au plasmide ouvert et déphosphorylé est effectuée par la combinaison de ces derniers à un ratio vecteur:insert de 2:1 pour une concentration finale d'ADN de 2,5 µg/ml ou plus (IBI, 1987). La ligation est réalisée dans un volume final de 20 µl en présence de 0,01 U. de T4 ADN Ligase (Pharmacia LKB Biotechnology, Dorval, Québec) et de 2 µl de tampon réactionnel 10X correspondant. Le milieu réactionnel est incubé à 4°C pendant 16 heures.

Les produits des réactions de ligation sont ensuite utilisés pour transformer des cellules compétentes de E. coli traitées au CaCl_2 selon la méthode décrite par Maniatis et al. (1982).

Les bactéries transformées sont étalées sur gélose contenant le substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactose), et de l'IPTG (isopropyl-β-D thiogalactopyranoside), un inducteur.

Le vecteur contient une région de sites de restriction uniques située à l'intérieur de la région codant pour la β -galactosidase. Advenant l'insertion d'un fragment d'ADN à l'intérieur de cette région, le gène de la β -galactosidase sera inactivé. Les colonies recombinantes sont reconnues par leur coloration blanche sur une gélose contenant le substrat.

Les colonies recombinantes sont criblées et repiquées dans 3 ml de bouillon LB, contenant 125 μ g d'Ampicilline/ml. Le bouillon est agitées à 250 rpm en incubation à 37°C pour la nuit. Les plasmides recombinants ainsi amplifiés sont libérés par la lyse alcaline des bactéries (Maniatis *et al.*, 1982), purifiés par extractions au phénol, phénol-chloroforme et chloroforme, et précipités à l'éthanol froid 100% tel que décrit précédemment. La taille des fragments insérés dans les plasmides est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% après clivage enzymatique de l'ADN plasmidique.

II.5.1.1 Transfert de type "Southern" de l'ADN

plasmidique: La méthode de Southern (1975) modifiée selon le protocole de Schleicher & Schuell (1987) est utilisé afin de transférer efficacement l'ADN plasmidique sur membrane de nylon. Les fragments d'ADN coupé sont séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel est rincé à l'eau distillée puis trempé dans une solution de NaCl 1,0M, NaOH 0,5M pendant 15 min. afin de dénaturer l'ADN.

Le transfert de l'ADN est effectué par capillarité sur une membrane de nylon Biotrans (ICN, Pall Biosupport, East Hills, USA) utilisant un tampon de transfert salin composé de citrate de sodium (SSC 10X) à pH 7,0 (Maniatis et al., 1982).

II.5.2 Amplification enzymatique du gène codant pour la

polyédrine du VPNLd.TR: Le gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR est amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide de la Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA), une enzyme thermophile isolée de Thermophilus (Thermus) aquaticus. La réaction est effectuée de façon telle qu'indiquée au protocole GeneAmp™ (Perkin Elmer Cetus, 1988). Brièvement, un cycle d'amplification est composé de trois étapes permettant de réaliser successivement la dénaturation de l'ADN matrice à 94°C, l'appariement des amorces oligonucléotidiques entre 37°C et 55°C correspondant à une température de 5°C sous la T_m de l'amorce la moins stable, et l'extension des brins d'ADN à l'aide de la Taq polymérase dont l'activité est optimale à 72°C.

Dans le cas présent, des échantillons purifiés d'ADN des VPNLd.TR et VPNLd.US (souche Américaine) sont amplifiés individuellement par 35 cycles de PCR, sur un appareil automatisé de type DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, U.S.A.), en présence de 2,5 U. de Taq polymérase et

de 1,0 μ M des amorces 1 et 2 (Fig.6). Les amorces utilisées ont été sélectionnées à partir d'une région conservée entre la souche US et TR du VPN. Ces amorces ont été synthétisées par Research Genetics (Huntsville, U.S.A.). La température d'appariement des amorces à la matrice est calculée selon la formule:

$$T_A = 4(G+C) + 2(A+T) - 5^{\circ}\text{C}$$

II.5.2.1 Clonage des fragments sous-molaires: Les fragments surnuméraires et sous-molaires amplifiés ne correspondent pas à la taille du fragment amplifié du gène de la polyédrine du VPNLd.TR ou de celui du VPNLd.US témoin. Ces fragments sont élués des gels d'électrophorèse utilisés pour la vérification et la quantification des fragments obtenus par amplification PCR, et clonés dans le site HincII du vecteur de clonage plasmidique pIBI31 (IBI, New Haven, USA). Au préalable, le plasmide (pIBI31) est linéarisé par la coupure franche de l'endonucléase HincII. L'insert (fragment sous-molaire), théoriquement non-phosphorylé en 5', est ligaturé au plasmide coupé et non-déphosphorylé dans les conditions décrites en II.5.1 modifiées par l'ajout de 0,01 U. de T4 ARN ligase (Sugino et al., 1977).

Les étapes de ségrégation et d'amplification des plasmides recombinants sont effectuées selon la méthode décrite à la section II.5.1.

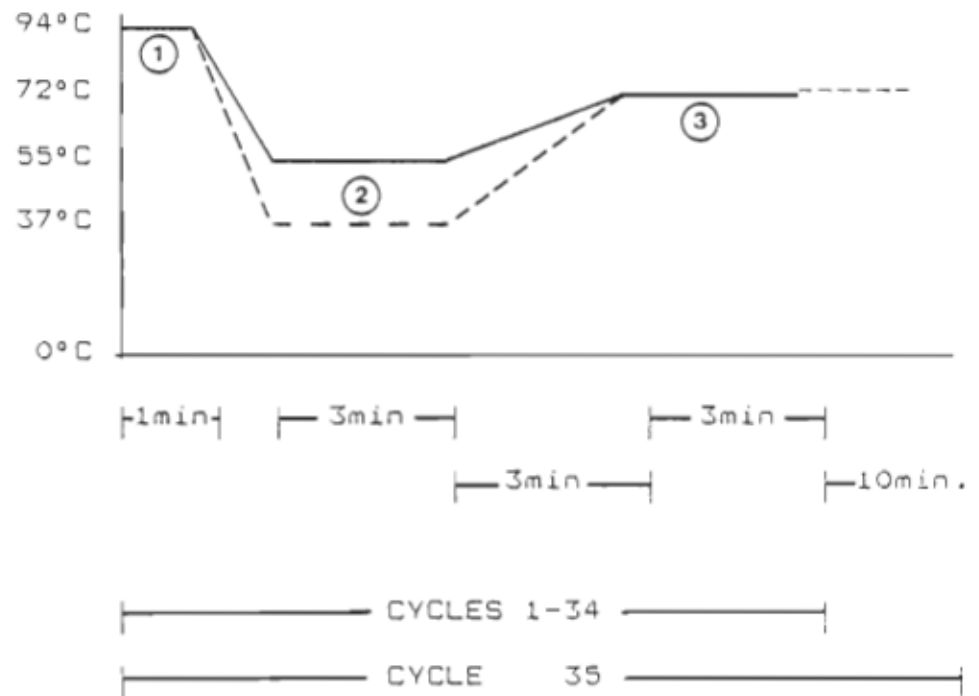
La sélection des clones, ayant comme inserts des fragments de tailles similaires aux fragments sous-molaires, est effectuée par une analyse électrophorétique des plasmides recombinants coupés simultanément à l'aide de PstI et XbaI.

L'homologie entre les clones de bandes sous-molaires (BSM) et le fragment amplifié du gène de la polyédrine du VPNLd.TR est évaluée par hybridation avec le fragment amplifié et marqué du gène de la polyédrine du VPNLd.TR (sonde TR6 : section II.7.2) dans les conditions énumérées à la section II.5.4 .

FIGURE 6 : Représentation schématique de la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).

_____ courbe de température utilisée pour
l'amplification d'ADN purifié

----- courbe de température utilisée pour
l'amplification d'échantillons bruts.



CYCLE PCR :

DÉNATURATION

A 94°C

①

ADN CIBLE

APPARIEMENT

DES AMORCES

(1) GGAAAAATCCAAATACACCGTAAATG (T_m : 48°C)

(2) (T_m : 44°C) ATTTGCTGCTAGGCCTGAGCT

ÉLONGATION

③

72°C

GGAAAAATCCAAATACACCGTAAATG

ATTTGCTGCTAGGCCTGAGCT

II.5.3 Marquage radioactif de l'ADN : Les fragments correspondants aux gènes de la polyédrine du VPNBm et du VPNLd de souche Canadienne (TR) et Américaine (US), auparavant obtenus par élution ou par amplification enzymatique, sont marqués par l'incorporation du dCTP³² α (ICN Biochemicals Division, California, USA). Le marquage est effectué selon la méthode des amorces aléatoires (Feinberg et Vogelstein, 1983), en utilisant une trousse commerciale (Prime Time "C", IBI, New Haven, U.S.A.). Brièvement, l'échantillon d'ADN est incubé à 25°C pendant 14 heures en présence de 10 μ Ci P³² α -dCTP/ml, 5 U. du fragment Klenow et d'un mélange des nucléotides froids (IBI, New Haven, U.S.A.). L'ADN marqué est débarrassé des nucléotides marqués non-incorporés par chromatographie en utilisant la technique des "Spun-columns" (Maniatis et al., 1982).

Des aliquotes de 1 μ l sont précipitées à l'acide trichloroacétique 5% (TCA) sur filtre Whatman GF/C (Whatman International Ltd, Maidstone, Angleterre) puis séchées sous une lampe. Après séchage, les papiers sont placés dans 5 ml de mélange scintillant (4g. PPO-2,5 diphényl-ozanole, 0,1g de Popop 2,2'-p-phénylène-tris 4-méthyl 5 phénylozanole). La radioactivité de chaque échantillon est mesurée par un spectrophotomètre à scintillation liquide de type Beckman LS7500 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA).

II.5.4 Criblage des plasmides recombinants : Les banques de clones transférées sur membrane de nylon (section II.5.1.1) sont criblées par hybridation au fragment amplifié et marqué du gène de la polyédrine du VPNLd.TR (sonde TR6).

Les membranes sont tout d'abord traitées par immersion dans une solution de pré-hybridation contenant de l'ARN_e à 0,25 mg/ml. Les membranes sont incubées à 42°C pendant 6 heures afin de permettre la saturation des sites non-spécifiques. Elles sont ensuite incubées, en conditions strictes, pendant 12 heures à 42°C dans une solution contenant 50% de formamide en présence de 10⁶ CPM/ml de la sonde préparée tel que décrit à la section précédente.

Les membranes sont ensuite lavées dans des bains successifs d'une première solution de SSC 2X à 50°C pendant 30min., puis dans une seconde de SSC 0,2X contenant 0,2% SDS (sodium dodecyl sulfate) pendant 30 min. à 25°C. Elles sont enfin séchées et exposées pour autoradiographie sur pellicule X-Omat TM.AR (Eastman Kodak Co.,Rochester,USA) pendant 12 heures à -70°C. Les pellicules autoradiographiques sont révélées sur un appareil de type X-Omat M20 (Eastman Kodak Co.,Rochester,USA). Les clones d'ADN plasmidique, ayant comme insert la portion d'ADN complémentaire au fragment de la sonde utilisée, sont identifiés sur autoradiographie et isolés des banques pour être amplifiés individuellement.

Chaque clone est identifié et conservé dans une solution de 40% de glycérol stérile à -70°C jusqu'à utilisation.

La vérification des plasmides recombinants du gène de la polyédrine du VPNLd.TR (clones positifs à l'hybridation de la sonde TR6) est effectuée après la déshybridation des mêmes membranes à 95°C pendant 10 min. et leur réhybridation successive au fragment amplifié et marqué du gène de la polyédrine du VPNLd.US (sonde US), dans les conditions déjà décrites.

II.6 Caractérisation du gène de la polyédrine du VPNLd.TR:

L'hétérogénéité génotypique du VPNLd est vérifiée par la comparaison du profil de restriction et de la séquence nucléotidique du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR principalement avec notre isolat du VPNLd.US et la séquence du VPNLd publiée par Smith et al. (1988).

II.6.1 Profil électrophorétique comparatif des fragments du gène codant pour la polyédrine des VPNLd.TR et

VPNLd.US: Des quantités de 500 ng d'ADN amplifié des souches Canadienne et Américaine du VPNLd sont digérées à l'aide de plusieurs endonucléases de restriction dans les conditions déjà décrites à la section II.4.1 . Les produits de la réaction sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%-TEA 1X (annexe 8) à 100 v. pendant 60 min. . La migration terminée, le gel est coloré et observé aux U.V. , de la façon décrite précédemment, puis transféré sur membrane de nylon par transfert de type "Southern" (section II.5.1.1). La sonde utilisée pour cette hybridation est le fragment amplifié du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR (section II.5.4) . Les fragments de restriction s'hybridant avec cette sonde sont révélés par autoradiographie.

II.6.2 Séquençage du gène de la polyédrine du VPNLd.TR:

Après production massive du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR dans les conditions standards (Maniatis et al., 1982), l'ADN plasmidique est purifié par extraction alcaline. L'extraction est effectuée selon les méthodes décrites par Birnboim et Doly (1979) et Maniatis et al. (1982) et modifiées par Mierendorf et Pfeffer (1987), utilisant une précipitation au polyéthylène glycol 13% (PEG : PM 8000, Sigma Chemical Co., St-Louis, USA) suivi de trois rinçages à l'éthanol 70% froid. L'ADN purifié ainsi obtenu est solubilisé dans l'eau distillée et déionisée stérile, puis quantifié sur gel d'agarose 0,8% TEA.

La réaction de séquençage du gène de la polyédrine du VPNLd.TR est effectuée par la réaction utilisant des didésoxynucléotides (ddNTPs), basée sur la réaction de séquençage de Sanger (1977).

Les quantités de 2 µg à 3 µg d'ADN plasmidique dans 8 µl d'eau sont dénaturées pendant 30 min. à 37°C en présence de 2 µl de NaOH 2M. L'ADN dénaturé est précipité à l'éthanol 100% froid, puis lyophilisé. Les culots d'ADN sont resuspendus de façon à obtenir une concentration finale d'ADN d'environ 1µg/µl dans un volume de 10 µl d'eau distillée et déionisée stérile.

Quatre tubes contenant des quantités équivalentes de 1 µg d'ADN pour chaque 1000 nucléotides du clone sont mis en réaction en présence de 10 ng de chacune des amorces 5'-3' utilisées pour la réaction PCR (section II.5.2) et de 2 µl du tampon de réaction (Tris-HCl 70 mM (pH 7,5), MgCl₂ 70 mM, NaCl 500 mM) pour un volume final de 12 µl. Chaque tube est agité brièvement, incubé à 37°C pour 20 min., puis refroidi à la température ambiante (30 min). Ces tubes sont identifiés par la lettre du didésoxynucléotide (ddNTP) employé pour la réaction de séquençage, soit: A, C, G, T.

Dans chacun de ces tubes de mélange plasmide-amorce, nous ajoutons respectivement 0,1mM ddATP (tube A), 0,3 mM ddCTP (tube C), 0,5 mM ddGTP (tube G) et 1,0 mM ddTTP (tube T). Des volumes de 3 µl de dATP[α-³²P] (ICN, Biochemicals Division, Irvin, Californie), 1 µl de DTT 0,1 mM et 3 U. de l'enzyme T7 ADN polymérase (Sequanase 2: Pharmacia LKB Biotechnology, Dorval, Québec) sont ajoutés à chaque tube de réaction. Les tubes sont agités à 37°C pendant 5 min.. La réaction est arrêtée par l'ajout de 4 µl d'une solution d'arrêt (0,1% de xylène cyanol, 0,1% de bleu de bromophénol, Na₂EDTA, et 95% de formamide déionisée).

Des volumes de 2 µl d'échantillons sont déposés sur gel en gradient d'acrylamide 6% (Biggin et al, 1983) pour une migration à 30 mA se poursuivant jusqu'à ce que le bleu de

bromophénol atteint le bas du gel. Le gel est fixé pendant 20 min. dans 2 L d'un mélange d'acide acétique 5% et de méthanol 5%, récupéré sur une feuille de papier Whatman 3MM, recouvert d'une pellicule plastique et séché à 80°C pendant 30 min.. Le gel est ensuite exposé pendant 16 à 36h. à l'abri de la lumière à -70°C sur pellicule X-Omat RP (Eastman Kodak Co., Rochester, USA). La séquence est lue et analysée à l'aide du programme d'analyse IBI/Pustell (IBI/Pustell DNA and protein sequence analysis system, cat. 81501, version PC, 1986; IBI, New Haven, USA).

Afin de compléter et vérifier la séquence obtenue, les 18mer 5'TCGACCGGTACTTGGTGG 3' et 5'ACGAGGGCTACGTGCCGC 3' pour le brin contenant le cadre de lecture ouvert du gène de la polyédrine et les 18mer 5'GTGGAGGGCTCCACGATG 3' et 17mer 5'GATCTCTTTGAAGAGAG 3' pour le brin complémentaire ont été synthétisés (F. Shareck, Laboratoire de synthèse d'oligonucléotides, I.A.F.).

II.7 Méthode de diagnostic: La méthode de détection que nous avons mise au point utilise le fragment amplifié du gène de la polyédrine comme sonde, laquelle est hybridée à des échantillons pré-amplifiés par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

II.7.1 Préparation des échantillons de terrain: L'ADN viral est purifié à partir d'échantillons de larves, d'oeufs et d'excréments récoltés dans différentes régions du Québec, de l'Ontario et du nord-est des États-Unis.

Les échantillons sont homogénéisés individuellement en présence de 500 µl de tampon DAS modifié (section II.1.3.1), puis débarassés des protéines à l'aide de protéinase K - SDS suivi d'extractions phénol et chloroforme, tel que décrit à la section II.4 . Un volume de 10 µl de chaque échantillon est conservé à -20°C pour la réaction d'amplification par PCR, le reste est immobilisé en triplicat sur membrane de nylon Biotrans (ICN,Pall Biosupport,East Hills,USA) à l'aide d'un appareil "slot-blot" de type Minifold II (Schleicher & Schuell, Keene, U.S.A.). Les membranes sont ensuite séchées sous vide à 80°C pendant 60 minutes dans un four à vide (National Appliances Co.,Portland,USA) permettant une meilleure fixation des échantillons aux membranes. Ces dernières sont enfin scellées sous vide et hybridées dans des sacs de polyester/polyéthylène (Gibco/BRL,Burlington,Canada).

II.7.2 Préparation des sondes et hybridation: Une quantité de 1 µg des clones H2 et H3, correspondant à de courts inserts (<2,0 Kpb) provenant de la digestion complète de l'ADN total du VPNLd.TR par l'endonucléase HindIII, sont marqués par déplacement de coupures (nick translation) à l'aide du nucléotide dCTP (P^{32} α). Le marquage d'une durée de 90 min. à 16°C est effectué selon les procédures décrites par Amersham (1984). Le fragment amplifié du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR est radiomarké de la même façon et constitue la sonde TR6.

II.7.3 évaluation de la spécificité des sondes: Une quantité de 50 ng d'acides nucléiques purifiés de différentes souches de Virus de la Polyédrose Nucléaire (VPN), de Virus de la Granulose (VG) et du Virus de la Polyédrose Cytoplasmique (VPC), ainsi qu'un échantillon des oligonucléotides amorces utilisés pour la réaction PCR, sont fixés sur membrane de nylon, selon la procédure déjà décrite, et hybridés aux sondes H2, H3 et TR6 dans des conditions identiques à celles énumérées à la section II.5.4 .

II.7.4 évaluation de la sensibilité de la méthode: Des dilutions allant de 10^{11} à 1 molécule d'ADN, correspondant au gène amplifié et à une quantité équimolaire d'ADN total du VPNLd.TR, sont fixées sur membrane de nylon et hybridées aux sondes H2, H3 et TR6 comme précédemment.

Les dilutions d'ADN comprises sous la limite de détection de la sonde TR6 sont amplifiées par 35 cycles PCR (section II.5.2), fixées et hybridées à nouveau à la sonde TR6 dans les conditions énumérées à la section II.5.4 .

La limite de sensibilité de la méthode est évaluée selon la réponse obtenue sur autoradiogramme après une exposition de 12 heures à -70°C.

II.7.5 évaluation de la dispersion géographique du VPnLd dans les populations de spongieuses répertoriées:

Les échantillons de larves, d'oeufs et d'excréments fixés sur membrane de nylon (section II.7.1) sont hybridés aux sondes H2, H3 et TR6 dans les conditions décrites à la section II.5.4 . Les membranes sont exposées au noir à -70°C sur pellicule X-Omat TM.AR (Eastman Kodak Co.,Rochester,USA). Après 12 heures d'exposition, les informations recueillies sur autoradiogrammes sont compilées puis annotées sur une carte géographique relatant les régions du Québec où la densité des populations larvaires est élevée et mettant en évidence la présence du VPnLd potentiellement épizootique dans ces populations.

II.8 évaluation de la latence et de la persistance du VPnLd:

Les échantillons négatifs lors de l'hybridation aux sondes H2, H3 et TR6 sont maintenant amplifiés par PCR avant d'être fixés et hybridés à la sonde TR6.

II.8.1 Chez les larves: Des volumes de 10 µl des broyats purifiés sont amplifiés par 35 cycles de PCR dans un volume réactionnel de 100 µl, selon la procédure décrite à la section II.5.2. Des échantillons amplifiés, des aliquotes de 10 µl sont déposés sur gel d'agarose 0,8% TEA pour le diagnostic visuel des bandes d'ADN fluorescent après électrophorèse. Le reste est fixé et hybridé à la sonde TR6 dans les conditions déjà décrites.

II.8.2 Chez les oeufs: Des masses d'oeufs des différentes régions d'échantillonnage sont divisées en deux à l'aide de lames de scalpel stériles. La première demie est broyée et fixée de la façon décrite à la section II.7.1. La surface des oeufs de la seconde demie est stérilisée par immersion dans l'hypochlorite de sodium, tel que décrit à la section II.1.1.1, suivie de trois lavages à l'eau distillée stérile. Ces masses d'oeufs sont ensuite broyées et fixées de la même façon que les premières. De plus, un volume de 10 µl de chaque échantillon purifié d'oeufs stérilisés et non-stérilisés est amplifié par 35 cycles de PCR, comme décrit à la section II.5.2.

Les échantillons amplifiés sont enfin fixés sur membrane de nylon dans l'ordre de correspondance des échantillons non amplifiés. Les échantillons sont finalement hybridés à la sonde TR6 dans les conditions décrites à la section II.5.4 , puis exposés au noir pendant 12 heures à -70°C sur pellicule X-Omat TM.AR. L'autoradiogramme est développé à l'aide d'un processeur automatique de type X-Omat M20 (Eastman Kodak Co., Rochester, USA).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

III.1 Infection in vitro et permissivité cellulaire :

III.1.1 Mise en évidence d'une infection virale intra-

cytoplasmique chez les cellules Es-263:

Des échantillons d'hémolymphe filtrées sur membrane à porosité de 0,45 μm ont donné lieu à l'apparition d'une infection virale cytoplasmique chez les cellules de la lignée Euxoa scandens (Es-263). La figure 7A met en évidence l'envahissement du cytoplasme cellulaire par des particules virales parasphériques. D'autres particules sont accolées à la périphérie de la membrane cytoplasmique externe ainsi qu'au pourtour de structures extracellulaires. Des vacuoles intracytoplasmiques contenant le petit virus ont également été retrouvées (Fig.7B).

La plupart des particules virales ont une forme parasphérique, alors que certaines sont icosaédriques ou polymorphes et présentent des arêtes (Fig.7C), et ont une taille approxi-

mative de 25 nm de diamètre. Il est possible d'observer, à l'intérieur du cytoplasme cellulaire, des rangées de particules virales denses aux électrons séparées par des particules moins denses, vides ou incomplètes (Fig.7A et 7C).

L'électrophorégramme de l'ADN du VPNLd purifié à partir de broyats de larves virosées de la région de Trois-Rivières, desquels l'hémolymphe a été extraite, est présenté à la figure 8. Nous pouvons y observer, en plus de la bande d'ADN du VPNLd, la présence de deux fragments contaminants absents dans l'échantillon d'ADN purifié à partir de larves virosées provenant des états-Unis (VPNLd.US). Ces fragments, dégradés par l'action enzymatique après traitement des échantillons à la RNase A, correspondent à deux fragments d'ARN .

FIGURE 7 : Microphotographies d'un virus contaminant le cytoplasme des cellules de la lignée E.s.263.

Infection in vitro obtenue à l'aide d'hémolymphe prélevée de larves de L. dispar de la région de Trois-Rivières, atteintes de polyédrose nucléaire.

- A Coupe transversale d'une cellule infectée (grossissement 41 040X).
- B Vacuole intracytoplasmique (►) contenant des paracristaux de particules virales (30 700X).
- C Particules virales parasphériques d'environ 25nm de diamètre (115 776X).

P : particule pleine, dense aux électrons

V : particule vide

→ particules polymorphes présentant des arêtes.

► rangs de particules denses aux électrons

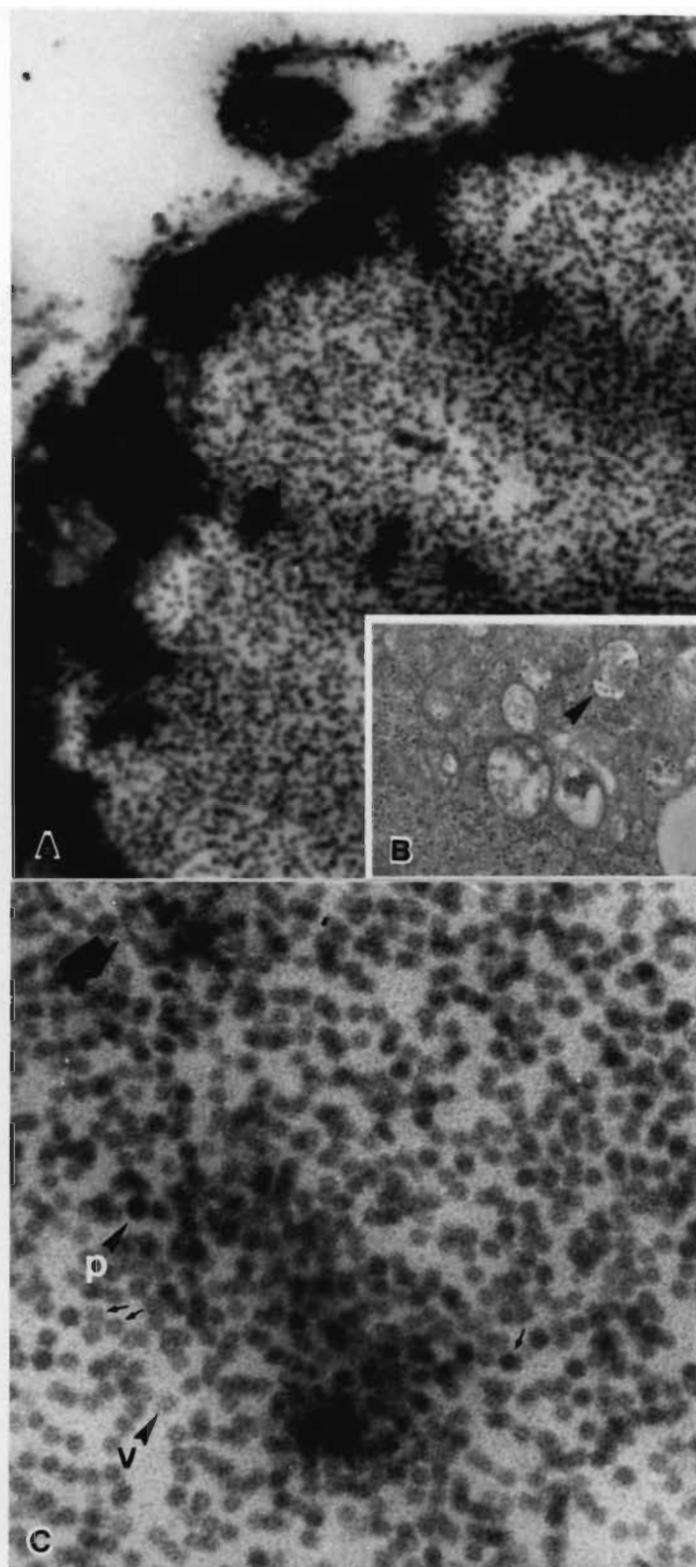
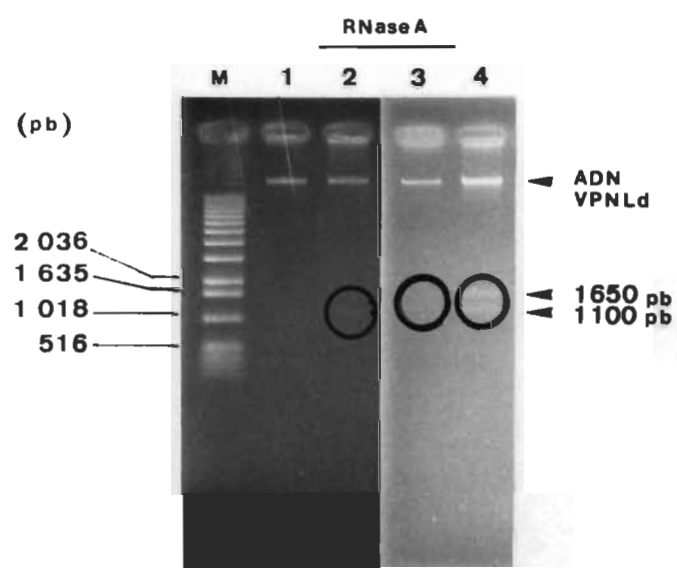


FIGURE 8 : électrophorégramme des bandes d'ARN contaminant la préparation d'ADN du VPNLd purifié à partir d'échantillons de larves virosées de la région de Trois-Rivières.

- 1 ADN témoin du VPNLd.US .
- 2 ADN témoin du VPNLd.US traité à la RNase A.
- 3 ADN purifié du VPNLd.TR traité à la RNase A.
- 4 ADN purifié du VPNLd.TR .
- M Marqueur de taille 1Kb (paires de bases : pb)



III.1.2 Permissivité cellulaire et conditions d'infection

in vitro au VPNLd: De notre collection de lignées cellulaires infectées à l'aide du VPNLd , seule la lignée Cf-124 a semblé démontrer un certain degré de permissivité à l'infection du VPNLd. La figure 9 démontre une infection complète des cellules Cf-124 à l'aide d'un inoculum, constitué de virions libres purifiés sur gradient de sucrose 25-60%, titrant $2,2 \times 10^6$ PFU/ml (section II.2.3.1). Il est possible d'y observer l'évolution temporelle des symptômes caractéristiques d'une infection à VPN.

Les cellules de la lignée cellulaire Cf-124 sont de petites tailles (10-15 μm X 20-25 μm) et caractérisées par une forme fuselée (Fig.9A). Après 72 heures d'infection, les cellules s'arrondissent et augmentent de taille (en moyenne 22-30 μm de diamètre). Le noyau devient plus évident et contient de petites masses cristallines réfringentes en microscopie photonique à contraste de phase (Fig.9B). Enfin, après un temps post-inoculation de 96 heures, les cellules conservent leur forme arrondie, la membrane nucléaire est accolée à la membrane cytoplasmique et le noyau contient des masses cristallines réfringentes de tailles moyennes variant entre 1 et 3 μm .

Les résultats obtenus lors de la variation des paramètres physiques et chimiques au cours des essais d'infection in vitro sont résumés au tableau I. Seules les cellules de la lignée Cf-124 ont démontré une infection complète, avec production de polyèdres, dans les conditions d'infections expérimentales suivantes: une température d'adsorption et d'entretien de 28°C; et des temps d'adsorption du virus en contact de 60 min., 120 min et 5 jours avec les cellules. Après cinq jours d'infection, une proportion de plus de 50% des cellules Cf-124 contenaient des masses cristallines réfringentes (polyèdres).

Les autres résultats obtenus indiquent l'observation d'effets cytopathiques sur les cellules Ld et Es infectées à 28°C et pour un temps de contact virus-cellules de cinq jours, ainsi que sur des cellules Ld et Cf transfectées avec l'ADN nu en présence de CaCl_2 (stimulateurs 9 et 10 : Tableau I. et Fig. 4 de la section II.2.3.3). Avec tous les autres stimulateurs potentiels (voir Fig.4) on note aucune apparition de polyèdre ou aucun effet cytopathique.

FIGURE 9 : évolution in vitro de l'infection du VPNLd.TR chez les cellules de la lignée Cf124 (grossissement 320X).

- A Cellules Cf124 témoins (72 heures en culture).
- B Cellules Cf124 hypertrophiées (72 heures post-infection).
- C Cellules Cf124 envahies de masses cristallines (96 heures post-infection).

Les observations et photographies ont été réalisées en microscopie photonique à contraste de phase (B et C).

trait = 5 μ m

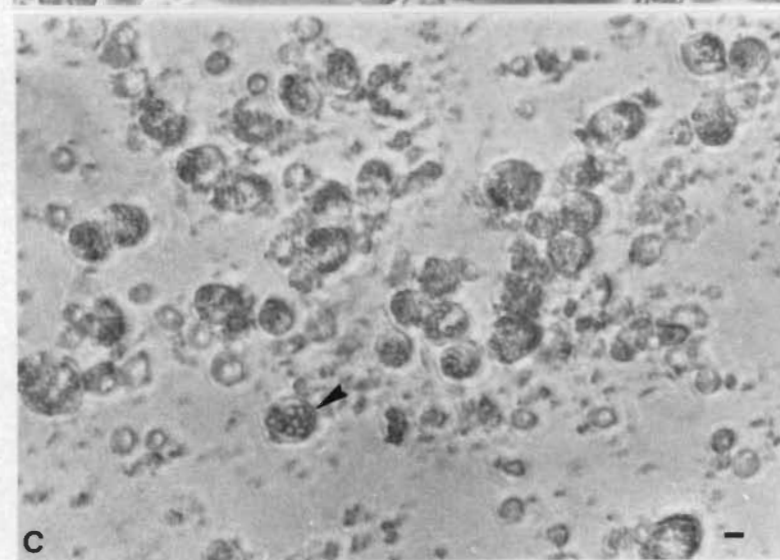
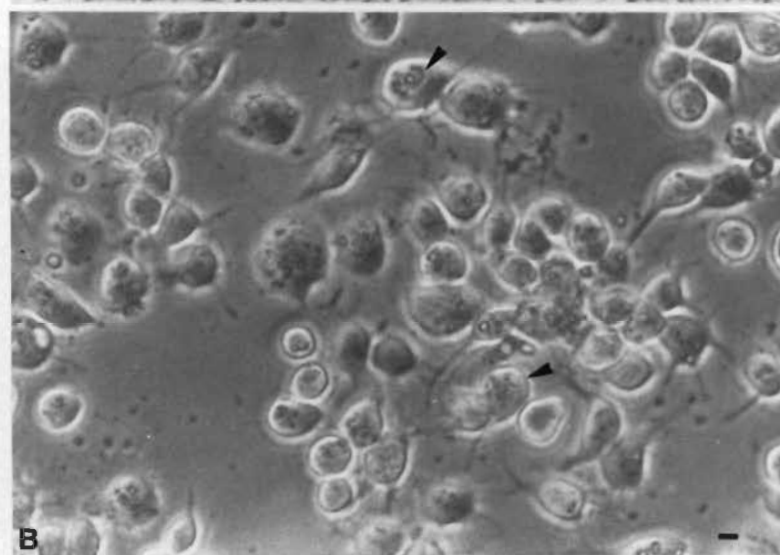
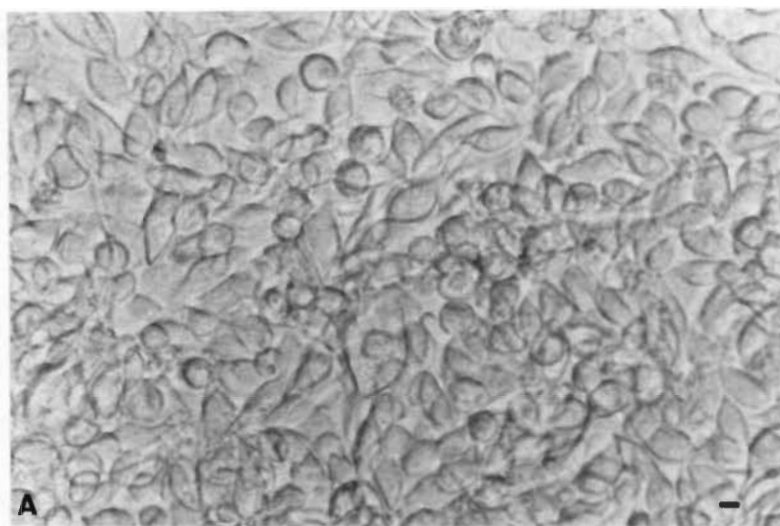


TABLEAU I.

VARIATION DES PARAMETRES PHYSIQUES
ET CHIMIQUES DES CONDITIONS
D'INFECTION IN VITRO AU VPNLd

lignées	Paramètres															
	Physiques						Chimiques									
	températures (°C)			temps d'adsorption			stimulateurs									
	4	28	37	60min	120min	5j.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ld	-	E	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	E	E
Es	-	E	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cf	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	E	E
BmN4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

E : effets cytopathiques

+: infection complète avec production de polyèdres

stimulateurs 1-10 : se référer à la figure 4 (p.55).

III.2 Caractérisation de l'ADN du VPNLd.TR:

III.2.1 Profils de restriction de l'ADN viral: Les profils de restriction des génomes d'ADN du VPN de Lymantria dispar de souches Américaine (VPNLd.US), Ontarienne (VPNLd.ONT) et Québécoise (Trois-Rivières : VPNLd.TR) sont présentés aux figures 10 et 11. La digestion complète des trois ADN en réactions séparées à l'aide des endonucléases de restriction EcoRI, HindIII et BamHI a donné des électrophorégrammes identiques entre eux.

Les profils comparatifs obtenus après digestion des trois ADN à l'aide des enzymes BglII et PstI ont cependant permis d'observer l'apparition de bandes surnuméraires ainsi que de nouveaux positionnements électrophorétiques de bandes existantes (Fig.11). L'électrophorégramme des ADN coupés par BglII démontre une similarité des profils génétiques du VPNLd.US et du VPNLd.TR. Par ailleurs, le profil BglII obtenu pour l'ADN du VPNLd.ONT démontre l'apparition d'un fragment surnuméraire d'environ 4 600 pb et le repositionnement des fragments de 8 500 pb et de 8 200 pb, initialement retrouvés sur le profil des deux premiers ADN, à 8 200 pb et 8 100 pb. Le profil d'ADN du VPNLd.TR ne diffère des autres ADN que par l'apparition d'une bande surnuméraire PstI de 4 100 pb (Fig.11).

FIGURE 10: Profil électrophorétique des fragments d'ADN après digestion entière à l'aide des endonucléases de restriction EcoRI et HindIII, du VPN de Lymantria dispar de souches US (1), TR (2) et ONT (3).

Les échelles de taille (en paires de bases : pb) sont basées sur les fragments HindIII de l'ADN du phage Lambda (λ) et sur les fragments du marqueur (M) 1Kb de BRL (Gibco/BRL, Burlington, Canada).

STANDARD
"pb"

23 130 —
9 416 —
6 557 —
4 361 —
2 322 —
2 027 —
564 —
125 —



EcoRI



HINDIII



STANDARD
"pb"

12 216 —
11 198 —
10 180 —
9 162 —
8 144 —
7 126 —
6 108 —
5 090 —
4 072 —
3 054 —
2 036 —
1 635 —
1 018 —
516 —

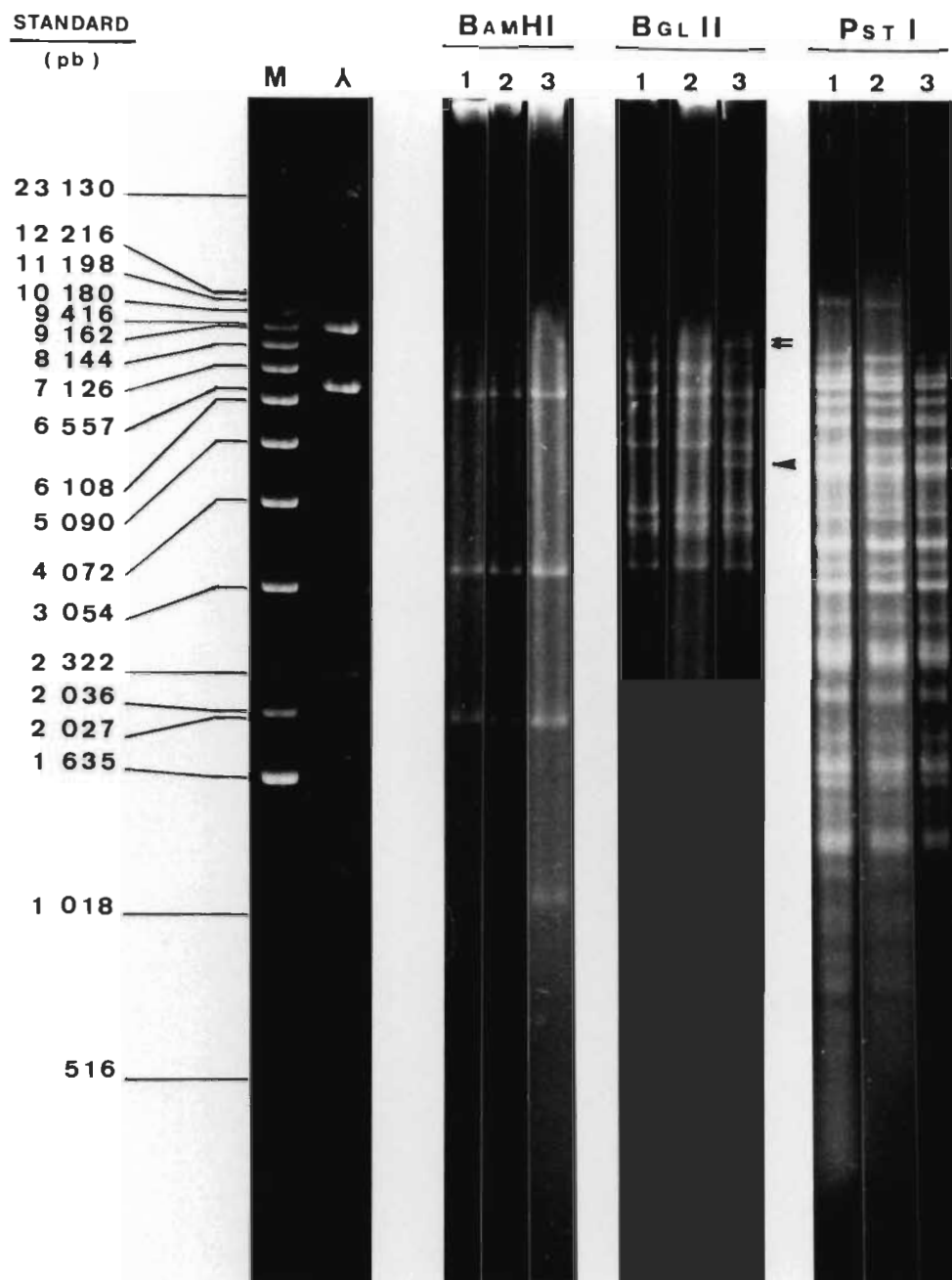


FIGURE 11: Profils électrophorétiques des fragments d'ADN du VPNLd de souches US (1), TR (2) et ONT (3), après digestion entière à l'aide des endonucléases de restriction BamHI, BglII et PstI.

Les échelles de taille (en paires de bases : pb) sont basées sur les fragment HindIII de l'ADN du phage Lambda (λ) et sur les fragments du marqueur (M) 1Kb de BRL (Gibco/BRL, Burlington, Canada).

Fragments surnuméraires ➤

Fragments repositionnés →



III.3 Caractérisation du gène de la polyédrine du VPNLd.TR:

III.3.1 Comparaison du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR et du VPNLd.US amplifiés par PCR:

La taille des fragments amplifiés par 35 cycles de PCR, correspond à la taille du cadre de lecture de la région codante du gène de la polyédrine des VPNLd.TR et VPNLd.US. De plus, ils ne démontrent aucune dissimilarité entre eux (Fig.12). La taille des fragments obtenus est évaluée à environ 780 pb par comparaison à la migration des marqueurs de taille.

Le profil de restriction comparatif des gènes amplifiés et coupés par les endonucléases AluI, ApaI, AvaII, HaeIII, HincII, Sau3A et XhoI démontre cependant la différence de positionnement des sites reconnus par les deux premières enzymes à l'intérieur du gène de chacune des souches de VPNLd (Fig.13). Les doublets présents à la base du gel coloré pourraient correspondre aux oligonucléotides amorces utilisés lors de l'amplification PCR. Il est possible d'observer une faible quantité d'ADN non coupé dans les puits 1 et 2 de AluI et ApaI donnant la référence de migration de l'ADN témoin absent sur la photographie du gel. Les différences, difficilement observables sur électrophorégramme sont mises en évidence sur autoradiogramme après transfert de type "Southern" des ADN coupés et leur hybridation au fragment amplifié et radio-marqué du gène de la polyédrine du

VPNLd.TR. Les fragments AluI apparents sont respectivement de 400 pb et 300 pb pour le VPNLd.TR et de 600 pb et 100 pb environ pour le VPNLd.US. De même, les fragments ApaI sont de 500 et 200 pb pour le VPNLd.TR et de 650 pb et 50 pb (présupposé) pour le VPNLd.US.

FIGURE 12: Amplification du gène codant pour la polyédrine des VPNLd.TR et VPNLd.US par 35 cycles de réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

TR6 Fragment amplifié à partir de l'ADN purifié du VPNLd.TR

US Fragment amplifié à partir de l'ADN purifié du VPNLd.US

M Marqueurs de taille (paires de bases : pb)

La spécificité des oligonucléotides amorces est vérifiée à l'aide d'une réaction contrôle sur le plasmide utilisé pour le clonage moléculaire (pIBI31) ainsi que sur l'ADN du phage Lambda (λ).

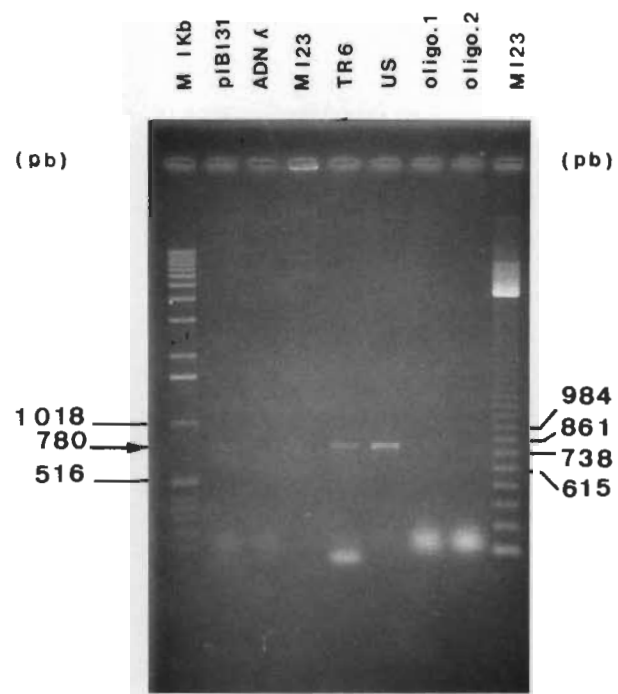
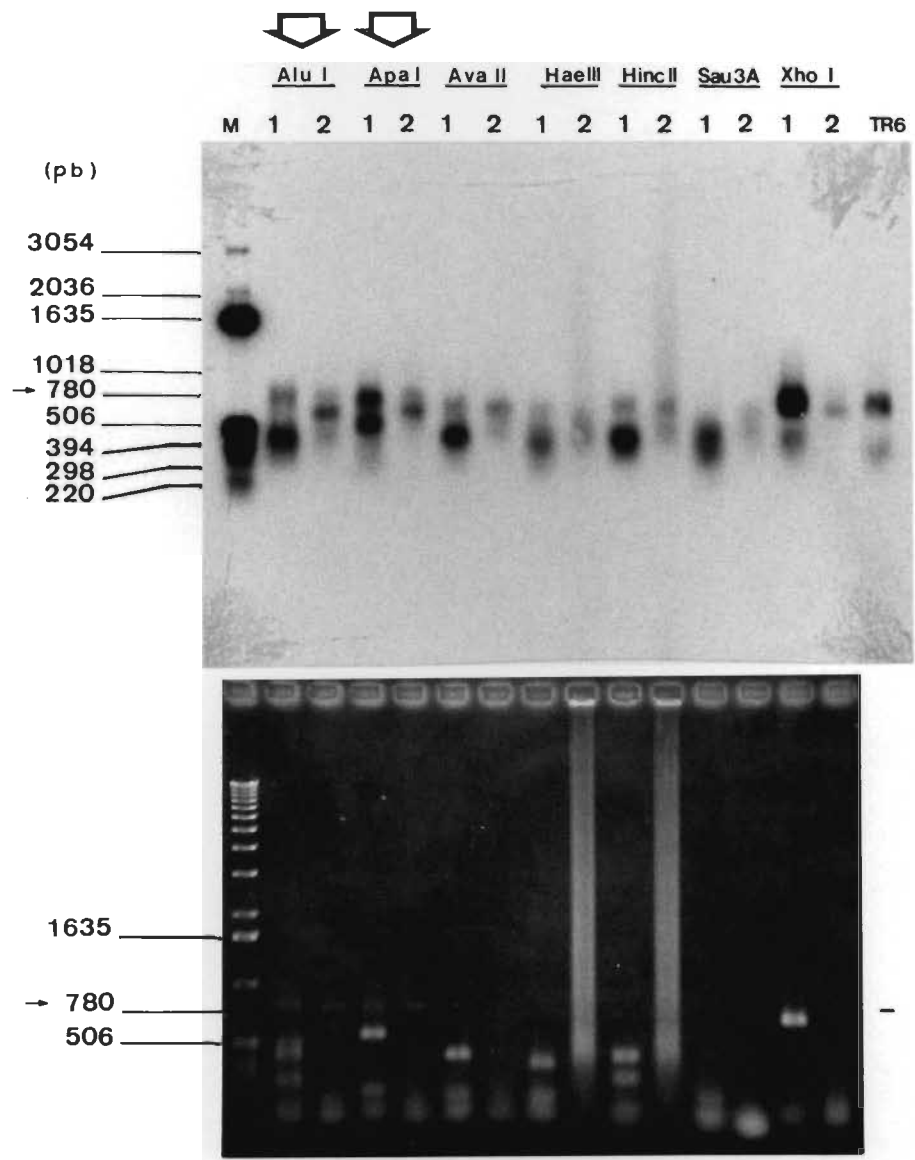


FIGURE 13: Autoradiogramme et électrophorégramme correspondant du profil de restriction comparatif entre les fragments du gène de la polyédrine des VPNLd.TR et VPNLd.US amplifiés par PCR.

- 1 Fragment amplifié du gène de la polyédrine du VPNLd.TR .
- 2 Fragment amplifié du gène de la polyédrine du VPNLd.US .
- TR6 Fragment amplifié et non-coupé du gène de la polyédrine du VPNLd.TR (n'apparaît pas sur la photographie du gel coloré).
- 780 Position des fragments d'ADN non-coupés
- M Marqueur de taille 1kb (BRL,Gaithersburg,USA) apparaissant aussi sur l'autoradiogramme après hybridation avec le plasmide pBR322 marqué au dCTP-P ³²α. Le marqueur 1kb contient les séquences homologues au pBR322.
- Ⓛ Marque la migration différentielle des fragments générés par la coupure des échantillons 1 et 2 à l'aide des enzymes de restriction AluI et ApaI .



III.3.2 Clonage moléculaire du gène codant pour la

polyédrine du VPNLd.TR: Les résultats du criblage du fragment correspondant au gène de la polyédrine du VPNLd.TR, effectué par hybridation des fragments amplifiés utilisés comme sondes (TR6 et US) à l'ADN du VPNLd.TR coupé par l'endonucléase PstI, sont présentés à la figure 14. Les deux sondes s'hybrident fortement à un fragment PstI de 5 300 pb et faiblement à un fragment de 2 175 pb. L'hybridation multiple de la sonde TR6 s'explique par la présence de séquences adjacentes au gène de la polyédrine à l'intérieur de notre clone, ce qui n'est pas le cas du gène cloné du VPNLd.US. Ces séquences pourraient reconnaître d'autres régions homologues de l'ADN viral due à la grande variabilité génétique et à la présence de régions répétitives chez le VPNLd.

Les plasmides recombinants ont été vérifiés par hybridation au fragment amplifié et radio-marqué du gène de la polyédrine du VPNLd.TR (Fig.15). Nous constatons que seuls les clones du groupe 54 (C 54-1 à 3) donnent un signal d'hybridation. La taille des clones linéarisés par coupure PstI est de 8 300 pb et correspond à l'insertion de fragments identiques de 5 300 pb à 5 400 pb à l'intérieur du vecteur de clonage (pIBI31) d'une taille de 2 900 pb.

Les fragments de hauts poids moléculaires restant sont des fragments d'ADN chromosomique obtenus lors de la lyse alcaline des bactéries recombinantes. Les inégalités d'observation entre l'électrophorégramme et l'autoradiogramme correspondent aux inégalités des limites de détection de chaque méthode. En effet, la coloration de l'ADN sur gel par le bromure d'éthidium permet l'observation d'une quantité minimale d'environ 20 ng d'ADN, alors que la limite de détection d'une hybridation moléculaire est de l'ordre de 1 pg d'ADN homologue. La taille du clone 54 a été confirmée par une analyse de restriction et l'évaluation du total des tailles moyennes des fragments générés par les enzymes AccI, ApaI, EcoRI, HincII, PstI, PvuI, SalI et XhoI ne reconnaissant qu'un site unique à l'intérieur du vecteur de clonage (Fig.16).

La figure 15 démontre aussi l'absence d'hybridation de la sonde TR6 avec le clone 59 (C 59) contenant un insert de 6 900 pb et l'absence d'hybridation avec les clones BSM24 et BSM34 de 700 pb et 500 pb respectivement, correspondant aux bandes sous-molaires quelquefois observées après amplification PCR du gène de la polyédrine du VPNLd.US.

FIGURE 14: Criblage du fragment correspondant au gène de la polyédrine sur l'ADN total du VPNLd.TR coupé par l'endonucléase de restriction PstI (A).

λ Marqueur de taille (paires de bases : pb) apparaissant aussi sur autoradiogramme après hybridation avec l'ADN entier du phage lambda marqué à l'aide du dCTP-P $^{32}\alpha$.

A ADN total du VPNLd.TR coupé par PstI

TR6 Fragment polyédrine du VPNLd.TR amplifié par PCR et radiomarké à l'aide du dCTP-P $^{32}\alpha$.

US Fragment polyédrine du VPNLd.US amplifié par PCR et radiomarké à l'aide du dCTP-P $^{32}\alpha$.

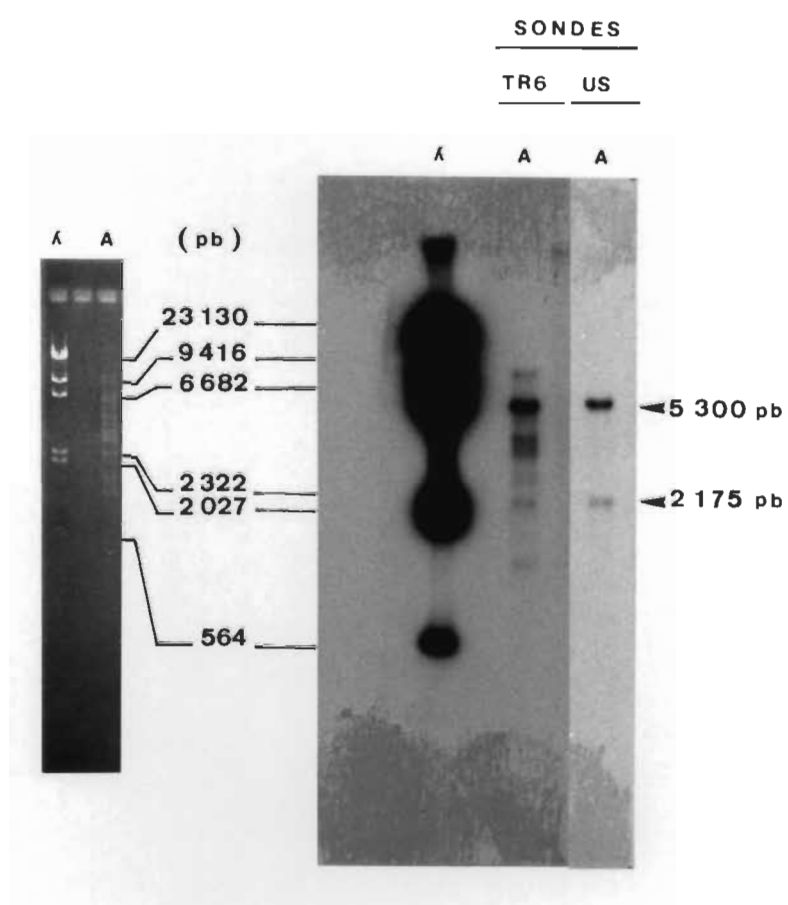
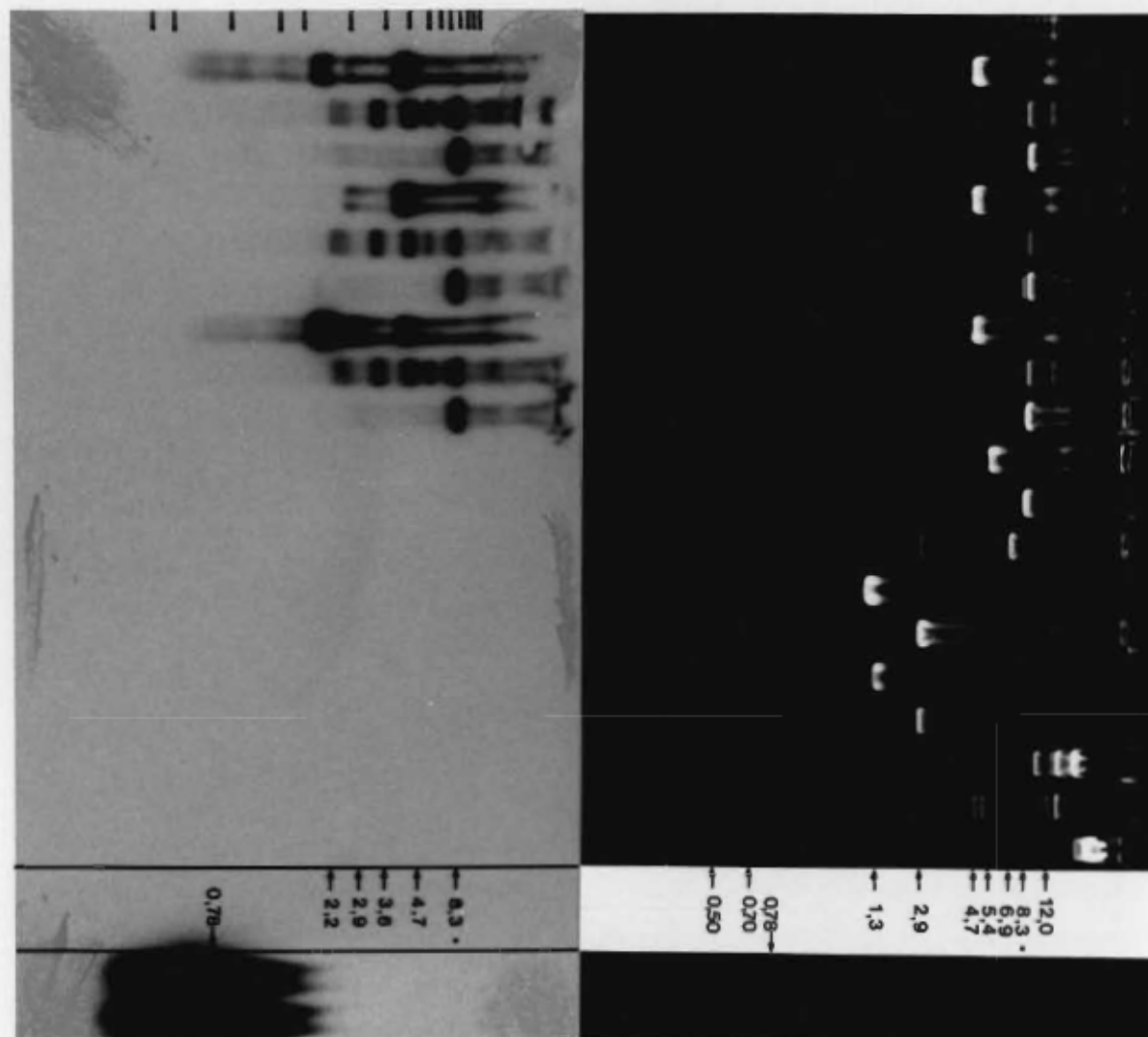


FIGURE 15: Criblage des plasmides recombinants du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR .

Les clones (C et BSM) non-coupés et coupés par les enzymes PvuI, PstI et PstI-XbaI ont été transférés sur membrane de nylon par "Southern blot" et hybridés à la sonde TR6.

- M Marqueur de taille (Kilopaires de bases : Kpb)
- TR6 Fragment polyédrine du VPNLd.TR amplifié par PCR
et signal correspondant sur l'autoradiogramme.
- US Fragment polyédrine du VPNLd.US amplifié par PCR
et signal correspondant sur l'autoradiogramme.



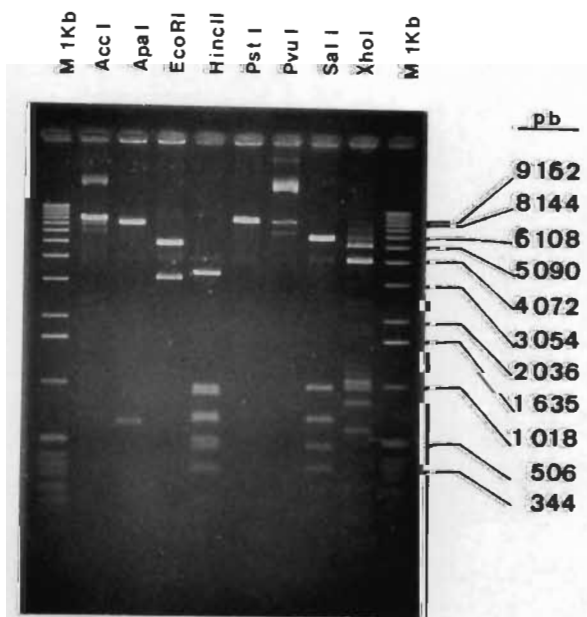
M 1Kb
 C 54-1
 C 54-1 / Pvu I
 C 54-1 / Pst I
 C 54-2
 C 54-2 / Pvu I
 C 54-2 / Pst I
 C 54-3
 C 54-3 / Pvu I
 C 54-3 / Pst I
 C 59
 C 59 / Pvu I
 C 59 / Pst I
 BSM 24
 BSM 24 [Pst I Xba I]
 BSM 34
 BSM 34
 λ Pvu I
 λ Pst I
 λ Xba I

TR6
 US

FIGURE 16 : Profil de restriction du clone 54 (C54-1).

Ce clone est coupé par huit enzymes de restriction ne reconnaissant qu'un site unique dans le vecteur de clonage pour chaque enzyme utilisée.

pb : paires de bases



Taille des fragments obtenus (pb)

Acc I	Apa I	Eco RI	Hinc II	Pst I	Pvu I	Sal I	Xho I
8 144	7 400	5 090	3 550	8 144	8 144	5 500	5 100
	700	3 100	1 000			990	1 100
			900			725	1 018
			750(2)			475	800
			506			320	600
			450				
			320				
			200				
			150				
8 144	8 100	5 190	8 576	8 144	8 144	8 010	8 618

III.3.3 Positionnement et orientation des constituants du

clone C54 : Les résultats de l'amplification effectuée par 35 cycles de PCR sur le clone C54, utilisant une réaction d'amplification pour chaque orientation possible des amorces 1 et 2 (respectivement homologues à une portion du brin positif et du brin négatif de l'insert), sont présentés à la figure 17.

L'électrophorégramme des fragments obtenus démontre l'amplification à partir des amorces situées à l'intérieur du gène (amorces 1 et 2) dans les deux orientations possibles. Les distances séparant l'amorce universelle F des oligonucléotides amorces 1 et 2 sont respectivement de 1 550 pb et 2 500 pb, alors que pour l'amorce universelle R ces distances sont respectivement de 1 100 pb et 2 700 pb .

Enfin, nos résultats démontrent que l'insert libéré par clivage à l'aide des enzymes PstI et BamHI, situé en aval du site PstI sur le plasmide, présente une taille d'approximativement 5 300-5 500 pb.

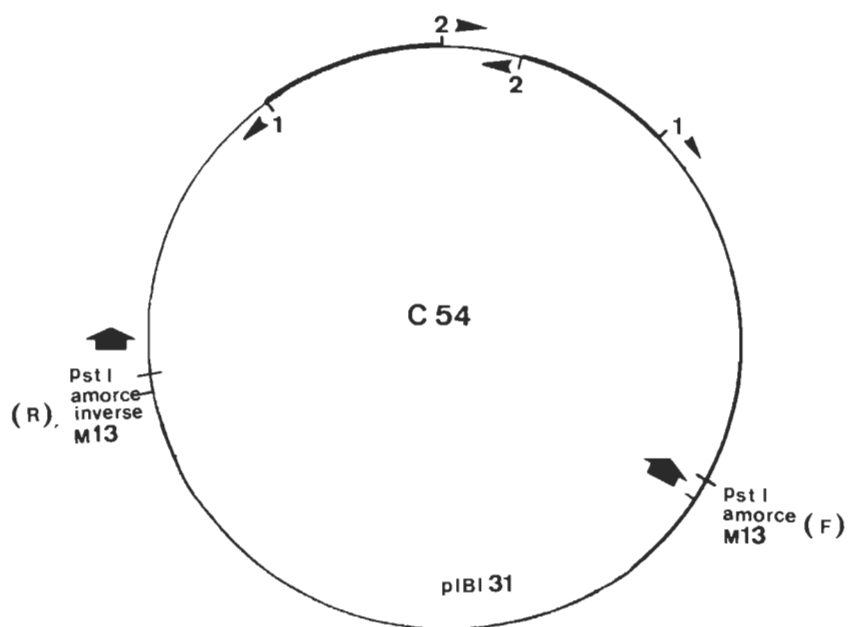
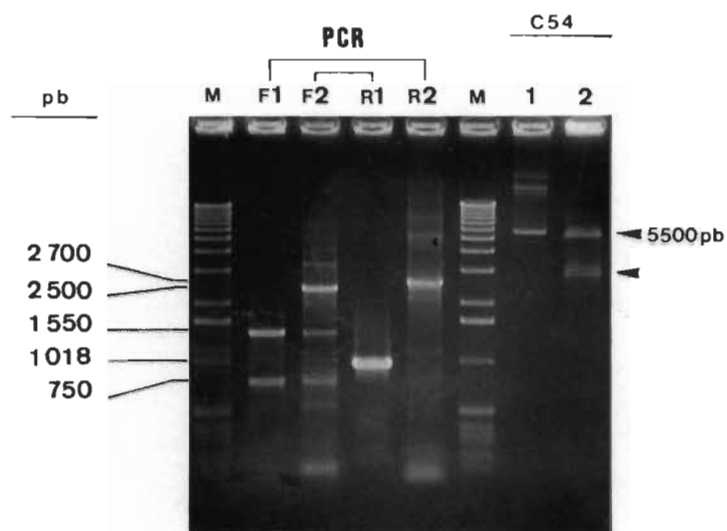
FIGURE 17 : Positionnement et orientation du fragment d'ADN contenant le gène de la polyédrine du VPnLd inséré au site PstI du pIBI31 .

Le positionnement et l'orientation sont déterminés par le rapport des distances approximatives (pb) et le sens d'élongation entre des amorces universelles (F:forward, R:reverse) et les oligonucléotides amorces 1 et 2 (voir Fig.6).

- M Marqueur de taille (paires de bases : pb)
- F1 Amplification de l'amorce F vers l'amorce 1
- F2 Amplification de l'amorce F vers l'amorce 2
- R1 Amplification de l'amorce R vers l'amorce 1
- R2 Amplification de l'amorce R vers l'amorce 2

- C54 1 Clone 54 non-coupé
- C54 2 Clone 54 coupé par les endonucléases PstI et BamHI .

► Plasmide pIBI31 linéarisé



III.3.4 Séquence partielle du gène codant pour la polyé-

drine du VPNLd.TR: Le séquençage du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR effectué sur le plasmide recombinant C54-1 a permis d'élaborer la séquence partielle présentée à la figure 18. La séquence du cadre de lecture ouvert de 740 nucléotides (nt) présumés pour le gène de la polyédrine du VPNLd.TR présente plus de 98% d'homologie avec la séquence alignée du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.US publiée par Smith et al. (1988).

Il est évident que la comparaison définitive de la composition en acides aminés entre le produit du gène de la polyédrine du VPNLd.TR et celui du VPNLd.US sera seulement possible lorsque le séquençage du gène aura été réalisé sur les deux brins.

FIGURE 18 : Séquence nucléotidique partielle du gène de la polyédrine du Virus de la Polyédrose Nucléaire de Lymantria dispar , souche Trois-Rivières (VPNLd.TR).

Les boîtes représentent la position des amorces utilisées pour le séquençage.

TR séquence du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR

US séquence du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.US (Smith et al., 1988)

• positionnement des différences de séquences nucléotidiques.

———— Portion non-séquencée du VPNLd.TR

Les bases supplémentaires de la séquence US sont représentées sous le nucléotide le précédent.

TR (1)
US

```

-23 55AAAAATCA AATACACCTT AAAATG
      ATGCACA ACTTTTACAA CTACAGCCCC

26  -----A AAACCTACGT GTACGACAAT AAGTATTACG AAGGCTTGGG
      GCCCTGGGCA AAACCTACGT GTACGACAAT AAGTATTACA AAAACTTGGG

76  CACGCTGATC AAACAGGCCA AGCGCCAAAA GCACCTTGGAA CAGCAGGAGA
      CACGCTGATC AAACAGGCCA AGCGCCAAAA GCACCTTGGAA CAGCAGGAGA

126 TCGAGGAGCG CACGCTCGAC CACCTCGACC GGTACTTGGT GGTTCGAGGA
      TCGAGGAGCG CACGCTCGAC CACCTCGACC GGTACTTGGT GGC-CGAGGA

176 TCCCCTTCTA CCGGCCCGGC AAAAATCAGA AACTCTCTCT CTTCAAAGAG
      -CCCCTTCTA CCGGCCCGGC AAAAATCAGA AACTCTCTCT CTTCAAAGAG

226 ATGCAATGT CAAGCCCGAC ACGATGAGC TGGTGGTCAA CTGGAGCGGC
      ATGCAATGT CAAGCCCGAC ACGATGAGC TGGTGGTCAA CTGGAGCGGC
      C

276 AAAGATTTTC TCAGGAGAGC TTGGACCCGC TTCATGAGGA CAGCTTCCCC
      AAAGATTTTC TCAGGAGAGC TTGGACCCGC TTCATGAGGA CAGCTTCCCC
      G

326 ATGTTCAACG ACCAGGAAGT GATGGACATT TATCTCAGCA TCAGGTGGG
      ATGTTCAACG ACCAGGAAGT GATGGACATT TATCTCAGCA TCAGGTGGG

376 CCCACCAAG CCCACAGAT GCTACAGTT -----
      CCCACCAAG CCCACAGAT GCTACAGTT CGTGGCGCAG CACGCGCTGC

426 -GGT-C-ACGAGGAGGCTACGTCGGC-ACGA GGTGATCCG ATGTTGGAGC
      -GGTCC-ACGAGGAGGCTACGTCGGC-ACGA GGTGATCCG ATGTTGGAGC

476 CTTCCAGGCT CGAGAACAAC GAGTACAGGA TTAGCCTGGC TAAGCGAGGC
      CTTCCAGGCT CGAGAACAAC GAGTACAGGA TTAGCCTGGC TAAGCGAGGC

526 GGCCTCTGTC CCATCAGGAA CTTCACAGC GCGT-ACGACCTGTTTCAGC
      GGCCTCTGTC CCATCAGGAA CTTCACAGC GCGTAAACGACCTGTTTCAGC

576 ACTTCTCAA CTCCGTCAT CTGGGACAAC TTCTACAAGC CCATGTTGTA
      ACTTCTCAA CT-CGTCAT CTGGGACAAC TTCTACAAGC CCATGTTGTA

626 CGTGGGCACG ACCTCCGCC AGGAGGAGGA GATCTCTCTC GAGGTCTGCT
      CGTGGGCACG ACCTCCGCC AGGAGGAGGA GATCTCTCTC GAGGTCTGCT

676 TGGTGTTCAG GATCAAGGAG TTGCTCC -----
      TGGTGTTCAG GATCAAGGAG TTGCTCCCGC GACGCGCTCT TGTTCAGG

726 -----TAAACGACGA TCGGACTCG A
      ACCGCGTAC TAAACGACGA TCGGACTCG A

```

(1) : SIGNAL D'INITIATION DE LA TRADUCTION (ATG)
TR : SEQUENCE DU GENE DE LA POLYEDRINE DU VPNUd.TR
US : SEQUENCE DU GENE DE LA POLYEDRINE DU VPNUd.US
(SMITH et al., 1988)

//

III.4 Méthode de diagnostic utilisant une sonde spécifique couplée à des échantillons cibles pré-amplifiés :

III.4.1 Spécificité des sondes moléculaires utilisées: La figure 19 démontre la spécificité de la sonde TR6 envers la portion du gène codant pour la polyédrine du VPNLd, les signaux d'hybridation n'étant positifs que pour l'ADN total du VPNLd et le clone C54 contenant le gène de la polyédrine. Nous notons cependant un faible bruit de fond lors de l'hybridation croisée entre la sonde TR6 et le plasmide pIBI31, retrouvé lors de l'hybridation du plasmide (pIBI31) utilisé comme sonde avec l'ADN total du VPNLd. Les signaux obtenus au niveau de l'ADN du VPNLd et du clone C54 à l'aide du pool des sondes TR6, H2 et H3 (POOL) sont amplifiés par rapport aux signaux obtenus à l'aide des sondes uniques. Les sondes H2 et H3, constituées de fragments HindIII du VPNLd.TR (Fig.20), s'hybrident spécifiquement avec l'ADN total du VPNLd, avec le clone C54 et avec l'ADN du vecteur dans lequel ils ont été clonés (pIBI31).

FIGURE 19 : évaluation de la spécificité des sondes moléculaires utilisées pour le développement d'une méthode de diagnostic .

TR6	Fragment amplifié et radio-marqué du gène de la polyédrique du VPNLd.
H2-H3	clones HindIII radio-marqués.
POOL	mélange équimolaire des sondes TR6, H2 et H3
VPC	Virus de la Polyédrose Cytoplasmique
VGPr	Virus de la Granulose de <u>Pieris rapae</u>
VGCf	Virus de la granulose de <u>Choristoneura fumiferana</u>
VPNCv	Virus de la Polyédrose Nucléaire de <u>Cryptothelea varigata</u> (Chine)
VPNBm	VPN de <u>Bombyx mori</u>
VPNMm	VPN de <u>Mamestra</u> sp.
VPNCf	VPN de <u>Choristoneura fumiferana</u>
VPNLd	VPN de <u>Lymantria dispar</u>
C54	Clone 54 (contenant le gène polyédrique du VPNLd)
C59	Clone 59 (fragment PstI de 6 000 pb)
Oligo A	Mélange d'oligonucléotides amorces 1 et 2 (p.71)
* Une quantité de 50 ng de chaque échantillon a été fixée sur membrane de nylon et hybridée aux sondes.	

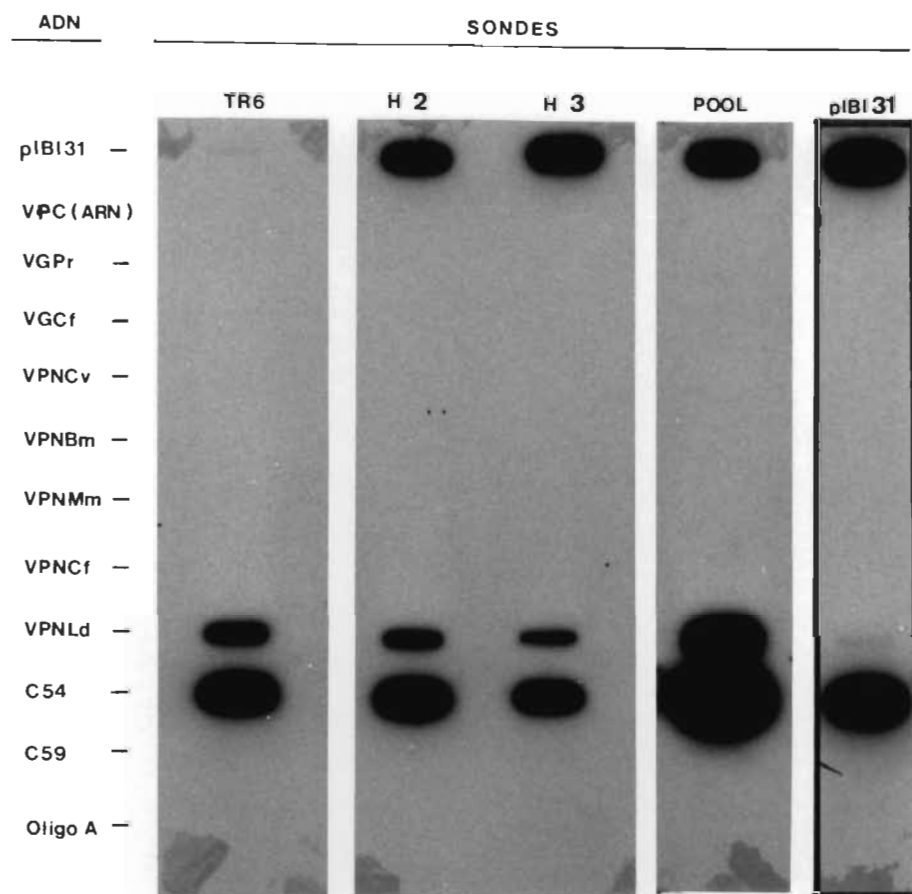


FIGURE 20 : électrophorégramme des plasmides H2 et H3
utilisés comme sondes contrôles lors des essais
de diagnostic.

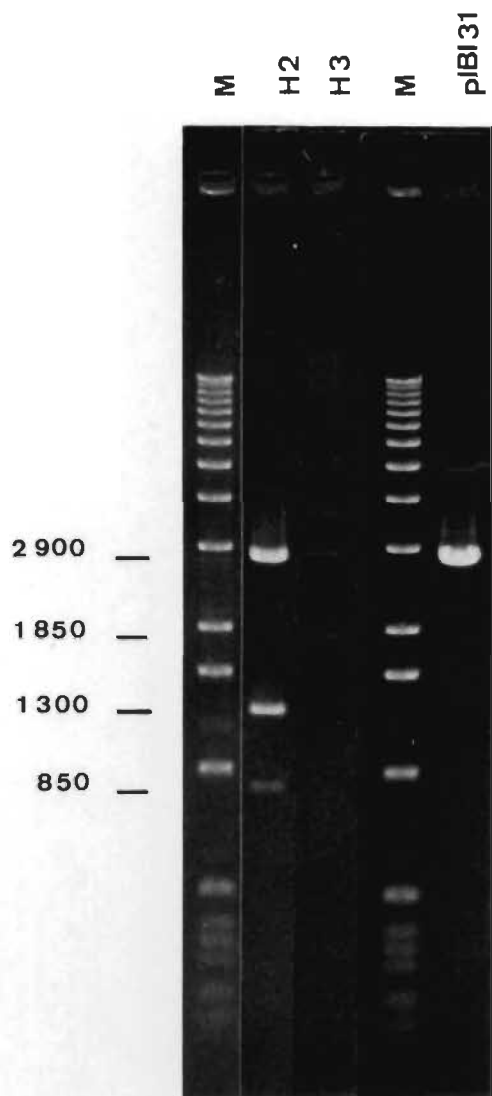
M marqueur de taille (paires de bases : pb)

H2-H3 plasmides recombinants coupés par HindIII (H)

H2 contient deux inserts dont les tailles
respectives sont de 850 et 1 300 pb.

H3 contient un seul insert de 1 850 pb.

pIBI31 vecteur de clonage linéarisé par coupure HindIII



III.4.2 Sensibilité de la méthode couplée : Les signaux de détection obtenus après hybridation des sondes TR6, H2, H3 et du pool des trois sondes (POOL) à des dilutions logarithmiques d'ADN total du VPnLd, comparés aux signaux obtenus après hybridation de la sonde TR6 à des dilutions équimolaires non-amplifiées du fragment polyédrique et amplifiées par 35 cycles de PCR à partir de la limite de détection de la sonde TR6, sont présentés à la figure 21A.

En comparant les méthodes (hybridation à des sondes employées seules ou couplées à des échantillons pré-amplifiés), nous observons une amélioration d'environ 10^6 fois de la limite de détection, qui passe de 10^8 molécules à 10^2 molécules lorsque l'ADN est pré-amplifié avant l'hybridation à la sonde TR6.

La limite de détection des sondes employées seules est comparable entre elles lorsqu'hybridées à l'ADN total (10^8 molécules). Cependant la différence de limite de détection obtenue par hybridation de la sonde TR6 avec l'ADN total du VPnLd et avec l'ADN du fragment polyédrique amplifié est de l'ordre de 1 log, soit de 10^7 molécules et 10^8 molécules respectivement.

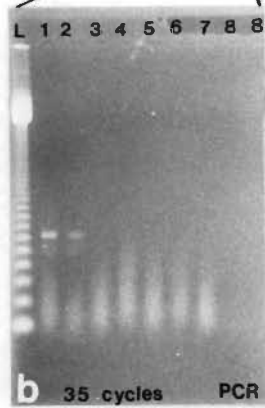
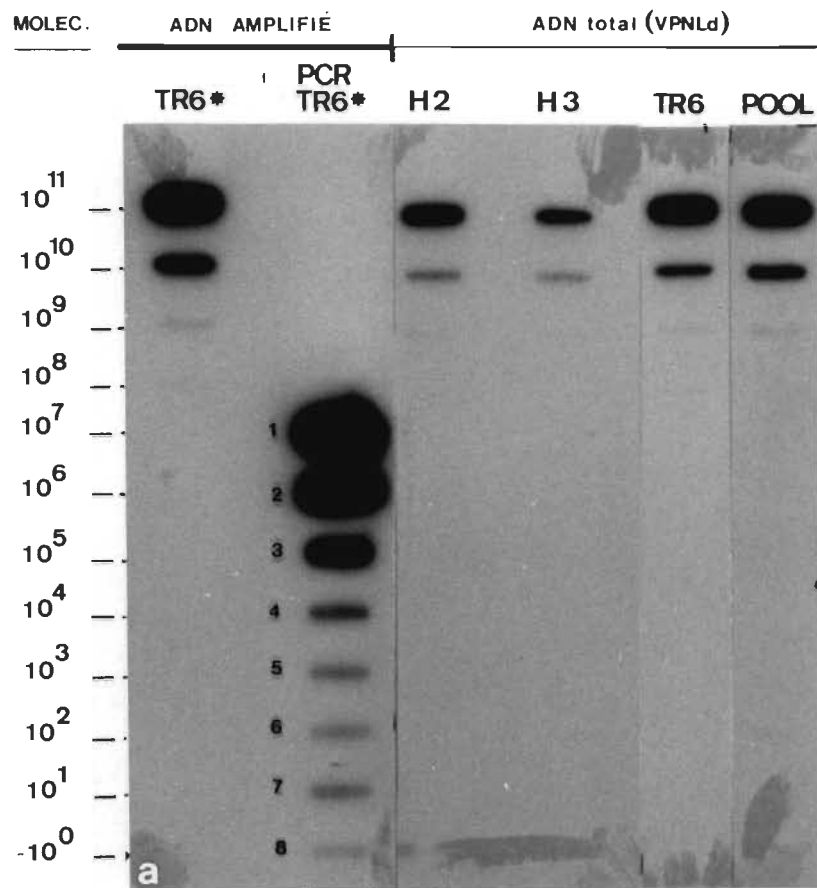
Il est intéressant de souligner que les dilutions limites de 10^7 molécules et 10^6 molécules d'ADN peuvent être détectées sur électrophorégramme après 35 cycles d'amplification PCR (Fig.21B). Cela nous indique, par correspondance à la figure 21A (piste TR6*), que la détection visuelle sur électrophorégramme permet une détection limite de la cible d'ADN amplifiée supérieure de deux log à la détection obtenue sur autoradiogramme à l'aide de la sonde TR6 hybridée aux mêmes échantillons, et de quatre log inférieure à la détection de la même sonde hybridée à des échantillons pré-amplifiés (Fig.21A, piste PCR-TR6).

FIGURE 21: évaluation de la sensibilité de la méthode de diagnostic utilisant une sonde spécifique couplée à des échantillons pré-amplifiés par PCR .

A Limites de détection comparées entre l'hybridation des sondes employées seules et la sonde TR6* utilisée sur des dilutions limites d'ADN pré-amplifié

MOLEC. Dilutions logarithmiques du nombre de molécules d'ADN fixé.

B électrophorégramme des dilutions limites d'ADN (1-8) amplifiés par 35 cycles de PCR



III.4.3 Diagnostic de la virose au VPNLd : Les essais de détection de la présence du VPNLd à l'intérieur d'échantillons biologiques ont été effectués par hybridations moléculaires à la sonde spécifique TR6 et aux sondes contrôles H2, H3 et du pool des trois sondes (POOL). Les résultats présentés à la figure 22 démontrent la présence du virus dans les échantillons provenant des régions du Sud-Ouest du Québec, de l'Ontario et dans les échantillons de la région de Trois-Rivières (Québec). Nous devons cependant noter que la faible incidence des populations de spongieuses au Québec entre les années 1986 et 1988 ne permet pas d'être catégorique sur la dispersion réelle du VPNLd. Le faible signal observé après hybridation de la sonde H2 et du pool de sondes à un échantillon d'excréments serait probablement dû à l'hybridation du fragment de la sonde H2 à une séquence répétitive n'ayant pas une spécificité absolue pour l'ADN du VPNLd.

Les résultats des épreuves diagnostiques effectuées au cours de toutes nos expériences sont résumés à la figure 23 représentant la carte de dispersion du VPNLd détecté par hybridation moléculaire dans les populations de spongieuses échantillonnées au cours des années 1986 à 1988. Les échantillons provenant des régions ci-haut mentionnées, ainsi que de la région de New Paltz (NY, USA) se sont avérés positifs à l'hybridation moléculaire de nos sondes, marquant la présence du virus à l'intérieur de ces populations de spongieuses.

FIGURE 22: Détection de l'ADN du VPNLd par hybridation aux sondes moléculaires.

Les sondes utilisées sont identifiées par :
TR6, H2, H3 et POOL (mélange des trois sondes).

L'absence de signaux, lors de l'hybridation des échantillons de larves et d'excréments aux différentes sondes, a été vérifiée par hybridation de la sonde TR6 aux mêmes échantillons pré-amplifiés par 35 cycles de PCR (TR6-PCR) .

* Diagnostiqué en microscopie photonique ou électronique .

Témoin positif : larve virosée au VPN et vérifiée par
microscopie électronique (*).

échantillons L : larves
O : oeufs
X : excréments

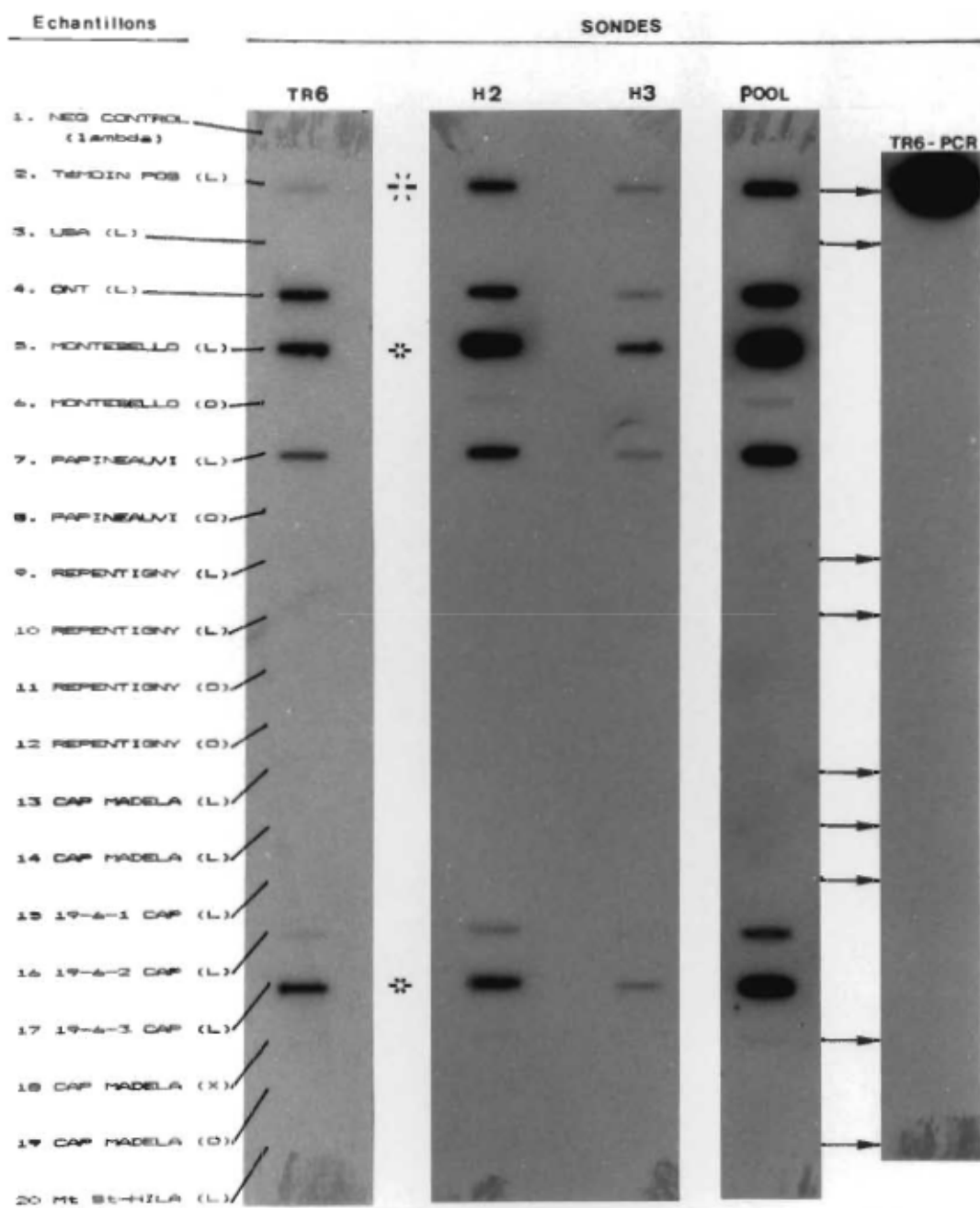


FIGURE 23: Carte relatant la dispersion géographique du VPNLd dans les populations de spongieuses échantillonnées en 1987 et 1988.

- 1 Cap de la Madeleine (Trois-Rivières)
- 2 Berthier
- 3 Repentigny
- 4 Montebello
- 5 Papineauville
- 6 Gatineau
- 7 Sault Ste-Marie
- 8 Mont St-Hilaire
- 9 New-York (U.S.A.)
- E Population élevée de larves de spongieuses

Les régions encerclées correspondent aux sites d'échantillonnage où la présence du virus a été détectée.



III.4.4 évaluation de la latence et de la persistance du

VPNLd chez les oeufs de Lymantria dispar:

Lors de l'hybridation moléculaire de la sonde TR6 aux échantillons d'oeufs de différentes régions, nous avons observé un signal positif sur l'échantillon provenant de Montebello (Fig.22). Comme il est possible de le constater à la figure 24, le signal d'hybridation est absent sur la partie des masses d'oeufs stérilisées au préalable (T) et présent sur la partie non-stérilisée du même échantillon (N). De plus, l'échantillon stérilisé et amplifié donne un signal d'hybridation faible, alors que le même échantillon non-stérilisé et amplifié présente un signal très évident.

FIGURE 24: Évaluation de la latence et de la persistance du VPNLd chez les oeufs de Lymantria dispar à l'aide de sondes moléculaires couplées au PCR.

Cette méthode utilise la sonde TR6, spécifique au gène de la polyédrine du VPNLd, hybridée à des broyats de masses d'oeufs pré-amplifiés par 35 cycles de PCR .

N. Masses d'oeufs non traitées.

T. Masses d'oeufs stérilisées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 3%.

N.PCR échantillons non traités et pré-amplifiés.

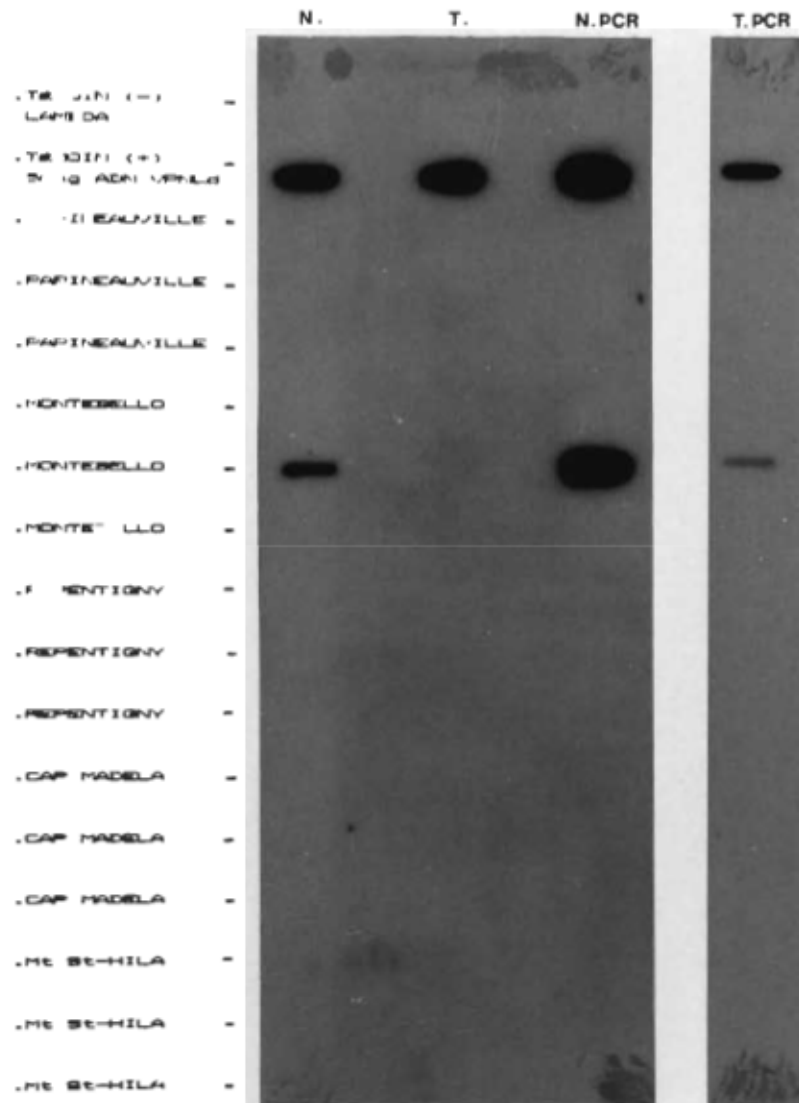
T.PCR échantillons stérilisés et pré-amplifiés.

Cap Madela : Région de Cap de la Madeleine (Trois-Rivières, Québec).

Mt St-Hila : Région de Mont St-Hilaire (Québec).

MASSSES D'OEUFs

35 CYCLES



III.4.5 Purification de l'ADN viral du VPNLd à l'aide du

lysozyme: Les résultats obtenus pour la purification de l'ADN du VPNLd à l'aide de Protéinase K-SDS 5%, du mélange protéinase K-lysozyme-SDS 5%, du lysozyme couplé au SDS 5% et du SDS 5% employé seul, sont présentés à la figure 25A.

Tous les produits utilisés sont adéquats pour la purification de l'ADN viral (Fig.25A). Cependant, les quantités d'ADN viral libérées par le lysozyme (LS) et par le SDS seul (S) semblent plus grandes que celles libérées par la méthode conventionnelle utilisant comme réactifs la protéinase K couplée au SDS 5% (KS). Cette différence apparaît aussi lorsque le lysozyme est ajouté aux réactifs de la méthode conventionnelle (KLS). Par contre, les échantillons traités à la protéinase K ne semblent pas être affectés d'une quelconque activité DNasique causant la dégradation partielle de l'ADN, ce qui semble être le cas des échantillons traités à l'aide de lysozyme et de SDS (LS et S) où l'on remarque l'apparition d'une traînée suivant le sens de migration de l'ADN.

L'hybridation de la sonde TR6 avec les dilutions semi-logarithmiques des échantillons d'ADN purifiés par les différentes méthodes (Fig.25B) démontre que la quantité d'ADN libérée à l'aide du lysozyme est environ dix fois plus grande

que les quantités d'ADN libérées à l'aide des autres produits. Cela est mis en évidence en comparant l'intensité des signaux obtenus pour une dilution d'ADN purifié à l'aide de lysozyme par rapport aux dilutions correspondant à un signal d'intensité équivalente pour l'ADN purifié par les autres méthodes. Par exemple, le signal obtenu pour une dilution à 0,03 % de volume initial d'ADN purifié par LS correspond à un signal d'intensité équivalente pour une dilution à 0,31 % de volume d'ADN purifié par les autres méthodes.

Il est cependant important de souligner que la limite de détection de la sonde n'est pas augmentée et correspond pour tous les échantillons à une dilution à 0,01 % de volume d'ADN purifié selon les différentes méthodes.

FIGURE 25 A: ADN du VPNLd purifié à l'aide de protéinase K (K), Lysozyme (L) et SDS 5% (S) à partir du broyat d'un lot commun de trois larves virosées.

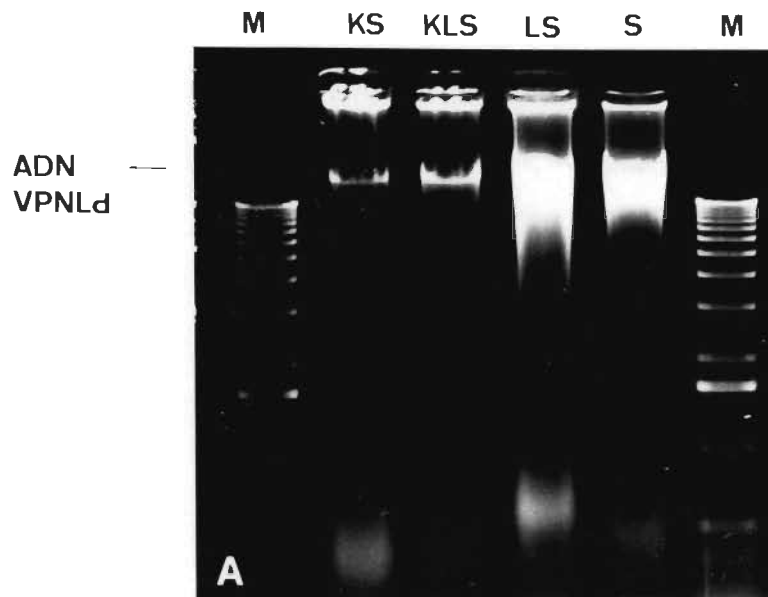
Le même échantillon de larves a été utilisé pour les différentes méthodes de purification de l'ADN viral.

FIGURE 25 B: évaluation de la limite de détection de la sonde TR6 hybridée à des dilutions d'ADN viral préparé à l'aide de protéinase K (K), Lysozyme (L) et SDS 5% (S).

* Les dilutions ont été effectuées par pourcentage de volume d'ADN purifié :

100,00 % : 40,00 µl

31,60 % : 12,64 µl

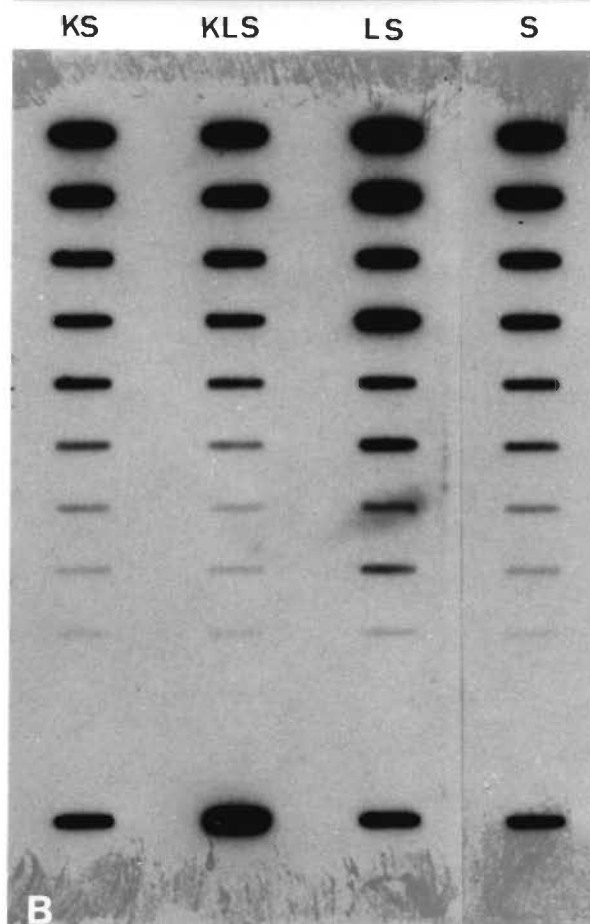


ECHANTILLONS
D'ADN FIXE (%)

100,00 —
31,60 —
10,00 —
3,16 —
1,00 —
0,31 —
0,10 —
0,03 —
0,01 —

TEMOIN ⊕ —

TEMOIN ⊖ —



DISCUSSION

L'infection double naturelle observée chez certaines larves de notre échantillon provenant de la région de Trois-Rivières (Québec) n'est pas un phénomène unique. Chez les lépidoptères, l'infection naturelle par des Virus de la Polyédrose nucléaire est souvent accompagnée de l'infection par d'autres petits virus (Charpentier et al., 1987; Hess et al., 1977; Moris et al., 1979, 1981; Vail et al., 1983). La fréquence d'apparition de ces infections fortuites de même nature dans une population larvaire déterminée semble cependant assez faible, ce qui rend plus difficile l'isolement et la caractérisation de ces petits virus.

Il semble toutefois possible que de petits virus, tel que celui observé dans nos échantillons, puissent persister dans l'environnement. Nos résultats démontrent d'ailleurs que les caractéristiques morphologiques du virus intracytoplasmique observé chez les cellules de la ligné Euxoa scandens (Fig.7), infectées expérimentalement à l'aide d'hémolymphe contaminée provenant de larves de Lymantria dispar virosées au VPN

échantillonnées à Trois-Rivières en 1986, sont très similaires à celles du virus décrit par Charpentier et collaborateurs (1987), dans les tissus de larves de L. dispar échantillonnées en 1982 dans la même région.

Ce type de particule virale est apparenté, par ses caractéristiques morphologiques, aux Picornaviridae et aux Nodaviridae. De plus, ces virus ont tous deux une affinité particulière pour le tissu adipeux des larves (Garzon et al., 1978; Charpentier et al., 1987). Cependant, la symétrie polymorphe de certaines particules virales présentant des arêtes (Fig.7C), ainsi que la taille moyenne des particules observées (25 nm), suggère une plus grande similitude avec les picornavirus d'insectes et d'animaux (18-29 nm).

L'observation de deux bandes d'ARN sur l'électrophorogramme de la préparation de VPnLd contaminée (Fig.9), suggère par contre une plus grande similarité avec l'arrangement du génome à deux fragments monocaténares d'ARN des Nodaviridae qu'avec le génome à ARN monocaténaire des Picornaviridae.

Ce type de virus retrouvé dans les population de L. dispar au Québec fait présentement l'objet d'essais de caractérisation physico-biochimique (Charpentier et al., 1987).

Nos résultats suggèrent que la lignée Es (IAFEs-1), permissive à la réplication du petit virus et non-permissive au VPN (Fig.7), pourrait être utilisée afin d'isoler et d'amplifier ce petit virus des larves doublement contaminées.

Les essais d'infection in vitro chez les différentes lignées de cellules de lépidoptères inoculées à l'aide de virions purifiés de VPNLd.TR ont démontré (Tableau I.), que seules les cellules de la lignée Cf-124 permettent, en conditions standards d'infection (Annexe 7), la formation de polyèdres intranucléaires (Fig.9B et C). Ces cellules permissives présentaient, lors de l'infection, tous les signes caractérisant une infection à VPN au niveau cellulaire : arrondissement des cellules, hypertrophie du noyau, disparition des nucléoles (lorsque visibles), apparition d'inclusions nucléaires caractéristiques et lyse des parois cellulaires (Sohi S.S., communication personnelle, 1989). L'absence de formation de polyèdres chez les autres lignées cellulaires infectées ne signifie pas pour autant qu'il y ait absence de réplication virale.

De plus, l'observation d'effets cytopathiques chez ces cellules (Es et Ld) n'est pas une évidence de leur permissivité pour le virus. Dwyer (1988) a d'ailleurs émis l'hypothèse de la présence probable d'une protéine associée au VPNAc, qui serait cytotoxique et cytolytiques pour les cel-

lules de Pieris rapae. Un phénomène semblable pourrait être pris en considération afin d'expliquer l'apparition d'effets cytopathiques en absence de synthèse de polyèdres chez les cellules Es et Ld en contact prolongé d'une période de cinq jours avec le VPNLd.TR.

L'absence d'infection des cellules pré-cultivée ou conservées à 4° et 37°C (Tableau I.), y compris chez la lignée Cf-124 considérée permissive, s'explique par la sénescence rapide des cellules cultivées à températures élevées (observée chez les cellules témoins), et par le ralentissement du métabolisme cellulaire à 4°C. Ces variations, affectant l'état des cellules, auraient comme répercussion de ralentir la synthèse d'enzymes cellulaires thermosensibles jouant probablement un rôle dans la réplication du virus, telles l'ADN polymérase, la thymidine kinase, la DNase, la transcriptase, ordinairement actives chez les cellules infectées au VPN à 28°C (Kelly, 1981; Miller et al., 1981; Wang et al., 1983; Moore et al., 1987; Knittel et Fairbrother, 1987).

Un stress quelconque des cellules pourrait aussi expliquer l'absence d'infection. Il a déjà été émis l'hypothèse que les propriétés et l'état du substrat cellulaire utilisé influencent la réplication du VPN in vitro (Milténburger et al., 1984; Goodwin et al., 1978; Lynn et Hink, 1980).

en phase de croissance logarithmique (section II.2.3.2) peut avoir causé le déphasage de la division cellulaire affectant ainsi leur susceptibilité envers le virus. Il est d'ailleurs connu que le taux de croissance cellulaire a une influence particulière sur la permissivité des cellules pour les baculovirus (Braun et Faulkner, 1975; Stockdale et Gardiner, 1977; Lynn et Hink, 1978; Wood et al., 1982; Nakagaki et al., 1987).

Il se peut que la solubilisation alcaline de la matrice protéique majeure (section II.1.3.4) ait causée un changement d'antigénicité des protéines natives à la surface des virions libérés, provoquant ainsi l'insensibilité des cellules envers le virus. Cette hypothèse a déjà été soulevée lors de comparaisons sérologiques de préparations de baculovirus (Dicapua et Norton, 1976). Il semblerait de plus que la solubilisation alcaline puisse dégrader l'ADN viral (Knudson et Tinsley, 1978), ce qui modifierait irréversiblement les propriétés d'une préparation de virus initialement infectieuse. Enfin, il n'est pas exclus que le faible pouvoir d'infection du VPNLd soit attribuable à l'ADN même du virus. Malgré des essais répétés, nos travaux n'ont pas permis de trouver une lignée cellulaire hautement permissive au VPNLd bien qu'un certain taux d'infection ait été obtenu.

Le profil des sites de restriction de l'ADN du VPNLd provenant des états-Unis (US), de l'Ontario (ONT) et de Trois-Rivières, Québec (TR), démontre qu'il existe une hétérogénéité génétique entre les isolats des différentes régions (Fig.10 et 11). Les différences mineures obtenues pour les profils BglII et PstI (Fig.11) identifient chacun des variants génétiques par la présence de bandes surnuméraires absentes chez le virus type (US). L'apparition d'un fragment surnuméraire BglII de 4 600 pb et le repositionnement des fragments de 8 500 pb et 8 200 pb caractérisent l'isolat ONT du VPNLd par rapport aux isolats US et TR du même virus. De la même façon, l'isolat TR se distingue des autres isolats par un fragment surnuméraire PstI de 4 100 pb .

Il n'est pas certain que le profil de fragmentation de l'ADN de chaque isolat de VPN corresponde au profil d'ADN du type sauvage de chaque isolat. Cependant, les fragments surnuméraires d'ADN caractérisant les isolat TR et ONT pourraient correspondre à des modifications génétiques viables et conservées permettant l'adaptation du virus à un hôte plus nordique. Dans ce cas , les variants génétiques de chaque population virale seraient sujets à la sélection naturelle des types les mieux adaptés, et seraient plus fréquents sinon plus visibles dans la population.

L'intérêt des analyses de restriction réside dans le fait qu'elles peuvent être utilisées comme alternative aux méthodes d'identification et de caractérisation de l'isolat viral d'origine en plus d'être utilisées comme moyen de détection et d'identification des modifications génétiques pouvant se produire après l'introduction de ce virus dans une population d'insectes. La variabilité génétique, étant un phénomène répandu chez les baculovirus (Smith et Crook, 1988), doit être étudiée sérieusement chez les isolats de VPNLd ayant un potentiel d'utilisation contre les insectes ravageurs. Il va de soi que les propriétés génétiques d'une préparation virale, employée comme insecticide biologique, doivent être connues et faire l'objet d'un contrôle de qualité rigoureux, afin d'éviter tout relargage de virus ayant subi des mutations ou des recombinaisons indésirables.

L'amplification enzymatique du gène codant pour la polyédrine des VPNLd.US et TR à l'aide d'amorces oligonucléotidiques homologues aux deux séquences nous a permis de constater que la taille des fragments correspondants était identique (Fig.12). Cependant, le profil de restriction comparatif des gènes amplifiés démontre des différences entre la taille des fragments générés par *AluI* et *ApaI* (Fig.13). De plus, nos résultats démontrent que le gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR est localisé sur un fragment *PstI* d'environ 5 300 pb (Fig.14).

Ceci diffère des résultats obtenus par Smith et al. (1988), ayant localisé le gène à l'intérieur d'un fragment PstI de 2 300pb. Les résultats de l'amplification PCR du clone C54, correspondant au fragment PstI d'environ 5 300 pb, obtenus à l'aide des amorces (1 et 2) homologues aux extrémités du cadre de lecture du gène de la polyédrine du VPNLd.TR et des amorces universelles M13, suggèrent la présence de deux gènes de la polyédrine inversement orientés à l'intérieur du même insert.

Il semble donc possible que l'isolat du VPNLd.TR soit caractérisé par la présence de deux gènes codant pour la polyédrine inversement orientés sur le génome et localisés à environ 1 500 pb de chaque extrémités du fragment PstI d'une taille de 5 300 pb. Aucun arrangement similaire du gène n'a été décrit dans la littérature jusqu'à présent pour le VPNLd ou d'autres VPN. Par contre, l'obtention de mutants (naturels ou induits) dans la région codante du gène responsable du codage des polyèdres d'un autre virus d'insecte (Virus de la Polyédrose Cytoplasmique) a été rapportée (Arella et al., 1988).

étant donné la libération de plus d'un fragment lors de la digestion du plasmide recombinant C54 par l'endonucléase PstI, nos résultats ne démontrent pas la possibilité que ce clone puisse correspondre à un dimère de deux fragments PstI

d'une taille approximative de 2 650 pb. Par ailleurs, aucun fragment de cette taille ne s'est auparavant hybridé spécifiquement au gène amplifié et marqué, utilisé comme sonde.

La possibilité d'un tel arrangement impliquerait l'expression simultanée des gènes inversement orientés et le partage de séquences homologues en aval des codons de terminaison. Dans un cas semblable, la séquence apparaîtrait comme un palindrome de très grande taille.

Afin de déterminer l'orientation et le nombre de copies du gène à l'intérieur du clone C54 et du fragment PstI élué, il serait intéressant de vérifier si les bandes obtenues par amplification dans les deux orientations s'hybrident, après transfert de l'électrophorégramme, au gène de la polyédrine amplifié et radio-marqué. De plus, il serait possible de vérifier la présence de deux gènes inversés sur le génome en employant qu'une seule des deux amorces homologues aux extrémités du gène lors de l'amplification enzymatique sur l'ADN natif du VPnLd.TR. L'amplification entre les amorces identiques hybridées sur chacun des brins de l'ADN viral, en supposant qu'il s'agisse d'un mutant ayant deux gènes identiques inversement orientés, ferait apparaître un fragment de taille proportionnelle à la distance séparant les extrémités identiques de chaque copie de gène.

Dans le cas contraire, l'amplification n'aurait pas lieu. Quoiqu'il en soit, l'arrangement théorique proposé pour le double gène inversé de la polyédrine du VPNLd pourrait permettre la fabrication d'un vecteur d'expression doublement efficace à la condition de conserver les régions promotrices ainsi que la séquence entière située en aval des signaux de terminaison.

La séquence partielle du gène codant pour la polyédrine du VPNLd.TR a été obtenue par la réaction de séquençage de Sanger (1977) du clone C54 à l'aide de 6 amorces homologues aux séquences internes et aux séquences des extrémités du cadre de lecture présumé (Fig.18). Cette séquence démontre une homologie de plus de 98% avec la séquence alignée du gène de la polyédrine du clone g du VPNLd.US publiée par Smith et al. (1988). Comme le cadre de lecture du gène partiellement séquencé de notre isolat du VPNLd ne peut être établi avec certitude jusqu'à vérification des séquences complètes, nous ne pouvons nous prononcer sur les différences relevées jusqu'à présent. Cependant, la très grande homologie observée entre les séquences alignées démontre que la sonde TR6 et le clone 54-1, correspondant au gène de la polyédrine du VPNLd.TR, peuvent être utilisés de façon fiable dans le diagnostic des épizooties au VPNLd. L'hybridation non-spécifique de ces sondes en conditions strictes est quasi inexistante. Cela a d'ailleurs été démontré pour la sonde TR6 (Fig.19).

L'amélioration des préparations de baculovirus ayant une utilité potentielle dans le contrôle des insectes nuisibles, nécessite une meilleure connaissance des interactions hôte-virus en nature, ainsi que de l'interaction des parasites de l'hôte avec le virus. De plus, il est nécessaire d'avoir des outils nous permettant d'évaluer de façon précise l'efficacité et la persistance dans l'environnement de telles préparations biologiques. Il va de soi d'ajouter, qu'une même méthode de diagnostic devrait permettre d'effectuer des études épidémiologiques sur les populations cibles d'insectes afin de détecter de nouveaux isolats viraux potentiellement plus efficaces ou plus spécifiques pour la lutte biologique contre les insectes ravageurs d'essences économiquement importantes.

Dans cette optique, nous avons mis au point une méthode de détection sensible et spécifique pour le VPNLd, par le couplage de la technique d'hybridation moléculaire à la réaction d'amplification enzymatique par PCR.

Nos résultats démontrent que la sonde TR6, correspondant au gène de la polyédrine du VPNLd.TR, est spécifique à la détection de l'ADN du VPNLd (Fig.19). Il est à noter que les sondes H2, H3 (Fig.19 et 20) et le pool des trois sondes (H2, H3 et TR6: POOL) ont aussi été choisis comme témoins lors des essais d'hybridation pour leur spécificité envers l'ADN du VPNLd.TR.

L'autoradiogramme de l'évaluation de la limite de détection de la sonde TR6 couplée à des échantillons d'ADN pré-amplifiés montre que la sensibilité de détection est améliorée d'environ 10^4 fois par rapport à la limite de détection obtenue par hybridation de la même sonde à des échantillons d'ADN non-amplifiés (Fig.21).

Cela suggère que la méthode couplée permet de détecter aussi peu que 100 molécules du gène de la polyédrine dans un échantillon cible. Des résultats similaires ont été obtenus par Steffan et Atlas (1988) lors d'essais de détection du Pseudomonas cepacia à l'aide de la même méthode, et par Syvänen et al. (1988) lors d'essais de détection et de quantification des produits de l'amplification par PCR à partir de l'ADN du Cytomégalo virus (CMV) utilisé comme standard cible.

Les essais de détection de la présence du virus dans les populations de larves de spongieuses, et la vérification des échantillons négatifs à l'hybridation des sondes employées seules, effectuée par la méthode couplée, ont démontré que le virus était présent dans certains des échantillons de larves et d'oeufs de spongieuses provenant de populations élevées échantillonnées en 1986, 1987 et 1988 (Fig.22, 23 et 24), alors que le virus était absent ou faiblement présent dans les populations à faible densité larvaire.

Cette observation appuie l'hypothèse de Doane, décrite par Murray et Elkinton (1989), suggérant que l'incidence de l'infection au VPN est dépendante de la densité de population de l'hôte.

Dans un autre ordre d'idée, Woods et Elkinton (1987) stipulent que l'incidence d'infection serait dépendante de la présence de virus latent dans la population. A ce sujet nous avons démontré, à l'aide de la méthode d'hybridation couplée, que l'hypothèse de la latence chez le VPNLd serait inexacte. Selon nous, il s'agirait plutôt de persistance du virus, transmis lors de la ponte, à la surface des oeufs.

Nous avons observé que l'ADN témoin traité de la même façon que les oeufs (Fig.24), soit par stérilisation à l'aide d'hypochlorite de sodium, donne un signal avant et après amplification. Alors que le signal présent pour les oeufs stérilisés et amplifiés est absent pour les oeufs stérilisés non-amplifiés. A partir de ces seules observations nous pourrions conclure qu'il puisse inévitablement s'agir de latence. Cependant, l'hypochlorite de sodium a la propriété de ne dégrader que partiellement l'ADN et les mêmes signaux faibles sont retrouvés après l'hybridation de la sonde TR6 aux échantillons d'ADN témoins et d'oeufs stérilisés et amplifiés.

Le signal obtenu pour l'ADN témoin traité et non amplifié suggère que la méthode de stérilisation de surface des oeufs n'est pas assez efficace pour ne pas induire de faux positifs lorsque la méthode de diagnostic couplée est utilisée. Cela implique aussi que les méthodes de stérilisation de surface des oeufs devront être révisées afin d'éviter toute contamination persistante du VPN à la surface des oeufs de spongieuse utilisés en élevage.

La méthode d'hybridation d'une sonde moléculaire spécifique couplée à des échantillons pré-amplifiés, est pour l'instant trop coûteuse pour être utilisée à grande échelle (pour des études d'épidémiologie par exemple). Cependant, il est possible d'obtenir à meilleurs coûts des informations très précises à l'aide des méthodes d'hybridation conventionnelles.

Nos travaux sur les méthodes de purification de l'ADN du VPNLd à l'aide de protéases et de SDS (Fig.25A) montrent que le lysozyme, utilisé selon la méthode décrite à la section II.4, est une alternative à l'utilisation de la protéinase K.

Il semble que l'activité enzymatique du lysozyme soit plus efficace et puisse produire la libération d'environ dix fois plus d'ADN viral à moindre coût que la protéinase K (Fig.25B).

Il est connu que le lysozyme hydrolyse les liens β -1,4 des mucopolysaccharides entre l'acide N-acétyl muramique et la N-acétyl- β -D-glucosamine. Le lysozyme est couramment utilisé dans les méthodes d'extraction et de lyse de bactéries comme E. coli (Haas et Dowding, 1975). L'enzyme hydrolyse la paroi constituée de peptidoglycan. Son activité hydrolytique chez le VPNLd est cependant très surprenante, car moins de 50% des protéines des baculovirus sont glycosylées. Par ailleurs, la littérature ne fait pas mention de l'emploi du lysozyme dans les méthodes de purification des acides nucléiques viraux.

Il se pourrait que l'un des sites actifs du lysozyme chez les VPN soit situé sur une protéine structurale majeure de la nucléocapside ou sur les DNP (désoxynucléoprotéines), sites qui ne seraient pas reconnus par la protéinase K. Dans le dernier cas, les DNP non-hydrolysés ne permettraient pas la libération de l'ADN lié. De cette façon, lors de l'extraction des protéines, l'ADN coprécipiterait en même temps que la protéine dans la phase organique alors que le lysozyme hydrolyserait les liens entre la protéine et les acides nucléiques, permettant de récupérer la portion d'ADN auparavant précipité.

Il serait possible de vérifier cette hypothèse en hybridant l'ADN viral, utilisé comme sonde, à des dilutions identiques de chacune des phases organiques utilisées pour l'extraction des protéines des échantillons d'ADN purifié à l'aide de protéinase K et de lysozyme.

CONCLUSION

Il a été démontré, lors des essais d'infection in vitro, que la lignée cellulaire Cf-124 présente les caractéristiques de permissivité à la réplication du VPNLd.TR dans les conditions standards d'infection (28°C, adsorption de 60 min. à 5j., milieu de culture complet additionné de 10% SVF, cellules en phase de division logarithmique).

La lignée cellulaire IAFEs-1 a permis de mettre en évidence la présence d'un petit virus à réplication cytoplasmique. Ce petit virus à double ARN est apparenté par sa forme et sa taille au petit virus mis en évidence par Charpentier et al. (1987). Nos résultats démontrent que la lignée IAFEs-1, permissive à la réplication du petit virus et non-permissive à la réplication du VPNLd, pourrait être utilisée afin d'isoler, de mieux caractériser et de vérifier l'inocuité de ce petit virus retrouvé lors d'infections doubles naturelles dans la population de larves de Lymantria dispar de la région de Trois-Rivières.

L'analyse qualitative de l'ADN de notre isolat du Virus de la Polyédrose Nucléaire de L. dispar (VPNLd.TR), par comparaison aux ADN des isolats du VPNLd.US et VPNLd.ONT, a révélé l'existence d'une hétérogénéité génétique entre eux. Un fragment surnuméraire PstI de 4 100 pb caractérise le profil de restriction de l'ADN de notre isolat. De plus, le profil de l'ADN fragmenté du VPNLd.ONT est caractérisé par la présence d'un fragment surnuméraire BglII de 4 600 pb. Nos résultats suggèrent que l'hétérogénéité génétique du VPNLd, observé entre les isolats des différentes régions, correspondrait à une adaptation différentielle du virus liée à la dispersion géographique de son hôte.

La mise en évidence, chez le VPNLd.TR, de la présence de deux gènes codant pour la polyédrine inversement orientés à l'intérieur d'un fragment PstI de 5 300 pb, indique qu'il puisse s'agir d'un mutant naturel. D'ailleurs plusieurs différences majeures ont été observées par rapport aux données disponibles pour le VPNLd.US, tant au niveau de la localisation du gène que de son orientation, du nombre de copies par génome et quelques sites de restriction internes. L'analyse de restriction du fragment PstI de 5,3 Kb du génome total et sa comparaison au fragment de même taille du clone C54 seraient justifiées.

La séquence partielle du cadre de lecture du gène de la polyédrine du VPNLd.TR a démontré une homologie de plus de 98% avec la séquence du clone g de Smith et al. (1988). La séquence devra cependant être complétée sur les deux brins afin de valider nos résultats et déterminer la séquence en acides aminés correspondants.

Nos travaux concernant l'élaboration d'une méthode de diagnostic utilisant une sonde moléculaire couplée à des échantillons pré-amplifiés par PCR s'est avérée sensible et spécifique à la détection du VPNLd. Cette méthode a permis de vérifier la validité des résultats lors de l'étude de dispersion du virus. A ce propos, nous avons démontré que le VPNLd était présent dans les populations denses de spongieuses échantillonnées en 1986, 1987 et 1988 dans les régions de Trois-Rivières, de l'Outaouais, de Sault Ste-Marie et de New Paltz (NY, USA).

De plus, la méthode de diagnostic couplée (sonde-PCR), nous a permis de démontrer qu'il y a persistance du VPNLd à la surface de quelques échantillons d'oeufs contaminés et absence de latence. Dans ce dernier cas, nos résultats suggèrent que la méthode de stérilisation de surface des oeufs, à l'aide d'hypochlorite de sodium, n'est pas assez efficace pour ne pas induire de faux positifs lorsque la méthode de diagnostic couplée est utilisée.

Enfin, le lysozyme utilisé lors de l'étape de purification de l'ADN viral, s'est avéré plus efficace et moins coûteux que la protéinase K . Cependant, la présence de DNases restreint son utilisation parce qu'on ne peut inactiver les DNases sans inactiver l'enzyme . Il se pourrait que l'un des sites attaqués par le lysozyme chez les VPN soit situé sur les désoxynucléoprotéines , libérant ainsi une plus grande quantité d'ADN et évitant, lors de l'étape d'extraction, la coprécipitation de ce dernier avec les protéines vers la phase organique .

Les travaux présentés dans ce mémoire démontrent qu'il existe des variations intraspécifiques des isolats du Virus de la Polyédrose Nucléaire de Lymantria dispar. L'utilisation de ces virus pour la lutte biologique doit s'appuyer sur une connaissance précise et sur l'exploitation de cette diversité biologique. Cette exploitation ne peut être réalisée efficacement sans outils spécifiques et sensibles pour la détection du virus ou de ses variants potentiellement mieux adaptés pour lutter contre la spongieuse.

Il va de soi que les coûts afférents à l'exploitation d'insecticides biologiques, soit à la production, aux études d'épidémiologie et au diagnostic, devront être pris en considération.

BIBLIOGRAPHIE

- Agriculture Canada. 1986. La spongieuse ravageur des forêts et des arbres d'ornement. (Publication 1811/B) . Ottawa, Canada.
- Aifu L., Q. Junchuan, C. Rankin, S.E. Hardin et R.F. Weaver. 1986. Nucleotide Sequence of a portion of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome containing the EcoRI site-rich region (hr5) and an open reading frame just 5' of the p10 gene. J. Gen. Virol. 67 : 2565-2570.
- Alain R.. 1985. étude comparée, en microscopie électronique, du virus du crapet Arlequin et de la rubéole. Mémoire de maîtrise M027 . Institut Armand Frappier, Université du Québec. pp. 37-39.
- Alam M.Z., W.C. Yearian, S.Y. Young et A.J. Mueller. 1987. Soybean foliage consumption by Pseudoplusia includens (Walker)(Lepidoptera:Noctuidae) larvae infected with nuclear polyhedrosis virus. J. Entomol. Sci. 22 : 212-223.
- Andrews D.L., B. Beames, M.D. Summers et W.D. Park. 1988. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculo-virus vector. Biochem J. 252 : 199-206.
- Arella M.. 1983. Réplication en culture cellulaire du virus de la polyédrose cytoplasmique (VPC) d'Euxoa scandens Riley (Noctuidae:Agrotinae). Thèse D.004, Institut Armand Frappier, Université du Québec. pp. 38-56.

- Arella M., S. Belloncik, G. Charpentier et J.P. Bourassa. 1986. études sur le baculovirus de Lymantria dispar. Communication présentée à la 2^e Conférence Internationale des Entomologistes d'expression française. U.Q.T.R. Juillet 1986. Résumé de la communication no. 42.
- Arella M., C. Lavallée, S. Belloncik et Y. Furuichi. 1988. Molecular cloning and characterization of cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin and viable deletion mutant gene. J. Virol. 62 : 211-217.
- Arif B.M., S.T. Tija et W. Doerfler. 1985. DNA homologies between the genome of Choristoneura fumiferana and Auto-grapha californica nuclear polyhedrosis viruses. Virus Res. 2 : 85-94.
- Arif B.M.. 1986. The structure of viral genome. In: Doerfler W. et P. Böhm (Eds.), Current topics in microbiology and immunology: The molecular biology of baculoviruses. Berlin: Springer-Verlag. pp. 21-30.
- Beames B. et M.D. Summers. 1988. Comparison of host cell DNA insertions and altered transcription at the site of insertions in few polyhedra baculovirus mutants. Virology 162 : 206-220.
- Beames B. et M.D. Summers. 1989. Location and nucleotide sequence of the 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants. Virology 168 : 344-353.
- Beaton C.D. et B.K. Filschle. 1976. Comparative ultrastructural studies of insect granulosis and nuclear polyhedrosis viruses. J. Gen. Virol. 31 :151-161.
- Belloncik S., J.M. Quiot, M. Arella et J. Lecomte. 1982. Establishment of continuous cell line of Euxoa scandens (Lepidoptera:Noctuidae:Agrotinae). In vitro 18 : 261-330
- Bicknell J.N., D.J. Leisy, G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1987. Comparison of the p26 gene region of two baculoviruses. Virology 161 : 589-592.
- Biggin M.D., T.J. Gibson et G.F. Hong. 1983. Buffer gradient gels and ³²S label as an aid to rapid DNA sequence determination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 3963-3967.
- Billimoria S.L. et S.S. Sohi. 1977. Development of an attached strain from a continuous insect cell line. In vitro 13 : 461-466.

- Birnboim H.C. et J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7 : 1513.
- Blumenthal E.M. et C.R. Hoover. 1986. Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) population control using mechanical barriers and contact insecticides applied to tree stems. J. Econom. Entomol. 79 : 1394-1396.
- Brown M. et P. Faulkner. 1975. Factors affecting the yield of virus in a cloned cell line of Trichoplusia ni infected with a nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 26 : 251-257.
- Bud H.M. et D.C. Kelly. 1977. The DNA contained by the nuclear polyhedrosis viruses isolated from four Spodoptera spp. (Lepidoptera: Noctuidae), genome size and configuration assessed by electron microscopy. J. Gen. Virol. 37 : 135-143.
- Bud H.M. et D.C. Kelly. 1980. An electron microscope study of partially lysed baculovirus nucleocapsids: the intranucleocapsid packaging of viral DNA. J. Ultrastr. Res. 73 : 361-368.
- Burgues H.D.. 1986. Production and use of pathogens to control insect pests. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. : 127S-137S.
- Burgues S.. 1977. Molecular weights of lepidopterans baculovirus DNA's: derivation by electron microscopy. J. Gen. Virol. 37 : 501-510.
- Burley K., A. Miller, K.A. Harrap et D.C. Kelly. 1982. Structure of the baculovirus nucleocapsid. Virology 120 : 433-440.
- Busslinger M., J. Hurst et R.A. Flavell. 1983. DNA methylation and regulation of globin gene expression. Cell 34 : 197-206.
- Bustos M.M., V.A. Luckow, L.R. Griffing, M.D. Summers et T.C. Hall. 1988. Expression, glycosylation and secretion phaseolin in a baculovirus system. Plant Molec. Biol. 10 : 475-488.
- Carbonell L.F., M.J. Klowden et L.K. Miller. 1985. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipterian and mammalian cells. J. Virol. 56 : 153-160.

- Carbonell L.F. et L.K. Miller. 1987. Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines. *Appl. Environm. Microbiol.* 53 : 1412-1417.
- Carbonell L.F. et L.K. Miller. 1987. Genetic engineering of viral pesticides: expression of foreign genes in non permissive cells. In: Liss A.R. (Ed.), *Molecular strategies for crop protection*. New York pp. 235-242
- Carruthers W.R., J.S. Cory et F.P. Entwistle. 1988. Recovery of pine beauty moth (Panolis flammea) nuclear polyhedrosis virus from pine foliage. *J. Invertebr. Pathol.* 52 : 27-32.
- Carson D.D., L.A. Guarino et M.D. Summers. 1988. Functional mapping of an AcNPV immediately early gene which augments expression of the IE-1 *trans*-activated 39K gene. *Virology* 162 : 444-451.
- Carstens E.B.. 1987. Identification and nucleotide sequence of the regions of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome carrying insertion elements derived from Spodoptera frugiperda. *Virology* 161 : 8-17.
- Charpentier G., J.P. Bourassa, C. Hébert, S. Garzon et H. Strykowski. 1987. Mise en évidence d'une nouvelle particule virale intracytoplasmique chez les larves de Lymantria dispar (Lepidoptera:Lymantriidae). *C.R. Acad. Sci. Paris t.305 série III* : 83-88.
- Chen C.A. et H. Okoyama. 1988. Calcium phosphate-mediated gene transfer: A high efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques* 6 : 632-638.
- Chisholm G.E. et D.J. Henner. 1988. Multiple early transcripts and splicing of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J. Virol.* 62 : 3193-3200.
- Chisholm D. et G. Symonds. 1988. Transfection of myeloid cell lines using polybrene/DMSO. *Nucl. Acids Res.* 16 : 2352.
- Chung K.L., M. Brown et P. Faulkner. 1980. Studies on the morphogenesis of polyhedral inclusion bodies of a baculovirus Autographa californica NPV. *J. Gen. Virol.* 46 : 335-347.

- Cochran M.A. et P. Faulkner. 1983. Location of homologous DNA sequences interspersed at five regions in the baculovirus AcNPV genome. *J. Virol.* 45 : 961-970.
- Cochran M.A., B.L. Ericson, J.D. Knell et G.E. Smith. 1987. Use of baculovirus recombinants as a general method for the production of subunit vaccines. In: Cold Spring Harbor (Ed.). Vaccines 87: baculovirus insect cell expression. New York: Cold Spring Harbor. pp. 384-388.
- Crawford A.M. et L.K. Miller. 1988. Characterization of an early gene accelerating expression of late genes of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 62 : 2773-2781.
- Croizier G.. 1984. Les Apports de la biologie moléculaire à la connaissance des baculovirus et leurs conséquences sur la lutte virologique contre les insectes nuisibles. *Bull. Soc. Entomol. France* (extrait), tome 89 pp. 137-146.
- Croizier G., J.M. Quiot, S. Paradis et B. Amiri. 1986. Comparaison de la composition génétique de trois isolats de baculovirus de la polyédrose nucléaire du lépidoptère Spodoptera littoralis. *Entomophaga* 31 : 385-392.
- Cunningham J.C.. 1988. Baculoviruses: their status compared to Bacillus thuringiensis as microbial insecticides. *Outlook on Agriculture* 17 : 10-17.
- Devauchelle G.. 1988. Les baculovirus des insectes: intérêt et perspectives. *Annls Soc. Ent. Fr. (N.S.)* 24 : 403-406.
- DiCapua R.A. et P.W. Norton. 1976. Immunochemical characterization of the baculoviruses: present status. In: Kurstak E. et K. Maramorosch (Eds.), Invertebrate tissue culture: Applications in medicine, biology, and agriculture. New York: Academic Press. pp. 317-330.
- Diekmann S.. 1987. DNA methylation can enhance or induce DNA curvature. *EMBO J.* 6 : 4213-4217.
- Doane C.C.. 1969. Trans-ovum transmission of a nuclear polyhedrosis virus in the gypsy moth and the inducement of virus susceptibility. *J. Invertebr. Pathol.* 14 : 199-210.
- Dobos P. et A. Cochran. 1980. Protein synthesis in cells infected by Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (Ac-NPV): the effect of cytosine arabinoside. *Virology* 103 : 446-464.

- Doerfler W.. 1986. Expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome in insect cells: homologous viral and heterologous vertebrate genes - The baculovirus vector system. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 131 : 51-68.
- Dwyer K.G.. 1988. Establishment of cell lines from *Pieris rapae* embryos: Characterization and susceptibility to baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.* 52 : 268-274.
- Dwyer K.G. et R.R. Granados. 1988. Mapping *Pieris rapae* granulosis virus transcripts and their *in vitro* translation products. *J. Virol.* 62 : 1535-1542.
- Elleman C.J., P.F. Entwistle et S.R. Hoyle. 1980. Application of the impression film technique to counting inclusion bodies of nuclear polyhedrosis viruses on plant surfaces. *J. Invertebr. Pathol.* 36 : 129-132.
- Entwistle P.F., J.S. Cory et C. Doyle. 1988. An overview of insect baculovirus ecology as a background to field release of a genetically manipulated nuclear polyhedrosis virus. In: Klingmüller W. (Ed.), Risk assessment for deliberate releases. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp.73-80.
- Esser K. et G. Dohmen. 1987. Drug resistance genes and their use in molecular cloning. *Proc. Biochem.* Oct. 1987: 144-148.
- Faulkner P., M. Brown et K.N. Potter. 1976. Utilization of tissue culture techniques to clone an insect cell line and to characterize strains of baculovirus. In: Kurstak E. et K. Maramorosch (Eds.), *Invertebrate tissue culture: Application in medicine, biology, and agriculture*. New-York: Academic Press. pp. 347-360.
- Faulkner P. et E.B. Carstens. 1986. An overview of the structure and replication of baculoviruses. In: Doerfler W. et P. Böhm (Eds.), *Current topics in microbiology and immunology: The molecular biology of baculoviruses*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 1-20.
- Federici B.A. 1986. Ultrastructure of Baculoviruses. In : Granados R.R. et B.A. Federici (Eds), *The biology of Baculoviruses : Biological properties and molecular biology*. Floride: CRC Press, Inc. pp. 61-88.

- Feinberg A.P. et B. Vogelstein. 1983. A technique for radio-labelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132 : 6-13
- Felton G.W., S.S. Duffey, P.V. Vail, H.K. Kaya et J. Manning. 1987. Interaction of nuclear polyhedrosis virus with cathecols: potential incompatibility for host-plant resistance against noctuid larvae. *J. Chem. Ecol.* 13 : 947-957.
- Flore P.H., J.P. Burand, R.R. Gettig et H.A. Wood. 1987. Characterization of DNA polymerase activity in *Trichoplusia ni* cells infected with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 68 : 2025-2031.
- Fraser M.J., G.E. Smith et M.D. Summers. 1983. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *J. Virol.* 47 : 287-291.
- Fraser M.J.. 1986. Transposon mediated mutagenesis of baculoviruses: Transposon shuttling and implications for speciation. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 79 : 773-783.
- Friesen P.D. et L.K. Miller. 1985. Temporal regulation of baculovirus RNA: overlapping early and late transcripts. *J. Virol.* 54 : 392-400.
- Friesen P.D. et L.K. Miller. 1987. Divergent transcription of early 35- and 94-Kilodalton protein genes encoded by the HindIII K genome fragment of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 61 : 2264-2272.
- Fuch L.Y., M.S. Woods et R.F. Weaver. 1983. Viral transcription during *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection: a novel RNA polymerase induced in infected Spodoptera frugiperda cells. *J. Virol.* 48 : 641-646.
- Furlong A.M., D.R. Thomsen, K.R. Marotti, L.E. Post et S.K. sharma. 1988. Active human tissue plasminogen activator secreted from insect cells using a baculovirus vector. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10 : 454-464.
- Garzon S., G. Charpentier et E. Kurstak. 1978. Morphogenesis of the Nodamura virus in the larvae of the lepidopteran Galleria mellonella (L.). *Arch. Virol.* 56 : 61-76.

- Guarino L.A. et M.D. Summers. 1987. Functionnal mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J. Virol.* 57 : 563-571.
- Guarino L.A. et M.D. Summers. 1987. Nucleotide sequence and temporal expression of a baculovirus regulatory gene. *J. Virol.* 61 : 2091-2099.
- Guarino L.A. et M.D. Summers. 1988. Functional mapping of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus genes required for late gene expression. *J. Virol.* 62 : 463-471.
- Gettig R.R., J.P. Burand, P.H. Flore, W.J. McCarthy et H.A. Wood. 1987. Replication of Heliothis zea nuclear polyhedrosis virus in insect cell culture: virus-induced and structural proteins. *J. Gen. Virol.* 68 : 1617-1625.
- Giese N., M. May-Siroff, W.J. LaRochelle, K. Van Wyke Coelingh et S.A. Aaronson. 1989. Expression and purification of biologically active v-sis/Platelet-derived Growth Factor B protein by using a baculovirus vector system. *J. Virol.* 63 : 3080-3086.
- Gonnet P. et G. Devauchelle. 1987. Obtention par recombinaison dans le gène du polypeptide p10 d'un baculovirus exprimant le gène de résistance à la néomycine dans les cellules d'insecte. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 305, série III : 111-114.
- Goodwin P.A. et K.S. Shields. 1984. Effects of Blepharipa pratensis [Dip.:Tachinidae] on the pathogenicity of nuclear polyhedrosis virus in stage V of Lymantria dispar [Lep.: Lymantriidae]. *Entomophaga* 29 : 381-386.
- Goodwin R.H., G.J. Tompkins et P. McCawley. 1978. Gypsy moth lines divergent in viral susceptibility I. Culture and identification. *In Vitro* 14 : 485-494.
- Goodwin R.H. et J.R. Adams. 1980. Nutrient factors influencing viral replication in serum-free cell line culture. In: Kurstak/Maramorosch/Dübendorfer (Eds.), *Invertebrate systems in vitro*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp.493-509.
- Grace T.D.C.. 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature (London)* 195 : 788.

- Granados R.R.. 1980. Infectivity and mode of action of baculovirus. *Biotechnol. Bioeng.* XXII : 1377-1405
- Granados R.R. et B.A. Federici. 1986. The biology of baculoviruses: Biological properties and molecular biology. Vol. I-II C.R.C. Press Inc. Floride, USA. pp. 1-36.
- Groner A.. 1987. Massenproduktion von baculoviren (in vivo und in vitro) und aspekte der kommerzialisierung von viruspreparaten. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 52 (2a): 139-145.
- Guarino L.A., M.A. Gonzales et M.D. Summers. 1986. Complete sequence of the homologous DNA regions of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 60 : 224-229.
- Guarino L.A. et M.D. Summers. 1988. Functional mapping of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genes required for late gene expression. *J. Virol.* 62 : 463-471.
- Haas M.J. et J.E. Dawding. 1965. Aminoglycoside-modifying enzymes. In: Hash J.H. (ed.), *Methods in enzymology* V.XLIII. New York: Academic Press. pp. 621.
- Harmon S.A., J.M. Johnston, T. Ziegelhoffer, O.C. Richards, D.F. Summers et E. Ehrenfeld. 1988. Expression of hepatitis A virus capsid sequences in insect cells. *Virus Res.* 10 : 273-280.
- Harrap K.A.. 1972 The structure of nuclear polyhedrosis viruses II. The virus particle. *Virology* 50 : 124-132.
- Harrap K.A. et J.F. Longworth. 1974. An evaluation of purification methods for baculovirus. *J. Invertebr. Pathol.* 24: 55-62.
- Harrap K.C., C.C. Payne et J.S. Robertson. 1977. The properties of three baculoviruses from closely related hosts. *Virology* 79 : 14-31.
- Hattman S.. 1982. DNA methyltransferase-dependent transcription of the phege Mu *mom* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5518-5521.

- Hausser C., H. Fusswinkel, J. Li, C. Oellig, R. Kunze, M. Müller-Neumann, M. Heinlein, P. Starlinger et W. Doerfler. 1988. Overproduction of the protein encoded by the maize transposable element Ac in insect cells by a baculovirus vector. *Mol. Gen. Genet.* 214 : 373-378.
- Hébert C., J.P. Bourassa, G. Charpentier et S. Garzon. S.D. Conditions écologiques favorisant le développement d'épizooties virales chez les larves de Lymantria dispar L. (Lepidoptera:Lymantriidae) dans la région de Cap-de-la-Madeleine, Québec. Article en révision
- Hébert C. 1983. Bio-écologie et contrôle naturel d'une population de Lymantria dispar L. (Lepidoptera:Lymantriidae) de la Mauricie, Québec. Thèse de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières, 231 p.
- Heimpel A.M. et J.R. Adam. 1966. A new nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, Trichoplusia ni. *J. Invertebr. Pathol.* 8 : 340
- Hess R.T., M.D. Summers, L.A. Falcon et D.B. Stoltz. 1977. A new icosahedral insect virus: Apparent mixed nuclear infection with the baculovirus of Autographa californica. *IRCS Med. Sci.* 5 : 562.
- Hess R.T. et L.A. Falcon. 1978. Electron microscope observations of the membrane surrounding polyhedral inclusion bodies of insects. *Arch. Virol.* 56 : 169-176.
- Himeno M., F. Sakai, K. Onodera, H. Nakai, T. Fukada et Y. Kawade. 1967. Formation of nuclear polyhedral bodies and nuclear polyhedrosis virus of silkworm in mammalian cells infected with viral DNA. *Virology* 33 : 507-512.
- Hink W.F., E.M. Strauss et W.A. Ramoska. 1977. Propagation of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in cell culture: methods for infecting cells. *J. Invertebr. Pathol.* 30 : 185-191.
- Hooft Van Iddekinge B.J.L., G.E. Smith et M.D. Summers. 1983. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 131 : 561-565.
- Howard S.C., M.D. Ayres et R.D. Possee. 1986. Mapping the 5' and 3' ends of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus polyhedrin mRNA. *Virus Res.* 5 : 109-119.

- Huber J.. 1988. Safety of baculovirus used as biological insecticides. In: Klingmüller W. (Ed.), Risk assessment for deliberate releases: The possible impact of genetically engineered microorganisms on the environment. Berlin: Springer-Verlag. pp. 65-71.
- Hughes P., F.Z. Squali-Houssaini, P. Foterre et M. Kohiyama. 1984. In vitro replication of a *dam* methylated and non-methylated *ori-C* plasmid. J. Mol. Biol. 176 : 155-159.
- Ignoffo C.M., M.E. Martignoni et J.L. Vaughn. 1983. A comparison of the US (Gypchek) and the USSR (Virin-Ensh) preparations of the nuclear polyhedrosis virus of the gypsy moth, Lymantria dispar. USDA Projet no. V-01.0705 : 1-64.
- Ignoffo C.M. et A.H. McIntosh. 1987. Effects of alkali and gut juices on the in vivo and in vitro infectivity of virions obtained from occlusion bodies and from the supernatant of virus-infected tissue culture. J. Invertebr. Pathol. 50 : 324-326.
- Ignoffo C.M. et A.H. McIntosh. 1988. Low temperature stability of baculovirus virions from tissue culture and from inclusion bodies. J. Invertebr. Pathol. 51 : 304-306.
- Jewell J.E. et L.K. Miller. 1980. DNA sequence homology relationships among six lepidopteran nuclear polyhedrosis viruses. J. Gen. Virol. 48 : 161-175.
- Jobin L.. 1979. La spongieuse installée au Québec pour y rester. La Presse 18 Août 1979 : A14-A15.
- Ju G., C. Miyamoto, J. Farrell-Towt, M.D. Summers et G. Smith. 1987. Use of the baculovirus-insect cell expression system. In: Cold Spring Harbor Laboratory (Ed.), Current Communications in molecular biology: Gene transfer vectors for mammalian cells. New York: Cold Spring Harbor. pp. 39-45.
- Kaplan M.M., T.J. Wiktor, R.F. Maes, J.B. Campbell et H. Coprowski. 1967. Effect of polyions on the infectivity of rabies virus in tissue culture: construction of a single-cycle growth curve. J. Virol. 1 : 145-151.
- Kelly D.C.. 1977. The DNA contained by nuclear polyhedrosis viruses isolates from four Spodoptera sp. (Lepidoptera:-Noctuidae) : genome size and homology assessed by DNA reassociation kinetics. Virology 76 : 468-471.

- Kelly D.C.. 1981. Baculovirus replication: stimulation of thymidine kinase and DNA polymerase activities in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 52 : 313-319.
- Kelly D.C.. 1982. Baculovirus replication (review article). *J. Gen. Virol.* 63 : 1-13.
- Kelly D.C.. 1985. The structure and physical characteristics of baculoviruses. In: Maramorosch K. et K.E. Sherman (Eds.), *Viral insecticides for biological control*. New York: Academic Press. pp. 469-488.
- Knebel D. H. Lübbert et W. Doerfler. 1985. The promoter of the late p10 gene in insect nuclear polyhedrosis virus *Autographa californica*: activation by viral gene products and sensitivity to DNA methylation. *EMBO J.* 4 : 1301-1306.
- Knell J.D. et M.D. Summers. 1984. A physical map for the *Heliothis zea* SNPV genome. *J. Gen. Virol.* 65 : 445-450.
- Knittel M.D. et A. Fairbrother. 1987. Effects of temperature and pH on survival of free nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 2771-2773.
- Knudson D.L. et T.W. Tinsley. 1974. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: purification, assay of infectivity, and growth characteristics of the virus. *J. Virol.* 14 : 934-944.
- Knudson D.L. et T.W. Tinsley. 1978. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell line of *Spodoptera frugiperda*: Partial characterization of the viral DNA, comparative DNA-DNA hybridization, and patterns of DNA synthesis. *Virology* 87 : 42-57.
- Koltunow A.M., K. Gregg et G.E. Rogers. 1987. Promoter efficiency depends upon intragenic sequences. *Nucl. Acids Res.* 15 : 7795-7807.
- Kozlov E.A., T.L. Levitina et N.M. Gusak. 1986. The primary structure of baculovirus inclusion body protein. Evolution and structure-function aspects. In: Doerfler W. et P. Böhn (Eds.), *Current topics in microbiology and immunology: The molecular biology of baculoviruses*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 135-164.

- Kumar S. et L.K. Miller. 1987. Effects of serial passage of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in cell culture. Virus Res. 7 : 335-349.
- Kuroda K., C. Hausser, R. Rott, H.D. Klenk et W. Doerfler. 1986. Expression of the influenza virus hemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector. EMBO J. 5 : 1359-1365.
- Kuzio J., D.Z. Rohel, C.J. Curry, A. Krebs, E.B. Carstens et P. Faulkner. 1984. Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. Virology 139 : 414-418.
- Laliberté C.. 1978. Influence de l'inanition, de la sous-alimentation, de l'infection virale et bactérienne sur la physiologie, les réserves et le métabolisme de Malocosoma disstria Hubner (Lepidoptera:Lasiocampidae). Mémoire de maîtrise M139, Dépt. Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières. pp. 3-70.
- Lance D.R., J.S. Elkinton et C.P. Schwalbe. 1987. Behaviour of late-instar gypsy moth larvae in high and low density populations. Ecol. Entomol. 12 : 267-273.
- Langner K.D., L. Vardimon, D. Reuz et W. Doerfler. 1984. DNA methylation of three 5'CCGG 3' sites in the promoter and 5' region inactive the E2a gene of Adenovirus type 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 2950-2954.
- Lavallé C.. 1984. étude de la virulence de différents baculovirus pour le ver-gris blanc, Euxoa scandens Riley (Lepidoptera:Noctuidae). Mémoire M024, Institut Armand Frappier, Université du Québec. pp. 1-101.
- Lebacq-Verheyden A.M., P.G. Kasprzyk, M.G. Raum, K. Van Wyke Coelingh, J.A. Lebacq et J.F. Battey. 1988. Post translational processing of endogenous and of baculovirus-expressed human gastrin-releasing peptide precursor. Mol. Cell. Biol. 8 : 3129-3135.
- Leisy D., G. Rohrmann et G. Beaudreau. 1984. Conservation of genome organization in two multicapsid nuclear polyhedrosis viruses. J. Gen. Virol. 52 : 699-702.
- Leisy D., G. Rohrmann et G. Beaudreau. 1986. The nucleotide sequence of the polyhedrin gene region from the multicapsid baculovirus of Orgyia pseudotsugata. Virology 153 : 280-288.

- Leonard D.E. et C.C. Doane. 1966. An artificial diet for the gypsy moth, Porthetria dispar (Lepidoptera:Lymantriidae). Ann. Entomol. Soc. Amer. 59 : 462-464.
- Lu A.L., S. Clark et P. Modrich. 1985. Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro. Proc. Natl. Sci. USA 80 : 4639-4643.
- Lübbert H., I. Kruczek, S.T. Tija et W. Doerfler. 1981. The cloned EcoRI fragments of Autographa californica polyhedrosis virus DNA. Gene 16 : 343-345.
- Luckow V.A. et M.D. Summers. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. Bio/Technology 6 : 47-55.
- Lynn D.E. et W.F. Hink. 1978. Infection of synchronized TN-368 cell cultures with alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 32 : 1-5.
- Lynn D.E. et Hink W.F. 1980. Comparison of nuclear polyhedrosis virus replication in five lepidopteran cell lines. J. Invertebr. Pathol. 35 : 234-240.
- Mackinnon E.A., J.F. Henderson, D.B. Stoltz et P. Faulkner. 1974. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage in vitro. J. Ultrastruct. Res. 49 : 419.
- Maeda S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato et M. Furusawa. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature 315 : 592-594.
- Maniatis T., E.F. Fritsch et J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (Ed.). New York: Cold Spring Harbor. pp. 1-545
- Martignoni M.E. et P.J.I. Iwai. 1986. A catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks. USDA, rapport PNW-195 (4^{ème} éd.). pp. 1-51.
- Maskel S.M. et R.A. DiCapua. 1988. Qualitative assays for the protease activity of Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 51 : 139-144.
- Matsuura Y., R.D. Possee et D.H.L. Bishop. 1986. Expression of the S-coded genes of lymphocytic choriomeningitis arenavirus using a baculovirus vector. J. Gen. Virol. 67 : 1515-1529.

- Matsuura Y., R.D. Possee, H.A. Overton et D.H.L. Bishop. 1987. Baculovirus expression vectors: The requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. J. Gen. Virol. 68 : 1233-1250.
- Matthews J.A. et L.J. Kricka. 1988. Analytical strategies for the use of DNA probes. Anal. Biochem. 169 : 1-25.
- Matthews R.E.S. 1980. Classification et nomenclature des virus, 3^{ème} rapport du comité international de taxonomie des virus. Presse de l'Université Laval, Québec. pp.59-62.
- Matthews R.E.S. 1982. Classification et nomenclature des virus, 4^{ème} rapport du comité international de taxonomie des virus. Presse de l'Université Laval, Québec. pp. 60-63.
- McCarthy W.J. et R.A. DiCapua. 1979. Characterization of solubilized proteins from tissue culture and host-derived nuclear polyhedra of Lymantria dispar and Autographa californica. Intervirology 11 : 174-181.
- McCarthy W.J., T.F. Murphy et W. Langridge. 1979. Characteristics of the DNA from Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus. Virology 95 : 593-597.
- McCarthy W.J., J.T. Lambiase et L.S. Henchal. 1980. The effect of inoculum concentration on the development of the nuclear polyhedrosis virus of Autographa californica in TN-368 cells. J. Invertebr. Pathol. 36 : 48-51.
- McClintock J.T., E.M. Dougherty et R.M. Weiner. 1983. In vitro replication of a multiple embedded nuclear polyhedrosis virus of Lymantria dispar, the gypsy moth, in a homologous cell line. Abstract of the annual meeting-1983 S 18, S.R. : 287 (résumé).
- McClintock J.T., E.M. Dougherty et R.M. Weiner. 1986. Protein synthesis in gypsy moth cells infected with a nuclear polyhedrosis virus of Lymantria dispar. Virus Res. 5 : 307-322.
- McClintock J.T., E.M. Dougherty et R.M. Weiner. 1986. Semi-permissive replication of a nuclear polyhedrosis virus Autographa californica in a gypsy moth cell line. J. Virol. 57 : 197-204.

- McClintock J.T. et E.M. Dougherty. 1988. Restriction mapping of Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus DNA: Localization of the polyhedrin gene and identification of four homologous regions. J. Gen. Virol. 69 : 2303-2312.
- McIntosh A.H. et S.B. Padhi. 1976. In vitro and in vivo comparative studies of several nuclear polyhedrosis viruses (NPVs) by neutralization, immunofluorescence and polyacrylamide gel electrophoresis. In: Kurstak E. et K. Maramorosch (Eds.), Invertebrate tissue culture: Applications in medicine, biology, and agriculture. New York: Academic Press. pp. 331-337.
- Meinkoth J. et G. Wahl. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Anal. Biochem. 138 : 267-284.
- Mierendorf R.C. et D. Pfeffer. 1987. In: Berger S.L. et A.R. Kimmel. Acad. Press Inc. U.S.A. Method in Enzymol. 152 Ch.58 : 556-562
- Miller D.W. et L.K. Miller. 1982. A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element. Nature (London) 299 : 562
- Miller L.K.. 1981. A virus vector for genetic engineering in invertebrates. In : Genetic engineering in the plant sciences Ch. 14 : 203-223.
- Miller L.K., J.E. Jewell et D. Browne. 1981. Baculovirus induction of DNA polymerase. J. Virol 40 : 305-308.
- Miller L.K.. 1985. Production of polypeptides in insect cells. European patent application . Office Européen des brevets. Publication no. 0 155 476 A1 pp. 1-29 (brevet).
- Miller L.K.. 1988. Baculovirus as gene expression vectors. Ann. Rev. Microbiol. 42 : 177-199.
- Miltenberger H.G.. 1980. The replication of insect pathogenic viruses (nuclear polyhedrosis viruses) in cell culture. Develop. biol. Standard 46 : 295-300.
- Miltenberger H.G., W.L. Naser et J.P. Harvey. 1984. The cellular substrate: A very important requirement for baculovirus in vitro replication. Z. Naturforsch 39c : 993-1002.

- Ministère de l'énergie et des Ressources (M.E.R.). Québec
1986 : Insectes et maladies des arbres. Suppl. Forêt
conservation 53 Mars 1987 : 13-15.
- Ministère de l'énergie et des Ressources (M.E.R.). Québec
1987 : Insectes et maladies des arbres. Suppl. Forêt
conservation 54 Mars 1988 : 14-17.
- Miyamoto C., G.E. Smith, J. Farrell-Towt, R. Chizzonite, M.D.
Summers et G. Ju. 1985. Production of human *c-myc* protein
in insect cells infected with a baculovirus expression
vector. *Mol. Cell. Biol.* 5 : 2860-2865.
- Moore N.F., L.A. King et R.D. Possee. 1987. Viruses of in-
sects: Mini review. *Insect Sci. Applic.* 8 : 275-289.
- Morris T.J., R.T. Hess et D.E. Pinnock. 1979. Physico-
chemical characterization of a small RNA virus associated
with baculovirus infection in Trichoplusia ni. *Inter-
virology* 11 : 238-247.
- Morris T.J., P.V. Vail et S.S. Collier. 1981. An RNA virus in
Autographa californica nuclear polyhedrosis virus prepa-
rations: Detection and identification. *J. Invertebr.
Pathol.* 38 : 201-208.
- Murray K.D. et J.S. Elkinton. 1989. Environmental contamina-
tion of egg masses as a major component of transgenera-
tional transmission of gypsy moth nuclear polyhedrosis
virus (LdMNPV). *J. Invertebr. Pathol.* 53 : 324-334.
- Nakagaki M., M. Ohba et Y. Tanada. 1987. Specificity of
receptor sites on insect cells for the synergistic factor
of an insect baculovirus. *J. Invertebr. Pathol.* 50 : 169-
175.
- Naser W.L., J.P. Harvey, A.M. Huger et J. Huber. 1987.
Choristoneura murinana nuclear polyhedrosis virus: Com-
parative biochemical and biological examination of repli-
cation in vivo and in vitro. *J. Gen. Virol.* 68 : 1251-
1260.
- Nelson M. et M. McClelland. 1988. The effect of site specific
methylation on restriction-modification enzymes. *Nucl.
Acids Res.* 15 : r219-r230.
- Newmark P.. 1986. Approval for first British virus release
experiment. *Nature* 320 : 2

- Nguyen H.D.. 1968. Enhancing effect of diethylaminoethyl-dextran on the focus forming titer of a murine sarcoma virus (Harvey strain). J. Virol. 2 : 643-644.
- Odell T.M., C.A. Butt et A.W. Bridgeforth. 1985. Lymantria dispar. In: Singh P. et R.F. Moore (Eds.), Handbook of insect rearing vol.II. New york: Elsevier vol. II. pp. 355-367.
- Payment P. et V. Pavilanis. 1980. Techniques virologiques. Les Presses de l'Université du Québec (Ed.), 1980 pp. 106.
- Payne C.C.. 1987. Current uses and future prospects for microbial pest control agents. Med. Fac. Landboww. Rijksuniv. Gent. 52 : 113-123.
- Pearson M.N., Russel R.L.Q., G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1988. p39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. Virology 167 : 407-413.
- Pennock G.D., C. Shoemaker et L.K. Miller. 1984. Strong regulated expression of Escherichia coli β -galactosidase in insect cells with baculovirus vector. Mol. Cell. Biol. 4 : 399-406.
- Phillips C.A.. 1978. Picornaviridae: Enteroviruses-Echoviruses. In: Seligson D. (Ed.), CRC Handbook series in clinical laboratory science. Section H: Virology and rickettsiology. Floride: CRC Press Inc.. v.I p.I pp. 157-167.
- Plasterk R.H.A., H. Vrieling et P. Putte. 1983. Transcription initiation of Mu *mom* depends on methylation of the promoter region and a phage-coded transactivator. Nature 301 : 344-347.
- Possee R.D.. 1986. Cell-surface expression of influenza virus hemagglutinin in insect cells using a baculovirus vector. Virus Res. 5 : 43-49.
- Possee R.D. et S.C. Howard. 1987. Analysis of the polyhedrin gene promoter of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. Nucl. Acids Res. 15 : 10233-10248.
- Potter K.N., P. Faulkner et E.A. MacKinnon. 1976. Strain selection during serial passage of Trichoplusia ni nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. 18 : 1040-1044.

- Price P.M., A. Mohamad, A. Zelent, A.R. Neurath et G. Acs. 1988. Translational selection in the expression of the hepatitis B virus envelope proteins. *DNA* 7 : 417-422.
- Quant-Russell R.L., M.N. Pearson, G.F. Rohrmann et G.S. Beaudreau. 1987. Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. *Virology* 160: 919.
- Quiot J.M.. 1975. Recherche sur la culture *in vitro* de cellules d'insectes et l'action de germes entomopathogènes en culture cellulaire. Université des Sciences et Techniques du Languedoc: Académie de Montpellier (Thèse) pp. 1-174.
- Quiot J.M.. 1976. Établissement d'une lignée cellulaire (SCLd 135) à partir d'ovaires du lépidoptère *Lymantria dispar* L. *C.R. Acad. Sci.* 282 : 465-468.
- Rankin C., B.G. Ooi et L.K. Miller. 1988. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene* 70 : 39-49.
- Razin A. et A.D. Riggs. 1980. DNA methylation and gene function. *Science* 210 : 604-610.
- Reed K.C. et D.A. Mann. 1985. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucl. Acids Res.* 13 : 7207-7221.
- Reynolds E.S.. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17 : 208-212.
- Richter A.R., J.R. Fuxa et M. Abdel-Fattah. 1987. Effect of host plant on the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus. *Environ. Entomol.* 16 : 1004-1006.
- Rigby P.W.J., M. Dieckmann, C. Rhodes et P. Berg. 1977. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113 : 237-251.
- Rohrmann G.F.. 1986. Polyhedrin structure : review article. *J. Gen. Virol.* 67 : 1499-1513.
- Rossiter M.C.. 1987. Use of a secondary host by non-outbreak populations of the gypsy moth. *Ecology* 68 : 857-868.

- Sanger F., S. Nicklen et A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 : 5463.
- Shang Yin G.. 1981. Virus envelope acquisition of nuclear polyhedrosis virus in vitro. Yale Jour. Biol. Med. 54 : 27-32.
- Shapiro M. et R.A. Bell. 1983. Enhanced effectiveness of Lymantria dispar (Lepidoptera:Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. Ann. Entomol. Soc. Amer. 75 : 346-349.
- Shapiro M., J.L. Robertson, M.G. Injac, K. Katagiri et R.A. Bell. 1984. Comparative infectivities of gypsy moth (Lepidoptera:Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus isolates from North America, Europe, and Asia. J. Econ. Entomol. 77 : 153-156.
- Shapiro M., H.K. Preisler et J.L. Robertson. 1987. Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (Lepidoptera:Lymantriidae) by chitinase. J. Econ. Entomol. 80 : 1113-1116.
- Shieh T.R. et G.T. Bohmfalk. 1980. Production and efficacy of baculoviruses. Biotech. Bioeng. 22 : 1357-1375.
- Shternshis M.V.. 1987. The principles of intensification of microbiological insect control. Med. Fac. Landboww. Rijksuniv. Gent. 52 : 395-401.
- Silver J. et V. Keerikatte. 1989. Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. J. Virol. 63 : 1924-1928.
- Singh S.P., R.T. Gudauskas et J.D. Harper. 1983. High resolution two dimensional gel electrophoresis of structural proteins of baculoviruses of Autographa californica and Porthetria (Lymantria) dispar. Virology 125 : 370-380.
- Small D.A. et N.F. Moore. 1987. Measurement of surface charge of baculovirus polyhedra. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 598-602.
- Smith G.C., S.A. Weiss, S.S. Kalter et J.L. Vaughn. 1981. Quantitative studies of nuclear polyhedrosis virus produced in vitro. In: Bailey G.W. (Ed.), 39th Ann. Proc. Electron. Microscopy Soc. Amer., Atlanta, Georgia, 1981 : 630 (résumé).

- Smith G.E. et M.D. Summers. 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* 89 : 517-527.
- Smith G.E. et M.D. Summers. 1982. DNA homology among subgroup A,B, and C baculoviruses. *Virology* 123 : 393-406.
- Smith G.E., M.J. Fraser et M.D. Summers. 1983. Molecular engineering of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.* 46 : 584-593.
- Smith G.E., M.D. Summers et M.J. Fraser. 1983. Production of human beta-interferon in insect cells infected with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 2156-2165.
- Smith G.E., G. Ju, B.L. Ericson, J. Mochera, H.W. Lahn, R. Chizzonite et M.D. Summers. 1985. Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 8404-8408.
- Smith I.R.L. et N.E. Crook. 1987. In vivo isolation of baculovirus genotypes. *Virology* 166 : 240-244.
- Smith I.R.L., N.A.M. Van Beek, J.D. Podgwaite et H.A. Wood. 1988. Physical map and polyhedrin gene sequence of Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus. *Gene* 71 : 97-105.
- Smith K.M. et R.W.G. Wyckoff. 1950. Structure within polyhedra associated with insect virus diseases. *Nature* 166 (Nov.): 861.
- Sohi S.S., J. Percy, J.C. Cunningham et B.M. Arif. 1981. Replication and serial passage of a multicapsid nuclear polyhedrosis virus of Orqyia pseudotsugata (Lepidoptera:-Lymantriidae) in continuous cell lines. *J. Can. Microbiol.* 27 : 1133-1139.
- Sohi S.S.. 1989. Communication personnelle. Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand Frappier, Laval, Québec.
- Southern E.M.. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503-517.

- Steffan R.J. et R.M. Atlas. 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2185-2191.
- Stiles B., J.P. Burand, M. Meda et H.A. Wood. 1983. Characterization of gypsy moth (Lymantria dispar) nuclear polyhedrosis virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 : 297-303.
- Stockdale H. et G.R. Gardiner. 1977. The influence of the condition of cells and medium on production of polyhedra of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in vitro. *J. Invertebr. Pathol.* 30 : 330-336.
- Stoltz D.B., C. Pavan et A.B. Da Cunha. 1973. Nuclear Polyhedrosis Virus: A possible example of de novo intranuclear membrane morphogenesis. *J. Gen. Virol.* 19 : 145-149.
- Sugino A., H.M. Goodman, H.L. Heyneker, J. Shine, H.W. Boyer et N.R. Cozzarelli. Interaction of bacteriophage T4 and DNA ligases in joining of duplex DNA base-paired ends. *J. Biol. Chem.* 252 : 3987-3994.
- Summers M.D. et D.L. Anderson. 1973. Characterization of nuclear polyhedrosis virus DNA's. *J. Virol.* 12 : 1336-1346.
- Summers M.D. et G.E. Smith. 1978. Baculovirus structural polypeptides. *Virology* 84 : 390-402.
- Summers M.D.. 1984. Method for producing a recombinant baculovirus expression vector. Office Européen des brevets. Publication no. 0 127 839 A2. pp. 1-60. (brevet)
- Summers M.D. et G.E. Smith. 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Publication B-1555. Texas Agricultural Experimentation Station, Texas A&M University (Ed.). pp. 1-56.
- Syvänen A.C., M. Bengtström, J. Tenhunen et H. Söderlund. 1988. Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection. *Nucl. Acids Res.* 16 : 11327-11338.
- Tada A., A. Fuse, H. Sekine, B. Simizu, A. Kondo et S. Maeda. Expression of the E2 open reading frame of papillomaviruses BPV1 and HPV6b in silkworm by a baculovirus vector. *Virus Res.* 9 : 357-367.

- Thiem S.M. et L.K. Miller. 1989. Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. 63 : 2008-2018.
- Tija S.T., E.B. Carstens et W. Doerfler. 1979. Infection of Spodoptera frugiperda cells with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. II. The viral DNA and the kinetics of the replication. Virology 99 : 399-409.
- Tinsley T.W.. 1985. Antigenic structure of insect virus e s . In: Van Regenmortel M.H.V. et A.R. Neurath (Eds.), Immunochemistry of viruses: The basis for serodiagnosis and vaccines. New York: Elsevier Sci. Publishers B.V. pp. 479-492.
- Tomalski M.D., J. Wu et L.K. Miller. 1988. The location, sequence, transcription, and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. Virology 167 : 591-600.
- Tramper J. et J.M. Vlak. 1987. Some engineering and economic aspects of continuous cultivation of insect cells for the production of baculoviruses. Ann. N.Y. Acad. Sci. 469 : 279-288.
- Vago C. et A. Amargier. 1963. Coloration histologique pour la différenciation des corps d'inclusion polyédriques de virus d'insectes. Ann. épiphyties 14 : 269-274.
- Vago C. et M. Bergoin. 1963. Développement des virus à corps d'inclusion du lépidoptère Lymantria dispar en cultures cellulaires. Entomophaga 8 : 253-261.
- Vago C., J.M. Quiot et A. Amargier. 1969. Développement des virus d'invertébrés en culture organotypiques. C.R. Acad. Sc. Paris, t.269 pp. 978-981.
- Vago C., K. Aizawa, C. Ignoffo, M.E. Martignoni, L. Tarasevitch et W. Tinsley. 1974. Present status of the nomenclature and classification of invertebrate viruses. J. Invertebr. Pathol. 23 : 133-134.
- Vail P.V., T.J. Morris et S.S. Collier. 1983. An RNA virus in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus preparations: Gross pathology and infectivity. J. Invertebr. Pathol. 41 : 179-183.

- Van Beek N.A.M., A.C.G. Derksen, R.R. Granados et P.R. Hughes. 1987. Alkaline liberated baculovirus particles retain their infectivity per os for neonate lepidopterous larvae. J. Invertebr. Pathol. 50 : 339-340.
- Van Der Beek C.P., J.D. Saaier-Riep et J.M. Vlak. 1980. On the origin of the polyhedral protein of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. Virology 100 : 326-333.
- Vasiljevic L.J. et M. Injac. 1971. Artificial diet for the gypsy moth (Lymantria dispar L.). Zastita Bilja 22 (115-116): 389-396.
- Vlak J.M. et G.F. Rohrmann. 1985. The nature of polyhedrin. In: Maramorosch K. et K.E. Sherman (Eds.), Viral insecticides of biological control. New York: Academic Press.
- Vogelstein B. et D. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 615-619.
- Vogt P.K.. 1967. DEAE-dextran: enhancement of cellular transformation induced by avian sarcoma viruses. Virology 33 : 175-177.
- Volkman L.E. et M.D. Summers. 1975. Nuclear polyhedrosis virus detection: relative capabilities of clones developed from Trichoplusia ni ovarian cell line TN-368 to serve as indicator cells in a plaque assay. J. Virol. 16 : 1630-1637.
- Volkman L.E. et P.A. Goldsmith. 1985. Mechanism of neutralization of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. Virology 143 : 185-195.
- Volkman L.E.. 1986. The 64K envelope protein of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. In: Doerfler W. et P. Böhm (Eds.), Current topics in microbiology and immunology: The molecular biology of baculoviruses. Berlin: Springer-Verlag pp. 103-118.
- Volkman L.E., P.A. Goldsmith et R.T. Hess. 1986. Alternate pathway of entry of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: Fusion at the plasma membrane. Virology 148 : 288-297.

- Wahl G.M., M. Stern et R. Stark. 1979. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 3683-3687.
- Wang X. et D.C. Kelly. 1983. Baculovirus replication: Purification and identification of the Trichoplusia ni nuclear polyhedrosis virus-induced DNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 64 : 2229-2236.
- Wang X., T. Lescott, E. DeClercq et D.C. Kelly. 1983. Baculovirus replication: Inhibition of Trichoplusia ni multiple nuclear polyhedrosis virus by [E]-5-(2-bromovinyl)-2-deoxyuridine. *J. Gen. Virol.* 64 : 1221-1227.
- Watanabe H.. 1987. Effect of the concentration of fetal bovine serum in a culture medium on the susceptibility of Bombyx mori cells to a nuclear polyhedrosis virus. *Appl. Ent. Zool.* 22 : 397-398.
- Weyer U. et R.D. Possee. 1988. Functional analysis of the p10 gene 5' leader sequence of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Nucl. Acids Res.* 16 : 3635-3653.
- Whitford M., S. Stewart, J. Kuzio et P. Faulkner. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 63 : 1393-1399.
- Whitt M.A. et J.S. Manning. 1987. Role of chelating agents, monovalent anion and cation in the dissociation of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus occlusion body. *J. Invertebr. Pathol.* 49 : 61-69.
- Whitt M.A. et J.S. Manning. 1988. Stabilization of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus occlusion body matrix by zinc chloride. *J. Invertebr. Pathol.* 51 : 278-280.
- Whitt M.A. et J.S. Manning. 1988. A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. *Virology* 163 : 33-42.
- Woods H.A., L.B. Johnston et J.P. Burand. 1982. Inhibition of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus replication in high density Trichoplusia ni cell cultures. *Virology* 119 : 245-254.

- Woods H.A. et J.P. Burand. 1986. Persistent and productive infections with the Hz-1 baculovirus. In: Doerfler W. et P. Böhm (Eds.), Current topics in microbiology and immunology: The molecular biology of baculoviruses. Berlin: Springer-Verlag. pp. 119-134.
- Woods H.A. et J.S. Elkinton. 1987. Bimodal patterns of mortality from nuclear polyhedrosis virus in gypsy moth (Lymantria dispar) populations. J. Invertebr. Pathol. 50 : 151-157.
- Zervos P.H., L.M. Morris et R.J. Hellwig. 1988. A novel method for rapid isolation of plasmid DNA. BioTechniques 6 : 238-242.
- Zethner O., D.A. Brown et K.A. Harrap. 1979. Comparative studies on the nuclear polyhedrosis viruses of Lymantria monacha and L. dispar. J. Invertebr. Pathol. 34 : 178-183.

ANNEXE 1

Liste des pathologies virales naturelles de la *spongieuse*

TYPE	VECTEUR
. Polyédrose cytoplasmique	. Virus de la polyédrose cytoplasmique (VPC)
. Densonucléose	. Virus de la densonucléose (VDN)
. Virose Iridescente	. Iridoviridae
. Polyédrose nucléaire	. Virus de la polyédrose nucléaire (VPN)
. Sphéroïdose	. Poxviridae (d'insectes)
. Viroses présumées	. Picornaviridae
	. Bunyaviridae
	. Nodaviridae

(Martignoni et Iwai, 1986)

ANNEXE 2

Milieu de Grace (1962)

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1013	mg	Sucrose	26,680	mg
HCL	2240	mg	Fructose	400	mg
CaCl ₂	1000	mg	Glucose	700	mg
MgCl ₂ 6H ₂ O	2280	mg	Acide Malique	770	mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	2780	mg	Acide Cétoglutarique	370	mg
NaHCO ₃	700	mg	Acide Succinique	60	mg
L-Arginine-HCL	700	mg	Acide L-Aspartique	350	mg
L-Asparagine	350	mg	L-Lysine HCL	625	mg
L-Alanine	225	mg	L-Méthionine	50	mg
L-Cytatine	22	mg	L-Phénylalanine	175	mg
Acide L-Gluta-	600	mg	DL-Sérine	1150	mg
mique					
L-Glutamine	600	mg	L-Tyrosine	50	mg
Glycine	650	mg	L-Tryptophane	100	mg
L-Histidine	2500	mg	L-Thréonine	175	mg
L-Isoleucine	50	mg	L-Valine	100	mg
Thiamine-HCL	0,02	mg	Riboflavine	0,02	mg
D-Ca-Pantothenate	0,02	mg	Pyridoxine-HCL	0,02	mg
Acide Para-Amino	0,02	mg	Niacine	0,02	mg
Benzoïque					
I-Inositol	0,02	mg	Biotine	0,02	mg
Choline-HCL	0,20	mg	Pénicilline	1000	UI
			Streptomycine	1000	ug

. Compléter à 1 litre d'eau distillée

. Ajuster le pH à 6,4

. Compléter avec 110 ml de serum foetal de veau préalablement décomplémenté à 55°C pendant 1 heure.

ANNEXE 3

Milieu TC-10 (5 L.)

KCl	14,35	g	L-Arginine-HCl	3,500	g
CaCl ₂ 2-H ₂ O	4,60	g	Acide L-Aspartique	1,750	g
MgCl ₂ 6-H ₂ O	11,40	g	L-Asparagine	1,989	g
MgSO ₄ 7-H ₂ O	13,90	g	L-Alanine	1,125	g
Tryptose (B)	13,00	g	Acide L-Glutamique	3,000	g
D-Glucose	5,00	g	β -Alanine	1,000	g
			L-Glutamine	4,000	g
Thiamine-HCl	2,00	mg	Glycine	3,250	g
Riboflavine	2,00	mg	L-Histidine	12,500	g
D-Ca-Pantote	2,00	mg	L-Isoleucine	0,250	g
nate					
Pyridoxine-HCl	2,00	mg	L-Leucine	0,375	g
Acide Para	2,00	mg	L-Lysine-HCl	3,125	g
aminobenzoique					
Acide folique	2,00	mg	L-Methionine	0,250	g
Acide Nicoti	2,00	mg	L-Proline	1,750	g
nique					
I-Inositol	2,00	mg	L-Phenylalanine	0,750	g
Biotine	1,00	mg	DL-Serine	5,500	g
Choline-Cl	20,00	mg	L-Threonine	0,875	g
NaH ₂ PO ₄ 2-H ₂ O	5,49	g	L-Valine	0,500	g
NaHCO ₃	1,75	g	L-Cysteine	0,125	g
			L-Tryptophane	0,500	g
			L-Tyrosine	0,250	g

* Dissoudre séparément

Ajuster à pH 6,2

Additionner 10 à 20% SVF (selon le type de cellules)

ANNEXE 4

Fixateur Carnoy

- . Chloroforme 30 ml
- . Alcool éthylique 60 ml
- . Acide Acétique glacial 10 ml

Fixation par immersion de 48 heures à 4°C
suivi de deux bains d'alcool éthylique absolu
pour une période de 24 heures à 4°C.

S'il s'agit de larves d'insectes, les extrémités devront être coupées après 24 heures.

ANNEXE 5

Technique de coloration des polyèdres

1. Préparation du colorant :

Colorant Buffalo Black (Sigma Chemical Co., USA)	0,1 g
Méthanol absolu	50,0 ml
Acide acétique glacial	30,0 ml
Eau distillée	20,0 ml

Ajouter l'acide acétique dans le mélange eau-alcool et y additionner le colorant. Conserver à l'abri de la lumière. Refaire la solution à tous les mois.

2. Méthode de coloration à chaud :

- Placer le frottis sur une plaque chauffante, et portée à 40°C.
- Couvrir de solution colorante pendant 5 minutes.
Ne pas laisser le colorant sécher.
- Enlever la solution colorante et laver le frottis.
- Sécher à l'air.

Les polyèdres apparaitront bleu foncé.

(Sikorowski et al., 1971)

ANNEXE 6

Milieu LB (Luria-Bertani)

Pour 1 litre :

- . Bacto-tryptone 10 g
- . Bacto-yeast extract 5 g
- . NaCl 10 g

ajuster à pH 7,5 à l'aide d'hydroxide de sodium.

Stériliser avant l'emploi.

Agar LB :

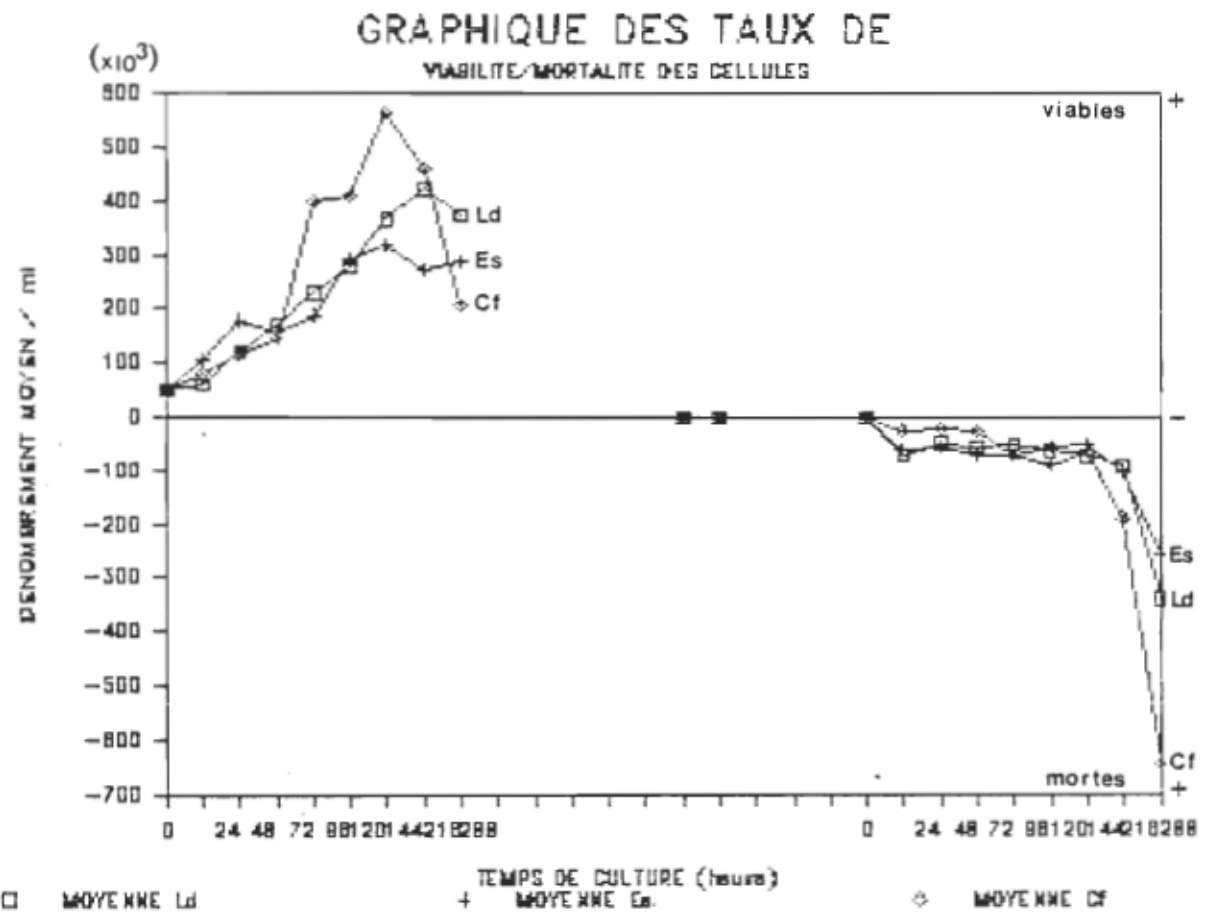
- . Bouillon LB (1 L.)
- . Bacto Agar 15 g

Stériliser avant l'emploi.

Laisser refroidir à environ 50°C, ajouter les antibiotiques s'il y a lieu, et couler dans les boîtes de pétri.

(Maniatis et al., 1982)

ANNEXE 7



CONDITIONS D'ENTRETIEN ET D'INFECTION STANDARD

- . NOMBRE INITIAL DE CELLULES/PASSAGE : 50 000/ml
- . MILIEU : GRACE OU TC-10 COMPLET
 - 10 % SÉRUM FŒTAL DE VEAU
 - 0,2 % GENTAMICINE
- . INCUBATION : 28°C
- . PÉRIODE D'UN PASSAGE : 5 JOURS
- . TEMPS DE DÉDOUBLEMENT : 24 HEURES POUR LA LIGNE CELLULAIRE Es
40 HEURES POUR LES LIGNES CELLULAIRES Ld ET Cf

ANNEXE 8

Tampons réactionnels :

Enzymes de restriction BRL	Tampons réactionnels	
	no.	description
	1	Tris HCl 50mM pH 8,0, MgCl ₂ 10mM
HindIII, PstI	2	Tris HCl 50mM pH 8,0, MgCl ₂ 10mM, NaCl 50mM
EcoRI, BamHI, BglI	3	Tris HCl 50mM pH 8,0, MgCl ₂ 10mM, NaCl 100mM
HincII	4	Tris HCl 20mM pH 7,4, MgCl ₂ 5mM, KCl 50mM

Tris-EDTA-Acétate (concentré 50X)

pour 1 litre :	Tris base	108 g.
	Acide acétique glaciale	57,1 ml
	EDTA 0,5 M pH 8,0	100,0 ml

Tampon de ligation (10X) : Tris 0,5 M pH 7,4, MgCl₂ 0,1 M,
dithiothréitol 0,1 M (DTT),
spermidine 10mM, ATP 10mM et
1 mg/ml de BSA.