

THESE

PRESENTEE PAR Marc OHRESSER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE II
FACULTE DES SCIENCES DE LUMINY

Spécialité : Biologie Cellulaire et Microbiologie

REGULATION DE LA TRANSCRIPTION DE GENES PRECOCES EXPRIMES PAR
LE BACULOVIRUS *AcMNPV* DANS DES CELLULES D'INSECTES

Soutenu le 22 Février 1994

Devant le jury composé de:

G. CROIZIER (Rapporteur)

G. DEVAUCHELLE

M. HERAL

J. LUPKER (Rapporteur)

J. C. PATTE (Président)

R. ROSSET

à ma femme

à mes parents

... "Soyez féconds, multipliez, remplissez la terre, et l'assujétissez; et dominez sur les poissons de la mer, sur les oiseaux du ciel, et sur tout animal qui se meut sur la terre." (Génèse chapitre 1, verset 28)

THESE

PRESENTEE PAR Marc OHRESSER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE II
FACULTE DES SCIENCES DE LUMINY

Spécialité : Biologie Cellulaire et Microbiologie

REGULATION DE LA TRANSCRIPTION DE GENES PRECOCES EXPRIMES PAR
LE BACULOVIRUS *AcMNPV* DANS DES CELLULES D'INSECTES

Soutenu le 22 Février 1994

Devant le jury composé de:

G. CROIZIER (Rapporteur)

G. DEVAUCHELLE

M. HERAL

J. LUPKER (Rapporteur)

J. C. PATTE (Président)

R. ROSSET

AVANT PROPOS

Le travail présenté dans ce mémoire a été pour l'essentiel réalisé au Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire dirigé par M. Cérutti. Ce laboratoire fait parti de la Station de Pathologie Comparée INRA-UA CNRS 1184 (St Christol Lez Alès), dont le Directeur est G. Devauchelle. Ce travail a été effectué sous la responsabilité scientifique de C. Delsert du Laboratoire Défense et Résistance des Invertébrés Marins UMR 9947 CNRS/IFREMER/Université Montpellier II dirigé par P. Roch.

Ce travail a bénéficié en ma personne d'une bourse de recherche de la société nationale ELF aquitaine.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail :

Mr G. CROIZIER, DR2 INRA, Laboratoire de Génétique des Virus, Station de Recherches de Pathologie Comparée, 30380 St Christol Les Alès

Mr G. DEVAUCHELLE, Professeur associé-DR1 INRA, Station de Recherches de Pathologie Comparée, 30380 St Christol Les Alès

Mr M. HERAL, IFREMER, Chef du Laboratoire de Biologie et Ecologie des Invertébrés Marins, BP133, 17390, La Tremblade

Mr. J. LUPKER, Sanofi ELF Biorecherches, Directeur de l'Unité des Technologies des Cellules Animales Recombinées, Labège Innopole Voie n°1 BP137, 31676 Labège Cedex

Mr. J-C. PATTE, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille II, Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS, 31 chemin Joseph Aiguier, 13277 Marseille Cedex 9

Mr R. ROSSET, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille II, Laboratoire de génétique et Biologie Cellulaire, Luminy case 907, 13288 Marseille Cedex

Je remercie Messieurs G. Devauchelle, H. Grizel, M. Héral, E. Miahle et P. Roch de m'avoir accueilli dans leur laboratoire respectif pour mon stage de doctorat et les membres de leur équipe qui ont su m'apporter leur aide. Je tiens à remercier Madame M-C. Ragaglia pour sa confiance et sa bienveillance pour le financement de ces travaux et Messieurs P. Maldonado et D. Shire pour l'intérêt qu'ils m'ont porté. Je tiens à remercier tout particulièrement les personnes qui m'ont aidé pour la correction de ce rapport, notamment Mesdemoiselles L. Garnier et I. Schmidt.

INTRODUCTION

La gravité des épidémies d'origine virale qui affectent les élevages de crevettes des principaux pays producteurs, a amené notre laboratoire à démarrer une étude sur ce sujet, dans le cadre des programmes d'IFREMER. Parmi les agents pathogènes responsables de fortes mortalités, on trouve différents types de virus appartenant à la famille des *Baculoviridae*. En l'absence de moyens d'investigation adaptés à l'étude de ces virus, nous avons utilisé le modèle du baculovirus de la chenille arpentuse de la luzerne (*AcMNPV*) infectant des cellules d'insectes, afin de définir le cadre général d'une lutte anti-virale.

La stratégie de lutte anti-virale retenue était l'expression d'ARN anti-sens contre les gènes viraux précoces ou affectant la réplication de l'ADN viral. Ce système présente en outre l'avantage de mimer la situation qui serait présente dans les cellules d'un animal transgénique exprimant de telles séquences anti-sens. Ceci constitue en fait le but ultime de ces recherches. Il nous a donc fallu mettre au point un ensemble de vecteurs d'expression actifs dans les cellules de lépidoptères, mais également maîtriser la sélection de clones cellulaires exprimant des séquences anti-sens de façon stable, techniques peu développées chez les lépidoptères.

Dans un premier temps, nous avons établi des lignées cellulaires de lépidoptères produisant de façon constitutive des ARN et des protéines. Cela nous a demandé la mise au point préalable de vecteurs d'expression et de leurs modalités d'utilisation. Ces expériences nous ont conduit (i) à mettre en évidence l'intégration et la transcription des ADN transfectés (publication 1), et (ii) à localiser un activateur transcriptionnel (de type "enhancer") sur un des vecteurs d'expression utilisés (publication 1). Cette séquence activatrice provient d'un densovirus utilisé dans la construction du vecteur d'expression. Les vecteurs obtenus ont permis l'expression stable d'ARN anti-sens de différents gènes d'*AcMNPV*.

L'évaluation de la transcription du gène *dnapol* nous a conduit à étudier sa régulation transcriptionnelle tant lors de son expression transitoire que durant l'infection (publication 2). Nous avons ainsi montré que la protéine IE1 est l'activateur principal de *dnapol*. Son expression en tant que protéine a été suivie grâce à anticorps spécifique (publication 2). Cela nous a amené à mettre en évidence un gène anti-sens présent naturellement au niveau du promoteur du gène *dnapol* (publication 3). L'impact de l'activité de ce gène anti-sens sur le promoteur du gène *dnapol* a été évalué (publication 2).

Les conclusions de notre travail, qui a conduit à l'élucidation de mécanismes cellulaires et viraux fondamentaux nous permettent de cerner avec plus de précision la nature d'une approche anti-virale applicable aux populations animales.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1) LES BACULOVIRUS

1.1) Introduction

Les polyédroses nucléaires sont des infections touchant les Arthropodes et sont caractérisées par l'apparition de corps d'inclusion cristallins facilement détectables (**revue par Granados et Federici, 1986**).

Dès le XIX^{ième} siècle, une corrélation a été remarquée entre la présence de corps d'inclusion et les symptômes d'une maladie chez le ver à soie. En 1912, la propagation de la maladie par injection de filtrat d'animaux malades a permis d'en proposer une étiologie virale. Il faudra néanmoins attendre 1947 pour que les travaux de Bergold montrent que les corps d'inclusion contiennent des particules virales et que l'agent causatif, un baculovirus, soit identifié. Il a été montré que les baculovirus sont présents chez nombre d'arthropodes et notamment chez les crustacés (**Vago, 1966**). D'un point de vue fondamental, seuls les baculovirus d'insectes ont été bien étudiés. Il s'agit de virus à ADN double brin de grande taille dont l'expression génique est dirigée par une cascade de régulation particulièrement complexe (**revue par Blissard et Rohrmann, 1990**).

L'utilisation aujourd'hui commune du baculovirus en tant que vecteur d'expression puissant, tend à occulter le fait que notre connaissance de ce virus reste fragmentaire. Il faut garder en mémoire notamment le fait que son génome ne soit pas totalement séquencé et que l'ensemble de ses gènes ne soit pas connu. Le baculovirus reste donc un modèle d'étude fondamentale de la régulation génique.

Nous aborderons dans un premier temps des notions de systématique et notamment la comparaison phylogénétique des baculovirus d'insectes et de crustacés. Nous traiterons ensuite du cycle viral et de sa régulation et plus particulièrement de la régulation de transcription. Le cas du gène *iel* sera détaillé en raison de son rôle comme acteur majeur de cette régulation.

En raison de l'orientation de notre projet de recherche, nos rappels seront volontairement limités à l'aspect régulation génique du baculovirus. Soulignons que l'on pourra utilement se reporter aux revues générales en ce qui concerne l'étude des gènes structuraux (**Rohrmann, 1992**) ou l'emploi des baculovirus comme vecteur d'expression (**Luckow et Summers, 1988**).

1.2) Classification, hôtes et phylogénie des baculovirus

Les baculovirus forment la famille des *Baculoviridae*. Ce sont des virus enveloppés en forme de bâtonnet à ADN circulaire double brin. Les infections dues à des baculovirus ont été observées essentiellement chez les insectes, quoique quelques unes aient été décrites chez les crustacés décapodes : crabes (**Johnson, 1976**), crevettes (**Couch, 1974b**) et écrevisses (**Anderson et Prior, 1992**). Parmi les insectes, les baculovirus infectent principalement les lépidoptères mais également les Hyménoptères, les Diptères, les Coléoptères et les Trichoptères.

Les baculovirus sont divisés en 2 sous familles en fonction de la présence de corps d'inclusions viraux : les *Eubaculovirinae* sont inclus, les *Nudibaculovirinae* ne le sont pas (**Francki et coll., 1991**). Les *Eubaculovirinae* sont séparés en 2 groupes suivant le mode d'inclusion : (i) les virus à polyédrose nucléaire (NPV) présentent de nombreux virions inclus dans des corps d'inclusion nucléaires appelés polyèdres. Les NPV sont les plus étudiés des baculovirus.

(ii) les virus à granule (GV) présentent des virions individuels dans un corps d'inclusion appelé granule. Apparemment, ils ne sont connus que chez les Lépidoptères.

Postérieurement à la classification de **Francki et coll. (1991)**, une étude phylogénétique des *Eubaculovirinae* a été publiée (**Zanotto et coll., 1993**). Les virus concernés sont ceux dont les séquences nucléotidiques ou peptidiques des gènes de la polyédrine (pour les NPV) ou des gènes de la granuline (pour les GV) étaient disponibles. Ces gènes codent pour la protéine structurale majeure des corps d'inclusion viraux. Les auteurs concluent que si l'on considère un NPV d'hyménoptère et des GV et NPV de lépidoptère, les virus de lépidoptère sont phylogénétiquement plus proches entre eux que les NPV des autres insectes. Il semble donc que la spéciation des deux types morphologiques de lépidoptères soit postérieure à la séparation des virus d'hyménoptère et de lépidoptère. Par contre à un niveau d'évolution plus proche, et de façon générale, la spéciation des virus de lépidoptère ne suit pas toujours la phylogénie des hôtes respectifs (**Zanotto et coll., 1993**). On peut noter que le NPV de *Lymantria dispar* (*LdNPV*) est phylogénétiquement à part au sein des NPV de lépidoptère (**Zanotto et coll., 1993**).

1.3) Comparaison entre baculovirus d'insecte et de crevette

Les NPV d'insecte et ceux de crevette (BP et MBV; voir annexe 1) ont des génomes de la même taille et des similitudes structurales et immunologiques :

(i) La morphologie des virions et des cellules infectées est très similaire entre virus de crevette et d'insecte, on observe notamment des noyaux hypertrophiés et des structures membranaires associés aux virions et à la membrane nucléaire (**Couch, 1974b; Young et coll., 1993**).

(ii) Il existe des réactions immunologiques croisées entre BP et AcMNPV (**Summers, 1977**).

(iii) Pour les virions, des densités de flottaison similaires ont été observées pour BP et les baculovirus d'insecte (**Summers, 1977; Bruce et coll., 1991**).

(iv) Il y a sur les gènes de polyédrine des régions conservées entre les deux types de virus insecte et BP. Ces homologies ont permis l'amplification par PCR avec des amorces dégénérées d'un fragment du génome de MBV similaire en taille à celui des baculovirus d'insecte (**Vickers et coll., 1990; Chen et coll., 1992; Chang et coll., 1993**).

On note toutefois que des différences entre baculovirus de crevette et d'insecte existent entre les corps d'inclusion de BP et MBV et ceux de NPV d'insecte :

(i) La trame paracrystalline des corps d'inclusion de BP est de 120 nm au lieu de 40 à 70 nm pour les baculovirus d'insecte (**Summers, 1977**). De plus, les polyèdres de BP sont solubles au SDS 0,1% contrairement à ceux d'AcMNPV (**Summers, 1977**).

(ii) Au niveau moléculaire, la polyédrine de BP est plus lourde que celle des insectes, 50 kDal et 25 à 31 kDal respectivement (**Summers, 1977**). Des résultats similaires ont été signalés pour MBV (**Mari et coll., 1993**).

Il n'existe pas de lignée cellulaire continue de cellules de crevettes ce qui rend l'étude des virus très difficile *in vitro* (**Chen et coll., 1989**). La purification du virus et de son ADN est dépendante de la disponibilité d'un élevage. En absence de lieu de production à proximité des laboratoires, les animaux doivent donc être importés. Or les corps d'inclusions sont peu stables même conservés à - 80 °C (**Bruce et coll., 1991**). L'approvisionnement en matériel d'étude est donc particulièrement problématique.

Les baculovirus de crevette restent donc peu connus, peu étudiés mais sont apparentés aux baculovirus d'insecte mieux connus. Il est probable que la similitude morphologique des virus traduise une certaine similitude dans les mécanismes moléculaires. Pour ces raisons, il nous a semblé logique d'étudier les mécanismes moléculaires de baculovirus de crevette à partir du modèle AcMNPV qui est le mieux connu, notamment au niveau de sa régulation génique.

1.4) Cycle viral

L'infection des animaux s'effectue en plusieurs phases où différents tissus sont affectés (**revue par Granados et Federici, 1986**). Dans la nature, l'hôte est infecté par ingestion d'aliment contaminé par des corps d'inclusions viraux. L'infection modifie le comportement, la physiologie et la biosynthèse cellulaire de l'animal au profit de la production de particules virales. Dans des conditions artificielles d'infection, la capacité de mobilisation de la synthèse protéique de l'hôte par le virus peut être utilisée pour faire exprimer une protéine étrangère.

1.4.1) infection primaire des cellules de l'hôte

Les NPV (prototype : AcMNPV) sont transmis par ingestion de corps d'inclusion. Ces corps d'inclusion sont dissous dans l'environnement intestinal alcalin de l'hôte. Les virions inclus libérés pénètrent les cellules épithéliales (infection primaire) où ils subissent un premier cycle de réplication.

1.4.2) premier cycle de réplication virale

L'enveloppe des virions inclus fusionne avec la membrane plasmique de la face apicale des cellules épithéliales et les nucléocapsides sont transportées vers le noyau où l'ADN viral est libéré. L'ADN est répliqué et des nucléocapsides sont assemblées dans le stroma virogène du noyau hypertrophié (8 h pi). Les nucléocapsides sont alors exportées vers la membrane cellulaire. Elles acquièrent successivement une enveloppe à partir de l'enveloppe nucléaire, la perdent puis sont enveloppées d'une membrane plasmique lorsqu'elles bourgeonnent au dehors de la cellule (18 h pi). Les virions extra-cellulaires ainsi formés possèdent un péplomère (proéminence glycoprotéique de virions enveloppés) composé notamment d'une glycoprotéine virale de 64 kDal (gp64) ancrée à la membrane plasmique formant désormais l'enveloppe virale.

1.4.3) infection secondaire de l'organisme

Les virions extra-cellulaires sont disséminés dans l'ensemble de l'organisme, ils vont permettre l'infection secondaire. Les virions pénètrent dans les cellules par endocytose et fusion membranaire, les nucléocapsides sont alors importées dans le noyau en induisant des câbles d'actine (**Charlton et Volkman, 1993**) où la réplication se déroule alors suivant le même schéma que décrit précédemment.

1.4.4) inclusion des virions dans des structures protéiques

En phase plus tardive d'infection (24 h pi), les nucléocapsides sont enveloppées individuellement (SNPV) ou collectivement (MNPV) dans le noyau par une membrane

fabriquée *de novo*. Ils sont alors inclus dans une matrice paracrystalline. Cette trame protéique est composée d'une protéine virale de 29 kDal, la polyédrine, exprimée en abondance en fin d'infection. Ces corps d'inclusion sont entourés d'une enveloppe et peuvent, après mort de l'animal ou évacuation dans les fèces, contaminer l'environnement.

1.4.5) les baculovirus vecteurs d'expression

Lors d'infections expérimentales (de cultures cellulaires ou par injection à des animaux), seule l'infection par virions extracellulaires est indispensable. Les gènes impliqués exclusivement dans l'inclusion des virions sont non essentiels avec ce mode de transmission. Ces gènes sont la polyédrine (protéine majeure des corps d'inclusion) et la p10 (protéine nucléaire et cytoplasmique de fonction mal définie). Ces gènes étant non essentiels, les loci correspondants du génome viral peuvent être modifiés ce qui permet d'obtenir des virus recombinants. L'ADN viral est infectieux et le génome est extensible ce qui rend les recombinaisons faciles. Les gènes très tardifs sont exprimés de façon massive et l'utilisation de leurs promoteurs a permis le développement de vecteurs d'expression baculovirus particulièrement efficaces (**revue par Luckow et Summers, 1988**).

1.4.6) interaction hôte-pathogène

Parmi les nombreuses interactions du virus avec son hôte, deux phénomènes ont été décrits : l'un concerne la mort cellulaire induite par le virus (**Clem et coll., 1991**), l'autre contrôle l'endocrinologie de l'hôte (**O'Reilly et coll., 1989b**).

1.4.6.1) rôle du virus dans l'apoptose

La non induction de la mort cellulaire programmée par l'infection est essentielle à la propagation virale. Durant l'infection, la cellule est maintenue en survie par un ou des gènes viraux qui empêchent l'apoptose (mort programmée de la cellule : **Hockenbery et coll., 1993**) (**Clem et coll., 1991**). L'inactivation accidentelle ou expérimentale du gène *p35* d'*AcMNPV* provoque la mort prématurée des cellules infectées, ce qui limite l'infection virale *in vivo* comme *in vitro* (**Clem et coll., 1991**). *In vitro* le caractère essentiel de ce gène dépend de la lignée cellulaire utilisée (**Hershberger et coll., 1992**). Ce gène agit *in trans* comme cela a été suggéré avec un virus portant un gène *p35* inactivé, en insérant un gène intact ailleurs dans le virus (**Hershberger et coll., 1992**). Lorsque le gène *p35* est inactivé, la prévention de l'apoptose est restaurée en co-transfectant l'ADN viral avec un fragment d'ADN du baculovirus à granuloze *CpGV* porteur du gène *iap* (**Crook et coll., 1993**) par complémentation *in trans*. Curieusement, le gène *iap* de *CpGV* ne possède pas d'homologie avec le gène *p35*

d'AcMNPV mais est étroitement apparenté avec un autre gène très précoce d'AcMNPV de fonction inconnue (**Crook et coll., 1993**). Ces gènes de type *iap* présentent des motifs en "zinc finger" présents également sur les gènes très précoces de baculovirus : *ie-N*, *cg30* et *pe-38*. La présence d'un motif en "zinc finger" les identifie comme des régulateurs transcriptionnels et les apparente notamment à certains oncogènes. Ces travaux suggèrent qu'il existe une famille de gènes impliqués dans la régulation virale de l'apoptose et que leur utilisation est spécifique des cellules infectées.

L'importance de l'apoptose peut également être évaluée en utilisant des gènes étrangers. Un gène responsable de la méthylation des adénines des motifs TCGA accélère le phénomène d'apoptose lorsqu'il est exprimé par un baculovirus (**Xia et coll., 1993**). A l'inverse lorsque le proto-oncogène *bcl-2* a été surexprimé dans des cellules SF9 infectées par un virus recombinant, la mort cellulaire a été retardée (**Alnemri et coll., 1992**).

1.4.6.2) modifications endocrinologiques de l'hôte

Au cours du développement larvaire, les chenilles arrêtent de s'alimenter au moment des mues et de la pupaison. Le virus AcMNPV inhibe la mue et la pupaison des larves infectées qui continuent donc à s'alimenter (**O'Reilly et coll., 1989b**). Ce phénomène est dû à l'ecdystéroïde UDP-glucosyltransférase codée par le gène *egt* du virus (**O'Reilly et coll., 1989b**). Cette enzyme en modifiant l'ecdystéroïde de l'hôte (hormone du développement) modifie son comportement (**O'Reilly et coll., 1989b**).

1.5) Transcription des gènes viraux

Dans les cellules infectées, l'expression des gènes viraux s'effectue selon une cascade ordonnée d'évènements (**Kelly et Lescott, 1981**). Un grand nombre de faits suggère que cette régulation s'opère au niveau de la transcription (**Blissard et Rohrmann, 1990**). La transcription des baculovirus est divisée en 4 classes temporelles : 2 précoces et 2 tardives (**Kelly et Lescott 1981**). Ces classes sont différenciées également par les signaux de transcription, les ARN polymérase utilisées et la nécessité de facteurs viraux pour la transcription (**Blissard et Rohrmann, 1990**).

1.5.1) transcription des gènes précoces

L'expression des gènes très précoces (alpha) ne nécessite pas de synthèse de protéines virales au préalable comme cela a été montré dans des expériences de marquage des protéines en utilisant des inhibiteurs spécifiques (**Kelly et Lescott, 1981**). Par contre, les gènes précoces (bêta) ont besoin pour s'exprimer du produit fonctionnel des gènes alpha (**Kelly et Lescott, 1981**). Ils ne s'expriment pas dans des cellules infectées en présence d'analogues d'acides aminés conduisant à la synthèse de protéines non fonctionnelles (**Kelly et Lescott, 1981**). Leur ARN ne sont pas transcrits en présence de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique) (**Rice et Miller, 1986**) contrairement aux gènes alpha. Il faut noter que les conclusion tirées de l'utilisation de la cycloheximide peuvent fausser la classification car une infime quantité de protéines de la classe alpha peu suffire à activer les gènes bêta (**Guarino et Summers, 1987**).

La transcription des gènes alpha est sous la dépendance de l'ARN polymérase II cellulaire. Cela a été montré dans des expériences de transcription par des extraits nucléaires hétérologues de cellules de mammifères en présence de l' α -amanitine un inhibiteur spécifique de l'ARN polymérase II (**Hoopes et Rohrmann, 1991**).

1.5.2) signaux et site d'initiation de transcription des gènes précoces

Dans le cas général, la transcription des gènes alpha et de certains gènes bêta commence à partir de l'adénine d'une séquence "CAGT" se situant 21 à 24 nucléotides en aval d'une "TATA box" (Blissard et Rohrmann, 1990). Cette séquence "CAGT" n'est pas retrouvée au site précoce du gène *39k* (Guarino et Smith, 1992) et au site précoce du gène *35k* (Dickson et Friesen, 1991). Dans le cas du promoteur précoce de *39k*, il a été démontré que la "TATA box" détermine la localisation du site d'initiation par des expériences d'insertion entre la "TATA box" et le site normal d'initiation (Dickson et Friesen, 1991). Pour les gènes de l'ADN polymérase (*dnapol*), de l'hélicase (*p143*) et de l'activateur des fonctions tardives *p47*, la séquence "CGTGC" est le site d'initiation de la transcription précoce (Carstens et coll., 1993).

L'intégrité de la "TATA box" est nécessaire à la transcription, comme l'ont prouvé des expériences de transfection de cellules par le gène *gp64* (Blissard et Rohrmann, 1991) et par le gène *39k* (Guarino et Smith, 1992). Pour le gène *39k*, l'intégrité du signal "CAGT" est également indispensable à la transcription spécifique à ce site (Guarino et Smith, 1992). La transcription précoce de *39k* est initiée à un second site différent de "CAGT", la mutation de ce site n'altère pas de façon quantitative la transcription à ce site (Guarino et Smith, 1992). Une séquence consensus "G(A/T)(G/T)A(A/T)CGTGT(A/G)" est fréquemment trouvée en amont des promoteurs précoces (entre 40 et 100 paires de bases du cap) (Nissen et Friesen, 1989). Ce consensus est retrouvé dans le consensus des répétitions en tandem de l'activateur transcriptionnel viral *hr5*: "(A/T)(A/T)CGNGT(A/G)".

L'interaction d'un facteur nucléaire de type protéine "GATA" avec le promoteur d'un gène alpha (*pe38*) a été mise en évidence par des expériences de "foot printing" et de retard sur gel (Krappa et coll., 1992). Cependant, l'altération du site de fixation du facteur de type "GATA" sur le promoteur de *pe38* ne modifie pas sa transcription en expression transitoire (Krappa et coll., 1992). La protéine PE38 issue de ce gène porte des motifs "zinc finger" et "leucine zipper" spécifiques des protéines ayant de l'affinité avec l'ADN (Krappa et coll., 1992).

Le promoteur d'un autre gène alpha, le gène *me53*, n'est actif en expression transitoire dans les cellules de *Spodoptera frugiperda* que s'il possède des séquences virales spécifiques en amont de sa "TATA box" (Knebel-Mörsdorf et coll., 1993). Cela n'est pas obligatoire pour les cellules TN-368 de *Trichoplusia ni* (également permissive au virus), ce qui montre que les signaux requis pour la transcription peuvent être différents d'une machinerie cellulaire à l'autre (Knebel-Mörsdorf et coll., 1993). Le gène *me53* code pour une protéine portant un motif "leucine zipper" (Knebel-Mörsdorf et coll., 1993).

1.5.3) la transcription des gènes tardifs

Les gènes tardifs (gamma) et très tardifs (delta) commencent leur transcription pendant ou après la réplication de l'ADN viral (Kelly et Lescott, 1981). Leur expression est inhibée par la cytosine arabinoside (Kelly et Lescott, 1981) et est bloquée par l'aphidicoline, un autre inhibiteur de l'ADN polymérase virale qui bloque également la transcription des gènes tardifs (Rice et Miller, 1986). La cycloheximide, inhibiteur des fonctions précoces (Kelly et Lescott, 1981) et l'altération de gènes précoces (Miller et coll., 1983; Partington et coll., 1990; Carstens et coll., 1993) ont également un effet délétère sur l'expression des gènes tardifs gamma et delta. En expression transitoire, la transcription de ces gènes est activée par des facteurs viraux (Knebel et coll., 1985; Guarino et Summers, 1988; Weyer et Possee, 1988; Passarelli et Miller, 1993). Toutefois, des produits de gènes tardifs et très tardifs (capsides vides et polyèdres) ont été observés dans des cellules infectées, traitées à la cytosine arabinoside (inhibiteur des ADN polymérases) à 44 h pi (Dobos et Cocheran, 1980). D'autre part, un produit de gène tardif a été détecté dans des cellules de drosophile, cellules ne permettant pas la réplication normale de l'ADN viral, et ceci même en présence d'aphidicoline (Morris et Miller, 1992). Des expériences complémentaires (Morris et Miller, 1993) ont montré que l'aphidicoline ne bloquait pas complètement la réplication de l'ADN viral ce qui pourrait autoriser une faible transcription du gène tardif considéré.

1.5.4) signaux de transcription des gènes tardifs et très tardifs

Il existe un motif conservé parmi les promoteurs de gènes tardifs "(A/G)TAAG" (Blissard et Rohrmann, 1990). Leur transcription est initiée directement à partir du motif, généralement au niveau de la thymidine (Blissard et Rohrmann, 1990). Les gènes très tardifs (delta) se différencient des gènes tardifs car ils produisent des ARN présents très tard lors de l'infection et sont très exprimés (Blissard et Rohrmann, 1990). Les gènes delta connus sont les gènes de la polyédrine et *p10*, dont l'initiation de la transcription s'opère à partir de la séquence consensus des gènes tardifs "(A/G)TAAG" dans le consensus plus large "A(A/G)TAAGTATTT" (Ooi et coll., 1989; Blissard et Rohrmann, 1990).

Possee et Howard (1987) ont fait des délétions et des insertions dans la région flanquante en 5' du gène de la polyédrine, l'activité de la transcription du gène étant mesurée par un gène rapporteur. Le promoteur a pu être délété jusqu'à 20 paires de bases avant le site d'initiation sans que l'activité de la transcription ne soit altérée. Des résultats similaires ont été rapportés dans des expériences d'expression transitoire du gène très tardif *p10* (Qin et coll., 1989) et du promoteur tardif du gène *39k* (Guarino et Smith, 1992). Ces promoteurs sont donc actifs sans que d'autres séquences que celle du site d'initiation ne soient nécessaires en amont. En aval du site

1.5.3) la transcription des gènes tardifs

Les gènes tardifs (gamma) et très tardifs (delta) commencent leur transcription pendant ou après la réplication de l'ADN viral (Kelly et Lescott, 1981). Leur expression est inhibée par la cytosine arabinoside (Kelly et Lescott, 1981) et est bloquée par l'aphidicoline, un autre inhibiteur de l'ADN polymérase virale qui bloque également la transcription des gènes tardifs (Rice et Miller, 1986). La cycloheximide, inhibiteur des fonctions précoces (Kelly et Lescott, 1981) et l'altération de gènes précoces (Miller et coll., 1983; Partington et coll., 1990; Carstens et coll., 1993) ont également un effet délétère sur l'expression des gènes tardifs gamma et delta. En expression transitoire, la transcription de ces gènes est activée par des facteurs viraux (Knebel et coll., 1985; Guarino et Summers, 1988; Weyer et Possee, 1988; Passarelli et Miller, 1993). Toutefois, des produits de gènes tardifs et très tardifs (capsides vides et polyèdres) ont été observés dans des cellules infectées, traitées à la cytosine arabinoside (inhibiteur des ADN polymérases) à 44 h pi (Dobos et Cocheran, 1980). D'autre part, un produit de gène tardif a été détecté dans des cellules de drosophile, cellules ne permettant pas la réplication normale de l'ADN viral, et ceci même en présence d'aphidicoline (Morris et Miller, 1992). Des expériences complémentaires (Morris et Miller, 1993) ont montré que l'aphidicoline ne bloquait pas complètement la réplication de l'ADN viral ce qui pourrait autoriser une faible transcription du gène tardif considéré.

1.5.4) signaux de transcription des gènes tardifs et très tardifs

Il existe un motif conservé parmi les promoteurs de gènes tardifs "(A/G)TAAG" (Blissard et Rohrmann, 1990). Leur transcription est initiée directement à partir du motif, généralement au niveau de la thymidine (Blissard et Rohrmann, 1990). Les gènes très tardifs (delta) se différencient des gènes tardifs car ils produisent des ARN présents très tard lors de l'infection et sont très exprimés (Blissard et Rohrmann, 1990). Les gènes delta connus sont les gènes de la polyédrine et *p10*, dont l'initiation de la transcription s'opère à partir de la séquence consensus des gènes tardifs "(A/G)TAAG" dans le consensus plus large "A(A/G)TAAGTATTT" (Ooi et coll., 1989; Blissard et Rohrmann, 1990).

Possee et Howard (1987) ont fait des délétions et des insertions dans la région flanquante en 5' du gène de la polyédrine, l'activité de la transcription du gène étant mesurée par un gène rapporteur. Le promoteur a pu être délété jusqu'à 20 paires de bases avant le site d'initiation sans que l'activité de la transcription ne soit altérée. Des résultats similaires ont été rapportés dans des expériences d'expression transitoire du gène très tardif *p10* (Qin et coll., 1989) et du promoteur tardif du gène *39k* (Guarino et Smith, 1992). Ces promoteurs sont donc actifs sans que d'autres séquences que celle du site d'initiation ne soient nécessaires en amont. En aval du site

d'initiation de la transcription des gènes delta *p10* (Weyer et Possee, 1988) et de la polyédrique (Ooi et coll., 1989), l'intégrité de la région 5' non traduite s'avère indispensable à l'activité maximale du promoteur sans que la stabilité des ARN ne soit mise en cause (Ooi et coll., 1989).

Par ces caractéristiques, les promoteurs des gènes tardifs de baculovirus sont atypiques et s'apparentent aux promoteurs reconnus par des ARN polymérases mitochondriales et des bactériophages T7 et T3 par l'identité des séquences reconnues et du site d'initiation (Qin et coll., 1989). Enfin, notons que la séquence des promoteurs de mitochondrie de levure est très similaire : "TATAAGTA" (Qin et coll., 1989).

1.5.5) extinction de la transcription des gènes cellulaires en fin d'infection

La transcription des gènes cellulaires d'actine, d'histone et *hsp70* est inhibée à partir du début de la phase tardive (12-18 h pi) de l'infection (Kelly et Lescott, 1981; Ooi et Miller, 1988). Ce phénomène est bloqué en présence de cycloheximide, d'aphidicoline (Ooi et Miller, 1988) ou de cytosine arabinosine (Kelly et Lescott, 1981), ce qui montre qu'il est dû à une fonction virale tardive. L'inhibition de l'activité ARN polymérase II cellulaire met en évidence l'existence d'une ARN polymérase virale encore active en phase tardive d'infection (Ooi et Miller, 1988).

1.5.6) les "homologous regions" (*hr*) : des activateurs transcriptionnels viraux agissant en *cis*

Six régions de l'ADN viral présentant de fortes homologies de séquence ont été localisées (Guarino et Summers, 1986b; Guarino et coll., 1986). L'une d'entre elle, *hr5*, a été placée en *cis* dans des constructions utilisant différents promoteurs et un gène rapporteur. La construction est transfectée dans des cellules et l'expression transitoire du gène chimère est mesurée. Le promoteur de *iel* (gène très précoce de baculovirus) n'est pas activé par *hr5* (Guarino et Summers, 1986b), alors que celui de *ieN* (autre gène très précoce) est activé par *hr5* (Carson et coll., 1991a). Le promoteur de *39K* (gène précoce du baculovirus) est activé par *hr5* seul ou en synergie avec IE1 (protéine activatrice produite par le gène *iel*) (Guarino et coll., 1986) tout comme le gène hétérologue du virus de vertébré RSV (Guarino et Summers, 1986b). D'autres gènes précoces du baculovirus tel que *35K* (Nissen et Fiesen, 1989) et le *p143* (Lu et Carstens, 1993) ont leur transcription induite par *hr5*. L'activation est indépendante de la position et de l'orientation de *hr5* vis à vis du gène comme attendu d'un "enhancer" (Guarino et Summers, 1986b; Guarino et coll.,

1986; Nissen et Fiesen, 1989; Carson et coll., 1991a; Lu et Carstens, 1993).

Dans des expériences d'expression transitoire basées sur le même principe, l'importance de la présence des *hr* en *cis* des gènes tardifs a été mise en évidence : la transcription à partir d'un promoteur tardif (normalement localisé en aval de *ie1* sur le brin négatif) est activée d'un facteur 5 par la présence de *hr5* dans la construction qui est co-transfectée avec de l'ADN viral (Guarino et Summers, 1987). Par ailleurs, la transcription du gène très tardif *p10* est également activée par la présence de *hr5* dans des expériences d'expression transitoire en cellules infectées (Qin et coll., 1989).

Pour le gène précoce *35K*, l'activation en *cis* par *hr5* a pu être vérifiée *in situ* lorsque les séquences sont intégrées dans un virus recombinant (Rodems et Friesen, 1993). On ne retrouve pas le même effet *in situ* pour le promoteur du gène très tardif de la polyédrine et pour le consensus tardif du LTR du transposon TED de lépidoptère (Rodens et Friesen, 1993). La signification de ces expériences doit être relativisée car parmi ces trois gènes analysés *in situ*, seul *35K* est naturellement présent à proximité d'une séquence *hr*.

1.5.7) l'ARN polymérase virale

Une activité ARN polymérase, résistante à l'alpha-amanitine, distincte de l'activité cellulaire a été détectée dans des extraits de cellules infectées par AcMNPV (Gruha et coll., 1981). La résistance de l'activité enzymatique à l'alpha-amanitine apparente cette activité à l'ARN polymérase I cellulaire (responsable de la transcription des ARNr dans les nucléoles), mais Yang et coll. (1991) ont démontré qu'il s'agissait en fait d'une ARN polymérase ayant une composition en sous unités différente des 3 ARN polymérases cellulaires. De même, immunologiquement l'ARN polymérase virale est distincte des ARN polymérases cellulaires (Yang et coll., 1991). L'activité ARN polymérase virale est présente dans des cellules infectées traitées à l'aphidicoline, ce qui suggère une régulation précoce de ce gène.

1.5.8) transcription de gènes viraux par des extraits nucléaires

En transcription *in vitro*, par des extraits nucléaires de cellules saines, les gènes bêta sont transcrits à un niveau de base (Glocker et coll., 1992). Avec des extraits de cellules infectées, certains promoteurs alpha et bêta sont activés (activation d'un facteur 10 du promoteur de IE1) (Glocker et coll., 1992), mais si les extraits sont préparés après 8 h d'infection, la quantité d'ARN transcrit décroît. Ce phénomène est expliqué par les auteurs comme étant dû à la forte activité DNase mesurée dans les extraits nucléaires en phase tardive d'infection.

Les promoteurs tardifs ne sont pas reconnus par des extraits nucléaires de cellules saines ou infectées. Cette absence de transcription est expliquée par la perte d'un facteur essentiel lors de la préparation des extraits (**Glocker et coll., 1992**).

1.5.9) la transcription anti-sens des gènes viraux

Les gènes viraux sont fréquemment transcrits en ARN suivant une orientation inverse à la normale (orientation anti-sens) (**Oellig et coll., 1987; Guarino et Summers, 1988; Ooi et Miller, 1992**). La transcription d'ADN sur les 2 brins permet d'expliquer une régulation négative d'un des gènes par différents mécanismes : déstabilisation d'ARN par formation de molécules hybrides (effet en *trans*) (**Takayama et Inouye, 1990**), ou occlusion de promoteurs (effet en *cis*) (**Ooi et Miller, 1992**).

Deux cadres de lecture ouverts (ORF) encadrent le gène de la polyédrine, leur orientation est inverse par rapport à la polyédrine (**Ooi et Miller, 1992**). Un ARN de 3,2 kpb couvre ces 2 ORF en orientation sens et la polyédrine en orientation anti-sens, cet ARN est présent à un niveau maximal dans les cellules à 12 h pi (gène tardif) puis son niveau décroît (**Ooi et Miller, 1992**). Cette décroissance atypique pour un gène tardif n'est pas observée si la transcription du gène de la polyédrine est abolie par mutagenèse (**Ooi et Miller, 1992**). Cela suggère une régulation anti-sens de l'ARN de 3,2 Kb (ARN sens) par les ARN du gène de la polyédrine (ARN anti-sens) (**Ooi et Miller, 1992**).

La même chute de la quantité d'ARN en fin d'infection est retrouvée pour le gène *dnapol* de l'ADN polymérase d'*AcMNPV* (**Tolmaski et coll., 1988**). Une unité de transcription putative (présence d'un signal tardif d'initiation) chevauche sur le brin complémentaire la région 5' des gènes *dnapol* de *LdMNPV* et *AcMNPV* (**Bjornson et coll., 1992**). Cet ARN anti-sens porte une ORF conservée de façon significative entre les deux virus (**Bjornson et coll., 1992**).

La présence de transcrits anti-sens peut amener à la production d'artéfacts dans les expériences d'extention d'amorce et de protection de sonde ADN sur les ARN sens à analyser (**Ooi et Miller, 1991**).

1.5.10) épissage des ARN viraux

Un seul gène de baculovirus, *ie1*, a été décrit comme ayant un ARN susceptible d'être épissé (Chisholm et Henner, 1988). L'épissage rajoute aux ARN de *ie1* un exon supplémentaire, en amont de la séquence codante de la protéine IE1, ce qui permet la traduction d'une protéine plus grande appelée IE0 (Chisholm et Henner, 1988). Ce phénomène d'épissage est observé tout au long de l'infection (Kovacs et coll., 1991a) pour des ARN initiés au niveau des promoteurs précoces mais aussi tardifs.

1.5.11) ARN polycistronique

Le gène *cg30* est présumé, selon sa séquence, être un facteur de transcription (présence de motifs de "zinc finger" et "leucine zipper") (Thiem et Miller, 1989). Il a été localisé comme la seconde ORF d'un ARNm polycistronique (Thiem et Miller, 1989). Le cadre de lecture de *cg30* commence 2 nucléotides après le codon stop de la protéine majeure de capsid (vp39). Le gène *cg30* est transcrit à partir d'un promoteur précoce interne à l'ORF de la vp39 et à partir du promoteur tardif en amont de *vp39*. Des minicistrons sont également présents au début des gènes *39k* (Guarino et Summers, 1990) *gp64* d'*OpMNPV* (Blissard et Rohrmann, 1991) et *ie0* (Kovacs et coll., 1991a). La présence de minicistron dans trois gènes de baculovirus leurs suggère un rôle dans les cellules infectées bien que la mutation du minicistron du gène *39k* soit sans incidence sur l'expression du gène rapporteur *cat* lorsque la construction p39K-CAT est transfectée dans des cellules (Guarino et Smith, 1992).

1.5.12) activité relative des promoteurs des différentes classes

L'activité relative des différents types de promoteurs de baculovirus a été évaluée en les plaçant "*in situ*" dans un virus recombinant, en amont du gène rapporteur *cat* (Morris et Miller, 1992). Un promoteur de gène cellulaire de drosophile (*hsp70*) a été utilisé en parallèle. Dans des cellules permissives au virus, le promoteur très tardif est 2 à 3 fois plus actif que le promoteur tardif et 10 à 20 fois plus actif que le promoteur précoce ou le promoteur cellulaire de drosophile (Morris et Miller, 1992). Dans des lignées cellulaires infectables mais ne produisant pas de virions de façon efficace, la différence entre promoteurs tardifs et très tardifs disparaît ou s'inverse (Morris et Miller, 1992). Dans les cellules non permissives, le promoteur de *hsp70* est le plus actif bien que les promoteurs viraux restent actifs (Morris et Miller, 1992).

1.6) Les gènes très précoces *ie1* et *ie0* et leurs implications dans la régulation génique

Le promoteur du gène de la protéine non structurale précoce majeure 39K d'*AcMNPV* dépend de produits viraux pour être actif après transfection (**Guarino et Summers, 1986a**). Le gène viral *ie1*, responsable de son activation en *trans* a été localisé et sa régulation analysée (**Guarino et Summers, 1986a**). Les propriétés de ce gène et de *ie0* qui est produit par épissage de certains de ses ARN (**Chisholm et Henner, 1988**), ont été étudiées, tant sur des promoteurs isolés que lorsqu'ils sont liés en *cis* à des séquences d'activateurs transcriptionnels (**Kovacs et coll., 1991b**). Les promoteurs des différentes classes temporelles du virus sont régulés par IE1 (**Passarelli et Miller, 1993**) qui active également des promoteurs étrangers aux baculovirus (**Guarino et Summers, 1986b**). Des expériences de retard sur gel ont mis en évidence son interaction avec des séquences cibles virales (**Guarino et Dong, 1991**). Cela a permis de localiser les différents domaines fonctionnels, d'affinité avec l'ADN, d'activation et d'inhibition de la protéine IE1 (**Kovacs et coll., 1992**).

1.6.1) un mutant thermosensible d'*AcMNPV* affecté dans l'expression des gènes viraux alpha, bêta et gamma

Un mutant thermosensible d'*AcMNPV* a été caractérisé comme étant affecté, en condition non permissive, sur un locus de son génome dont la fonction est indispensable à la synthèse des protéines virales des phases bêta, gamma et delta et à la réplication de l'ADN (**Miller et coll., 1983**). Cette mutation a été localisée entre 90,7 et 1,9 unités génomiques (**Miller, 1981**) par la technique dite de "marker rescue", c'est à dire par co-transfection de l'ADN du virus mutant avec un fragment d'ADN de type sauvage. Le phénotype de cette mutation correspond bien à un gène précoce régulateur de toutes les fonctions virales.

1.6.2) un promoteur précoce dont l'activité dépend du virus : test pour localiser la(les) fonction(s) alpha activatrice(s)

Le promoteur du gène précoce et tardif de la protéine de 39 kDal (*39K* ou *pp31*), protéine non structurale majeure d'*AcMNPV* (**Vlack et coll., 1981; Guarino et Smith, 1990; Guarino et coll., 1992**), n'est pas actif en expression transitoire dans des cellules non infectées (**Guarino et Summers, 1986a**). Ce gène code pour une protéine phosphorylée basique ayant de l'affinité pour l'ADN et étant une composante du stroma virogène (**Guarino et coll., 1992**). Le promoteur du gène *39K* ne devient actif que s'il est transfecté dans des cellules infectées, ou s'il est co-

transfecté avec de l'ADN viral, c'est donc un gène bêta (**Guarino et Summers, 1986a**).

1.6.3) localisation du gène *ie1* d'AcMNPV

Le gène impliqué dans l'activation en *trans* de 39k-CAT a été localisé en coupant l'ADN viral, avant co-transfection, par différentes enzymes de restriction, supprimant ou ne supprimant pas l'activation (**Guarino et Summers, 1986a**). Le gène recherché se trouve au niveau d'un des sites de coupure inactivant l'effet de l'ADN viral co-transfecté. Cette stratégie de localisation est appelée cartographie fonctionnelle. La localisation est ensuite affinée par co-transfection du plasmide rapporteur avec des fragments d'ADN viral. Cette stratégie a été utilisée par **Guarino et Summers (1986a)** qui ont localisé la région du génome d'AcMNPV (entre 95 et 97,5 unités génomiques) capable d'activer, par co-transfection dans des cellules non infectées, le promoteur du gène *39k* (gène bêta) de la construction 39k-CAT (**Guarino et Summers, 1986a**). Notons que cette localisation correspond précisément à la mutation thermosensible décrite plus haut (**Miller, 1981**). L'activation est augmentée en présence de l'activateur transcriptionnel viral *hr5* inséré sur le même plasmide (**Guarino et Summers, 1986b**). Le promoteur du gène activateur porté par ce fragment d'ADN viral, dénommé "immediate early 1" (*ie1*), permet l'expression du gène rapporteur *cat* lorsque la construction IE1-CAT est transfectée dans des cellules non infectées (**Guarino et Summers, 1986a**). *ie1* est donc un gène alpha capable d'activer en *trans* l'expression d'un gène bêta, seul ou en synergie avec un activateur transcriptionnel viral.

1.6.4) IE1 protéine d'AcMNPV activatrice de promoteur

Le promoteur du LTR du virus du sarcome de Rous (RSV) en amont du gène rapporteur *cat* (RSV-CAT) est inactif dans des cellules non infectées (**Guarino et Summers, 1986b**), mais actif si les cellules sont infectées par AcMNPV (**Carbonel et coll., 1985; Guarino et Summers, 1986b**). Le gène *ie1* d'AcMNPV active en *trans* ce promoteur par co-transfection avec pRSV-CAT (**Guarino et Summers, 1986b**). Une activation en *trans* du même ordre de grandeur a été observée par la présence de l'activateur transcriptionnel viral *hr5* aux abords de RSV-CAT (*phr5*-RSV-CAT). L'activation par co-transfection de *ie1* est augmentée d'un facteur 1000 (en terme d'activité CAT) par la présence de la séquence *hr5* insérée aux abords de RSV-CAT (*phr5*-RSV-CAT) (**Guarino et Summers, 1986b**). IE1 peut donc activer en *trans* un gène hétérologue, seul ou en synergie avec un "enhancer" de baculovirus.

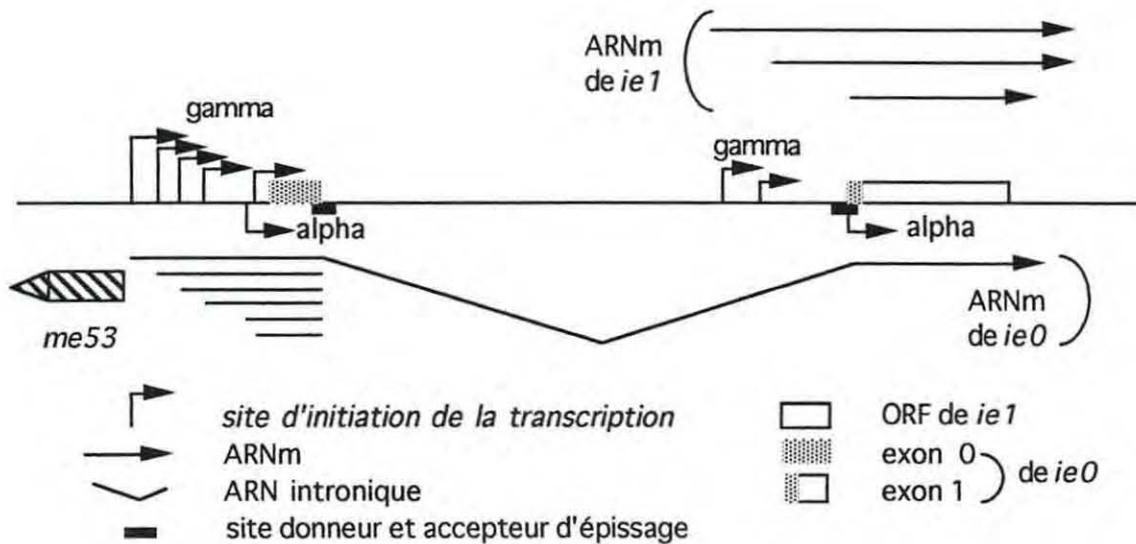
1.6.5) transcription du gène *iel* d'AcMNPV

D'après la séquence nucléotidique, *iel* code pour une protéine de 581 acides aminés et d'une masse moléculaire prédite de 66,856 kDal (**Guarino et Summers, 1987**). *iel* a été transcrit et traduit *in vitro* produisant une protéine d'une masse moléculaire apparente de 70 kDal, identique au produit de traduction *in vitro* d'ARNm de cellules infectées (**Guarino et Summers, 1987**). Des ARN sens d'*iel* de 1,9 kpb de long, initiés à 50 paires de bases en amont du signal d'initiation de la traduction, sont présents dès 0 heure post infection (h pi) (juste après une période d'adsorption du virus de 1 heure) et de façon constante durant l'infection (**Guarino et Summers, 1987**). Des ARN tardifs initiés à 880 et 1022 paires de bases en amont du site d'initiation précoce sont détectés à 12 h pi, puis leur quantité augmente à 18 h pi et se maintient jusqu'à 24 h pi (**Guarino et Summers, 1987**). Des ARN anti-sens ont aussi été observés, initiés en aval du transcrit sens et recouvrant partiellement ou totalement la séquence codante de *iel* (**Guarino et Summers, 1987; Kovacs et coll., 1991a**). Les transcrits précoces de *iel* sont donc présents de façon constante durant l'infection. Des transcrits sens de taille supérieure et des transcrits d'orientation anti-sens sont également observés en phase tardive d'infection.

La localisation virale d'un promoteur semble avoir une importance sur son activité. Pour le montrer, **Jarvis (1993)** a construit le gène chimère IE1-LacZ en plaçant le promoteur précoce de *iel* en amont du gène rapporteur *lac-z*. Cette unité de transcription a été placée soit dans l'ADN d'un virus recombinant soit dans l'ADN cellulaire d'une cellule transfectée (intégration aléatoire et aspécifique) : dans un environnement viral, le gène chimère est activé au niveau transcriptionnel en phase tardive d'infection alors que dans un environnement cellulaire, l'activité est réduite (**Jarvis, 1993**). Ceci peut s'expliquer par la réplication de l'ADN viral ou par une activation transcriptionnelle qui sont dûes à l'environnement du virus.

1.6.6) épissage d'ARN spécifique du gène *iel* et localisation des gènes *ie0* et *me53*

Des études complémentaires sur *iel* ont localisé l'épissage d'ARN initiés en amont du gène (**Chisholm et Henner, 1988**). L'épissage permet la traduction d'une protéine plus grande IE0 (**Chisholm et Henner, 1988**). Le promoteur de l'exon supplémentaire est en tandem inversé (c'est à dire en position tête à tête) avec le promoteur d'un autre gène très précoce *me53* (**Knebel-Mörsdorf et coll., 1993**).



Le site accepteur de l'épissage est situé au niveau du site d'initiation de transcription proximal du gène *ie1* d'AcMNPV (Chisholm et Henner, 1988). L'exon supplémentaire (exon 0) est situé 4 kbp en amont sur l'ADN viral et produit un ARNm de 2,1 Kb présent uniquement de façon très précoce (de 30 min à 4 h pi, maximum à 1 et 4 h pi) (Chisholm et Henner, 1988). Une répartition temporelle différente de la transcription de *ie0* sera discutée plus loin (Kovacs et coll., 1991a). Ce transcrite permet la synthèse d'une protéine contenant la totalité de IE1 avec 54 acides aminés supplémentaires en N terminal, ce qui permet de prédire la protéine IE0 de 636 acides aminés d'une taille présumée de 72,551 kDal (Chisholm et Henner, 1988).

L'absence de détection du phénomène d'épissage dans la première étude de *ie1* tient à la technique utilisée : en protection contre la nucléase S1 avec une sonde, seuls le site d'initiation de la transcription d'*ie1* et le site accepteur d'épissage qui sont confondus sont détectés (Guarino et Summers, 1987).

Le site d'initiation du transcrite de 2,1 kpb a été localisé par extension d'amorce à 189 paires de bases en amont du site donneur d'épissage (à 1 et 2 h pi) (Chisholm et Henner, 1988). Ce site est localisé dans la séquence "CATG" typique des promoteurs précoces et est précédé à 24 paires de bases par une "TATA box" (Chisholm et Henner, 1988). Ces signaux sont présents dans des séquences conservées plus larges : "CAGTATC" et "TATATAAAGCC" (Knebel-Mörsdorf et coll., 1993) identiques à celles du promoteur du gène *me53*. Le gène *me53* est transcrit en orientation opposée à *ie0*, les deux sites d'initiation de la transcription étant séparés de 170 paires de bases (Knebel-Mörsdorf et coll., 1993).

1.6.7) transcription et épissage de *iel*

Les transcrits de l'exon 0 ont été analysés plus en détail par des expériences de protection contre la nucléase S1 à l'aide d'une sonde génomique spécifique de l'intron (détection des ARN non épissés de *ie0*) (Kovacs et coll., 1991a) et d'une sonde génomique délétée de son intron (ADNc plus sa région promotrice) (Kovacs et coll., 1991a, 1991b). En utilisant cette dernière sonde, les ARN de *iel* et les ARN non épissés de *ie0* sont détectés de façon identique (fragments protégés courts) ainsi que les ARN épissés *ie0* (fragments protégés plus longs) (Kovacs et coll., 1991a, 1991b). L'utilisation de ces différentes sondes a permis de tester l'efficacité de l'épissage durant l'infection (Kovacs et coll., 1991a).

Les ARNs totaux spécifiques du site précoce d'initiation de la transcription de *ie0* puis épissés apparaissent à 0 h pi, leur niveau est stable jusqu'à 2 h pi, puis revient à un niveau plus faible vers 5 h pi (Kovacs et coll., 1991a). A partir de 24 h pi, les ARN détectés sont initiés à partir de quatre sites tardifs en amont et à un site tardif en aval du site d'initiation précoce, puis sont épissés (Kovacs et coll., 1991a). Les ARN totaux correspondant aux transcrits de *iel* et à ceux non épissés de *ie0* apparaissent 15 minutes après le contact du virus avec les cellules; leur niveau augmente à 0 h pi (0 h pi = 1 heure après l'inoculation), augmente encore à 1 h pi, puis redescend à 5 h pi avant de retrouver leur niveau précédant à 11 h pi et atteindre son maximum à 24, 48 et 72 h pi (Kovacs et coll., 1991a). Toutefois, l'inflexion du signal à 5 h pi n'a pas pu être confirmée par d'autres travaux utilisant notamment des expériences de "northern blot" (Kneber-Mörsdorff et coll., 1993).

Les transcrits précoces de *ie0* non épissés ne sont détectés qu'en très faible quantité et seulement entre 0 et 2 h pi (maximum de détection des ARN épissés correspondants) (Kovacs et coll., 1991a). Les transcrits tardifs de *ie0* non épissés apparaissent à partir de 24 h pi tout comme leurs équivalents épissés, sauf pour les transcrits tardifs les plus courts initiés en aval du site précoce (Kovacs et coll., 1991a). Ces ARN sont détectés non épissés à 11 h pi alors qu'ils ne sont pas détectables sous leur forme épissée (Kovacs et coll., 1991a).

Les transcrits de *ie0* sont donc capables d'être épissés tout au long de l'infection, quoique l'épissage semble moins efficace en fin d'infection et lorsque les ARN sont initiés au site tardif le plus proche du site d'épissage (Kovacs et coll., 1991a).

1.6.8) détection immunologique des protéines IE1 et IE0 du NPV d'*Orgyia pseudosugata* (OpMNPV)

Lorsque le gène *iel* d'OpMNPV est transfecté, la protéine est visible sous trois formes électrophorétiques. Si le gène transfecté comprend l'exon 0, 2 bandes de migration plus lente apparaissent (Theilman et Stewart, 1993). Les protéines IE1 et IE0 sont détectées tout au long de l'infection (Theilman et Stewart, 1993). Une des

IE0 sont détectées tout au long de l'infection (**Theilman et Stewart, 1993**). Une des bandes spécifiques de *ie1* est associée aux virions bourgeonnant mais pas aux virions inclus (**Theilman et Stewart, 1993**). L'apport d'une forme de IE1 aux cellules lors de l'infection est surprenant, il se peut que la présence de *ie1* dans les virions ne soit pas significative et soit dûe au mode d'enveloppement de ces virions au niveau de la membrane plasmique. Ce faible apport de IE1 par les virions pourrait expliquer la différence de transcription de certains gènes bêta après infection en présence de cycloheximide (transcription) ou transfection de cellules non infectées par de l'ADN nu (pas de transcription).

1.6.9 la protéine IEN d'AcMNPV activatrice en trans de *ie1*

Dans le cas d'AcMNPV, lorsque la quantité de *ie1* exprimée est limitante, l'activation de 39k-CAT par IE1 est augmentée par co-transfection avec de l'ADN viral (**Carson et coll., 1988**). Cette approche a servi de test pour la cartographie fonctionnelle des gènes impliqués dans cette activation (**Carson et coll., 1988**). Le gène isolé a été nommé *ieN*, il est transcrit dès 0 h pi (**Carson et coll., 1988**) et tout au long de l'infection (**Krappa et Knebel-Mördorf, 1991**). Par contre, la quantité de la protéine IE2 d'OpMNPV, protéine homologue de IEN d'AcMNPV, décroît à partir de 36 h (**Theilman et Stewart, 1993**).

Le gène *ieN* a un promoteur de type alpha actif dans des cellules non infectées (**Carson et coll., 1988**). Cela a été mis en évidence par des expériences d'expression transitoire de la construction IEN-CAT et par analyse des transcrits sur cellules transfectées par *ieN* (**Carson et coll., 1988**).

En co-transfection avec la construction IEN-CAT, IE1 réprime le promoteur de *ieN* alors que IEN active son propre promoteur (**Carson et coll., 1991a**). En co-transfection avec 39k-CAT, IE1-CAT ou IE0-CAT, IEN est sans effet sur le promoteur de 39K (**Carson et coll., 1988**) mais active les promoteurs de *ie1* et de *ie0* (**Carson et coll., 1991b**). La séquence de *ieN* a été analysée (**Carson et coll., 1991b**), le polypeptide de 47 kDal codé par ce gène possède des motifs de régulateur transcriptionnel. L'activation du promoteur de *ie1* par IEN a lieu également si le promoteur de *ie1* est transfecté de façon stable (intégration à l'ADN cellulaire) (**Jarvis, 1993**). Chez OpMNPV, l'activation de *ie1* par IE2 (homologue de IEN) a été mise en évidence par co-transfection et détection immunologique des protéines (**Theilmann et Stewart, 1993**). Comme cela a été montré par délétion progressive, la région du promoteur de *ieN* responsable de son autoactivation transcriptionnelle, n'est pas discernable du promoteur minimal (**Carson et coll., 1991b**).

1.6.10) régulation de *ie1* et des activateurs en *trans* associés

Pour le gène *gp64* d'*OpMNPV*, les séquences cibles responsables de l'activation en *trans* par IE1 ont été étudiées grâce à la construction *gp64-CAT* (le gène rapporteur *cat* est placé sous le contrôle du promoteur du gène *gp64*). Le gène chimère *gp64-CAT* est activé en expression transitoire par co-transfection avec le gène *ie1* d'*AcMNPV* tant que sa "TATA box" n'est pas délétée (**Blissard et Rohrmann, 1991**). L'action activatrice en *trans* de IE1 ne semble donc pas utiliser une région cible spécifique du promoteur.

Par des expériences de co-transfection d'un plasmide rapporteur avec pIE1, pIE0 (ADNc de la forme épissée sous contrôle du promoteur de l'exon 0) ou pIE0+IE1 (exon 0 et 1 de *ie1* séparés par leur intron dans leur configuration naturelle), les activités en *trans* de ces différents gènes alpha sur leur propre promoteur et sur celui d'un gène bêta ont été étudiées (**Kovacs et coll. 1991b**). Les plasmides rapporteurs utilisés étaient : pIE1-CAT (promoteur alpha de IE1), IE0-CAT (promoteur alpha de *ie0*), pIE0+IE1-CAT, p39K-CAT et *phr5-39K-CAT* (**Kovacs et coll. 1991b**). IE0 active la transcription de *ie1*, IE1 s'autoactive et inhibe la transcription de *ie0* (**Kovacs et coll. 1991b**). Les effets réciproques de IE0 et IE1 sur leur promoteur ont été vérifiés au niveau de la production des protéines fusionnées : IE0-CAT et IE1-CAT (**Kovacs et coll. 1991b**). Les auteurs ont analysé l'action de IE0 et IE1 sur le promoteur bêta du gène *39K* contrôlant l'expression du gène rapporteur *cat* : IE1 active la transcription de *39K* en présence (*phr5-39K-CAT*) et en absence (*p39K-CAT*) de *hr5*, alors que IE0 n'a d'effet sur la transcription de *39K* qu'en présence de *hr5* (**Kovacs et coll. 1991b**). En expression transitoire simple, *hr5* n'a pas d'effet sur la transcription de *ie1* (**Guarino et Summers, 1986b**).

D'autres analyses ont été faites par transfection des gènes isolés et analyse des ARN transcrits de façon transitoire (**Kovacs et coll., 1991b**). IE0 active la transcription de *ie1* (**Kovacs et coll., 1991b**). IE1 active sa propre transcription et inhibe la transcription de *ie0* (**Kovacs et coll., 1991b**). Dans la configuration naturelle exon 0-intron-exon 1 le promoteur de *ie0* n'est actif qu'en l'absence des protéines IE1 et IE0 (mutation non sens dans l'ORF de *ie1*) (**Kovacs et coll., 1991b**). IE0 n'a pas d'effet direct sur l'activité de son promoteur (**Kovacs et coll., 1991b**).

Pour résumer, il semble que IE0 et IEN apparaissent de façon transitoire pour activer *ie1* qui dès lors s'autoactive et inhibe les gènes alpha *ie0* et *ieN* (**Kovacs et coll., 1991b**). La protéine IE1 est aussi capable d'activer la transcription du gène précoce bêta : *39K* (**Guarino et Summers, 1986a**), alpha : *gp64* (**Blissard et Rohrmann, 1991**), d'un gène tardif (**Guarino et Summers, 1987**) et d'un gène très tardif (**Pasarelli et Miller, 1993**) ainsi qu'un promoteur hétérologue du rétrovirus du sarcome de Rous : RSV-LTR (**Guarino et Summers, 1986b**),.

Les gènes du MNPV d'*Orgyia pseudosugata* (*OpMNPV*) correspondant aux gènes *ie1* et *ieN* du baculovirus *AcMNPV* ont été isolés et caractérisés (**Theilman et Stewart, 1991**). L'activation réciproque de leurs promoteurs a été également étudiée (**Theilman et Stewart, 1991**). Le gène *ie1* d'*OpMNPV* présente le même phénomène d'épissage et une distribution temporelle de ses ARN qui sont similaires à ceux d'*AcMNPV* (**Theilman et Stewart, 1991**). Les activations de la transcription de *ie1* (IE1-CAT) par IE2 (équivalent de IEN d'*AcMNPV*) et par lui-même ont été montrées (**Theilman et Stewart, 1992**). Le gène *ie1* d'*OpMNPV* active la transcription du gène *39k* d'*AcMNPV* en absence (39K-CAT) ou en présence (hr5-39K-CAT) de l'activateur transcriptionnel *hr5* d'*AcMNPV* (**Theilman et Stewart, 1992**). L'activation de l'expression de *ie1* par IE2 et l'inhibition de l'expression de *ie2* par IE1 ont été également montrées par des techniques immunologiques en expression transitoire (**Theilman et Stewart, 1993**). Co-transfecté, le gène *ie1* du virus de *Bombyx mori* (*BmMNPV*) présente les mêmes propriétés d'activation en *trans* sur la construction hr5-39K-CAT que son homologue d'*AcNPV* (**Huybrechts et coll., 1992**).

1.6.11) IE1 protéine activatrice de gènes tardifs

L'effet d'IE1 sur les promoteurs tardifs a été étudié en expression transitoire par transfection d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur tardif (**Guarino et Summers, 1988**). Le promoteur utilisé est celui responsable de la transcription anti-sens du gène IE1 (pL1-CAT) (**Guarino et Summers, 1988**). Cette construction transfectée seule ou co-transfectée avec le gène *ie1* est inactive par contre L1-CAT s'exprime s'il est co-transfecté avec de l'ADN viral. IE1 n'a donc pas d'activité sur un promoteur viral tardif isolé, celui-ci dépend d'autres activités virales (**Guarino et Summers, 1988**). Afin d'étudier son action, l'activateur transcriptionnel viral *hr5* a été placé en amont du promoteur dans pL1-CAT (= pL2-CAT). Lorsque le plasmide pL2-CAT est transfecté seul, le gène *cat* n'est pas exprimé, par contre *cat* est exprimé si la construction est co-transfectée avec de l'ADN viral (**Guarino et Summers, 1988**). La présence de *hr5* en *cis* du promoteur augmente le signal obtenu d'un facteur 5 (**Guarino et Summers, 1988**). Si l'ADN viral co-transfecté avec pL2-CAT est substitué par *ie1*, l'activité devient très réduite (0,3%). Cela montre que IE1 est capable, en présence d'un activateur transcriptionnel viral, d'activer en *trans* un promoteur tardif bien que cette activation soit bien inférieure à celle obtenue avec de l'ADN viral. Pour localiser le facteur agissant en *trans* sur l'expression du promoteur tardif, pL2-CAT est co-transfecté avec *ie1* et avec différents fragments de restriction de l'ADN viral : 10% de l'activité est retrouvée par co-transfection avec un fragment d'ADN viral minimum (**Guarino et Summers, 1988**). Cette portion d'ADN viral porte trois ORF qui sont transcrites à partir de promoteurs bêta (**Guarino et Summers, 1988**). Seules deux de

ces ORF sont responsables de l'activation en *trans* de pL2-CAT. L'une de ces ORF code pour un peptide ayant un motif "cystein finger", ce qui laisse suspecter son interaction avec l'ADN. La réplication du plasmide rapporteur a été évaluée pour vérifier que l'activation ne soit pas une conséquence de la réplication (**Guarino et Summers, 1988**). Les plasmides ne sont répliqués que s'ils sont co-transfectés avec de l'ADN viral. L'activation est donc bien au niveau transcriptionnel, au moins dans les expériences de co-transfection avec *ie1* et d'autres fragments viraux .

ie1 et *ieN* sont essentiels à l'expression transitoire de promoteurs tardifs ou très tardifs (**Passarelli et Miller, 1993**). La transcription de ces gènes n'est possible qu'après co-transfection avec une librairie d'ADN viral. Le gène portant l'ORF de 630 paires de bases est également essentiel à l'expression des gènes tardifs et très tardifs (**Passarelli et Miller, 1993**).

1.6.12) retard sur gel d'une sonde *hr* par formation de complexes protéine IE1-élément *hr5*

L'extrait cellulaire de cellules transfectées par le gène *ie1* d'AcMNPV permet, par des expériences de retard sur gel d'une sonde *hr5*, de mettre en évidence deux types de retard correspondant à la formation de deux complexes (**Guarino et Dong, 1991**). La formation de ces deux complexes s'effectue de façon non compétitive et est spécifique d'extraits de cellules transfectées par *ie1* (**Guarino et Dong, 1991**). Ces complexes sont déplacés par un oligonucléotide correspondant à l'une des deux séquences de 60 paires de bases de *hr5* (**Guarino et Dong, 1991**). Ces séquences contiennent des séquences en tandem direct (DR60) contenant un palindrome. Lorsque DR60 est utilisé comme sonde dans des expériences de retard sur gel, un seul complexe est formé.

Les extraits cellulaires de cellules transfectées par *ie1* et ses différents mutants sont utilisés dans des expériences de retard sur gel d'une sonde *hr5* (**Kovacs et coll., 1992**). Les 25 acides aminés en position C terminale sont indispensables à la formation d'un complexe protéine-*hr5*. Les délétions progressives dans la partie N terminale de IE1 rendent la migration du complexe plus rapide. Cela montre bien que IE1 participe directement à la formation d'un tel complexe.

1.6.13) les différents domaines fonctionnels de IE1

Les multiples propriétés de IE1 impliquent très vraisemblablement que cette protéine est composée de différents domaines ayant des activités spécifiques. Pour vérifier cette hypothèse, **Kovacs et coll. (1992)** ont utilisé le gène *ie1* tronqué dans sa partie N ou C terminale. Ces gènes tronqués ont permis de tester l'activation en *trans* d'un promoteur bêta (p39k-CAT et p39k-CAT) par co-transfection (**Kovacs et coll., 1992**). Pour les différents mutants, l'activation est similaire en présence ou en

absence de l'activateur transcriptionnel viral ce qui montre que les régions d'IE1 impliquées dans les 2 types d'activation (*hr5* dépendante ou indépendante) sont les mêmes (Kovacs et coll., 1992). Les acides aminés de 51 à 144 en position N terminale et les 25 acides aminés C terminaux sont indispensables à l'activation du promoteur bêta du gène *39k* (Kovacs et coll., 1992). Pour valider ces expériences, la quantité de protéine IE1 mutée exprimée de façon transitoire a été contrôlée grâce à un sérum obtenu par injection d'une protéine IE1 produite en bactéries (Kovacs et coll., 1992).

L'effet des différents mutants d'IE1 est mesuré sur l'expression des protéines fusionnées IE0-CAT et IE1-CAT (Kovacs et coll., 1992). Pour cela, le gène *ie1* muté est co-transfecté avec pIE0+IE1-CAT et les protéines radiomarquées produites sont visualisées sur gel après immunoprécipitation avec un sérum anti protéine CAT. IE1 entier inhibe la production d'IE0-CAT et stimule la production de IE1-CAT. La protéine mutante délétée des 144 acides aminés en position N terminale inhibe IE0-CAT comme la protéine native, mais n'active pas la production de IE1-CAT (Kovacs et coll., 1992). Cela met en évidence le fait que les régions responsables de l'activation de IE1 et de l'inhibition de IE0 sont distinctes (Kovacs et coll., 1992). Le mutant de IE1 délété des 51 acides aminés en position N terminale a les mêmes propriétés que IE1 entier sur la production d'IE0-CAT et IE1-CAT (Kovacs et coll., 1992).

1.6.14) mutant d'IE1 dominant en trans

Les mutants de IE1 ont été testés pour leur capacité à perturber l'activation du promoteur de *39k* par IE1 ou IE0 (Kovacs et coll., 1992). Les constructions p ϕ 5-39k-CAT et p39k-CAT ont été co-transfectées simultanément avec *ie1* ou *ie0* et un des mutants d'*ie1*, l'activité CAT a été ensuite mesurée : IE1 délétée de ses 25 acides aminés en position C terminale (domaine de liaison à l'ADN essentiel à l'activation et à l'inhibition) inhibe d'une façon dépendante de la dose, l'effet de IE1 lié à l'activateur transcriptionnel *hr5*; l'activité de IE1 indépendante de l'activateur transcriptionnel n'est pas altérée; ce même mutant augmente l'effet activateur de IE0 sur p ϕ 5-39k-CAT; Le mutant de IE1 délétée de ses 144 acides aminés en position N terminale (domaine d'activation) n'interfère pas avec IE1 (Kovacs et coll., 1992). La structure secondaire de la partie C terminale de IE1 présente des structures en hélice-boucle-hélice typiques de motifs de liaison à l'ADN (Kovacs et coll., 1992). Cette région est plus particulièrement conservée entre les gènes *ie1* d'*AcMNPV* et d'*OpMNPV* (Kovacs et coll., 1992).

1.7) Le gène de l'ADN polymérase viral (*dnapol*) et les gènes en relation avec la réplication de l'ADN viral

L'ADN polymérase induite par les baculovirus a été d'abord décrite par son activité biochimique (Kelly, 1981; Miller et coll., 1981). Un gène *dnapol* présentant de fortes homologies avec d'autres ADN polymérases virales a été localisé sur le génome viral (Tolmaski et coll., 1988). La régulation de la transcription de ce gène semble complexe. C'est un gène précoce dont le niveau d'ARN détectable chute brusquement après 6 h pi (Tolmaski et coll., 1988). En analysant la séquence d'un autre gène de *dnapol* de baculovirus, on remarque des signaux de transcription tardive présents dans une orientation anti-sens, ce qui pourrait expliquer la régulation négative des ARN de *dnapol* en fin d'infection (Bjornson et coll., 1992). Le gène *p143* d'AcMNPV est essentiel à la réplication virale et code pour une hélicase (Lu et Carstens, 1991). Les signaux transcriptionnels de ce gène sont très proches de ceux du gène *dnapol* et comportent notamment le signal de transcription précoce non habituel "GCGTCT" (Lu et Carstens, 1991). Le gène *p143* est un gène précoce bêta et tardif (Lu et Carstens, 1991) ayant une fonction sur la spécificité virale (Croizier et coll., sous presse; Kamida et Maeda, 1993; Maeda et coll., 1993). Des origines virales de réplication ont été décrites, notamment les séquences *hr* également décrites comme activateurs transcriptionnels (Pearson et coll., 1992). Une protéine PCNA ("proliferating cells nuclear antigene") de la famille des cyclines a également été identifiée par homologie de séquence, son action favorise la réplication virale (O'Reilly et coll., 1989).

1.7.1) activité biochimique de l'ADN polymérase virale

L'activité biochimique et l'isolement en chromatographie d'une ADN polymérase induite par infection ont été décrits. Ses propriétés biochimiques l'apparentent aux ADN polymérases d'herpèsvirus, de poxvirus, d'adénovirus et aux ADN polymérases cellulaires de mammifère (Kelly, 1981; Miller et coll., 1981; Mikailov et coll., 1986a; Mikailov et coll., 1986b). Cette enzyme est exprimée même si les cellules sont traitées à l'aphidicoline, indiquant que le gène est vraisemblablement un gène viral précoce (Wang et Kelly, 1983).

1.7.2) localisation du gène *dnapol* par sonde hétérologue

Tolmaski et coll. (1988) ont localisé le gène de l'ADN polymérase virale d'AcMNPV par "Southern blot" en utilisant une sonde oligonucléotidique correspondant à une séquence d'acides aminés conservée entre différentes ADN polymérases virales. Le cadre de lecture ouvert (ORF) de cette séquence code pour un peptide de 984 acides

aminés d'une masse moléculaire de 114,310 kDal (Tolmaski et coll., 1988). Cette masse moléculaire correspond à la taille du peptide isolé en chromatographie suivant son activité enzymatique (Wang et Kelly, 1983). La séquence peptidique présente des zones d'homologies avec les différentes ADN polymérase virales (Tolmaski et coll., 1988). Le gène *dnapol* du NPV de *Lymantria dispar* (*LdMNPV*) a été également localisé par "Southern blot" avec une sonde spécifique du gène *dnapol* d'*AcMNPV* : les protéines déduites de la séquence présentent 45% d'homologie entre elles (Bjornson et coll., 1992).

1.7.3) transcription du gène *dnapol*

La transcription du gène *dnapol* d'*AcMNPV* a d'abord été décrite comme étant initiée principalement à -120 et -135 (les 2 sites les plus proximaux) et à -216 et -204 paires de bases (les 2 sites les plus distaux) en coordonnées relatives à l'initiation de la traduction (Tolmaski et coll., 1988). Les ARN correspondants ont été détectés entre 2 et 6 h pi, leur niveau devenant nul à 8 h pi (Tolmaski et coll., 1988). Lorsqu'un traitement à l'aphidicoline (inhibiteur de l'activité ADN polymérase virale) est appliqué au début et durant l'infection, la quantité d'ARN de *dnapol* détecté est réduite à 6 h pi mais leur présence est étendue à 12 h pi toutefois à ce dernier temps les sites proximaux sont sous représentés (Tolmaski et coll., 1988). Le gène *dnapol* semble donc s'autoréguler au niveau de la transcription ou semble être inhibé indirectement par la synthèse d'ADN viral ou l'expression de gènes tardifs (Tolmaski et coll., 1988). Un traitement à la cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique) dès le début de l'infection a permis de maintenir à 12 h pi la détection des ARN initiés à partir des sites distaux, les sites proximaux étant sous représentés (Tolmaski et coll., 1988). Quoique sa régulation soit plus complexe le gène *dnapol* est un gène bêta ou alpha, comme cela est montré par ailleurs dans des expériences de transcription et d'activation *in trans* par des extraits nucléaires de cellules saines et infectées (Glocker et coll., 1992; Bjornson et coll., 1992). Postérieurement à la première étude du gène *dnapol* d'*AcMNPV*, une autre technique de détection (extension d'amorce) a permis de montrer que le site proximal est le site d'initiation majeur (Glocker et coll., 1992).

Les signaux habituels des promoteurs précoces de baculovirus ne sont pas observés sur la séquence nucléotidique du gène *dnapol* d'*AcMNPV* (Tolmaski et coll., 1988) contrairement à ceux observés pour *LdMNPV* (Bjornson et coll., 1992). Les signaux de transcription du gène *dnapol* de *LdMNPV* ont été analysés comparativement à ceux d'*AcMNPV* (Bjornson et coll., 1992). Lorsque les promoteurs des gènes *dnapol* d'*AcMNPV* et de *LdMNPV* sont alignés suivant leur homologie de séquence, le site d'initiation le plus proximal d'*AcMNPV* coïncide avec le signal conventionnel de transcription précoce de *LdMNPV* (Bjornson et coll.,

1992). Ce site d'initiation de *LdMNPV* possède une "TATA box" 25 paires de base en amont, la région correspondante d'*AcMNPV* est "AAAA" (Bjornson et coll., 1992). Le site d'initiation précoce présomptif du gène *dnapol* de *LdMNPV* est actif en transcription *in vitro* dans des extraits cellulaires (Bjornson et coll., 1992).

1.7.4) transcription anti-sens du gène *dnapol*

Une ORF de 573 paires de bases codée par le brin complémentaire a été localisée en amont de la séquence codante du gène *dnapol* de *LdMNPV* et a été nommée ORF2 (Bjornson et coll., 1992). Cette séquence est retrouvée sur les 320 paires de bases séquencées en amont du gène *dnapol* d'*AcMNPV* (Bjornson et coll., 1992). La conservation de la séquence d'acides aminés est de 23% entre les deux virus sur la portion connue. L'ORF2 est précédée d'un signal de promoteur tardif situé à environ 25 paires de bases dans la séquence codante du gène *dnapol*, ceci pour les deux virus (Bjornson et coll., 1992). Le transcrit présomptif correspondant est d'orientation anti-sens vis à vis du gène *dnapol* et est contrôlé par une séquence conservée de promoteur tardif (Bjornson et coll., 1992). Ceci est une explication possible de l'extinction de la transcription du gène *dnapol* en phase tardive d'infection, comme cela a été décrit pour un transcrit anti-sens à la polyédrique (Ooi et Miller, 1992). La présence d'ARN anti-sens peut en tout cas expliquer la diversité des résultats obtenus pour la détermination du site d'initiation de la transcription de *dnapol* (Tolmaski et coll., 1988; Glocker et coll., 1992), car les ARN anti-sens ont déjà été décrits comme pouvant interférer avec la détection des ARN sens correspondants (Ooi et Miller, 1991).

1.7.5) le gène *p143* de l'hélicase, ses homologues de signaux transcriptionnels et sa régulation

Le gène codant pour une hélicase d'une taille présomptive de 143 kDal (*p143*) a été séquencé (Lu et Carstens, 1991). Sa fonction a été déduite de sa séquence peptidique et du phénotype d'un de ses mutants thermosensibles (Lu et Carstens, 1991). Les gènes *p143* et *dnapol* d'*AcMNPV* ont des schémas de régulation de la transcription similaires, avec une diminution en fin d'infection plus précoce pour *dnapol* (8 h pi) que pour *p143* (entre 12 et 26 h pi) (Lu et Carstens, 1992). Ces deux gènes sont impliqués dans la synthèse de l'ADN viral et leur promoteurs présentent certaines homologues (Lu et Carstens, 1992). Les sites d'initiation précoce de l'hélicase et proximal de la *dnapol* sont localisés au niveau d'une séquence "GCGTGCT" identique aux deux gènes (Lu et Carstens, 1992). Ce site précoce d'initiation à la transcription est également utilisé par le gène *p47* activateur des fonctions tardives et très tardives (Partington et coll., 1990; Carsten et coll., 1993). Cette séquence conservée

est précédée de 65 et 70 paires de bases par une autre séquence conservée "AGAGCGT" (Lu et Carstens, 1992). Ces deux séquences conservées n'ont pas été retrouvées pour d'autres gènes viraux (Lu et Carstens, 1992). Des motifs conservés communs à d'autres promoteurs précoces ont été aussi retrouvés (Lu et Carstens, 1992).

Lors d'expériences d'expression transitoire, le promoteur du gène *p143* n'est pas actif dans des cellules non infectées, sauf s'il présente l'activateur *hr5* lié en *cis* ou s'il est activé en *trans* par IE1 (Lu et Carstens, 1991). La transcription de *p143* en présence de IE1 est activée par co-transfection avec *ieN* comme cela est le cas pour la transcription de *39k*, un autre gène bêta (Lu et Carstens, 1993). Par contre, la co-transfection avec *pe38* active la transcription de *p143* en présence de IE1 alors que cela n'est pas le cas pour la transcription de *39k*, ce qui montre une régulation différente (Lu et Carstens, 1993). Une délétion en amont de la "TATA box" réduit significativement l'activité du promoteur du gène *p143* (Lu et Carstens, 1993), ce qui montre que le promoteur minimal suffit à l'induction de la transcription même si son niveau est moindre.

1.7.6) le gène *p143* et la spécificité virale

Certains baculovirus ont des séquences nucléiques très proches et recombinent ensemble, fréquemment lors de double infection, par exemple AcMNPV et le MNPV de *Rachiplusia* ou (RoMNPV) (Croizier et coll., 1988), AcMNPV et le NPV de *Bombyx mori* (BmNPV) (Kondo et Maeda, 1991). Des baculovirus recombinants de BmNPV et AcMNPV sont capables de se répliquer dans des cellules BmN (non permissives à AcNPV) et SF21 (non permissives à BmNPV) (Kondo et Maeda, 1991). Une série de croisement en retour ("back cross") entre un de ces recombinants et AcMNPV a permis de localiser un virus ne différant d'AcMNPV que par une séquence minimale originaire de BmNPV (Maeda et coll., 1993). La substitution d'une partie d'AcMNPV par son homologue de BmNPV permet donc la réplication d'AcMNPV dans BmN. Les propriétés de cette séquence localisée dans l'ORF du gène *p143* de BmNPV ont été confirmées dans des expériences de co-transfection de la région minimale avec l'ADN d'AcMNPV (Croizier et coll., sous presse; Maeda et coll., 1993). Contrairement au type sauvage d'AcMNPV, le recombinant d'AcMNPV ne variant que dans l'ORF du gène *p143*, ne possède pas la propriété d'inhiber la réplication de BmNPV en *trans* dans des expériences de co-infection (Croizier et coll., sous presse; Maeda et coll., 1993). Il semble donc que l'hélicase putative d'AcMNPV inhibe la réplication de BmNPV (Kamida et Maeda, 1993) et d'AcMNPV (Maeda et coll., 1993) spécifiquement dans les cellules BmN.

1.7.7) origines de réplication du virus

La première description d'origine de réplication chez les baculovirus a été faite à partir de *Galleria mellonella* NPV (*GmNPV*) en étudiant le maintien et l'amplification de

fragments d'ADN viral dans les cellules (**Blinov et coll., 1984**). Des fragments d'ADN viral ont été clonés dans des plasmides bactériens et introduits individuellement par transfection dans des cellules sensibles à l'infection par *GmNPV* (**Blinov et coll., 1984**). La réplication de ces plasmides a été quantifiée par l'activité transformante d'extraits cellulaires sur des bactéries (**Blinov et coll., 1984**). Le clone plasmidique retenue par ce test a été décrit comme incorporant de la thymidine tritiée après son introduction dans les cellules (**Blinov et coll., 1984**). La séquence de ce fragment est homologue à la partie interne du gène *gp67* d'*AcMNPV* (**Whitford et coll., 1989**), aucune fonction répliquative n'a été attribuée à cette région.

Six régions d'ADN viral homologues, *hr1*, *hr2*, *hr3*, *hr4L*, *hr4R* et *hr5* ont été localisées (**Cochran et Faulkner, 1983**). Leur profil de restriction a permis de déterminer des répétitions de séquence dans chacune de ces régions (**Cochran et Faulkner, 1983**). Par la suite, ces séquences ont été répertoriées comme étant des activateurs transcriptionnels (**Guarino et Summers, 1986b; Guarino et coll., 1986**). Récemment, elles ont été décrites comme étant des origines de réplication dans des cellules infectées (en se basant sur la nature déméthylée de l'ADN des vecteurs les portant) (**Pearson et coll., 1992**). Ces régions sont composées de palindromes imparfaits de 30 paires de bases qui lorsqu'ils sont introduits dans un plasmide bactérien, leur permettent de se répliquer dans des cellules infectées (**Pearson et coll., 1992**). L'efficacité de cette réplication est proportionnelle au nombre de palindromes introduits (**Pearson et coll., 1992**). Les régions adjacentes au *hr* influent également sur l'efficacité de la réplication des plasmides (**Leisy et Rohrmann, 1993**). Certains fragments d'ADN viral ne possédant pas de séquences *hr* permettent une réplication peu active du plasmide qui les porte ce qui n'est pas retrouvé avec le vecteur de clonage (**Leisy et Rohrmann, 1993**). Notons que **Guarino et Summers (1988)** avaient montré une réplication non spécifique de plasmides bactériens sans séquence virale dans les cellules lors d'expériences de co-transfection avec de l'ADN viral. Ils n'avaient pu alors mettre en évidence une réplication due aux *hr*, ce qui incombe sans doute à la sensibilité de leur expériences.

Les origines de réplication contenant l'information nécessaire en *cis* pour la réplication virale ont été isolées en analysant des génomes viraux défectifs (**Lee et Krell, 1992**). Ces génomes défectifs (40% de la taille normale du virus) sont analysés à partir de stock de virus propagés sans dilution de l'inoculum et sont formés d'un fragment de 2,8 kpb répété (**Lee et Krell, 1992**).

Parallèlement, une autre équipe a isolé trois régions en utilisant le même principe (**Kool et coll., 1993**). Deux d'entre elles permettent la réplication de plasmides dans des cellules transfectées et infectées (**Kool et coll., 1993**), ces résultats étant basés sur la déméthylation de l'ADN répliqué (*Dpn I* résistant). Ces régions contiennent *hr3* et

hr5. Si seule *hr5* est délétée du virus, la réplication virale en culture cellulaire ne s'en trouve pas altérée (**Rodems et Friesen, 1993**). Les *hr* semblent donc être des origines de réplication interchangeable ou non essentielles.

1.7.8) cycline virale

Un gène précoce, *etl*, a été caractérisé comme étant indispensable à l'expression normale des gènes tardifs (**Crawford et Miller, 1988**). Ce gène code pour un peptide de 28 kDal et est transcrit uniquement de façon précoce dans les cellules infectées (avant 12 h pi) et la cycloheximide n'inhibe pas la transcription de ce gène (**Crawford et Miller, 1988**). Si le gène *etl* est délété, l'apparition des gènes tardifs est retardée de 4 à 6 h (**Crawford et Miller, 1988**). La transcription des gènes tardifs étant en relation avec la réplication de l'ADN viral, ce retard peut être attribué à un mauvais fonctionnement de la réplication de l'ADN. Ce gène présente 40% d'homologie (en acides aminés) avec le gène de l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) de rat et est également appelé cycline ou protéine auxiliaire de la polymérase delta (**O'Reilly et coll., 1989a**). Les similitudes de séquence de ce gène et l'effet phénotypique de son inactivation argumentent pour un PCNA viral associé à la réplication par l'ADN polymérase viral qui est de type delta (**O'Reilly et coll., 1989a**). L'expression de cette enzyme peut contribuer à établir un environnement de phase S (période du cycle cellulaire pendant laquelle l'ADN est dupliqué), ce qui permettrait aux virus de se répliquer efficacement dans les tissus hôtes qu'ils soient en quiescence ou en prolifération (**O'Reilly et coll., 1989a**).

1.8) Conclusion

Les graves problèmes économiques occasionnés par les épidémies d'origine virale dans les élevages de crevettes pénéides sont à l'origine de notre projet de recherche. En effet notre thématique était d'évaluer, à partir du modèle *AcMNPV*, la faisabilité d'une approche anti-sens dans la lutte contre les virus de crevette. Ainsi que le montrent les rappels bibliographiques, la complexité de la réplication du baculovirus permet d'envisager de bloquer la propagation de ce virus en inhibant l'expression de certains gènes clés. Parmi ces gènes, nous avons retenu le gène *ie1* puisqu'il est très précoce et régule de multiples gènes qui sans lui sont inactifs. D'autre part, le blocage de la réplication de l'ADN viral semblait également une cible privilégiée, puisque sensible au niveau de l'expression de l'ADN polymérase virale.

Le but que nous nous étions fixés nous a amené (i) à développer un vecteur d'expression très actif spécifique des cellules de lépidoptère, (ii) à mettre au point la sélection de lignées cellulaires de lépidoptère exprimant de façon stable différentes constructions et (iii) à étudier la régulation complexe du gène *dnapol* lors du cycle viral.

2) LES ARN ANTI-SENS INHIBITEURS DE GENES VIRAUX

2.1) Techniques d'immunisation anti-virale pouvant remplacer la vaccination

2.1.1) limites d'utilisation de la vaccination anti-virale

Les maladies virales de crustacés en élevage ne peuvent pas être évitées par la vaccination comme cela est habituellement le cas pour les animaux d'élevage. En effet, les invertébrés ne possèdent pas de système immunitaire utilisant des immunoglobulines et ne peuvent pas par conséquent être immunisés par vaccination conventionnelle. Les techniques d'immunisation pouvant remplacer la vaccination ont été l'objet de peu d'investigation car les animaux d'élevage sont généralement des vertébrés. Pour le ver à soie, un des rares invertébrés d'élevage, les problèmes provoqués par des maladies virales ont trouvé leur solution par des techniques d'élevage tel que la désinfection des pontes (**Granados et Federici, 1986**). La lutte antivirale chez les plantes présente certaines caractéristiques communes avec les invertébrés (vaccination impossible, décalage des connaissances par rapport aux vertébrés). Néanmoins la phytopathologie a bénéficié de connaissances avancées en sélection et génétique classique des plantes. Des plantes trans-géniques exprimant des éléments viraux (protéines, ARN) ont montré leur efficacité contre des infections virales (**Grumet, 1990**). C'est chez l'Homme que l'effort de recherche est le plus important visant à trouver des moyens d'immunisation d'un type nouveau. Car si la vaccination y est largement utilisée, elle devient problématique ou impossible pour des virus dont les séquences protéiques sont extrêmement variables, tel que certains rétrovirus. Le système immunitaire sérologique étant pour l'instant impuissant face à ces pathogènes, les moyens développés tendent à bloquer la réplication virale dans la cellule. Les molécules effectrices devront donc soit être introduites dans la cellule, soit être exprimées par la cellule. La transformation génétique des cellules germinales (trans-génèse) n'étant pas applicable pour l'Homme, c'est la transformation génétique de cellules somatiques qui est envisagée, comme cela est déjà le cas pour certaines maladies génétiques.

2.1.2) expression de protéines et d'ARN d'origine virale capables de bloquer la réplication virale

Les produits viraux pouvant être exprimés dans les cellules pour interférer avec le cycle de multiplication virale sont soit des protéines, soit des ARN anti-sens d'origine virale. Cela a été illustré dans les expériences d'inhibition du rétrovirus HIV-I avec l'utilisation de :

- protéines "trans-dominantes" dérivées des gènes viraux de régulation, *rev* (**Malim et coll., 1989**) et de structure, *gag* (**Trono et coll., 1989**),

- ARN anti-sens (**Rhodes et James, 1990; Joshi et coll., 1991; Chatterjee et coll., 1992**),
- et de ribozymes dirigés contre les messagers au niveau de *gag* (**Sarver et coll., 1991**), de l'intégrase (**Sioud et Drlica, 1991**) ou de la région de tête de l'ARN messager (**Weerashinghe et coll., 1991**).

L'activité catalysée par ces 3 types de produits est de nature très différente : (i) Les protéines "trans-dominantes" sont des protéines régulatrices virales mutantes qui rentrent en compétition avec leurs homologues sauvages et peuvent inhiber leurs activités. (ii) Les ARN anti-sens sont des ARN produits dans la cellule en grande quantité et portant une séquence inverse et complémentaire à celle de certains ARN viraux. Les ARN anti-sens peuvent s'apparier aux ARN viraux et modifier l'expression des gènes correspondants. (iii) Les ribozymes sont des ARN possédant une structure secondaire autocatalytique, ils peuvent se former par l'appariement d'un ARN viral avec un ARN porteur de la séquence responsable de sa structure secondaire et de courte séquence anti-sens. L'ARN viral sera clivé spécifiquement par le ribozyme.

Les ARN anti-sens sont utilisés comme moyen naturel de régulation génique chez les procaryotes et les eucaryotes (**Takayama et Inouye, 1990**). Ils ont été utilisés également en tant que système artificiel d'inhibition de gènes eucaryotes cellulaires et viraux (**Takayama et Inouye, 1990**). Cette approche a permis d'obtenir des phénocopies de mutants et d'inhiber des phénomènes cellulaires et viraux à des fins analytiques ou thérapeutiques. Dans certaines études *in vitro*, l'expression d'ARN anti-sens peut être substituée par des oligonucléotides anti-sens ayant la même capacité d'hybridation aux ARN cibles (**Helène et Toulmé, 1990**). Ces oligonucléotides sont surtout utilisés comme outils d'étude génétique *in vitro*. L'utilisation *in vivo* est dépendante de problèmes pharmacologiques classiques (toxicité, cinétique, coût).

2.2) Utilisation respective des oligonucléotides et des ARN anti-sens comme inhibiteurs de gènes cellulaires ou viraux

Les ARN et les oligonucléotides anti-sens sont utilisés à des fins différentes. Les oligonucléotides sont utilisés principalement *in vitro* à des fins expérimentales, bien que des traitements thérapeutiques soient en développement. Les ARN anti-sens sont utilisés *in vitro* mais également *in vivo* par trans-génèse d'animaux et de plantes et sont développés dans l'attente d'une thérapie génique chez l'Homme.

Dans le cas de l'inhibition de la réplication virale, l'usage des oligonucléotides se révèle efficace mais la protection qu'ils apportent est cantonnée à l'expérimentation *in vitro*. L'usage des oligonucléotides est la seule voie d'inhibition par anti-sens facilement testable lorsque l'expression d'ARN n'est pas impossible (promoteur non disponible dans le système biologique). Les ARN anti-sens peuvent être transcrits *in vitro* puis introduits dans les cellules par micro-injection. Cette technique est particulièrement efficace vu la quantité massive d'ARN anti-sens introduite (**Takayama et Inouye, 1990**). L'usage le plus classique est l'expression d'ARN anti-sens en culture cellulaire visant l'inhibition de gènes cellulaires et viraux dans des lignées cellulaires exprimant ces ARN de façon stable. Les ARN anti-sens peuvent également être exprimés de façon transitoire dans les cellules. Dans ce cas le gène cible est co-introduit avec le vecteur responsable de l'expression de l'anti-sens.

Plusieurs cas d'obtention d'animaux trans-géniques pour des gènes anti-sens dirigés contre des gènes viraux ont été rapportés chez la souris (**Takayama et coll., 1989**) et le lapin (**Ernst et coll., 1991**). Chez les plantes, cette approche est beaucoup plus utilisée à cause de la facilité d'obtention des plantes trans-géniques notamment par le système *Agrobacterium* (**Grumet, 1990**). Cependant l'approche la plus utilisée chez les plantes trans-géniques résistantes à des virus, est la production de protéine virale (**Grumet, 1990**). Ceci peut être expliqué par une relative simplicité du cycle viral des virus de plantes à ARN.

2.3) Mécanismes de blocage de l'expression des gènes par molécules anti-sens

2.3.1) caractéristiques générales

Les ARN (revue par **Takayama et Inouye, 1990**) et oligonucléotides (revue par **Helène et Toulmé, 1990**) anti-sens sont capables d'inhiber l'expression génique à différentes phases. Leurs modes d'action sont plus ou moins spécifiques de leurs natures chimiques. Les oligonucléotides et ARN anti-sens peuvent interférer avec la transcription, la maturation, le transport, la stabilité et la traduction des ARN du gène

cible. Leurs présences peuvent perturber la structure secondaire et la formation de complexes responsables de la stabilité et de la traduction des ARN. L'élucidation des mécanismes précis d'inhibition génique souffre du manque de compréhension de la stabilité des ARN dans la cellule. La formation de molécules bicaténares ARN/ARN ou ARN/ADN forme un substrat favorable à l'action de nucléases cellulaires (ARN/ARN : RNase à ARN double brin; ARN/ADN : RNase H). Les molécules anti-sens doivent être présentes généralement suivant un rapport stoechiométrique très grand vis à vis de l'ARN du gène ciblé. L'introduction ou l'expression de ces molécules doivent donc être considérées en conséquence.

2.3.1) blocage par ARN anti-sens

Les ARN anti-sens bloquent l'expression du gène cible généralement (i) par déstabilisation des ARN sens du gène cible qui voient leur demi-vie diminuer et leur niveau dans la cellule chuter ou (ii) par hybridation avec l'ARN sens sans qu'il y ait déstabilisation (Takayama et Inouye, 1990). (iii) Des interactions avec le transport cytoplasmique des ARN ont également été suspectées (Kim et Wold, 1985). (iv) Les ARN anti-sens peuvent aussi agir au niveau de la transcription (Yakoyama et Imamoto, 1987). (v) Il a été également montré *in vitro* que les ARN anti-sens pouvaient inhiber l'épissage d'ARN (Munroe, 1988).

2.3.2) blocage par oligonucléotides anti-sens

Dans le cas des oligonucléotides, l'action semble possible à des niveaux multiples. (i) Le mécanisme le plus évident agit par l'intermédiaire d'un encombrement stérique de l'ARN durant la traduction par les ribosomes, bien que d'autres modes d'action soient envisageables. Des interactions avec (ii) la maturation de l'ARN par "capping" ou (iii) l'accrochage du complexe ribosomal sont mis en évidence lorsque l'oligonucléotide utilisé couvre la région 5' non traduite de l'ARN. (iv) Par ailleurs, l'effet d'oligonucléotides spécifiques de la région 3' non traduite met en évidence une altération de la stabilité des ARN ciblés (Chiang et coll., 1991). Dans les expériences rapportées par Chiang et coll. (1991), l'activité au niveau du codon d'initiation de la transcription est indépendante de l'action de la RNase H (action sur la traduction) alors que l'action sur la zone 3' non traduite est RNase H dépendant (effet sur la stabilité).

Contrairement aux oligonucléotides anti-sens qui sont complémentaires et anti-parallèles, certains oligonucléotides complémentaires et parallèles peuvent former des triples hélices avec de l'ADN double brin. Lorsqu'un oligonucléotide approprié est utilisé, de telles structures peuvent apparaître dans la cellule au niveau d'un promoteur, et bloquer la transcription du gène correspondant (Postel et coll., 1991).

2.4) Utilisation des oligonucléotides anti-sens

Un certain choix de la nature chimique des oligonucléotides utilisés est possible. En effet, les modifications de la structure naturelle de l'ADN apportent des avantages vis à vis des modes d'actions des molécules anti-sens mais également au niveau des possibilités de leur utilisation. L'efficacité de l'introduction des oligonucléotides dans les cellules lors d'expériences en culture cellulaire dépend de la nature chimique des oligonucléotides et de la technique d'introduction utilisée. Le choix des régions pour lesquelles les oligonucléotides sont complémentaires, conditionne leur mode d'action dans la cellule. L'effet inhibiteur observé sur l'expression du gène cible peut être étendu à la réplication virale ou à la fonction cellulaire correspondante.

2.4.1) choix de la nature chimique des oligonucléotides

Les oligodéoxynucléotides naturels ont été les premiers qui ont été produits en grande quantité et à des coûts raisonnables pour la recherche. Puis des oligonucléotides modifiés ont été élaborés par la suite. L'affinité des oligonucléotides avec l'ARN ou l'ADN cible étant fondamentale, les modifications se sont portées principalement sur le squelette phosphoré et sur l'anométrie des sucres. Des molécules (poly-L-lysine, agents intercalant...) peuvent également être couplées aux oligonucléotides. Les avantages apportés par les modifications peuvent être une amélioration de l'entrée dans les cellules, une résistance accrue aux nucléases, une plus grande affinité pour les acides nucléiques complémentaires. Chaque molécule présente des caractéristiques qui régissent leur utilisation. Les oligonucléotides phosphorothioates sont les plus avantageux en culture cellulaire (**Cohen, 1991**) où ils permettent notamment l'action de la RNase H et sont d'une solubilité acceptable et d'une relative résistance aux nucléases biologiques.

2.4.2) régions cibles des oligonucléotides anti-sens

Généralement, l'effet des oligonucléotides sur l'expression d'un gène cible est étudié au cas par cas. Toutefois, quelques études comparent l'efficacité de différentes régions cibles (**Chiang et coll., 1991; Kmetz et coll., 1991**). Lorsque des oligonucléotides anti-sens de différentes localisations sont utilisés pour inhiber le gène de l'ICAM humain, la région d'initiation de la traduction et une séquence localisée dans la région 3' non traduite se sont avérées les plus sensibles notamment par rapport à d'autres séquences situées ailleurs en 5' ou 3' et dans la partie centrale de la séquence codante (**Chiang et coll., 1991**). Au cours de cette étude, il a été montré que le mécanisme du blocage dépendait du site d'hybridation de l'oligonucléotide (**Chiang et coll., 1991**). Lorsque des oligonucléotides phosphorothioates sont utilisés pour inhiber le gène *vmw65* (gène régulant la réplication virale) du virus herpes simplex de type 1 (HSV-1),

l'inhibition de l'expression du gène cible et la réplication du virus dépendent de la taille et de la localisation des séquences cibles (**Kmetz et coll., 1991**). L'oligonucléotide placé au niveau du codon d'initiation de la traduction présente l'activité maximale et son effet se trouve augmenté si la taille de la séquence cible passe de 18 à 23 paires de bases (**Kmetz et coll., 1991**). Si la région ciblée est déplacée de 33 paires de bases en amont, l'activité de l'oligonucléotide disparaît presque entièrement (**Kmetz et coll., 1991**).

2.4.3) introduction des oligonucléotides anti-sens dans la cellule

Les oligonucléotides sont introduits habituellement dans les cellules par adjonction au milieu de culture et entrée "passive" (**Marcus-Sekura, 1988; Postel et coll., 1991**). Toutefois, cette méthode d'introduction peut donner de faibles taux d'introduction dans les cellules, nécessiter des temps d'introduction relativement longs, nécessiter des concentrations d'oligonucléotides élevées dans le milieu de culture et peut finalement être non effective par suite de la dégradation des oligonucléotides dans le milieu de culture et dans les compartiments cellulaires. L'utilisation d'oligonucléotides modifiés permet d'améliorer l'introduction par diffusion en augmentant leur entrée dans la cellule (par exemple oligonucléotides poly-L-lysine) ou leur résistance aux nucléases (par exemple oligonucléotides phosphorothioates). Plus récemment, une méthode alternative, la lipofection, a été utilisée pour introduire des oligonucléotides modifiés ou non modifiés dans des cellules (**Chiang et coll., 1991**). Cette méthode utilisant de petits liposomes unilamellaires cationiques a permis d'augmenter d'un facteur 100 l'effet inhibiteur des oligonucléotides phosphorothioates anti-sens dans des cultures cellulaires (**Chiang et coll., 1991**). Des techniques utilisant d'autres types de liposomes ont été également appliquées afin d'améliorer l'entrée des oligonucléotides anti-sens dans les cellules (*revue par Thierry et coll., 1992*).

2.4.4) effets des oligonucléotides anti-sens

Récemment, **Simons et coll. (1992)** ont mis en évidence l'efficacité d'un traitement local par oligonucléotide, pour inhiber l'obstruction pathologique de la carotide du rat. Ce traitement à base d'oligonucléotides phosphorothioates anti-sens de gène *c-myc*, inhibe la prolifération et l'accumulation de cellules de muscle lisse (**Simons et coll., 1992**). Des oligonucléotides ayant le même type de modification chimique ont permis d'inhiber l'expression de *c-myc* en culture cellulaire et ainsi de mettre en évidence son action tumorigène (**Watson et coll., 1991**). L'inhibition de la synthèse de ICAM en culture cellulaire par lipofection d'oligonucléotides phosphorothioates anti-sens a permis de mettre en évidence la fonction d'adhérence de cette protéine (**Chiang et coll., 1991**).

En plus de l'inhibition génique, des traitements par oligonucléotides présentant différentes modifications ont permis d'inhiber la réplication de différents virus en culture cellulaire (**revue par Cohen, 1991**). Des oligonucléotides de nature variée inhibent la réplication des virus suivants, qu'ils soient

- naturels : HSV-1 (**Draper et coll., 1990**), RSV (**Zamecmik et Stephenson, 1978**), HIV (**Zamecmik et coll., 1986**),
- phosphorothioates : HIV (**Matsukutura et coll., 1987**), HSV-1 (**Kmetz et coll., 1991**),
- méthylphosphonates : HIV (**Sarin et coll., 1988**), VSV (**Agris et coll., 1988**), HSV-1 (**Smith et coll., 1986**),
- phosphoramidates : HIV (**Argawal et coll., 1988**),
- conjugués à la poly-L-lysine : VSV (**Lemaitre et coll., 1987**),
- conjugués avec un agent intercalant : le virus de l'influenza (**Zerial et coll., 1987**).

2.5) ARN anti-sens naturels et artificiels

Les ARN anti-sens sont actifs naturellement chez les eucaryotes (**Takayama et Inouye, 1990**) mais leur action semble associée à des phénomènes bien spécifiques. Pour les ARN anti-sens artificiels, peu d'éléments de référence sont disponibles quant aux régions cibles les plus efficaces, néanmoins on sait que le niveau de la transcription des ARN anti-sens est essentiel à l'efficacité de l'inhibition. Leur action est effective *in vitro* comme *in vivo*.

2.5.1) les ARN anti-sens moyen naturel de régulation des gènes procaryotes et eucaryotes

Les ARN anti-sens sont un moyen naturel de régulation chez les procaryotes, ils agissent aux niveaux de la réplication et de l'expression génique de plasmides, de phages, de transposons et de l'ADN chromosomique (**Takayama et Inouye, 1990**).

L'action des ARN anti-sens n'a pas été formellement établie chez les eucaryotes mais elle est fortement suspectée. Des gènes cellulaires ayant des ARN anti-sens codés sur le même locus (permettant une régulation par interférence des promoteurs) ou sur un locus différent ont été décrits (**Takayama et Inouye, 1990**). La régulation de ces gènes cellulaires par la cellule est parfois corrélée à une certaine spécificité tissulaire des ARN sens et anti-sens (**Takayama et Inouye, 1990**). Notons en particulier que, les particules nucléoprotéiques d'ARN messenger du gène de la chaîne lourde de la myosine (MHC) de poulet sont associées *in vivo* avec des ARN de 102 nucléotides, ayant la faculté de bloquer sa traduction *in vitro* (**Heywood, 1987**).

Les ARN anti-sens peuvent être également d'origine virale :

- (i) La transcription d'ARN anti-sens d'un gène très précoce ICP-0 de HSV-1 est détectée pendant l'infection latente par le virus (**Stevens et coll., 1987**). Cette transcription pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse en inhibant le gène ICP-0.
- (ii) une région du gène CP de l'ARN du virus de la mosaïque du concombre est complémentaire et s'hybride *in vitro* en 2 points avec son ARN satellite (**Reizaian et Symons, 1986**). Cette interaction jouerait un rôle dans la régulation de ce gène viral.
- (iii) L'ARN du viroïde de la tubercule fusiforme ("spindle tuber") de la pomme de terre présente 5 régions contigües qui peuvent s'hybrider de façon stable avec les ARN 7 S de la tomate (**Symons, 1989**). Ces régions contigües sont retrouvées dans plusieurs autres viroïdes infectant la tomate (**Symons, 1989**). La formation de ces hybrides pourrait interférer avec la fonction de translocation de la membrane nucléaire attribuée à l'ARN 7 S et contribuer ainsi à la pathogénèse (**Symons, 1989**).

2.5.2) régions cibles des ARN anti-sens

La définition des régions cibles des ARN anti-sens chez les eucaryotes n'a pas été étudiée de façon extensive. La région généralement choisie est dans la partie 5' du gène, sa taille peut varier de 50 paires de bases au gène entier et peut ou non comporter le codon d'initiation (Takayama et Inouye, 1990). Dans le cas où on cherche à inhiber la réplication d'un virus, le choix du gène qui va être pris pour cible s'ajoute aux choix de la séquence du gène.

Dans le cas des rétrovirus, le choix du gène cible est limité par rapport à d'autres virus qui possèdent un génome de grande taille : (i) Pour RSV, le gène *env* a été pris comme cible et a conduit à une inhibition efficace (Chang et Stoltzfus, 1985); (ii) Pour HIV-1, les séquences des terminaisons répétées longues (LTR) présentes en 5' et 3' des transcrits sont utilisées (Chatterjee et coll., 1992). L'utilisation de deux séquences cibles est appuyée par plusieurs arguments : le premier est d'augmenter l'inhibition du virus, le second est de réduire considérablement les chances de survie d'un virus modifié dans une des séquences cibles.

Les gènes ciblés doivent de préférence être peu exprimés, pour que les conditions d'inhibition soient plus facilement atteintes. Le gène cible *E1a* choisi pour inhiber l'adénovirus 5, présente également des propriétés de précocité de l'expression et de gène régulateur qui sont favorables à une inhibition de la réplication virale (Miroshinichenko et coll., 1989).

2.5.3) expression des ARN anti-sens artificiels dans les cellules

Les ARN anti-sens doivent être présents en excès par rapport à l'ARN cible. Leur expression doit donc être contrôlée par un promoteur très actif ou bien les gènes anti-sens doivent être présents en un grand nombre de copies (Takayama et Inouye, 1990). Les vecteurs d'expression sont introduits dans les cellules par une technique classique de transfection. Si le vecteur porte uniquement la séquence anti-sens derrière un promoteur, il conduira à une expression transitoire dans les cellules ayant incorporé le plasmide (typiquement de 1 à 5 % des cellules). Si le vecteur est porteur d'un gène de sélection (résistance à un antibiotique ou à une drogue), l'expression stable est conditionnée par une pression de sélection. Le vecteur utilisé pour l'expression continue des ARN anti-sens peut être intégratif ou épisomal (Miroshinienko et coll., 1989). L'expression transitoire des ARN anti-sens n'est utilisée que si le gène cible est co-transfecté. Car si le gène cible est exprimé dans toutes les cellules, les cellules n'exprimant pas les ARN anti-sens en expression transitoire masquent l'inhibition potentielle. L'expression stable d'ARN anti-sens nécessite une introduction préalable du vecteur d'expression dans les cellules. En étude *in vitro*, cette introduction est opérée par une technique classique de transfection cellulaire. Pour obtenir des animaux trans-géniques, les protocoles adaptés à l'espèce utilisée sont suivis. Dans un contexte de thérapie génique chez l'Homme, la

transduction est particulièrement intéressante pour modifier les cellules somatiques. La transduction est l'introduction de molécules d'ADN dans une cellule par encapsidation préalable dans une particule virale puis infection avec cette particule. Cette technique a été illustrée par l'établissement de lignées lymphocytaires résistantes au virus HIV-1 après transduction des cellules avec un vecteur d'expression d'ARN anti-sens dérivé d'un virus associé aux adénovirus (AAV) (**Chatterjee et coll., 1992**).

2.5.4) analyse des effets des ARN anti-sens artificiels

En culture cellulaire, de nombreux cas d'inhibition de gènes cellulaires et viraux ont été rapportés (**Takayama et Inouye, 1990**). L'inhibition des gènes pris pour cible par les ARN anti-sens a conduit à une inhibition de la réplication virale de :

- RSV (**Chang et Stoltzfus, 1985**)

- HIV-1 : Au niveau des cultures cellulaires transduites et sélectionnées pour la production d'ARN anti-sens spécifiques de HIV-1, une réduction de plus de 99% de la production de particules infectieuses a été obtenue (**Chatterjee et coll., 1992**). Dans la même étude, l'inhibition des gènes viraux a été préalablement mise en évidence en expression transitoire d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur viral.

- l'adénovirus 5 : L'expression de façon constitutive d'ARN anti-sens dirigés contre le gène viral E1a de l'adénovirus 5 a permis d'inhiber à 95% l'infectabilité de cellules en culture à l'adénovirus 5 (**Miroshnichenko et coll., 1989**).

Le blocage de gènes par ARN anti-sens a servi aussi à déterminer l'ordre et l'amplitude d'activation des promoteurs viraux (**Roelvink et coll., 1992**). Dans ce cas, la fonction du gène inhibé n'est pas recherchée (le gène inhibé est un gène rapporteur) mais plutôt l'activité des promoteurs des gènes sens et anti-sens. Les promoteurs étudiés proviennent de 2 gènes tardifs du baculovirus *AcMNPV* qui sont surexprimés durant l'infection d'une lignée cellulaire de *Spodoptera frugiperda*. Un gène rapporteur est placé, dans son orientation sens ou anti-sens, sous le contrôle des promoteurs viraux du gène de la polyédrine (polyédrine-Sens, polyédrine-Anti-Sens) et *p10* (*p10*-Sens et *p10*-Anti-Sens). Ces constructions sont réintroduites séparément dans des virus recombinants. Lors de co-infection de virus polyédrine-Sens et de virus *p10*-Anti-Sens, l'expression du gène rapporteur polyédrine-Sens est retardée de plusieurs heures. La co-infection réciproque (virus *p10*-Sens et Virus polyédrine-Anti-Sens) ne produit pas le même effet. Ce phénomène confirme l'activation plus précoce de *p10* (accumulation d'ARN anti-sens). Le gène inhibé est un gène rapporteur étranger aux baculovirus et aux lépidoptères mais montre qu'un mécanisme d'inhibition génique par stratégie anti-sens est possible dans les cellules de lépidoptère.

Des animaux trans-géniques ayant acquis des gènes anti-sens dirigés contre des gènes viraux ont été obtenus chez la souris et le lapin : (i) aucun effet contre le virus de l'hépatite de la souris n'a été observé chez la souris (**Takayama et coll., 1989**), (ii)

chez le lapin, un effet anti-viral contre l'adénovirus 2 a été observé uniquement sur une culture de cellules rénales (**Ernst et coll., 1991**). Cette difficulté à inhiber l'infection des animaux par ARN anti-sens est compréhensible car les difficultés liées à la trans-génèse s'additionnent aux difficultés liées à l'inhibition de la réplication virale. En effet, des animaux trans-géniques pour des gènes anti-sens capables d'inhiber l'expression du gène cellulaire pris pour cible et de produire une modification phénotypique au niveau de la fonction visée ont été obtenus chez la souris (**Katsuki et coll., 1988**) et la drosophile (**Qian et coll., 1988**). Pour les plantes trans-géniques, les tentatives ont été plus fructueuses tant pour l'inhibition des gènes cellulaires que pour l'inhibition d'infection virale (**Grumet, 1990**).

2.6) Conclusion

Les ARN anti-sens inhibent efficacement l'expression de gènes cellulaires et viraux (Takayama et Inouye, 1990). Dans le cas des gènes viraux, l'effet sur leur expression peut se traduire sur la réplication du virus (Chang et Stoltzfus, 1985; Miroshnichenko et coll., 1989; Chatterjee et coll., 1992). L'inhibition des gènes dépend essentiellement de la quantité d'ARN anti-sens dans la cellule par rapport à la quantité d'ARN sens (Takayama et Inouye, 1990). L'inhibition de gènes cellulaires par ARN anti-sens a été transposée de façon efficace au animaux (Katsuki et coll., 1988; Qian et coll., 1988) et aux plantes trans-géniques (Grumet 1990). L'inhibition de la réplication virale au niveau des organismes est effective chez les plantes (Grumet, 1990) mais reste problématique chez l'animal (Takayama et Inouye, 1989; Ernst et coll., 1991). La principale raison évoquée est l'expression inadéquate des ARN anti-sens (Ernst et coll., 1991).

Deux difficultés sont distinguées pour l'obtention de cellules inhibant l'infection par des baculovirus en exprimant des ARN anti-sens. La première est d'obtenir les conditions nécessaires à une inhibition marquante du gène cible (zone du gène ciblé, rapport quantitatif ARN anti-sens-ARN sens). La seconde difficulté est d'obtenir par l'inhibition d'un gène viral, l'inhibition de l'infectiosité virale (la cellule n'est plus infectable), ou de la propagation virale (la cellule infectée transmet moins bien l'infection). Ces deux types de difficulté peuvent être contournés (i) par le choix d'un promoteur très actif pour diriger l'expression des ARN anti-sens, (ii) par le choix d'un gène cible essentiel pour la réplication virale.

L'objet de notre étude est de montrer la faisabilité de l'inhibition par ARN anti-sens de la réplication des baculovirus de crevettes. Notre modèle de travail est le baculovirus AcMNPV infectant des cellules de *Spodoptera frugiperda*. Vu l'objectif final, l'expression d'ARN anti-sens dans la cellule est le moyen d'inhibition approprié. Pour ce qui est des possibilités d'utiliser des ARN anti-sens dans notre modèle d'étude, nous avons vu que le blocage moléculaire par ARN anti-sens est effectif dans des cellules de *S. frugiperda* (Roelvink et coll., 1992). D'autre part, les ARN anti-sens sont suspectés d'être une méthode de régulation génique naturelle chez les baculovirus (Ooi et Miller, 1990). L'expression des ARN anti-sens naturels décrits est dépendante de facteurs viraux (voir paragraphe 1.5.9), ces promoteurs ne peuvent pas par conséquent être utilisés dans le cadre d'une inhibition virale. Cela énonce notre principal problème : l'expression adéquate des ARN anti-sens dans les cellules de *S. frugiperda*.

3) TRANSFORMATION STABLE DE CELLULES DE VERTEBRES ET D'INSECTES

3.1) Introduction

L'obtention de lignées cellulaires exprimant de façon stable une séquence dans le but d'inhiber la propagation d'un virus, représente une modélisation de l'animal transgénique, qui permet de définir à la fois le vecteur d'expression et la nature de la séquence la plus à même de bloquer le cycle viral. C'est pourquoi nous nous appliquerons à définir les modalités d'obtention de telles lignées cellulaires, notre modèle restant par ailleurs le cycle d'AcMNPV dans les cellules SF9 du lépidoptère *Spodoptera frugiperda*. Afin d'obtenir des cellules exprimant une séquence de façon stable, un vecteur d'expression doit être introduit dans ces cellules et s'y maintenir. Le maintien du vecteur d'expression est renforcé par l'application d'une pression de sélection en présence d'un gène co-transfecté apportant un avantage sélectif. Le maintien des vecteurs d'expression peut se faire sous forme épisomale autorépliquative (se répliquant de façon indépendante à l'ADN cellulaire) mais plus couramment par intégration au génome cellulaire. Les informations relatives à ces systèmes sont essentiellement issues du modèle mammifère; peu de données sont en effet disponibles au sujet des insectes.

3.2) Phénomène d'intégration illégitime de l'ADN transfecté

L'ADN transfecté s'intègre dans l'ADN cellulaire selon une fréquence faible; ces événements rares peuvent être amplifiés s'ils confèrent un avantage sélectif à la cellule (**revue par Bishop et Smith, 1989**). Les fragments d'ADN transfectés peuvent s'organiser en une structure en répétition en tandem. Si une pression de sélection est appliquée graduellement, le nombre de copies intégrées augmente (**revue par Schimke, 1988**).

3.2.1) intégration aléatoire

La transfection de cellules avec de l'ADN conduit à son intégration chromosomique en une ou plusieurs copies (**Huttner et coll., 1981**). En général, l'ADN transfecté est intégré en plusieurs copies, dans ce cas un seul site d'insertion en tandem a été observé (**Huttner et coll., 1981; Robins et coll., 1981; Folger et coll., 1982**). L'intégration se fait à faible fréquence (1 transformant pour 10^4 à 10^6 par cellules transfectées) selon un mécanisme de recombinaison non légitime dans le génome. Cette insertion est supposée être due à la jonction des extrémités de l'ADN étranger, linéaire ou linéarisé par la cellule, au niveau d'une cassure de l'ADN cellulaire (**Bishop et Smith, 1989**). Ceci peut expliquer que lorsque l'ADN est introduit en quantité limitante, la fréquence d'intégration est plus importante si l'ADN est linéaire plutôt que circulaire (**Folger et coll., 1982; Chu et coll., 1987**). De courtes séquences de "remplissage", provenant notamment de l'ADN introduit, peuvent être observées à la jonction de l'ADN introduit avec l'ADN cellulaire (**Anderson et coll., 1984**). Cette intégration est aléatoire c'est à dire qu'elle est effectuée dans des régions chromosomiques différentes suivant les lignées monoclonales analysées (**Robins et coll., 1981**).

3.2.2) répétition en tandem

L'arrangement des molécules intégrées en tandem est essentiellement selon une répétition en tête à queue, mais à faible fréquence et suivant les conditions expérimentales, des copies peuvent être juxtaposées selon une répétition en tête à tête et queue à queue (**Folger et coll., 1982; 1985; Bishop et Smith, 1989**). Cette organisation montre que la recombinaison homologue entre molécules d'ADN transfectées (phénomène donnant une structure tête à queue) est le principal mécanisme de mise en place des répétitions en tandem. Il s'avère que la formation des tandems a lieu de façon extra chromosomique (**Folger et coll., 1985**).

3.2.3) recombinaison entre plasmides co-transfectés

Des molécules d'ADN plasmidique présentant des homologies peuvent, après transfection dans des cellules, subir une recombinaison homologue entre elles avant de s'intégrer dans les chromosomes de l'hôte (**Anderson et Eliason, 1986**). Cette recombinaison est plus efficace entre molécules linéaires qu'entre molécules circulaires ou qu'entre molécules circulaires et linéaires (**Anderson et Eliason, 1986**). Ce phénomène serait catalysé par les enzymes cellulaires de réparation. D'autre part, des séquences non homologues peuvent être intégrées ensemble dans l'ADN cellulaire (**Perucho et coll., 1980; Anderson et coll., 1984**). Leur jonction met en évidence un mécanisme de recombinaison au niveau des régions partiellement homologues et la présence de séquences de "remplissage" entre les plasmides associés (**Anderson et coll., 1984**).

3.2.4) les marqueurs de sélection

Afin de pouvoir distinguer les cellules transformées de façon stable de la population de cellules transfectées, l'ADN intégré doit conférer un phénotype sélectionnable qui est conféré par un marqueur de sélection qui éventuellement permettra l'amplification des gènes intégrés lors de l'augmentation progressive de la pression de sélection.

L'amplification de gène est un phénomène de multiplication de séquences conférant un avantage sélectif à la cellule (**revue par Schmike, 1988**). Ce phénomène a d'abord été décrit dans les cellules cancéreuses où les séquences amplifiées sont des oncogènes. Le même phénomène est observé pour des marqueurs de sélection endogènes ou exogènes. L'augmentation progressive de la pression de sélection permet d'amplifier le nombre de copies non seulement du gène marqueur de sélection transfecté mais également du gène étranger intégré à proximité. Les gènes bactériens de résistance aux antibiotiques ne permettent pas habituellement une grande fourchette de concentrations d'utilisation et par conséquent ne peuvent pas être amplifiés.

3.2.5) l'amplification génique

L'amplification de gènes se manifeste fréquemment sous deux formes d'anomalie du caryotype : des régions à marquage homogène (HSR) (**Lin et coll., 1985**) ou des éléments extra-chromosomiques à réplication autonome appelés chromosomes double minutes (DM) (**Hamkalo et coll., 1985**). Les DM semblent être les intermédiaires à l'établissement des HSR. La réplication de ces structures extrachromosomiques est due à la présence d'une origine de réplication apportée par les séquences amplifiées au moment de leur excision de l'ADN chromosomique (**Carroll et coll., 1987**). Ces épisomes, produits par l'excision, mesurent jusqu'à 250 Kb (invisible en microscopie électronique) alors que les chromosomes DM ont une taille plus vaste de l'ordre de 5000 Kb (visible en

microscopie électronique) (**Hamkalo et coll., 1985**). Lors de l'extraction de l'ADN cellulaire, de telles structures peuvent être purifiées selon la technique de lyse alcaline grâce à leur nature circulaire superenroulée qui résiste à la dénaturation-renaturation.

Notons que les HSR donnent des gènes amplifiés stables alors que les DM sont instables en absence de pression de sélection (**Schmike, 1988**). Cette différence de stabilité est explicable par la nature chromosomique des HSR (ségrégation des chromosomes à la mitose) alors que les DM sont extra-chromosomiques ("dilution" du caractère en absence de pression de sélection).

3.2.6) intégration spécifique

Le site d'insertion de l'ADN dans le génome cellulaire peut affecter l'expression des gènes intégrés (**Feinstein et coll., 1982**). Afin d'intégrer des séquences choisies dans un environnement chromosomique identique, une stratégie a été développée (**Fukushige et Sauer, 1992**). Dans un premier temps, une lignée est établie par intégration d'un vecteur primaire de façon aléatoire et en simple copie. Ce vecteur possède, en plus du marqueur qui a permis sa sélection, un second gène marqueur qui celui là est défectif. Un vecteur secondaire transfecté dans cette lignée peut alors se recombiner de façon spécifique au niveau de la séquence de bactériophage *lox*, présente sur les 2 vecteurs. Cette recombinaison est rendue possible grâce à la fonction *cre* exprimée de façon transitoire par un plasmide co-transfecté avec le vecteur secondaire. L'intégration du vecteur secondaire rend actif le gène de sélection défectif présent dans le vecteur primaire ce qui permet de sélectionner ces événements d'intégration spécifique du site.

Par ailleurs, les virus associés aux adénovirus (AAV), de la famille des *parvoviridae*, peuvent en absence de virus "helper", s'intégrer en un site spécifique (**Kotin et coll., 1990**). Cette faculté due aux régions terminales répétées (ITR) est unique parmi les virus à ADN. Les vecteurs de transduction utilisant les ITR d'AAV-2 peuvent produire des particules virales transductrices avec l'aide d'un plasmide "helper" portant les fonctions *trans* de l'AAV et de l'adénovirus (**Kotin et coll., 1992**). De tels vecteurs transducteurs ont été utilisés *in vitro* pour expérimenter les possibilités de thérapie génique chez l'Homme (**Charterjee et coll., 1992**).

3.3) Transformation de cellules de mammifères

Lorsque des cellules de mammifères sont transfectées, le gène marqueur utilisé pour sélectionner les événements rares d'intégration peut être un facteur métabolique cellulaire ou un facteur de détoxification bactérien. Certains marqueurs subissent, dans des conditions de sélection adaptées, une amplification génique. D'autre part, les ADN transfectés peuvent se maintenir dans les cellules comme molécules autorépliquatives s'ils possèdent les séquences virales permettant ce mode de répllication.

3.3.1) marqueurs de sélection

Le gène de la thymidine kinase (*tk*) de Herpes Simplex Virus (HSV) a été le premier marqueur de sélection utilisé pour transfecter de façon stable un gène dans des cellules de mammifères (**Wigler et coll., 1977**). La transfection de ce gène dans des cellules TK⁻ a conduit à la sélection, en milieu HAT (Hypoxantine, Aminoptérine, Thymidine) de cellules ayant intégré le gène *tk* (**Wigler et coll., 1977**). Par la suite, des gènes étrangers ont pu être introduits dans des cellules de mammifères en les co-transfectant avec le gène *tk* (**Perucho et coll., 1980; Robins et coll., 1981**). Le nombre de copies intégrées de gènes étrangers varie de 5 à 100 suivant les clones étudiés (**Robins et coll., 1981**). L'inconvénient de ce marqueur de sélection est qu'il nécessite l'obtention préalable de cellules TK⁻ (les cellules de mammifères étant naturellement TK⁺).

L'alternative consiste à utiliser des gènes bactériens de résistance à un antibiotique n'ayant pas d'équivalent cellulaire. L'acquisition de ces gènes induit un phénotype dominant. Les trois gènes de ce type les plus communément utilisés sont, l'aminoglycoside phosphotransférase (= *aph* = néo : sélection avec la substance G418) (**Southern et Berg, 1982**), la xantine-guanine phosphotransférase (= *xgprt* = *gpt* : sélection en milieux sans guanine) (**Mulligan et Berg, 1981**) et l'hygromicine-B-phosphotransférase (= *hph* = hygromycine-B : sélection à l'hygromycine-B) (**Palmer et coll., 1987**). Le gène *aph* est le plus utilisé. Il confère la résistance à la substance G418 et est initialement une composante du transposon Tn5 d'*E. coli*. Le G418 est un aminoglycoside similaire à la néomycine, la gentamycine et la kanamycine. Il interfère avec la fonction ribosomale.

3.3.2) amplification des séquences transfectées

Les gènes marqueurs de sélection de la dihydrofolate réductase (*dhfr*) (**Wigler et coll., 1980**) et de l'adénosine déaminase (*ada*) (**Kaufman et coll., 1986**) ont été amplifiés respectivement par le méthotrexate (MTX) et la 2'-déoxycofornicine (dCF). Le MTX inhibe de façon compétitive l'action du gène *dhfr* rendu indispensable à l'anabolisme cellulaire par les conditions de culture (sérum dialysé). La dCF est un

analogue de métabolite inhibiteur de l'ADA, qui détoxifie le 9-b-Xylofuranosyl adénine, qui en entrant dans la voie de synthèse de l'ADN est létale pour les cellules. Si le niveau d'ADA ou de DHFR (ou de leurs analogues cellulaires) est important dans les lignées cellulaires à transférer, et que des mutants ne sont pas disponibles, la sélection n'est possible qu'avec de forts taux d'expression du gène marqueur transféré. Une autre possibilité en cas d'activité DHFR endogène élevée est d'utiliser un gène *dhfr* relativement résistant au MTX (**Wigler et coll., 1980**) ou de sélectionner les transformants par un marqueur de sélection dominant avant amplification (**Kim et Wold, 1985**).

3.3.3) maintien épisomal de vecteurs d'expression viraux dans les cellules de mammifères

Des vecteurs d'expression dérivés du virus du papillome bovin (BPV) de la famille des *Papilloviridae* possèdent la possibilité de se répliquer en un grand nombre de plasmides autorépliquatifs (de l'ordre de 150 copies par cellule) (**Challberg et Kelly, 1989**). Ce maintien en structure épisomale est permis par la réplication de l'ADN selon un mode viral lui-même dépendant de la présence de séquences virales agissant en *cis* (origine de réplication) et en *trans* (facteur viral). Le phénomène est également observé pour les vecteurs dérivés du virus simiens 40 (SV40) de la famille des *Papovaviridae* (action en *trans* de l'antigène T) et du virus d'Épstein-Barr (EBV) de la famille des *herpesviridae* (action en *trans* de l'antigène EBNA-1) (**Sambrook et coll., 1989**). L'absence d'une de ces séquences résulte en une intégration aléatoire du vecteur porteur du marqueur de sélection (**Southern et Berg, 1982; Sambrook et coll, 1989; Bishop et Smith, 1989**). L'avantage des vecteurs épisomaux est qu'ils permettent une fréquence de transformation cellulaire élevée et que les plasmides recombinants présents au niveau d'un clone cellulaire peuvent être réisolés directement par simple transfection de bactéries avec l'extrait cellulaire.

3.4) Transformation de cellules d'insectes

La transfection de cellules de mammifères a été beaucoup plus étudiée que celle des cellules des insectes, pour lesquelles pratiquement toutes les études se sont rapportées au diptères (mouche, moustique) (**revue par Walker, 1988**). Notons que les vecteurs utilisés sont composés principalement de séquences virales.

3.4.1) gènes marqueurs de sélection

La première transformation de cellules d'insectes a été effectuée en utilisant un gène de drosophile de type sauvage comme marqueur de sélection pour convertir les cellules d'un clone de la lignée cellulaire Kc sensible au milieu TAM (Thymidine, Adénine, et Méthotrexate) en cellules résistantes (**Wyss, 1981**). L'isolement des clones est possible sur ce type de cellules à faible adhérence grâce à l'application d'une surcouche d'agarose après transfection avec de l'ADN génomique de drosophile. Suivant la même technique de transfection avec de l'ADN de drosophile de type sauvage, **Sang et coll. (1984)** ont pu convertir une lignée shibire thermosensible (*shi^{ts}*) en cellules capable de se diviser à 29°C. Cela les a conduit à sélectionner des séquences n'ayant aucun avantage sélectif par elles-mêmes en co-transfectant ces cellules avec de l'ADN de drosophile et le gène étranger (**Sang et coll., 1984**).

Sinclair et coll. (1983) ont décrit l'obtention de cellules portant des copies extrachromosomiques instables en absence de pression de sélection. Le plasmide utilisé, pCVgpt, porte le marqueur de sélection bactérien *gpt* sous le contrôle du promoteur de la répétition terminale longue (LTR) de l'élément transposable de drosophile copia. Par la suite, lors d'expériences de transfection de cellules S2 de drosophile avec le plasmide portant le gène bactérien *aph* sous le contrôle du promoteur du LTR de copia, des insertions en quelques sites chromosomiques ont été détectées à 10-20 copies par génome, avec une répétition en tandem en tête à queue (**Rio et Rubin, 1985**). **Maisonhaute et Echalié (1986)** ont utilisé le gène *aph* et le promoteur du gène *tk* du virus de l'herpès (HSV) pour transfecter avec succès des cellules Kc de drosophiles, bien qu'il n'est pas été clairement défini si l'expression du gène *aph* était sous le contrôle du promoteur de *tk*.

La première expérience de transformation stable de cellules de lépidoptère a été décrite par **Jarvis et coll. (1990)**. Le vecteur utilisé à cet effet porte le gène *aph* sous le contrôle du promoteur immédiatement précoce de baculovirus *iel* (**Jarvis et coll., 1990**). Suivant le profil de restriction obtenu, le marqueur de sélection est intégré en plusieurs copies dans certains clones.

D'autre part, notons que certains vecteurs expriment le gène *aph* sous le contrôle d'un promoteur d'un densovirus (*Parvoviridae* d'insecte) (**Rolling, 1992**). Ces vecteurs permettent l'établissement de lignées cellulaires de lépidoptères résistantes à la

substance G418. Le mode de maintien de ces constructions dans la cellule a été décrit comme étant épisomal pour un vecteur et intégratif pour l'autre. Ces vecteurs ont été construits à partir de l'ADN cloné du densovirus du lépidoptère *Junonia coenia* (JcDNDV) (Dumas et coll., 1992) par insertion du gène *aph* dans la séquence codante du gène structural.

3.4.2) co-transfection dans les cellules d'insectes

Un plasmide du type pCVgpt décrit plus haut, co-transfecté avec un gène *hsp40* de drosophile (*hsp70* tronquée), dans des cellules D1 de *Drosophila melanogaster*, a conduit à l'intégration de *hsp40* dans chacun des 5 clones analysés (5 à 30 copies par cellules) (Burke et coll., 1984). Les transcrits du gène *hsp40* intégré n'ont pas été mis en évidence (Burke et coll., 1984). Par contre les transcrits ont été observés après co-transfection du même gène *hsp40* dans les lignées cellulaires DH33 de *D. hydei* (Sinclair et coll., 1985) et shits de *D. melanogaster* (Simcox et coll., 1985). Notons que dans les lignées cellulaires établies à partir des DH33, la répétition en position tête à queue d'un grand nombre de copie intégré de *hsp40* a été montrée. La stabilité des séquences de pCVgpt en absence de pression de sélection et la présence de l'ADN transfecté dans l'ADN de haut poids moléculaire en "Southern blot" suggèrent une intégration chromosomique dans les cellules D1 de *D. melanogaster* (Burke et coll., 1984) et DH33 de *D. hydei* (Sinclair et coll., 1985).

Pour les co-transfections en cellules de lépidoptères, Jarvis et coll. (1990) ont co-transfecté les plasmides porteurs des gènes *aph* et *lac-Z* dans des cellules de lépidoptères, ces deux gènes étant placés sous le contrôle d'un promoteur immédiatement précoce de baculovirus. Des clones cellulaires exprimant de façon stable (en absence de pression de sélection) la bêta-galactosidase (produit de *lac-Z*) ont été obtenus par sélection au G418.

3.4.3) amplification génique en cellules d'insectes

Bourouis et Jarry (1983) ont construit un vecteur contenant un gène *dhfr* résistant au MTX sous le contrôle du promoteur du LTR de l'élément transposable copia. Ce plasmide a permis d'obtenir l'intégration d'environ 1000 à 3000 copies dans les cellules Kc de drosophile. L'ADN y est intégré sous forme d'oligomères en position tête à queue (Bourouis et Jarry, 1989). Le profil de restriction du plasmide intégré est visible par coloration au bromure d'éthidium de l'ADN cellulaire digéré, cet ADN amplifié représente de 2 à 6 % de l'ADN cellulaire total (Bourouis et Jarry, 1989). Depuis il a été montré que des cellules du moustique *Aedes albopictus* spontanément résistantes au MTX ont un caryotype altéré (Shotkoski et Fallon, 1990). Les auteurs suggèrent que l'amplification du gène *dhfr* est responsable de cette résistance.

Plus récemment, **Monroe et coll. (1992)** ont obtenu des cellules d'*Aedes albopictus* transformées par un plasmide porteur du gène bactérien de résistance à l'hygromycine B (*hph*). Le nombre de copies intégrées dans les cellules s'élève à 60 000 dans un des clones obtenus. Le profil de restriction du plasmide transfecté est visible par simple coloration au bromure d'éthidium de l'ADN cellulaire, coupé par des enzymes de restriction (**Monroe et coll., 1992**). En hybridation *in situ*, les intégrations ont été localisées dans des chromosomes cellulaires (HSR) et dans des chromosomes doubles minutes (DM) (**Monroe et coll., 1992**). Notons que cette amplification génique n'est pas provoquée par une augmentation progressive de la pression de sélection mais par un antibiotique (**Monroe et coll., 1992**).

3.4.4) l'élément transposable P de drosophile

L'élément P est une séquence transposable intégrée dans le génome des drosophiles de type P en un grand nombre de copies. Leur transposition, activée en cas de croisement avec une femelle de type M (ne présentant pas d'éléments P), provoque des mutations par insertion (dysgénie hybride). **Moss (1985)** a transfecté des cellules de drosophile de type M avec un plasmide porteur de l'élément P; un grand nombre de copies de l'élément P a ainsi été transposé, bordé de leurs répétitions terminales inversées (ITR), vers le génome cellulaire. Les ITR de l'élément P ont été décrites comme augmentant la fréquence de transformation stable de cellules de mammifères (**Clough et coll., 1985**). Toutefois, l'existence d'un effet direct sur l'intégration n'est pas évident, un effet indirect par augmentation de la transcription du gène de sélection étant possible. Ceci d'autant plus que les essais de transformation de moustiques, par transfection avec des plasmides porteurs de l'élément P, ont abouti à des événements d'intégration attribués à une recombinaison illégitime sans relation avec le mode d'intégration de l'élément P par transposition de la séquence entre les ITR (**Miller et coll., 1987; McGrane et coll., 1988; Morris et coll., 1989**).

Dans les expériences de **Monroe et coll. (1992)** utilisant le gène *hph* afin de transformer des cellules de moustiques, un résultat similaire est obtenu en présence ou non de séquences régulatrices (promoteur et terminateur) dérivées de l'élément P et du virus SV40. Ceci tend à montrer que ces séquences n'ont pas de rôle spécifique dans les phénomènes d'intégration observés.

3.4.5) promoteurs actifs en cellules d'insectes lépidoptères

Les expériences d'expression de gènes en cellules de lépidoptères ont été opérées principalement dans des contextes viraux et particulièrement lors d'études concernant les baculovirus. Toutefois, des expressions transitoires ont été effectuées chez la drosophile.

L'expression transitoire a été utilisée afin de tester les méthodes de transfection et l'efficacité des promoteurs dans les cellules d'insectes. La construction hsp-CAT contient

le promoteur du gène *hsp70* de drosophile en amont du gène bactérien de la chloramphénicol acéthyl transférase (*cat*). Cette construction a été utilisée pour montrer l'efficacité de la transfection dans les lignées cellulaires de *D. melanogaster* et *D. immigrans* (**Di Nocera et David, 1983**) et dans une lignée cellulaire du moustique *Aedes algopictus* (**Durbin et Fallon, 1985**). En revanche, transfectée sur les lignées de lépidoptères de *Plodia interpuctella* et *Manducta sexta*, cette même construction ne permet de détecter que des traces d'activité comparativement aux résultats obtenus dans les cellules de diptères (drosophile et moustique) (**Berger et coll., 1985**). En fait, cette différence peut être due à l'efficacité de la transfection ou à l'activité du promoteur. D'autre part, hsp-CAT a été décrit comme étant actif dans les lignées cellulaires de *Spodoptera frugiperda* bien que l'aspect quantitatif n'ait pas été abordé (**Zuidema et coll., 1990**).

Les promoteurs de gènes immédiatement précoces de baculovirus sont actifs en expression transitoire dans différents types de cellulaires d'insectes (**Guarino et Summers, 1986a; Carson et coll., 1988; Kovacs et coll., 1991b**) mais également en expression stable (**Jarvis et coll., 1990; Jarvis, 1993**). D'autres gènes sont dépendants soit d'une activité virale soit d'une activation par un élément régulateur viral (**Guarino et Summers, 1986a**). Les promoteurs du densovirus de *Junonia coenia* (*JcDNV*) ont été utilisés en expression transitoire (**Giraud et coll., 1992**) et en expression continue (**Rolling, 1992**) dans les cellules de *Spodoptera littoralis*. **Walker (1988)** a proposé d'utiliser des promoteurs cellulaires d'actine ou de baculovirus pour étendre l'établissement de lignées d'insectes autres que celles des drosophiles.

3.5) Conclusion

Les principaux mécanismes d'intégration de l'ADN transfecté ont été largement étudiés bien qu'ils restent mal compris dans le détail. L'ADN transfecté est intégré de façon non spécifique dans le génome cellulaire, sauf lorsque des fonctions de virus ou d'éléments transposables en *cis* et en *trans* sont apportés par les vecteurs d'expression utilisés (à l'exception des vecteurs dérivés du virus AAV où les ITR seules suffisent à induire une intégration spécifique). Bien que relativement peu d'informations soient disponibles en ce qui concerne les cellules d'insectes, on peut dire que le comportement de l'ADN transfecté semble similaire à celui trouvé chez les cellules de vertébrés. Le domaine le mieux documenté est celui des diptères (mouche, moustique) chez lesquels un mode d'intégration spécifique par transposition de l'élément P a par ailleurs été décrit (**Moss, 1985**).

Pour permettre le maintien de séquences régulant l'activité virale (exemple ARN anti-sens), l'expression du marqueur de sélection devra être de préférence non régulée par le virus ciblé. En l'occurrence, nous ne pouvons pas utiliser les vecteurs d'expression dérivant des promoteurs de baculovirus. Les vecteurs d'expression dérivés du densovirus sont utilisables pour exprimer de façon constitutive des ARN anti-sens dans des cellules de lépidoptères.

Nous ne disposons pas actuellement de promoteurs très actifs dans les cellules de lépidoptères. Notre choix s'est donc porté sur le seul disponible le promoteur du gène de l'actine cytoplasmique de *Bombyx mori* (**P. Couble communication personnelle**).

MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire et transfection

Les cellules SF9 de *spodoptera frugiperda* (ATCC CRL 1711) ont été cultivées à 28°C dans du TC100 contenant 5% de sérum de veau foetal décomplémenté (Gibco-Berthesda Research Laboratories). Les cellules ont été transfectées avec de l'ADN plasmidique purifié par 2 gradients de CsCl, en utilisant la technique de lipofection (DOTAP, Boeringer) suivant les instructions du fournisseur. En bref, une fiole de 25 cm² contenant 3 millions de cellules qui sont rincées avec du milieu sans sérum avant la lipofection. La monocouche cellulaire a été incubée 4 h avec 3 ml de milieu sans sérum contenant 40 µl de DOTAP et 10 µg d'ADN. En expression transitoire, lorsque la quantité d'ADN introduite est variable, la quantité totale d'ADN a été ajustée à 10 µg par l'ajout d'ADN plasmidique de pBKS2⁺ (Stratagene cloning Systems). En expression stable, dans le cas de co-transfection de cellules, 1 µg de plasmide porteur du gène *neo^r* est utilisé avec 9 µg de plasmide à co-sélectionner. Le surnageant a été alors remplacé par 5 ml de milieu de culture à un temps défini comme le temps de post-transfection 0. Pour les expériences d'expression transitoire, les cellules ont été récupérées à 24 h post-transfection. Pour les expressions stables, les cellules ont été repiquées dans deux fioles de 75 cm² 24 h post-transfection et soumises alors à une sélection en présence de la substance G418 (Gibco-BRL) à une concentration finale de 1 mg par ml. Le milieu a été renouvelé tout les 4 jours jusqu'à ce que la monocouche cellulaire parvienne à confluence. Eventuellement, des clones cellulaires ont été isolés à partir de ces lignées polyclonales par dilution des cellules en plaque à 96 puits, observation microscopique et culture des puits ne présentant qu'une seule cellule. Une bonne approximation de la fréquence d'obtention des clones cellulaires résistants au G418 peut être obtenue en comptant les foyers cellulaires après culture en évitant toute agitation des fioles.

Détection in situ de la β-galactosidase

La méthode suivante a été utilisée directement sur la monocouche cellulaire d'une fiole de culture de 25 cm² pour colorer en bleue les cellules exprimant la β-galactosidase issues du gène bactérien lac-Z. Les monocouches cellulaires ont été rincées deux fois dans du PBS à 4 °C, fixées 5 min à température ambiante dans 2 ml de PBS à 2 % de formaldéhyde et 0,2 % de glutaraldéhyde, puis rincées deux fois 5 min dans du PBS à température ambiante. Les cellules ont été alors incubées 1 h dans 3 ml de ferricyanure de potassium 36 mM, ferrocyanure de potassium 36 mM, MgCl₂ 2 mM, X-gal 0,33 mg/ml (solution stock à 20 mg/ml dans du diméthyl formamide).

Amorces et amplification par PCR

Les séquences ci-dessous soulignées ou en lettres minuscules indiquent respectivement un site de restriction ou des mutations ponctuelles. Les amorces nucléotidiques (Eurogentech) et leurs coordonnées, indiquées entre parenthèses, sont relatives au codon d'initiation du gène considéré (ou correspondent à la numérotation de *JcDNV* pour l'amorce D2) :

- (A1) amorce *ie1* sens : 5'CGTTCATGTTGGATATTGTTTCAGTTGC3' (-72; -45)
- (A2) amorce *ie1* anti-sens : 5'CACCGTGTCTGGCTCCATCCGGGGTGGG3' (+153; +127)
- (B1) amorce *neo^r* sens : 5'ggggaattcAAGATCTGATCAAGAG3' (-37; -22)
- (B1) amorce *neo^r* anti-sens : 5'GCTTGGTCTGGTCATTTgGAtCCC3' (+829; +807)
- (C1) amorce actine A₃ sens : 5'ccgGGTACCACCACCCTGCCTATTTCTGC3' (-1479; -1451)
- (C2) amorce actine A₃ anti-sens : 5'ACgaaTTCGTCGCAaATCTTGAATTAGTGC3' (+17; -13)
- (D1) amorce externe actine A₃ : 5'CACGGCAGAAATAGGCAGGGTGGTG3' (-1446; -1471)
- (D2) amorce externe de *JcDNV* : 5'TTCCACCTTCAGCTCCAAGGTCTTCG3' (188; 263)
- (E1) amorce *ie0* sens : 5'AGTATCAATTGTGCTCCGGCGCACAC3' (-72; -47)
- (E2) amorce *ie0* anti-sens : 5'CTGCTGAGCTTCAGCGCAAGCGGACG3' (+114; +89)
- (E3) amorce promoteur *ie0* sens : 5'GCACGTTTCAGCCATCGAGAGGC3' (-238; -217)

Les réactions d'amplification ont été effectuées suivant les recommandations du fournisseur de la ADN polymérase Vent (Biolabs) dans un volume de 100 µl. Dans le cas d'amplification d'ADN cellulaire, 1 µg d'ADN a été utilisé et la température d'hybridation a été portée à 65 °C. 35 cycles d'amplification (1 min à 94°C, 1 min à 50°C sauf si indication contraire, 2 min à 72°C) ont été effectués avec un thermocycleur TRIO (Biometra), après une étape de dénaturation initiale de 3 min à 94 °C. Une étape finale d'élongation de 5 min à 72 °C a été alors effectuée.

Construction des plasmides

pUie1, pB-5'dp ont été décrits (Ohresser et coll., 1994) et contiennent respectivement le gène *ie1* entier et une région 5' du gène *dnapol* (de -132 à +56 de l'ATG) d'AcNPV.

Le plasmide pBSK₂⁺A₃LacZ a été construit préalablement (Mounier, **Résultats non publiés**) par insertion du fragment *Sma*I-*Sal*I de pMC1871 (Pharmacia) 169 paires de bases après le début du premier exon (Mounier et Prudhomme, 1989) et 85 nucléotides avant le signal de polyadénylation du gène de l'actine A₃ de *Bombyx mori* (Mounier et Prudhomme, 1991). Le plasmide pAZ a été construit en sous-clonant le grand fragment *Kpn*I de pBSK₂⁺A₃LacZ dans le site homologue d'un plasmide pBKS₂⁺ préalablement délété de son site *Bam*HI. Cette construction conserve 1476 paires de bases avant le codon d'initiation de A₃ et environ 420 paires de bases (la séquence n'est pas complètement connue) après le signal de polyadénylation (Mounier communication personnelle).

Un fragment d'ADN de baculovirus amplifié par PCR avec la paire d'amorces (A1; A2) et s'étendant des coordonnées -72 à +153 a été inséré soit dans le site *Sma*I de pBKS₂⁻ pour donner le plasmide pB-5'ie1, soit entre les sites *Bam*HI réparés de pAZ pour donner pAie1S (S pour le même sens que celui de transcription de A₃) ou pAie1AS (AS pour anti-sens soit le sens inverse de la transcription de A₃) suivant l'orientation du fragment inséré. De la même façon, un fragment a été amplifié avec la paire d'amorce (E1; E2) et a été inséré soit dans le site *Sma*I de pBKS₂⁺ pour donner le plasmide pB-5'ie0, soit entre les sites *Bam*HI réparés de pAZ pour donner pAie0S ou pAie0AS. De façon similaire, l'insertion d'un fragment de PCR aux extrémités réparées s'étendant des coordonnées -133 à +56 du gène *dnapol* d'AcNPV (Ohresser et coll., 1994) entre les sites *Bam*HI réparés de pAZ a donné pAdpS ou pAdpAS.

Le vecteur d'expression pAneo a été obtenu par les modifications suivantes de pBSK₂⁺A₃LacZ : la région promotrice de l'actine A₃ de *Bombyx mori* a été amplifiée dans une réaction utilisant la paire d'amorces (C1, C2) et le plasmide pBSK₂⁺A₃LacZ comme matrice. Le fragment d'ADN résultant s'étendant des coordonnées -1476 à +12 et étant dépourvu du codon d'initiation de l'actine A₃, a été digéré par *Kpn*I et *Eco*RI et inséré dans les sites homologues d'un plasmide pUC19 (Yanisch-Perron et coll., 1985) préalablement délété de son site *Bam*HI pour donner pUC19promA₃. En parallèle, le signal de polyadénylation de l'actine A₃ contenu entre les sites *Bam*HI et *Sac*I de pBSK₂⁺A₃LacZ (Fig 1B) a été cloné dans les sites homologues de pBKS₂⁺. D'autre part, un fragment a été amplifié par PCR avec la paire d'amorces (B1; B2) sur une matrice pneo (Pharmacia). Ce fragment contenant l'ORF du gène *neo^r* a été inséré

dans le site *HincII* de pBKS2⁻ (donnant pBKS2⁻neo), puis a été excisé par coupure avec les enzymes *EcoRI* et *BamHI*. Le fragment obtenu a été réinséré en amont du signal de polyadénylation de A3 donnant le plasmide pBKS2⁺neoA33'. Par la suite, le vecteur d'expression pAneo (Fig 1B) a été construit par l'insertion du fragment *HindIII-EcoRI* de pUC19promA3 qui possède le promoteur de A3 dans les sites homologues du plasmide pBKS2⁺neoA33' contenant en séquence le gène *neo^r* et le signal de polyadénylation de l'actine A3.

Le fragment *KpnI* de pAdpAS a été réparé et inséré dans le site *SmaI* du "polylinker" de pAneo pour donner le plasmide pAneo/AdpAS dans lequel les gènes *neo^r* et AdpAS sont exprimés comme deux unités de transcription séparées sous le contrôle du promoteur de l'actine A3.

Un fragment d'ADN de baculovirus amplifié par PCR avec la paire d'amorce (E2; E3) et s'étendant des coordonnées -236 à +114 du gène *ie0* a été inséré dans le site *SmaI* en amont du signal de polyadénylation de l'actine A3 (décrit plus haut), pour donner pPieo.

L'ensemble des constructions décrites ci-dessus a été contrôlé par séquençage de l'ADN double brin en utilisant le "T7 DNA polymerase kit" (pharmacia) suivant le protocole décrit par le fournisseur.

pBRJneo et pBRJneoΔnsh sont deux vecteurs d'expression préalablement décrits (**Rolling, 1992**) (Fig 1A) dérivés de *JcDNV* le densovirus de *Junonia coenia* (**Dumas et coll., 1992**). Brièvement, un fragment *BglII-BamHI* de pneo (Pharmacia) contenant le gène *neo^r* a été inséré dans le site *PvuII* situé dans le gène structural de pBRJ (le génome de *JcDNV* cloné dans pBR322) pour donner pBRJneo. L'insertion du fragment *BamHI* de pBRJneo contenant le gène *neo^r* et la partie interne de la répétition inversée terminale (ITR) gauche de *JcDNV* entre les sites *BamHI* de deux ITR gauches symétriques a produit pBRJneoΔnsh. Cette construction ne possède ni les fonctions structurales ni les fonctions non structurales de *JcDNV* et exprime *neo^r* sous le contrôle du promoteur et du signal de terminaison de la transcription contenus respectivement dans l'ITR gauche reconstituée et l'ITR gauche délétée (**Rolling, 1992**). L'insertion du fragment *KpnI* réparé de pAdpS ou pBSK2⁺A3LacZ dans le site *DdeI* de pBRJneoΔnsh a constitué respectivement le plasmide pΔ/AdpS ou pΔ/AZ dans lequel *neo^r* est sous le contrôle du promoteur du gène structural de *JcDNV* et dpS sous le contrôle du promoteur de l'actine A3.

Extraction et analyse des ARN

Les ARN cellulaires totaux ont été extraits suivant la méthode d'extraction à l'isothiocyanate de guanidium (**Chomczynski et Sacchi, 1987**). L'analyse de protection aux RNases a été effectuée essentiellement comme cela a été décrit (**Gilman, 1993**). Les riboprobes suivantes ont été transcrites *in vitro* à partir du plasmide pBluescribe :

- une sonde de 258 nucléotides, spécifique des transcrits sens du gène *dnapol*, synthétisée par l'ARN polymérase de T7 à partir de pB-5'dp linéarisé par *EcoRI*, donnant un fragment de protection maximale de 189 nucléotides.

- une sonde de 274 nucléotides, spécifique des transcrits anti-sens du gène *dnapol*, synthétisée par l'ARN polymérase de T3 à partir de pB-5'dp linéarisé par *BamHI*, donnant un fragment de protection maximale de 189 nucléotides.

- une sonde de 305 nucléotides, spécifique des transcrits sens du gène *ie1*, synthétisée par l'ARN polymérase de T7 à partir de pB-5'ie1 linéarisé par *EcoRI*, donnant un fragment de protection maximale de 225 nucléotides.

- une sonde de 256 nucléotides, spécifique des transcrits sens du gène *ie0*, synthétisée par l'ARN polymérase de T7 à partir de pB-5'ie0 linéarisé par *EcoRI*, donnant un fragment de protection maximale de 190 nucléotides.

Extraction et analyse de l'ADN cellulaire

L'ADN cellulaire total a été extrait suivant la méthode de lyse *in situ*. Le milieu a été complètement enlevé des fioles de cultures puis les cellules (environ 15 millions) ont été lysées par du TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8) à 0,1 % SDS et à 0,1 mg/ml protéinase K et incubées toute la nuit à 37°C. Le lysat a été ajusté à 10 ml et à 0,4 M final de NaCl puis extrait avec 10 ml phénol équilibré à pH 8/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) et avec 10 ml de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). L'ADN a été ensuite précipité par 2 volumes d'éthanol 100% à température ambiante, récupéré immédiatement avec une pipette pasteur, rincé par immersion dans de l'éthanol 70% et repris dans 0,5 ml de TE à 0,1% de SDS et 2 µg/ml de RNase A, incubé 1 h à 37°C puis extrait et précipité comme précédemment. Le culot final a été repris dans du TE puis quantifié au spectrophotomètre.

Les ADN de petits poids moléculaires sont enrichis suivant la méthode de **Hirt (1967)** à partir de 15 millions de cellules, extraits avec un volume de phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25/24/1), un volume de chloroforme / alcool isoamylique (24/1) puis précipités par 2,5 volumes d'éthanol absolu et incubé 1 h à -

20 °C. Le culot après centrifugation a été rincé à l'alcool à 70 %, repris dans 0,5 ml de TE à 0,1 % de SDS et 5 µg/ml de RNase A plus 10 µg de glycogène, incubé 1 h à 37 °C puis ajusté à 2,5 M de NH₄Ac dans 3 ml final et précipité par 2 volumes d'éthanol absolu 1 h à 4 °C. L'ADN a été centrifugé 15 min à 10000 g, rincé à l'éthanol 70 %, repris dans 25 µl de TE et quantifié au spectrophotomètre.

Dix µg ont été éventuellement digérés par des enzymes de restriction (*Pst*I pour la Fig 4, *Nco*I et *Bst*X1 pour linéariser respectivement les plasmides porteur du gène *neo*^r et pAdpS ou pAdpAS), puis chargés sur gel d'agarose. La double digestion capable de linéariser chacun des plasmides co-transfectés nous a permis d'analyser successivement le devenir de chacune de ces séquences sur la même membrane après dèshybridation. Des modifications du protocole de transfert suivant la technique de Southern (**Selden, 1993**) ont été apportées dans l'hybridation et les lavages. La pré-hybridation et l'hybridation ont été effectués respectivement 1 h et toute la nuit à 68°C dans un tampon Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,2 à 0,5 M (solution pH 7,2 = 68,4 ml de Na₂HPO₄ + 31,6 ml de NaH₂PO₄), 7% SDS, 1 mM EDTA, 0,5 mg/ml.d'ADN de saumon fragmenté et dénaturé et en présence d'une sonde d'ADN radioactif. Les lavages ont été effectués dans un tampon à 40 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ à pH 7,2 et 1% SDS dans la séquence suivante : 1 lavage rapide à température ambiante, 1 de 30 min à température ambiante et enfin 1 de 30 min à 68°C.

Marquage des sondes ADN

Les sondes ont été synthétisées à partir d'ADN dénaturé puis hybridé avec des amorces aléatoires suivant le protocole du kit "random prime labelling kit" de Boehringer en présence de dCTP αP³². Les ADN clonés excisés et purifiés utilisés pour le marquage des sondes spécifiques du gène *neo*^r et de la région 5' du gène *dnapol* d'*AcNPV* proviennent respectivement des plasmides pBKS₂^{-neo} et pB-5'dp.

RESULTATS ET DISCUSSION

1) EXPRESSION D'ARN ANTI-SENS SPECIFIQUES DU BACULOVIRUS AcMNPV EN CELLULES DE LEPIDOPTERE

1.1) Publication 1: Un nouveau système de vecteur d'expression pour l'obtention de lignées cellulaires continues d'insecte.

En tenant compte des données bibliographiques et des finalités de ce travail, le projet de recherche retenu a été l'inhibition de gènes du baculovirus *AcMNPV* par l'expression d'ARN anti-sens dans les cellules hôtes. L'inhibition de l'expression de ces gènes doit conduire à la réduction de la multiplication virale. Dans le cadre de notre étude, nos premières préoccupations ont été (1) de maîtriser la sélection de clones cellulaires exprimant de façon stable des séquences et (2) de disposer d'un vecteur d'expression capable d'être transcrit efficacement dans les cellules de lépidoptère. L'acquisition de ce matériel et de ces techniques nous ont amené à un travail de fond sur l'expression stable en cellules SF9. La transcription étant l'objet d'une régulation spécifique durant l'intégration des vecteurs d'expression dans l'ADN cellulaire, nous avons déterminé les possibilités d'activation transcriptionnelle d'un vecteur d'expression.

UN NOUVEAU SYSTEME DE VECTEUR D'EXPRESSION POUR L'OBTENTION DE LIGNEES CELLULAIRES CONTINUES D'INSECTE.

Marc Ohresser et coll.

INTRODUCTION

La transfection de cultures cellulaires avec des vecteurs spécifiques peut conduire à leur expression si leur intégration aléatoire dans l'ADN cellulaire est favorisée par une pression de sélection (**Bishop et Smith, 1989**). Par conséquent, un vecteur d'expression stable possède un gène marqueur de sélection dont l'expression est contrôlée par un promoteur actif dans les cellules à transfecter. Les marqueurs de sélection les plus pratiques à utiliser sont ceux qui produisent un phénotype dominant, dont en particulier le gène de l'aminoglycoside phosphotransférase (*aph* ou *neo^r*) (**Southern et Berg, 1982**). Les vecteurs d'expression doivent bien entendu posséder également un promoteur capable de diriger la transcription du gène à exprimer. Cette seconde unité de transcription est présente soit sur le même plasmide soit sur un second plasmide qui sera co-transfecté. Le gène à exprimer est alors co-intégré et co-sélectionné dans une certaine proportion des clones cellulaires. Ces techniques, bien connues pour les cellules de vertébrés, ont été également utilisées pour les cellules de drosophiles, mais peu d'informations sont disponibles pour les cellules de lépidoptères (**Jarvis et coll., 1990; Rolling, 1992; Jarvis, 1993; Persillon, 1993**). Les vecteurs d'expression spécifiques des cellules de lépidoptère correspondant portent le gène *neo^r* sous le contrôle transcriptionnel de séquences dérivées de baculovirus (**Jarvis et coll., 1990; Jarvis, 1993; Persillon, 1993**) ou de densovirus (*Parvoviridae*) (**Rolling, 1992**). Les cellules de lépidoptères sont infectables par les vecteurs d'expression baculovirus et leur transfection stable présente plusieurs intérêts : (1) le faible coût et le caractère défini du milieu de culture sans sérum utilisé (production de masse et purification favorisées), (2) la possibilité de co-exprimer des protéines avec celles produites en quantité massive par les vecteurs d'expression baculovirus, (3) offrir une meilleure sécurité que les cellules de mammifères en ce qui concerne les risques biologiques. D'autre part, la régulation génique des baculovirus est encore peu explorée. L'expression stable de séquences dans la lignée cellulaire SF9 nous est apparue intéressante pour l'étude du baculovirus AcNPV (le prototype du groupe).

RESULTATS

Etablissement de lignées cellulaires dérivées de SF9 exprimant de façon stable le gène *neo^r*

La transfection de cellules de SF9 de *Spodoptera frugiperda* par les plasmides pBRJneo et pBRJneo Δ nsh (voire Fig 1A et matériels et méthodes) a permis la sélection de cellules résistantes à l'aminoglycoside G418 (Table 1) comme cela avait été rapporté préalablement pour les cellules de *Spodoptera littoralis* (Rolling, 1992). Ces vecteurs possèdent une partie (pBRJneo Δ nsh) ou la totalité du génome du densovirus du lépidoptère *Junonia coenia* (JcDNV). Le comportement au cours de la transfection de ces vecteurs n'étant pas complètement élucidé (Rolling, 1992), un autre plasmide pAneo a été construit en plaçant la séquence codante du gène *neo^r* sous le contrôle des éléments transcriptionnels du gène A3 de l'actine cytoplasmique du vers à soie *Bombyx mori* (Fig 1B et matériels et méthodes). Le promoteur utilisé dans pAneo provient de la construction pBSK₂⁺A₃LacZ (Fig 1B) qui a été délété en amont de son site *KpnI* et en aval d'un site de restriction qui a été créé 12 paires de bases en aval de l'ATG de A₃ (codon d'initiation de l'actine) muté en ATT (Fig 1B). L'activité du gène rapporteur *lac-Z* présent dans ces constructions en aval du promoteur de A₃, a été détectée par coloration *in situ* de la β -galactosidase. L'activité du promoteur commençant au site *KpnI* a été vérifiée en expression transitoire dans les cellules SF9 (résultats non montrés) par transfection avec le plasmide délété pAZ issu de pBSK₂⁺A₃LacZ (Fig 1B). Le plasmide pAneo nous a également permis, et suivant les mêmes modalités, d'établir des cultures cellulaires en présence de G418 (Table 1) alors que la transfection dans les mêmes conditions d'un plasmide portant uniquement la séquence codante du gène *neo^r* ne permet pas l'émergence de clones cellulaires résistants (Table 1).

Expression stable du gène *lac-Z* dans des cellules SF9

L'unité de transcription AZ clonée dans pAZ (Fig 1B), qui a montré son efficacité en expression transitoire, a été insérée dans la région d'origine plasmidique du vecteur pBRJneo Δ nsh. Ce nouveau plasmide p Δ /AZ (Fig 1B) a été utilisé pour transférer des cellules SF9 dans le but d'obtenir une expression stable du gène rapporteur. Les cellules SF9(Δ /AZ) sélectionnées en présence de G418 ont été testées pour leur activité β -galactosidase par coloration *in situ*. La proportion de cellules présentant une activité détectable (colorées en bleu) reste faible, de l'ordre de 5% (résultats non montrés), tout

comme ce qui a été observé en expression transitoire. Lorsque les cultures monoclonales dérivées ont été testées pour leur activité β -galactosidase *in situ*, certains clones ne présentaient que des cellules blanches (résultats non montrés), d'autres ne présentaient que des cellules bleues (Fig 2) ou un mélange de cellules blanches et bleues (résultats non montrés). Le taux de cellules blanches et de cellules bleues reste constant si les cellules sont testées durant une période d'un mois à partir de la même culture (résultats non montrés). Pour éliminer toute possibilité d'interaction de la protéine produite par le gène rapporteur sur les phénomènes de sélection ou de co-sélection, nous avons choisi de substituer l'expression d'un gène rapporteur par la transcription d'une courte séquence d'ARN.

Etablissement des différentes lignées pouvant transcrire un ARN donné par transfection avec différents vecteurs d'expression

Une séquence de 189 paires de bases du gène *dnapol* du baculovirus AcNPV (Tolmaski et coll., 1988) a été intégrée à la place du gène *lac-Z* dans le plasmide pAZ. Les plasmides pAdpS (S pour sens) et pAdpAS (AS pour anti-sens) (Fig 1B) permettent la transcription de l'insert quelque soit son orientation. Les cellules SF9 ont été co-transfectées par pAdpS d'une part et pBRJneo Δ nsh, pBRJneo ou pAneo d'autre part. Les cellules sélectionnées au G418 ont été nommées respectivement SF9(Δ +AdpS) SF9(J+AdpS) ou SF9(Aneo+AdpS). De la même façon la lignée SF9(Δ +AdpAS) a été établie par co-transfection de pBRJneo Δ nsh et pAdpAS. Considérant l'éventualité du caractère autorépliatif de pBRJneo Δ nsh suggéré par les travaux de **Rolling (1992)**, l'unité de transcription AdpS provenant du plasmide pAdpS a été insérée dans pBRJneo Δ nsh donnant le plasmide p Δ /AdpS (Fig 1B) qui a conduit à la sélection de la lignée SF9(Δ /AdpS). Afin de comparer également la transfection et la co-transfection avec le vecteur pAneo, l'unité de transcription Aneo provenant du plasmide pAneo a été insérée dans la partie d'origine plasmidique de AdpAS donnant le plasmide pAneo/AdpAS (Fig 1B) qui a conduit à la sélection de la lignée SF9(Aneo/AdpAS). Une certaine instabilité des séquences à exprimer ayant été suspectée dans le paragraphe précédent, la même séquence de 189 paires de bases a été insérée en aval de la séquence codante du gène *neo^r* de la construction pAneo et suivant une orientation contraire à celle de *neo^r* (anti-sens). Ce plasmide nommé pAneo-dpAS (Fig 1B) a permis la sélection de la lignée SF9(Aneo-dpAS).

Expression stable d'ARN à partir des différents vecteurs d'expression

Les ARN totaux extraits des lignées SF9(Δ /AdpS) SF9(Δ +AdpS), SF9(J+AdpS) et SF9(Aneo+AdpS) ont été analysés par protection aux RNases d'une ribosonde de 258 nucléotides spécifique de l'unité de transcription AdpS (Fig 1 et 3). L'abondance des ARN spécifiques transcrits étant très variable d'une lignée à l'autre deux autoradiographies obtenues après des temps différents d'exposition sont présentées, aux temps de 1 h (Fig 1A) et 60 h (Fig 3B). Les lignées SF9(Δ /AdpS) et SF9(Δ +AdpS) présentent des taux de transcription du même ordre de grandeur. En effet, les ARN de dpS sont environ 2 fois plus nombreux dans SF9(Δ /AdpS) que dans SF9(Δ +AdpS) (Fig 3A colonnes 1 et 2). Par ailleurs, les lignées SF9(Δ /AdpS) et SF9(Δ +AdpS) présentent également des taux de transcription semblables. La transcription de AdpS est environ 2 fois plus active dans SF9(J+AdpS) que dans SF9(Aneo+AdpS) (Fig 3A et 3B colonnes 3 et 4). Par contre, les ARN spécifiques sont de l'ordre de 50 fois moins abondants lorsque les plasmides utilisés pour la co-transfection sont pBRJneo ou pAneo plutôt que pBRJneo Δ nsh (Fig 3B comparez les colonnes 3 et 4 avec la colonne 2) (comparez Fig 3A colonne 2 avec Fig 3B colonne 3 et 4). Les signaux détectés sont spécifiques car aucune protection n'a été détectée avec l'ARN de cellules SF9 non transfectées (Fig 3A, colonne T⁻) et d'autre part un signal intense et de la taille attendue est observé en additionnant à l'ARN non spécifique de SF9 l'ARN non radioactif, transcrit *in vitro*, en anti-sens par rapport à la sonde (Fig 3A colonne T⁺).

L'analyse de la transcription des autres lignées nous a conduit à comparer pour Aneo la transfection et la co-transfection. Dans une même expérience, les ARN extraits des lignées SF9(Aneo/AdpAS) et SF9(Aneo-dpAS) d'une part et SF9(Aneo+AdpS) d'autre part ont été analysés en protection aux RNases de ribosondes mesurant respectivement 274 nucléotides et 258 nucléotides, spécifiques des ARN dpAS et des ARN dpS. Les signaux obtenus sont identiques entre eux (résultats non montrés). Les conditions de détection étant similaires (activité spécifique et taille des sondes comparables), on peut en déduire que les ARN spécifiques sont présents en quantité équivalente dans SF9(Aneo/AdpAS), SF9(Aneo-dpAS) et SF9(Aneo+AdpS).

Analyse de l'intégration des plasmides dans les cellules transfectées

La forme selon laquelle le plasmide se maintient dans la cellule, épisomale ou intégrée, ainsi que le nombre de copies par cellules ont été déterminés. Les ADN totaux extraits des lignées cellulaires dont le niveau de transcription a été décrit dans le paragraphe précédent ont été hybridés à une sonde spécifique de la séquence codante du gène *neo^r* suivant la technique du "Southern blot" (Fig 4). Les témoins correspondant à de l'ADN de p Δ /AdpS purifié à partir de bactérie donnent les signaux positifs (Fig 4A

colonne T⁺10 et T⁺1 et Fig 4B colonne T⁺10). Notons qu'après digestion par *Pst*I, le témoin positif fait apparaître les bandes spécifiques de pBRJneoΔnsh voulues (Fig 4B colonne T⁺10 et Fig 1A). Il en est de même pour tous les signaux détectés après digestion par *Pst*I (Fig 4A colonnes 1, 2, 4, 5 et 6 et Fig 1). La quantité de gène *neo*^r dans les cellules peut être estimée en nombre de copies par cellule à partir du nombre de molécules déposés dans le témoin positif et d'après le nombre de cellules correspondant à l'ADN chargé dans un puits. 10 ng de pΔAdpS (Fig 4 colonne T⁺10) d'une taille de 8,9 kpb correspondent à 10⁹ molécules. 10 μg d'ADN de SF9 déposés par puits correspondent à 10⁶ cellules (10 pg par cellule comme cela a été déduit du rendement d'extraction de l'ADN cellulaire). Les signaux présents dans la colonne T⁺10 (Fig 4A et 4B) correspondent donc à 1000 copies par cellules. Les signaux observés sont spécifiques des lignées transfectées car l'ADN de SF9 ne donne aucun signal (Fig 4A et 4B colonne T⁻).

Toutes les lignées cellulaires analysées par "Southern blot" sans digestion préalable de l'ADN montrent une hybridation au niveau de l'ADN de haut poids moléculaire (Fig 4B colonnes 1, 2, 4, 5, et 6) à la même localisation que celle observé en coloration au bromure d'éthidium du gel avant transfert (résultats non montrés). Les ADN de faible poids moléculaire ont été préparés à partir des mêmes lignées et soumis en parallèle dans l'expérience de "Southern blot". Les signaux observés sont proportionnels à ceux de la Fig 4B (ADN non digéré) mais sont 5 fois plus faibles (résultats non montrés) et correspondent logiquement à une contamination par de l'ADN cellulaire.

Lorsque les cellules ont été transfectées par pBRJneoΔnsh, pAneo/AdpAS ou pAneo-dpAS, l'intensité des signaux observés est équivalente et correspond à environ 1000 copies par cellule (Fig 4A et B colonnes 1, 5 et 6). Lors de co-transfection, pAneo et pBRJneoΔnsh sont présents en un nombre de copies équivalent (Fig 4A colonnes 2 et 4). Dans ces expériences de co-transfection, la quantité de plasmide porteur du gène *neo*^r utilisée diminue et le nombre de copies de *neo*^r détectées décroît en proportion (Fig 4 comparer les colonnes 1 et 2 ou 4 et 5). La lignée obtenue par co-transfection avec pBRJneo permet la présence de moins de 50 copies par cellules.(en deça du seuil de détection de cette expérience) (Fig 4 colonne 4) alors que celle obtenue par co-transfection avec pAneo ou pBRJneoΔnsh conduit à la présence d'au moins 10 fois plus de plasmide (Fig 4 comparer les colonnes 3 et 4).

Co-intégration des plasmides co-transfectés dans l'ADN cellulaire

La mise en évidence du maintien des unités de transcription AdpS ou AdpAS transfectées sur le plasmide porteur du gène *neo*^r ou co-transfectées a été faite de manière

implicite en analysant la transcription. Mais le nombre de copies des unités de transcription AdpS ou AdpAS reste important à déterminer pour s'assurer de l'ampleur réelle de l'activation transcriptionnelle qui est suspectée pour les lignées établies par co-transfection. C'est pourquoi le nombre de copies par cellule du gène *neo^r* et des séquences dpS ou dpAS ont été déterminés sur l'ensemble des lignées établies (Table 2). Cette expérience indépendante du "Southern Blot" présenté Fig 4 nous donne des résultats similaires concernant le nombre de copies du gène *neo^r* (comparer Fig 4 et Table 1). Brièvement la transfection de vecteurs dérivés de pAneo et pBRJneo Δ nsh a conduit au maintien de l'ordre de 1000 copies, alors que la co-transfection n'utilisant que 1 μ g de ces plasmides a conduit à une intégration de l'ordre de 100 copies. Si les lignées ont été établies par transfection d'un seul plasmide, comme attendu le nombre de séquences dpS ou dpAS intégrées est identique. Si les plasmides sont co-transfectés le nombre de plasmides co-sélectionnés sont 10 fois plus nombreux que les plasmides porteurs du gène *neo^r*.

Les mêmes mesures sur quelques cultures monoclonales nous ont permis d'avoir des idées plus précises sur la composition réelle des populations polyclonales (Table 2). L'analyse des 2 clones obtenus à partir de SF9(Δ /AdpS) montre une quantité équivalente pour les deux unités de transcription. Par contre, l'analyse des clones issus de lignées établies avec pBRJneo Δ nsh permet de déceler dans certains cas des quantités moindres de l'ADN transfecté. Le rapport d'intégration entre le gène *neo^r* et les séquences dpS et dpAS reste constant. Les 2 clones analysés de SF9(J+AdpS) présentent un nombre de séquence dpS accru mais le signal détecté étant à la limite de détection, cet accroissement n'a pas été considéré comme significatif. Parmi les clones issus de la co-transfection avec pAneo, seuls 3 clones sur 7 possèdent un nombre de copies de dpS détectable.

Intégration des vecteurs d'expression en répétition en tandem direct

La structure de certaines répétitions de l'ADN transfecté peut être élucidée par "Southern blot" en utilisant des sites de restriction spécifiques des plasmides utilisés. Dans l'expérience de "Southern blot" ayant servi à établir les données quantitatives reportées dans la table 2, des observations qualitatives ont été effectuées selon l'allure de l'hybridation (résultats non montrés). Les ADN cellulaires ont été digérés par une ou deux enzymes de restriction capables de linéariser les plasmides introduits. Pour chaque lignée cellulaire analysée et suivant les sonde *neo^r* ou dp utilisées, une seule bande est visible de taille correspondant au plasmide linéarisé homologue à la sonde (résultats non montrés).

Un activateur transcriptionnel dans l'ITR du densovirus JcDENV.

La comparaison des résultats de l'analyse du taux de transcription et du taux d'intégration a mis en évidence une activation transcriptionnelle de A3 (voir discussion). Afin de déterminer la nature du mécanisme d'activation du promoteur A3, nous avons recherché la présence d'une séquence de pBRJneo Δ nsh capable d'activer à distance le promoteur A3 en expression transitoire. Des cellules SF9 ont été transfectées par p Δ /AdpS et pAdpS ou co-transfectées par pBRJneo Δ nsh et pAdpS puis les ARN ont été extraits 24 h post-transfection et analysés par protection aux RNases d'une ribosonde de 258 nucléotides spécifiques des ARN dpS (Fig 5A respectivement colonnes 1, 2 et 3). Les fragments protégés ont une taille approximative de 190 nucléotides correspondant aux 189 nucléotides attendus, ces signaux sont spécifiques comme le montre la protection avec de l'ARN de cellules transfectées avec du pBKS (Fig 5A colonne T⁻). La présence de pBRJneo Δ nsh sur le plasmide contenant AdpS augmente la quantité d'ARN accumulée d'un facteur 8 (Fig 5A comparer colonnes 1 et 2) comme cela a été déterminé par comparaison avec une échelle de dilution (résultats non montrés). Par contre, la co-transfection de pAdpS avec pBRJneo Δ nsh n'a pas d'impact sur la transcription de AdpS. En expression transitoire, pBRJneo Δ nsh fonctionne comme un activateur de transcription seulement s'il est présent en *cis* (Fig 5A comparer colonnes 2 et 3).

Nous avons également vérifié que l'augmentation de la quantité d'ARN détectée correspond bien à des ARN initiés au niveau du promoteur A3. Les ARN des lignées SF9(Δ /AdpS) et SF9(Δ +AdpS) ont été analysés selon la technique "Northern blot" à l'aide d'une sonde spécifique de dpS (Fig 6). Les ARN majoritaires mesurent environ 1,4 Kilo bases ce qui correspond à un ARN initié dans la séquence promotrice de A3 (Fig 1B).

Mise en évidence de jonctions entre les plasmides co-transfectés

L'activation du promoteur de A3 dans les lignées établies par transfection avec p Δ /AdpS plutôt qu'avec pAneo/AdpS pourrait donc s'expliquer par la présence en *cis* et à proximité des séquences de pBRJneo Δ nsh. Lorsque l'activation est observée après co-transfection, un lien physique relativement étroit est nécessaire pour qu'une activation en *cis* soit possible. Nous avons utilisé pour mettre en évidence ce contact la technique de PCR. Des amorces oligonucléotidiques correspondant à l'extrémité 5' du promoteur de A3 (Fig 1B oligoD1) et à l'extrémité 5' de l'ITR gauche entière de pBRJneo Δ nsh (Fig 1A oligoD2) ont été utilisées dans des réactions de PCR en utilisant comme matrice l'ADN

total des lignées cellulaires établies par co-transfection de pBRJneo Δ nsh ou pBRJneo (Fig 7). Alors qu'aucun produit d'amplification n'a été observé avec de l'ADN de SF9 (Fig 7 colonne 1), les ADN de SF9(Δ +AdpS) (Fig 7 colonne 2) permettent l'amplification d'un grand nombre de bandes et ceux de SF9(J+AdpS) (Fig 7 colonne 3) d'une seule bande. Ces produits d'amplification ont été réamplifiés suivant les mêmes conditions à partir de l'ADN élué des blocs d'agarose du gel sans que cela se produise avec les blocs d'agarose provenant de l'ADN de SF9 (résultats non montrés). Des amplifications ont été effectuées en utilisant comme matrice de l'ADN de SF9 additionné de 1 ng de chacun des plasmides co-transfectés, pBRJneo Δ nsh et pAdpS d'une part et pBRJneo et pAdpS d'autre part. Aucun produit d'amplification n'a été détecté (résultats non montrés). Pour montrer que l'ADN amplifié est bien spécifique du couple d'amorces, des réactions ont été effectuées avec une seule des amorces sans qu'aucun produit n'apparaisse (résultats non montrés).

Activation en *trans* du promoteur de l'actine cytoplasmique de *Bombyx mori* par l'activateur IE1 de baculovirus

Le plasmide pAie1S a été construit de façon similaire à pAdpS (Fig 1B) mais en utilisant une région 5' du gène *iel* d'AcNPV commençant 22 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (Guarino et Summers, 1987). Des cellules SF9 ont été transfectées avec pAie1S, ou co-transfectées avec pUie1 contenant le gène *iel* sous sa forme native. Les ARN totaux extraits ont été soumis à une protection aux RNases d'une ribosonde de 305 nucléotides spécifique de la région 5' de *iel* (Fig 5B). Les cellules transfectées par pAie1S produisent une protection maximale de la sonde de 225 nucléotides (Fig 5B colonne 2), celles transfectées par pUie1 produisent un fragment protégé de 203 nucléotides (Fig 5B colonne 1) plus court de 22 nucléotides correspondant à des ARN initiés au site précoce de *iel* à la coordonnée -50 (Guarino et Summers, 1987). Lorsque des cellules sont co-transfectées avec les deux plasmides, le taux de transcription de pAie1S est augmenté d'un facteur 10 (Fig 5B colonne 3). Le même phénomène d'activation a été également observé en expression transitoire avec la transcription d'une autre courte séquence d'ADN suivant la même stratégie (résultats non montrés).

DISCUSSION

Il n'existe pas pour les cellules de lépidoptère de système de vecteurs d'expression continue suffisamment étudiés, notamment pour les modalités de co-sélection et le mécanisme de maintien des plasmides (co-) transfectés dans la cellule.

Les vecteurs d'expression stables du densovirus de lépidoptères *JcDNV* capables de rendre les cellules de *Spodoptera littoralis* résistantes au G418 nous ont amené à les utiliser dans notre modèle d'étude sur les cellules SF9. L'obtention de cellules résistantes au G418 après transfection de SF9 avec ces vecteurs montre que les gènes et/ou les séquences virales utilisées sont actifs dans les cellules de *Spodoptera frugiperda*. Pour pBRJneo Δ nsh, ces éléments viraux sont le promoteur du gène structural (Fig 1A) et les ITR (Rolling, 1992). Pour pBRJneo, il faut ajouter les gènes non structuraux qui sont indispensables à la réplication virale (Giraud et coll., 1992). Pour clarifier le rôle réel de ces fonctions virales, un vecteur d'expression a été construit à partir des séquences cellulaires du gène de l'actine A3 de *Bombyx mori*. Le plasmide pAneo construit possède les mêmes propriétés que les vecteurs densovirus pour l'obtention de clones résistants au G418. Seuls les signaux de transcription semblent donc être utilisés pour l'établissement des lignées cellulaires résistantes au G418. Les possibilités des vecteurs d'expression ont été étendues à la co-expression d'un gène rapporteur.

Le gène rapporteur *lac-Z* étant disponible sous le contrôle du promoteur du gène A3, nous avons établi des clones cellulaires exprimant *lac-Z* de façon stable en intégrant l'unité de transcription de *lac-Z* dans le vecteur pBRJneo Δ nsh. La détection *in situ* de la β -galactosidase dans la totalité des cellules n'a pas pu être observée au niveau de la lignée cellulaire polyclonale. Ce résultat peut être expliqué par un avantage sélectif apporté par des délétions accidentelles du gène rapporteur rendu instable par la toxicité du produit qu'il exprime. Pour tester cette hypothèse, nous avons procédé au clonage cellulaire de la population préalablement obtenue SF9(Δ /AZ). Des clones cellulaires dont la totalité des cellules présente un niveau de β -galactosidase détectable *in situ* ont été isolés. La proportion de cellules ayant un niveau détectable de β -galactosidase est variable suivant les clones cellulaires analysés. Cette proportion est stable avec le temps, il semble que la variation d'un clone à l'autre soit plutôt due à la variation du niveau général d'expression qu'à une inactivation spontanée du gène rapporteur sur le vecteur d'expression. Cela infirme l'hypothèse de l'instabilité du gène *lac-Z*.

Une série de lignées cellulaires a été établie en utilisant l'expression d'une courte séquence d'ARN pour tester les possibilités de co-expression de gènes étrangers avec le gène *neo^r*. Les divers vecteurs d'expression viraux ou cellulaires ont été utilisés suivant

deux approches différentes. Le gène rapporteur et le marqueur de sélection sont placés soit sur le même plasmide servant à la transfection soit sur deux plasmides différents utilisés pour co-transfecter les cellules. L'expression de la courte séquence d'ARN est détectée dans tous les cas mais est beaucoup plus importante lorsque pBRJneo Δ nsh est utilisé. Le fait que la transcription soit observée après co-transfection des cellules avec pBRJneo Δ nsh et pAdpS ne correspond pas à un maintien autorépliatif de pBRJneo Δ nsh. Si cela est le cas, seule l'hypothèse d'une recombinaison entre le plasmide sans avantage sélectif et pBRJneo Δ nsh pourrait expliquer cette transcription. Or un tel phénomène devrait être extrêmement fréquent pour que la transcription de dpS soit observée avec une intensité équivalente à celle observée si les deux séquences étaient sur le même plasmide. La différence du niveau de transcription entre les cellules co-transfectées avec pBRJneo et pAneo plutôt qu'avec pBRJneo Δ nsh peut s'expliquer par diverses hypothèses : (i) le maintien sous forme intégrée ou autorépliatif des constructions et/ou (ii) le nombre de copies présentes dans la cellule influe sur le niveau de transcription. Les travaux de **Rolling (1992)** suggèrent une intégration unique en un seul site pour pBRJneo et un maintien épisomal autorépliatif en un nombre de copies multiples pour pBRJneo Δ nsh. (iii) Une différence d'expression de AdpAS peut être également attribuée à une plus faible efficacité de la co-sélection avec pAneo. (iv) La séquence du plasmide co-transfecté pourrait également influencer sur la transcription de dpS à partir du promoteur A₃ par la présence d'un activateur transcriptionnel de type "enhancer" et/ou (v) pAneo co-transfecté pourrait déstabiliser l'unité de transcription AdpS dans la cellule.

Des conclusions peuvent également être déduites du niveau de transcription équivalent observé entre les lignées SF9(Aneo/AdpAS), SF9(Aneo-dpAS) et SF9(Aneo+AdpS). La transfection avec un seul plasmide dérivé de pAneo conduit à un niveau de transcription de AdpS et de AdpAS du même ordre de grandeur que lorsque les deux plasmides sont utilisés. Ce résultat est identique à celui obtenu avec pBRJneo Δ nsh et suggère qu'un lien physique des ADN co-transfectés se produit de façon très fréquente, comme cela a été montré dans les cellules de mammifère (**Perucho et coll., 1980; Anderson et coll., 1984**). Ce comportement identique de pBRJneo Δ nsh et pAneo durant la co-transfection infirme l'hypothèse (iii) attribuant la différence de taux de transcription à une différence de l'efficacité de la co-sélection. L'insertion de la séquence à exprimer en aval du gène *neo^r* devrait permettre d'augmenter la stabilité de cette séquence en contre-sélectionnant les événements de délétion à son niveau. Comme le taux de transcription reste inchangé, l'hypothèse (v) de l'instabilité de pAdpS co-transfecté avec pAneo est invalidée. D'autre part, le niveau de transcription de AdpAS dans des lignées transfectées par un vecteur unique dérivé de pAneo est similaire à celui de AdpS observé après co-transfection, et indirectement est de l'ordre de 50 fois moins actif que si

les cellules avaient été transfectées avec p Δ /AdpS. Ces résultats obtenus à partir de vecteurs uniques dérivés de pBRJneo Δ nsh ou de pAneo confirment les conclusions déduites après comparaison des niveaux de transcription obtenus dans les cellules co-transfectées.

Des analyses supplémentaires ont été effectuées pour départager les hypothèses restantes que sont (i) la structure et (ii) le nombre de copies de vecteur dans les cellules et (iv) une activation transcriptionnelle entre les plasmides co-transfectés. Une analyse électrophorétique des ADN totaux et de petit poids moléculaire nous ont montré que pBRJneo Δ nsh conduisait en fait à une intégration dans l'ADN cellulaire d'un nombre important de copies (de l'ordre de 1000 par cellule) essentiellement en tandem répété. La présence des séquences transfectées dans l'ADN de haut poids moléculaire montre que l'ADN transfecté a été intégré dans de l'ADN cellulaire de cette taille. Ceci est concordant avec le fait qu'aucun signal n'a été enrichi dans les surnageants de Hirt. pBRJneo Δ nsh ne codant pour aucune protéine virale, ce plasmide se comporte comme les vecteurs d'expression porteurs d'une origine de répllication virale mais étant incapable de se maintenir sous forme autorépllicative sans la présence de protéines virales (**Challberg et Kelly, 1989**). Une organisation similaire à pBRJneo Δ nsh a été montrée pour pAneo. L'hypothèse (i) de l'influence du maintien épisomal sur l'activité transcriptionnelle des unités de transcription AdpS transfectées ou co-transfectées peut donc être écartée. Le même nombre de copies de pAneo et pBRJneo Δ nsh intégrées après co-transfection écarte l'hypothèse (ii) de l'influence de l'ampleur de l'intégration sur la transcription globale obtenue à partir des vecteurs pAneo et pBRJneo Δ nsh ou de leurs dérivés. La transcription plus active dans SF9(Δ /AdpS) que dans les lignées établies par transfection de vecteurs dérivés de pAneo ne peut être expliquée que par une activation transcriptionnelle du promoteur A₃ par un ou des éléments du pBRJneo Δ nsh.

Par ailleurs, nous pouvons noter que pBRJneo est présent dans un nombre de copies plus faible éventuellement unique comme cela a été suggéré par **Rolling (1992)**. Cette propriété d'intégration spécifique à pBRJneo peut être due aux fonctions non structurales qui joueraient un rôle négatif sur l'intégration non spécifique du plasmide. pBRJneo conduit à l'intégration d'au moins 10 fois plus de plasmides que celle obtenue par co-transfection avec pAneo. Or pBRJneo a conduit à l'établissement d'une lignée cellulaire ayant une transcription d'environ deux fois supérieure à celle établie par pAneo (Fig 3B comparer colonnes 3 et 4). Il semble donc que pBRJneo entraîne la co-sélection d'au moins 20 fois plus de pAdpS que pAneo et/ou qu'un ou des éléments de pBRJneo active (d'un facteur égal ou supérieur à 20) la transcription du promoteur A₃. D'autre part, ce rapport minimal de 10 entre le nombre de copies de pBRJneo et pBRJneo Δ nsh est en accord avec le rapport de l'ordre de 50 observé pour la transcription. La différence

observée dans la transcription de pAdpS co-transfecté avec pBRJneo et pBRJneo Δ nsh serait donc due au nombre de copies intégrées .

L'analyse des plasmides co-transfectés montre un arrangement en tandem direct de ces plasmides. Comme les vecteurs ne sont pas autoréplicatifs, un profil de restriction correspondant au plasmide linéarisé ne peut être du qu'à une structure polymérique du plasmide. Autrement dit, chacun des plasmides transfectés présente des répétitions en tandem direct (plasmides linéaires alignés dans la même direction) comme cela est souvent le cas (**Bishop et Smith, 1989**). Cette expérience n'a pas permis de détecter de jonction entre les deux plasmides co-transfectés (une bande de taille différente de chacun des plasmides étant reconnu par les deux sondes utilisées), même dans les cultures monoclonales. Par ailleurs, le nombre de copies intégrées est proportionnel à la quantité d'ADN utilisée durant l'établissement des lignées ce qui montre que les phénomènes d'intégration ne sont pas saturés. L'analyse du devenir du nombre de copies de chacune des séquences transfectées dans les clones cellulaires nous donne des résultats variables. Une certaine proportion de clones dérivant de lignées établies par co-transfection avec pBRJneo Δ nsh conserve un nombre de copies intégrées important. La faible proportion de clones de la lignée SF9(Aneo+AdpS) conservant le nombre de copies observé dans la culture polyclonale peut être due à une faible stabilité des plasmides co-intégrés au cours du clonage cellulaire.

L'efficacité plus importante de l'expression du gène rapporteur lorsque pBRJneo Δ nsh est utilisé nous a conduit à mettre en évidence une activation en *cis* dans des expériences d'expression transitoire. Cette activation est en relation avec l'activité du promoteur du gène A3. Notons qu'une telle séquence activatrice n'a jamais été rapportée chez les *Parvoviridae* (**Marriott et Brady, 1989**). La séquence virale responsable ne peut être située que sur l'ITR gauche de pBRJneo Δ nsh. L'activation en *cis* du promoteur A3 à la suite d'une co-transfection sous-entend un phénomène de co-intégration du promoteur A3 à proximité de la séquence de pBRJneo Δ nsh responsable de l'activation.

La technique de la PCR nous a permis de visualiser des jonctions. Les résultats sont confortés par une série de témoins éliminant les différents artefacts d'amplification envisageables. L'absence d'amplification dans les expériences de simulation de la présence simultanée des plasmides a montré que les produits d'amplification observés dans les lignées co-transfectées étaient bien spécifiques de la co-intégration des vecteurs. La co-intégration de séquences hétérologues à proximité a déjà été rapportée, elle peut avoir lieu notamment par un mécanisme de recombinaison illégitime faisant appel à de courtes séquences présentant de faibles homologies (**Anderson et coll., 1984**).

Des résultats complémentaires nous ont permis de mettre en évidence l'activation en *trans* du promoteur cellulaire A3 par la protéine de baculovirus IE1. Une activation de ce type a été rapportée pour des gènes viraux homologues de baculovirus (**Guarino et**

Summers, 1986a) et hétérologues de rétrovirus aviaire (**Guarino et Summers, 1986b**).

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de mettre en évidence (1) les propriétés d'intégration et de co-intégration de vecteurs d'expression dans des cellules SF9 comme cela avait été rapporté pour des séquences virales dans les cellules SF21 similaires (**Jarvis et coll., 1990**) (2) un activateur transcriptionnel sur le génome de *JcDENV* dont la présence est nouvelle pour les *Parvoviridae*. (3) l'activité activatrice de la protéine IE1 de baculovirus sur un promoteur cellulaire.

REFERENCES

- Anderson, R. A., S. K. Kato, and R. D. Camierini-Otero.** 1984. A pattern of partially homologous recombination in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:206-210.
- Bishop, J. O., and P. Smith.** 1989. Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. *Mol. Biol. Med.* **6**:283-298.
- Challberg, M. D., and T. J. Kelly.** 1989. Animal virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:671-714.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
- Dumas, B., M. Jourdan, A. M. Pascaud, and M. Bergoin.** 1992. Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia coenia* densovirus reveals an organisation unique among *Parvoviridae*. *Virology* **191**:202-222.
- Gilman, N.** 1993. p 401- 478 in F.M. Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1. John Wiley and Sons, New-York.
- Giraud, C., G. Devauchelle, and M. Bergoin.** 1992. The densovirus of *Junonia coenia* (*JcDNV*) as a insect cell expression vector. *Virology* **186**:207-218.
- Guarino, L. A., and D. M. Summers.** 1986a. Functionnal mapping of transactivating gene required for expression of baculovirus delayed-early gene. *J. Virol.* **57**:563-571.
- Guarino, L. A., and D. M. Summers.** 1986b. Interspeded homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed early gene expression. *J. Virol.* **60**:215-223.
- Guarino, L. A., and M. D. Summers.** 1987. Nucleotide sequence and temporal expression of a baculovirus regulatory gene. *J. Virol.* **61**:2091-2099.
- Hirt, B.** 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**:365-369.
- Jarvis, D. L., J-A. G. W. Fleming, and M. D. Summers.** 1990. Use of early baculovirus promoters for continous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Biotechnology* **8**:950-954.
- Jarvis, D. L.** 1993. Effects of baculovirus infection on IE1-mediated foreign gene expression in stably transformed insect cells. *J. Virol.* **87**:2583-2591.
- Marriott, S. J., and J. N. Brady.** 1989. Enhancer function en viral and cellular gene regulation. *Biochi. Biophys. Acta* **989**:97-110.

- Mounier, N., and J. C. Prudhomme.** 1991. Differential expression of muscle and cytoplasmic actin genes during development of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **21**:523-533.
- Mounier, N., and J. C. Prudhomme.** 1989. Isolation of actin genes in *Bombyx mori*: the coding sequence of a cytoplasmic actine gene expressed in the silk gland is interrupted by a single intron in a unusual position. *Biochimie* **68**:1053-1061.
- Ohresser, M., N. Morin, M. Cerutti, and C. Delsert.** 1994. Temporal regulation of a complex and unconventional promoter by viral products. *J. Virol.* in press.
- Persillon, C.** 1993. Doctor-Ingeneer Thesis of INSA of Toulouse.
- Perucho, M., D. Hanahan, and M. Wigler.** 1980. Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. *Cell* **22**:309-317.
- Rolling, F.,** 1992. Doctorat thesis of University of Aix-Marseille II.
- Selden, R. F.** 1993. p291-2910 in F.M. Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1. John Wiley and Sons, New-York.
- Southern, P. J., and P. Berg.** 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotique resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**:327-341.
- Yanisch-Perron, C., J., Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M 13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M 13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103- 119.

LEGENDES DES FIGURES

Fig. 1. Les différentes constructions permettant l'expression du gène *neo^r* et/ou de la région 5' du gène *dnapol*.

Panneau A. Les principales caractéristiques des vecteurs d'expression stable construits par **Rolling (1992)** à partir du génome de *JcDENV* sont montrées. Les boîtes grisées représentent une partie (boîtes rectangulaires) ou la totalité (boîtes en forme de flèche) des extrémités terminales inversées gauche (ITR Left) ou droite (ITR Right) de *JcDENV*. L'ITR gauche est complétée d'une séquence en amont présentant une structure en épingle à cheveux (triangle noir). Panneau B. La construction pBSK₂⁺A₃LacZ préalablement établie par **Mounier** (résultats non publiés) et celles qui en dérivent sont schématisées. Dessous les constructions, l'ARNm correspondant est indiqué, il faut noter que l'extrémité 5' n'a pas été localisée. La flèche sinusoidale représente la région 5' du gène *dnapol* d'AcNPV avec son orientation vis à vis du promoteur du gène A₃. Les lignes épaisses représentent l'ADN dérivé de *JcDENV* (panneau A) ou de A₃ (Panneau B). Les boîtes en forme de flèche représentent les séquences codantes du gène *neo^r* (boîte hachurée), des gènes de *JcDENV* (boîtes vides) et du gène *lac-Z* (boîtes en damier). La boîte interrompue par une ligne brisée représente une séquence codante inactivée par une insertion. Les interruptions de séquence sont représentées par deux traits parallèles. Les petites flèches noires portant les mentions oligoD1 et oligoD2 symbolisent la localisation et l'orientation des amorces oligonucléotidiques D1 et D2. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sac*I; PolyA pour terminateur transcriptionnel; une série de A pour la queue de polyadénylation d'un ARNm. Les nombres sur des parenthèses horizontales indiquent la distance en paires de bases. Les autres nombres sont en coordonnées avec L'ATG du premier exon de A₃.

Fig. 2. expression stable de la β-galactosidase.

Des cellules d'un clone cellulaire obtenues après transfection du vecteur d'expression pΔ/AZ ont été colorées au X-gal *in situ*. L'activité β-galactosidase est révélée par la couleur bleue. Toutes les cellules sont colorées en bleue plus ou moins intensément.

Fig. 3. Efficacité accrue de la transcription dans les lignées cellulaires établies avec pBRJneo Δ nsh ou un plasmide dérivé.

10 μ g d'ARN extraits des différentes lignées (colonnes 1, 2, 3 et 4 correspondant au nom de la lignée indiquée au dessus) ont été analysés en protection aux RNases d'une sonde de 258 nucléotides (non digérée colonne P) spécifique de l'unité de transcription AdpS. Deux contrôles négatif et positif consistant respectivement en de l'ARN de SF9 (colonne T⁻) et en de l'ARN de SF9 additionné d'ARN transcrits *in vitro* complémentaires sur 211 nucléotides à la sonde (colonne T⁺) ont été utilisés. Les ARN issus de l'unité de transcription AdpS protègent un fragment de 189 nucléotides (colonnes 1, 2, 3 et 4) correspondant à la protection maximale de la sonde par la région 5' de *dnapol*. La taille approximative des fragments protégés a été déterminée comparativement à une séquence d'ADN et est mentionnée avec celle de la sonde en nucléotides par des flèches au bord du cadre. L'autoradiographie a été exposée 1 h (Panneau A) ou 60 h (Panneau B).

Les ARN transcrits dans les lignées SF9(Δ /AdpS) et SF9(Δ +AdpS) sont légèrement plus abondants que ceux transcrits dans respectivement les lignées SF9(J+AdpS) et SF9(Aneo+AdpS). Mais la transcription de SF9(Δ /AdpS) et SF9(Δ +AdpS) est d'environ 50 fois plus importante que celle de SF9(J+AdpS) et SF9(Aneo+AdpS).

Fig. 4. Intégration et nombre de copies de vecteurs d'expression intégrés dans l'ADN cellulaire.

10 μ g d'ADN totaux de SF9 (colonne T⁻) ou des différentes lignées cellulaires (colonnes 1, 2, 3, 4, 5 et 6 correspondant aux lignées dont le nom est indiqué au dessus) ont été soumis à une hybridation avec une sonde spécifique du gène *neo^r* après transfert par "Southern blot". L'ADN total a été analysé natif (panneau B) ou digéré par *Pst*I (panneau A). Les témoins positifs correspondent aux dépôts de 1 (T⁻) ou 10 μ g (T⁺) de plasmide p Δ /AdpS purifiés de bactéries. La localisation et la taille des fragments du marqueur de masse moléculaire utilisé sont reportées par des flèches et des nombres en kilo paires de bases contre le bord droit du cadre. Les localisations et les tailles des fragments de restriction générés par la digestion *Pst*I des ADN transfectés sont mentionnées de la même façon sur le bord gauche du panneau A.

Les ADN porteurs du gène *neo^r* provenant des lignées co-migrent avec l'ADN de haut poids moléculaire. L'abondance de leur intégration est indépendante s'il s'agit d'un vecteur de type pAneo plutôt que de type pBRJneo Δ nsh. Par contre, le nombre de copies

intégrées varie pour un même type de vecteur s'il s'agit d'une co-transfection plutôt qu'une transfection.

Fig. 5. La transcription du promoteur A₃ est activée en *cis* et en *trans* par une séquence du densovirus JcDENV et la protéine IE1 du baculovirus AcNPV.

10 µg d'ARN totaux de cellules SF9 ont été extraits après expression transitoire des unités de transcription AdpS (Panneau A) ou Aie1S (Panneau B) et analysés en protection aux RNases avec des sondes spécifiques mesurant respectivement 258 et 305 nucléotides. P indique le dépôt ou la hauteur de migration de la sonde non digérée. Les tailles approximatives des fragments protégés estimées sur une séquence d'ADN ont été reportées sur le bord droit de chacun des panneaux. Panneau A. La taille estimée de 189 nucléotides des fragments protégés correspond à la protection maximale de la sonde. Les signaux sont spécifiques puisque rien n'a été détecté avec de l'ARN provenant de cellules de SF9 transfectées avec du pBKS (colonne T⁻). Des quantités équimolaires de l'unité de transcription AdpS ont été transfectées sous la forme d'un plasmide pAdpS (Fig 5A colonne 2), sous la forme d'un plasmide complexe pΔ/AdpS (Fig 5A colonne 1) ou bien co-transfectée avec un nombre équivalent de pBRJneoΔnsh (Fig 5A colonne 3). La quantité d'ARN mesurée est plus importante si JneoΔnsh est présent en *cis* sur le même plasmide que AdpS alors que sa présence en *trans* lors d'expériences de co-transfection, n'a pas d'effet. Panneau B. La taille estimée à 225 nucléotides des fragments protégés lorsque les cellules sont transfectées (Fig 5B colonne 2) ou co-transfectées (Fig 5B colonne 3) avec 1 µg de pAie1S correspond à la protection maximale de la sonde. La taille estimée à 203 nucléotides des fragments protégés lorsque les cellules sont transfectées (Fig 5B colonne 1) ou co-transfectées (Fig 5B colonne 3) avec 1 µg de pUie1 correspond à une initiation du gène *ie1* à la coordonnée -50. Ces signaux sont mentionnés respectivement "5' région" et "*ie1* initiation" sur le bord gauche du panneau B. La quantité d'ARN mesurée est plus importante d'un facteur 10 si pUie1 est co-transfecté avec pAie1S (comparer colonnes 2 et 3). IE1 est donc capable d'activer la transcription du promoteur A₃ en *trans*.

Fig. 6. Les ARNm majoritaires de l'unité de transcription AdpS mesurent 1,4 kilo bases.

20 µg d'ARN totaux des lignées SF9(Δ/AdpS) et SF9(Δ+AdpS) ainsi que de la lignée SF9, comme cela est mentionné en haut de chaque colonne de migration, ont été analysés par "Northern blot" avec une sonde spécifique de la région 5' de *dnapol*. Des

ARN de tailles standard ont comigrés avec les échantillons et ont été visualisés par coloration au bromure d'éthidium, leurs niveaux de migration et leurs tailles sont mentionnés par les flèches et les valeurs en kilo bases situées sur le bord droit du cadre. Alors qu'aucun signal n'a été détecté avec les ARN de cellules SF9, la majorité des transcrits présents dans chacune des deux lignées analysées a une taille estimée à 1,4 kilo bases.

Fig. 7. Les plasmides des couples (pBRJneo Δ nsh; pAdpS) et (pBRJneo; pAdpS) sont présents à proximité dans l'ADN des lignées établies par leur co-transfection.

Les ADN des lignées SF9, SF9(Δ +AdpS) et SF9(J+AdpS) ont été utilisés, comme il est mentionné sur le haut du cadre, pour effectuer une réaction de PCR avec une température d'hybridation de 65 °C. Le couple d'amorces (D1; D2), localisées comme indiqué Fig 1 permet d'amplifier les jonctions des plasmides pBRJneo Δ nsh ou pBRJneo avec pAdpS. La totalité des réactions a été soumise à électrophorèse, colorée au bromure d'éthidium et photographiée en trans-illumination aux UV. Les tailles des bandes du standard utilisé (colonne WM) sont mentionnées en kilo paires de bases sur le bord droit du cadre. Alors qu'aucun signal n'est visible avec l'ADN provenant des cellules SF9, plusieurs bandes sont détectées pour les deux couples de plasmides.

TABLE 1 Fréquence de transformation des cellules SF9 par différents plasmides

Nom du plasmide transfecté	fréquence d'apparition des clones résistants au G418 ^a
pBRJneoΔnsh	10 ⁻³
pBRJneo	10 ⁻⁴
pAneo	10 ⁻³
pBKS2 ⁻ neo	<10 ⁻⁶

^a Ordre de grandeur du nombre de foyers cellulaires observés divisés par le nombre de cellules transfectées par 10 µg de plasmide

TABLE 2 Quantification du nombre de copies intégrées pour chacun des gènes
co-transfectés

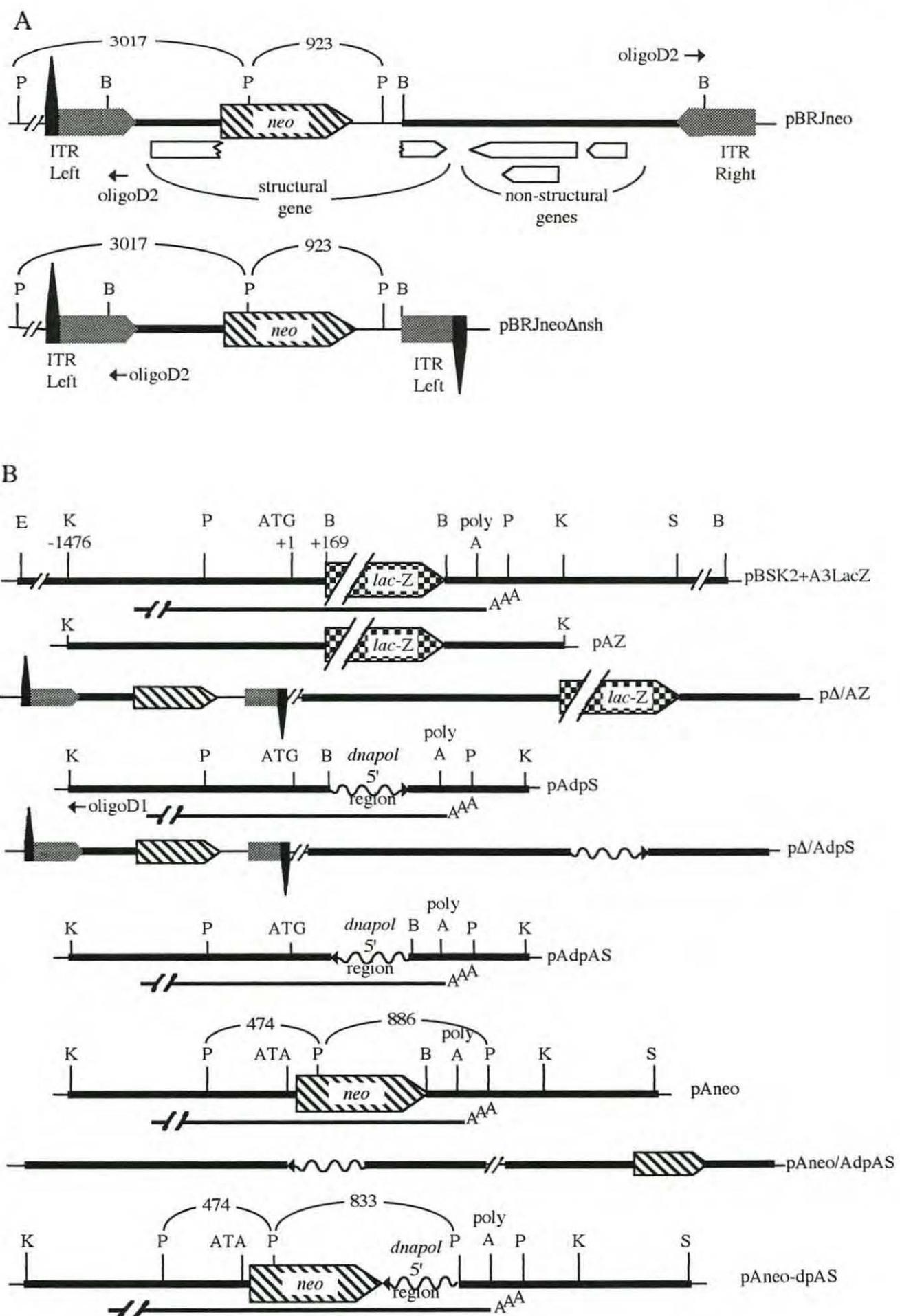
Plasmides ayant servis à la transfection	cultures polyclonales		cultures monoclonales	
	<i>neo^r a,b</i>	<i>dp^{a, c}</i>	<i>neo^r a,b</i>	<i>dp^{a, c}</i>
pΔ/AdpS	700	700	700	700
pBRJneoΔnsh+pAdpS	200	1500	1500	1500
			<75	<75
pBRJneoΔnsh+pAdpAS	75	1000	<75	<75
			75	1000
			75	1000
			75	1000
			<75	100
			<75	800
			<75	800
pBRJneo+pAdpS	<75	<75	<75	75
			<75	75
			<75	75
pAneo+pAdpS	200	1000	75	100
			75	75
			75	75
			<75	<75
			<75	<75
pAneo-dpAS	1200	1200	<75	<75
			<75	<75
pAneo/AdpAS	1500	1500		

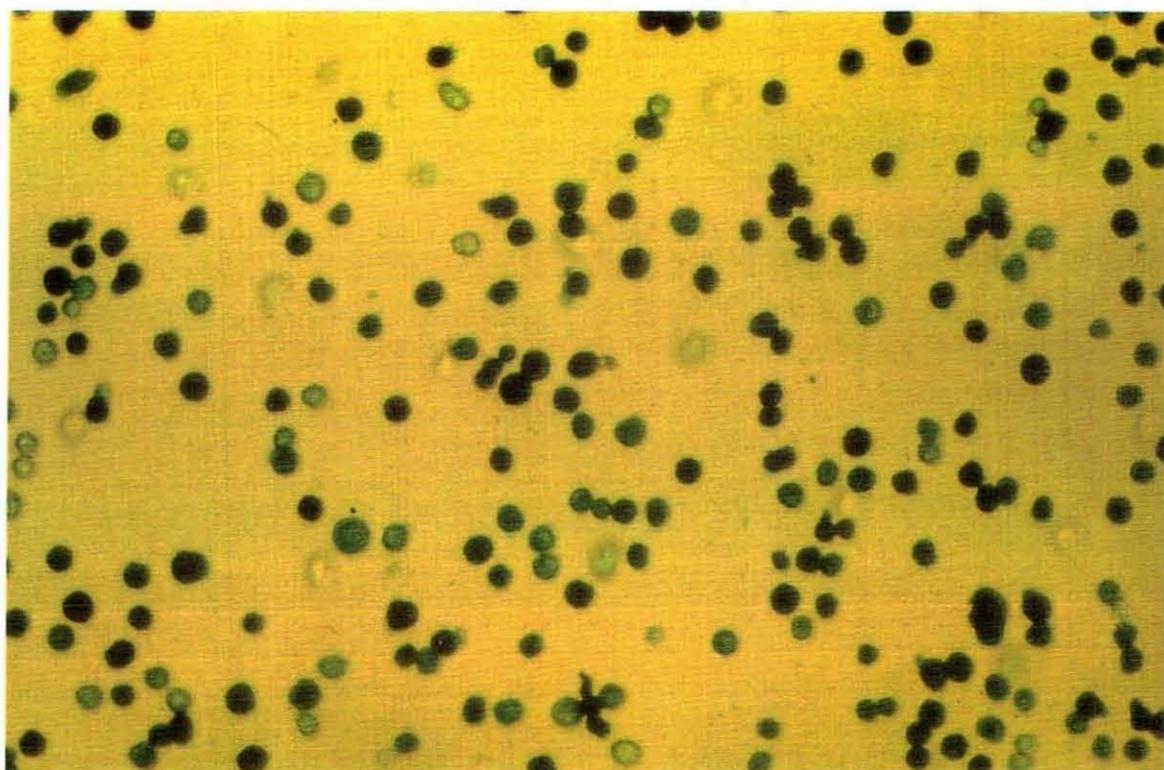
^a nombre de copies estimé en "Southern blot" (voir texte) comparé au dépôt d'un nombre déterminé de plasmides (voire texte). La membrane de transfert a été hybridée

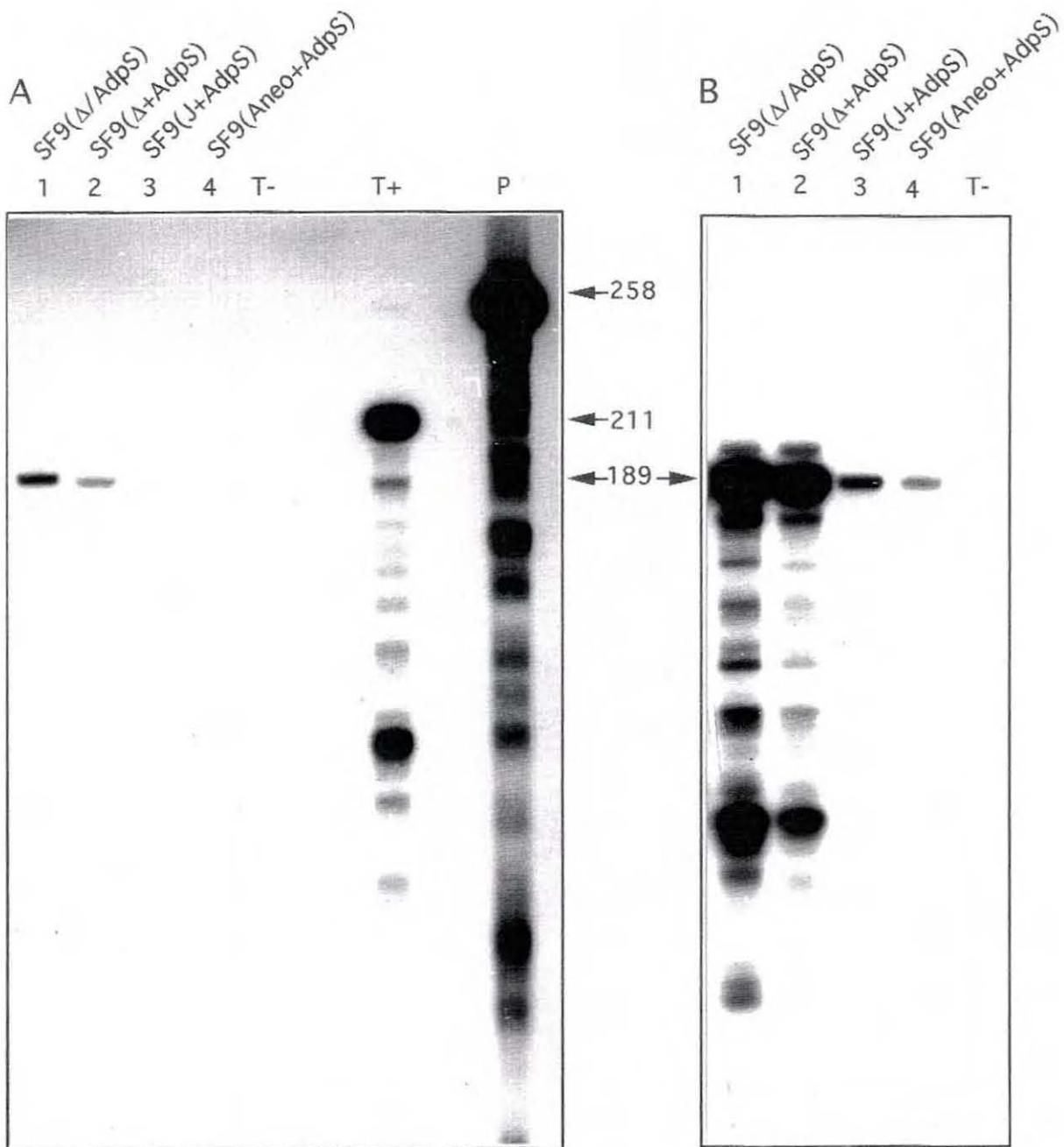
consécutivement avec une sonde ADN spécifique de *neo^r b* ou de la région 5' de *dnapol*

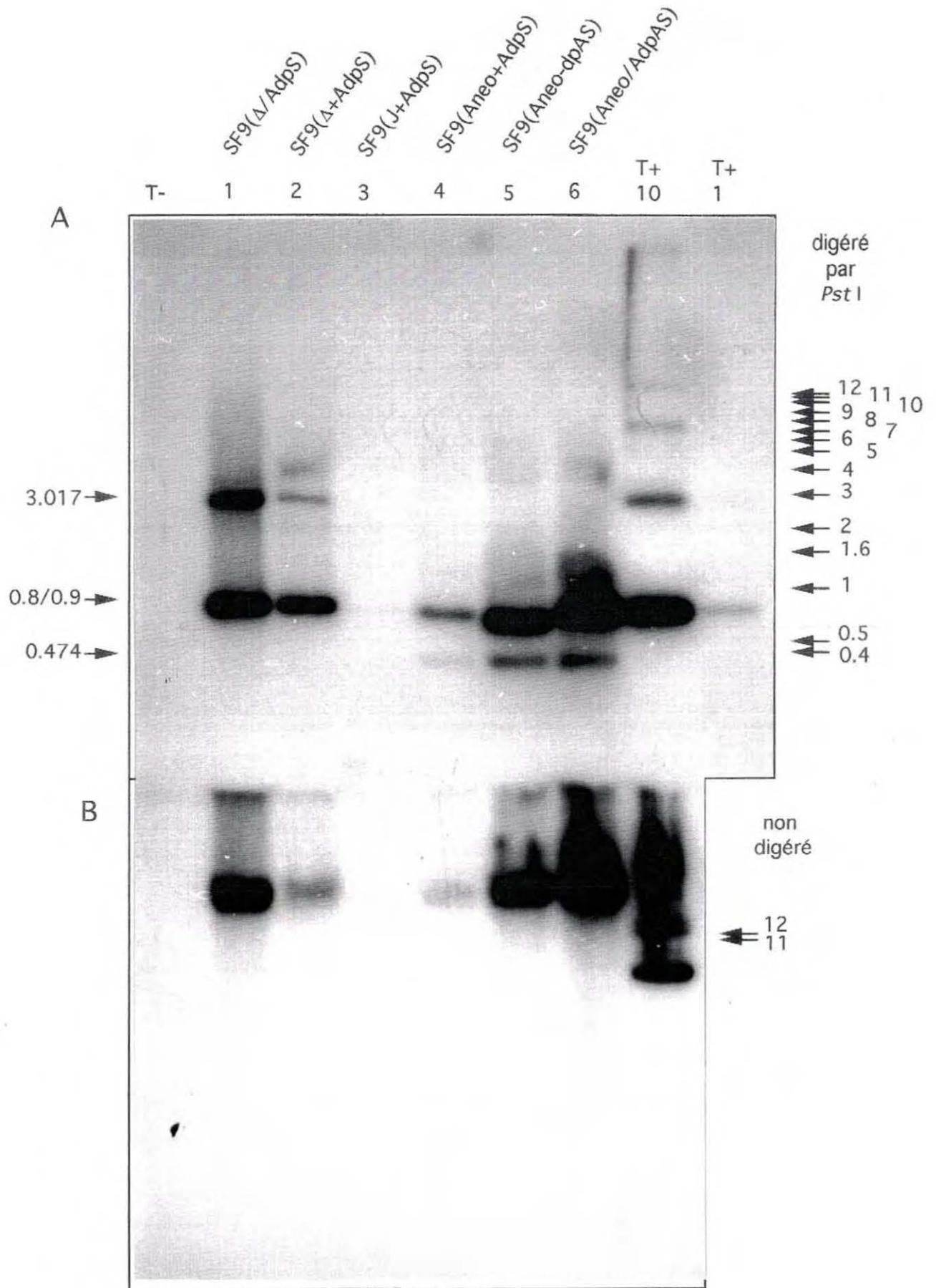
^c exprimée par AdpS et AdpAS

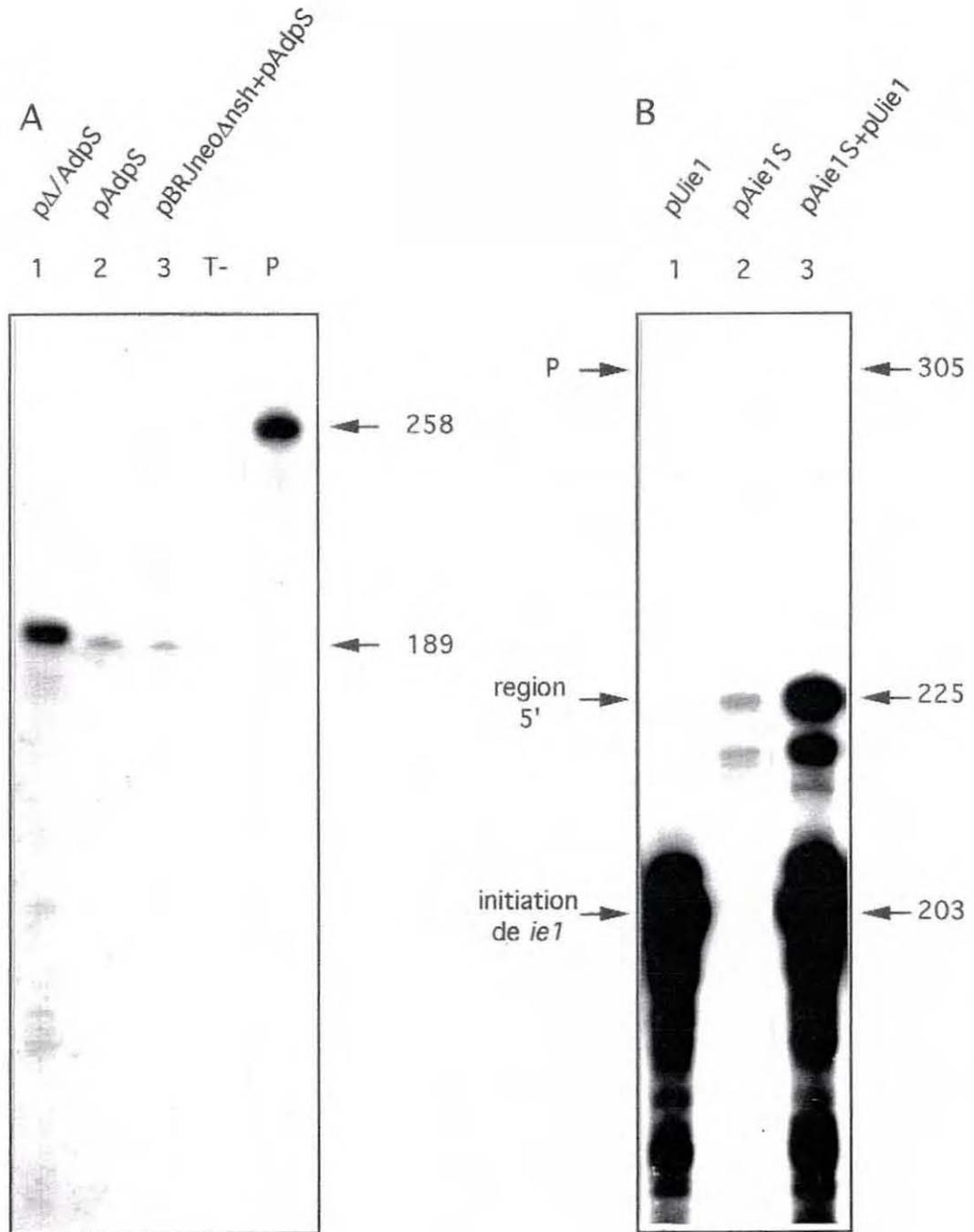
Fig. 1

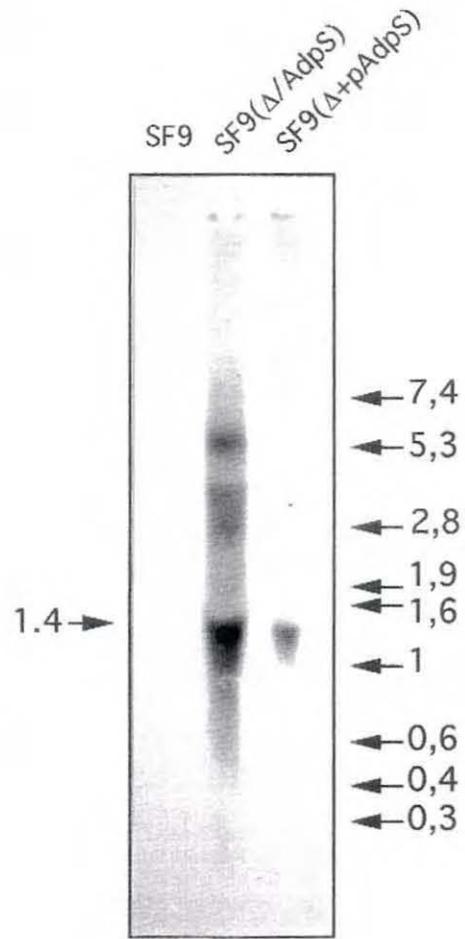


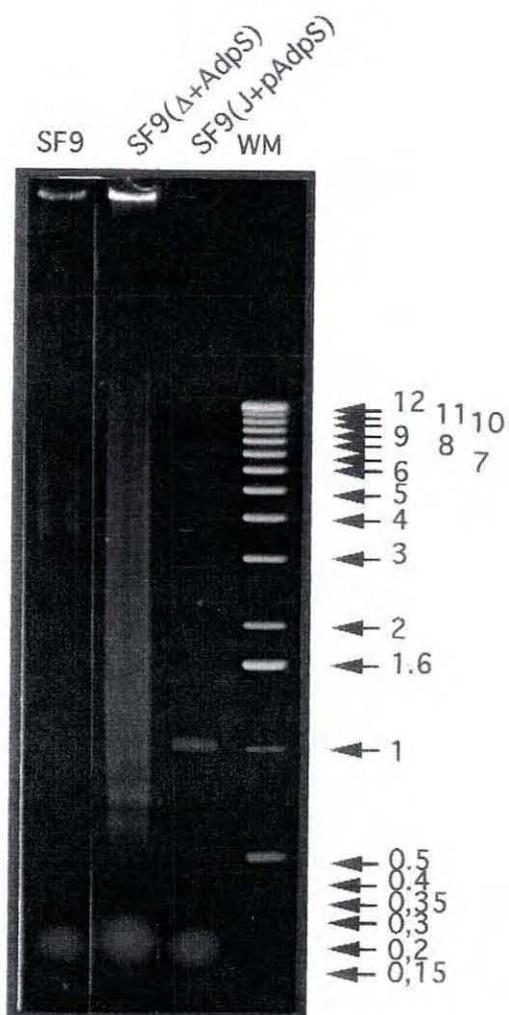












Des cellules SF9 exprimant de façon stable un marqueur de sélection ont été obtenues aussi bien avec des vecteurs d'expression dérivant d'un gène cellulaire qu'avec ceux dérivant de virus. La non spécificité du mécanisme de maintien des plasmides dans les cellules a ainsi été démontrée. La transfection par de tels vecteurs a permis également l'expression stable de la β -galactosidase. Des études plus approfondies sur l'expression stable d'ARN nous ont amené à caractériser l'intégration et la transcription des vecteurs d'expression. Les plasmides transfectés ou co-transfectés s'intègrent en un nombre élevé de copies selon un mode de répétition en tandem direct. La présence d'une séquence responsable de l'activation en *cis* du promoteur de l'actine cytoplasmique de *Bombyx mori* a été mis en évidence sur le génome du densovirus JcDENV. Cette séquence de type "enhancer" nous a permis d'améliorer les performances de nos vecteurs d'expression.

1.2) Expression transitoire des gènes cible

et des ARN anti-sens

Les ARN anti-sens ont la faculté de s'hybrider et d'inhiber l'expression des gènes cible. Leur efficacité nécessite généralement un excès d'ARN anti-sens par rapport au nombre d'ARN cible. Dans le cadre de notre étude, les ARN doivent être exprimés dans la cellule afin de se placer dans des conditions similaires à celles d'un animal transgénique. Dans une première approche, nous avons exprimé de façon transitoire les gènes cible et les ARN anti-sens. Les gènes cible sont l'activateur transcriptionnel viral *ie1* (Guarino et Summers, 1987), le gène *ie0* (Chisolm et Henner, 1988) qui lui est apparenté et le gène *dnapol* de l'ADN polymérase virale (Tolmaski et coll., 1988). La séquence de ces gènes à exprimer en ARN anti-sens a été choisie dans une région du gène souvent utilisée pour les ARN anti-sens. Ces fragments sont d'une taille de l'ordre de 200 paires de bases, chevauchent le codon d'initiation et débutent entre le site d'initiation de la transcription et la "TATA box". Ces régions 5' sont donc incapable d'initier la transcription.

1.2.1) expression transitoire des ARN anti-sens

Les régions 5' de *ie1* (-72; +153) et *dnapol* (-132; +56) ont été amplifiées par PCR sur l'ADN d'AcNPV comme cela a été décrit pour *ie1* (publication 1) et *dnapol* (publication 2). La région 5' de *ie0* (-76; +114) a été amplifiée par PCR. L'étendue de ces régions est définie entre parenthèses en coordonnée au codon d'initiation du gène concerné. La région 5' de *ie0* et *ie1* finit et débute respectivement au niveau d'un site donneur et accepteur d'épissage. Le plasmide pAZ exprime le gène *lac-Z* en expression stable ou en expression transitoire (publication 1). Les régions 5' préalablement amplifiées par PCR ont été insérées à la place de *lac-Z* par ligation entre des extrémités franches comme cela a été décrit pour la région 5' des gènes *ie1* et *dnapol* (publication 1). L'insertion des régions cible de *ie0*, *ie1* et *dnapol* à la place de *lac-Z* a donné les plasmides pAie0S, pAie1S, et pAdpS d'une part et pAie0AS, pAie1AS, et pAdpAS d'autre part suivant qu'elle a été effectuée respectivement dans la même orientation (S comme sens) ou dans l'orientation inverse (AS comme anti-sens) de la transcription du gène A3.

Les cellules SF9 ont été transfectées par les différentes constructions capable de transcrire la région 5' de *ie1* en orientation sens puis les ARN sens exprimés de façon transitoire de cette région ont été détecté par protection aux RNases d'une sonde spécifique de 305 nucléotides. La construction pUie1 a parfois été co-transfectée, ce plasmide permet l'expression transitoire de la protéine IE1 (publication 2). Lorsque 1 µg de pUie1 a été utilisé, une quantité massive d'ARN est détectée (Fig 1 colonne 2)

d'une taille approximative de 200 nucléotides correspondant aux ARN initiés au site précoce du gène *ie1* (Guarino et Summers, 1987). Dans les mêmes conditions la transcription de pAie1S n'est pas détectable (Fig 1 colonne 2). Par contre, si les plasmides sont co-transfectés, un signal apparaît d'une taille approximative de 230 nucléotides correspondant à une protection maximale de la sonde (225 nucléotides). Un signal d'une intensité similaire apparaît si 1 µg de pUie1 est co-transfecté avec 9 µg de pAie1AS. L'ensemble des signaux détectés est spécifique des ADN ayant servi à la transfection car aucun signal n'est visible si les cellules ont été transfectées par pBKS (Fig 1 colonne 1). Le même phénomène d'augmentation des ARN transcrits à partir du promoteur de A3 par *ie1* a été visualisé par expression transitoire de pAie0S et protection aux RNases d'une ribosonde de 256 nucléotides spécifique des transcrits sens de *ie0* (Fig 2). Alors que les ARN ne sont pas détectables dans les conditions utilisées sans *ie1* (Fig 2 colonne 1), un signal apparaît et croît en co-transfectant pAie0S avec des quantités croissantes de pUie1 (Fig 1 colonnes 2, 3 et 4).

L'interprétation de ces résultats met en évidence une activation des transcrits accumulés à partir du promoteur du gène A3 en présence de *ie1*. Cette activation a été décrite et discutée plus haut (**publication 1**). D'autre part, des ARN transcrits dans l'orientation inverse à la transcription du gène A3 ont été détectés. Leur intensité après expression transitoire de 9 µg d'ADN est similaire à l'intensité visualisée après expression transitoire de 1 µg d'ADN suivant l'orientation inverse. Les ARN anti-sens inverses sont donc de l'ordre de 10 fois moins abondant que les ARN transcrit dans l'orientation normale. Ces ARN sont initiés dans l'orientation inverse soit en amont soit en aval du gène de A3. La présence de cette transcription compromet l'efficacité de la régulation par ARN anti-sens artificiels car l'excès d'ARN anti-sens ne pourra jamais dépasser la valeur de 10. Ces conclusions nous montrent l'intérêt d'utiliser un terminateur de transcription bi-directionnel tel que celui du virus SV40.

1.2.2) expression transitoire des gènes viraux

Lorsque des cellules sont transfectées par *ie1*, les transcrits de ce gène sont initiés à son site d'initiation précoce (Fig 1 colonne 2). Le fragment d'ADN portant le promoteur du gène *ie0* d'AcMNPV s'étendant du nucléotide -238 au nucléotide +114 a été amplifié par PCR puis inséré en amont du signal de polyadénylation de A3 donnant pPie0. Ce plasmide a été utilisé pour transfecter des cellules, son expression transitoire a été analysée en protection aux RNases en utilisant une riboprobe spécifique de 256 nucléotides. Le fragment protégé d'environ 190 nucléotides correspond à une protection totale de la sonde (Fig 2 colonne 5). Le taux de transcription de pPie0 réduit de façon

importante si pUie1 est co-transfecté (Fig 2 colonne 6, 7 et 8). *ie1* est un gène précoce (Guarino et Summers, 1986b) comme *ie0* (Kovacs et coll., 1991b) leur transcription est effective dans des cellules sans d'autre produit viral. La co-transfection de cellules avec pPie0 et pUie1 conduit à l'inhibition du taux de transcription de pPie0 comme décrit précédemment (Kovacs et coll., 1991b). L'analyse de l'expression transitoire de *dnapol* et son activation en *trans* par IE1 a été abordée plus loin (publication 2).

Les transcrits accumulés après expression transitoire de 1 µg de pUie1 sont de l'ordre de 20 fois plus nombreux que ceux accumulés par 1 µg de pAie1S (Fig 1 colonnes 2 et 3). Cette différence s'amoinde à 5 fois si une quantité équivalente de pUie1 est co-transfecté (Fig 1 colonne 4). Si pPie0 est transfecté dans des cellules, à quantité d'ADN transfecté égale, le taux de transcription est 10 fois plus important que celui observé après transfection avec pAie0S. Les taux de transcription ont tendance à s'équilibrer en présence de *ie1* (Fig 2 colonnes 2 et 6). Dans le cas de co-transfection avec le plasmide pdp1 portant le promoteur du gène *dnapol* en amont du terminateur de transcription de A3 (publication 2), et une quantité égale de pUie1, le niveau de transcrits détecté est équivalent à ce qui est observé avec un nombre de plasmide pAdpS et pUie1 similaire (résultats non montrés).

Les gènes cible retenus sont tous des gènes précoces. *ie1* est transfecté sous la forme du gène entier, la protéine IE1 est capable de s'autoactiver (Kovacs et coll., 1991b). *dnapol* est aussi activé par *ie1* (publication 1). Nous avons confirmé l'inhibition de la transcription de *ie0* par IE1 comme cela a été montré auparavant (Kovacs et coll., 1991b). L'activité relative des promoteurs viraux a été déterminée vis à vis du promoteur cellulaire A3 dirigeant la synthèse des ARN anti-sens. Les expériences devront être conduites en utilisant une quantité d'ADN cible transfecté minimale. Ceci afin de pouvoir transfecter les cellules avec le maximum de "gènes anti-sens". Le promoteur de *dnapol* est relativement peu actif même en présence de IE1, par contre dans les mêmes conditions il est transcrit avec un taux comparable à celui du promoteur A3. Le promoteur de *ie0* qui est plus actif arrive, en présence de IE1, à un taux de transcription comparable à celui de A3.

1.2.3) effet des ARN anti-sens sur les gènes viraux transfectés

Aucune chute du taux de transcription de *ie1* n'a été observé lorsque 1 µg de pUie1 est co-transfecté avec 1 µg de pAie1AS (Fig 1 comparez colonnes 3 et 5). Les mêmes résultats ont été obtenus en protection aux RNases d'une ribosonde de 256 nucléotides spécifique des transcrits de *ie0* après co-transfection de 5 µg de pPie0 avec 5

μg de pAie0AS, de 1 μg de pPie0 avec 9 μg de pAie0AS ou par 1 μg de pPie0 avec 9 μg de pAie0AS et 1 μg de pUie1 (résultats non montrés).

Aucune inhibition de la transcription n'a pu être détectée ce qui n'est pas surprenant si on considère la faible activité du promoteur du gène A3 par rapport à l'activité des gènes viraux cible.

1.3) lignées cellulaires exprimant les régions cible en orientation anti-sens

Des lignées ont été établies en utilisant les différents gènes cible et différents vecteurs d'expression tous basés sur le promoteur de A3 pour exprimer les ARN anti-sens. L'efficacité de ces lignées pour l'expression des ARN anti-sens et pour la réduction du taux de transcription des gènes cible n'a pas été évaluée au delà de l'établissement des lignées cellulaires et de leur clonage. En effet, les données obtenues durant les expériences d'expression transitoire concernant le promoteur du gène A3 indiquent que son usage n'est pas adapté aux ARN anti-sens. Parmi les points compromettant gravement les chances de réussite d'une inhibition de gènes par de tel ARN on peut noter (1) la présence de transcrits inverses sur toutes les constructions basées sur le promoteur A3 (2) la faible expression du promoteur A3 par rapport aux promoteurs de baculovirus.

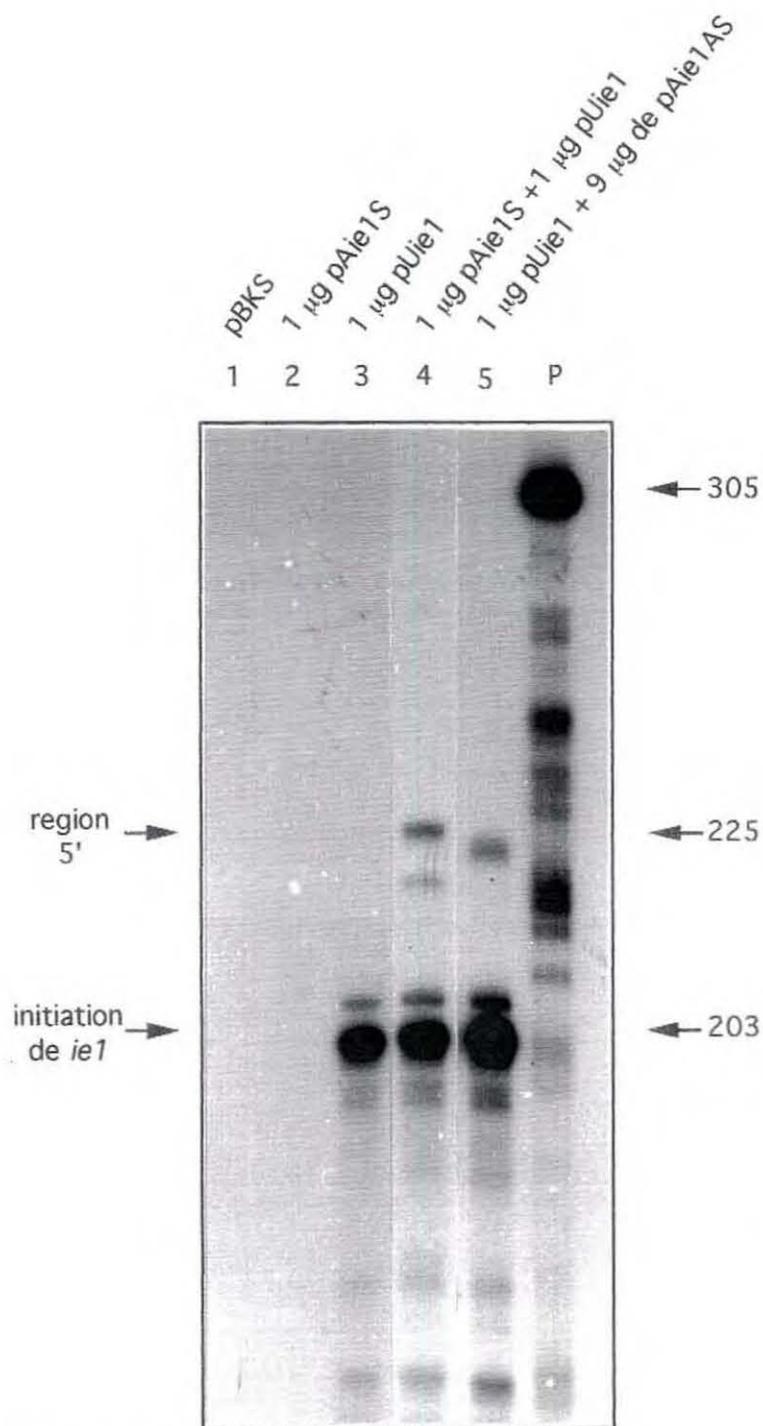


Fig. 1. Co-expression du gène *ie1* et de son ARN anti-sens

Différentes constructions capables de transcrire la région 5' du gène *ie1* en orientation sens (pAie1S, pUie1) ou anti-sens (pAie1AS) ont été transfectées dans des cellules SF9. Les ARN exprimés de façon transitoire ont été analysés par protection d'une sonde de 305 nucléotides (colonne P sonde non digérée) spécifique des transcrits sens de la région 5' de *ie1*. La taille des fragments protégés a été estimée sur une séquence d'ADN comigrant et les valeurs exactes correspondantes ont été mentionnées en nucléotides à droite du panneau. Les ARN transcrits à partir de 1 µg de pAie1S (colonne 2) ne sont détectables que si une quantité équivalente de pUie1 est co-transfectée (colonne 4). Les cellules transfectées par 9 µg de pAie1AS produisent des ARN sens de la région à exprimer et n'altèrent pas le taux de transcription de pUie1 (colonne 5).

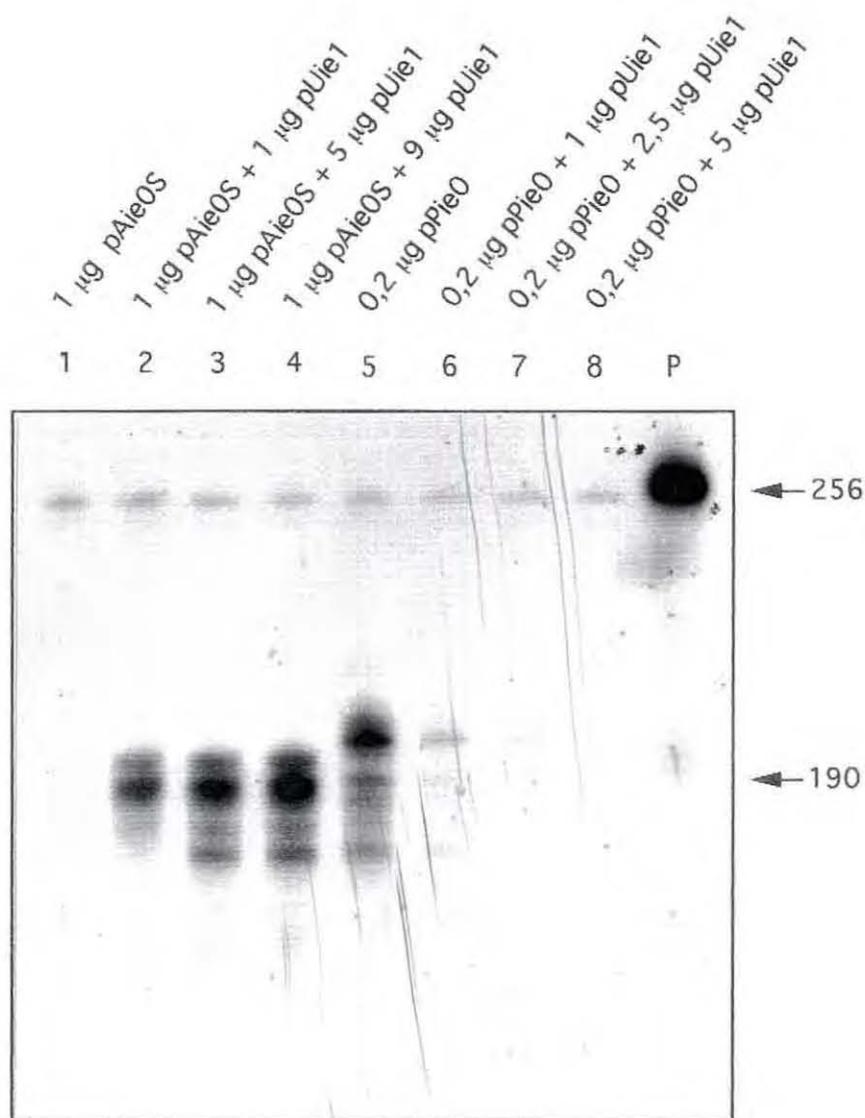


Fig. 2. Effet de *iel* sur la transcription des promoteurs des gènes *A3* et *ie0*

Des cellules ont été co-transfectées par 1 µg de pAie0 (colonne 1) et 1, 5 et 9 µg de pUie1 (colonnes 2, 3 et 4). Les ARN transcrits de façon transitoire ont été analysés par protection d'une ribosonde de 256 nucléotides (non digérée ligne P) spécifique des ARN sens. De la même façon les ARN issus de la co-transfection de 0,2 µg de pPie0 (colonne 5) avec 1, 2,5 et 5 µg de pUie1 (colonnes 6, 7 et 8). La taille des fragments protégés a été déterminée comme indiqué pour la Fig. 1 et est indiquée sur la droite du panneau. *iel* active le promoteur de *A3* et inhibe le promoteur de *ie0*.

2) REGULATION DU GENE DE L'ADN POLYMERASE D'AcMNPV

2.1) Publication 2 : Régulation temporelle d'un promoteur complexe et non conventionnel par des produits viraux

Le gène *dnapol* d'AcMNPV a été choisi en tant que gène cible dans notre approche d'inhibition de gènes viraux. L'analyse des ARN de *dnapol* durant l'infection, afin d'observer une éventuelle inhibition, nous a permis de visualiser une utilisation des sites d'initiation différente de celle décrite dans la littérature (Tolmaski et coll., 1988). D'autre part, lorsque nous avons voulu détecter l'expression stable d'ARN anti-sens dans des cellules infectées, nous en avons aussi visualisé dans le témoin négatif correspondant à des cellules SF9 non transfectées (résultats non présenté). La taille du fragment protégé au cours de l'expérience de protection aux RNases correspondait à une initiation de la transcription au niveau d'un site consensus de promoteur de gène tardif. La présence tardive d'ARN anti-sens alors que la quantité d'ARN de *dnapol* chute brusquement nous a conduit à supposer une régulation par le biais de ces ARN anti-sens naturels. Bjornson et coll. (1992) ont publié simultanément une analyse de séquence de cette région en émettant les mêmes hypothèses. Lorsque les tentatives d'inhibition de l'expression transitoire des gènes cible ont été effectuées, nous avons dû au préalable établir les modalités d'expression transitoire de *dnapol*, notamment son induction par la protéine IE1. Le gène *ie1* étant également dans le cadre de notre étude un gène cible pour les ARN anti-sens artificiels, des anticorps avaient été préparés pour détecter une éventuelle inhibition de la traduction. Ces anticorps nous ont permis de visualiser l'évolution des quantités de IE1 et IE0 au cours de l'infection. L'ensemble de ces éléments concernant la régulation de *dnapol* et l'intérêt de la présence d'ARN anti-sens naturels effectifs nous ont conduit à étudier plus en profondeur la régulation de ce gène.

Temporal Regulation of a Complex and Unconventional Promoter by Viral Products.

**Marc Ohresser,^{1,2} Nathalie Morin,³ Martine Cerutti,²
and Claude Delsert ^{1*}**

¹IFREMER and CNRS UMR 9947, Université de Montpellier 2, 34095 Montpellier Cedex 5, France; ²INRA and CNRS UA 1184, 30380 Saint-Christol Lez Alès, France and ³CNRS URA 1487, Institut de Biologie, Faculté de Médecine, 34060 Montpellier, France.

Running title: Negative Regulation of an inducible *dnapol* Promoter.

* Corresponding author. Mailing address: UMR9947, IFREMER/CNRS, Université de Montpellier 2, CP80, 2 place E. Bataillon, Montpellier, France, 34095, Cedex 5.
Phone: (33) 67 14 46 25. Fax : (33) 67 14 46 22.

Abstract

DNA polymerase (*dnapol*) gene of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) presents a complex promoter organization. It lacks usual TATA box and start-site and its RNA accumulation increases, then decreases dramatically during infection. We investigated *dnapol* temporal regulation. Transiently expressed *dnapol* gene was transcribed at low level from minor start-sites. Co-expression with *ie0* and/or *ie1* immediate early genes dramatically enhanced *dnapol* transcription, specifically from a new start-site. Moreover, the *ie1* transactivation required little or no information in front of this non conventional proximal promoter. We showed that IE0 and IE1 proteins were stably expressed during infection and that *dnapol* mRNA level decrease was not a consequence of the disappearance of these proteins. *dnapol* promoter region contains a putative overlapping ORF in opposite direction. We showed that the ORF-2 was indeed highly expressed late, when *dnapol* mRNA level decreased and that during that time *dnapol* mRNA stability was not significantly altered, excluding a destabilizing antisense effect. Additionally, we showed that *dnapol* promoter was inhibited late but not early during the infection of cells transiently expressing constructs carrying either intact or altered ORF-2 promoter. Therefore, initiation of ORF-2 initiation of transcription and the *dnapol* promoter inhibition are two coincidental non-related phenomena. Finally, we showed that both the IE1 transactivation and the late inhibition occurred in the same limited region around the *dnapol* promoter.

Introduction

DNA replication is a crucial event in DNA virus cycle, suggesting that regulation of viral *dnapol* gene expression is an essential control. During viral cycle of Baculovirus, a family of large double stranded DNA viruses infecting insects (2), a new DNA polymerase activity is detected (24) which is distinguishable from host DNA polymerases by different sensitivity to inhibitors such as aphidicolin or nucleotide analogs (22; 23; 24;34). Sequencing of a 3.6 kb pair region of the AcNPV DNA, from 39.5 to 42.5 map units, revealed the existence of an open reading frame that presents some degree of homology with other DNA polymerases from mammalian viruses (8; 19; 33) and is referred to as *dnapol*. More recently a distantly related Baculovirus, *Lymantria dispar* multi-capsid nuclear polyhedrosis virus (LdNPV) was shown to contain a related ORF, which shares 48% amino acid sequence homology with the AcNPV *dnapol*. Both sequences contain seven amino acid motifs, common to other non related DNA polymerases (1).

AcNPV *dnapol* promoter region is an unusual baculoviral promoter since it lacks a conventional TATA motif and a CAGT start-site (33). Nevertheless, it contains two sets of start-sites experimentally determined at coordinates -120 to -124 nt (defined as proximal site) and -200 to -216 nt (defined as distal site) upstream to the *dnapol* initiation codon (33). Moreover, both a distal and a proximal promoter were deduced from sequence comparison with the upstream region of the *p143* gene which encodes for a helicase related gene. One of these motifs, 5'- GCGTGCT-3', corresponding to the proximal start-site (10; 33), is preceded by a sequence, 5'-AAAATT-3', located at the same coordinates as the *p143* gene promoter (4; 20).

dnapol promoter of AcNPV is active *in vitro* in insect cell nuclear extracts, although transcription rate is higher when directed by the LdNPV *dnapol* promoter (10, 1). Kinetics of RNA accumulation during the AcNPV cycle show that *dnapol* mRNA which is detectable as early as 2 hours post-infection (p.i.), accumulates to a maximum level by 6 hours p.i. and then declines to a low level by 10 hours p.i. (33), when other early mRNAs remain at high steady state levels (5; 15; 16). It is therefore likely that both positive and negative regulatory events precisely control the *dnapol* mRNA accumulation. Analysis of the organization of the *dnapol* containing region revealed a second ORF, referred to as the ORF-2, in both the AcNPV and LdNPV genomes (1). ORF-2 is located upstream to *dnapol* and oriented in opposite direction, with both initiation codons only separated by a few nucleotides. A start-site consensus sequence for late AcNPV genes, A/GTAAG, is present in the 5' end region of both baculovirus *dnapol* minus strand, suggesting that the ORF-2 might be expressed late during infection (1).

The possibility that *dnapol* mRNA steady state level decline might result of an interference between both the *dnapol* and the putative ORF-2 transcription activities, led us to investigate the *dnapol* promoter regulation and its mRNA stability.

Materials and Methods

Cells, viruses and infection of cells

Spodoptera frugiperda Sf9 cells (ATCC CRL 1711) were grown at 28°C in TC 100 supplemented with 5% decomplexed fetal calf serum (Gibco - Bethesda Research Laboratories). Supernatant of the AcNPV clone 1.2 (a kind gift from G. Croizier) infected cells was used as viral inoculum. Cells growing as a monolayer were incubated at half confluence (10 million cells per 75 cm² flask) at 30 pfu per cell under a 3 ml volume. After 1 hour of adsorption the inoculum was replaced by fresh medium and cells further incubated at 28°C. This time was defined as the post-infection time 0 in kinetic experiments.

When required, drugs (purchased from Sigma) were added to the medium as follows. Cycloheximide was added 1 hour before infection at a final concentration of 100 µg per ml and aphidicolin was added at 5 µg per ml at the end of the virus adsorption step (33). Transcription inhibition experiments were done in presence of actinomycin D at a final concentration of 10 µg per ml (13), added at a time defined as the transcription inhibition time 0.

Primers and PCR amplification

Primers were designed to amplify a region extending from the proximal start-site to the beginning of the coding sequence of *dnapol* gene for pB5'dp plasmids or encompassing the N-terminal part of the IE1 protein for the pGEX-IE1 vector (see below). Sequences below are underlined or in lower case letter respectively when indicating introduced restriction sites or point mutations. Primers were purchased from Eurogentec (Belgium) and their coordinates mentioned between brackets are relative to the initiation codon of the considered gene :

- (A1) *dnapol* sense primer : 5'-CGCAAAGCGTGCTCATAACCGCTCC-3' (-133; -110)

- (A2) *dnapol* antisense primer : 5'-GGTTTTGCATATTCTGCAAAGCGCG-3' (+56; +32)
- (B1) IE1 protein sense primer : 5'-GGAATTCCCGCGTCGTACACCAGCGC-3' (+22; +38)
- (B2) IE1 protein antisense primer : 5'-GAAGCTTCACGTGTGGTGCACATC GACG-3' (+938; +920)
- (C1) ORF-2 promoter sense primer : 5'-AATATA TccAtGGAATGAACTCAAA ACGCGC-3' (+6; +35)
- (C2) ORF-2 promoter antisense primer : 5'-CATTccAtGGATATATTTTCATTT TTAAATATGC-3' (+22; -12)
- (D1) *dnapol* promoter sense primer : 5'-GTGTGTTTCGCGGACGGTTTC-3' (-180; -161)

Amplification reactions were done as recommended by the Taq polymerase supplier (Stratagene Cloning System, La Jolla, CA) in 100 μ l volumes. 30 cycles of amplification (1 mn at 94°C; 1 mn at 50°C; 2 mn at 72°C) were performed using a TRIO thermocycler (Biometra, Germany), after an initial heat denaturation step at 94 °C for 3 mn. An extra step of elongation at 72°C for 5 mn was then performed.

Plasmid constructs

pdnapol is a pUC 19 plasmid (35) containing the AcNPV Sac I - F restriction fragment which carries the intact *dnapol* gene (33). The AcNPV EcoRI-V restriction fragment (approximately 900 bp) containing the *dnapol* promoter region and 66 bp of its coding sequence was inserted in the EcoRI site of the pBKS2(+) plasmid (Stratagene Cloning System) to form the pBEV plasmid. A Hind III-Asp718 restriction fragment of about 550 bp (approximate size since the sequence 3' to the polyadenylation signal has not been determined yet) was then isolated from the pBKS2(+) A3 LacZ plasmid (a kind gift of N. Mounier) containing the *Bombyx mori* actin A3 polyadenylation site (26) and inserted downstream to the EcoRI-V fragment of pEBV. This construct referred to as the pBdp-1 plasmid and the following constructs are schematically represented on Fig.1. Subsequent deletions of the 5' part of the *dnapol* promoter region of pBdp1 were respectively made by the Acc I, Mlu I and Eag I restriction enzymes, down-sizing the ATG upstream sequence to approximately 700 bp (pBdp-2), 600 bp (pBdp-3) or precisely to 244 bp (pBdp-4). The pBdp5 plasmid was obtained by PCR amplification with the (D1-Reverse) primers on a pBdp1 template and subsequent insertion between the Sma I and Asp718 sites of pBKS2. The pBdp6 plasmid carrying a disrupted ORF-2

promoter was constructed as follows: PCR amplification reactions were separately done on pBdp1 plasmid with the two sets of primers (i) (Universal primer; C2) for fragment A (approximately 1 Kb) and (ii) (Reverse primer; C1) for fragment B of an approximate size of 700 bp. DNA fragment A and B were respectively digested by Sac I and Nco I and by Nco I and Asp 718 before a 3 fragment ligation in the Sac I and Asp 718 predigested pBKS2 plasmid. pBdp7 was obtained through the deletion of the Aat II - Hind III fragment on a pBdp1 template and pBdp 8 by deleting the Nco I - Hind III sequence from the pBdp 6 plasmid. In order to make templates generating riboprobes specific for the RNA expressed by the pBdp(1;6;7;8) plasmid series, a Bam HI - Asp 718 deletion was performed 5' to the actin A3 sequence of the pBdp (1;6;7;8) plasmids, preserving only 41 bp for pBdp (1 and 6) and 34 nt for pBdp (7 and 8) of the actin A3 sequence. These constructs are referred to as the pBdp Δ (1;6;7;8) plasmid series. The pUie0-ie1 plasmid contains the AcMNPV Hind III-G restriction fragment inserted in the pUC 19 vector (35). The pUie1 plasmid contains the ClaI-XbaI fragment of the pUie0-ie1 plasmid inserted in the pUC18 vector. The pB-5'dp was made of PCR fragments amplified with (A1; A2) set of primers extending between coordinates (+56; - 132) relative to the initiation codon of *dnapol*. This DNA fragment was inserted, after T4 DNA polymerase treatment in the Sma I site of pBKS2 plasmid. The pGEX-IE1 vector, made to over-express the N-terminal 305 amino acids of the IE1 protein in *E.coli*, was constructed by in-frame insertion of a 916 bp PCR amplified fragment using (B1;B2) primers and subsequent EcoRI and HindIII digestion, in the linearized pGEX-KG vector (29).

Constructs were verified by double strand DNA sequencing, according to manufacturer recommendations (USB Co.).

Transfection

Cells were transfected with plasmid DNA purified through double banding in CsCl gradient, using lipofection technique (DOTAP, Boehringer) and according to manufacturer instructions. Briefly, 25 cm² flasks were seeded with 3 million cells and rinsed with serum free medium before lipofection. 3 ml of serum free medium containing 40 μ l of DOTAP reagent mixed to 10 μ g of DNA were laid upon the cell monolayer and incubated for 4 hours. When the amount of in-put DNA was variable the total amount of DNA was kept constant in all samples, by adding pBKS2 plasmid DNA up to 10 μ g. Supernatant was then discarded and 5 ml of culture medium was added at a time defined as the post-transfection time 0. Experiments using infection of transfected cells were done as follows: 4 hours after transfection media was replaced by the AcNPV inoculum for 1 hour and then new media was added at a time defined as infection time 0.

RNA extraction and analysis

Total cellular RNA was extracted according to the guanidinium thiocyanate extraction method (6). RNAase protection analysis was essentially performed as previously described (9). The following riboprobes were *in vitro* transcribed from the pBluescribe plasmid by T3 RNA Polymerase (Stratagene Cloning System):

- A 274 nt long ORF-2 specific probe from the Bam HI linearized pB5'dp giving maximal protection to a 189 nt long fragment.
- A 371 nt long dna pol specific probe from the Eag I (-244) linearized pBEV plasmid giving maximal protection to a fragment of 321 nt (on RNA from transient expression) or of 309 nt (on RNA from infection).
- To specifically identify mRNAs transcribed from plasmid templates in transfection-infection experiments, riboprobes were made from pBdp $\Delta(1;6;7;8)$ plasmid series after linearization with Eag I (-244). Riboprobe length and their respective maximal protection are indicated between brackets as follows: pBdp $\Delta 1$ (369; 350); pBdp $\Delta 6$ (369;350); pBdp $\Delta 7$ (353; 234); pBdp $\Delta 8$ (315; 294).

Hybridization reactions were made in a total volume of 30 μ l of denaturing mix with 20 μ g of total RNA at 42°C and with 5000 cpm per μ l of 32-P radio-labelled riboprobe. RNAase digestion was performed at 30°C for 30 mn and undigested products were electrophorezed on 7 M Urea-6% Poly-acrylamide gels.

IE1 Antibodies.

The N-terminal 305 amino acids of baculovirus IE1 protein was inserted in the expression cassette of the pGEX-IE1 bacterial vector and expressed as a fusion protein with the N-terminus of the glutathione-S- transferase. Expression of the fusion protein was performed essentially as described by Smith and Johnson (1988), except that IPTG (0.2mM) was added to the *E. coli* culture once the O.D. at 600nm reached 0.4. Cells were then grown for an additional 3 hours at 30°C. The production of GST-IE1 fusion protein was visualized by Coomassie staining of the gel. Analysis of the induced cell extract showed a very intense additional band of 70 kDa, whereas none was observed when the culture was grown in the absence of IPTG. From the intensity of this band we estimated the production of the resulting fusion protein to 2 to 4 mg per 100 ml of culture. The difference between the predicted and the apparent molecular weight of the fusion protein is about 10 kDa and might be due to secondary structure. Since 95% of the recombinant product became insoluble during the extraction (data not shown), induced *E. coli* lysate prepared through denaturing conditions, was submitted to a 12 % preparative

SDS-PAGE. After Coomassie staining, the IPTG induced band was excised from the gel and electro-eluted using the Elutrap device (Schleicher and Schuell) for 6 hours (200 mA) in buffer A (25 mM Tris-HCl pH8; 192 mM glycine; 0.025%SDS). Purity of the eluted fusion protein was confirmed by Coomassie staining and the rate of recovery was estimated to 60% (data not shown). 400 μ g of this purified protein was used to raise rabbit polyclonal antibodies (Eurogentec). Specificity of the antibodies (at dilution 1/2000) was determined by Western blot analysis either on pUie1 or on pUie1-ie0 transfected Sf9 cells and on mock or baculovirus infected Sf9 cells. The Ab-Ag complex was developed by reaction of phosphatase alkaline conjugated secondary antibodies with nitroblue tetrazolium and Bromo-Chloro-Indolyl-phosphate. Controls with preimmune serum on mock or infected cells or with immune serum on mock infected cells didn't reveal any band; thus attesting of the anti-IE1 serum specificity.

Results

AcNPV *dnapol* promoter is weakly active in Sf9 cells.

Although *dnapol* mRNA is detected as early as 2 hours p.i. during the viral cycle, it peaks only at 6 hours p.i. (33) and moreover, its promoter is only weakly active in *in vitro* transcription assay (10 and see Fig.4A). Therefore it was of interest to determine whether the *dnapol* gene promoter, lacking usual RNA polymerase II regulatory elements (10), was active in transient assay in absence of any viral or viral-induced factor(s). A chimeric construct, the pBdp1 plasmid (Fig.1), carrying approximately 900 bp upstream of the *dnapol* ATG and 66 bp of its coding sequence was inserted in front of a polyadenylation signal provided by a fragment of about 550 bp of the 3' end of *Bombyx mori* actin A3 gene (26). Sf9 cells were transfected with pBdp1, according to the lipofection technique and RNA was extracted 24 hours post-transfection. RNAase protection analysis using a 371 nt long riboprobe on 20 μ g of total RNA gave a series of faint signals for pBdp1 (Fig.2 A, lane 1). These signals were visible only after a long time exposure (7 days at -70°C), ranged from approximately 290 nt to 210 nt (Fig.2 A, lane 1), whereas no signal could be detected in mock transfected cells (data not shown). Based on the approximate size determination of the protected fragments, our data (Fig.2 A, lane 1) show that the larger protected fragment corresponds to RNA initiated at the distal start-site level, previously described on AcNPV infected cell RNAs (33). Four other signals ranging in size from approximately 210 nt to 240 nt are of slightly higher intensity (Fig.2 A, lane 1). This result indicates that transcription is initiated from the *dnapol* promoter region, although at a barely detectable level, from the same minor start-

sites as during the infection (Fig. 2 A, lane 5) but does not use the proximal start-site which is the main transcription site during infection (10 and see Fig 2 A, lane 5).

In order to determine the boundaries of a functional *dnapol* promoter, 5' end truncations were made reducing the *dnapol* ATG upstream region to approximately 700 bp, 600 bp, 244 bp and 24 bp respectively for the pBdp2, pBdp3, pBdp4 and pBdp5 plasmids (see Fig.1). Sf9 cells were transfected with 5 μ g of either of these plasmids and RNAase protection assay was done as above. Results obtained with pBdp2 to 4 were essentially identical to those obtained with pBdp1 (Fig.2 A, lane 3 and data not shown for pBdp2 and pBdp3), except that signals intensity was higher for pBdp4, a shorter version of the *dnapol* promoter which carries only 32 bp upstream to the distal promoter.

***ie1* gene product transactivates *dnapol* promoter.**

dnapol promoter activity is enhanced when *in vitro* transcription is performed in nuclear extracts from AcNPV infected cells, even when the extract is made as early as 4 hours p.i. (10). This led us to investigate the possible transactivating effect of the *ie0* and/or *ie1* gene products on the *dnapol* promoter. First, we assessed the ability of the pUie0-*ie1* and pUie1 to express the IE0 and IE1 polypeptides in Sf9 cells. A rabbit polyclonal immuno-serum raised against a bacterially expressed chimeric IE1 protein (see Materials and Methods) revealed through a Western blot assay, a polypeptide of 70 kDa in pUie1 transfected cells (Fig.3, lane *ie1*) while a 70-80 kDa doublet was observed in pUie0-*ie1* transfected cells (Fig.3, lane *ie0-ie1*). No band was visible on extracts made from untransfected cells (Fig. 3, lane MI) or early during the infection (Fig.3, lanes 0 and 30') or with a pre-immune serum (data not shown). The apparent molecular weight of IE0 and IE1 polypeptides is in good agreement with their predicted molecular weight, further confirming their identity (5;16).

We cotransfected Sf9 cells with the pUie0-*ie1* or the pUie1 plasmid respectively expressing the IE0 and/or IE1 polypeptide(s) with pBdp1 and analyzed its transcription product as described above. An additional and very intense protected band was detected in both assays (Fig.2 A, lane 2; data not shown for pUie0-*ie1*). Further cotransfection experiments using pUie1 and pdnapol (Fig. 2A, lane 5) or either one of the pBdp2 to 5 plasmid series produced similar results (Fig.2 A, lane 4; Fig.2 B, lane 3 and data not shown for pBdp2 and 3). The new IE1 induced band corresponded to a transcription starting at the proximal start-site, shown to be a major *dnapol* start-site during AcNPV infection both in *in vitro* and *in vivo* assays (10 and Fig. 2A, lane 5). Note that the signal is of slightly different size when produced by RNA from intact *dnapol* gene, due to the nature of the riboprobe transcribed from a chimeric construct with an additional short sequence (12 nt). The IE1 induced band is less intense for pBdp4 and pBdp5 which are

truncated respectively to 75 bp and 24 bp upstream to the unconventional *dnapol* "TATA box" (see Fig.2 A, lane 4; Fig.2 B, lane 3).

Therefore the *dnapol* promoter activity is strongly and specifically induced by the IE1 trans-activator at the level of the otherwise unused proximal start-site.

IE0 and IE1 polypeptides are stably expressed during the AcNPV viral cycle.

As our results above indicated that IE0 and/or IE1 polypeptide(s) is (are) a main *dnapol* promoter transactivator(s), we assessed whether the steady state level decline of *dnapol* mRNA (33) might result from a reduction of its transcription rate due to a lack of IE0 and/or IE1 transactivators. Thus, we examined the level of accumulation of IE0 and IE1 polypeptides at various times p.i. in AcNPV Infected cells. Cells were harvested at times ranging from 0 to 24 hours p.i. and protein extracts were analyzed by Western blot assay as above. Both 80 kDa IE0 and 70 kDa IE1 products were detected by the anti-IE1 serum as early as 30 min. p.i. although at a very low level (see Fig.3). At this very early time point, the 70 kDa and 80 kDa proteins appeared to be present at an equimolar ratio. Later on, 8 hours p.i., both proteins accumulated to reach a maximum but unequal level. As a consequence of the much higher IE1 accumulation rate, the IE1/IE0 protein ratio increased from 1 to about 5 during the 1 to 10 hours p.i. time period (see Fig.3). Later during the lytic cycle, after 10 hours p.i., the IE1/IE0 protein ratio increased again as the IE0 protein level decreased rapidly, the IE1 protein level remaining essentially stable (Fig.3, lane 10). Whatever the respective trans-activating function(s) of IE1 and IE0 polypeptides may be, the sharp drop of *dnapol* mRNA accumulation by 12 hours p.i. (33 and see Fig.4 A) can't be attributed to a diminution of the IE1 and/or IE0 protein(s) level, both proteins remaining abundant until late during the infection.

ORF-2 is expressed late during the viral cycle.

Sequence analysis of two distantly related baculoviruses, AcNPV and LdNPV, indicated that a second ORF, termed the ORF-2, located upstream to the *dnapol* and oriented in opposite direction (Fig.4 D), is preceded by a nearby baculovirus late promoter consensus sequence (1). Therefore, both the *dnapol* and the putative ORF-2 genes are arranged in a complex organization, which might generate expression interference if ORF-2 was to be expressed. In order to assess the putative ORF-2 gene expression, we performed RNAase protection analysis on infected cell RNAs extracted at times ranging from 0 to 24 hours p.i., using a 274 nt long riboprobe (Fig.4 D). The pattern of protection included fragments of approximate size 150 nt, 125 nt and 190 nt.

These signals are ORF-2 specific since they are not observed on RNA from mock transfected cells (data not shown) or early during the infection (Fig.4 B, lanes 0 to 6). The 150 nt and 125 nt long signals correspond to RNAs initiated at the initiation site, GTAAG, located at coordinates +17 relative to the *dnapol* initiation codon (1). Evidence indicates that the shorter signal (125 nt) is most likely to be an artifact of RNAase digestion since (i) it has been reported that RNAase nicked double stranded RNAs at the level of A/T rich sequences (9) as it is the case between coordinates -10 to +12 (21 nt out of 22 nt are A or T) (ii) a similar artifact of RNAase digestion has been observed when *dnapol* mRNA was detected using an antisense riboprobe exactly complementary to the ORF-2 sense probe (data not shown) (iii) the intensity of both the 125 nt and 150 nt signals varies in parallel. The longer signal (approximately 190 nt) corresponds to the full protection of the riboprobe, excluding the plasmid multicloning site sequence, and suggests the use of a distant start-site. Such a putative start-site (GTAAG) is found at coordinates +210 relative to the AcNPV *dnapol* initiation codon and most likely explains the detection of a minor RNA initiated farther upstream. ORF-2 specific signals on RNA from infected cells were first detected at 8 hours p.i., intensifying to reach a plateau by 12 hours p.i. and then remained stable until our last experimental time point at 24 hours p.i. (Fig.4 B, lanes 8 to 24). Therefore, as predicted from sequence analysis, the ORF-2 is abundantly expressed as a late gene from two start-sites, a main one at coordinate +17 and a secondary weaker one farther away. Cycloheximide and aphidicolin treatment, used as described in Materials and Methods, totally abolished the ORF-2 transcription (Fig.4 B, lanes c and a), confirming its status as a late transcription unit.

Additionally, the same RNA samples were analyzed by RNAase protection assay with a 371 nt long *dnapol* specific riboprobe giving protection to an intense signal of the approximate size of 190 nt. As expected from previous report (33), the *dnapol* specific signal appeared at 2 hours p.i., peaked at 8 hours p.i. and declined to a low level by 12 hours p.i. (Fig.4 A, lanes 2 to 24). While generally agreeing with the conclusions of Tomalski *et al.* (1988), our data differ in that the distal and intermediate start-sites are minor sites stably used during the infection (Fig.4A and Fig.2 lane 6) whereas the proximal site is the main and only cycle dependent start-site (Fig. 4A). Then, while the ORF-2 expression arose by 8 hours p.i. to reach a high level plateau, the *dnapol* mRNA steady state level declined to a very low level. Furthermore, addition of cycloheximide, a translation inhibitor, induced the accumulation of *dnapol* mRNA late during the infection, initiated at the proximal start-site at 24 hours p.i. as well as at 13 hours p.i. (Fig. 4 A lane c and Fig.4 C, lane 2), while it reduced the ORF-2 RNA to an undetectable level (Fig.4 B, lane c), in sharp contrast with their normal low accumulation level at these times. Aphidicolin, a DNA replication inhibitor, reduced the transcription initiated at the minor intermediate and distal sites but did not affect the level of RNA initiated at the proximal

site (Fig.4 A, compare lanes 24 and a) Altogether, these data suggested some interference between the expression of the 2 genes.

Stability of *dnapol* mRNA is constant through the viral cycle.

We compared *dnapol* mRNA stability early and late during the infection, in order to detect any significant variation which might explain the *dnapol* mRNA drop at late times p.i. AcNPV infected cells were treated with actinomycin D respectively at 4 hours and 9 hours p.i. and RNA was extracted at time points 0, 3 and 6 hours post-treatment and analyzed by RNAase protection assay using the 371 nt long *dnapol* specific riboprobe as above. The *dnapol* mRNA specific signal, of approximate size 190 nt, progressively decreased during the 0 to 6 hours time-course without significant difference whenever actinomycin D was added, early (4 hours) or late (9 hours) during the infection (Fig. 5).

We further determined the *dnapol* mRNA stability in presence of actinomycin D at later times, 6 and 10 hours p.i., in order to avoid possible interference with the actinomycin D induced apoptosis (7). RNAase protection was done as described above, on RNAs extracted after actinomycin D addition at various post-treatment times, including t= 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours. The intensity of *dnapol* specific signal regularly decreased when time increased (data not shown). Analysis by densitometry scanning of autoradiograms was performed, allowing to determine a *dnapol* mRNA half-life value of about 2 hours (data not shown). This half-life value is in good agreement with the decline rate of the *dnapol* mRNA steady state level whether *dnapol* gene transcription would stop at 8 hours p.i. These data show that the drop of *dnapol* mRNA steady state level is not related to an ORF-2 RNA destabilizing antisense effect, since the ORF-2 RNA accumulation does not significantly alter *dnapol* mRNA stability.

ORF-2 promoter alteration and *dnapol* RNA accumulation late during the infection.

We assessed the possibility of an inhibitory effect of the ORF-2 expression on *dnapol* promoter activity. To test this hypothesis, constructs were made carrying a disrupted ORF-2 promoter or lacking the promoter area and were transiently expressed in infected cells. pBdp6 plasmid was made by introducing clustered point mutations in the ORF-2 promoter while pBdp7 carried an Aat II - Hind III deletion and pBdp8 a shorter Nco I - Hind III deletion in the promoter area (Fig.1 and see Materials and Methods). RNAase protection analysis of the transiently expressed RNAs from cells respectively transfected with pBdp1, pBdp6, pBdp7 or pBdp8 plasmid and subsequently infected

with AcNPV, was performed with corresponding specific riboprobes transcribed from pBdp($\Delta 1$; $\Delta 6$; $\Delta 7$; $\Delta 8$) plasmids (see Materials and Methods). Our data show that the protected fragments are all specific for RNAs initiated at the *dnapol* proximal start-site of each construct (Fig. 6 A, lane 2 and data not shown for pBdp 1, pBdp 7 and pBdp 8). Similar analysis done 24 hours p.i. did not reveal any detectable signal for *dnapol* mRNA (Fig.6 A, lane 3 and data not shown for pBdp1; pBdp7 and pBdp8), indicating that late during the infection, *dnapol* promoter was inhibited even when the transiently expressed construct would not carry a functional ORF-2 promoter. Additionally, we tested the pBdp5 construct, carrying only 24 bp in front of the proximal non conventional "TATA box", in the same conditions as above. Results of this experiment showed a protected fragment of approximately 230 nt, when RNAs were extracted 6 hours p.i. (Fig.6 B, lane 1) corresponding to the pBdp5 *dnapol* proximal start-site usage whereas no signal could be detected when the extraction was done 24 hours p.i. (Fig. 6 B, lane 2). As an internal control, this specific probe provided a very intense signal of approximately 190 nt, corresponding to viral mRNA analyzed 6 hours p.i., whereas only faint signals for intermediate and proximal site usage were detected on RNA extracted 24 hours p.i. (Fig.6 B). Therefore, these results showed that the ORF-2 expression is not responsible for the *dnapol* promoter inhibition. Furthermore, they indicated that the mechanism inhibiting *dnapol* promoter activity, requires little or no sequence upstream to the proximal unconventional TATA motif.

Discussion

Here we report a study of the transcriptional control of a temporally regulated unusual promoter, directing the AcNPV *dnapol* gene transcription. We present evidence that *dnapol* gene, intact or truncated in its promoter region (pBdp1 to 4) was transiently expressed when introduced into Sf9 cells. These results show that the extremely low level expression observed in our assay, started from minor distal and intermediate start-sites, sites also used at a comparable rate during infection (see Fig. 2 A). Strikingly, the proximal start-site, the main site during infection (10 and see Fig. 2 A), was not used in the absence of viral or viral-induced products. The proximal start-site became very highly active when *dnapol* was co-transfected with plasmids expressing the *ie0* and/or *ie1* genes, even on a construct carrying as little as 24 nt upstream to the proximal promoter. Note that the induction of transcription by *ie1* gene, although remaining strong, gradually decreased when the truncation of the promoter came in the range of 85 nt (pBdp4) to 24 nt (pBdp5) of the proximal promoter. Moreover, our results showed that IE1 activation was not further enhanced in presence of iE0, indicating that IE1 is a highly efficient transactivator, sufficient for *dnapol* proximal promoter induction. While our data indicating

that the proximal site is the major and only cycle-dependent *dnapol* start-site during infection, are in agreement with previous report by Glocker *et al.* (1992), they differ from the observations reported by Tomalski *et al.* (1988). Although we don't have explanation for this discrepancy, it might originate in the difference of viral and cellular clones used in the otherwise similar experimental protocols.

The IE1 induction of the *dnapol* proximal promoter differs from its effect on more classical AcNPV promoters (3; 15; 31), in that these promoters present a basic activity in the absence of IE1. The *dnapol* promoter induction by IE1 is instead comparable to the IE1 induction of the early promoter of 39K, which becomes inactive at late times during infection (12).

Transiently expressed *ie1* gene allowed the synthesis of a 70 kDa polypeptide whereas a 70-80 kDa doublet was expressed from the *ie0-ie1* gene. Surprisingly enough, both polypeptides were present through the course of infection, even though they are encoded by immediate early genes. While this work was under completion, Theilman and Stewart (1993) reported a similar observation on *Orgyia pseudotsugata* Nuclear Polyhedrosis Virus, a distantly related baculovirus, with the noticeable difference that these authors identified 5 distinct polypeptides encoded by the *ie0-ie1* gene. Our data are in good agreement with the findings by Pasarelli *et al.*, (1993) indicating that IE1 activates transcription of certain late genes. Furthermore, the limited amount of IE0 and IE1 proteins available in cycloheximide treated cells, most likely carried by the virus as recently reported (32), was sufficient to induce a strong accumulation of *dnapol* mRNA initiated at the proximal start-site (see Fig. 4A and C). Then, the absence of both the IE0 and IE1 polypeptides could not be alleged as a cause for the late decline of *dnapol* mRNA steady state level.

Interestingly, although AcNPV and LdNPV are only distantly related baculoviruses and share little similarity in their genome organization (36), Bjornson *et al.* (1993) showed that the organization of the *dnapol* promoter region is conserved. This region contains a second ORF, directed in opposite orientation, with a putative late start-site and promoter motif located in the *dnapol* coding sequence, in such a way that *dnapol* and ORF-2 RNAs are complementary on 139 nt of their 5' sequence (1). Because of this complex organization and because antisense RNA expression was proposed as a mechanism regulating certain baculovirus genes (27, 30), we hypothesized that an analogous regulation might participate to the sudden decline of *dnapol* mRNA steady state level.

We showed that the putative AcNPV ORF-2 was indeed expressed, starting at 8 hours p.i. and then rapidly reached a high level plateau. The ORF-2 transcription mainly initiated in the area of the predicted late start-site consensus sequence at coordinate +17 relative to the *dnapol* ATG (1), although a second minor start-site was shown to be

farther upstream, most likely located at coordinates + 210, where we identified a perfect late AcNPV start-site consensus sequence. Temporal expression analysis of the *dnapol* gene performed on the same RNA samples as above, underlined the coincidental timing of the ORF-2 transcription and of the *dnapol* mRNA steady state level decline. Moreover, while cycloheximide treatment induced the accumulation of *dnapol* mRNA late during infection, it completely inhibited the ORF-2 transcription, further suggesting a possible interference between the expression of the two genes. We observe here the same discrepancy as above with the report by Tomalski *et al.* (1988) regarding the choice of start-site in presence of cycloheximide, but not when aphidicolin, a DNA replication inhibitor, blocks only the distal and intermediate sites. Then, since aphidicolin does not affect the major start-site usage, viral DNA replication does not appear to directly interfere with *dnapol* transcription.

In order to determine whether the correlation between the transcription of *dnapol* and ORF-2 was only coincidental, we considered the possibility of an ORF-2 mediated *dnapol* mRNA degradation. *dnapol* mRNA stability was compared at early and late times during the infection in presence of actinomycin D and showed no significant alteration at late times (comparison at 6 hours and 10 hours p.i.) when ORF-2 was highly expressed. Then, *dnapol* mRNA steady state level decline is due to a block of transcription, yet with the possible involvement of an ORF-2 transcriptional activity or complex assembly blocking a weaker *dnapol* promoter. Our results obtained by infecting cells transiently expressing constructs lacking or carrying altered ORF-2 promoters, showed that the ORF-2 transcriptional activity or complex assembly couldn't be responsible for the block of *dnapol* transcription. We conclude of these data, that the transcription of the ORF-2 gene and the simultaneous block of transcription of the *dnapol* gene are two coincidental phenomena without any direct interference on one another.

Then, the AcNPV *dnapol* gene transcription is inhibited late during infection, by a mechanism involving viral or viral-induced product(s), but not through any direct interference with the ORF-2 expression. Since both the activation and inhibition mechanisms are targeted on a relatively small area around the *dnapol* proximal promoter, we think such an inhibiting factor might act by inducing subtle change(s) (25) in the IE1 protein properties and then indirectly triggers the *dnapol* transcription inhibition.

Acknowledgements

We would like to thank Nicole Mounier, Pierre Couble, Olivier Martin and Cécile Persillon for the kind gift of plasmids and George Kuhl for art-work. We are indebted to G. Croizier and G. Devauchelle for helpful discussions during the course of this work and for reading the manuscript. This research was supported by the grant 7807 (to M.O.) from Société Nationale ELF Aquitaine.

BIBLIOGRAPHY

1. **Bjornson, R. M., B. Glocker, and G. F. Rohrman.** 1992. Characterization of the nucleotide sequence of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus DNA Polymerase gene region. *J. Gen. Virol.* **73**: 3177-3183.
2. **Blissard, G. W., and G. F. Rohrmann.** 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Ann. Rev. Entomol.* **35**: 127-155.
3. **Blissard, G. W., and G. F. Rohrmann.** 1991. Baculovirus gp64 gene expression: Analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. *J. Virol.* **65**: 5820-5827.
4. **Carstens, E. B., A. L. Lu, and H. L. B. Chan.** 1993. Sequence, transcriptional mapping, and overexpression of p47, a baculovirus gene regulating late gene expression. *J. Virol.* **67**: 2513-2520.
5. **Chisholm, G. E., and D. J. Henner.** 1988. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J. Virol.* **62**: 3193-3200.
6. **Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
7. **Clem, R. J., and L. Miller.** 1993. Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and the *in vivo* infectivity of a baculovirus. *J. Virol.* **67** : 3730-3738.
8. **Earl, P. L., E. V. Jones and B. Moss.** 1986. Homology between DNA polymerases of poxviruses, herpesviruses and adenoviruses: Nucleotide sequence of the vaccinia virus DNA Polymerase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 3659-3663.
9. **Gilman, N.** 1993. p 401- 478 *in* F.M. Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1. John Wiley and Sons, New-York.
10. **Glocker, B., R. R. Hoopes, and G. F. Rohrmann.** 1992. *In vitro* transactivation of baculovirus early genes by nuclear extracts from *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* **66**: 3476-3484.

11. **Guarino, L. A., and M. D. Summers.** 1986. Functional mapping of a transactivating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J. Virol.* **57** : 563-571.
12. **Guarino, L. A., and M. D. Summers.** 1987. Nucleotide sequence and temporal expression of a baculovirus regulatory gene. *J. Virol.* **61** : 2091-2099.
13. **Hoopes, R. R., and G. F. Rohrmann.** 1991. *In vitro* transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** : 4513-4517.
14. **Jarvis, D. L.** 1993. Effects of baculovirus infection on IE1-mediated foreign gene expression in stably transformed insect cells. *J. Virol.* **67** : 2583-2591.
15. **Knebel-Morsdorf, D., Kremer, A., and F. Jahnel.** 1993. Baculovirus gene ME53, which contains a putative zinc finger motif, is one of the major early-transcribed genes. *J. Virol.* **67** : 753-758.
16. **Kovacs, G. R., L. A. Guarino, and M. D. Summers.** 1991. Novel regulatory properties of the IE1 and IE0 transactivators encoded by the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **65** : 5281-5288.
17. **Kovacs, G. R., J. Choi, L. A. Guarino, and M. D. Summers.** 1992. Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early 1 transcriptional regulatory protein. *J. Virol.* **66** : 7429-7437.
18. **Krapa, R., and D. Knebel-Mörsdorf.** 1991. Identification of the very early transcribed baculovirus gene PE-38. *J. Virol.* **65** : 805-812.
19. **Lardep, B. A., S. D. Kemp, and G. Darby.** 1987. Related functional domain in virus DNA polymerases. *EMBO J.* **6** : 169-175.
20. **Lu, A., and E.B. Carstens.** 1992. Transcription analysis of the EcoRI D region of the baculovirus of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus identifies an early 4-kilobase RNA encoding the essential p143 gene. *J. Virol.* **66** : 655-663.
21. **Lu, A., and E. B. Carstens.** 1993. Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology.* **195** : 710-718.
22. **Mikhailov, V. S., J. O. Ataeva, K. A. Marlyev, and P. K. Kullyev.** 1986a. Changes in DNA Polymerase activities in pupae of the silkworm *Bombyx mori* after induction with nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **67** : 175-179.
23. **Mikhailov, V. S., K. A. Marlyev, J. O. Ataeva, and P. K. Kullyev, and A. M. Atrazhev.** 1986b. Characterization of 3'-5' exonuclease associated with DNA Polymerase of silkworm nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res.* **14** : 3841-3857.
24. **Miller, L. K., J. E. Jewell, and D. Browne.** 1981. Baculovirus induction of a DNA Polymerase. *J. Virol.* **40** : 305-308.
25. **Morin, N., C. Delsert, and D. F. Klessig.** 1989. Mutations that affect phosphorylation of the Adenovirus DNA-Binding Protein alter its ability to enhance its own synthesis. *J. Virol.* **63** : 5228-5237.

26. **Mounier, N., and J. C. Prudhomme.** 1991. Differential expression of muscle and cytoplasmic actin genes during development of *Bombyx mori*. *Insect. Biochem.* **21**: 523-533.
27. **Ooi, B. G., and L. K. Miller.** 1990. Transcription of the baculovirus polyhedrin gene reduces the levels of antisens transcript initiated downstream. *J. Virol.* **64**: 3126-3129.
28. **Pasarelli, A. L., and L. K. Miller.** 1993 . Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression : ie-1, ie-N and lef-2. *J. Virol.* **67** : 2149-2158.
29. **Smith, D. B., and K. S. Johnson.** 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Gene.* **67**: 31-40.
30. **Takayama, K. M., and M. Inouye.**1990. Antisense RNA. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**: 155-184.
31. **Theilmann, D. A., and S. Stewart.** 1991. Identification and characterization of the ie1 gene of *Orgyia pseudotsugata* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology*, **180**: 492-508.
32. **Theilmann,D. A., and S. Stewart.** 1993. Analysis of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus trans-activators IE1 and IE2 using monoclonal antibodies. *J.Gen. Virol.*, **74** : 1819-1826.
33. **Tomalski, M. D., J. Wu, and L. K. Miller.** 1988. The location, sequence, transcription and regulation of a baculovirus DNA Polymerase gene. *J. Virol.* **167**: 591-600.
34. **Wang, X., and 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.
35. **Yanisch-Perron, C., J., Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M 13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M 13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**: 103- 119.
36. **Zanotto, P. M. A., B. D., Kessing, and G. E. Marugnac.** 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses : evolutionary rates and host-associations. *J. Invert. Pathol.*, **62** : 147-164.

Legend of the figures

Fig. 1 . Schematical representation of *dnapol* chimeric constructs.

Coordinates of all constructs are relative to the *dnapol* initiation codon. pBdp1 was obtained by insertion of the AcNPV Eco RI - V (-900 to +66) fragment in front of a Hind III - Kpn I fragment containing the actin A₃ polyadenylation signal. Subsequent deletions were made with Acc I, Mlu I and Eag I enzymes respectively for pBdp 2; pBdp 3; pBdp 4. Coordinates are approximate for pBdp 1 to 3, since the corresponding sequence remains to be determined. The pBdp 5 insert was PCR amplified from pBdp 1 with the (D1; Universal) pair of primers and extend from -180 to the end of the actin A₃ DNA fragment. pBdp 6 corresponds to pBdp 1 but with clustered point mutations at positions +15; +17; +18. pBdp 7 carries a deletion between the Aat 2 (-44) and Hind III (+66) sites while pBdp 8 carries a deletion between the Nco I (+17) and Hind III (+66) sites. *dnapol* coding sequence and the actin A₃ transcription terminator are respectively represented by hatched and empty boxes. Deletions are figured by triangles and arrows indicate *dnapol* and ORF-2 cap-sites. Ac, Acc I; At, Aat 2; Ea, Eag I; Ec, Eco RI; H, Hind III; N, Nco I; M, Mlu I; Poly A for transcription terminator; Dist. and Prox. for distal and proximal *dnapol* start-sites.

Fig. 2 . Transient expression and *ie1* transactivation of *dnapol* promoter in Sf9 cells.

RNA from transfected cells was analyzed by RNAase protection assay using a 371 nt long riboprobe as represented on Panel C. Note that the total amount of transfected DNA was kept constant by adding pBKS plasmid up to 10 μ g when required. P is for undigested riboprobe. Panel A. Cells were harvested 4 hours p.i. (lane 5) or after single transfection with pBdp1 (5 μ g) (lane 1) or with pBdp 4 (5 μ g) (lane 3) or double transfection with pUie1 (5 μ g) and pBdp 1 (5 μ g) (lane 2) or pBdp 4 (5 μ g) (lane 4) or pdnapol (5 μ g) (lane 6). Lane 1 was exposed for 5 days at -70°C while other lanes were exposed for only 6 hours. Arrows indicate the approximate size of the protected fragments. Panel B. Cells were singly transfected with pBdp 5 (5 μ g) (lane 2) or doubly transfected with pUie1 (5 μ g) and pBdp 1 (5 μ g) (lane 1) or pBdp 5 (5 μ g) (lane 3). Panel C. Schematized representation of *dnapol* chimeric constructs and the protected fragments they provide in RNAase protection assays. Note that the riboprobe used in this assay protects a longer fragment (+12 nt) on RNA from chimeric constructs than on RNA from the intact gene expressed by transfection or infection. Numbers are indicated in nucleotides and all abbreviations are as mentioned in Fig. 1 legend.

While faint protected fragments corresponding to distal and intermediate start-sites are detected in singly transfected cells, a unique and very intense signal is present in infected or doubly transfected cells and corresponds to the proximal start-site usage.

Fig. 3 . Western blot analysis of viral or transient expression of *ie0* and *ie1* immediate early genes.

Sf9 cells were lysed 24 hours post-transfection or at various times post-infection as indicated on the above line. 50 μ g of total protein extract was loaded on each lane of a 12 % SDS-PAGE before transfer to nitrocellulose membrane. This blot was immunodeveloped with an anti-IE1 rabbit polyclonal serum and subsequently revealed by the reaction of Phosphatase alkaline conjugated secondary antibodies with NBT and BCIP. Note that a single 70 kDa protein is produced by pUie1(lane ie1) and a 70-80 kDa doublet is visible in cells transfected with pUie0-ie1(lane ie0-ie1) or during the course of infection in Sf9 cells (lane 0 to 24) whereas no signal is detected in mock infected cells (lane MI).

Fig. 4 . Kinetics of mRNA accumulation for *dna pol* and ORF-2 genes.

RNA from infected cells were extracted at various time points as indicated in hours on the line above both A and B panels. P is for undigested riboprobe. Panel A. RNAase protection analysis was done with a 371 nt long *dna pol* specific riboprobe which provided protection to fragment of approximate size 190 nt, as shown on Panel D. Panel B. RNAase protection was done using a 274 nt long riboprobe specific for the putative ORF-2 gene. Lanes a and c correspond to RNA from cells treated with aphidicolin (added after virus adsorption) (lane 2) or with cycloheximide (added 2 hours before infection) and harvested 24 hours p.i. Protected fragment of approximately 190 nt (maximal protection for RNA initiated at a distal Start-site), 150 nt (for RNA starting at the predicted start-site at +17) and 125 nt (degradation product) were obtained. These data indicated that the ORF-2 RNA is indeed expressed at late time p.i. and initiated at a proximal and a distal cap-sites. Panel C. Similar experiment was done as in Panel A but with cells either untreated (lane 1) or pre-treated with cycloheximide 2 hours before infection (lane 2) and harvested 13 hours p.i. A fragment of approximately 190 nt long was protected in presence of cycloheximide, corresponding to RNA initiated at the proximal cap-site. Panel D. *dnapol* and ORF-2 transcription units are schematically represented with their RNAs and fragments they protect in RNAase protection assays.

dnapol and ORF-2 coding sequences are respectively figured by a hatched and an empty box. Tracks of A represent polyadenylation tails.

Fig. 5 . Kinetics of *dnapol* mRNA degradation at 4 hours and 9 hours p.i.

Panel A. Cells were actinomycin D treated at 4 or 9 hours p.i. and RNA was extracted immediately (time 0) or after 3 hours or 6 hours as indicated on the above line. RNAase protection analysis was done with a 371 nt riboprobe specific for *dnapol* mRNA. A signal of approximately 190 nt was protected as expected. Note that the decline of intensity of the *dnapol* signal is slightly faster at 9 hours, although it does not represent a dramatic alteration of *dnapol* mRNA stability.

Fig. 6 . Inhibition of *dnapol* transcription is not mediated by ORF-2 expression.

Panel A. RNAase protection analysis was done using a 369 nt long riboprobe specific for pBdp 6. RNA was extracted from cells doubly transfected with pBdp 6 (5 μ g) and pUie1 (5 μ g) (lane 1) or from cells transfected and infected for 6 hours (lane 2) or 24 hours (lane 3). A signal of approximately 230 nt specific for *dnapol* mRNA initiated on pBdp 6 template is visible on lane 1 and 2 but is not detectable on lane 3. Then, viral inhibition of *dnapol* promoter occurred even in the absence of a functional ORF-2 promoter. Panel B. RNAase protection analysis using a 369 nt long riboprobe specific for pBdp 5, was done on RNA from cells transfected with pBdp 5 and subsequently infected with AcNPV. It provided an intense signal of approximate size 230 nt at 6 hours p.i. but no signal at 24 hours p.i. It additionally protected a very intense signal (approximately 190 nt) specific for the viral *dnapol* mRNA, much stronger at 6 hours p.i. than at 24 hours p.i. as expected. This experiment indicates that both viral and chimeric *dnapol* genes are similarly down-regulated late during the infection, and that the down-regulation requires little or no information upstream to the unconventional promoter. Inf. and Transf. are for protected signals from RNAs initiated respectively on viral or transfected templates.

Fig. 1

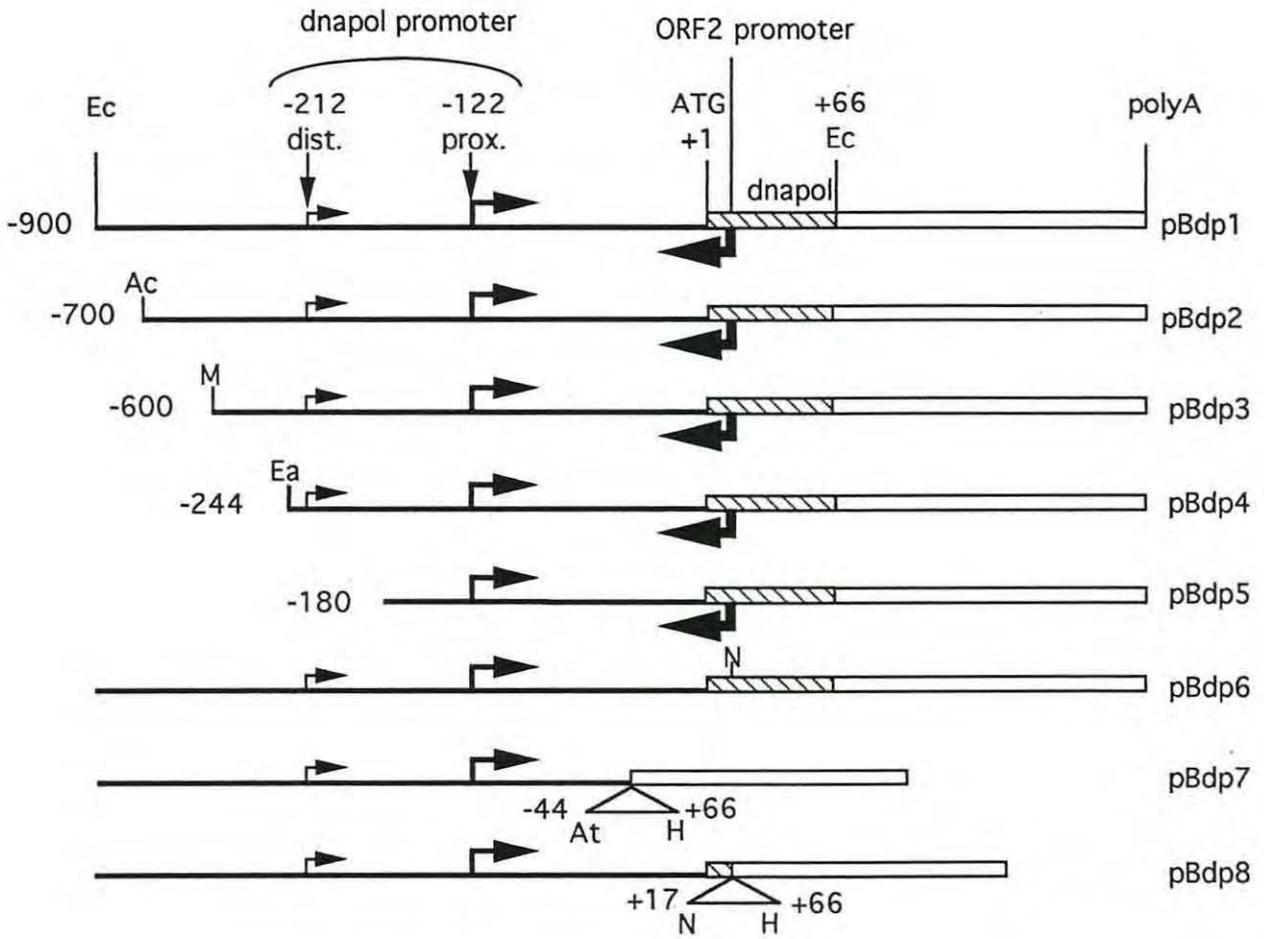
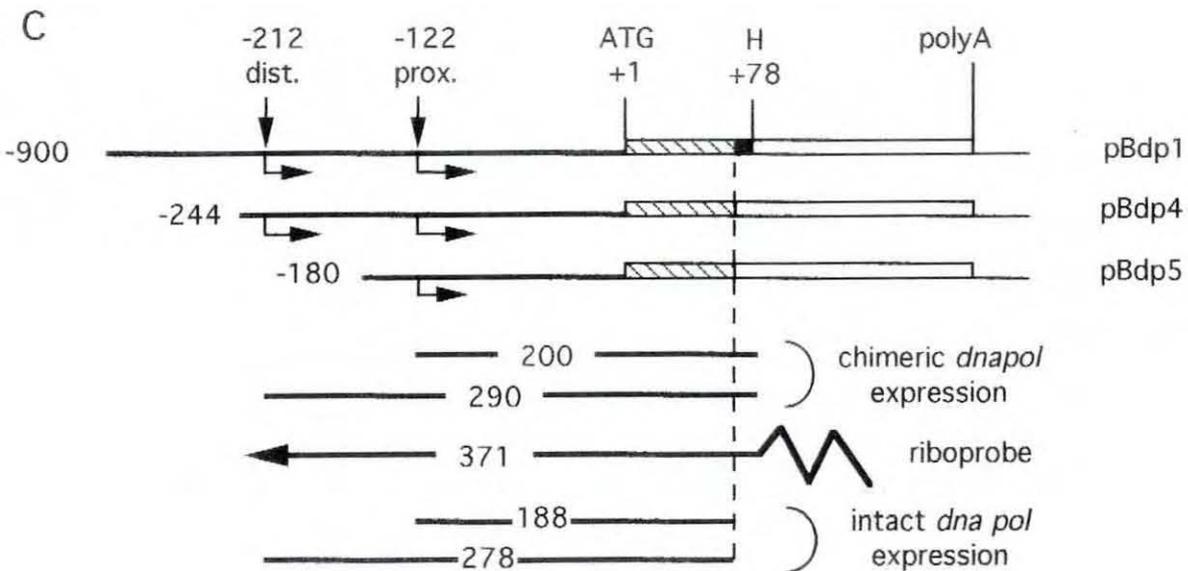
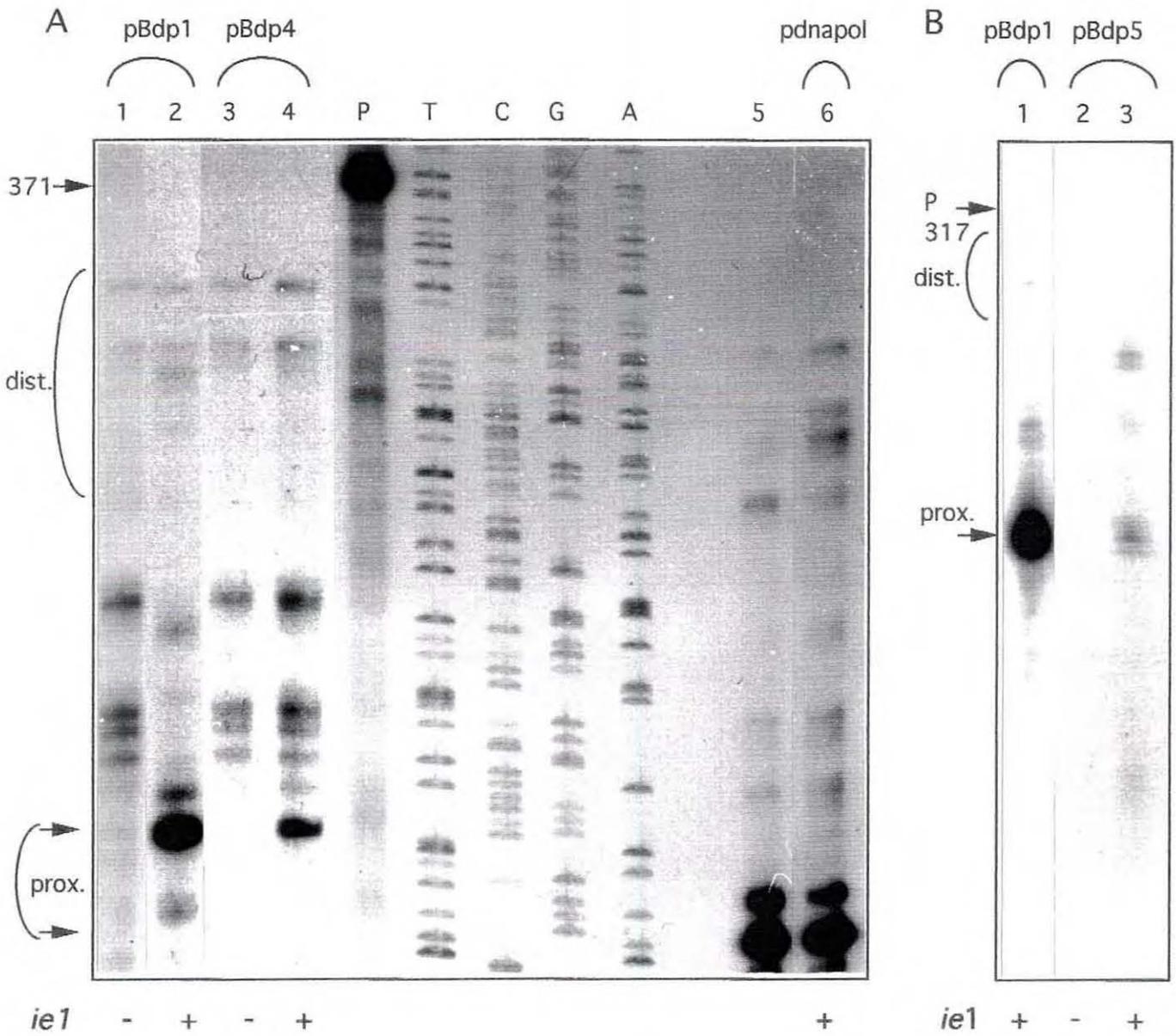
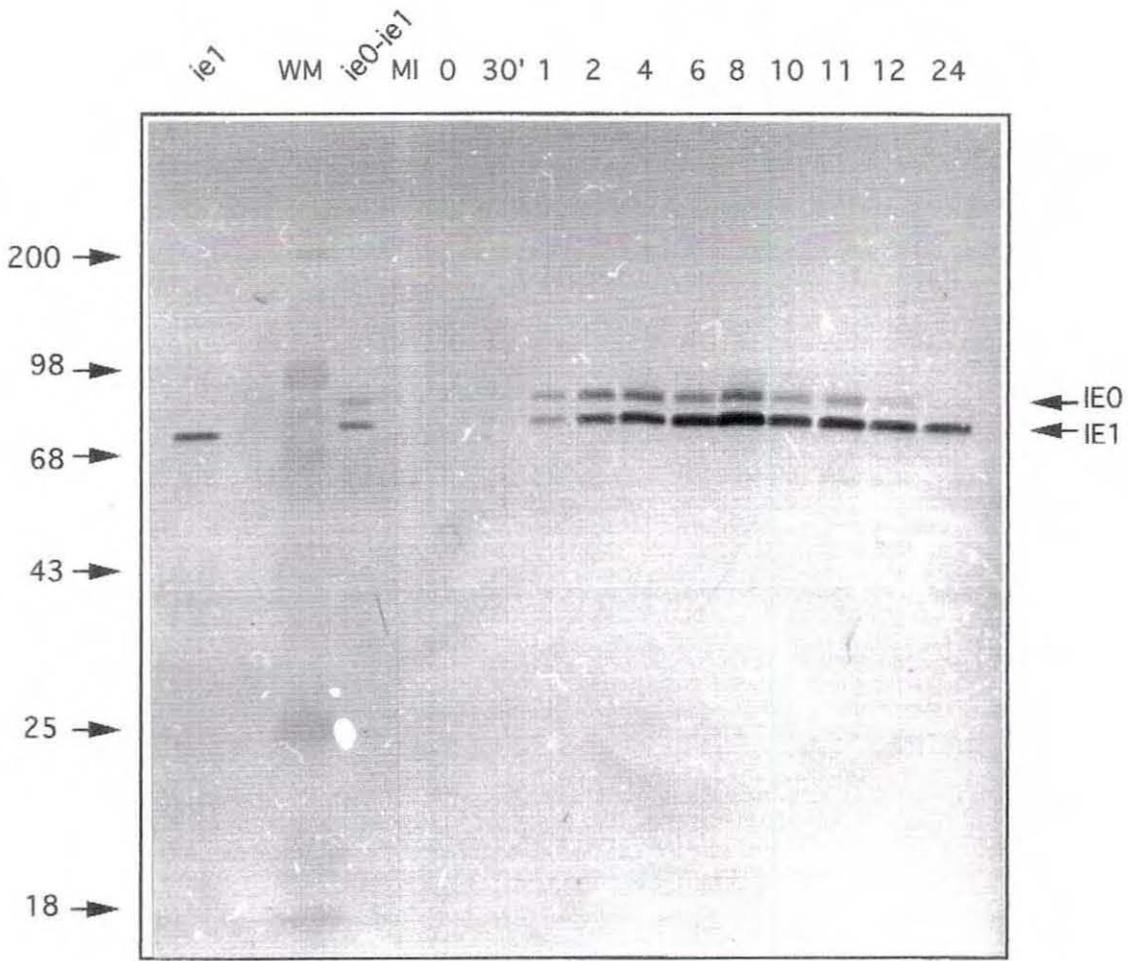
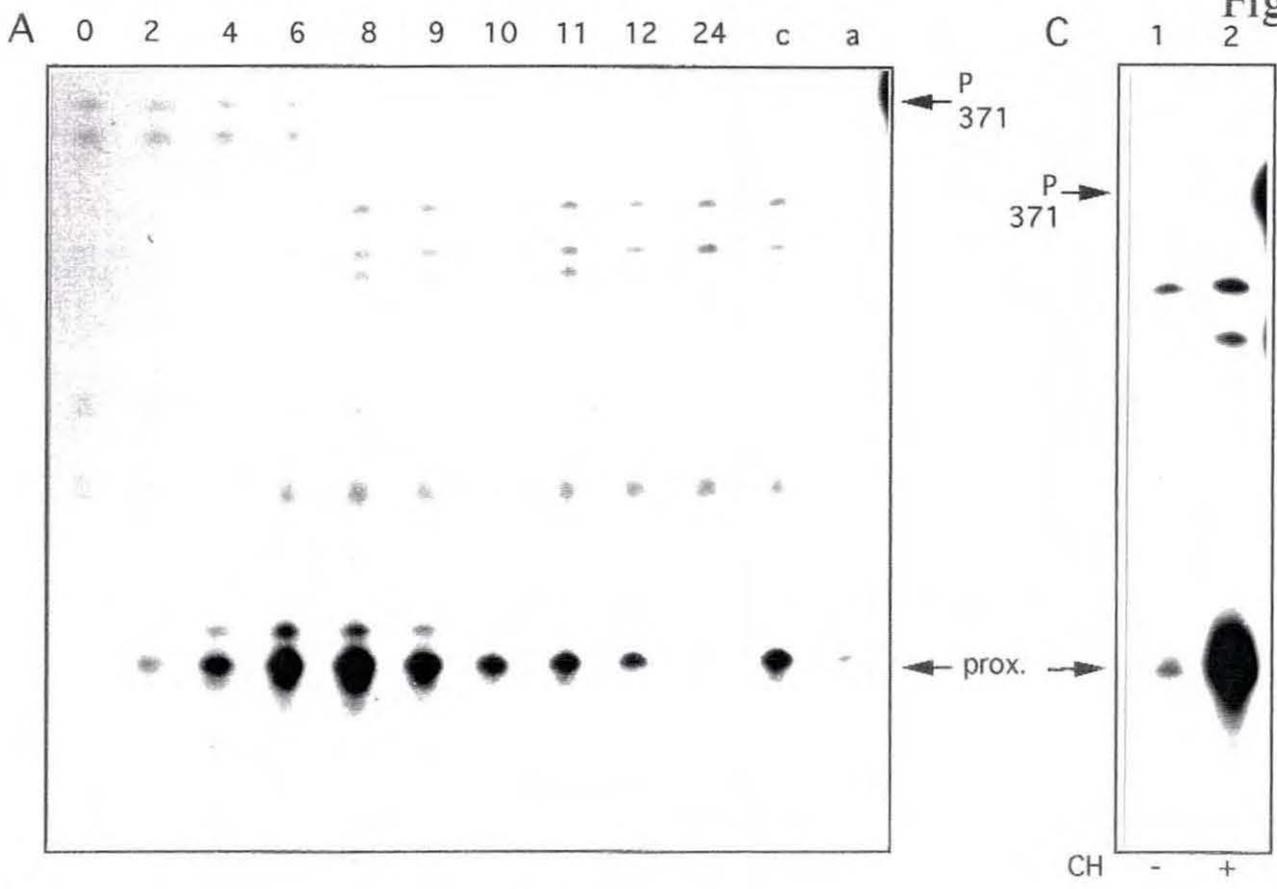


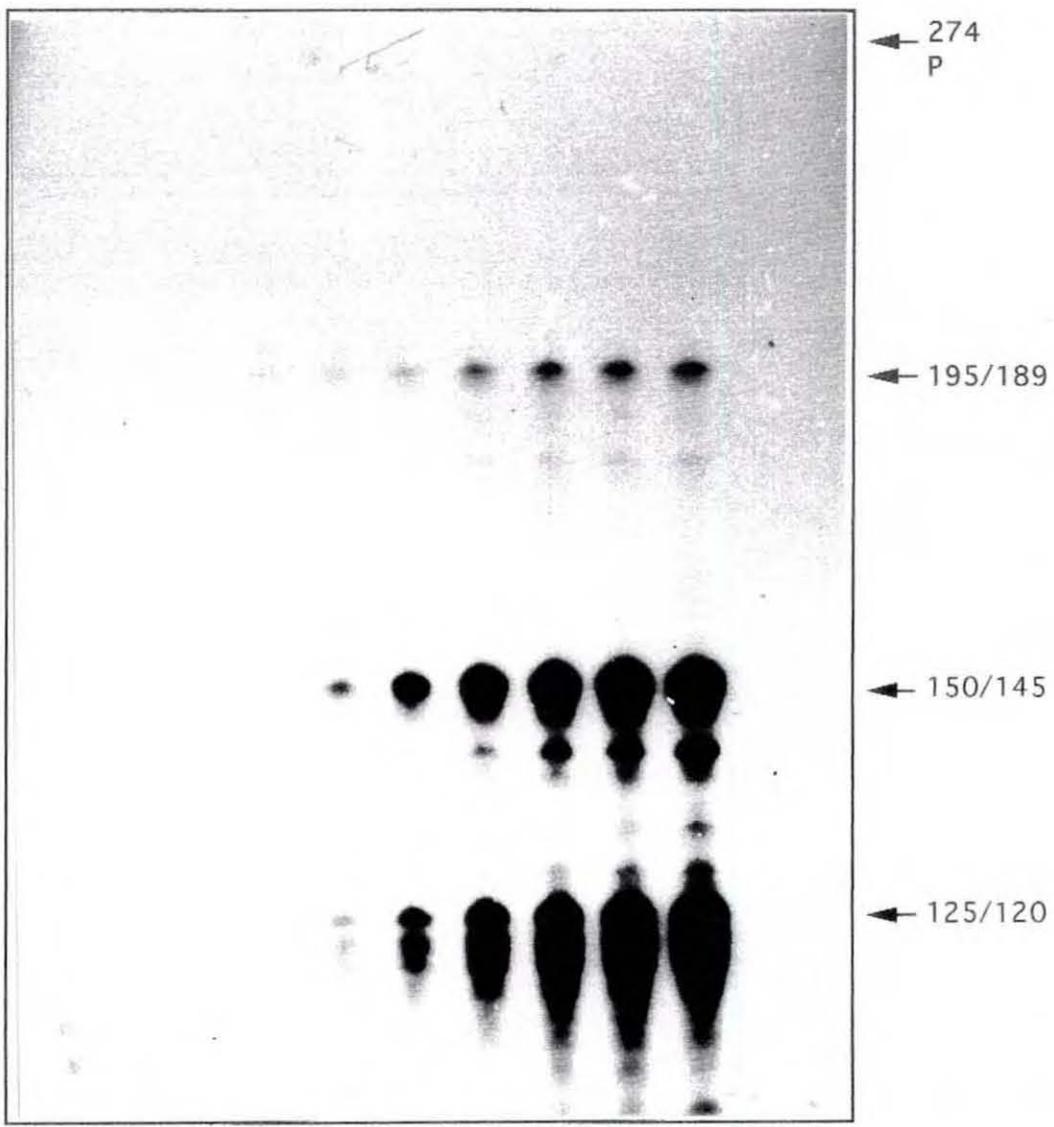
Fig. 2

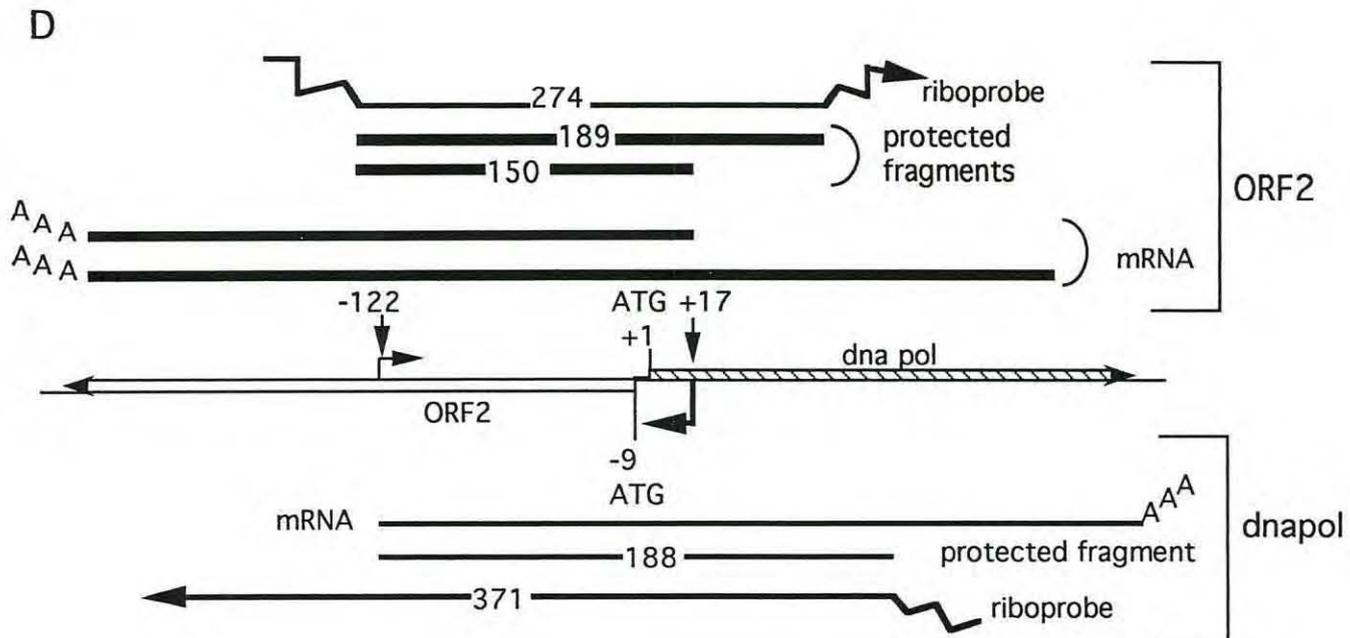


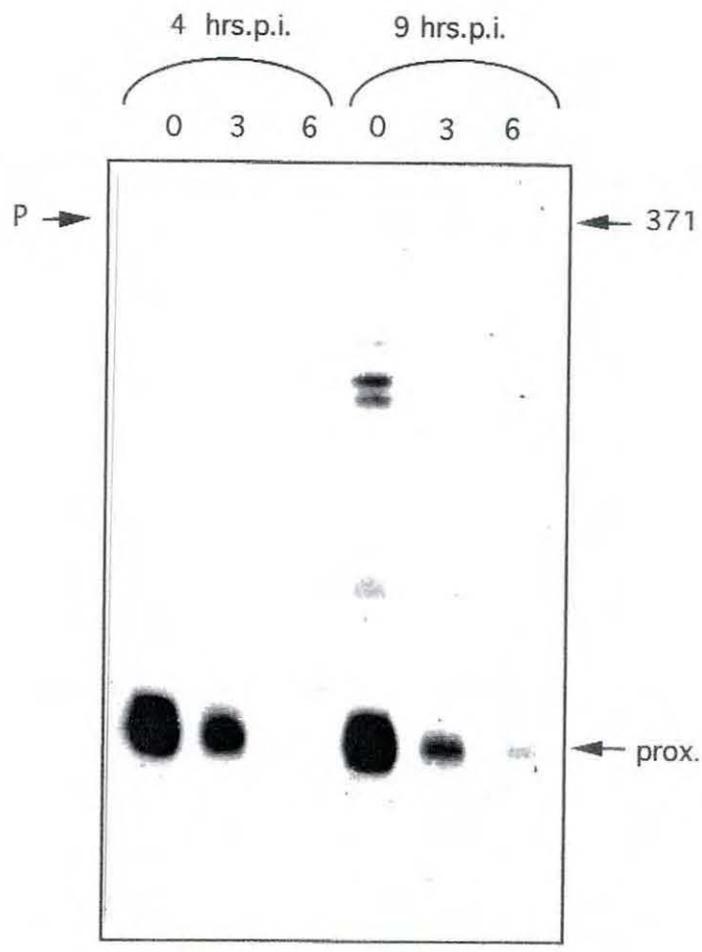


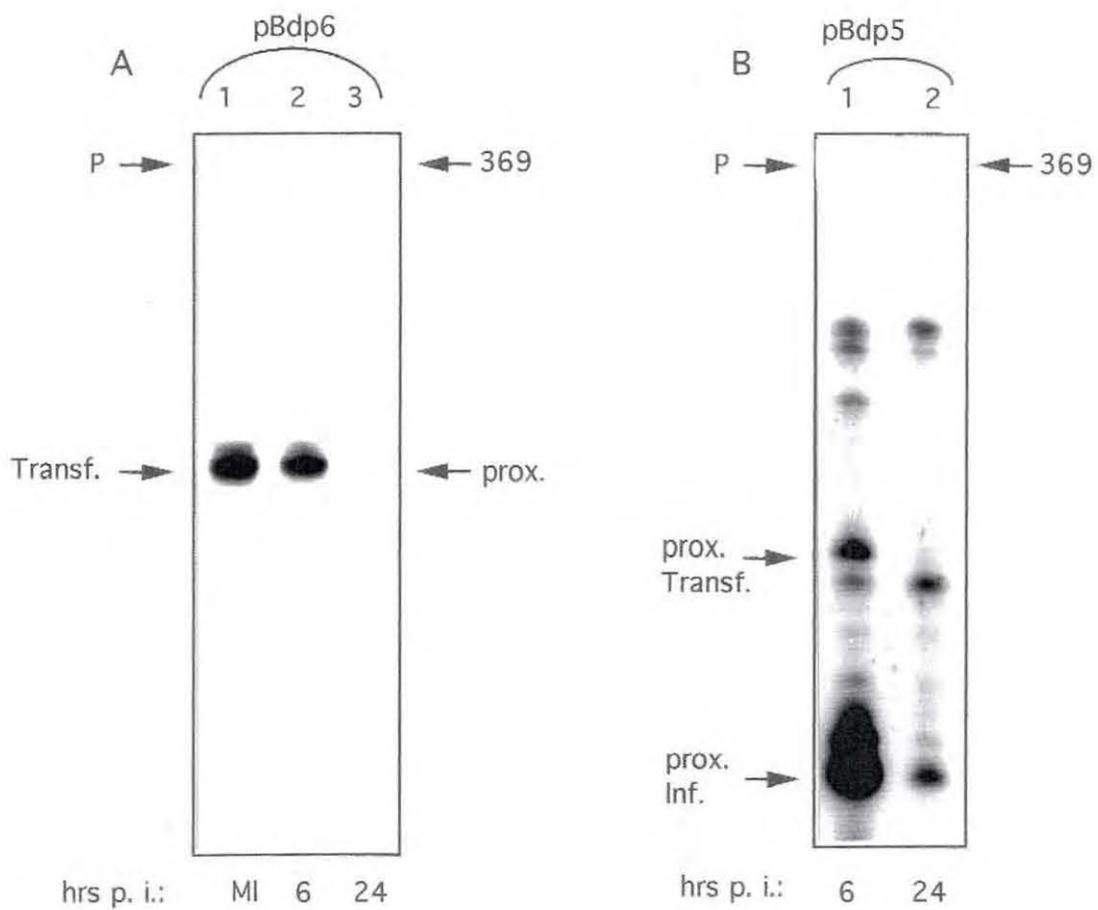


B 0 2 4 6 8 9 10 11 12 24 a c









Nous avons étudié la régulation temporelle de *dnapol*. En expression transitoire, ce gène est transcrit à un faible niveau de base à partir de sites d'initiation mineurs. La co-expression des gènes immédiatement précoces *ie0* et/ou *ie1* active de façon considérable la transcription de *dnapol*. De plus, l'activation en *trans* par IE1 ne nécessite pas ou peu d'information en amont de son promoteur proximal. Nous avons vu que les protéines IE0 et IE1 sont exprimées de façon stable au cours de l'infection. Par conséquent, la décroissance du niveau d'ARNm de *dnapol* n'est pas un effet de la disparition de ces protéines. D'après sa séquence nucléotidique, la région du promoteur de *dnapol* contient un cadre de lecture (ORF-2) qui la chevauche dans l'orientation opposée. Nous avons montré que cette ORF-2 est activement exprimée en phase tardive d'infection pendant que le niveau d'ARNm de *dnapol* chute. Toutefois, la stabilité des ARN de *dnapol* n'est pas altérée au cours de l'infection, ce qui exclut un effet de déstabilisation par les ARN antisens. De plus, nous avons montré par des expériences d'expression transitoire que la transcription de *dnapol* était inhibée uniquement en fin d'infection dans des cellules transfectées par des constructions portant le promoteur de l'ORF-2 intact ou altéré. Donc le début de la transcription de l'ORF-2 et l'inhibition du promoteur de *dnapol* sont deux phénomènes sans relation qui coïncident. Finalement, nous avons montré que l'activation en *trans* par la protéine IE1 et l'inhibition tardive ont lieu sur la même région limitée du promoteur de *dnapol*.

2.2) Publication 3: Séquence et analyse transcriptionnelle d'un gène anti-sens par rapport au promoteur du gène de l'ADN polymérase du virus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica*.

La transcription de l'ORF-2 présente en position anti-sens sur le promoteur du gène *dnapol* d'AcNPV n'est pas impliquée dans la chute de l'activité de ce promoteur (**publication 2**). Pourtant, une ORF est présente à la même localisation et possède également un signal d'initiation de transcription tardive sur le génome de *LdNPV* (**Bjornson et coll., 1992**). *LdNPV* et *AcNPV* sont des virus éloignés au point de vue phylogénétique (**Zanotto et coll., 1993**) et en particulier en ce qui concerne l'organisation du génome. Ceci a permis de faire l'hypothèse que la conservation de la localisation de l'ORF-2 traduirait un rôle ubiquitaire parmi les baculovirus en relation avec la localisation du gène *dnapol* chevauchant et opposé (**Bjornson et coll., 1992**). L'absence de motif peptidique connu sur la séquence complète de l'ORF-2 de *LdNPV* n'a pas permis de lui attribuer de fonction (**Bjornson et coll., 1992**). La séquence d'AcNPV homologue à l'ORF-2 de *LdNPV* n'étant connue que partiellement, son analyse et sa comparaison avec son homologue d'*LdNPV* n'ont pas pu être effectuées. Ceci nous ont amenés à séquencer la totalité de l'ORF-2.

**Sequence and Transcriptional Analysis of an Antisense Gene relative to
DNA polymerase gene promoter of *Autographa californica* Nuclear
Polyhedrosis Virus.**

Marc Ohresser,^{1,2*} Martine Cerutti ¹, and Claude Delsert²

INRA and CNRS UA1184, 30380 Saint-Christol-Lez-Alès, France;¹ IFREMER and
CNRS UMR 9947, Université de Montpellier 2, 34095 Montpellier Cedex 5, France.²

Running title : Analysis of a Gene Antisense for Viral *dnapol* Promoter

* Corresponding author. Mailling address:
INRA/CNRS, 34380, Saint Christol Lès Alès,
France. Fax: (33)66524699.

Abstract

An ORF partially overlapping the *dnapol* promoter and running in opposite direction was believed to be expressed by *LdNPV* baculovirus. A ORF starting in exactly the same position was found by sequence analysis in *AcNPV*. This late ORF was longer, poorly preserved among baculoviruses and normally transcribed.

DNA polymerase gene (*dnapol*) of *AcNPV* was characterized by sequence homologies (8) and the homologous gene of *Orgyia pseudosugata* NPV (*OpNPV*) was recently shown to be essential for activity of baculovirus replication origin in transfected cells (7). Recently a related baculovirus, *LdNPV* was shown to contain a related gene showing 48% amino acids identity with the *AcNPV dnapol* gene (1). Sequence analysis of the *dnapol* promoter containing region revealed a second ORF, referred to as ORF-2, in both the *AcNPV* and *LdNPV* genomes (1). ORF-2 is located upstream to *dnapol* ORF and oriented in opposite direction, with both initiation codons only distant of few nucleotides (Fig. 1A and C). The sequence GTAAG, consensus for late baculovirus gene transcription initiation is found 14 bp down stream *dnapol* ATG, on the complementary strand (Fig 1A and C). This sequence is actively used late in infection, but no early transcription was found (6). It was also noted at the same location on sequence of *LdNPV* (1). No early transcription of ORF-2 was detected (6). Additionally to the the transcription start site location conservation between *AcNPV* and *LdNPV* ORF-2, partial 363 bp (121 amino-acids) long sequence of *AcNPV* ORF-2 shows 29% amino acids identity with complete 573 bp (191 amino acids) long sequence of *LdNPV* ORF-2 (1). Analysis of RNA accumulation kinetic during the *AcNPV* cycle assumed that both positive and negative regulatory events control the *dnapol* mRNA level (8). More recent studies (6) on the regulation of *AcNPV dnapol* gene show that his negative regulation is independent of ORF-2 promoter occurrence and do not act by RNA destabilization effect. Therefore, the ORF-2 conservation structure between phylogenetically distant baculoviruses (10) remains to be explained.

To increase the knowledge about this gene, we determined the complete nucleotide sequence of *AcNPV* ORF-2, which surprisingly shares few amino-acid homology compared to which previously described on a partial sequence (1). The size of *AcNPV* ORF-2 is also different of the *LdNPV* one. The features of sequence analysis data were confirmed by mapping the RNA.

The *SacI*-F DNA restriction fragment of *AcNPV* strain 1-2 (a kind gift of G. Croizier) has been previously cloned (6). This Fragment contain the entire *dnapol* gene and additional upstream sequences (Fig. 1A) (8). The 3' *AcNPV* ORF-2 region was sequenced on both strands (Fig. 1C) using T7 sequencing kit (Pharmacia) after subcloning or by using specific primers (Fig. 1B). Note that a additional 235 bp *EcoRI* restriction fragment was located between *EcoRI*-V and *EcoRI*-U restriction fragments (Fig 1A). This fragment was not previously mapped presumably because his small size, so we called it *EcoRI*-235 to avoid any confusion with other possibly forgotten *EcoRI*

fragments. Newly determined sequence was added to the previously published (8) and allow the complete characterization of *AcNPV* ORF-2 sequence (Fig 1C). Previously published *AcNPV* ORF-2 sequence (8) was found to be identical (unpublished data) to that of E2 (a kind gift of M. Summers) and 1-2 virus strains. Stop codon in frame with previously described N terminal portion of ORF-2 (1) was located at position -960 from ATG of *dnapol* gene (Fig 1C). 349 bp were sequenced further downstream of stop codon without any "AATAAA" polyadenylation signal was detected, but two related sequences "AATTAA" were identified respectively overlapping stop codon and 162 bp downstream (Fig 1C). This "AATTAA" sequences were the single derogation at the "AATAAA" transcription termination signal which are used (9). This was observed at the end of a late transcript of *AcNPV iel* gene (4) and also at the end of *Bombyx mori* multicapsid NPV *iel* gene (5).

The deduced complete peptidic sequence of *AcNPV* ORF-2 was compared with the sequence published for *LdNPV* ORF-2 (1) (Fig 2). *AcNPV* ORF-2 is 126 amino-acids longer than the *LdNPV* ORF-2 (318 rather than 192) (Fig 2B). However, N terminal part of *AcNPV* ORF-2 amino-acid sequence was found to be aligned with amino-acid sequence of ORF-2 gene of *LdNPV* on the basis of few stretch of amino-acids identities or homologies (Fig 2A). At the parameter selected, homologies regions were aligned (Fig 2A), this guarantee the significance of this alignment. The main homologous region shares 10 amino-acids identical over 11 (Fig 2B), it is the singly really notable with conserved proline track. The 11 amino-acids motif was previously mentioned (1) and its presence on the previously published partial sequence of ORF-2 is responsible of the overestimation of the amino-acid identity percentage announced (29%) between the two ORF-2. Amino-acid sequences translated of *AcNPV* nucleotidic sequence in the 3 ORF possible and was compare with this similarly deduced of *LdNPV* (data no shown). No significant homologies were found, therefore, few similitude between *AcNPV* and *LdNPV* ORF-2 peptidic sequence can not be ascribed at a sequence mistake generating a frame shift when sequences was translated. The entire sequenced *AcNPV* ORF-2 was analyzed on GenPro, SWISSPROT and NBRF-PIR protein data bank and no homology or known peptidic motif was found (data no shown).

To further characterize ORF-2 gene, we mapped the transcription termination site by RNase protection using the 235 bp *EcoRI* restriction fragment (Fig 1A) previously cloned in homologous site of pBKS₂⁺ plasmid (Stratagene Cloning System) (pBKS₂⁺*EcoRI*-235). This plasmid was cut by *HindIII* and *in vitro* transcribed with *in vitro* transcription kit (Stratagene Cloning System) to generate a 311 nucleotides long, ³²P radiolabeled, ORF-2 specific riboprobe (Fig 3B). This probe overlap the end of the

ORF-2 (Fig 3B). SF9 cells were infected by AcNPV (strain 1-2) as previously described (6). Total cellular RNA was extracted using guanidium thiocyanate (2) 0, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12 and 24 hrs post infection and 5 micrograms of RNA were submitted to RNase protection essentially as previously described (3). In this essay, the 311 nucleotides long probe present two main protected fragments with sizes approximately 241/231 and 139/129 nucleotides. There appeared between 6 and 8 hrs post infection and remained during infection (Fig 3A). Signal intensity of protected fragments was equivalent (data no shown) to those observed in similar condition for the main transcription inhibition site of ORF-2 gene (6), suggesting that there is no internal transcription terminator. RNA abundance are similar (data no shown). When cells were treated as previously described (6) by cycloheximide or aphidicolin drugs which inhibit respectively delayed early and late or only late transcription, no signal was observed 24 hrs post infection (Fig 3A line c and a). This confirms that mapped transcripts belong to late transcription category. As late transcripts always initiate at a "TAAG" sequence and no "TAAG" is present between start site and the actually mapped region, those transcripts must initiate at the ORF-2 initiation site.

The 241/231 nucleotides long protected fragments match well with 235 nucleotides long full length protected probe, this means that the transcription termination is located after *EcoRI* site, possibly at the "AATTAA" signal located 162 bp downstream the ORF-2 stop codon (Fig 3B). The 139/129 long protected fragment reveals that transcripts are polyadenylated 27 at 37 nucleotides after the "AATTAA" signal of the stop codon (Fig 3B). This in good agreement with the fact that the "AATAAA" type sequence typically located 10/35 bp upstream polyadenylation site (9). The longer protected fragment give stronger signal (Fig 3A) but have a higher specific activity (proportional at fragment length). Therefore, we estimated that half of ORF-2 transcripts stop just after stop codon.

The AcNPV ORF-2 has been submitted to EMBL, accession number : xxxxxx).

This research was supported by the grant 7807 (to M.O.) from Société Nationale ELF Aquitaine. We thank Dr M. Lopez for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- 1 **Bjornson, R. M., B. Glocker, and J. F. Rohrmann.** 1992. Characterization of the nucleotide sequence of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase gene region. *J. Gen. Virol.* **73**:3177-3183.
- 2 **Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
- 3 **Gilman, N.** 1993. p401-478 in F.M. Ausubel (ed.), *Current protocols in molecular Biology*, vol. 1 John Wiley and Sons, New-York.
- 4 **Guarino, L. A., and M. D. Summers.** 1987. Nucleotide sequence and temporal expression of a baculovirus regulatory gene. *J. Virol.* **61**:2091-2099.
- 5 **Huybrechts, R., L. Guarino, M. Van Brussel, and V. Vulsteke.** 1993. Nucleotide sequence of a transactivating *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus immediate early gene. *Biochimica Biophysica Acta.* **1129**:328-330.
- 6 **Ohresser, M., N. Morin, M. Cerutti, and C. Delsert.** 1994. Temporal regulation of a complex and unconventional promoter by viral products. *J. Virol.* in press.
- 7 **Pearson, M. N., R. M. Bjornson., C. Ahrens., and G. F. Rohrmann.** 1993. Identification and characterization of putative origin of DNA replication in the genome of a baculovirus pathogenic for *Orgyia pseudosugata*. *Virology* **197**:715-725.
- 8 **Tomalski, M.D., J. Wu, and L. K. Miller.** 1988. The location, sequence, transcription and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology* **167**:591-600.
- 9 **Wahle, E., and W. Keller.** 1992. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursor. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:419-440.
- 10 **Zanotto, P. M. A., B. D. Kessing, and J. E. Maruniak.** 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses : evolutionary rates and host associations. *J. Invert. Pathol.* **62**:147-164.

Legends of the figures

Fig. 1. Map and sequence of *AcNPV* ORF-2 gene

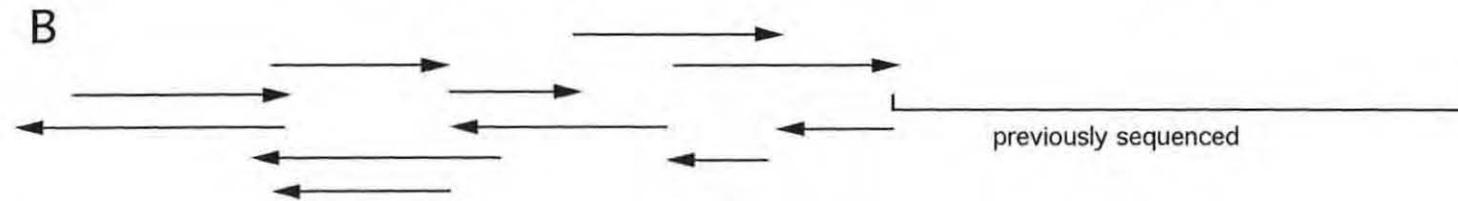
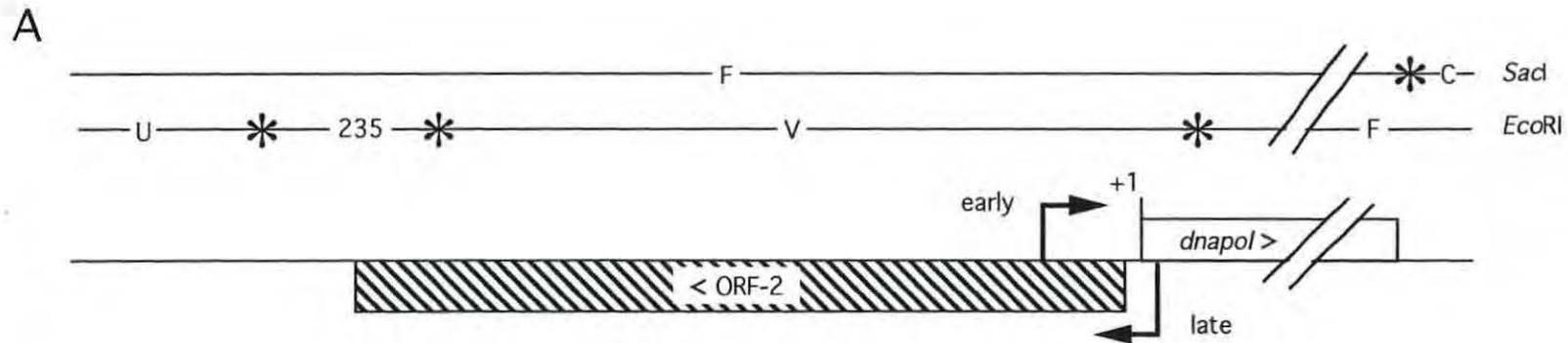
Panel A. Location of ORF-2 (hatched box) relative to *dnapol* ORF (empty box) is indicated on *AcNPV* genome map. Broken arrows locate early or late transcription start-site as indicated, +1 indicated the origin of nucleotide numeration used for list sequence. Asterisk on a line indicate the position of restriction sites of enzymes indicated on the right side of the line. When located one a the same line, capital letter or number are the name give at corresponding restriction fragment. Panel B. Strategy followed for DNA sequencing is indicated : each arrow represent a independently characterized sequence. Panel C. ORF-2 nucleotide sequence is show : numeration is respective of *dnapol* gene initiation codon, lower-case is the previously reported sequence. Transcription start-site are underline; ORF-2 translation start and stop codons are boxed; putative polyadenylation signals are underline; *EcoRI* recognition sequences are in bold.

Fig. 2. Comparison of peptidic sequence of *AcNPV* and *LdNPV* ORF-2.

Panel A. Deduced amino-acid sequences of *AcNPV* and *LdNPV* ORF-2 was compared with window size of 7 amino-acids (one mismatch accepted) on the basis of chemical homologies. The result is shown on a dot matrix. Panel B. The same peptidic sequence was aligned using the main sequence homology stretch. Numbering start on the first amino-acid; asterisk mean match; dash mean gap.

Fig. 3. 3' end mapping of ORF-2 RNA.

Panel A. RNA extracted of cells after 0, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 24 hrs post infection (as indicated above line) and 24 hrs post infection with cycloheximide (lane c) or aphidicolin (lane a) treatment was used to protect a ORF-2 3' region specific probe witch was also migrated undigested (lane P). Panel B. The main features of the viral DNA and RNA, of probe and of generated fragments are schematized. E, *EcoRI* site; polyA for putative transcription terminator; track of A represent polyadenylation tail; number are sizes indicated in nucleotides.



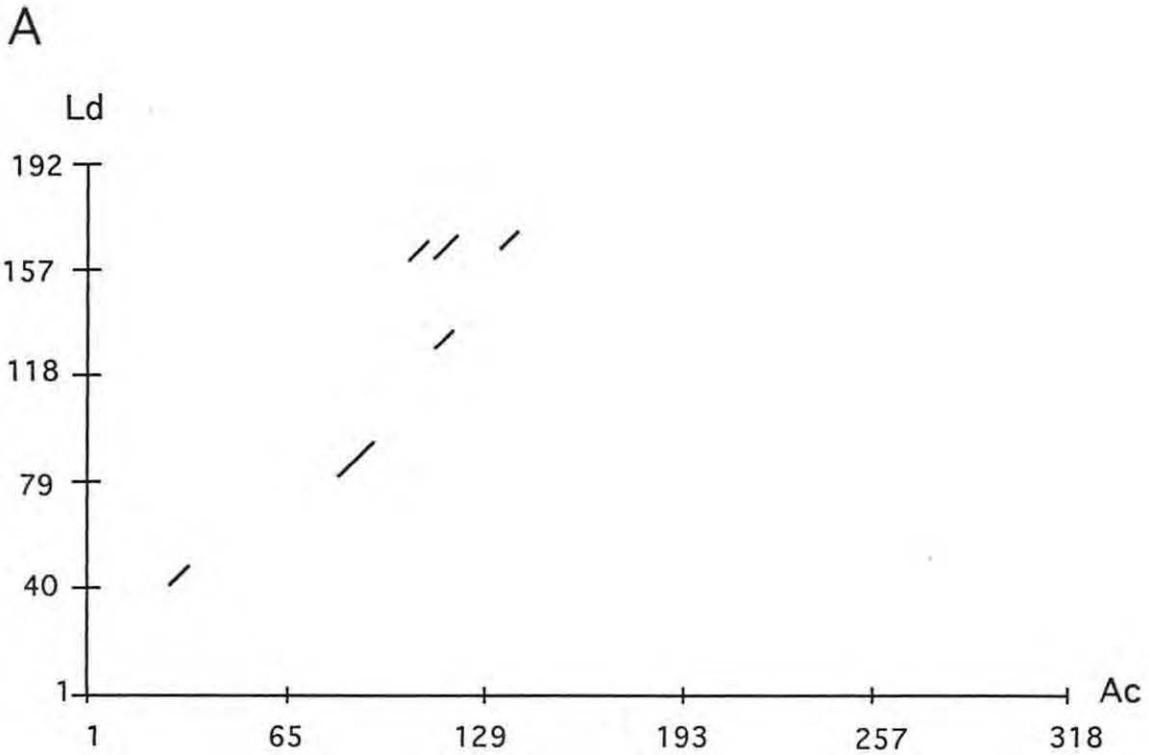
C

```

-1311                                     T CAAATGTCGA
-1300 TTCTATTCTT CTTTGTGAGTT TATAAATGTC CTCGTTCAAC TGGCGATTCA TGTTTTTATA TTCGTCCAAA TCGCCTTTTT GCAATTGTAT TTCAGACAAT
-1200 CTTTCGGCAT TTTCATCTCT CAATTTCTGT ACGGTGTCGT TGAGTCTTT GTTGGATCTC TCTAATTGTT TAATTTTTTCG CACGTTTTCA CTTTTTTGTT
-1100 GTGCGAATTC ACTTTGTCT TCAAATATCT CTTTATACCT TAAATCCAAC TCGTCGTATT GCGATTGCAG AGTTTCCACT CTTTCGTTTG CAATTCTATG
-1000 TTGCTCGCTG ATTTGTTGCA TCAAAGCGCG TTCTCTTTT AATTGTTCTT GCAAATTTGA AATGACGATA TCGCTGTTGA CGTTTCCACG GTCGGAGGAG
-900 AAAGAGGAGC CGCGCTTTGA AGTATGCTCG TTTGAATCT TGTGTAAAGT TCGTTAGAGT ATTGGGTCAA TTGGTCAAAA GTGGTGAACT GAAAATTTGT
-800 TCGCATCACC AAATAAAGA CTCTAGTAAA AAAATCTATA AACGTAACTA TGTTAGTGCA CAGATACTGA TCTATTGCAA AACGTATGTT TGTTTTTTGG
-700 TATACGCATC TAATAAATTC TGTAATAATG TAATCAATTA ATGTTTCGAAC GGAAGTTATA GACGATATAA CGTTAATCAT GGTCACGTTG TTTACTACGT
-600 GCACGCGTAC GATCCTGATT AACACTTCAA CGAAATTTTG AACAAGTTCC CAAGTCATGT TCGTTTGCAT GTTTTTAAAT AAAGCCGCCA GTTCAGACTC
-500 CTCCTCGTTA GTC AACGTGA TTTGATTCAA ACTTTGCGAG CCGCCGACGC CCGCGACGTT CGATTCTGGC GGCTGTGTTG GCGGCGGTGT CGAAAACGGA
-400 TACGGCGGAT AATACGGATA ATTGTTGTAA TACGGTGGTT GAGGTGGCGC GGGGGTTGA ggaggcggtg ggggtggttg catcgcgggc acgggcgcg
-300 gcgataaatt gtaatogtac ttgtagttga tgttgctcgt caacgtgttg atatctcggc gggcgaatc cgataaaaat tgcataatca acgcccagcag
-200 agcgtcgggt tcaaagctat gtgtgttcgc ggaocggttc aaaattacaa cgactttgtg aatctctcgc aaagcgtgct cataccgctc cagagttttg
-100 attcagacac tcatgggtgtt tatgggtgtt aacaaatcgt gtacagtgcg cgtgttgacg totgtgocct catatttggg ccacgctgc atatttaaaa
+1 atgaaaatat atccttaca tgaactcaaa acgocgtttg cagaatatgc aaaaccagga gaattc...

```

Fig. 2



B

```

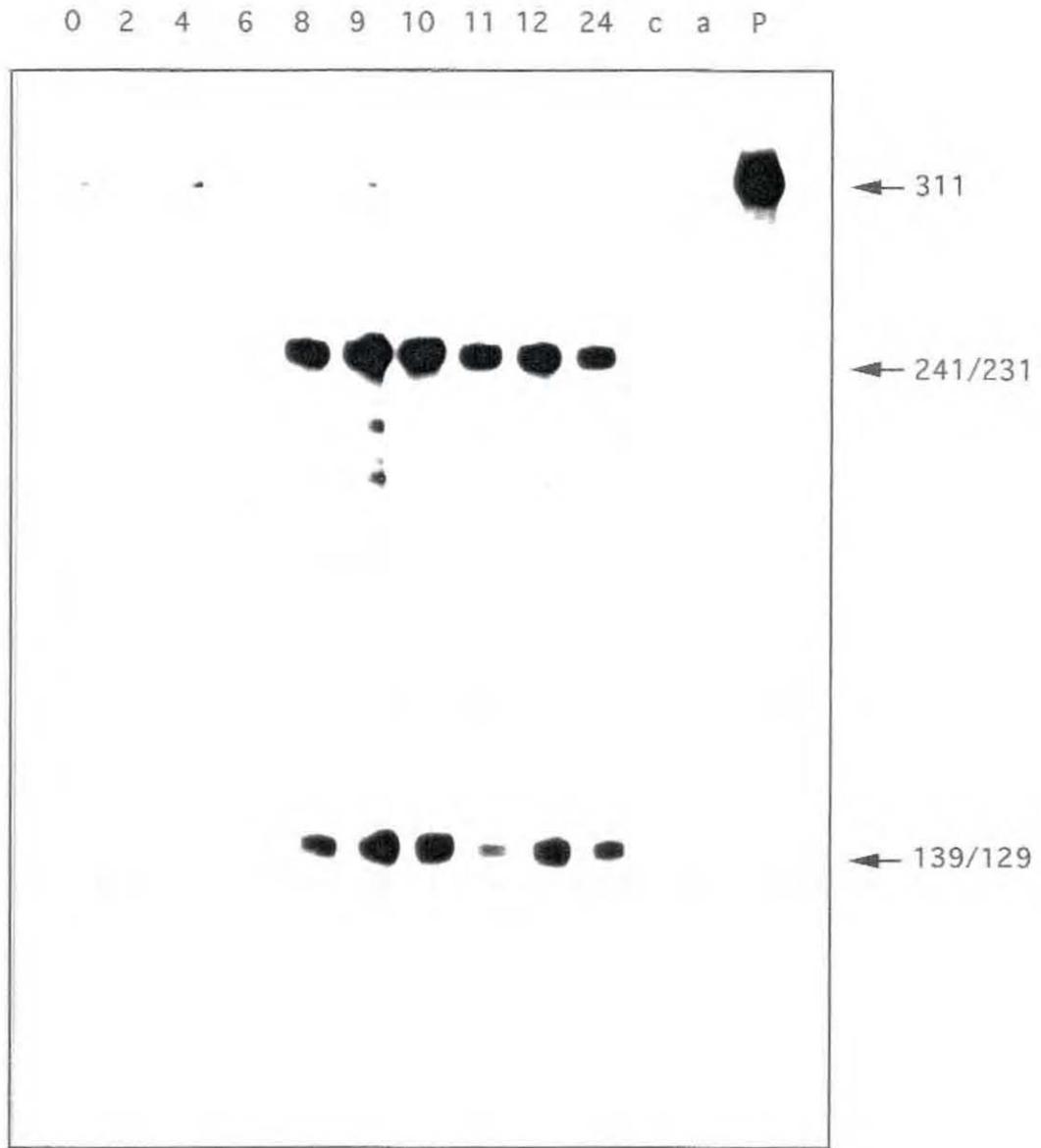
Ac  +1 MQRWPKYG-GTD-VNT-RTVHDLLNTINTMSARIKTLERYEHALREIHKVVVILKPSANTHSFEP +62
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ld  +1 -MASYRYRAPTRYINADVSDNLLRTIDSMSRQCRSRNETESELARVRSII-TLYRP-HLQNRVD +62

Ac  +63 DALPALIMQFLSDFAGRDINTLTHNINYKYDYNYPAPVPAMQ----- +105
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ld  +63 LQVAELVLEALMPPNGA--QQITHNFNYKYDYNTNSAAAPPRLLSRRAAAPDRRVRRADRPVRTD +135

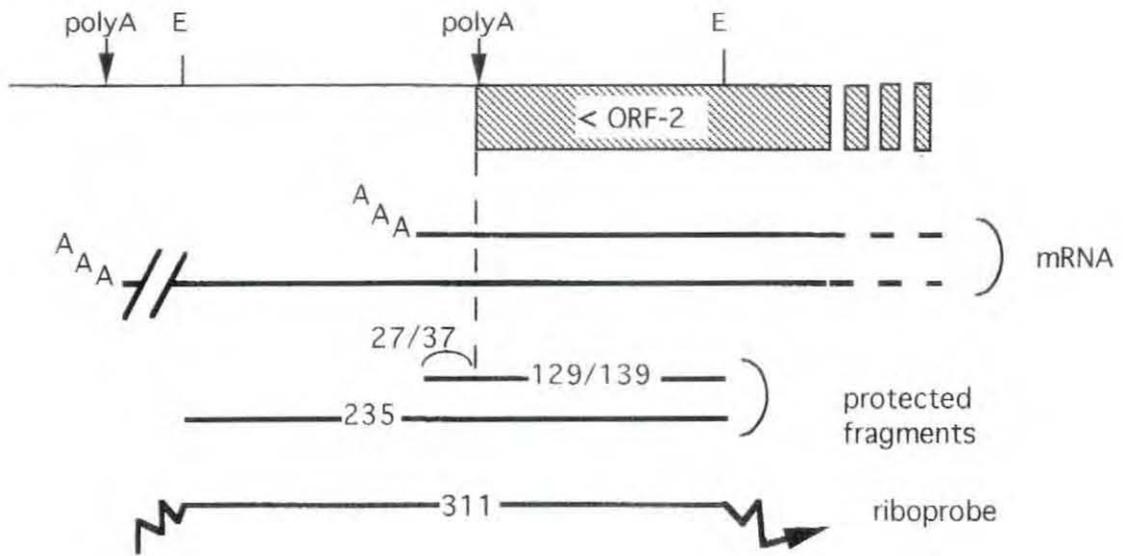
Ac  +106 --PPPPPPQPPAPPQPPYNNYPYPPYPFSTPPPTQPPESNVAGVGGSQSLNQITLTNEEESELAA +170
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ld  +136 APSPPPPPKADAPNPIQQNVYINSAGEAARPSSPRPPPPPPASGGGASRSCKWTTPTNWRSRRTTTTPR +192

Ac  +171 LFKNMQTNMTWELVQNFVEVLIRIVRVHVVNNVTMINVISSITSVRTLIDYNFTEFIRCVMYQKTNI +236
Ac  +237 RFAIDQYLC TNIVTFIDFFTRVFYLV MRTNFQFTTFDQLTQYSNELYTRIQT SILQSAAPLSPTV +301
Ac  +302 ETSTAIS SFQICKNN +318
    
```

A



B



La séquence d'acides aminés de l'ORF-2 d'*AcNPV* est plus longue que celle de *LdNPV*. Toutefois, de rares régions d'homologies permettent d'aligner la séquence de *LdNPV* sur le début de celle d'*AcNPV*. Aucun motif peptidique connu n'a été identifié sur la portion du gène nouvellement séquençée. La cartographie de l'extrémité 3' des ARN du gène de l'ORF-2 ajoutée à l'analyse de la séquence et aux travaux précédents (**publication 2**) nous permettent d'identifier ce gène comme étant transcrit de façon tardive conventionnelle. La conservation de la localisation de ce gène entre deux virus distant reste étonnante.

CONCLUSION

Les conditions ont été définies pour la transformation stable de cellules de lépidoptère SF9 avec des vecteurs dérivés de séquences cellulaires ou de séquences du densovirus *JcDENV*. Au cours de ce travail de mise au point, nous avons montré principalement la co-intégration d'ADN plasmidique dans la cellule et la présence d'une séquence virale, probablement dans l'ITR gauche de *JcDENV*, activant en *cis* la transcription d'un promoteur hétérologue et dépendant uniquement de facteurs cellulaires. Cette activation possède certaines propriétés des séquences de type "enhancer" présentes dans des génomes viraux mais elles n'ont jamais été détectées chez les *Parvoviridae*. Cette découverte fortuite aurait besoin d'être confirmée par des expériences complémentaires permettant de localiser précisément la séquence responsable de l'activation et de confirmer sa capacité d'activation sur d'autres promoteurs. Les propriétés d'intégration non spécifique de l'ADN dans le génome cellulaire ont été confirmées pour les cellules de lépidoptères. Ceci fait paraître ce phénomène comme étant commun aux cellules animales et pourrait donc être utilisé dans le cadre de l'expression de gènes dans des organismes tels que les crustacés.

Après cette première approche, nous avons étudié les possibilités d'inhibition de gènes de baculovirus sur un modèle. Il consiste en un système biologique d'insecte lépidoptère. Les cellules utilisées sont celles pour lesquelles nous avons défini les modalités d'expression stable. Le virus est le baculovirus *AcMNPV* dont la régulation moléculaire est la mieux connue parmi les virus d'insectes. Les vecteurs d'expression optimisés ont été utilisés pour exprimer de façon constitutive des séquences d'ARN anti-sens dans des cellules SF9. Ces ARN anti-sens ont été définis sur des gènes précoces ou essentiels à la réplication de l'ADN. En parallèle à la transformation stable, des expériences ont été conduites en expression transitoire des ARN anti-sens et des gènes viraux à inhiber. Ces expériences ont mis en évidence l'activation en *trans* du gène *ie1* d'*AcMNPV* sur le promoteur du gène cellulaire *A3*. Une telle activation n'avait été rapportée que sur des gènes viraux. Dans cette étude, nous avons choisi le promoteur du gène *A3* pour contrôler la transcription des ARN anti-sens. Ce choix a été fait afin que les ARN anti-sens ne soient pas régulés par le virus. Les résultats montrent que cela n'était pas nécessaire puisque un gène cellulaire est influencé par un produit viral. L'étude comparative de l'activité des promoteurs des gènes cible viraux *ie1*, *ie0* et *dnapol* d'une part et du gène cellulaire *A3* de *Bombyx mori* utilisé pour transcrire les ARN anti-sens d'autre part a montré une activité plus faible du promoteur de *A3*. Bien que ce résultat demande confirmation pour d'autres gènes cellulaires, il semble que les gènes viraux soient de façon générale, et comme cela est vérifié pour les systèmes biologiques mieux étudiés, plus actifs que les gènes cellulaires. Pour une utilisation en cellules de

lépidoptère non infectées, peu de comparaisons d'activité de promoteur sont disponibles. Les promoteurs précoces de baculovirus semblent les plus actifs parmi les promoteurs connus. D'autre part, les séquences régulatrices de la transcription du gène A3, telles qu'elles sont utilisées dans notre étude, possèdent un promoteur supplémentaire actif en orientation inverse. Cette caractéristique qui est rédhibitoire pour l'expression des ARN anti-sens, qui doivent être présents dans la cellule en grand excès par rapport aux ARN complémentaires, nous montre l'intérêt d'utiliser un terminateur de transcription bi-directionnel. Comme cela était prévisible compte tenu des conclusions précédentes sur les conditions d'expression des ARN anti-sens, la co-expression d'ARN anti-sens et des gènes viraux cible n'a pas conduit à leur inhibition. Tenant compte des résultats obtenus en expression transitoire, l'expression stable et l'analyse des effets des mêmes séquences anti-sens n'ont pas été étudiées. De plus, l'expression stable des ARN anti-sens en utilisant notre vecteur optimal ne dépasse que de peu le niveau de la transcription du gène cible (résultats non présentés) en optimisant la multiplicité d'infection et le temps d'infection (résultats non présentés).

La mise au point de l'expression transitoire du gène *dnapol* et la découverte fortuite d'un ARN anti-sens naturel induit durant l'infection, alors que la transcription de *dnapol* décroît, nous a conduit à étudier la relation existant entre ces deux séquences. Le gène *dnapol* est un gène précoce nécessitant la présence de la protéine IE1 pour être transcrit de façon transitoire. IE1, dont nous avons montré l'expression continue au cours de l'infection virale à l'aide d'un anticorps, induit la transcription à partir d'un site d'initiation nouveau qui est le site principalement utilisé durant l'infection. L'initiation des ARN transcrits en orientation inverse sur le promoteur du gène *dnapol* a été localisée à partir d'un promoteur tardif situé dans la séquence codante du gène. La chute d'ARNm de *dnapol* détectable n'est pas due à une déstabilisation de l'ARN. Nous avons par ailleurs déterminé que la transcription des ARN anti-sens n'était pas responsable de l'inhibition de la transcription de *dnapol*. En effet, parmi les gènes de baculovirus présentant des ARN anti-sens, une inhibition par antagonisme de promoteurs a été déterminée. Une série de délétions a déterminé une région minimale, commençant juste en amont de la séquence de type "TATA box", permettant l'activation en *trans* du promoteur de *dnapol*, ce qui avait déjà été déterminé pour d'autres promoteurs de baculovirus. La même région minimale suffit également à l'inhibition de la transcription en fin d'infection, ce qui suggère que ce phénomène est en relation avec IE1. La détection de modification de cette protéine multifonctionnelle pourrait être l'objet de la poursuite de ce travail.

La présence des ARN anti-sens sur le promoteur de *dnapol* pourrait être fortuite si elle n'était présente exactement à la même localisation sur les génomes AcMNPV et LdMNPV très éloignés d'après l'arbre phylogénétique des baculovirus. Nous avons séquencé complètement la séquence codante de ce gène anti-sens sur le génome

d'*AcMNPV* et caractérisé sa transcription. La protéine du gène, transcrit comme un gène tardif, ne possède pas de motif peptidique particulier et est très faiblement conservée entre les deux baculovirus. La présence et la localisation du gène anti-sens de *dnapol* pourraient être vérifiées sur d'autres baculovirus. Un anti-sérum spécifique serait utile pour déterminer la fonction de ce gène.

Notre travail a consisté essentiellement à contribuer à la connaissance générale de ce couple cellule-virus, peu étudié par rapport à ceux de vertébrés, aussi bien en ce qui concerne les cellules de lépidoptères que pour les baculovirus. Le manque de données quantitatives et qualitatives sur le promoteur cellulaire utilisé pour exprimer des ARN anti-sens ne nous a pas permis d'aborder favorablement les possibilités d'inhibition. Pour cette approche, d'autres promoteurs plus actifs seraient souhaitables, probablement des promoteurs viraux. D'après les données bibliographiques récentes concernant les baculovirus, deux possibilités d'inhibition de la réplication virale émergent. La co-expression de gènes *iel* mutant permet l'inhibition des propriétés d'activation de la transcription de *iel* dont les propriétés connues sont de plus en plus étendues. L'expression constitutive ou plutôt induite par le virus d'un tel mutant dans les cellules pourrait permettre d'inhiber certaines de ces fonctions. D'autre part, les phénomènes d'inhibition de l'apoptose ont été étudiés de façon accrue pour les baculovirus. Des mutants de certains gènes viraux responsables de cette inhibition conduisent à une baisse significative de l'efficacité de la réplication virale. Dans des perspectives de protection de crustacés, il peut être intéressant d'initier l'apoptose en début d'infection. D'autre part, L'expression de gènes hétérologues dans la cellule d'insecte est capable de provoquer ce phénomène. Le caractère inductible de certains promoteurs de baculovirus pourrait orienter une éventuelle poursuite de ces travaux vers l'initiation précoce du phénomène d'apoptose par le virus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agris, C.H., Blake, K.R., Miller, P.S., Reddy, M.P., Ts'o, P.O.P., 1988.** Inhibition of vesicular stomatitis virus protein synthesis and infection by sequence-specific oligodeoxynucleotides methylphosphonates. *Biochemistry*, **25**, 6268-6273.
- Alnemri, E.S., Roberson, N.M., Fernandes, T.F., Croce, C.M., Litwack, G., 1992.** Over-expressed full-length human BCL2 extends the survival of baculovirus infected SF9 insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7295-7299.
- Alt, F.W., Kellems, R.E., Bertino, J.R., Schmieke, R.T., 1978.** Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J. Biol. Chem.*, **252**, 1357-1370.
- Anderson, R.A., Kato, S.K., Camierini-Otero, R.D., 1984.** A pattern of partially homologous recombination in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 206-210.
- Anderson, R.A., Eliason, S.L., 1986.** Recombination of homologous DNA transfected into mammalian cells occurs predominantly by terminal pairing. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 246-252.
- Anderson, I.G., Prior, H.C., 1992.** Baculovirus infections in the mud crab, *Scylla servata* and a fresh water crayfish, *Cherax quadricarnatus*, from Australia. *J. Fish Pathol.*, **66**, 256-273.
- Argawal, S., Goodchild, J., Civeira, M., Thornton, A., Sarin, P., Zamecnik, P., 1988.** Oligodeoxynucleoside phosphoramidates and phosphorothioates as inhibitor of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7079-7083.
- Berger, E.M., Marino, G., Torrey, D., 1985.** Expression of *Drosophila* hsp70-CAT hybrid gene in *Aedes* cells induced by heat shock. *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **11**, 371-377.
- Bishop, J.O., Smith, P., 1989.** Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. *Mol. Biol. Med.*, **6**, 283-298.
- Bjornson, R.M., Glocker, B., Rohrmann, J.F., 1992.** Characterization of the nucleotide sequence of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase gene region. *J. Gen. Virol.*, **73**, 3177-3183.
- Blinov, V.M., Gutorov, V.V., Holodinov, N.G., Iljichev, A.A., Karginov, V.A., Mikrjukov, V.V., Morduinov, V.A., Nikonov, J.V., Petrov, N.A., Urmanov, I.H., Vasilenko, S.K., 1984.** Nucleotide sequence of the *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus origin of DNA replication. *FEBS Lett.*, **167**, 254-258.
- Blissard, G.W., Rohrmann, F., 1990.** Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.*, **35**, 127-55.

- Blissard, G.W., Rohrmann, F., 1991.** Baculovirus gp64 gene expression : analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. *J. Virol.*, **65**,5820-5827.
- Bonami, J.R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., Lightner, D.V., 1990.** Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**,2657-2664.
- Bourouis, M., Jarry, B., 1983.** Vectors containing a procaryotic dihydrofolate reductase gene transform cells to methotrexate-resistance. *EMBO J.*, **2**,1099-1104.
- Brock, J.A., Vakawa, L.K., Van Campen, H., Hayashi, T., Teruka, S., 1986.** A record of *Baculovirus penaei* from *P. marginatus* Randall in Hawaii. *J. Fish Dis.*, **9**,353-355.
- Bruce , L.D., Trumper, B.B.,Lightner, D.V., 1991.** Methods for viral isolation and DNA extraction for a penaeid shrimp baculovirus. *J. Virol. Methods*, **34**,245-254.
- Burke, J.F., Pinchin, S.M., Ish-Horowicz, D., Sinclair, J.H., Sang, J.H., 1984.** Integration of *Drosophila* heat-shock genes transfected into cultured *Drosophilamelanogaster* cells. *Somat. Cell Mol.Genet.*, **10**,578-588.
- Carbonell, L.F., Klowen, M.J., Miller, L.K., 1985.** Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J. Virol.*, **56**,153-160.
- Carroll, S.M., Gaudray, P., De Rose, M.L., Emery, J.F., Meinkoth, J.L., Nakkin, E., Subler, M., Von Hoff, D.D., Wahl, G.M., 1987.** Charaterization of an episome produced in hamster cells that amplify a transfected CAD gene at high frequency : functional evidence for a mammalian replication origin. *Mol. Cell. Biol.*, **7**,1740-1750.
- Carson, D.D., Guarino, L.A., Summers, M.D., 1988.** Functional mapping of a AcNPV immediate early gene which augments expression of the IE1 trans-activated 39K gene. *Virology*, **162**,444-451.
- Carson, D.D., Summers , M.D. Guarino, L.A., 1991a.** Transient expression of the *Autographacalifornica* nuclear polyhedrosis virus immediate early gene, IE-N, is regulated by three viral elements. *J. Virol.*, **65**,945-951.
- Carson, D.D., Summers, M.D., Guarino, L.A., 1991b.** Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. *Virology*, **182**,279-286.
- Carstens, E.B., Lu, A.L., Chan,L.B., 1993.** Sequence transcriptional mapping and overexpression of p47, a baculovirus gene regulationg late gene expression. *J. Virol.*, **67**,2513-2520.
- Challberg, M.D., Kelly, T.J., 1989.** Animal virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**,671-714.

- Chatterjee, S., Johnson, D.R., Wong, K.K., 1992.** Dual target inhibition of HIV-1 *in vitro* by means of a adeno-associated virus anti-sense vector. *Science* (Washington), **259**,1485-1488.
- Chang, L.-J., Stoltfus, C.M., 1985.** Gene expression of both intron-less and intron-containing Rous sarcoma virus is specifically inhibited by anti-sense RNA. *Mol. Cell. Biol.*, **5**,2341-2348.
- Chang, P.S., Lo, C.-F., Kou, G.-H., Lu, C.C., Chen, S.N., 1993.** Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *J. Invertebr. Pathol.*, **62**,116-120.
- Charlton, C.A., Volkman, L.E., 1993.** Penetration of *Autographa californica* nuclear polyherdosis virus nucleocapsids in IPLB SF21 cells induces actine cable formation. *Virology*, **197**,245-254.
- Chen, S.N., Chi, S.C., Kou, G.H., Liao, I.C., 1989.** Cell culture from tissues of grass prawn, *Penaeus monodon*. *Fish Pathol.*, **21**,161-166.
- Chen, S.N., Chang, P.S., Lo, C.F., Kou, G.H., 1992.** Application of biotechnology on the detection of *Penaeus monodon*. 8th int. Colloq. Pathol. Mar. Aquacult., 2-4 May 1992, Montpellier (France).
- Chiang, M.Y., Chan, H., Zounes, M.A., Frieier, S.M., Lima, W.F., Bennet, C.F., 1991.** Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule1 expression by two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **266**,18162-18171.
- Chisholm, G.E., Henner, D.J., 1988.** Multiple early transcription and splicing of the *Autographacalifornica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J. Virol.*, **62**,3193-2200.
- Chu, G.H., Hayawa, H., Berg, P., 1987.** Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.*, **15**,1311-1326.
- Clem, R.J., Fechheimer, M., Miller, L.K., 1991.** Prevention of apoptosis by baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* (Washington), **254**,1388-1390.
- Clough, D.W., Lepsinske, H.M., Davidson, R.L., Storti, R.V., 1985.** *Drosophila* P element-enhanced transfection in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **5**,898-901.
- Cochran, M.A., Faulkner, P., 1983.** Location of homologous DNA sequences intersped at five regions in baculovirus AcMNPV genome. *J. Virol.*, **43**,961-970.
- Cohen, J.S., 1991.** Antisense oligodeoxynucleotides as antiviral agents. *Antiviral Res.*, **16**,121-133.
- Couch, J.A., 1974a.** An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp, ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invertebr. Pathol.*, **24**,311-331.

- Couch, J.A., 1974b.** Free and occluded virus, similar to baculovirus, in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature* (London), **247**,229-231.
- Couch, J.A., 1978.** Diseases, parasites, and toxic responses of commercial penaeid shrimps of the gulf of Mexico and Southd Atlantic coasts of North America. *Fish Bull.*, **76**,1-44.
- Crawford, A.M., Miller, L.K., 1988.** Characterization of a early gene accelerating expression of late gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **62**,2773-2781.
- Croizier, G., Croizier, L., Quiot, J.M., Lereclus, D., 1988.** Recombination of *Autographacalifornica* and *Rachiplusia ou* nuclear polyhedrosis viruses in *Galleria mellonella* L.. *J. Gen. Virol.*, **169**,177-185.
- Croizier, G., Croizier, L., Argaud, O., Poudevigne, D., in press.** Extention of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*.
- Crook, N.E., Clem, R.J., Miller, R.K., 1993.** An apoptosis inhibiting baculovirus gene with zinc finger-like motif. *J. Virol.*, **67**,2168-2174.
- Dickson, J.A., Friesen, P.D., 1991.** Identification of upstream promoter elements mediating early transcription from the 35000-molecular-weight protein gene of *Autographacalifornica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.*, **65**,4006-4016.
- Di Nocera, R., David, I.B., 1983.** Transient expression of genes introduced in cultured cells of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**,7095-7098.
- Dobos, P., Cochran, M.A., 1980.** Protein synthesis in cells infected by *Autographacalifornica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) : the effect of cytosine arabinosine. *Virology*, **103**,446-464.
- Doubrosky, A., Paynter, J.L., Sambli, S.K., Atherton, J.G. et Lester R.J.G., 1988.** Observation on the ultrastructure of baculovirus in Australian *Penaeus monodon* and *Penaeus merguensis*. *Aust. J. Mar. Fresh Water Res.*, **39**,743-752.
- Draper, K.G., Ceruzzi, M., Kmetz, M.E., Sturzenbecker, L.J., 1990.** Complementary oligonucleotide sequence inhibits both vmw65 gene expression and replication of herpes simplex virus. *Antiviral Res.*, **13**,151-164.
- Dumas, B., Jourdan, M., Pascaud, A.M., Bergoin, M., 1992.** Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia coenia* densovirus reveals an organisation unique among *Parvoviridae*. *Virology*, **191**,202-222.
- Durbin, J.E., Fallon A.M., 1985.** Transient expression of the chloramphenicol acethyl transferase gene in cultured mosquito cells. *Gene*, **36**,173-178.
- Ernst, L.K., Zakuharchesiko, V.I., Suraeva, N.M., Ponomareava, T.I., Miroshnichenko, O.I., Prokofev, M.I., Tikchonenko, T.I., 1991,**

- Transgenic rabbits with antisense RNA gene targeted at adenovirus 5. *Therianology*, **35**,1258-1271.
- Fegan, D.F., Flegel, T.W., Sriurairata, S., Waiyakruttha, M., 1991.** The occurrence, development and histology of baculovirus in *Penaeus monodon* in southern Thailand. *Aquaculture*, **96**,205-217.
- Ferstein, S., Ross, S., Yamamoto, K., 1982.** Chromosomal position effects determine transcriptional potential of integrate mammary tumor virus DNA. *J. Mol. Biol.*, **156**,549-565.
- Folger, K.R., Wong, E.A., Wahl, G., Capecchi, M.R., 1982.** Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells : evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol. Cell. Biol.*, **2**,1372-1387.
- Folger, K.R., Thomas, K., Capecchi, M.R., 1985.** Non reciprocal exchange of information between DNA duplexes coinjected into mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **5**,59-63.
- Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., Brown, F. (Eds.), 1991.** Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer Verlag, Wien. 450p.
- Fukushig, S Sauer, B., 1992.** Genomic targeting with a positive-selection *lox* integration vector allowing highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**,7905-7909.
- Giraud, C., Devauchelle, G., Bergoin, M., 1992.** The densovirus of *Junonia coenia* (JcDENV) as a insect cell expression vector. *Virology*, **186**,207-218.
- Glocker, B., Hoops, R.R., Rohrmann, G.F., 1992.** *In vitro* transactivation of baculovirus early genes by nuclear extracts from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.*, **66**,3476-3484.
- Granados, R.R., Federici, B.A., 1986.** The Biology of Baculovirus. Volume 1. CRC Press. Boca Raton, Florida. 276p.
- Gruhl, M.A., Buller, P.L., Weaver, R.F., 1981.** Alfa-amanitine-resistant RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.*, **38**,916-921.
- Grumet, R., 1990.** Genetically engineered plant virus resistance. *HortScience*, **25**,508-513.
- Guarino, L.A., Gonzalez, MA., Summers, M.D., 1986.** Complete sequence and enhancer function of the heterologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **60**,224-229.
- Guarino, L.A., Summers, D.M., 1986a.** Functionnal mapping of trans-activating gene required for expression of baculovirus delayed-early gene. *J. Virol.*, **57**,563-571.

- Guarino, L.A., Summers, M.D., 1986b.** Interspecied homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed early gene expression. *J. Virol.*, **60**,215-223.
- Guarino, L.A., Summers, M.D., 1987.** Nucleotide sequence and temporal expression of a baculovirus regulatory gene. *J. Virol.*, **61**,2091-2099.
- Guarino, L.A., Summers, M.D., 1988.** Functional mapping of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genes required for late gene expression. *J. Virol.*, **66**,463-471.
- Guarino, L.A., Smith, M.W., 1990.** Nucleotide sequence and characterization of the 39K gene region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, **179**,1-8.
- Guarino et Smith, 1992.** Regulation of a delayed early gene transcription by dual TATA boxes. *J. Virol.*, **66**,3733-3739.
- Guarino, L.A., Dong, W., 1991.** Expression of a enhancer-binding protein in insect cells transfected with the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *J. Virol.*, **65**,7,3676-3680.
- Guarino, L.A., Dong, W., Broussard, D.R., Davis, R.W., Jarvis, D.L., 1992.** Baculovirus phosphoprotein pp31 is associated with virogenic stroma. *J. Virol.*, **66**,7113-7120.
- Hamkalo, B.A., Farnham, P.J., Jahnston, R., Schmike, R.T., 1985.** Ultrastructural features of minute chromosomes in a methotrexate-resistant mouse 3T3 cellline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**,1126-1130.
- Hammock, R.D., Vlack, J.M., 1992.** Dissimilar expression of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin and p10 genes. *J. Gen. Virol.*, **73**,1481-1489.
- Helène, C. Toulmé, J.-J., 1990.** Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1049**,99-125.
- Hershberger, P.A., Dickson, J.A., Friesen, P.P., 1992.** Site specific mutagenesis of the 35-kiloDalton protein gene encoded by the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus : cell line-specific effects on virus replication. *J. Virol.*, **66**,5525-5533.
- Heywood, S.M., 1987.** tcRNA a naturally occurring antisense RNA in eucaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **14**,6771. Corrigendum, **15**,384.
- Hockenbery, D.M., Oltrai, Z.N., Lin, X.M., Milliman, C.L., Korsmyer, S.J., 1993.** Bcl-2 functions in a antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, **75**,241-251.
- Hoops, R.R., Rohrmann, G.F., 1991.** *In vitro* transcription of baculovirus immediate early genes : accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**,4513-4517.

- Huybrechts, R., Guarino, L., Van Brussel, M., Vulsteke, V., 1992.** Nucleotide sequence of a transactivation *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus immediate early gene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1129**,328-330.
- Huttner, K.M., Babosa, J.A., Scangos, G.A., Pratchera, D.D., Ruddle, F.H., 1981.** DNA-mediated gene transfer without carrier DNA. *J. Cell Biol.*, **91**,153-156.
- Jarvis, D.L., Fleming, J-A.G.W., Summers, M.D., 1990.** Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Biotechnology*, **8**,950-954.
- Jarvis, D.L., 1993.** Effects of baculovirus infection on IE1-mediated foreign gene expression in stably transformed insect cells. *J. Virol.*, **67**,2583-2591.
- Johnson, P.T., 1976.** A baculovirus from the blue crabs *Callinectes sapidus*. Proc. 1st Int. Colloq. Invertebr. Pathol., Kingston (Ontario), Canada, p. 24.
- Joshi, S., Brunshot, A.V., Asad, S., Van der Elst, I., Read, S.E., Bernstein, A., 1991.** Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 multiplication by antisense and sense RNA expression. *J. Virol.*, **65**,5524-5530.
- Kamita, S.J., Maeda, S.,1993.** Inhibition of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (NPV) replication the putative DNA helicase gene of *Autographa californica* NPV. *J. Virol.*, **67**,6239-6245.
- Katsuki, M., Sato, M., KIMURA, M., Yokoyama, M., Kobayashi, K., Nomura, T., 1988.** Conversion of normal behaviour to shinered by myelin basic protein antisense cDNA in transgenic mice. *Science (Washington)*, **241**,593-595.
- Kaufman R.J., Murtha, P., Ingolia, D.E., Yeung, C-Y., Kellens, R.E., 1986.** Selection and amplification of heterologous gene encoding adenosine desaminase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**,3136-3140.
- 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., Lescott, T., 1981.** Baculovirus replication : protein synthesis in *Spodoptera frugiperda* infected with *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *Microbiologica*, **4**,35-57.
- Kim, S.K., World, B.J., 1985.** Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high level of anti-sense RNA. *Cell*, **42**,129-138.
- Kmetz, M.E., Ceruzzi, M., Schwartz, J., 1991.** vnr65 phosphorothioate oligonucleotides inhibit HSV KOS replication and vnr65 protein synthesis. *Antiviral Res.*, **16**,173-184.
- Knebel, D.,Lübbert, H., Döerfler, W., 1985.** The promoter of the late p10 gene in nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* : activation by viral gene products and sensitivity to DNA methylation. *EMBO J.*, **4**,1301-1306.

- Knebel-Mörsdorf, D., Kremer, A., Jahnel, F., 1993.** Baculovirus gene ME53, which contains a putative zinc finger motif, is one of the major early transcribed gene. *J. Virol.*, **67**,753-758.
- Kondo, A., Maeda, S., 1991.** Host-range expansion by recombination of the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **65**,3625-3632.
- Kool, M., Van Den Berg, M.M.M., Tramper, J., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., 1993.** Location of two putative origin of DNA replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, **192**,94-101.
- Kotin, R.M., Siniscato, M., Samulski, R.J., Zhu, X., Hunter, L., Laughin, C.A., McLaughin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., Berns, K.I., 1990.** Site specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**,2217-2225.
- Kovacs, G.R., Guarino, L.A., Graham, B.L., Summers, M.D., 1991a.** Identification of spliced baculovirus RNAs expressed late in infection. *Virology*, **185**,633-643.
- Kovacs, G.R., Guarino, L.A., Summers, M.D., 1991b.** Novel regulatory properties of the IE1 and IE0 transactivators encoded by the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **65**,5281-5288.
- Kovacs, G.R., Choi, J., Guarino, L.A., Summers, M.D., 1992.** Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate early 1 transcription regulatory proteins. *J. Virol.*, **66**,7426-7437.
- Krappa, R., Behn-Krappa, A., Jahnel, F., Doerfler, W., Knebel-Mörsdorf, P., 1992.** Differential factor binding at the promoter of early baculovirus gene PE38 during viral infection : GATA motif is recognized by an insect protein. *J. Virol.*, **66**,3494-3503.
- Krappa, R., Knebel-Mörsdorf, D., 1991.** Identification of the very early transcribed baculovirus gene PE-38. *J. Virol.*, **65**,805-812.
- Laramore, R., 1977.** Shrimp disease studies in Panama. Priorities in Crustacean Disease Research, 17-18 November 1977. Texas A&M Univ., College Station (Tx), USA.
- Leblanc, B.D., Overstreet, R.M., 1990.** Prevalence of *Baculovirus penaei* in experimentally infected white shrimp (*Penaeus vannamei*) relative to age. *Aquaculture*, **87**,237-243.
- Leisy, D.J., Rohrmann, G.F., 1993.** Characterization of the replication of plasmids containing hr sequences in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology*, **196**,722-730.
- Lee, H.Y., Krell, P.J., 1992.** Generation and analysis of defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **66**,4339-4347.

- Lemaitre, M., Bayard, B., Lebleu, B., 1987.** Specific antiviral activity of poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequences complementary to vesicular stomatitis virus II protein mRNA initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**,648-652.
- Lightner, D.V., Proctor, R.R., Sparks, A.K., Adams, J.R., Heimpel, A.M., 1973.** Testing penaeid shrimp for susceptibility to an insect nuclear polyhedrosis virus. *Environ. Entomol.*, **2**,611-613.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1981.** A baculovirus caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Invertebr. Pathol.*, **38**,299-302.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Bell, J.A., 1983.** Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHN), a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invert. Pathol.*, **42**,62-70.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1985.** A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **45**,47-53.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1988.** New host and geographic record for the penaeid shrimp virus BP, MBV, IHHN and HPV. Abstr. 3rd Int. Colloq. Pathol. Mar. Aquacult., 2-6 october 1982, Gloucester Point (Virginia) USA, p.5-7.
- Lightner, D.V., 1988.** Diseases of cultured penaeid shrimps and prawns. (Sindermann, C.J., Lightner, D.V., Eds.) In : Disease Diagnosis and Control in North America Marine Aquaculture. Elsevier, Amsterdam, p. 8-127.
- Lightner, D.V., Bell, T.A., Redman, R.M., 1989.** A review of the known hosts, geographical range and current diagnostic procedures for the virus diseases of cultured shrimp. Proc. Colloq. Advances in Tropical Aquaculture Tahiti, February 20-March 4, Aquacop IFREMER. Actes de Colloque, p.113-126.
- Lin, C.C., Alitalo, K., Schwab, W., George, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., 1985.** Evolution of karyotypic abnormalities and C-MYC oncogene amplification in human colonic carcinoma cell lines. *Chromosoma*, **92**,11-15.
- Lu, A., Carstens, E.B., 1991.** Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, **181**,336-347.
- Lu, A., Carstens, E.B., 1992.** Transcription analysis of the *EcoRI* D region of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus identifies an early 4 kilobase RNA encoding the essential p143 gene. *J. Virol.*, **66**,655-663.
- Lu, A., Carstens, E.B., 1993.** Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **195**,710-718.
- Luckow, V.A., Summers, M.D., 1988.** Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology*, **6**,47-55.

- Maeda, S., Kamita, S.G., Kondo, A., 1993.** Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6 kilobase-paire DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *J. Virol.*, **67**,6234-6238.
- Malim, M.H., Bohnein, S., Hauber, J., Cullen, B.R., 1989.** Functional dissection of the HIV-1 Rev *trans*-activator-derivation of a *trans*-dominant repressor of Rev function. *Cell*, **58**,205.
- Marcus-Sekura, C.J., 1988.** Techniques for using antisense oligodeoxynucleotides to study gene expression. *Anal.Biochem.*, **172**,189-295.
- Mari, J., Bonami, J.R., Poulos, R., Lightner, D., 1993.** Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV=MBV). *Dis. Aquat. Org.*, **16**,207-215.
- Maisonhaute, C., Echaliier, G., 1986.** Stable transformation of *Drosophila* Kc cells to antibiotic resistance with bacterial neomycin resistance gene. *FEBS Lett.*, **197**,45-59.
- Matsukura, M., Shinozuka, K., Zon, G., Mitsuya, H., Reitz, M., Cohen, J.S., Bruder, S., 1987.** Phosphorothioate analogs of oligonucleotides inhibitions of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **84**,7706-7710.
- Mc Grane, V., Carlson, J.O., Miller, B.R., Beaty, B.J., 1988.** Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **39**,502-510.
- Mikhailov, V.S., Ataeva, J.O., Marlyev, K.A., Kullyev, D.K., 1986a.** Change in the DNA polymerase activities in the pupae of the silkworm *Bombyx mori* after infection with nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.*, **67**,155-179.
- Mikhailov, V.S., Marlyev, K.A., Ataeva, J.O., Kullyev, P.K., Atvazhev, A.M., 1986b.** Characterization of 3' --> 5' exonuclease associated with DNA polmymerase of silkworm nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res.*, **14**,3841-3857.
- Miller, L.H., Sakai, R.K., Romans, P., Gwadz, R.W., Kaitoff, P., Coon, H.G., 1987.** Stable ingration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* (Washington), **237**,779-781.
- Miller, L.K., Jewell, J.E., Browne, D., 1981.** Baculovirus induction of DNA polymerase. *J. Virol.*, **40**,305-308.
- Miller, L.K., 1981.** Construction of a genetic map of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by marker rescue of temperature-sensitive mutants. *J. Virol.*, **39**,973-976.
- Miller, L.K., Trimarchi, R.E., Browne, D., Pennock, G.P., 1983.** A temperature sensitive mutant of the baculovirus *Autographa californica* nuclear

- polyhedrosis virus defective in an early function required for further gene expression. *Virology*, **126**,376-380.
- Miroshnichenko, O.I., Powomareva, J.I., Tikchonenki, T.I., 1989.** Inhibition of adenovirus 5 replication in cos-1 cells by antisense RNAs against the viral E1a region. *Gene*, **84**,83-89.
- Momoyoma, K., Sano, T., 1989.** Developmental stage of Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* Bate, susceptible to baculoviral mid-gut gland necrosis (BMV) virus. *J. Fish Dis.*, **12**,585-589.
- Monroe, T.J., Muhlmann-Diaz, M.C., Kovach, M.J., Carlson, J.O., Bedford, J.S., Beaty, B.J., 1992.** Stable transformation of a mosquito cell line results in extraordinary high copy numbers of the plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**,5725-5729.
- Munroe, S.H., 1988.** Antisense RNA inhibits splicing of pre-mRNA *in vitro*. *EMBO J.*, **7**,2523-2532.
- Morris, A.C., Eggleston, P., Crampton, J.M., 1989.** Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. *Med. Vet. Entomol.* **3**,1-7.
- Morris T.D., Miller, L.K., 1992.** Promoter influence on baculovirus -mediated gene expression in permissive and non permissive insect cell lines. *J. Virol.*, **66**,7397-7405.
- Morris, T.D., Miller, L.K., 1993.** Characterization of productive and non-productive AcMNPV infection in selected insect cell lines. *Virology*, **197**,339-348.
- Moss, R.E., 1985.** Ph D. Thesis Harvard University Cambridge, Massachusetts, USA.
- Munroe, S.H., 1988.** Antisense RNA inhibits splicing of pre-mRNA *in vitro*. *EMBO J.*, **7**,2523.
- Mulligan, R.C., Berg, P., 1981.** Selection for animal cells that express the *E.coli* gene coding for xantine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**,2072-2076.
- Nissen, M.S., Friesen, P.D., 1989.** Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. *J. Virol.*, **63**,493-503.
- Ooi, B.G., Miller, L.K., 1988.** Regulation of host RNA level during baculovirus infection. *Virology*, **166**,515-523.
- Ooi, B.G., Rankin, C., Miller, L.K., 1989.** Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrine gene. *J. Mol. Biol.*, **210**,721-736.

- Ooi, B.G., Miller, L.K., 1991.** The influence of antisense RNA of the transcriptional mapping of the 5' terminus of baculovirus RNA. *J. Gen. Virol.*, **72**,527-534.
- Ooi, B.G., Miller, L.K., 1992.** Transcription of the baculovirus polyhedrin gene reduces the level of an antisense transcript initiated downstream. *J. Virol.*, **64**,3126-3129.
- Oellig, C., Happ, B., Müller, T., Doerfler, W., 1987.** Overlapping sets of viral RNAs reflect the array of polypeptides in the *EcoRI*-J end N fragments (map positions 81.2 to 85.0) of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *J. Virol.*, **61**,3048-3087.
- O'Reilly, D.R., Crawford, A.M., Miller, L.K., 1989a.** Viral proliferating cell nuclear antigen. *Nature* (London), **337**,606.
- O'Reilly, D.R., Luckow, V.A., Miller, L.K., 1989b.** A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glycosyl transferase. *Science* (Washington), **145**,1110-1112.
- Overstreet, R.M., 1978.** Marine maladies ? Worms, germs, and other symbionts from the Northern Gulf of Mexico. Mississippi-Alabama Sea Grant Consortium Publ. No. MASGP 78-021,140p.
- Overstreet, R.M., Stuck, S., Hawkins, W.E., 1988.** Experimental infections with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea : Decapoda) as a bioassay. *J. Wld. Aquacult. Soc.*, **19**,175-187.
- Palmer, T.D., Hock, R.A., Osborne, W.R.A., Miller, A.D., 1987.** Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine deficient human cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**,1055-1059.
- Pargington, S., Yu, H., Lu, A., Carstens, E.B., 1990.** Isolation of temperature sensitive mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus : phenotype characterization of baculovirus mutants defective in very late gene expression. *Virology*, **175**,91-102.
- Passarelli, A.L., Miller, L.K., 1993.** Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression : *ie-1*, *ie-n*, and *lef-2*. *J. Virol.*, **67**,2149-2158.
- Pearson, M., Bjorson, R., Pearson, G., Rohrmann, G., 1992.** The *Autographa californica* baculovirus genome evidence for multiple replication origin. *Science* (Washington), **257**,1382-1384.
- Perucho, M., Hanahan, D., Wigler, M., 1980.** Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. *Cell*, **22**,309-317.
- Possee, R.D., Howard, S.C., 1987.** Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **70**,1273-1279.

- Postel, E.H., Flint, S.J., Kessler, D.J., Hogan, M.E., 1991.** Evidence that a triplex forming oligodeoxynucleotide binds to the *c-myc* promoter in HeLa cells, thereby reducing *c-myc* mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**,8227-8231.
- Qian, J., Hongo, S., Jacobs-Lorena, M., 1988.** Antisense ribosomal protein gene expression specifically disrupt oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl., Acad. Sci. USA*, 9601.
- Qin, J., Liu, A., Weaver, R.F., 1989.** Studies on the control region of the p10 gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen Virol.*, **70**,1273-1279.
- Roelvink, P.W., van Meer, M.M.M., de Kurt, C.A.D., Possee, R.P., Hammock, R.D., Vlak, J.M., 1992.** Dissimilar expression of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin and p10 genes. *J. Gen. Virol.*, **73**,1481-1989.
- Rezaian, M.A., Symons, R.H., 1986.** Antisense regions in satellite RNA of cucumber mosaic virus form stable complexes with the viral coat protein gene. *Nucleic Acids Res.*, **14**,3229-3239.
- Rice, W.C., Miller, L.K., 1986.** Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in non permissive *Drosophila* cell. *Virus Res.*, **6**,155-172.
- Rio, D.C., Rubin, G.M., 1985.** Transformation of cultured *Drosophila melanogaster* cells with a dominant selectable marker. *Mol. Cell. Biol.*, **5**,1833-1834.
- Robins, D.M., Ribley, S., Henderson, A.S., Axel, R., 1981.** Transforming DNA integrate into the host chromosome. *Cell*, **23**,29-39.
- Rhodes, A., James, W., 1990.** Inhibition of human immunodeficiency virus replication in cell culture by endogenously synthesized antisense RNA. *J. Gen. Virol.*, **71**,1965-1974.
- Rodems, S.M., Friesen, P.D., 1993.** The *hr5* transcriptional enhancer stimulates early expression from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome but is not required for virus replication. *J. Virol.*, **67**,5776-5785.
- Rohrmann, G.F., 1992.** Baculovirus structural proteins. *J. Gen. Virol.*, **73**,749-761.
- Rolling, F., 1992.** Vecteurs dérivés du densovirus de *Junonia coenia* (JcDNV) exprimant sous forme épisomale ou intégré des gènes étrangers dans des cellules d'insecte. Thèse Doct., Univ. Aix-Marseille 2. 513p.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, J., 1989.** Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Sang, J.H., Sinclair, J.H., Burke, J.F., Ish-Horowics, D., 1984.** Rescue of a *Drosophila* temperature sensitive mutant cell line by DNA transfection. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **10**,573-577.

- Sano, T., Nishimura, T., Fukuda, H., Hayashida, T., Momoyama, K., 1984.** Baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) larvae in japanese intensive culture systems. *Helgöäder Meeresunters*, **37**,255-664.
- Sarvin, P.S., Argrawal, S.J., Civeira, M.P., Goodchild, J., Ikeuchi, T., Zamecnik, P.C., 1988.** Inhibition of acquired immunodeficiency syndrome virus by oligonucleotide methylphosphonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**,7448-7451.
- Sarver, N., Cantin, E.M., Chang, P.S., Zaia, J.A., Ladne, P.A., Stephens, D.A., Rossi, J.J., 1990.** Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science (Washington)*, **247**,1222-1225.
- Schmike, R.T., 1988.** Gene amplification in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **263**,5989.
- Shotkoski, F.A., Fallon, A.M., 1990.** Genetic changes in methotrexate-resistant mosquito cells. *Arch. Insect Biochem. Phys.*, **15**,79-92.
- Simcox, A.A., Cheney, C.M., Hoffman, E.P., Shearn, A., 1985.** A deletion of the 3' end of the *Drosophila melanogaster* hsp70 gene increases stability of mutant mRNA during recovery from heat shock. *Mol. Cell. Biol.*, **5**,3397-3402.
- Simon, M., Edelman, E.R., De Keyser, J-l., Langer, R., Rosenberg, R.D., 1992.** Antisense *c-myc* oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulating *in vivo*. *Nature (London)*, **359**,67-70.
- Sinclair, J.H., Sang, J.H., Burke, J.F., Ish-Horowicz, D., 1983.** Regulated expression of a *Drosophila melanogaster* heat shock locus after stable integration in a *Drosophila hydei* cell line. *Nature (London)*, **306**,198-200.
- Sioud, M., Drlica, K., 1991.** Prevention of human immunodeficiency virus type 1 integrase expression in *Escherichia coli* by ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**,7303-7307.
- Smith, C., Aurelian, L., Reddy, M.P., Miller, P.S., Ts'o, P.O.P., 1986.** Antiviral effect of an oligo(nucleotide) methylphosphonate complementary to the splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early pre-mRNA 4 and 5. *Biochemistry*, **83**,2787-2791.
- Southern, P.J., Berg, P., 1982.** Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**,327-341.
- Stevens, J.G., Wagner, E.K., Devi-Rao, G.B., Cook, M.L., Feldman, L.T., 1987.** RNA complementary to a herpes virus alfa gene mRNA is prominent in latency infected neuron. *Science (Washington)*, **235**, 1056-1059.
- Summers, M.D., 1977.** Characterization of shrimp baculovirus. Environ. Prot. Ag. Report Nr. EPA-600/3-77-130.

- Symons, R., 1989.** Pathogenesis by antisense. *Nature* (London), **338**,542-543.
- Takayama, K.M., Kwiya, S., Weiss, S., Chada, K., Inouye, S. Inouye, M., 1989.** Antisense RNA mediated inhibition of viral infection in tissue culture and transgenic mice. In : Cech, T.R.(Ed.), p.299-311. UCLA Symp. on Molecular Biology of RNA. Keystone, Vol. 94, Liss, New York.
- Takayama, K.M., Inouye, M., 1990.** Antisense RNA. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 155-174.
- Theilman, D.A., Stewart, S., 1991.** Identification and characterization of the IE1 gene of *Orgyia pseudosugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, **180**,492-508.
- Theilman, D.A., Stewart, S., 1992.** Molecular analysis of the trans-activating IE-2 gene of *Orgyia pseudosugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, **187**,84-96.
- Theilman, D.A., Stewart, S., 1993.** Analysis of the *Orgyia pseudosugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus transactivator IE-1 and IE-2 using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, **74**,1819-1826.
- Thierry, A.R., Rahman, A., Dritschilo, A., 1992.** Liposomal delivery as a new approach to transport antisense oligonucleotides. In : Gene Regulation : Biology of Antisense RNA and DNA (R. P. Erickson, J.G. Izant, Eds.), Raven Press, New York.
- Thiem, S.M., Miller, L.K., 1991.** A baculovirus gene with a novel transcription pattern encodes a polypeptide with a zinc finger and a leucine zipper. *J. Virol.*, **63**,4489-4497.
- Tomalski, M.D., Wu, J., Miller, L.K., 1988.** The location, sequence, transcription and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology*, **167**,591-600.
- Trono, D., Fienberg, M.D., Baltimore, D., 1989.** HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. *Cell*, **59**,113-120.
- Truman, R.B., Bell, T.A., Lightner, D.V., Hazanow, S., 1990.** Unique physicochemical properties of the occluded penaeid shrimp baculovirus and their use in diagnosis of infections. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**,128-131.
- Tsing, A., Bonami, J.R., 1987.** A viral disease of the shrimp, *Penaeus japonicus* Bate. *J. Fish Dis.*, **10**,139-141.
- Vago, C., 1966.** A virus disease in crustacean. *Nature* (London), **209**,1290.
- Vickers, J.E., Spradbrow, P.B., Lester R.D.G., Perbenton, J.M., 1990.** Detection of baculoviral DNA in infected prawns using polymerases chain reaction. Symp. Diseases in Asian Aquaculture, Bali (Indonesia). Asian Fish. Soc.

- Vlak, J.M., Smith, G.E., Summers, M.D., 1981.** Hybridization selection and *in vitro* translation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mRNA. *J. Virol.*, **40**,3,762-771.
- Wadson, P.H., Pon, R.T., Shiu, R.T., 1991.** Inhibition of expression by phosphorothioate antisense oligonucleotides identifies a critical role for *c-myc* in the growth of human breast cancer. *Cancer Res.*, **51**,3996-4000.
- Walker, V.K., 1988.** Gene transfer in insects. *Adv. Cell Culture*, **7**,87-124.
- Wang, X., Kelly, 1983.** Baculovirus replication : purification and identification of the *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus-induced DNA polymerase. *J. Gen. Virol.*, **64**,2229-2236.
- Weerasinghe, M., Liem, S.E., Asad, S., Read, S.E., Joshi, S.,1991.** Resistance to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in human CD4⁺ lymphocyte derived cell lines conferred by using retroviral vectors expressing an HIV-1 RNA-specific ribozyme. *J. Virol.*, **65**,5531-5534.
- Weyer, U., Possee, R.D., 1988.** Functional analysis of the p10 gene 5' leader sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic. Acids Res.*, **16**,3635-3653.
- Witford, M.S., Stewart, S., Kusio, J., Faulkner, P., 1989.** 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.
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L-S., Pellicer, A., Cheng, Y-C., Axel, R., 1977.** Transfer of purified herpes simplex virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell*, **11**,223-232.
- Wigler, W., Perucho, M., Kurtz, D., Dana, S., Pellicer, A., Alex, R., Siversteins, S., 1980.** Transformation of mammalian cells with amplifiable dominant-acting gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **177**,3567-3570.
- Wyss, C., 1981.** Transformation of a mutant *Drosophila* cell line *in vitro*. *Experientia*, **37**,665.
- Xia, Y., Van Etten, J.L., Dobos, P., Ling Y.Y., Krell, P.J., 1993.** Adenine DNA methyl transferase M.CviRI expression accelerates apoptosis in baculovirus-infected cells. *Virology*, **196**,817-824.
- Yang, C.L., Stetler, D.A., Weaver, R.F., 1991.** Structural comparison of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerase and the three nuclear RNA polymerases from the host, *Spodoptera frugiperda*. *Virus Res.*, **20**,251-264
- Yokoyama, K., Imamoto, F., 1987.** Transcriptional control of the endogenous *MYC* protooncogene by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**,7363-7367.

- Young, J.C., MacKinnon, E.A., Faulkner P., 1993.** The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of *Spodoptera frugiperda* cells *in vitro* infected by *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Struct. Biol.*, **110**,141-153
- Yu, A.C.H., Lee, Y.L., Eng, L.F., 1991.** Inhibition of GFA synthesis by antisense RNA in astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, **30**,72-79.
- Zamecnik, P.C., Stenphenson, M.L., 1978.** Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by specific oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**,280-294.
- Zamecnik, P.C., Goodchild, J., Taguchi, Y., Sarin, P.S., 1986.** Inhibition of replication and expression of human T-cell lymphotropic virus type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complementary to viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**,4143-4146.
- Zanotto, P.M.A., Kessing, B.D., Maruniak, J.E., 1993.** Phylogenetic interrelationships among baculoviruses : evolutionary rates and host associations. *J. Invertebr. Pathol.*, **62**,147-164.
- Zerial, A., Thuong, N.T., Helène, C., 1987.** Selective inhibition of the cytopathic effect of the type A influenza viruses by oligodeoxynucleotides covalently linked to an intercalating agent. *Nucleic. Acids Res.*, **15**,9909-9919.
- Zuiderma, D., Schouten, A., Usmany, M., Made, A.J., Belsham, G.J., Roosien, S., Klinge-Roode, A.C., van Lent, J.W.M., Vlak, J.M., 1990.** Expression of cauliflower mosaic virus gene in insect cells using a novel polyhedrin based baculovirus expression vector. *J. Gen. Virol.*, **70**,2201-2209.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	4
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	7
1) LES BACULOVIRUS	8
1.1) Introduction	8
1.2) Classification, hôtes et phylogénie des baculovirus	9
1.3) Comparaison entre baculovirus d'insecte et de crevette	10
1.4) Cycle viral	11
1.4.1) infection primaire des cellules de l'hôte.....	11
1.4.2) premier cycle de réplication virale	11
1.4.3) infection secondaire de l'organisme.....	11
1.4.4) inclusion des virions dans des structures protéiques.....	11
1.4.5) les baculovirus vecteurs d'expression	12
1.4.6) interaction hôte-pathogène.....	12
1.4.6.1) rôle du virus dans l'apoptose.....	12
1.4.6.2) modifications endocrinologiques de l'hôte.....	13
1.5) Transcription des gènes viraux.....	14
1.5.1) transcription des gènes précoces.....	14
1.5.2) signaux et site d'initiation de transcription des gènes précoces.....	15
1.5.3) la transcription des gènes tardifs.....	16
1.5.4) signaux de transcription des gènes tardifs et très tardifs.....	16
1.5.5) extinction de la transcription des gènes cellulaires en fin d'infection	17
1.5.6) les "homologous regions"(<i>hr</i>) : des activateurs transcriptionnels viraux agissant en <i>cis</i>	17
1.5.7) l'ARN polymérase virale	18
1.5.8) transcription de gènes viraux par des extraits nucléaires.....	18
1.5.9) la transcription anti-sens des gènes viraux	19
1.5.10) épissage des ARN viraux	20
1.5.11) ARN polycistronique.....	20
1.5.12) activité relative des promoteurs des différentes classes.....	20
1.6) Les gènes très précoces <i>ie1</i> et <i>ie0</i> et leurs implications dans la régulation génique.....	21
1.6.1) un mutant thermosensible d' <i>AcMNPV</i> affecté dans l'expression des gènes viraux alpha, bêta et gamma	21

1.6.2) un promoteur précoce dont l'activité dépend du virus : test pour localiser la(les) fonction(s) alpha activatrice(s)	21
1.6.3) localisation du gène <i>ie1</i> d'AcMNPV	22
1.6.4) IE1 protéine d'AcMNPV activatrice de promoteur	22
1.6.5) transcription du gène <i>ie1</i> d'AcMNPV.....	23
1.6.6) épissage d'ARN spécifique du gène <i>ie1</i> et localisation des gènes <i>ie0</i> et <i>me53</i>	23
1.6.7) transcription et épissage de <i>ie1</i>	25
1.6.8) détection immunologique des protéines IE1 et IE0 du NPV d' <i>Orgyia pseudosugata</i> (<i>OpMNPV</i>).....	25
1.6.9 la protéine IEN d'AcMNPV activatrice en <i>trans</i> de <i>ie1</i>	26
1.6.10) régulation de <i>ie1</i> et des activateurs en <i>trans</i> associés	27
1.6.11) IE1 protéine activatrice de gènes tardifs.....	28
1.6.12) retard sur gel d'une sonde <i>hr</i> par formation de complexes protéine IE1-élément <i>hr5</i>	29
1.6.13) les différents domaines fonctionnels de IE1	29
1.6.14) mutant d'IE1 dominant en <i>trans</i>	30
1.7) Le gène de l'ADN polymérase viral (<i>dnapol</i>) et les gènes en relation avec la réplication de l'ADN viral	31
1.7.1) activité biochimique de l'ADN polymérase virale	31
1.7.2) localisation du gène <i>dnapol</i> par sonde hétérologue.....	31
1.7.3) transcription du gène <i>dnapol</i>	32
1.7.4) transcription anti-sens du gène <i>dnapol</i>	33
1.7.5) le gène <i>p143</i> de l'hélicase, ses homologues de signaux transcriptionnels et sa régulation.....	33
1.7.6) le gène <i>p143</i> et la spécificité virale	34
1.7.7) origines de réplication du virus	34
1.7.8) cycline virale	36
1.8) Conclusion	37
2) LES ARN ANTI-SENS INHIBITEURS DE GENES VIRAUX.....	38
2.1) Techniques d'immunisation anti-virale pouvant remplacer la vaccination	38
2.1.1) limites d'utilisation de la vaccination anti-virale	38
2.1.2) expression de protéines et d'ARN d'origine virale capables de bloquer la réplication virale.....	38
2.2) Utilisation respective des oligonucléotides et des ARN anti-sens comme inhibiteurs de gènes cellulaires ou viraux	40

2.3) Mécanismes de blocage de l'expression des gènes par molécules anti-sens	40
2.3.1) caractéristiques générales.....	40
2.3.1) blocage par ARN anti-sens.....	41
2.3.2) blocage par oligonucléotides anti-sens.....	41
2.4) Utilisation des oligonucléotides anti-sens.....	42
2.4.1) choix de la nature chimique des oligonucléotides.....	42
2.4.2) régions cibles des oligonucléotides anti-sens	42
2.4.3) introduction des oligonucléotides anti-sens dans la cellule	43
2.4.4) effets des oligonucléotides anti-sens	43
2.5) ARN anti-sens naturels et artificiels	44
2.5.1) les ARN anti-sens moyen naturel de régulation des gènes procaryotes et eucaryotes	44
2.5.2) régions cibles des ARN anti-sens	46
2.5.3) expression des ARN anti-sens artificiels dans les cellules	46
2.5.4) analyse des effets des ARN anti-sens artificiels	47
2.6) Conclusion	49
3) TRANSFORMATION STABLE DE CELLULES DE VERTEBRES ET D'INSECTES	50
3.1) Introduction	50
3.2) Phénomène d'intégration illégitime de l'ADN transfecté.....	51
3.2.1) intégration aléatoire.....	51
3.2.2) répétition en tandem.....	51
3.2.3) recombinaison entre plasmides co-transfectés	52
3.2.4) les marqueurs de sélection.....	52
3.2.5) l'amplification génique.....	52
3.2.6) intégration spécifique	53
3.3) Transformation de cellules de mammifères.....	54
3.3.1) marqueurs de sélection.....	54
3.3.2) amplification des séquences transfectées	54
3.3.3) maintien épisomal de vecteurs d'expression viraux dans les cellules de mammifères	55
3.4) Transformation de cellules d'insectes	56
3.4.1) gènes marqueurs de sélection	56
3.4.2) co-transfection dans les cellules d'insectes.....	57
3.4.3) amplification génique en cellules d'insectes.....	57

3.4.4) l'élément transposable P de drosophile	58
3.4.5) promoteurs actifs en cellules d'insectes lépidoptères.....	58
3.5) Conclusion	60
RESULTATS ET DISCUSSION.....	68
1) EXPRESSION D'ARN ANTI-SENS SPECIFIQUES DU BACULOVIRUS AcMNPV EN CELLULES DE LEPIDOPTERE.....	69
1.1) Publication 1: Un nouveau système de vecteur d'expression pour l'obtention de lignées cellulaires continues d'insecte.....	69
1.2) Expression transitoire des gènes cible.....	99
et des ARN anti-sens.....	99
1.2.1) expression transitoire des ARN anti-sens	99
1.2.2) expression transitoire des gènes viraux.....	100
1.2.3) effet des ARN anti-sens sur les gènes viraux transfectés	101
1.3) lignées cellulaires exprimant les régions cible en orientation anti- sens	102
2) REGULATION DU GENE DE L'ADN POLYMERASE D'AcMNPV.....	105
2.1) Publication 2 : Régulation temporelle d'un promoteur complexe et non conventionnel par des produits viraux.....	105
2.2) Publication 3: Séquence et analyse transcriptionnelle d'un gène anti- sens par rapport au promoteur du gène de l'ADN polymérase du virus de la polyédrose nucléaire d' <i>Autographacalifornica</i>	135
CONCLUSION.....	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	151
TABLE DES MATIERES.....	167
ANNEXE.....	174

ILLUSTRATIONS

Publication 1 :

TABLE 1 Fréquence de transformation des cellules SF9 par différents plasmides.....	89
TABLE 2 Quantification du nombre de copies intégrées pour chacun des gènes.....	90
Fig. 1. Les différentes constructions permettant l'expression du gène <i>neo^r</i> et/ou de la région 5' du gène <i>dnapol</i>	91
Fig. 2. expression stable de la β -galactosidase.....	92
Fig. 3. Efficacité accrue de la transcription dans les lignées cellulaires établies avec pBRJneo Δ nsh ou un plasmide dérivé.....	93
Fig. 4. Intégration et nombre de copies de vecteurs d'expression intégrés dans l'ADN cellulaire.....	94
Fig. 5. La transcription du promoteur A ₃ est activée en <i>cis</i> et en <i>trans</i> par une séquence du densovirus <i>JcDNV</i> et la protéine IE1 du baculovirus <i>AcNPV</i>	95
Fig. 6. Les ARNm majoritaires de l'unité de transcription AdpS mesurent 1,4 kilo bases.....	96
Fig. 7. Les plasmides des couples (pBRJneo Δ nsh; pAdpS) et (pBRJneo; pAdpS) sont présents à proximité dans l'ADN des lignées établies par leur co-transfection.....	97

Fig. 1. Co-expression du gène <i>iel</i> et de son ARN anti-sens.....	103
Fig. 2. Effet de <i>iel</i> sur la transcription des promoteurs des gènes A ₃ et <i>ie0</i>	104

Publication 2 :

Fig. 1 . Schematic representation of <i>dnapol</i> chimeric constructs.....	127
Fig. 2 . Transient expression and <i>iel</i> transactivation of <i>dnapol</i> promoter in Sf9 cells.....	128
Fig. 3 . Western blot analysis of viral or transient expression of <i>ie0</i> and <i>iel</i> immediate early genes.....	129
Fig. 4 . Kinetics of mRNA accumulation for <i>dna pol</i> and ORF-2 genes.....	130 et 131
Fig. 5 . Kinetics of <i>dnapol</i> mRNA degradation at 4 hours and 9 hours p.i.....	132
Fig. 6 . Inhibition of <i>dnapol</i> transcription is not mediated by ORF-2 expression.....	133

Publication 3 :

Fig. 1. Map and sequence of <i>AcNPV</i> ORF-2 gene	143
---	-----

Publication 3 :

Fig. 1. Map and sequence of <i>AcNPV</i> ORF-2 gene	143
Fig. 2. Comparison of peptidic sequence of <i>AcNPV</i> and <i>LdNPV</i> ORF-2.....	144
Fig. 3. 3' end mapping of ORF-2 RNA.....	145

ANNEXE

ANNEXE 1) LES MALADIES VIRALES DE CREVETTE	176
1.1) Introduction	176
1.2) Répartition géographique et espèces affectées par les différents virus.....	177
1.3) Histopathologie, ultrastructure et diagnostic des virus.....	179
1.3.1) virus de la nécrose hypodermale et hématopoïétique infectieuse (IHHNV).....	179
1.3.1.1) histologie.....	179
1.3.1.2) ultrastructure.....	179
1.3.1.3) diagnostic	179
1.3.2) virus de l'hépatopancréas de type parvovirus (HPV).....	179
1.3.2.1) histologie.....	179
1.3.2.2) ultrastructure.....	180
1.3.3) virus de type <i>Reoviridae</i> (REO)	180
1.4) Baculovirus de crevette	181
1.4.1) les différents baculovirus et leurs caractéristiques morphologiques et infectieuses	181
1.4.2) traitement des animaux infectés.....	182
1.4.3) spécificité des virus	182
1.4.4) transmission.....	182
1.4.5) sensibilité à l'infection suivant l'age	182
1.4.6) diagnostic.....	183
1.4.6.1) microscopie optique	183
1.4.6.2) essai biologique et procédure d'activation de la maladie.....	183
1.4.7) connaissances sur la biologie moléculaire virale.....	183
1.4.7.1) propriétés immunologiques.....	183
1.4.7.2) extraction de l'ADN	183
1.4.7.3) PCR avec amorces dégénérées	184
1.4.8) propagation <i>in vitro</i>	184
1.5) Conclusion	185

ANNEXE 1) LES MALADIES VIRALES DE CREVETTE

1.1) Introduction

La production mondiale de crevettes pénéides a connu une progression importante au cours des dernières décennies. Cette progression a été obtenue non seulement par une extension des aires géographiques d'élevage mais également par l'augmentation de la taille et l'intensification des élevages. L'ensemble de ces conditions a favorisé l'apparition d'épizooties dont les effets économiques sont particulièrement graves. L'une des causes principales de ces épidémies est d'origine virale et implique notamment des virus de type baculovirus.

La virologie des invertébrés est peu développée par rapport aux connaissances accumulées chez les vertébrés. En conséquence, l'étude des maladies virales chez les crustacés est rendue difficile par le manque de données de base. L'absence de lignées cellulaires de crustacé contribue grandement à ces lacunes. L'étude de la virologie des crustacés a débuté par l'observation d'un virus chez le crabe par **Vago en 1966**. Depuis, le domaine d'investigation a été étendu aux crustacés ayant un intérêt économique, particulièrement aux espèces utilisées en aquaculture. Parmi ces espèces les crevettes pénéides sont d'une grande importance. On distingue actuellement 6 virus infectant les crevettes pénéides (*Crustacea, Decapoda, Natantia, Penaeus*) :

- 3 *Baculoviridae* : *Baculovirus penaei* (BP) (**Couch, 1974a; 1974b**), le baculovirus de type *monodon* (MBV) (**Lightner et Redman, 1981**) et le virus de la nécrose baculovirale de l'intestin moyen (BMV) (**Sano et coll, 1981**).
- 2 *Parvoviridae* : le virus de l'hépatopancréas de type parvovirus (HPV) (**Lightner et Redman, 1985**) et le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (IHHNV) (**Lightner et coll., 1983; Bonami et coll., 1990**).
- 1 virus de type *Reoviridae* : REO (**Tsing et Bonami, 1987**).

1.2) Répartition géographique et espèces affectées par les différents virus

Six virus ont été répertoriés pour les différentes espèces de pénéides (Tableau 1). Toutes les espèces sont affectées bien que certaines d'entre elles n'ait pas subi d'épizooties sérieuses. Cela est dû soit à la tolérance vis à vis du virus, soit à une non contamination de l'aire géographique de l'hôte. Les espèces gravement affectées par les maladies virales sont : *P. vanamei*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. marginatus* (infection par BP), *P. stylirostris* (infection par IHHNV), *P. japonicus* (infection par BMV et REO), *P. semisulcatus* et *P. merguiensis* (HPV).

Tableau 1 : La spécificité des virus de pénéides (Lightner et coll., 1989)

sous-genre et espèce des hôtes	VIRUS					
	BP	MBV	BMV	IHHNV	HPV	REO
<i>Lipopenaeus</i>						
<i>P. vanamei</i>	+++	+		+	+	
<i>P. stylirostris</i>	++			+++		
<i>P. setiferus</i>	+			+(e)		
<i>P. Schmitti</i>	++					
<i>Penaeus</i>						
<i>P. monodon</i>	+	++		++	++	++
<i>P. esculentus</i>		+			++	
<i>P. semisulcatus</i>		+		+	+++	
<i>Penneropenaeus</i>						
<i>P. merguiensis</i>		++		+++		
<i>P. indicus</i>					++	
<i>P. chinensis (=orientalis)</i>					++	
<i>P. penicillatus</i>	++	++			++	
<i>Marsupenaeus</i>						
<i>P. japonicus</i>			+++	++(e)		+++
<i>P. plebejus</i>		++				
<i>Farfantepenaeus</i>						
<i>P. aztecus</i>	+++			+(e)		
<i>P. duorarum</i>	+++			+(e)		
<i>P. brasiliensis</i>	++					
<i>P. pauliensis</i>	++					
<i>P. subtilis</i>	++					
<i>Merlicertus</i>						
<i>P. kerathurus</i>		+				
<i>P. marginatus</i>	+++					
<i>P. plebejus</i>		++				

BP = *Baculovirus penaei*, MBV = baculovirus de type *monodon*, BMV = virus de la nécrose baculovirale de l'intestin moyen, IHHNV = virus de la nécrose hypodermale et hématopoiétique infectieuse, HPV = virus de l'hépatopancréas de type parvovirus, REO = virus de type réovirus.

+ = infections observées mais sans signes de maladie

++ = infections pouvant résulter en une maladie modérée et des mortalités

+++ = infections résultant habituellement en une épizootie sérieuse

(e) = infections expérimentales, pas d'infections naturelles encore observées

La répartition géographique des différents virus est décrite au tableau 2 (Lightner et coll., 1989). BP est largement présent parmi les pénéides sauvages et cultivés d'Amérique, et n'a pas été observé ailleurs. MBV a également un grand nombre d'espèces hôtes et est présent dans les populations sauvages de pénéides dans les zones des côtes de l'Asie, en Australie, en Afrique, au Moyen-Orient et au sud de l'Europe. En dehors de ses hôtes habituelles MBV a également été observé sur des crevettes américaines exposées au virus. BMV n'a été mis en évidence que sur une seule espèce (*P. japonicus*) et seulement au Japon. Par contre, IHNV a une distribution mondiale dans les élevages mais sa présence dans les populations sauvages reste inconnue. Peu de données sont disponibles sur REO qui n'a été observé que dans très peu de cas.

Tableau 2 : répartition géographique des virus de pénéides (Lightner et coll., 1989)

virus régions	distribution parmi les pénéides sauvages	introduction dans de nouvelles
BP	Amériques : côte atlantique : Sud-Est des USA, golfe du Mexique Hawaï	pas d'introduction majeure
MBV	Indopacifique : Chine populaire, Taïwan, Philippines, Malaisie, Singapour, Indonésie Australie Afrique : Afrique du Sud Moyen Orient : Israël, Koweït Méditerranée : Italie	Pacifique : Tahiti, Hawaï Amériques : Mexique, Equateur, Brésil, Sud-Est des USA
BMV	Asie : Japon	
HPV	Indopacifique : Chine populaire, Taïwan, Philippines, Malaisie, Singapour, Indonésie Australie Afrique : Kenya Moyen Orient : Israël, Koweït	Amériques : Brésil, Equateur Pacifique : Hawaï
IHNV	Asie : Malaisie, Indonésie, Philippines, Singapour	Amériques : Sud-Est des USA, Caraïbes, Brésil, Venezuela, Equateur, Pérou, Amérique centrale Pacifique : Hawaï Moyen orient : Israël
REO	Asie : Japon, Malaisie	Pacifique : Hawaï Europe : France

BP = *Baculovirus penaei*, MBV = baculovirus de type *monodon*, BMV = virus de la nécrose baculovirale de l'intestin moyen, IHNV = virus de la nécrose hypodermale et hématopoïétique infectieuse, HPV = virus de l'hépatopancréas de type parvovirus, REO = virus de type réovirus.

1.3) Histopathologie, ultrastructure et diagnostic des virus

La nature des lésions observées chez les animaux infectés n'étant pas suffisamment spécifique de l'étiologie virale, le diagnostic des infections par les virus HPV, IHHNV et REO est effectué par microscopie optique. Dans un second temps nous aborderons plus en détail l'étude des baculovirus.

1.3.1) virus de la nécrose hypodermale et hématopoïétique infectieuse (IHHNV)

1.3.1.1) histologie

L'infection est visualisée en histologie (**Lightner et coll., 1983; 1989**) par la présence de corps nucléaire (corps de Cowdry de type A). Ces corps d'inclusion sont éosinophiles et Feulgen négatifs (absence d'ADN). Ils sont présents dans des noyaux hypertrophiés et anormaux. Il existe aussi des corps cytoplasmiques présentant des propriétés de coloration allant de l'éosinophilie à la basophilie. Les cellules infectées sont d'origine ectodermique (en particulier les cellules épithéliales de l'hypoderme cuticulaire) et mésodermique (en particulier les cellules des tissus hématopoïétiques).

1.3.1.2) ultrastructure

Les virions sont icosaédriques et mesurent 20 nm. Ils sont observés libres dans le noyau et le cytoplasme. Ils sont également observés en agrégats dans des corps cytoplasmiques. IHHNV a été classé provisoirement parmi les *Picornavidae* (**Lightner et coll., 1989**) puis en se basant sur la nature ADN simple brin du génome l'appartenance de ce virus à la famille des *Parvoviridae* a été proposée (**Bonami et coll., 1990**).

1.3.1.3) diagnostic

L'examen histologique direct de la population donne des faux négatifs. En effet des lots de crevettes déclarés négatifs par un examen direct, peuvent s'avérer positifs après avoir été élevés dans des conditions stressantes pendant 1 à 2 mois (procédure d'activation de la maladie) (**Lightner et coll., 1989**). Ceci n'est pas possible si l'espèce hôte est asymptomatique.

Pour ce dernier cas l'essai biologique est nécessaire. Le test consiste à infecter une espèce très sensible (*P. stylirostris* juvéniles) par injection, proximité ou ingestion des animaux d'une espèce asymptomatique à tester (**Lightner et coll., 1989**).

1.3.2) virus de l'hépatopancréas de type parvovirus (HPV)

1.3.2.1) histologie

L'infection est diagnostiquée en histologie par la présence de corps d'inclusion basophile Feulgen positif (présence d'ADN). Ces corps d'inclusions sont localisés dans les noyaux hypertrophiés et anormaux des cellules épithéliales des tubules de l'hépatopancréas (**Lightner et Redman, 1985**).

1.3.2.2) ultrastructure

Les particules virales ont un diamètre de 22-24 nm et sont assemblées en corps d'inclusion dans le stroma virogène. Le stroma virogène est nucléaire et associé avec le nucléole (**Lightner et Redman, 1985**). Ces caractéristiques sont similaires à celles des *Parvoviridae* de vertébrés (parvovirus) et d'invertébré (densovirus).

1.3.3) virus de type *Reoviridae* (REO)

Le diagnostic est opéré par observation des signes extérieurs de la maladie et par examen ultrastructural. Les lésions à REO sont éosinophiles mais peu visibles en histologie. On peut observer chez les animaux infectés des inclusions cytoplasmiques contenant des particules virales de 50 à 70 nm de diamètre. Ces corps d'inclusion sont localisés dans les cellules F et R de l'épithélium des tubules pancréatiques (**Tsing et Bonami, 1987; Lightner, 1988**). Les virions sont non enveloppés et icosaédriques (**Tsing et Bonami, 1987**).

1.4) Baculovirus de crevette

1.4.1) les différents baculovirus et leurs caractéristiques morphologiques et infectieuses

Les trois types de baculovirus de crevette peuvent être identifiés par différents facteurs (Tableau 3). Les virus *BP* (Couch, 1974b) et *MBV* (Lightner et Redman, 1981) possèdent des corps d'inclusion nucléaires : pyramidaux pour *BP* et ovoïdes pour *MBV*. La cellule infectée par *BMN* (Sano et coll., 1981) est dépourvue de corps d'inclusion. Les crevettes sont affectées par les baculovirus à des stades précoces de développement bien que les virus *MBV* (Lightner et Redman, 1981) et *BP* (Couch 1978) affectent également les adultes. Dans tous les cas l'infection est limitée aux cellules de l'hépatopancréas et de l'intestin antérieure. Généralement, chaque espèce est infectée par un seul type de virus (tableau 1 et chap. 1.2).

Tableau 3 : Caractéristiques des différents baculovirus de crevette

virus ^a et hôtes connus	stades affectés ^b	organes cibles ^c	taille des virions ^d	corps d'inclusion	références
BP <i>P. duorarum</i> <i>P. setiferus</i> <i>P. aztecus</i> <i>P. vanamei</i> <i>P. stylirostris</i> <i>P. marginatus</i> <i>P. penicillatus</i> <i>P. schmitti</i> <i>P. paulensis</i> <i>P. subtilis</i> <i>P. monodon</i>	tous L, PL L, PL	HP, IA HP, IA	74x270 54x286	pyramidaux	Overstreet, 1978 Couch, 1978 Laramore, 1977 Brock et coll., 1986 Lightner et Redman, 1988 Lightner et coll., 1989
BMV <i>P. japonicus</i>	L, PL	HP, IA	72x320	pas	Sano. et coll., 1981
MBV <i>P. monodon</i> <i>P. plebejus</i> <i>P. merguensis</i> <i>P. vanamei</i> <i>P. semisulcatus</i> <i>P. penicillatus</i>	PL, J, A PL, J, A	HP, IA HP, IA	69x275 45-55x 260-300	ovoïdes	Lightner et Redman, 1981 Doubrosky et coll., 1988 Lightner et coll., 1989

^a*BP* = *Baculovirus penaei*, *MBV* = baculovirus de type *monodon*, *BMV* = virus de la nécrose baculovirale de l'intestin moyen, *IHHNV* = virus de la nécrose hypodermale et hématopoïétique infectieuse, *HPV* = virus de l'hépatopancréas de type parvovirus, *REO* = virus de type réovirus.

^b L = larves, PL = post-larves, J = juvéniles, A = adultes. ^cHP = hépatopancréas, IA = intestin antérieur. ^dunité de mesure le nanomètre

1.4.2) traitement des animaux infectés

Les crevettes *P. monodon* infectées par MBV peuvent être traitées par un antibiotique qui arrête l'infection secondaire des animaux, mais cela ne fait que retarder la maladie (Lightner et Redman, 1981). Si les facteurs d'élevage sont optimaux, MBV est toléré par *P. monodon* (Fegan, et coll., 1991). Par contre les animaux survivant aux infections à BP sont systématiquement détruits pour éviter la contamination. Ils n'existe pas de traitement à BP et MBV mais les oeufs de crevettes infectées par MBV peuvent être décontaminés (voir paragraphe 1.4.4).

1.4.3) spécificité des virus

Le virus BP n'infectent pas les lignées de diptères et de lépidoptères comme il a été montré par Summers en 1976 (lignées cellulaire de *Aedes algopictus*, *Culex salinarus*, *Trichoplusia ni*, *Armigeres sulbatus*). Réciproquement le baculovirus d'insecte AcMNPV n'infecte pas les pénéides *P. aztecus* et les *P. setiferus* (Lightner et coll., 1973).

En condition expérimentale d'infection, MBV n'infecte pas *P. californiensis* et *P. stylirostris* (Lightner et Redman, 1981).

1.4.4) transmission

La détection de la transmission ovarienne nécessite l'emploi d'anticorps ou de sondes nucléiques. En effet Fegan et Coll. (1991) n'ont pas pu visualisé (en microscopie électronique) de virion dans les oeufs de *P. monodon* infectés par MBV. Ceci peut s'expliquer soit par une présence de virus en trop faible quantité soit par une persistance du virus sous forme d'ADN. Les mêmes conclusions sont apportées si on étudie la présence de virus sur des porteurs sains.

Les oeufs fertilisés et les nauplii de *P. japonicus* ne sont pas infectables par BMV. Les élevages peuvent donc être protégés par rinçage à l'eau des oeufs ou nauplii. Il est clair dans ce cas que la transmission verticale s'opère par contamination de la descendance par la mère (Monoyama et Sano, 1989).

1.4.5) sensibilité à l'infection suivant l'age

La prévalance du virus suivant l'age de l'hôte a été étudiée pour BP (Leblanc et Overstreet, 1990) et pour BMV (Monoyama et Sano, 1989). Les animaux âgés sont moins sensibles à BP et MBV que les larves et post-larves (Leblanc et Overstreet, 1990; Fegan et coll., 1991). Pour BMV seuls les stades larvaires et les premiers stades post-larvaires sont sensibles à l'infection (Monoyama et Sano, 1989).

1.4.6) diagnostic

Le diagnostic des maladies est établi par des méthodes de microscopie classique directement sur les animaux à tester. Cette opération peut être complétée par des procédures plus sensibles d'activation de la maladie ou faisant appel à des hôtes sur lesquels les symptômes sont plus visibles.

1.4.6.1) microscopie optique

Pour *BP* et *BMV* le diagnostic est facilité par la taille des corps d'inclusion qui sont observés à l'état frais dans les fèces, l'hépatopancréas ou l'intestin, par transition ou en contraste de phase. Les corps d'inclusion pyramidaux de *BP* mesurent de 0,5 à 12 micromètres de la base au sommet (**Couch, 1974b**). Les corps d'inclusions peuvent aussi être colorés au vert Malachite (**Lightner et coll., 1989**), cela est particulièrement intéressant pour localiser les corps d'inclusion de *MBV*. En effet ces corps d'inclusion de forme ovoïde sont plus difficiles à voir que ceux de *BP* qui sont pyramidaux. Les corps d'inclusion peuvent aussi être observés sur préparation histologique (éosinophiles). Ils sont également visibles au microscope à épifluorescence après coloration à la phoxine (**Truman, 1990**).

Pour *BMV* l'infection est contrôlée par l'observation de noyaux anormaux et hypertrophiés (**Sano et coll., 1981**) en montage frais ou préparation histologique.

1.4.6.2) essai biologique et procédure d'activation de la maladie

Les observations directes ne sont pas fiables car des animaux considérés sains par ces méthodes peuvent s'avérer infectés en utilisant des méthodes plus sensibles (**Lightner et coll., 1989**). En particulier pour *BP* et *MBV* l'infection est observable en microscopie après élevage de post-larves dans des conditions stressantes.

L'infection expérimentale est maîtrisée pour *BP* (**Overstreet et coll., 1988**, pour *MBV* (**Fegan et coll., 1991**), pour le baculovirus non inclus *BMV* (**Monoyoma et Sano, 1989**) et a été utilisée comme base d'essai biologique.

1.4.7) connaissances sur la biologie moléculaire virale

1.4.7.1) propriétés immunologiques

Des réactions croisées ont été obtenues à partir d'un sérum spécifique de baculovirus d'insecte. La polyédrine de *BP* purifié ainsi que le tissu de crevette infecté sont reconnus par l'immun-sérum (**Summers, 1977**).

1.4.7.2) extraction de l'ADN

L'ADN de *BP* a été purifié pour la première fois par **Summers (1977)**. La taille du génome de *BP* a été estimée à 114 kpb par des expériences d'étalement d'ADN. Un autre protocole de purification a été décrit depuis (**Bruce et coll., 1991**) permettant d'obtenir de l'ADN de *BP* en quantité et qualité suffisante pour obtenir un profil de restriction. L'ADN de *MBV* a été estimé à plus de 100 kpb par profil de restriction.

(Chen et coll., 1992; Chang et coll., 1993). Le clonage moléculaire de ce virus a été effectué sur 50 kpb (Mari et coll., 1992).

1.4.7.3) PCR avec amorces dégénérées

Le gène de la polyédrine de MBV a été amplifié par PCR grâce à des amorces dégénérées déterminées à partir de régions d'acides aminés conservées entre les différentes séquences de polyédrine connues (Vickers et coll., 1990; Chen et coll., 1992). La taille du fragment amplifié de MBV correspond bien à la taille prédite sur les séquences de polyédrines d'insecte. Toutefois la séquence du fragment amplifié reste inconnue.

1.4.8) propagation *in vitro*

Seules des primocultures de *P.monodon*. ont été obtenues (Chen et coll., 1989). Aucune lignée cellulaire stable n'a été décrite chez les crustacées.

1.5) Conclusion

Cinq virus de pénéides sur 6 ont été introduits dans des régions où ils étaient préalablement absents (tableau 2). Pour le contrôle d'importation d'animaux il y a un grand besoin de moyen de diagnostic adaptés. Ces moyens sont décrits dans la littérature mais ne sont pas disponibles sur le marché (immunodiagnostic, sondes nucléiques).

Un moyen d'obtenir des animaux indemnes serait de traiter les oeufs pour éviter la transmission verticale de la maladie. Ce traitement est appliqué efficacement contre la transmission de BMV. Mais la question de la présence ou non de transmission ovarienne des autres virus restera sans réponse tant que des moyens sensibles de détection ne sont pas appliqués à son étude.

L'obtention d'animaux résistants à des maladies virales est une autre voie d'approche. Mais les travaux de génétique classique et moléculaire ne font que commencer chez la crevette. Il existe, pour les baculovirus, un virus d'insecte apparenté à ceux des crustacés et dont l'état des connaissances est avancé. Ce modèle permet d'étudier la faisabilité de l'inhibition des baculovirus par des méthodes du génie génétique.



34980 St-Géroy-du-Pesc - Tél. 67 84 27 66